

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ENDODONTIA

CAUANA OLIVA TAVARES

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DA ENZIMA PURINA NUCLEOSÍDEO
FOSFORILASE (PNF) EM POLPAS DE RATOS EXPOSTAS AO MEIO
BUCAL**

Porto Alegre
2014

CAUANA OLIVA TAVARES

**IMUNOLocalização da enzima Purina Nucleosídeo
Fosforilase (PNF) em Polpas de ratos expostas ao meio
BUCAL**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre na área de Endodontia pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Porto Alegre
2014

Catálogo na Publicação

T231i Tavares, Cauana Oliva
Imunolocalização da enzima Purina Nucleosídeo
Fosforilase (PNF) em polpas de ratos expostas ao meio
bucal / Cauana Oliva Tavares. – Porto Alegre, 2014.
47 f.

Diss. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia,
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
Orientador: Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

1. Células Endoteliais. 2. Polpa Dentária.
3. Inflamação Crônica. 4. Endodontia. 5. Odontologia.
I. Figueiredo, José Antônio Poli de. II. Título.

CDD 617.634

Bibliotecária Responsável: Salete Maria Sartori, CRB 10/1363

CAUANA OLIVA TAVARES

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DA ENZIMA PURINA NUCLEOSÍDEO
FOSFORILASE (PNF) EM POLPAS DE RATOS EXPOSTAS AO MEIO
BUCAL**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre na área de Endodontia pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Anotônio Poli de Figueiredo

Prof. Dr. Francisco Montagner

Profa. Dra. Fabiana Vieira Vier-Pelisser

Porto Alegre
2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar a oportunidade de ser feliz, de aprender a cada dia e por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Aos meus pais, Giancarlo Tavares e Máriam Georges Oliva, por me mostrar que com vontade, organização, paciência e respeito ao próximo posso realizar os meus sonhos. Vocês são meus exemplos de honestidade, força e superação. Meu amor por vocês é imenso.

Ao meu irmão, Gregório Oliva Tavares, pelo companheirismo, pelo elo forte que nós temos e por me fazer acreditar que eu sou capaz. Mesmo com pouca idade, tua maturidade e tua visão sobre a vida me fazem crescer. Obrigada pelos conselhos e risadas sobre coisas que só nós entendemos.

Ao meu querido noivo, Marcello Snel Vianna, por ser tão positivo e incentivador. Ao teu lado sou mais forte e mais feliz. Teu valor em minha vida é inestimável. Te amo. Agradeço também à tua família, que nos incentiva e torce pelo meu sucesso profissional.

Às minhas avós, Irma Georges e Rosana Tavares. Cada uma a sua maneira, me ensinou que é preciso avançar, porém, saber recuar também é uma virtude. Agradeço à vó Irma por cultivar meu intelecto e à vó Rosana por desenvolver minhas habilidades manuais, ambos tão importantes para o exercício da odontologia.

Ao meu orientador, José Antônio Poli de Figueiredo, por ser uma inspiração para mim. Te agradeço por proporcionar momentos de reflexão, não só científicos, mas também de vida; por compartilhar o teu conhecimento sem qualquer restrição; por despertar a criatividade e o pensamento crítico dos teus alunos; por desenvolver a vontade de buscar o conhecimento sem que este seja uma obrigação; por idealizar um grupo de pesquisa em que todos se ajudam (o nosso “Biofilme”); por incentivar a habilidade da escrita; e por acreditar na melhora da educação. Obrigada, principalmente, por me proporcionar segurança suficiente para enfrentar os desafios da odontologia como profissional, discente e docente.

Ao professor Eraldo Batista Júnior, pelos desafios propostos. Superá-los trouxe experiência profissional e auto-conhecimento. Tens uma mente brilhante e é lamentável a brevidade da convivência.

À professora Roberta Kochemborger Scarparo, que me acompanha desde o curso de especialização. Obrigada por acreditar no meu potencial e despertar em mim a vontade de seguir este mestrado. Mudaste a minha vida para melhor. Obrigada por compartilhar tua inteligência incrível, pela acolhida e por ser exemplo de profissional e pessoa. Tu és muito especial.

À professora Fabiana Vieira Vier-Pelisser, coordenadora da área de endodontia deste Programa de Pós-graduação. Obrigada pelos ensinamentos de didática e pelas críticas construtivas, tão importantes na melhora das produções de aulas e artigos. Admiro teu empenho pela docência. Obrigada também pela ajuda e companheirismo durante as reuniões do PPGO.

À professora Maria Martha Campos, pela contribuição intelectual e pelas quintas-feiras agradáveis e cheias de conteúdo interessante. Obrigada por estar sempre disposta a ajudar, por querer o crescimento dos teus alunos e por incentivar a minha continuidade na área acadêmica. Agradeço por poder conviver com tamanha sabedoria e incansável dedicação à ciência.

Às pós-doutorandas, Renata Morgental e Silvana Beltrami, pela ajuda nos trabalhos de pesquisa, pelos ensinamentos e pela convivência.

Às minhas amigonas de curso, Carolina Cucco, Daiana Flores Giannastásio, Gabriela Xavier Fagundes e Magda Reis, por tantas risadas, pelo carinho e pelo apoio nos momentos de suor e lágrimas. Agradeço até pelos “perrengues” daquela viagem... Me fizeram ser uma pessoa melhor. Vocês são demais!

Ao meu amigo e colega, Tiago André Fontoura de Mello, pela convivência divertida e oportunidade de iniciar uma nova etapa.

Aos novos colegas e amigos, Helena Filipini, Rafael Hartmann e Luíza Wessel; aos colegas das outras áreas e também do PEGA. Agradeço à todos pelos momentos agradáveis que passamos juntos e pela troca de conhecimento.

Às minhas amigas do coração, Natália Dourado, Carolina Canabarro e Roberta Brochier, que desde o colégio me acompanham. Obrigada pela presença fiel na minha vida, pela solidariedade durante os momentos difíceis e pela vibração positiva com as conquistas. Amo vocês.

Aos meus colegas de profissão e amigos, Lucas Hörlle, Cátia Benetti e Bruna Maraschin, por todo apoio, companheirismo e amizade.

Aos secretários, Davenir Bruschi, Kléber da Silva, Paulo José da Silva, Gabriel da Silva e Vanessa Xavier. Agradeço a simpatia, prontidão, organização e dedicação. Vocês são essenciais para o PPGO.

Agradeço aos alunos do Mestrado e Doutorado em Odontologia pela confiança depositada a mim para representação discente.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de realização deste Mestrado.

Obrigada à todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional, pessoal e tornaram a minha vida mais feliz.

*“Ser capaz de colocar
continuamente em questão
as próprias opiniões. Esta é
a condição preliminar de
qualquer inteligência.”*

Italo Calvino (1923-1985)

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
1.1 Biologia Celular da Polpa.....	11
1.2 A Inflamação Pulpar Decorrente de Agentes Microbianos.....	13
1.3 Relação entre Processo Inflamatório, Células Imunológicas e o Mecanismo de Reparo da Polpa.....	15
1.4 Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNF)	16
OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO 1	21
ARTIGO - Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) is expressed in rat pulp tissue after induced inflammation	21
DISCUSSÃO GERAL.....	39
CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO A - Ilustração do dispositivo intrabucal utilizado durante o experimento.....	48

RESUMO

Dentre as funções do tecido pulpar, o papel de defesa contra as injúrias provocadas por microorganismos ocorre com o desenvolvimento dos processos inflamatório e imunológico. No entanto, a polpa encontra-se confinada por paredes rígidas e a inflamação pode perpetuar ou ampliar a alteração patológica em função de seus próprios eventos. Dentro deste contexto, a enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNF) é um alvo interessante para o controle de inflamação pulpar, pois está relacionada a cascata de eventos que gera células T ativadas. Sendo assim, o presente estudo objetivou caracterizar a enzima PNF em tecido pulpar de ratos *wistar*, através de imunohistoquímica, bem como estabelecer correlação entre a presença da enzima PNF e os eventos inflamatórios observados por método histológico. Foram utilizados 18 animais divididos em 3 grupos: grupo 1 [n=6]: sem exposição pulpar; grupo 2 [n=6]: com exposição pulpar por 24h; grupo 3 [n=6]: com exposição pulpar por 7 dias. A análise qualitativa aplicada para o método histológico indicou maior extensão inflamatória para o grupo 3, sendo que a intensidade de inflamação permaneceu a mesma para os grupos 2 e 3. O principal tipo celular inflamatório encontrado foi o neutrófilo, para ambos períodos experimentais. O grupo controle não apresentou alterações patológicas. A imunolocalização detectou a presença da enzima PNF em células endoteliais no grupo 3. Não houve expressão basal da enzima nos grupos 1 e 2. Sendo assim, concluiu-se que há presença da enzima PNF no tecido pulpar já no evento de transição do período agudo para o período crônico. A partir deste achado, a enzima torna-se alvo interessante de estudos endodônticos futuros que elucidem seu o papel, objetivando assim, o desenvolvimento de fármacos que controlem o dano pulpar.

Palavras-chave: PNP, células endoteliais, polpa dental, inflamação crônica e aguda.

ABSTRACT

The dental pulp activates inflammatory and immunopathologic defenses owing to microorganisms. However, pulp tissue is confined by rigid walls and inflammation may perpetuate or extend pathologic alteration due to its own events. Within this context, the enzyme Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) is related to a chain of events that generate activated T cells, thus it becomes an interesting target for pulp inflammation control. Under these circumstances, the present study aimed to characterize the PNP enzyme in rat pulp tissue, by immunohistochemistry, as well as establish a correlation among the inflammatory events with the enzyme, by histologic methods. Eighteen animals were divided into 3 groups: group 1 (n=6) – no cavity opening was performed; group 2 (n=6) – pulp tissue exposure for 24 hour; group 3 (n=6) – pulp tissue exposure for 7 days. Qualitative analysis was applied for histologic observations, which has indicated the same intensity of inflammation for groups 2 and 3. However, in group 3, inflammation was further extended through the pulp. The main inflammatory cells observed were neutrophils, for both experimental periods. No pathologic alterations were shown for the control group. Immunolocalization detected the presence of PNP in endothelial cells of group 3 at the transition period from acute to chronic inflammation. No PNP basal expression was observed for the groups 1 and 2. In conclusion, PNP is activated in rat pulp tissue. Our findings show a novel endodontic target and contribute with ongoing and future endodontic scientific studies that aim drugs development for pulp damage control.

Key Words: PNP, endothelial cells, pulp tissue, acute and chronic inflammation.

INTRODUÇÃO

1.1 *Biologia Celular da Polpa*

A polpa dentária é constituída por um tecido conjuntivo mesenquimal frouxo, com a presença de células, substância fundamental amorfa, fibras, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Histologicamente este tecido divide-se em zonas: 1- zona odontoblástica (formada pelos odontoblastos que são células localizadas logo abaixo da pré-dentina); 2- zona acelular (logo abaixo dos odontoblastos, contém o plexo nervoso de Raschkow e fibrilas nervosas amielínicas); 3- zona rica em células (alta densidade celular; presença de células mesenquimais indiferenciadas); 4- zona central (polpa propriamente dita, presença de vasos sanguíneos e nervos, fibras colágenas, fibras reticulares, fibroblastos e células de defesa)¹.

Esta estrutura confere a polpa basicamente 4 funções: nutrição, defesa, inervação e formação¹. A função nutritiva diz respeito, indiretamente, à função formativa, pois alimenta os odontoblastos que depositarão dentina ao longo de toda a vida pulpar. A dentinogênese acontece por meio da secreção de matriz dentinária pelos odontoblastos presentes na periferia da polpa. Ao longo da vida clínica do dente, a dentina secundária é formada por estímulos de baixa intensidade decorrentes da função biológica normal².

A dentina terciária ou também chamada de dentina reacional, é resultado de um processo com contaminação limitada e inflamação moderada, como por exemplo cáries de baixa intensidade, abrasão patológica, preparo cavitário, etc. Este desenvolvimento dentinário ocorre pela presença de odontoblastos vivos³.

No caso de um avanço rápido dos microorganismos, os odontoblastos são destruídos pelas toxinas bacterianas ou alterados pelas moléculas nocivas (liberadas pelo material restaurador, pelas células necróticas ou enzimas de degradação da matriz extracelular)⁴. Sendo assim, no momento de uma injúria ao tecido, as células mesenquimais presentes na zona central da polpa (que fisiologicamente estão presentes para a auto-renovação celular) contribuem

para o reparo e a mineralização diferenciando-se em células semelhantes à odontoblastos⁵.

A polpa também possui células com o importante papel de ativação das reações inflamatórias e imunopatológicas, que cuidam da defesa deste tecido. Fazem parte destes fenômenos, as células dendríticas, os histiócitos, neutrófilos, macrófagos e os linfócitos T⁵. Os eosinófilos, leucócitos e mastócitos também estão presentes, porém em menor número e próximos aos vasos sanguíneos.

As células imunológicas estão presentes tanto no tecido saudável como no patológico. No tecido saudável elas têm um papel crucial no controle de proliferação e apoptose celular, regulando assim, a densidade da população celular. No tecido pulpar exposto elas contribuem na resolução do processo inflamatório com as células dendríticas e os macrófagos, que ativam os linfócitos T⁶.

Em relação à vida útil do elemento dentário, torna-se importante a manutenção da fisiologia pulpar. A preservação da polpa vital e sadia se mostra vantajosa não somente pelo fato de que os dentes jovens atingidos por traumatismos ou cárie podem completar a sua rizogênese, mas também por que o tecido periapical de dentes em qualquer estágio de formação radicular permanecerá em estado de saúde. Maior facilidade, rapidez e economia das técnicas conservadoras também são apontadas como vantagens quando comparadas ao tratamento endodôntico radical². Além disso, mesmo quando a endodontia completa é realizada em dentes não necrosados previamente, o dente pode tornar-se mais vulnerável à infiltração microbiana por falhas no selamento coronário ou na massa obturadora dos canais radiculares. Conseqüentemente ocorre proliferação dos microorganismos dentro dos condutos, fator fortemente relacionado com o insucesso endodôntico⁷. Por fim, neste contexto é possível a perda do elemento dentário por complicações periapicais ou fraturas radiculares.

1.2 A Inflamação Pulpar Decorrente de Agentes Microbianos

As limitações dos eventos biológicos normais que ocorrem dentro do complexo dentino-pulpar decorrem da vaso-dilatação proveniente da inflamação, pois as células da polpa se apresentam envoltas pela dentina, que se apresenta como um compartimento rígido⁸.

Já em 1965, em um estudo clássico realizado por Kakehashi, Stanley e Fitzgerald⁹, os autores deixam clara a participação dos microorganismos no processo de necrose pulpar. Neste estudo polpas vitais foram expostas ao meio bucal e observadas histologicamente. Percebeu-se então o vínculo da presença dos microorganismos no canal radicular com o aparecimento de lesões periapicais crônicas. Os autores avaliaram ratos *germ-free* e ratos com microbiota convencional após exposições pulpares não tratadas e constataram, através do tempo, as alterações resultantes. Observou-se que os ratos *germ-free*, mesmo sem nenhum tratamento, apresentaram formação de ponte de dentina a partir do 14º dia de exposição e nenhuma necrose pulpar, abscesso ou granuloma periapical. No entanto, no grupo dos ratos com microbiota convencional foi constatada a presença de necrose pulpar e formação de lesões periapicais crônicas em virtude da presença das bactérias.

Quando o componente bacteriano entra em contato com as células do tecido, o mecanismo que se estabelece é a resposta aguda ou defesa inata induzida¹⁰. Os neutrófilos são as primeiras células a atuarem na área da lesão e o seu objetivo é localizar a região agredida, eliminar o agressor e remover os tecidos degenerados preparando a área afetada para o reparo. Esta é uma resposta rápida que pode durar desde minutos até dias e não distingue o agente agressor, apenas localiza o que é próprio ou não do organismo¹. A dor é proveniente do aumento de pressão nos tecidos devido à hiperemia, edema e liberação de agentes algógenos, como a bradicinina. Estes agentes estimulam as fibras C amielínicas².

Com a resposta inespecífica da inflamação aguda, ocorre a liberação de mediadores químicos e, uma vez liberados após a agressão tecidual, estes mediadores podem ampliar e perpetuar uma alteração patológica¹⁰. No tecido

pulpar existem mediadores químicos inativos no plasma ou seqüestrados no interior de células, os mais comuns são a histamina, as cininas, as prostaglandinas e as anafiloxinas. Os sistemas enzimáticos, que originarão os mediadores químicos, são: o sistema das cininas (que libera bradicinina para atuar na fase tardia da permeabilidade vascular); o sistema fibrinolítico (responsável pela formação do ácido araquidônico, prostaglandinas e leucotrienos); e o sistema complemento (constituído por proteínas que realizam a mediação da resposta vascular)².

O segundo mecanismo de defesa é a resposta imunológica adaptativa, de caráter específico, que é mediada basicamente por linfócitos T, macrófagos, células *natural killer* e as citocinas secretadas. A resposta humoral também está presente nesta fase e é mediada por linfócitos B, plasmócitos e anticorpos¹⁰.

Depois de um a dois dias da introdução do antígeno no tecido pulpar, as células dendríticas e macrófagos apresentam-no às células T CD4+ no baço ou linfonodos. As citocinas produzidas pelas células TCD4+ participam na resposta imune humoral estimulando a síntese de linfócitos B e auxiliando na síntese de anticorpos; participam na ativação de macrófagos favorecendo a destruição de antígenos; e auxiliam na diferenciação do linfócito T citotóxico.

As células B específicas podem ser ativadas pelos linfócitos T CD4+, pelo próprio agente agressor ou por células apresentadoras de antígenos e, a partir de então, passam a se diferenciar em plasmócitos nos tecidos, produzir anticorpos e células de memória, pela ação das citocinas¹¹.

O dano causado pelas células imunocompetentes está relacionado à liberação de enzimas lisossomais, citocinas e mediadores químicos¹. Existe a produção de moléculas microbidas nos fagolisossomos de células ativadas por agente agressor, tais como intermediários oxidativos de oxigênio (ROIs) e intermediários reativos de nitrogênio, principalmente o óxido nítrico produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS)¹¹. Essas moléculas causam dano ao tecido e podem apresentar efeito pró-reabsortivo dos tecidos mineralizados¹.

1.3 Relação entre Processo Inflamatório, Células Imunológicas e o Mecanismo de Reparo da Polpa

Com o aprofundamento da lesão de cárie no tecido dentinário, o processo inflamatório vai se desenvolvendo e o ataque da polpa pelos microorganismos induz a apresentação de células dendríticas junto à camada de células odontoblásticas¹². Assim, células como neutrófilos, linfócitos T, linfócitos B e macrófagos vão aumentando o seu número no interior da polpa.

A liberação de moléculas quimiotáticas pelos odontoblastos tem a função de recrutar as células dendríticas, as quais podem ser responsáveis pela imuno-vigilância do tecido pulpar, ou seja, sinalizariam a entrada de células de defesa dos vasos sanguíneos¹³. Esta liberação de moléculas se deve ao fato de que estas células possuem receptores, dentre eles o TLR9 (responsável pelo reconhecimento de ácido lipoteicóico - *LTA*, presente na parede celular de bactérias gram positivas) e o TLR2 (responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeo – *LPA*, presente na parede celular de bactérias gram-negativas)^{14,15}.

A sensibilidade ao *LTA* induz a síntese de citocinas quimiotáticas (quimiocinas) como a *CCL2* e a *CXCL10*, respectivamente envolvidas no recrutamento de células dendríticas e linfócitos T¹⁶.

A agressão de baixa intensidade provocada pelas toxinas que chegam ao tecido pulpar via túbulos dentinários, desencadeia eventos imunes e inflamatórios subjacentes a esta invasão, que estimulam a formação de dentina reparadora pelos odontoblastos. Porém, na ausência da reação odontoblástica a invasão bacteriana proporciona inflamações pulpares irreversíveis, que progridem para necrose pulpar, infecção do sistema de canais radiculares e doença periapical¹⁷.

O que dificulta o sucesso em muitos casos clínicos de tratamentos conservadores, ou seja, aqueles que têm o objetivo de manter a viabilidade pulpar, é a complexidade em determinar o limite entre as inflamações reversíveis e irreversíveis. Ainda assim, a tentativa de manutenção da polpa vital é válida antes de se partir para um tratamento endodôntico radical.

1.4 Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNF)

Os tratamentos conservadores de polpas dentárias vivas (com inflamação ou saudáveis) vêm sendo pesquisados dentro do campo da biologia celular e molecular, baseados na histofisiopatologia pulpar, a fim de minimizar os danos inflamatórios e se obter uma reconstrução da parte afetada.

Para que se desenvolva a resposta inata e adaptativa frente à agentes agressores é necessário que ocorra a sinalização e o recrutamento de células para o local da injúria. Nesse processo complexo e organizado de inflamação, é importante que a divisão celular aconteça. Para tanto, a célula necessita duplicar o seu material genético, o ácido desoxirribonucleico (DNA). Uma molécula de DNA consiste em duas cadeias polipeptídicas longas compostas por nucleotídeos que se complementam. Os nucleotídeos do DNA podem apresentar como base uma purina (adenosina ou guanina) ou uma pirimidina (citosina ou timina)¹¹.

A Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNF) é uma enzima, que atua na rota de salvamento das purinas, catalizando a clivagem da ligação glicosídica dos (desoxi)ribonucleosídeos¹⁸. Esta enzima cataliza a clivagem reversível, na presença de fosfato inorgânico (Pi), de ligações N-glicosídicas de nucleosídeos de purinas e deoxinucleosídeos, exceto adenosina, para gerar alfa-ribose 1-fosfato e a base de purina correspondente¹⁹. A partir de então, ocorre uma cascata de eventos que geram a guanosina trifosfato (GTP), ou seja, a energia necessária para que ocorra a divisão celular (Fig.1)¹⁸.

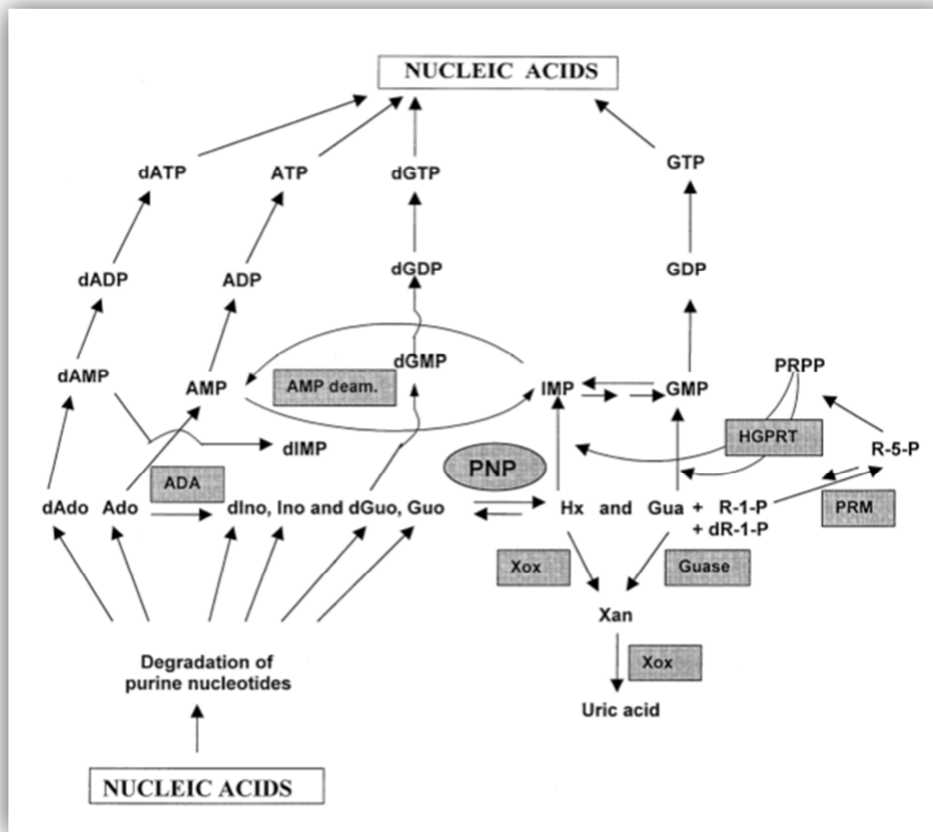


Figura 1 – Esquema de atuação da enzima PNF na rota de salvamento das purinas de ribo- e desoxirribonucleotídeos. (PNP=PNF; Hx=hipoxantina; Gua=guanina; R-1-P=ribose-1-fosfato; GMP=guanossina monofosfato; GDP=guanossina difosfato; GTP=guanossina trifosfato; dGTP=deoxiguanossina trifosfato)¹⁸.

Kenneth et al, em 1979, já demonstravam a necessidade de atividade normal da PNF. O estudo revelou anormalidades metabólicas e imunológicas em um paciente de 5 anos de idade que apresentava apenas 0,07% da atividade normal desta enzima. Dentre as observações constatou-se anemia hemolítica autoimune severa com decréscimo absoluto dos linfócitos T²⁰.

A relação bioquímica entre a falta de PNF e a deficiência de células T ocorre devido à falhas na degradação de deoxiguanosina que, na falta da PNF para fosforilá-la e transformá-la em guanina e deossirribose-1-fosfato, resulta somente na sua conversão em deoxiguanosina trifosfato (dGTP), realizada por quinases (dCyk). Como consequência, o excesso de deoxiguanosina trifosfato

inibe a atividade das redutases de ribonucleotídeos bem como a síntese de DNA e replicação celular, ou seja, provoca supressão da cascata de eventos que gera as células T ativadas (Fig. 2)²¹.

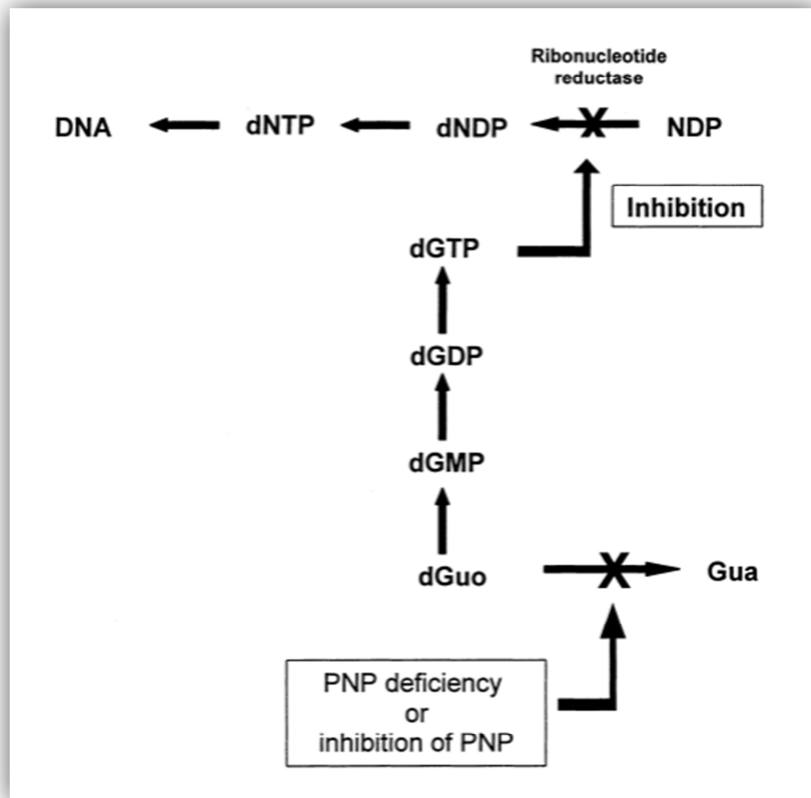


Figura 2 - Efeitos metabólicos da deficiência da enzima PNF levando ao acúmulo de dGTP, inibição da enzima ribonucleotídeo redutase e conseqüentemente inibição da síntese de DNA¹⁸.

A inibição da PNF se comporta como um agente imunossupressor, sendo útil para o tratamento clínico de desordens imunológicas, como por exemplo na rejeição de transplante de órgãos, psoríase, artrite reumatóide, esclerose múltipla, linfomas e leucemia de células T²².

Na cavidade bucal, foi possível demonstrar o importante papel da enzima PNF na modulação da resposta imune do periodonto de pacientes com comprometimento periodontal. Os resultados demonstraram alta atividade da

PNF nos sítios em que a doença periodontal não tinha sido tratada, assim como um decréscimo progressivo quando o tratamento foi realizado²³.

A compreensão de eventos biológicos pulpares é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Dentro deste contexto, a PNF) parece estar fortemente relacionada com os eventos inflamatórios e imunológicos desencadeados pelo organismo em resposta a antígenos e, até o presente momento, a atividade da PNF ainda não foi caracterizada no tecido pulpar.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a expressão da PNF na polpa dentária de ratos *Wistar* exposta e não exposta à cavidade bucal.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as alterações patológicas observadas através de análise histológica nos tempos experimentais de 24h e 7 dias;
- Avaliar a distribuição de células positivas para a PNF através de imunohistoquímica comparando tecido pulpar normal e alterado;
- Avaliar o efeito do tempo sobre contaminação pulpar e relacionar com a imunolocalização da PNF nos tempos experimentais de 24h e 7 dias;
- Correlacionar tais alterações com a presença da enzima PNF imunolocalizada nos tempos experimentais de 24h e 7 dias.

CAPÍTULO 1

ARTIGO

Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) is expressed in rat pulp tissue after induced inflammation

Formatado segundo as normas do periódico Journal of Endodontics, fator de impacto 2.92 e classificação A1 segundo a Capes.

Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) is expressed in rat pulp tissue after induced inflammation

Cauana Oliva Tavares DDS¹, Roberta Kochenborger Scarparo PhD¹, Carolina Cucco MSC¹, Gabriela Xavier Fagundes DDS¹, José Antônio Poli de Figueiredo PhD¹, Eraldo Luiz Batista Júnior PhD².

1. Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
2. University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

Corresponding Author:

Eraldo L. Batista Jr. DDS, MSc., DSc.

Associate Professor of Periodontology | Department of Diagnostics and Surgical Sciences

Faculty of Dentistry | University of Manitoba

D344B-790 Bannatyne Ave., Winnipeg, MB R3E 0W2, CANADA

Phone: (204) 789-3367

eraldo.batista@me.com

Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) is expressed in rat pulp tissue after induced inflammation

Abstract

Introduction: The enzyme Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) is related to a chain of events that generate activated T cells, thus it becomes an interesting target for pulp inflammation control. Under these circumstances, the present study aimed to immunolocalize PNP enzyme in rat pulp tissue, as well as to establish a correlation with the inflammatory events observed. **Methods:** Eighteen animals were divided into 3 groups: group 1 (n=6) – control, no cavity opening was performed; group 2 (n=6) – pulp tissue exposure for 24 hours; group 3 (n=6) – pulp tissue exposure for 7 days. To induce inflammation, right first mandibular molar pulps were exposed to the oral environment according to respective time periods. Immunohistochemistry positive staining for PNP was verified. Inflammation changes after 24 h and 7 days were evaluated histologically. Qualitative analysis using a scoring method was applied. Statistical analysis used was One Way ANOVA followed by Tukey test, α set at 0.05. (CI = 95%). **Results:** Histology has indicated the same intensity of inflammation for groups 2 and 3. However, in group 3, inflammation was further extended through the pulp. The main inflammatory cells observed were neutrophils, for both experimental periods. No pathologic alterations were shown for the control group. Immunolocalization detected the presence of PNP in endothelial cells of group 3 at the transition period from acute to chronic inflammation. No PNP basal expression was observed for the groups 1 and 2. **Conclusion:** PNP is activated in rat pulp tissue. Our findings show a novel endodontic target and contribute with the identification of the stage of development of chronic inflammation at its early onset.

Key Words: PNP, endothelial cells, pulp tissue, acute and chronic inflammation.

Introduction

Dental pulp exposure to oral microorganisms is frequently related to inflammatory and immunopathologic defense reactions¹. In this context, following a neutrophil-mediated nonspecific reaction the adaptive response is mainly characterized by the macrophages, T cells e cytokines^{2,3}. Especially if considering that pulp tissue is circumscribed by rigid walls, oxidative stress and dilation of blood vessels provoked at the inflamed area, interfere in pulp tissue homeostasis, although produced as important part of defense mechanisms. The continuity of inflammatory process may lead to pulp infarction and necrosis⁴.

In this regard, the pathways that rule the division of T cells in dental pulp remain as a non-explored issue, which could bring some insights on new approaches for the characterization of the degree of pulp damage and for the development of pharmacological strategies aiming to control inflammation. For that purpose, it is important to have duplication of genetic material (DNA) for cell division. The Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) enzyme has a key role in this process, being strongly related to lymphocytes and participating on the purine salvage pathway of mammalian cells. It catalyzes the irreversible cleavage of purine nucleosides, such as deoxyinosine and deoxyguanosine, to their respective bases and deoxyribose-1-phosphate. Since then, a chain of events take place to generate guanosine triphosphate (GTP), which is the necessary energy to DNA formation and cell division^{5,6,7}. The absence of PNP has immunosuppressive effects, been useful for clinical treatment of immunological disorders such as psoriasis, arthritis, and T cell leukemia⁸.

Within this context, this enzyme seems to rely on inflammatory and immunological events unchained by the organism against antigens. As this enzyme has not been characterized in dental pulps so far, this study was designed to access the activity of PNP in infected and normal rat dental pulps.

Material and methods

Animals

All animal procedures were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by National Institutes of Health. The methodology was approved by the local animal ethics committee (CEUA) of Pontifical University Catholic of Rio Grande do Sul (RS, Brazil – protocol 0056/12). Eighteen (18) male Wistar rats (weighting \approx 250g) were used. Standard control conditions (temperature $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 70% humidity, and a 12-hour/12-hour light-dark cycle) were offered to the animals during the experiment. They received standard rat chow diet (Nuvilab), with free access to filtered water.

Protocol for dental pulp exposure

Dental pulp exposure was performed by one trained operator according to previously described method⁹. Before the experimental procedures animals were anesthetized by intraperitoneal injection of a combination of xylazine (10mg/Kg) and ketamine (100mg/Kg). The oral cavity was left open with a mouth opening device¹⁰. The pulps of the first lower molars were surgically exposed with a 1011 round diamond bur in high-speed rotation under irrigation with physiologic solution. Pulps were left open to oral cavity for 24-hour and 7 days for contamination, according to the group. The animals were divided into 3 groups: group 1, control – normal dental pulp, in which no cavity opening was performed; group 2, dental pulp exposure for 24-hour; group 3, dental pulp exposure for 7 days.

Sample processing

After the experimental periods, the animals were killed by deep anesthesia with isoflurane. The mandibles were then surgically removed, dissected, fixed in 10% buffered formalin solution for 48 h, and decalcified with EDTA 15%, which was renewed every 5 days during a period of 5 weeks. Then,

the mandibles were processed for paraffin embedding in blocks. Five μm sections were made in a mesiodistal plane. The specimens for histology and immunolocalization analysis were processed at the Laboratory of Pathology at São Lucas Hospital (Porto Alegre, Brazil).

Histology and Immunolocalization of PNP

Two slide cuts were chosen from each animal and mounted over silanized glass slides. One slide was stained with hematoxylin-eosin. The other one was processed for immunolocalization. Endogenous peroxidase was blocked with H_2O_2 and further incubated overnight with diluted (1: 100) rat anti-PNP polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). After washing unbound antibodies with PBS, the sections were incubated with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-goat secondary antibody for 2 h at room temperature. Diaminobenzidine substrate was added to the reaction and the sections were counterstained with Mayer hematoxylin. Immunohistochemistry positive control was obtained with tonsils tissue. Negative control was performed omitting the primary antibody. The pulp extending from the crown to the apex was observed for detection of positive PNP expression and qualitative analyzed for histology. For histology analysis, pathologic alterations were classified according to intensity and extension of inflammatory pulp damage. The scores are summarized in table 1 and 2 and follows previous description⁹. Prevailing inflammatory cell type, presence of connective fibrous tissue, abscess formation, degeneration areas, presence of hyalinization, pulp necrosis and odontoblastic layer organization were also observed. The slides were observed under light microscopy and the images of interest were captured through a digital camera. After a training session explaining the gold standard of the evaluation parameters, two blinded and calibrated (Kappa: 0.73) examiners observed the slides separately, as previously described¹⁰. The same tooth area and magnifications (40x, 100x, 200x, 400x) were used.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out using One Way ANOVA followed by Tukey test. Data were subjected to statistical program GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) for $P < .05$ (CI = 95%).

Results

Histologic analysis

Histological evaluation presented significant differences amongst groups, especially regarding extent of pulp inflammation (Figure 1). The control group showed healthy standard pulp tissue, while the accessed pulp was characterized by inflammatory and degenerative events (Figure 2). In both experimental periods the main inflammatory cell type observed was neutrophils. Few macrophages were also observed.

At 24-hour period samples showed partial necrosis of coronary pulp tissue, circumscribed by inflammatory cells. Abscess formation and increased vascularity was shown in most of the samples near to the entrance of root canals. Mild hyaline degeneration was identified above abscessed area. Some samples evinced fiber condensation and decreased cellularity.

At 7 days period pulp tissue necrosis has advanced to the cervical third of the root. Above necrotic tissue inflammatory process was identified, but not contained by dense connective tissue. The inflammatory cells were spread and invading root canal medium third. All the samples showed abscess formation localized on the cervical or medium thirds. The odontoblastic layer was disrupted along the root.

PNP immunolocalization

PNP was detected mainly in pulp tissue endothelial cells at the 7 days period (Figure 3). None of the 24-hour period or control samples had positive staining for PNP. The staining occurred regardless of inflammatory intensity. However it was marked only in the sites above abscessed area.

Discussion

The present investigation sought to determine the baseline distribution of positive cells for Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) expression in dental pulp, comparing it to the observed before microbial contamination. The immunolocalization of this enzyme remains unexplored in many tissues. In this regard, the characterization of PNP in the dental pulp and its role still needs to be explained. PNP has been related, more specifically, with clonal expansion of T cells^{11,12,13,14,15}, mainly when activated by an antigen surface protein, the major histocompatibility complex class II (class II MHC). This enzyme has a key role in purine salvage pathway, being responsible for the conversion among (deoxy)nucleosides and its base, which in turn may be excreted (uric acid conversion) or recycled for biosynthesis of nucleic acids¹⁶. Therefore, when T cells do not receive the antigenic signal for duplication, they undergo apoptosis. After the programmed cell death, the enzyme reuses the cellular nucleic acids from the apoptosed cells¹⁷. Consequently, when there is PNP depletion, suppression of immature T cells proliferation follows, while B lymphocytes continue unaffected¹⁸.

In the current study dental pulp exposure to oral environment was performed to promote contamination, which stimulated inflammatory cells recruitment¹⁹. As observed herein, vasodilation and increased permeability lead to infiltration of inflammatory cells. In this regard, it is known that mast cells, neutrophils and macrophages are involved in non-specific and immediate defense mechanisms, as well as in the innate immune response²⁰. Neutrophils were the prevalent inflammatory cells in both experimental periods.

On the other hand, as well as in other pathologies, innate cells participate on the inflammatory modulation in dental pulp²¹. The triggering of acquired immune response from biochemistry substances release and antigenic recognition are ruled by these cells². For these reason, investigation on the pathways of T-cells recruitment is of paramount importance for the understanding of host response to aggression²¹. T lymphocytes are activated by presentation of captured antigenic proteins localized by the MHC class II molecules expressed in innate system cells. Active T lymphocytes (CD4+) have

their clonal expansion in lymphonodes, differentiate into memory T cells²² and migrate to the pulp tissue. At the local injury, native antigen presenting cells directly present the antigens to T cells. Moreover, according to the cytokine released, T lymphocytes stimulate other T cells, macrophages and B lymphocytes (responsible for antibodies against specific antigens)².

In a previous investigation, high numbers of T cells have been observed in pulp tissue with irreversible pulpitis, which suggests that the ratio analyzed with flow cytometry might be used as an index in the immunohistological diagnosis of irreversible pulpal pathosis²³. Another study²¹ assessed pulp tissue clinically diagnosed as irreversible pulpitis and histologically classified as intense inflammatory infiltrate. However, the authors observed that most of the T cells present were foxp3+ T regulatory lymphocytes (suppressor of CD4+ cells)²¹. Thus, the organism was attempting to prevent the inflammatory exacerbation by diminishing active T cells on dental pulp, although irreversible pulpitis was already installed. Consequently, it justifies the investigation of mechanisms that lead to an early onset, which is the phase of T cell recruitment.

In the present study the baseline expression of PNP was compared to the observed in acute inflammatory events (24 hours after tissue exposure)²⁵ and to a period which may precede chronic cells arrest (7 days after pulp exposure). Longer periods were not evaluated because pulp tissue necrosis has been described after experimental times as short as 14 days²⁶.

Although T cells did not dominate the microscopic field in inflamed areas, the 7-days evaluation period corresponded to a transitional phase when an active signaling for these cells recruitment was expected. In agreement, our findings indicated positive PNP staining for endothelial cells 7 days after pulp exposure to the oral environment, which was not detected, neither for the baseline expression, nor after 24 hours of tissue exposure. The perivascular detection was stronger above abscessed and more intensely inflamed areas. In this case, the inflammatory cells were not contained by dense connective tissue and were observed invading the cervical and medium root thirds, which characterized longer periods of pulp exposure.

The absence of staining in healthy pulps (control) and in the 24-hour period denoted the role of PNP in later events of inflammation. Corroborating with our findings, Batista et al²⁷ observed pronounced PNP expression in endothelial, lymphocytes and monocytes of gingival tissue with chronic periodontitis. The authors demonstrated high PNP activity in sites where the disease had not been treated, as much as its progressive decline when the treatment was performed, indicating the phenomena as a periodontal immune response modulation.

PNP detection in endothelial cells may be correlated with progressive recruitment of inflammatory cells arriving from blood vessels. Cytokines and chemokines secreted at the infection area hold the important role of endothelial cells stimulation and signaling²⁸. The increased number of vessels contributes to the augmented transport of inflammatory cells, nutrients, and oxygen to the site of inflammation²⁹. As a matter of fact, a previous study in rats evidenced an increased serum activity of PNP after partial hepatectomy, which was correlated to Intracellular adhesion molecule (ICAM-1) highest expression in endothelial cells³⁰. Considering that ICAM-1 is expressed to bind leukocyte integrin molecule²⁸, it is probably that this biological route is activated by PNP. Thus, PNP expression in blood vessels deserves attention and seems to be a new research target for the development of more efficient clinical therapies.

Since then, the enzyme becomes an interesting target for future endodontic investigations about novel pharmacologic strategies to control exaggerated inflammation and pulp damage.

Conclusion

Histologic analysis has shown same inflammatory intensity and neutrophil cellular pattern predominance for both experimental groups. However, more inflammatory extension was observed for 7 days group.

PNP staining was observed in endothelial cells of dental pulp at 7 days following aggression.

References

1. Goldberg M, Smith A. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:13–27.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*, 7th edn. Philadelphia: Elsevier - Saunders; 2012.
3. 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;47:303–11.
4. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9(4):498-521.
5. Bzowska A, Kulikowska E, Shugar D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2000; 88: 349-425.
6. Timmers LFSM, Caceres RA, Vivian AL, Gava LM, Dias R, Ducati RG, et al. Structural studies of human purine nucleoside phosphorylase: towards a new specific empirical scoring function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008; 479:28-38.
7. Moraes MC, Ducati RG, Donato AJ, Basso LA, Santos DS, Cardoso CL et al. Capillary bioreactors based on human purine nucleoside phosphorylase: a new approach for ligands identification and characterization. *Journal of Chromatography A* 2012; 1232:110-115.
8. Bantia S, Montgomery JA, Johnson HG, Walsh GM. In vivo and in vitro pharmacologic activity of the purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-34: the role of GTP and dGTP. *Immunopharmacology* 1996; 35: 53-63.
9. Dondoni L, Scarparo RK, Kantarci A, Van Dyke TE, Figueiredo JA, Batista EL Jr. Effect of the pro-resolution lipid mediator Resolvin E1 (RvE1) on pulp tissues exposed to oral environment. *Int Endod J* 2013; [Epub ahead of print] doi: 10.1111/iej.12224.
10. Scarparo RK, Dondoni L, Böttcher DE, Grecca FS, Rockenbach MI, Batista EL Jr. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod* 2011; 37(8):1069-73.
11. Hirschhorn R, Candotti F. Immunodeficiency due to defect of purine metabolism. In: Ochs HD, Smith CI, Puck JM (eds) *Primary immunodeficiency diseases. A molecular and genetic approach*. 2007; 2nd edn. Oxford University Press, New York.

12. Markert ML. Purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Immunodeficiency Rev* 1991; 3:45–81.
13. Dror Y, Grunebaum E, Hitzler J et al. Purine nucleoside phosphorylase deficiency associated with a dysplastic marrow morphology. *Pediatr Res* 2004; 55:472–477.
14. Aytekin C, Yuksek M, Dogu F et al. An unconditioned bone marrow transplantation in a child with purine nucleoside phosphorylase deficiency and its unique complication. *Pediatr Transplant* 2008; 12:479–482.
15. Giblett ER, Ammann AJ, Wara DW, Sandman R, Diamond LK. Nucleoside-phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity. *Lancet* 1975; 1:1010–1013.
16. Parks, RE Jr, Agrwal, RP. In the enzymes, 3rd Ed. (Boyer, P.D. ed.). 1972; Academic Press, New York.
17. Bantia S, Parker C, Upshaw R, Cunningham A, Kotian P, Kilpatrick JM, Morris P, Chand P, Babu YS. Potent orally bioavailable purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-4208 induces apoptosis in B- and T-lymphocytes - a novel treatment approach for autoimmune diseases, organ transplantation and hematologic malignancies. *Int Immunopharmacol* 2010; 10(7):784-90.
18. Eriksson S, Thealander L, Akerman M. Allosteric regulation of calf thymus ribonucleoside diphosphate reductase. *Biochemistry* 1979; 18(14):2948-52.
19. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20(3):340-49.
20. Avery JK. *Oral Development and Histology* 2002; 3rd edn. New York: Thieme.
21. Bruno KF, Silva JA, Silva TA, Batista AC, Alencar AH, Estrela C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in human dental pulpitis. *Int Endod J* 2010; Nov;43(11):1013-21.
22. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9, 179–200.
23. Hahn CL, Falker WA Jr, Siegel MA. A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J Endod* 1989 15(1):20-6.
24. Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14, 188–98.

25. Scarparo RK, Grecca FS, Dondoni L, Figueiredo JAP. ; Batista EL Jr, Böttcher DE. Apical Periodontium Response to Enamel Matrix Derivative as an Intracanal Medication in Rat Immature Teeth with Pulp Necrosis: Radiographic and Histologic Findings. *J Endod* 2012; 38:449-453.
26. Kohsaka T, Kumazawa M, Yamasaki M, Nakamura H. Periapical Lesions in Rats with Streptozotocin- Induced Diabetes. *J Endod* 1996; 22(8):418–421.
27. Batista Jr EL, Deves C, Ayub L, da Silva RG, Filho LCC, Basso LA, et al. Purine nucleoside phosphorylase activity and expression are upregulated in sites affected by periodontal disease. *J Periodont Res* 2010; 45:664-671.
28. Rahman A, Fazal F. Hug Tightly and Say Goodbye: Role of Endothelial ICAM-1 in Leukocyte Transmigration. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(4): 823–839.
29. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007; 27, 2514–23.
30. Ohtsuka M, Miyazaki M, Kondo Y, Nakajima N. Neutrophil-mediated sinusoidal endothelial cell injury after extensive hepatectomy in cholestatic rats. *Hepatology* 1997; 25(3):636-41.

Tables

Table 1. Scores used to evaluate the intensity of pulp inflammation

Score	Criteria for classifying the characteristics of pulp tissue
1	Absence of inflammation and hyalinization areas
2	Slight inflammatory infiltrate restricted by fiber condensation; underlying tissue showing absence of inflammatory cells/hyalinization
3	Slight inflammatory infiltrate or slight hyalinization areas/tissue necrosis restricted by fiber condensation; underlying tissue showing slight hyalinization areas
4	Moderate inflammatory infiltrate or extensive hyalinization areas/tissue necrosis not restricted by fiber condensation; underlying tissue showing sparse inflammatory cells
5	Severe inflammatory infiltrate or extensive hyalinization areas/tissue necrosis dominating the pulp tissue

Table 2. Scores used to evaluate the extension of pulp damage

Score	Criteria for classifying the extension of pulp alterations
1	Absence of inflammation and hyalinization areas
2	Inflammatory/degenerative responses restricted to the area of pulp exposure
3	Inflammatory/degenerative responses restricted to the entrance of root canals
4	Inflammatory/degenerative responses restricted to the cervical third of the root canals
5	Inflammatory/degenerative responses not restricted to the cervical third of the canals, reaching the middle third

Figure Legends

Figure 1 - Histological findings. (A) Control group showing normal pulp aspects (40x); (B) Group 2 showing inflammation cells and abscess at root canal entrance (arrows) (40x); (C) Extension of pulp involvement graph showing significant statistical difference (*or** $P > 0.05$) among 24-hour and 7 days experimental periods and these periods against control group; (D) Group 3 showing necrotic area at root canal entrance with inflammatory cells and abscessed area extending to root canal middle third (arrows) (40x).

Figure 2 - Histological findings. (A) Group 2 showing inflammation cells (*) above the necrotic area (100x). (B) Intensity of pulp response graph showing no significant statistical difference among 24-hour and 7 days experimental periods. Statistical differences were observed only among control group and experimental periods (* $P > 0.05$); (C) Group 3 showing abscessed area and inflammation cells (●). Cellularity reduction can be noted within the arrows (100x).

Figure 3 - PNP Immunohistochemistry. (A) Control group showing no pulp cell staining (100x); (B) Group 2 showing no pulp cell staining (100x); (C) Group 3 showing PNP expression at the endothelial cells (arrows) (200x).

Figure 1.

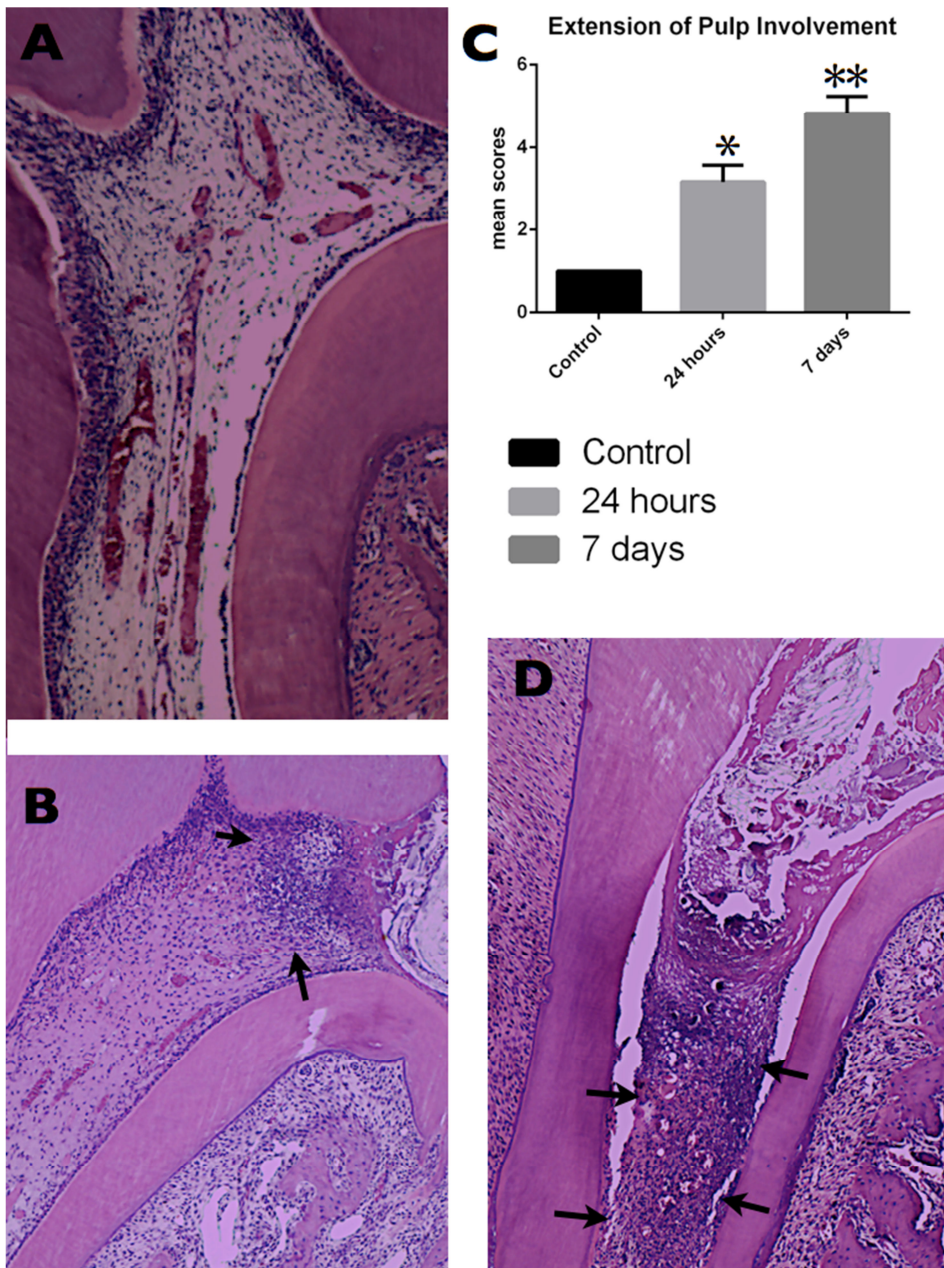


Figure 2.

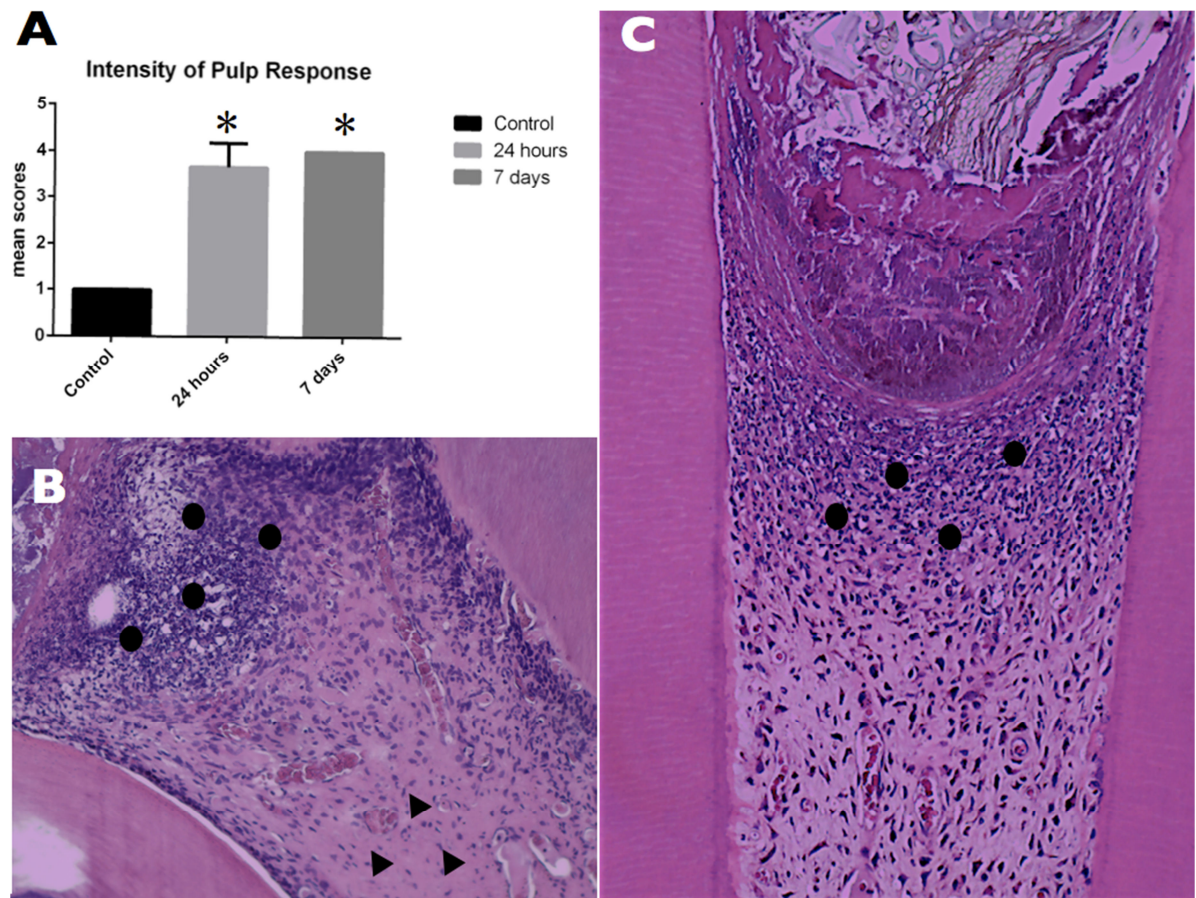
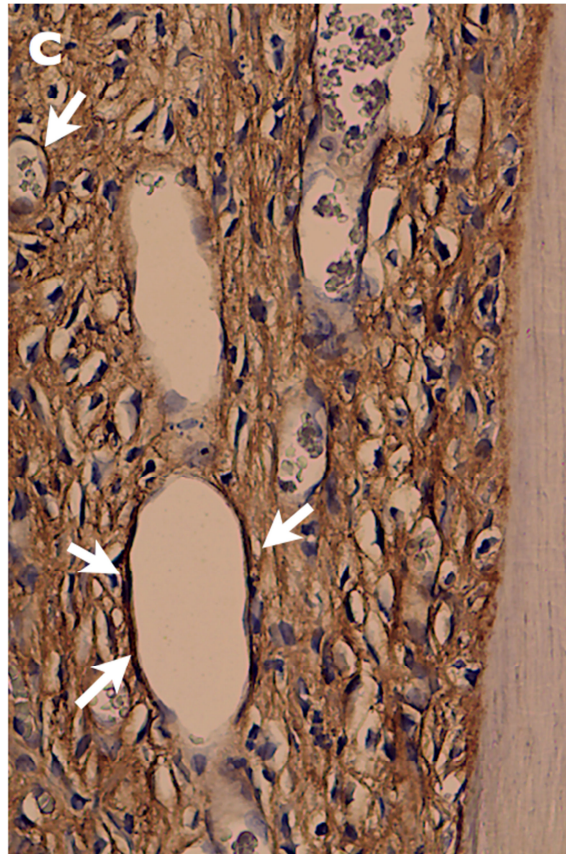
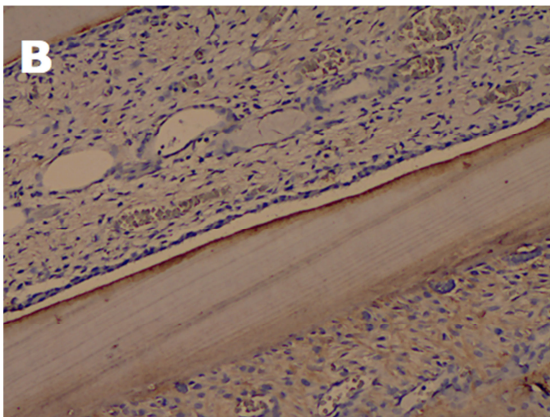
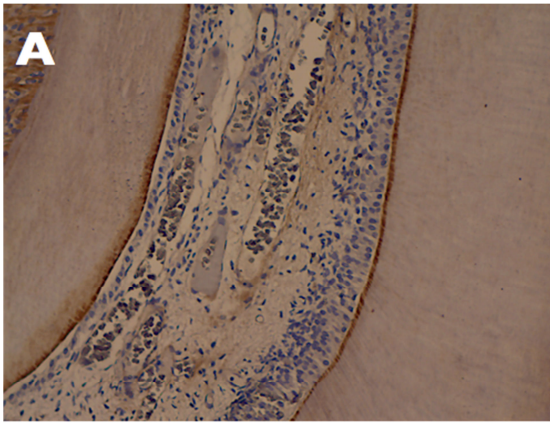


Figure 3.



DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho avaliou a distribuição de células positivas para Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNF) na polpa dental bem como comparou o efeito da contaminação pulpar sobre a imunoatividade da PNF. Esta enzima ainda é pouco explorada nos tecidos e o papel da PNF no tecido pulpar ainda permanece desconhecido.

A PNF tem sido correlacionada, mais especificamente, com a expansão clonal de células T^{24,25,26,27,28} principalmente quando ativadas pela proteína de superfície contra antígenos, o MHC de classe II. Esta enzima tem um papel chave na rota de salvamento de purinas, sendo responsável pela conversão entre (deoxi) nucleosídeos e suas respectivas bases, às quais podem ser excretadas através de sua conversão em ácido úrico ou reutilizadas na biosíntese de novos ácidos nucleicos²⁹. No entanto, quando as células T não recebem o sinal antigênico para duplicação, elas sofrem apoptose. Após a morte celular programada, a enzima recicla os ácidos nucleicos das células apoptóticas³⁰. Conseqüentemente, quando há deficiência de PNF, ocorre supressão da proliferação de células T enquanto que as células B não são afetadas³¹.

A metodologia de exposição da polpa dental à cavidade bucal foi aplicada afim de contaminá-la com microorganismos para estimular o recrutamento de células inflamatórias⁹. Os eventos de vasodilatação e aumento da permeabilidade provocam a saída de células inflamatórias do interior dos vasos sanguíneos em direção ao tecido injuriado. Neste sentido, sabe-se que mastócitos, neutrófilos e macrófagos estão envolvidos nos mecanismos de defesa não-específica e imediata, assim como na resposta imune inata³². Estas células foram observadas neste estudo, sendo o neutrófilo o tipo mais prevalente encontrado em ambos os períodos experimentais.

Assim como ocorre em outras patologias, as células da imunidade inata participam na modulação do processo inflamatório no tecido pulpar³³. Estas células participam no desencadeamento da resposta imune a partir do reconhecimento de antígenos e da liberação de substâncias bioquímicas¹¹. Por

esse motivo, a investigação das rotas de recrutamento de células T é de suma importância para o entendimento da resposta do hospedeiro à agressões³³. Os linfócitos T são ativados pela apresentação de proteínas antigênicas localizadas pelas moléculas do MHC de classe II expressas em células do sistema inato. Os linfócitos ativos (CD4+) realizam a sua expansão clonal nos linfonodos, diferenciam-se em células T³⁴ de memória e migram para o tecido pulpar. No local da injúria, células apresentadoras de antígenos apresentam o antígeno diretamente às células T. Além disso, de acordo com a citocina liberada, o linfócito T estimula outras células T, macrófagos ou linfócitos B (responsáveis pela produção de anticorpos para antígenos específicos)¹¹.

Em um estudo prévio³⁵, foi observado número elevado de células T em tecido pulpar com pulpite irreversível, sugerindo que os níveis analisados pela citometria de fluxo poderia ser utilizado como índice de diagnóstico de patologia pulpar irreversível. Outro estudo³³ observou polpas com pulpite irreversível e histologicamente classificada com infiltrado inflamatório intenso. No entanto, este estudo observou que a maioria das células T presentes eram linfócitos T reguladores (foxp3+ / supressores de células TCD4+). Sendo assim, pode-se entender que há uma tentativa de prevenção da exacerbação da inflamação pelo próprio organismo que contém a presença exagerada de células T ativas na polpa dental já com pulpite irreversível instalada. Dessa forma, justifica-se a investigação de mecanismos que levem ao recrutamento inicial dos linfócitos TCD4+.

No presente estudo realizou-se a comparação da expressão basal da PNF com os eventos inflamatórios de fase aguda (24 horas após exposição tecidual)³⁷ e de fase de transição, ou seja, um período que precede a chegada de células crônicas (7 dias após a exposição pulpar). Períodos mais longos não foram avaliados pois já foi relatado necrose pulpar a partir de períodos experimentais de 14 dias³⁸.

Apesar de não haver predominância de células T nas áreas inflamadas quando realizou-se a observação no campo microscópico, a avaliação do período de 7 dias corresponde à fase de ativação da sinalização, na qual espera-se o recrutamento destas células. Em concordância, nossos achados

indicam marcação positiva para a enzima PNF em células endoteliais 7 dias após exposição pulpar à cavidade bucal, sendo que não houve marcação no grupo controle e nem no período de 24 horas de exposição. A detecção perivascular foi mais acentuada abaixo da zona de abscesso, inflamação intensa e não contida por zona de fibroplasia. Este processo inflamatório foi observado na região cervical e terço médio de raízes, indicando um processo mais extenso de inflamação, característico de períodos mais longos de exposição pulpar.

A ausência de marcação nas polpa sadias (grupo controle) e nos períodos de 24 horas evidenciando o papel da PNF em eventos tardios de inflamação. Corroborando com os achados deste estudo, Batista et al³⁹ observaram a expressão pronunciada da PNF em células endoteliais, linfócitos e monócitos do tecido gengival com periodontite crônica. Os autores demonstraram a alta atividade da PNF em sítios onde a doença não foi tratada, bem como o seu declínio progressivo quando o tratamento foi realizado, indicando o fenômeno como uma modulação da resposta imune.

A detecção da PNF em células endoteliais pode estar correlacionada com o recrutamento progressivo de células inflamatórias advindas dos vasos sanguíneos. Citocinas e quimiocinas secretadas na área da infecção possuem um papel importante na estimulação e sinalização de células endoteliais⁴⁰. O aumento do número de vasos sanguíneos contribuem para a intensificação do transporte de células inflamatórias, nutrientes e oxigênio para o local da inflamação⁴¹. Dentro deste contexto, um estudo prévio evidenciou aumento na atividade da PNF no soro de ratos após hepatectomia parcial, a qual foi correlacionada com a máxima expressão das moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) presentes nas células endoteliais⁴². Considerando que a proteína ICAM-1 é expressada com o propósito de ligar-se às moléculas de integrina presentes nos leucócitos⁴⁰, é provável que esta rota biológica seja ativada pela PNF. Assim, a expressão da PNF nos vasos sanguíneos merece atenção e parece ser um novo alvo de investigação para o desenvolvimento de terapias clínicas mais efetivas.

Por fim, a enzima se torna um alvo interessante para futuras investigações endodônticas sobre novas estratégias farmacológicas para o controle do dano pulpar.

CONCLUSÃO

A avaliação histológica demonstra mesma intensidade inflamatória e predominância celular de neutrófilos para ambos os grupos experimentais, porém, a extensão inflamatória foi maior para o grupo de 7 dias.

A marcação da PNF foi observada em células endoteliais da polpa dental após 7 dias de agressão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

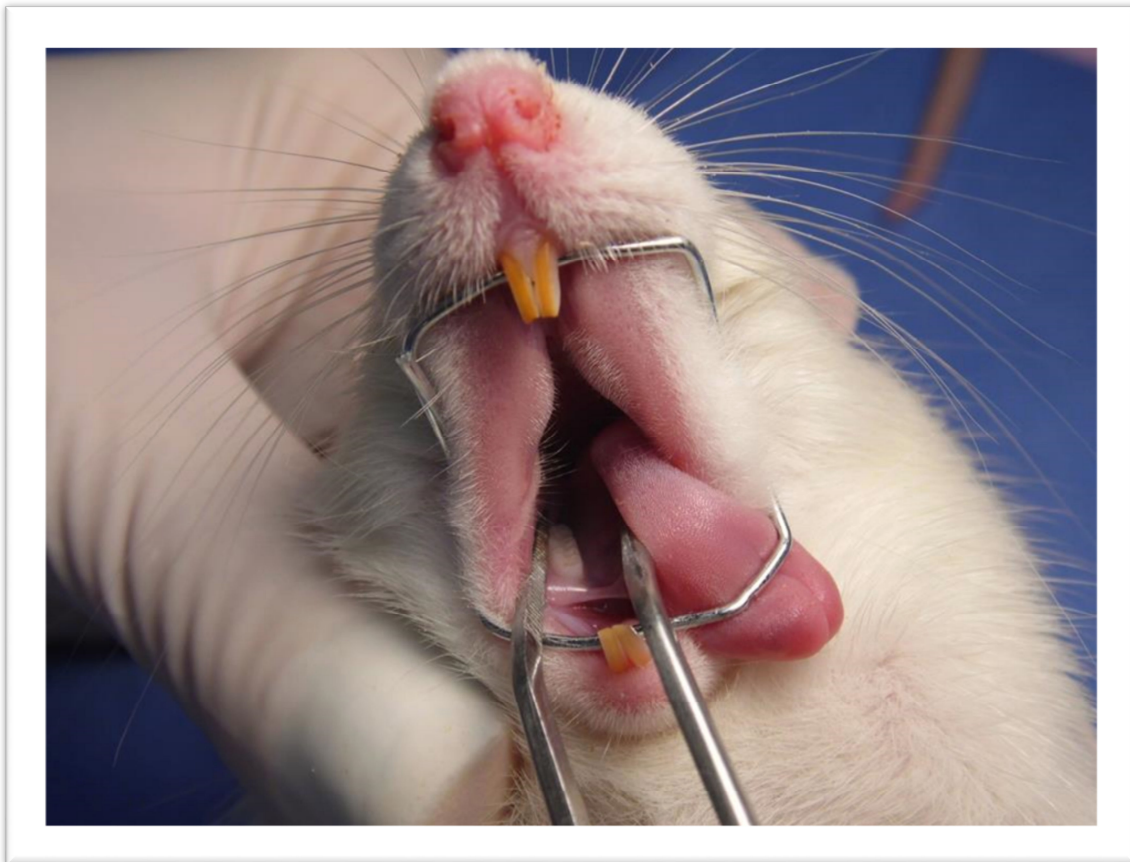
1. Lopes H, Siqueira Jr. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro: Medsi; 1999. 650p.
2. Estrela C, Figueiredo JAP. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas; 2001. 819p.
3. Lesot H, Bègue-Kirn C, Kübler MD, Meyer JM, Smith AJ, Cassidy N, et al. Experimental induction of odontoblast differentiation and simulation during reparative processes. *Cell Mater* 1993;3:201-17.
4. Goldberg M, Farges J, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and Immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* 2008; 58:137-147.
5. Goldberg M, Smith A. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp. A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:13–27.
6. 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;47:303–11.
7. Song M, King HC, Lee W, Kim E. Analysis of the Cause of Failure in Nonsurgical Endodontic Treatment by Microscopic Inspection during Endodontic Microsurgery. *J Endod* 2011;37:1516–1519.
8. Berger CR. Endodontia Clínica. São Paulo: Pancast; 2002. 571p.
9. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20(3):340-49.
10. Dantas CJS, Siqueira Jr JF. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Rio de Janeiro: Medsi; 2000. 238p.
11. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, 7th edn. Philadelphia: Elsevier - Saunders; 2012.
12. Jontell M, Bergenholtz G, Scheynius A, Ambrose W. Dendritic cells and macrophages expressing class II antigens in the normal rat incisor pulp. *J Dent Res* 1988;67:1263–6.
13. Farges J-C, Romeas A, Melin M, Pi J-J, Lebecque S, Lucchini M, et al. TGF- β ₁ induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer. *J Dent Res* 2003;82:652–6.

14. Nomiya K, Kitamura C, Tsujisawa T, Nagayoshi M, Morotomi T, Terashita M, et al. Effects of lipopolysaccharide on newly established rat dental pulp-derived cell line with odontoblastic properties. *J Endod* 2007;33:1187–91.
15. Ohshima H, Sato O, Kawahara I, Maeda T, Takano Y. Responses of immunocompetent cells to cavity preparation in rat molars: an immunohistochemical study using OX6-monoclonal antibody. *Connect Tissue Res* 1995;32:303–11.
16. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Ait-Yahia S, Vaure C, Chemin K, et al. Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation* 2002;73(Suppl. 1):7–11.
17. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol M* 2002;13:171–83.
18. Bzowska A, Kulikowska E, Shugar D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2000; 88: 349-425.
19. Timmers LFSM, Caceres RA, Vivan AL, Gava LM, Dias R, Ducati RG, et al. Structural studies of human purine nucleoside phosphorylase: towards a new specific empirical scoring function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008; 479:28-38.
20. Kenneth CR, Arnold WJ, Palella T, Fox IH. Cellular Immune deficiency with autoimmune hemolytic anemia in purine nucleoside phosphorylase deficiency 1979; 67:172-176.
21. Moraes MC, Ducati RG, Donato AJ, Basso LA, Santos DS, Cardoso CL et al. Capillary bioreactors based on human purine nucleoside phosphorylase: a new approach for ligands identification and characterization. *Journal of Chromatography A* 2012; 1232:110-115.
22. Bantia S, Montgomery JA, Johnson HG, Walsh GM. In vivo and in vitro pharmacologic activity of the purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-34: the role of GTP and dGTP. *Immunopharmacology* 1996; 35: 53-63.
23. Batista Jr EL, Deves C, Ayub L, da Silva RG, Filho LCC, Basso LA, et al. Purine nucleoside phosphorylase activity and expression are upregulated in sites affected by periodontal disease. *J Periodont Res* 2010; 45:664-671.
24. Hirschhorn R, Candotti F. Immunodeficiency due to defect of purine metabolism. In: Ochs HD, Smith CI, Puck JM (eds) *Primary immunodeficiency diseases. A molecular and genetic approach*. 2007; 2nd edn. Oxford University Press, New York.
25. Markert ML. Purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Immunodeficiency Rev* 1991; 3:45–81.

26. Dror Y, Grunebaum E, Hitzler J et al. Purine nucleoside phosphorylase deficiency associated with a dysplastic marrow morphology. *Pediatr Res* 2004; 55:472–477.
27. Aytakin C, Yuksek M, Dogu F et al. An unconditioned bone marrow transplantation in a child with purine nucleoside phosphorylase deficiency and its unique complication. *Pediatr Transplant* 2008; 12:479–482.
28. Giblett ER, Ammann AJ, Wara DW, Sandman R, Diamond LK. Nucleoside-phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity. *Lancet* 1975; 1:1010– 1013.
29. Parks, RE Jr, Agrwal, RP. In the enzymes, 3rd Ed. (Boyer, P.D. ed.). 1972; Academic Press, New York.
30. Bantia S, Parker C, Upshaw R, Cunningham A, Kotian P, Kilpatrick JM, Morris P, Chand P, Babu YS. Potent orally bioavailable purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-4208 induces apoptosis in B- and T-lymphocytes - a novel treatment approach for autoimmune diseases, organ transplantation and hematologic malignancies. *Int Immunopharmacol* 2010; 10(7):784-90.
31. Eriksson S, Thealander L, Akerman M. Allosteric regulation of calf thymus ribonucleoside diphosphate reductase. *Biochemistry* 1979; 10;18(14):2948-52.
32. Avery JK. *Oral Development and Histology* 2002; 3rd edn. New York: Thieme.
33. Bruno KF, Silva JA, Silva TA, Batista AC, Alencar AH, Estrela C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in human dental pulpitis. *Int Endod J* 2010; Nov;43(11):1013-21.
34. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9, 179–200.
35. Hahn CL, Falker WA Jr, Siegel MA. A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J Endod* 1989 15(1):20-6.
36. Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14, 188–98.
37. Scarparo RK, Grecca FS, Dondoni L, Figueiredo JAP. ; Batista EL Jr, Böttcher DE. Apical Periodontium Response to Enamel Matrix Derivative as an Intracanal Medication in Rat Immature Teeth with Pulp Necrosis: Radiographic and Histologic Findings. *J Endod* 2012; 38:449-453.
38. Kohsaka T, Kumazawa M, Yamasaki M, Nakamura H. Periapical Lesions in Rats with Streptozotocin- Induced Diabetes. *J Endod* 1996; 22(8):418–421.

39. Batista Jr EL, Deves C, Ayub L, da Silva RG, Filho LCC, Basso LA, et al. Purine nucleoside phosphorylase activity and expression are upregulated in sites affected by periodontal disease. *J Periodont Res* 2010; 45:664-671.
40. Rahman A, Fazal F. Hug Tightly and Say Goodbye: Role of Endothelial ICAM-1 in Leukocyte Transmigration. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(4): 823–839.
41. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007; 27, 2514–23.
42. Ohtsuka M, Miyazaki M, Kondo Y, Nakajima N. Neutrophil-mediated sinusoidal endothelial cell injury after extensive hepatectomy in cholestatic rats. *Hepatology* 1997; 25(3):636-41.

ANEXO A - Ilustração do dispositivo intrabucal idealizado por Scarparo et al* utilizado durante o experimento.



*Scarparo RK, Dondoni L, Böttcher DE, Grecca FS, Rockenbach MI, Batista EL Jr. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. J Endod 2011; 37(8):1069-73.