

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA –
ÊNFASE EM ODONTOPEDIATRIA**

Linha de Pesquisa
Diagnóstico de Afecções Buco-Faciais

**EXPRESSÃO DO VEGFR-2 EM POLPAS DE DENTES
DECÍDUOS E PERMANENTES JOVENS HUMANOS**

Letícia Grandó Mattuella

Orientadora:
Prof. Dr^a. Anna Christina Medeiros Fossati

Co-orientador:
Prof. Dr. Fernando Borba de Araujo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de mestre em Clínica Odontológica, ênfase em Odontopediatria.

Porto Alegre, dezembro de 2005.

“Mais ou menos favorecidos que sejam pela vida os nossos esforços, é preciso que, ao aproximar-se o grande fim, cada um de nós possa dizer: fiz o que pude.”

Pasteur

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, **Darci** e **Vanda**. Obrigada por acreditarem em mim e nunca medirem esforços para que eu realizasse os meus sonhos. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse subir mais este degrau na minha vida profissional. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu noivo, **Maurinho**. Obrigada por estar sempre do meu lado e pelo apoio incondicional durante a realização desta dissertação. Quero dividir contigo o mérito deste trabalho, pois foste fundamental para que eu pudesse finalizá-lo. Abdicaste muitos finais de semana para ficares comigo no laboratório. Tua presença foi muito importante para mim. Agradeço todos os dias por fazeres parte da minha vida. Te amo muito.

Aos meus avós, **Darvisio, Olga e Ermelinda** por estarem sempre torcendo e rezando por mim. Amo vocês.

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. **Anna Christina** Medeiros Fossati. Considero-te muito mais do que minha orientadora, mas também uma grande amiga. Tua experiência de vida e teus conselhos foram os meus alicerces durante os momentos de dificuldade. Obrigada, por estes dois anos de convivência e pela paciência que tiveste comigo. Te admiro muito.

Ao Prof. Dr. **Jacques Eduardo** Nör, por ter permitido a minha estada em seu laboratório e o meu aprimoramento científico. Eu me sinto abençoada por ter tido a oportunidade de trabalhar e aprender contigo. Conheci uma pessoa maravilhosa e um profissional extremamente dedicado, honesto e batalhador. Obrigada por ter proporcionado esta oportunidade ímpar na minha vida.

Às amigas do Nör Lab, **Mabel, Kathleen, Tatiana e Elisabetta**. Obrigada pelos momentos agradáveis que passamos juntas e pelos ensinamentos proporcionados por vocês. Foi muito bom tê-las conhecido.

Ao amigo **Zhihong**, pelos ensinamentos imunohistoquímicos e por sua amizade e simpatia.

Ao **Chris** Strayhorn, pela sua disposição no auxílio com o microscópio e na realização das imagens imunohistoquímicas.

À querida amiga **Silvana** Beltrami. Obrigada por ter me apresentado à cidade de Ann Arbor e pelo carinho e dedicação que tiveste comigo. Te desejo muito sucesso na tua vida profissional e pessoal.

Aos professores do Curso de Especialização em Odontopediatria da UFRGS, especialmente à Dr^a. **Carla** Moreira Pitoni e à Dr^a. **Juliana** Sarmento Barata, por estarem presentes na minha formação odontopediátrica e serem exemplos docentes para mim.

Às internas da Odontopediatria, **Patrícia** Ferreira, **Cláudia** Fischer, **Renata** Franzon, **Marília** Correia, **Lisiane** Bernardi, **Ana Carolina** Ferrer Diogo e aos amigos **Adriela** Azevedo Souza Mariath e **Luciano** Casagrande pela ajuda e incentivo constantes.

A todos os colegas do curso de mestrado, em especial às da Odontopediatria, **Gisele** Pedroso Moi e **Juliana** Jeker Marchi. Foi muito bom ter convivido com vocês durante estes dois anos. Dividimos muitos momentos, de dificuldades, de tristezas, de saudades, de alegrias. Mas com certeza, tudo valeu muito a pena.

Às mais novas amigas, **Márcia** Oliveira e **Sheila** Sallé. Nos conhecemos há pouco tempo, mas o suficiente para que eu as considere pessoas muito especiais.

À **Leticia** Westphalen Bento, por estar sempre presente nas horas em que precisei de um ombro amigo. Foste muito importante durante a execução deste trabalho. Te considero uma pessoa muito especial e além disso uma grande amiga.

À colega **Giovana** Cezar Dutra, pela ajuda na revisão e correção desta dissertação e principalmente pela grande amiga que se tornou durante este pouco tempo de convívio.

Às funcionárias da Odontopediatria, **Julcelaine** da Silva e **Ana Cláudia** Lopes Araújo, pela dedicação, confiança e amizade.

À Prof. Dr^a. **Fabiana** Vieira Vier-Pelisser, por ter me apresentado à pesquisa. Se hoje eu optei pela vida acadêmica, saiba que foste em ti que me inspirei. Obrigada pelos teus ensinamentos, pela tua amizade e por acreditar em mim.

Aos Profs. Drs. **José Antônio** Poli de Figueiredo e **Cassiano** Kuchenbecker Rösing, por suas contribuições durante a defesa deste projeto.

À **Isabel** da Silva Lauxen, pelo apoio, carinho, dedicação, torcida e pela amizade. Obrigada por ter me acolhido no Laboratório de Patologia e pela disposição em me ajudar sempre que precisei.

À **Adriana** Aguiar, secretária do Programa de Pós-Graduação, pela amizade e ajuda, sempre que necessárias.

Às bibliotecárias, **Norma** e **Eloísa** pela atenção e pelo auxílio na busca de artigos para a realização desta dissertação.

À **CAPES**, por incentivar a formação acadêmica no nosso país.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, pela oportunidade da realização da minha pós-graduação.

Aos Profs. Drs. **Manoel** Sant'Ana Filho e **Pantelis** Varvaki Rados, pelo apoio, incentivo e palavras amigas sempre que precisei.

A todos os funcionários que trabalham na portaria desta universidade, em especial aos Srs. **Antônio**, **Pedro**, **Ricardo** e **Carlos** pela disposição, simpatia e atenção nos inúmeros finais de semana em que precisei trabalhar no laboratório.

Aos meus pacientes e seus responsáveis, por aceitarem colaborar com esta pesquisa.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta dissertação.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. **Fernando** Borba de Araujo. Obrigada por ter me acolhido e aberto as portas da Odontopediatria para que eu pudesse fazer parte desta equipe formada por ti com tanta dedicação e respeito. Talvez eu não tenha tido a possibilidade de conhecê-lo durante o meu curso de graduação, mas agradeço todos os dias por esta oportunidade ter surgido no meu internato e continuado no meu curso de mestrado. Hoje, posso dizer com orgulho que fui tua aluna, e sei que acima de um profissional dedicado e competente, existe um ser humano maravilhoso. Obrigada por ter acreditado em mim.

RESUMO

O conhecimento dos mecanismos celulares envolvidos nos fenômenos orgânicos fisiológicos e/ou patológicos, poderá conduzir a diagnósticos clínicos mais precisos, tratamentos mais direcionados e prognósticos mais favoráveis. Considerando esta premissa, foi objetivo deste estudo avaliar por meio de reação imunohistoquímica a presença ou ausência do *vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR-2) em células endoteliais pulpares de dentes decíduos e permanentes jovens humanos, assim como a distribuição da sua imuno-marcação. A amostra foi constituída de nove dentes decíduos e quatro dentes permanentes jovens, selecionados de indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 5 e 10 anos e 11 e 14 anos, respectivamente. Os espécimes foram fixados em formol diluído a 10% com tampão fosfato 0,1 M por 24 horas e descalcificados com solução de Ana Morse. Após, os mesmos foram processados e incluídos em parafina. Realizaram-se cortes de 5 μ m de espessura. Uma lâmina de cada amostra foi corada pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E) para análise histológica e as demais foram submetidas à reação imunohistoquímica enzimática. Nesta, utilizou-se como anticorpo primário o anti-h VEGFR-2 na diluição de 1:100 e anticorpo secundário biotilado na diluição/proporção pré-estabelecidas pelo fabricante. Após o processamento das lâminas, os campos microscópicos mais significativos foram capturados e analisados qualitativamente quanto à presença ou ausência do VEGFR-2 nas células endoteliais pulpares, assim como à distribuição da imuno-marcação. Os resultados observados mostraram que tanto os dentes decíduos quanto os dentes permanentes jovens apresentaram, especificamente, as células endoteliais pulpares imuno-marcadas para o VEGFR-2. Entretanto, verificou-se que nem todas apresentaram a mesma distribuição de marcação, sendo esta nos dentes decíduos mais evidente próxima à região subodontoblástica. As células endoteliais da polpa dos dentes permanentes jovens demonstraram no mesmo espécime estudado, ausência e presença de marcação endotelial, entretanto esta se apresentou de forma mais uniforme. Levando-se em consideração as limitações encontradas neste estudo, sugere-se que os dentes decíduos apresentam uma capacidade de resposta maior das células endoteliais pulpares ao anti-h VEGFR-2 quando comparados aos dentes permanentes.

PALAVRAS-CHAVE: Dente Decíduo, Dente Permanente Jovem, Fator de Crescimento, Polpa Dental, VEGF, VEGFR-2.

ABSTRACT

The knowledge about the cellular mechanisms involved in the physiological and pathological organic phenomena can probably lead to a more accurate clinical diagnosis, as well as to a more precise treatment and to a more favorable prognosis. Following this significant assumption, the aim of this study was to evaluate through immunohistochemistry reaction the presence or absence of the vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) in endothelial pulp cells of primary and young permanent human teeth, as well as its immunostaining distribution. The sample was constituted of nine primary teeth and four young permanent teeth selected from individuals of both sexes, between the ages of 5-10 and 11-14, respectively. The specimens were fixed in 10% neutral-buffered formalin during 24 hours and decalcified in Ana Morse solution. Afterwards, they were processed and embedded in paraffin. Sections of 5 μm were cut and one slide of each sample was processed for staining with hematoxylin and eosin (H&E) to histological analysis while the other ones were submitted to the immunohistochemistry enzymatic reaction. In the latter, the anti-h VEGFR-2 was used in a dilution of 1:100 as a primary antibody and the secondary biotinylated antibody in the dilution/proportion pre-established by the manufacturer. After the slides were processed the most significant microscopic fields were rescued and qualitatively analyzed in relation to the presence or absence of the VEGFR-2 in the endothelial pulp cells, as well as the distribution of the immunostaining. The results demonstrated that, like the primary teeth, the permanent ones specifically presented the endothelial pulp cells immunostained to the VEGFR-2. Notwithstanding, it was observed that not all of them featured the same distribution, being this characteristic more evident in the deciduous teeth near the subodontoblastic region. The endothelial pulp cells of the young permanent teeth showed in the same specimen, absence or presence of endothelial immunostaining, however it was more uniform than the one observed in the primary teeth. Taking into consideration the limitations found in this study, there is a suggestion that the deciduous teeth present a larger capacity of their endothelial pulp cells to react to the anti-h VEGFR-2 while compared to the permanent ones.

KEYWORDS: Primary Tooth, Permanent Tooth, Growth Factor, Dental Pulp, VEGF, VEGFR-2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** Fotomicrografia da coloração em H&E da polpa de um dente decíduo humano (100X – ZOOM 1,7). 33
- FIGURA 2** Magnificação da região apresentada na Figura 1 (400X – ZOOM 1,7). 33
- FIGURA 3** Fotomicrografia da reação imunohistoquímica para o VEGFR-2 em polpa de dente decíduo humano. **Seta Vermelha:** Marcação evidente das células endoteliais pulpaes. **Seta Preta:** Marcação sutil em algumas células endoteliais pulpaes (200X). 38
- FIGURA 4** Magnificação da região apresentada na Figura 1 (400X). 38
- FIGURA 5** Fotomicrografia evidenciando a reação imunohistoquímica para o VEGFR-2 em células endoteliais pulpaes de dente permanente jovem humano. As setas indicam a ausência de imuno-marcção celular (200X). 38
- FIGURA 6** Fotomicrografia evidenciando a reação imunohistoquímica para o VEGFR-2 em células endoteliais pulpaes de dente permanente jovem humano. As setas indicam a tênue imuno-marcção celular (200X). 38

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Características das Amostras (Dentes Decíduos)	31
QUADRO 2	Características das Amostras (Dentes Permanentes)	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Expressa um valor em percentual

µm – Micrômetros

°C – Graus centígrados (Celsius)

Anti-h – Anti human

AP-1 – *Activator protein-1*

bFGF – *Basic fibroblast growth factor*

cDNA – DNA complementar

c-fos – Proteína proto-oncogênica

DAB – Di-amino benzidina tetrahydroclorideo

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

EGF – *Epidermal growth factor*

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

et al. – *Et alli* (e colaboradores)

FC – Fator de crescimento

Flk-1 – *Fetal liver kinase-1*

Flt-1 – *Fms-like tyrosine-kinase-1*

Flt-4 – *Fms-like tyrosine-kinase-4*

G – Gramas

G + – Gram positivas

G - – Gram negativas

H&E – Hematoxilina e eosina

HRP – *Horseradish peroxidase*

h – Horas

kDa – Kilo dalton

KDR – *Kinase domain region*

LPS – Lipopolissacárides

LTA – Ácido lipoteicóico

M – Molar

MEC – Matriz extracelular

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

P.A. – Pró-análise

PB – *Phosphate buffered*

PDGF – *Plateled derived growth factor*

PIGF – *Placenta growth factor*

P. intermedia – *Prevotella intermedia*

RTK – *Tyrosine-kinase receptor*

T.A. – Temperatura ambiente

TBST – *Tris buffer saline with tween*

TGF- α – *Transforming growth factor- α*

TGF- β – *Transforming growth factor- β*

TLR-2 – *Toll-like receptor-2*

TNF- α – *Tumor necrosis factor- α*

FO.UFRGS – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR-1 – *Vascular endothelial growth factor receptor-1*

VEGFR-2 – *Vascular endothelial growth factor receptor-2*

VEGFR-3 – *Vascular endothelial growth factor receptor-3*

VPF – *Vascular permeability factor*

W – Watts

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1. REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 Tecido Conjuntivo e Polpa Dental	17
1.2 Fatores de Crescimento	20
1.3 Angiogênese	22
1.4 VEGF	23
1.5 VEGF e seus Receptores	24
1.6 VEGF e Polpa Dental	25
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1 Delineamento do Estudo	31
3.2 Seleção da Amostra	31
3.3 Processamento dos Espécimes	32
3.4 Técnica Imunohistoquímica	34
3.5 Avaliação dos Resultados	35
3.6 Considerações Éticas	36
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	39
5.1 Metodologia	39
5.2 Resultados	41
6. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO 1 – Número da Amostra	56
ANEXO 2 – Solução de Ana Morse	57
ANEXO 3 – Processamento de Rotina para Inclusão em Parafina	58
ANEXO 4 – Termo de Consentimento Informado	59

INTRODUÇÃO

A Odontologia vem evoluindo como ciência e para tal os estudos realizados no âmbito da biologia celular e molecular têm apresentado um papel fundamental através da demonstração dos fenômenos que ocorrem a nível celular e de como as células reagem frente aos diversos estímulos.

O profissional da área da saúde deve compreender as reações celulares presentes tanto nos processos fisiológicos, como nos patológicos, assim como os mecanismos envolvidos em ambos. Inúmeras pesquisas metodologicamente bem conduzidas têm sido responsáveis pela descoberta de eventos biológicos extremamente importantes, possibilitando uma abordagem mais direcionada e efetiva das diversas situações que se apresentam clinicamente. Novas terapias têm surgido baseadas no entendimento mais aprofundado do desenvolvimento embrionário e nos processos envolvidos na cura de feridas em nível celular e molecular.

Sinais ou mensageiros químicos e macromoléculas protéicas que compõem a matriz extracelular (MEC) se apresentam como ligantes celulares, permitindo a troca de informações entre as células. O ligante se prende a locais específicos na superfície da membrana celular, denominados receptores. Estes, ao serem ativados pela união à molécula ligante, deflagram cascatas de sinalização intracitoplasmáticas que irão estimular ou inibir a transcrição de um determinado gene. Entre os sinalizadores químicos, encontram-se os fatores de crescimento (FC), sintetizados pela maioria das células, e que ligados a receptores específicos irão atuar na mudança de comportamento de uma célula-alvo.

O *vascular endothelial growth factor* (VEGF) é o FC mais importante no controle de respostas vasculares em todo o organismo. Sua expressão está relacionada com o fenômeno da angiogênese, sendo este um mitógeno específico para as células endoteliais. Seus receptores são do tipo *tyrosine-kinase* (RTK) e apresentam-se de três formas, o *vascular endothelial growth factor receptor-1* (VEGFR-1), o VEGFR-2 e o *vascular endothelial growth factor receptor-3* (VEGFR-3). Entretanto, o VEGFR-2 parece estar intimamente associado com as atividades

mitogênicas, de migração celular, de permeabilidade vascular e de sobrevivência das células endoteliais do VEGF. O objetivo deste trabalho, portanto, é verificar por meio de técnica imunohistoquímica a presença e a distribuição da imunomarcção do VEGFR-2 na polpa de dentes decíduos e permanentes jovens humanos.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Tecido Conjuntivo e Polpa Dental

O tecido conjuntivo desenvolve-se a partir do mesênquima, e caracteriza-se, morfológicamente, por apresentar diversos tipos de células, separadas por abundante material intercelular sintetizado por elas. Esse material apresenta uma parte com estrutura microscópica definida, as fibras do conjuntivo, e outra parte não estruturada, composta pela substância fundamental. Banhando as células, as fibras e a substância fundamental, há uma pequena quantidade de fluido, denominado o plasma intersticial (ROSS, REITH, ROMRELL 1993; BREW, FIGUEIREDO, 2003; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

A polpa é um tecido conjuntivo frouxo, especializado, que contém células, fibras, substância fundamental, vasos sangüíneos e terminações nervosas. Ela encontra-se confinada em paredes rígidas de dentina formando com esta uma entidade embriológica e funcional, denominada como o complexo dentino-pulpar (SMULSON, SIERASKI, 1998; AVERY, 2001; SOUZA, 2001; FIGUEIREDO, FIGUEIREDO, 2002; BERKOVITZ, HOLLAND, MOXHAM, 2004). A polpa desempenha diversas funções tais como, iniciação, formação, proteção, nutrição, reparação e promoção da vitalidade dos dentes (PICOSSE, 1977; CHIEGO JÚNIOR, 1994; AVERY, 2001; SOUZA, 2001).

Quando o aspecto histológico da polpa é examinado, quatro zonas distintas podem ser distinguidas: a camada odontoblástica na periferia da polpa, a camada acelular abaixo dos odontoblastos, a camada rica em células e o centro da polpa (SMULSON, SIERASKI, 1998; ARANA, KATCHBURIAN, 1999; AVERY, 2001; TORNECK, 2001; BERKOVITZ, HOLLAND, MOXHAM, 2004).

O tipo celular predominante na polpa dental é o fibroblasto, mas é possível observar a presença de outras células, tais como odontoblastos, células sangüíneas, células de Schwann, células endoteliais e células mesenquimais indiferenciadas. Além disso, durante os períodos de inflamação podem estar presentes células envolvidas na resposta imune, como os macrófagos, mastócitos,

células apresentadoras de antígenos e proteínas do plasma (CHIEGO JÚNIOR, 1994).

As fibras colágenas e reticulares fazem parte da MEC pulpar, e têm importante papel na sustentação deste tecido (FIGUEIREDO, FIGUEIREDO, 2002). O colágeno tipo I é o principal componente fibroso, mas o colágeno tipo III também constitui uma porção significativa (LINDE, 1985; MARTINEZ et al., 2000).

Os elementos celulares e fibrilares da polpa estão envoltos em uma substância fundamental gelatinosa com alta concentração de água, que contém um número de diferentes glicosaminoglicanas, glicoproteínas e proteoglicanas. Esta substância gelatinosa atua como barreira à invasão bacteriana, consistindo em um elemento de defesa inespecífico (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2000; SOUZA, 2001; BERKOVITZ, HOLLAND, MOXHAM, 2004). Além disso, as células estão constantemente interagindo com a MEC (MARTINEZ et al., 2000). Esta, por sua vez, tem um significado funcional muito amplo, formando um substrato que fornece condições adequadas para o crescimento e diferenciação das células dos vários tecidos. Ela participa da manutenção, da estrutura, do desenvolvimento embrionário e pós-natal, da proliferação celular, da regeneração, da nutrição e de processos patológicos (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2000).

Os vasos sangüíneos entram e deixam a polpa dental através dos forames apical e acessórios. As arteríolas ocupam uma posição central na polpa, atravessam sua porção radicular e emitem pequenos ramos laterais que se estendem e ramificam em direção à área subodontoblástica. Na região coronária da polpa forma-se uma extensa rede vascular capilar. O lado eferente ou de drenagem da circulação é composto por um extenso sistema de vênulas de diâmetros comparáveis aos das arteríolas, porém com paredes mais finas, tornando o seu lúmen maior. Os vasos linfáticos também são encontrados no tecido pulpar, sendo estes de pequeno calibre e com paredes finas. Percorrem, apicalmente, as regiões média e radicular da polpa, deixando-a, através de um ou dois grandes vasos pelo forame apical (ARANA, KATCHBURIAN, 1999; TORNECK, 2001).

A polpa dental é ricamente inervada, existindo uma correlação na distribuição dos nervos e vasos pulpares. Os nervos localizados nas proximidades dos vasos sanguíneos são constituídos por fibras nervosas mielínicas e amielínicas envoltas pelo citoplasma das células de Schwann. Um feixe neurovascular penetra na polpa através do forame apical e a partir de um feixe nervoso predominantemente mielinizado saem filetes nervosos até a região periférica do órgão pulpar, perdendo sua mielina no decorrer deste trajeto. Este feixe, na região subodontoblástica coronária, constitui o Plexo de Raschkow, localizado na camada acelular de Weil (TORNECK, 2001).

As características do tecido pulpar apresentadas até o momento possuem a mesma aplicabilidade histológica à polpa dos dentes decíduos, apesar destes apresentarem um ciclo biológico definido, que inicia com a embriogênese dentária e termina com a esfoliação fisiológica (FOX, HEELEY, 1980).

A vida média da polpa dental decídua é relativamente curta. A pulpogênese inicia-se junto com a formação coronária e radicular. Subseqüentemente, ocorre a formação completa da raiz seguida de reabsorção radicular incipiente e, finalmente, o avanço da rizólise até sua reabsorção total (GUEDES-PINTO, DUARTE, 1999).

Uma análise morfológica, histométrica e histoquímica da polpa de molares decíduos em diferentes fases de reabsorção radicular (início, metade e final de reabsorção) foi realizada por Araujo (1982). O autor concluiu que as alterações estruturais observadas no tecido pulpar nestas três fases não podem ser consideradas como degenerativas. A estrutura pulpar de dentes decíduos com rizólise até a metade da raiz reabsorvida é semelhante à descrita para dentes permanentes jovens, mantendo-se as estruturas vasculares, células mesenquimais e fibroblastos em maior quantidade no início e decrescendo na metade e final do processo.

Moreira (2001) estudou o aspecto histológico e a inervação do complexo dentino-pulpar de dentes decíduos humanos em diferentes fases de rizólise, subdividindo-os em três grupos. As amostras com até 1/3 de raiz reabsorvida

apresentavam dentina e pré-dentina revestindo o tecido pulpar, assim como, a presença das quatro camadas pulpares: a camada odontoblástica, a camada acelular, a camada rica em células e o centro da polpa. Além disso, a polpa apresentou intensa vascularização. Os espécimes com mais de 1/3 e até 2/3 de raiz reabsorvida apresentavam um tecido conjuntivo frouxo em 75% dos casos, constituído das quatro zonas pulpares, além de uma intensa vascularização, semelhante ao observado nos dentes do primeiro grupo. Já as amostras com mais de 2/3 de raiz reabsorvida demonstraram a presença da organização em camadas em apenas 28% dos casos.

A vascularização presente em dentes decíduos e permanentes, tanto em estado de saúde quanto em estado de doença, foi avaliada por Rodd e Boissonade (2005). Os autores observaram que somente o terço médio coronário da polpa dos dentes decíduos apresentou um significativo aumento da vascularização quando comparado ao mesmo local na polpa dos dentes permanentes. Ambas as dentições demonstraram um aumento da vascularização na região do corno pulpar na presença de lesão cáriosa, porém sem um aumento no número de vasos sanguíneos. Além disso, segundo os autores, não houve correlação entre a presença de sintomatologia e a vascularização pulpar.

1.2 Fatores de Crescimento

Os componentes da MEC da polpa são amplamente responsáveis pelas propriedades fisiológicas deste tecido. Vários processos clinicamente importantes ocorrem extracelularmente, como as reações inflamatórias e a formação de tecido calcificado (LINDE, 1985).

A proliferação celular é requerida em vários processos, incluindo embriogênese e desenvolvimento, respostas imunológicas e reposição de células. Acontece em resposta a um pequeno grupo de polipeptídeos denominados de FC, que regulam o comportamento das células (SMITH, MURRAY, LUMLEY, 2002). Existem na superfície celular receptores específicos para cada FC, que ao se ligar ao receptor faz com que esse se ative, deflagrando assim um sinal que será

internalizado e transduzido (THESLEFF, TUMMERS, 2003; FATORES de Crescimento, 2005).

Os sinais que passam entre as células são muito simples. Caracteristicamente, um tipo especial de molécula é produzido por uma célula – a célula sinalizadora – e detectada por outra – a célula-alvo – por meio de um receptor protéico, que reconhece o sinal e responde especificamente à molécula sinalizadora. O receptor protéico desempenha o primeiro passo numa série de processos de transdução da sinalização na célula-alvo, aonde o sinal extracelular que chega é convertido em sinais intracelulares que direcionam o comportamento celular (ALBERTS et al., 1999; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2000; LODISH et al., 2000; COOPER, 2002; NÖR, 2005).

A maioria dos receptores de superfície celular está associada aos canais iônicos, à proteína G ou às enzimas. A natureza do sinal intracelular deflagrado quando a molécula sinalizadora se liga ao receptor vai depender do tipo de célula-alvo e da associação ocorrida. Os receptores ligados a enzimas ficaram conhecidos pela sua função nas respostas a FC. A maioria desses fatores age como mediador local e é requerido somente em concentrações muito baixas. As respostas a eles são caracteristicamente lentas e necessitam muitas etapas de transdução intracelulares as quais, ao final, levarão a mudanças na expressão gênica. A maior classe de receptores associados a enzimas são aqueles cujo domínio citoplasmático funciona como uma proteína tirosino-quinase, fosforilando cadeias laterais de tirosina em proteínas intracelulares selecionadas. Tais RTK incluem a grande maioria dos receptores de FC (ALBERTS et al., 1999; COOPER, 2002).

Diversos FC iniciam e regulam a angiogênese, podendo ter um efeito regulatório positivo ou negativo. Eles podem agir tanto diretamente para regular a função das células endoteliais, quanto indiretamente para regular a expressão de outros FC por diferentes tipos celulares. (FOLKMAN, KLAGSBRUN, 1987).

A comunicação celular pode ocorrer de forma endócrina, parácrina ou autócrina. Na primeira, os hormônios são lançados no espaço extracelular,

penetram nos capilares sangüíneos e se distribuem por todo o corpo, indo atuar à distância na célula-alvo. Já quando na forma parácrina, os sinais químicos atuam nas proximidades do local onde foram secretados, atingindo tipos celulares diferentes da célula que originou o sinal. Na forma autócrina, os sinais químicos atuam no local onde foram secretados, atingindo o mesmo tipo de célula, além da própria célula que originou o sinal (ALBERTS et al., 1999; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2000; LODISH et al., 2000; COOPER, 2002).

1.3 Angiogênese

Os vasos sangüíneos podem se formar a partir de dois processos distintos, a vasculogênese e a angiogênese. Na vasculogênese ocorre a diferenciação de células endoteliais a partir de precursores mesodérmicos (angioblastos). Entretanto na angiogênese, novos vasos são formados a partir de outros já existentes. A vasculogênese ocorre durante o desenvolvimento embrionário e conduz à formação do plexo vascular primário. Posteriormente, estes canais endoteliais se desenvolvem formando um sistema mais complexo e se ramificando em vasos maiores e menores. Novos capilares são então formados através da angiogênese por divisão dos vasos de origem (AUERBACH, AUERBACH, 2001).

A angiogênese faz parte de um importante processo natural que ocorre no corpo, sendo fundamental em inúmeras condições fisiológicas (desenvolvimento embrionário, ovulação, cicatrização) e patológicas (artrite, retinopatia diabética, tumores). Em muitas doenças graves, o corpo perde o controle sobre a angiogênese resultando num desenvolvimento excessivo ou insuficiente de vasos sangüíneos, como no caso de retinopatia da prematuridade, câncer e psoríase (FOLKMAN, SHING, 1992; RIBATTI, 2004). Há pelo menos 20 FC angiogênicos e 30 anti-angiogênicos conhecidos (THE ANGIOGENESIS FOUNDATION, 2005).

Inúmeros indutores angiogênicos já foram identificados, incluindo membros da família do *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *transforming growth factor- α* (TGF- α), *transforming growth factor- β* (TGF- β), *platelet derived growth factor* (PDGF), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) entre outros (RIBATTI, 2004). Entretanto,

nenhum despertou tanto o interesse científico quanto o VEGF (FERRARA, 2002; OLIVEIRA, GODOY, SOUZA, 2002).

1.4 VEGF

Senger et al. (1983) descreveram, a partir da cultura de células tumorais de cobaia, a purificação parcial de uma proteína que promovia o aumento da permeabilidade vascular. Esta proteína chamada de *vascular permeability factor* (VPF) segundo os autores, poderia ser um mediador específico da hiperpermeabilidade de vasos sanguíneos tumorais e estar envolvida com a formação de ascites associadas a tumores (FERRARA, 2002).

Em 1989, Ferrara e Henzel isolaram um mitógeno específico para células endoteliais, a partir da cultura de células foliculares bovinas. Como esta proteína apresentou atividade promotora de crescimento somente em ação conjunta com as células endoteliais vasculares, ela foi denominada VEGF.

Por esta razão, alguns autores resolveram estudar a seqüência completa do cDNA do VPF e do VEGF. Algumas atividades, tais como a mitogênese para as células endoteliais e a indução da permeabilidade vascular, foram mediadas pelo mesmo fator (KECK et al., 1989; LEUNG et al., 1989).

O VEGF é originalmente uma glicoproteína de 45 kDa, básica e ligada à heparina (FERRARA, HENZEL, 1989). A família do VEGF atualmente inclui seis membros conhecidos, VEGF-A, B, C, D, E e o PDGF. O VEGF-A e o VEGF-B estão intimamente relacionados aos fenômenos angiogênicos. O *splicing* alternativo do mRNA de um único gene envolvendo oito éxons, codifica inúmeras isoformas protéicas do VEGF (LEUNG et al., 1989), com subunidades polipeptídicas contendo 121, 145, 165, 189 e 206 aminoácidos (RIBATTI, 2004). Das cinco isoformas apresentadas, o VEGF₁₆₅ é a mais abundantemente encontrada (KEYT et al., 1996). A MEC das células que expressam o VEGF₁₈₉ ou VEGF₂₀₆ auxilia o crescimento de células endoteliais. Em contraste, a proteína VEGF é bioquimicamente indetectável na MEC das células que expressam o VEGF₁₂₁ e o VEGF₁₆₅. Entretanto, a MEC derivada das células que expressam o

VEGF₁₆₅ é capaz de estimular o crescimento das células endoteliais, porém de forma menos efetiva. Uma explicação para este acontecimento pode ser o fato do VEGF₁₆₅ ser mais potente que as demais isoformas (PARK, KELLER, FERRARA, 1993).

As proteínas do VEGF podem se tornar disponíveis para as células endoteliais pelo menos através de dois mecanismos distintos, ou pelo *splicing* alternativo gerando proteínas difusíveis, como o VEGF₁₂₁ e o VEGF₁₆₅, ou pela ativação de proteases e clivagem das isoformas mais longas (FERRARA, 2002).

Existe uma significativa homologia do VEGF com o PDGF e outro membro desta família, o *placenta growth factor* (PIGF), (KEYT et al., 1996). O PIGF pode formar dímeros com o VEGF e apesar de sozinho apresentar pouca atividade mitogênica ou de permeabilidade, ele torna-se capaz de potencializar significativamente a atividade de concentrações muito baixas de VEGF (RIBATTI, 2004). O PDGF e o VEGF, apesar de estarem relacionados estruturalmente e serem mitógenos, atuam em células alvos distintas e apresentam diferentes propriedades biológicas (KECK et al, 1989).

1.5 VEGF e seus Receptores

Os receptores de VEGF estão expressos na superfície das células endoteliais vasculares. São do tipo RTK e se apresentam de três formas: *fms-like tyrosine-kinase-1* (Flt-1) ou VEGFR-1, *fetal liver kinase-1* (Flk-1), *kinase domain region* (KDR) ou VEGFR-2 e *fms-like tyrosine-kinase-4* (Flt-4) ou VEGFR-3 (PIMENTA, SÁ, GOMES, 2003), além de interagirem com uma família de co-receptores, as neurofilinas, as quais apresentam o VEGF ao seu receptor, aumentando a efetividade da cascata de transdução de sinal (FERRARA, 2001; FERRARA, GERBER, LeCOUTER, 2003). Há uma forte evidência de que estes receptores apresentam diversas propriedades de transdução de sinal e possivelmente mediam diferentes funções por apresentarem distinta afinidade pelo VEGF (WALTENBERGER et al., 1994; KEYT et al., 1996; FERRARA, 2001). Por

esta razão, muitas dificuldades têm sido encontradas na elucidação das contribuições individuais de cada um na sinalização do VEGF (FERRARA, 2001).

Há uma década atrás, o VEGFR-1 foi o primeiro RTK identificado e muitas dúvidas existiam a respeito das funções desta molécula (PARK et al., 1994; MARU, YAMAGUCHI, SHIBUYA, 1998). Roberts et al. (2004) demonstraram que na ausência do VEGFR-1, haveria mais ligante disponível para se ligar ao VEGFR-2 e o primeiro passo da transdução de sinal, a fosforilação do receptor RTK, estaria sobre-regulada. Esta sobre-regulação, por sua vez, conduziria a um aumento na sinalização através dos inúmeros caminhos que são ativados pela transdução de sinal do VEGFR-2, incluindo a proliferação, sobrevivência, migração e permeabilidade vascular. Neste trabalho os autores demonstraram que a modulação negativa do VEGFR-1 influencia na sinalização do VEGFR-2 interferindo no nível de fosforilação da tirosina.

O VEGFR-2 tem uma menor afinidade pelo VEGF quando comparado ao VEGFR-1, porém uma maior atividade sinalizadora. A atividade mitogênica em células endoteliais é principalmente mediada pelo VEGFR-2, determinando a sua proliferação (CYTOKINES, Growth Factors & Chemokines, 2005). O VEGFR-2 sofre uma fosforilação da tirosina e media a mitogênese, a migração celular e a permeabilidade vascular em resposta ao VEGF, enquanto que o VEGFR-1 apresenta fraca ou indetectável resposta (WALTENBERGER et al., 1994; SHALABY et al., 1995; KEYT et al., 1996; NIIDA et al., 1999; GILLE et al., 2001; FERRARA, GERBER, LeCOUTER, 2003).

1.6 VEGF e Polpa Dental

A polpa dental é um tecido de baixa flexibilidade, enclausurado entre paredes dentinárias rígidas. Apesar de algumas situações específicas requererem um aumento na densidade vascular, quando exagerado este processo pode se tornar deletério e contribuir para a instalação de uma patologia pulpar irreversível, uma vez que a polpa dental apresenta limitações em aliviar as pressões internas (SMULSON, SIERASKI, 1998).

Matsushita et al. (2000) sugeriram em seu trabalho que o VEGF produzido pelas células pulpares humanas age diretamente sobre estas de forma autócrina e promove a quimiotaxia, proliferação e/ou diferenciação celular. Esta ação ocorre por meio do VEGFR-2 e em parte pela sinalização do fator de transcrição *activator protein-1* (AP-1) através da proteína c-fos, apesar de ambos os receptores (VEGFR-1 E VEGFR-2) estarem presentes nas células pulpares.

Os trabalhos encontrados na literatura relacionando VEGF e polpa dental avaliaram a presença da proteína em diferentes situações (MATSUSHITA et al., 1999; ROBERTS-CLARK, SMITH, 2000; MARTINS, 2001; ARTESE et al., 2002; BOTERO et al., 2003; DERRINGER, LINDEN, 2003; TELLES et al., 2003; DERRINGER, LINDEN, 2004).

Roberts-Clark, Smith (2000), isolaram frações de matriz solúveis e insolúveis da dentina humana e mediram pela reação de ELISA a quantidade de vários FC angiogênicos, dentre eles, o VEGF, que foi encontrado em ambas as matrizes. Portanto, a matriz dentinária contém fatores de crescimento angiogênicos e a sua liberação depois de uma injúria pode ser importante para a resposta reparativa do complexo dentino-pulpar.

A utilização de anticorpos neutralizadores (anti-h VEGF, FGF2, PDGF, TGF- β e *epidermal growth factor* – EGF) permitiu avaliar a presença da combinação de cinco FC angiogênicos difusíveis na polpa dental humana durante a aplicação de força ortodôntica. Os anticorpos neutralizadores reduziram significativamente o número de microvasos nas culturas de células estudadas, demonstrando que ocorre a liberação desta combinação de FC na polpa dental durante a movimentação ortodôntica (DERRINGER, LINDEN, 2003). Os mesmos autores em 2004 avaliaram individualmente e através de diferentes combinações a resposta angiogênica pulpar. Da mesma forma, foram utilizados anticorpos neutralizadores (anti-h VEGF, FGF2, PDGF e TGF- β) e observou-se uma redução significativa no número de microvasos pulpares. Entretanto, houve uma tendência de maior redução com o aumento das combinações.

Em 2001, Martins comparou a expressão do VEGF em polpas dentais humanas inflamadas, hiperplasias fibrosas inflamatórias e granulomas dentários. Na polpa dentária, a imunolocalização do VEGF foi observada em células endoteliais e células inflamatórias, principalmente neutrófilos e plasmócitos. Neste trabalho, o autor analisou e comparou três lesões ocasionadas por agentes etiológicos distintos, sendo que duas delas, polpas inflamadas e granulomas dentários, encontravam-se em situações de confinamento por dentina e osso, concluindo que não houve diferença na imunolocalização do VEGF nas três condições estudadas.

Artese et al. (2002) realizaram a técnica imunohistoquímica para verificar a expressão do VEGF e do fator VIII em células pulparem sadias e com pulpíte irreversível, e observaram um número de microvasos estatisticamente maior na polpa sadia quando comparada à polpa com sinais irreversíveis. Tal fato pode ser explicado devido à falha da função vascular no órgão pulpar e à redução do fluxo sanguíneo, quando da presença de uma patologia irreversível.

Alguns estudos vêm sendo realizados para avaliar e relacionar a influência dos lipopolissacárides (LPS) produzidos pelas bactérias gram negativas (G -) e do ácido lipoteicoico (LTA) produzido pelas bactérias gram positivas (G +) na expressão do VEGF.

Matsushita et al. (1999) investigaram *in vitro* se a produção de VEGF pelas células pulparem humanas seria regulada pelos LPS, relacionando com a patogênese da pulpíte. Os autores observaram que os LPS da *Escherichia coli* (*E.coli*) e da *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) induziram a expressão do VEGF mRNA. Verificaram ainda que o inibidor do fator de transcrição AP-1 inibiu a indução do VEGF pelo LPS da *E. coli* e que o aumento da produção de VEGF pelos LPS requer a síntese de novas proteínas.

As células pulparem semelhantes a odontoblastos e os macrófagos sobre-regularam a expressão do VEGF em resposta ao estímulo dos LPS, entretanto, o mesmo não ocorreu com as células pulparem indiferenciadas e os fibroblastos. Os resultados deste estudo realizado *in vitro* demonstraram que a habilidade em

responder ao estímulo dos LPS e conseqüentemente aumentar a expressão do VEGF não é uma resposta generalizada para todos os tipos celulares, mas sim uma resposta específica para certas células (BOTERO et al., 2003).

Telles et al. (2003) analisaram o efeito do LTA produzido por *Streptococcus sanguis* e *mutans* na regulação da angiogênese avaliando cultura de células. Concluíram que o LTA induziu uma sobre-regulação do VEGF, tanto em macrófagos, quanto em células semelhantes a odontoblastos e em células pulpares indiferenciadas. Estas observações sugerem que o LTA de bactérias G + deve ter um papel direto no aumento da neovascularização observada em sítios infecciosos. Contrariamente, o LTA não induziu a expressão do VEGF em fibroblastos. Além disso, os autores sugerem que a regulação do VEGF nestas células é primeiramente pós-transcricional, uma vez que a expressão do VEGF mRNA permaneceu constante sob expressão ao LTA.

Soden (2005) avaliou a sinalização intracelular na expressão do VEGF induzida pelo LTA em células pulpares. O autor observou a presença do *tool-like receptor-2* (TLR2) em células semelhantes a odontoblastos, macrófagos e fibroblastos, entretanto as células pulpares indiferenciadas apresentaram uma menor expressão deste receptor em nível de mRNA. Além disso, a sobre-regulação do VEGF induzida pelo LTA nestas mesmas células é mediada por vias de sinalização diferentes.

A maioria dos trabalhos citados avaliou a presença do VEGF a partir de cultura de células, verificando a expressão da proteína sob várias condições por meio da utilização de reações bioquímicas e técnicas moleculares diversas, entretanto, pode-se valer também de técnicas imunohistoquímicas. Essas se baseiam na marcação de estruturas pela ação de anticorpos específicos, permitindo a identificação de componentes protéicos de células ou tecidos. Além disso, representam um valioso método auxiliar de diagnóstico em histopatologia, possibilitando uma melhor caracterização das células, agentes infecciosos e outras moléculas em relação à histoquímica convencional (TRUE, 1990).

Pouco se conhece sobre os receptores para o VEGF na polpa dental humana. Apenas Matsushita et al. (2000) avaliaram a presença destes no tecido pulpar, mas utilizando citometria de fluxo de células em cultura primária. Por esta razão, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de observar a expressão do VEGFR-2 na polpa de dentes humanos por meio de análise imunohistoquímica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar por meio de reação imunohistoquímica a expressão do VEGFR-2 em polpas dentais humanas.

2.2 Objetivos Específicos

Através de análise observacional, procurou-se:

- a) Avaliar qualitativamente a presença ou ausência do VEGFR-2 em células endoteliais pulpaes de dentes decíduos e permanentes jovens humanos.

- b) Verificar a distribuição da imuno-marcação do VEGFR-2 nos dois grupos dentários estudados.

3. METODOLOGIA

3.1 Delineamento do Estudo

Estudo observacional descritivo, qualitativo.

3.2 Seleção da Amostra

Treze dentes fizeram parte da amostra deste estudo, sendo que os mesmos foram divididos em 2 grupos, contendo:

Grupo 1: nove dentes decíduos humanos hígidos, ântero-superiores e inferiores, em diferentes fases de rizólise, sendo 4 incisivos centrais, 1 incisivo lateral e 4 caninos (Quadro 1).

QUADRO 1 – Características das Amostras (Dentes Decíduos)

<i>Número total de amostras</i>	9
Localização do dente na arcada dentária	
Incisivo central superior	2
Incisivo lateral superior	1
Canino superior	1
Incisivo central inferior	2
Canino inferior	3

Grupo 2: quatro dentes permanentes jovens humanos hígidos, com rizogênese completa, sendo 1 incisivo lateral, 1 pré-molar inferior e 2 superiores (Quadro 2).

QUADRO 2 – Características das Amostras (Dentes Permanentes)

<i>Número total de amostras</i>	4
Localização do dente na arcada dentária	
Incisivo lateral superior	1
1º Pré-molar superior	2
1º Pré-molar inferior	1

Os dentes decíduos (rizólise inicial, intermediária e final) e permanentes jovens foram coletados de crianças e adolescentes de ambos os sexos, com idade entre 5 e 10 anos (média de 7,4 anos) e 11 e 14 anos (média de 12,2 anos), respectivamente, que estavam em atendimento na Disciplina de Odontopediatria da FO.UFRGS, Porto Alegre-RS. A unidade amostral foi o paciente e, portanto cada amostra foi proveniente de um indivíduo. Os espécimes foram extraídos por razões ortodônticas (erupção ectópica do dente permanente ou discrepância negativa de base óssea em relação ao tamanho dentário). Portanto, este diagnóstico e a conduta terapêutica a ser tomada foram determinados pelo profissional responsável pelo tratamento da criança através de uma requisição para a realização da exodontia. Antes deste procedimento, critérios clínicos e radiográficos foram avaliados para determinar a inclusão do dente na amostra, bem como o preenchimento de uma ficha clínica individual com os dados do paciente e do espécime (ANEXO 1). Nos critérios clínicos, avaliou-se a condição de higiene dentária após a profilaxia prévia com pasta profilática e escova Robson, bem como a ausência de mobilidade não compatível com o processo de rizólise. Nos critérios radiográficos constatou-se saúde pulpar através da ausência de reabsorções dentinárias externas e internas patológicas, de aumento do espaço do ligamento periodontal e de lesão radiolúcida na região peri-radicular (ARAUJO et al., 2004).

3.3 Processamento dos Espécimes

Após a exodontia, as amostras foram identificadas e imersas em frascos plásticos individuais contendo formol diluído a 10% com tampão fosfato 0,1 M por um período de 24h (MOREIRA, 2001) à temperatura ambiente (T.A.) para a fixação do tecido pulpar. Seguido este período os espécimes foram submetidos ao processo de descalcificação com solução de Ana Morse (ARAUJO, 1982), conforme ANEXO 2.

A solução descalcificadora foi renovada a cada 72 h e as soluções A e B foram proporcionadas em partes iguais no ato da troca.

O tempo médio, necessário para a descalcificação dos espécimes decíduos e permanentes, foi de 4,7 e 5,2 meses, respectivamente.

Após a constatação do término da descalcificação através de critérios físicos (PAGE et al., 1996), procedeu-se a lavagem dos espécimes em água corrente por um período de 12h. A seguir, as amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e emblocadas em parafina (ANEXO 3). No ato da inclusão, os dentes decíduos (9) foram submersos na parafina de modo que a face vestibular dos mesmos ficasse posicionada contra a base do bloco. O incisivo lateral permanente e o pré-molar inferior foram incluídos da mesma forma. Entretanto, para que se obtivesse um corte histológico que contemplasse ambas as raízes, os pré-molares superiores (2) foram incluídos de modo que a sua face proximal ficasse direcionada contra a base do bloco. Obtiveram-se cortes histológicos seriados de 5 μm em micrótomo rotatório, e os mesmos foram posicionados sobre lâminas de vidro previamente carregadas (Dako, S3003, Carpinteria, CA). Uma lâmina de cada dente foi corada com H&E para verificar a abrangência tanto da polpa coronária como radicular, permitindo assim sua análise histológica integral. A partir deste momento, foram realizadas mais duas lâminas de cada amostra contendo dois cortes seqüenciais em cada uma. As lâminas foram então, aquecidas em estufa a 60°C durante 90 minutos e submetidas à reação imunohistoquímica.

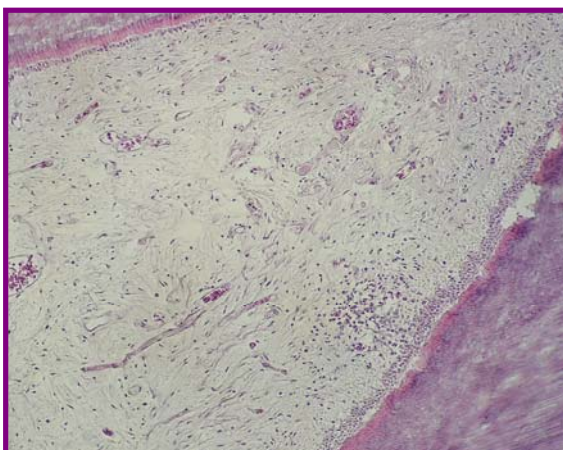


Figura 1: Fotomicrografia da coloração em H&E da polpa de um dente decíduo humano (100X – ZOOM 1,7).

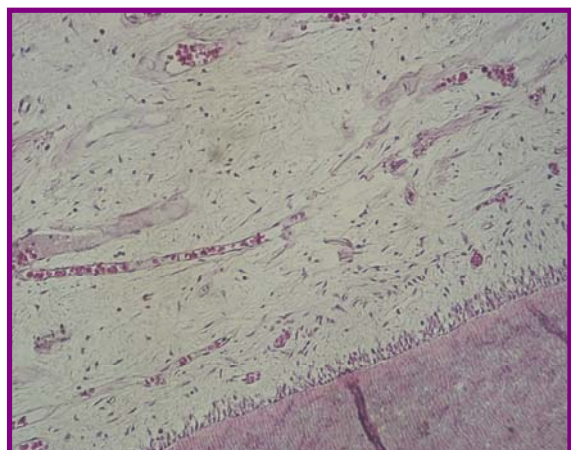


Figura 2: Magnificação da região apresentada na figura 1 (100X – ZOOM 1,7).

3.4 Técnica Imunohistoquímica

A técnica imunohistoquímica, utilizando anticorpo policlonal anti-h VEGFR-2 (R&D Systems, Minneapolis, EUA), seguiu o seguinte o protocolo:

- 1- Pré-aquecimento das lâminas por 20 minutos à temperatura de 65°C.
- 2- Desparafinização em xilol (três trocas de 2 minutos cada).
- 3- Reidratação através de trocas graduais de álcoois 100%, 95% e 70% (2 minutos cada).
- 4- Passagem rápida em água destilada.
- 5- Lavar em solução tampão, duas vezes (TBST, Dako, Code S3006, Carpinteria, EUA).
- 6- Recuperação antigênica (Target Retrieval Solution, Dako, Code S1699, Carpinteria, EUA): imergir as lâminas na solução e levá-las ao microondas (General Electric, New York, EUA – modelo JE1860 WH), em potência máxima (1100 W) por 10 minutos. Retirar e aguardar outros 10 minutos. Lavar em água destilada por 15 minutos.
- 7- Bloqueio da peroxidase endógena (Peroxidase Block, Dako Cytomation, Code K0679, Carpinteria, EUA). Aplicar uma gota proporcional sobre cada corte.
- 8- Lavar em solução tampão.
- 9- Anticorpo primário, concentração 1:100, durante 30 minutos. Aplicar uma gota proporcional sobre cada corte.
- 10- Lavar em solução tampão, duas vezes.
- 11- Anticorpo secundário (Biotinylated Link, Dako Cytomation, Code K0679, Carpinteria, EUA). Aplicar uma gota previamente proporcionada sobre cada corte e aguardar 30 minutos.
- 12- Lavar em solução tampão, duas vezes.
- 13- Reagente terciário (Streptavidin-HRP, Dako Cytomation, Code K0679, Carpinteria, EUA). Aplicar uma gota proporcional sobre cada corte e aguardar 30 minutos.
- 14- Lavar em solução tampão, três vezes.

- 15- Revelação com o cromógeno DAB (DAB + Substrate Buffer, Dako Cytomation, Code K0679, Carpinteria, EUA). Preparar a solução de acordo com o número de lâminas, conforme recomendação do fabricante.
- 16- Lavar em água destilada, três vezes durante 5 minutos cada.
- 17- Contra-coloração com hematoxilina de Harris por 3 segundos.
- 18- Lavar em água corrente por 5 minutos.
- 19- Passagem rápida em água destilada.
- 20- Desidratação através de trocas graduais de álcoois 70%, 95% e 100% (2 minutos cada).
- 21- Imergir em xilol (três trocas de 2 minutos cada).
- 22- Montagem da lâmina.

O processamento das lâminas foi realizado com o *Dako AutoStainer* (Dako Cytomation, Carpinteria, USA).

Como controle positivo foi utilizada placenta humana e no controle negativo foi feita a omissão do anticorpo primário.

3.5 Avaliação dos Resultados

Foi realizada a observação de todo o tecido pulpar contido em cada secção histológica. Os campos que possibilitaram uma melhor visualização foram capturados para análise com o auxílio do microscópio Nikon Scope Eclipse E800® (Nikon, Melville, EUA) acoplado a um computador marca DELL® (Dell Inc., Round Rock, USA), através do programa Image Pro-Plus 5.1® (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Os resultados foram avaliados por um único observador devidamente treinado em relação aos critérios de imuno-marcação. A partir dos controles positivo e negativo e do auxílio de um profissional (padrão-ouro) capacitado para esta avaliação, determinou-se o que seria considerado presença ou ausência de marcação imunohistoquímica. Os seguintes aspectos foram analisados:

- a presença ou a ausência de marcação imunohistoquímica nas células endoteliais pulpare de dentes decíduos e permanentes jovens humanos;
- a distribuição da marcação imunohistoquímica nas células endoteliais pulpare de dentes decíduos e permanentes jovens humanos.

3.6 Considerações Éticas

O projeto de pesquisa foi apresentado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS, sob protocolo número 57/04 em 31/08/05.

Os responsáveis pelos pacientes que participaram do trabalho foram informados verbalmente e por escrito, concordando com os procedimentos realizados mediante autorização através de um termo de consentimento informado (ANEXO 4).

4. RESULTADOS

A análise observacional qualitativa deste estudo permitiu a verificação da marcação imunohistoquímica do VEGFR-2, especificamente nas células endoteliais pulpareas. Este aspecto foi constatado em ambos os grupos estudados.

Observou-se que na polpa dos dentes decíduos, as células endoteliais não apresentaram a mesma distribuição de marcação, sendo esta mais evidente próxima à região subodontoblástica do que na porção mais interna da polpa decídua (Figuras 3 e 4).

Já as células endoteliais da polpa dos dentes permanentes demonstraram no mesmo espécime estudado, ausência (Figura 5) e presença (Figura 6) de marcação endotelial, entretanto esta se apresentou de forma mais uniforme.

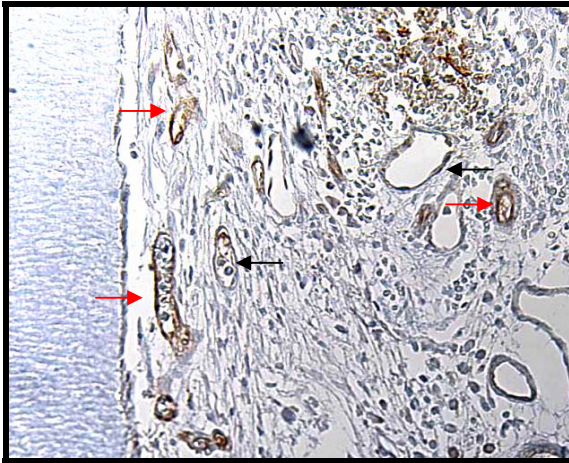


Figura 3: Fotomicrografia da reação imunohistoquímica para o VEGFR-2 em polpa de dente decíduo humano. **Seta Vermelha:** Marcação evidente das células endoteliais pulpare. **Seta Preta:** Marcação sutil de algumas células endoteliais pulpare (200x).

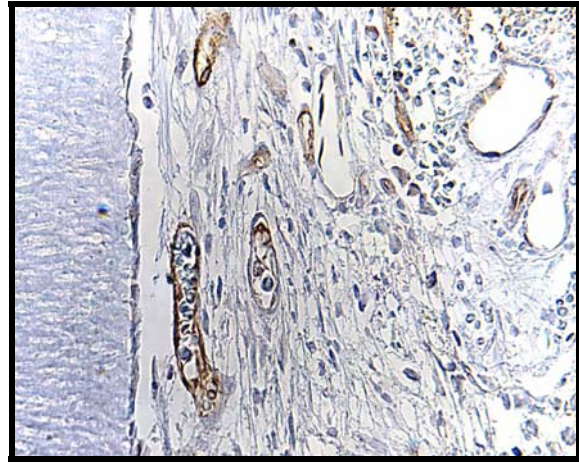


Figura 4: Magnificação da região apresentada na Figura 1 (400X).

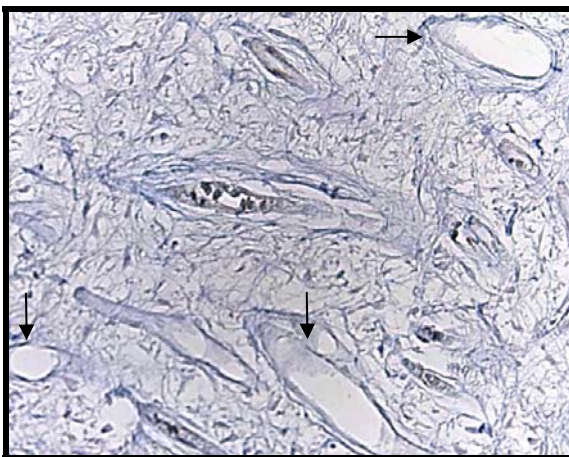


Figura 5: Fotomicrografia evidenciando a reação imunohistoquímica para o VEGFR-2 em células endoteliais pulpare humanas de dente permanente jovem humano. As setas indicam a ausência de imuno-marcação das células (200X).

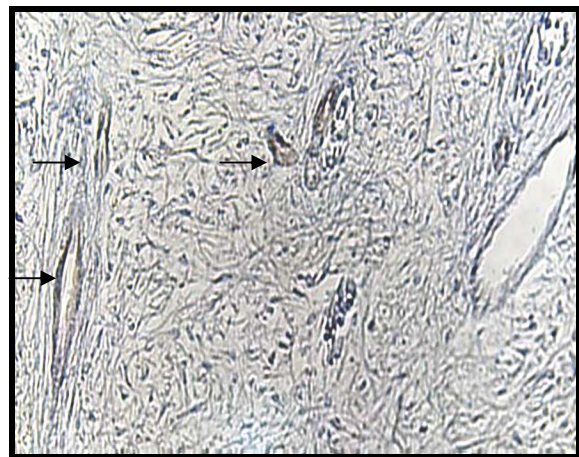


Figura 6: Fotomicrografia evidenciando a reação imunohistoquímica para o VEGFR-2 em células endoteliais pulpare de dente permanente jovem humano. As setas indicam a tênue imuno-marcação celular (200X).

5. DISCUSSÃO

5.1 Metodologia

No presente trabalho encontramos inúmeras dificuldades técnicas em relação ao processamento das peças, iniciando pela escolha do agente fixador e descalcificador a serem utilizados. A literatura é bastante vasta em relação ao assunto e existem inúmeros protocolos seguidos pelos diferentes centros de estudo (MILLER, SWANSON, WICK, 2000). Um plano piloto realizado previamente ao início desta pesquisa demonstrou que ambas as soluções fixadoras utilizadas foram eficientes em relação à preservação tecidual. A fixação realizada tanto com paraformaldeído a 4% (FOSSATI, 2000), quanto com formol a 10% (ARAUJO, 1982; SARI, ARAS, GUNHAN, 1999; MOREIRA, 2001), parece conservar os tecidos em condições favoráveis para estudo e análise microscópica de seus componentes celulares. Porém, em função da facilidade de obtenção, longa experiência na utilização, qualidade das peças fixadas e maior tempo de estocagem, preconizou-se a utilização de formol diluído a 10% tamponado (MILLER, SWANSON, WICK, 2000). O tampão fosfato a 0,1 M, proporciona uma melhor preservação dos constituintes celulares e teciduais (BRASILEIRO FILHO, BARBOSA, MIRANDA, 1994). A solução de paraformaldeído a 4%, além de exigir maiores dificuldades técnicas no seu preparo, como aquecimento e ajuste sensível do pH, tem um tempo limitado de validade (FOSSATI, 2000).

Page et al. (1996) informaram que qualquer ácido, mesmo que corretamente tamponado, apresenta efeitos na estabilidade do tecido. Os autores ainda acrescentaram que quanto mais rápida a ação do agente descalcificador, maiores as injúrias e os efeitos indesejáveis posteriores. Em nosso plano piloto, o EDTA a 10% exigiu um maior tempo de processamento das amostras em relação à solução de Ana Morse, alterando as características do tecido pulpar de forma mais agressiva. Isto nos sugere que uma descalcificação realizada de forma muito lenta também pode acabar se tornando deletéria ao tecido, pelo longo período de contato do agente descalcificador com o material processado.

Poucos trabalhos são encontrados na literatura que descrevam o tempo despendido para a completa descalcificação dentária, seja ela proveniente de material humano ou animal. Trabalhando com a descalcificação de terceiros molares humanos em ácido fórmico a 20%, Piva (2000) descreveu um tempo que variou de 6-8 semanas para o completo processamento dos espécimes. Vier (2005), avaliando dentes de roedores, relatou ter necessitado de 5 meses para a completa descalcificação das amostras em EDTA a 17%.

Desta forma, por ser um ácido fraco, a solução de Ana Morse foi selecionada, sendo que a adição do citrato de sódio à sua composição foi sugerida por Evans e Krajian¹ (1930) apud Morse (1945), para neutralizar a tendência do ácido fórmico de aumentar o volume do espécime submetido ao processo de descalcificação.

Sabe-se que a reabsorção nos dentes decíduos unirradiculares ocorre em forma de bisel e que por esta razão parte da polpa coronária ainda permanece intacta no momento da esfoliação dentária (TEN CATE, 2001; BERKOVITZ, HOLLAND, MOXHAM, 2004).

A ressecção apical visando uma melhor penetração do agente fixador (PIVA, 2002) foi dispensada nos dentes decíduos, devido ao processo de rizólise. Quanto aos dentes permanentes, da mesma forma, optou-se pela não utilização desta manobra, com a finalidade de não induzir um estímulo térmico sobre o tecido dentário e afetar a sua integridade.

Quando um estudo objetiva a utilização de técnicas imunohistoquímicas para a sua realização, as soluções empregadas devem preservar os epítopes antigênicos, causando o menor dano possível a estas estruturas, assim não comprometendo a marcação. Apesar da descalcificação invariavelmente afetar os epítopes independente da solução, alguns trabalhos realizaram a técnica imunohistoquímica e obtiveram resultados favoráveis (MOREIRA, 2001; PIVA, 2002).

¹ EVANS N, KRAJIAN A. New method of decalcification. *Arch Pathol*, Chicago, v. 10, no. 447.1930.

A utilização de microondas para a realização da recuperação antigênica é condenada por alguns autores pela irregularidade do aquecimento produzido. Além disso, o grau e a uniformidade do aquecimento variam de acordo com a quantidade de material processado. Para evitar que a solução evapore durante o aquecimento deverá ocorrer um monitoramento e uma complementação da solução para prevenir o ressecamento dos cortes (MILLER, SWANSON, WICK, 2000). Porém, a utilização de microondas foi a única opção testada que nos permitiu a recuperação dos epítopes antigênicos, de forma relativamente satisfatória.

Os nossos resultados não puderam ser quantificados pelas dificuldades técnicas encontradas no presente estudo. Acredita-se que o longo tempo requerido para a completa descalcificação das amostras, provavelmente tenha afetado a morfologia pulpar e limitado a avaliação imunohistoquímica por destruir os epítopes antigênicos necessários para uma análise mais detalhada. Por esta razão, este trabalho limitou-se à análise qualitativa da expressão do VEGFR-2 em polpas dentárias humanas, não havendo por isso a necessidade de separar os dentes decíduos de acordo com o seu grau de rizólise e a sua posição na arcada dentária. Os dentes decíduos com até $1/3$ ou entre $1/2$ e $2/3$ de sua raiz reabsorvida, não apresentaram diferença em relação à densidade de vasos sanguíneos no tecido pulpar (SARI, ARAS, GUNHAN, 1999). Sabe-se, contudo, que uma observação quantitativa simultânea à qualitativa permitiria uma visão mais precisa das mudanças angiogênicas pulpares (DERRINGER, LINDEN, 2003).

5.2 Resultados

O VEGF é um FC mitógeno para células endoteliais e, portanto, um potente fator angiogênico (FERRARA, HENZEL, 1989; FERRARA, 1995; GILLE et al., 2001). Estudos o apontam como o maior regulador da angiogênese fisiológica (FERRARA, BUNTING, 1996). Ele apresenta três RTK, o VEGFR-1, o VEGFR-2 e o VEGFR-3.

Inúmeros trabalhos relacionando o VEGF e a polpa dental foram encontrados na literatura (MATSUSHITA et al., 1999; ROBERTS-CLARK, SMITH, 2000; MATSUSHITA et al., 2000; MARTINS, 2001; ARTESE et al., 2002; BOTERO et al., 2003; TELLES et al., 2003; DERRINGER, LINDEN, 2003; DERRINGER, LINDEN, 2004; SODEN, 2005). No entanto, a detecção e a avaliação de seus receptores, *in vitro*, foi somente relatada por Matsushita et al. (2000), trabalhando com citometria de fluxo de células em cultura primária.

A literatura ainda não é clara a respeito das propriedades individuais de cada receptor na sinalização do VEGF. Na verdade, o VEGFR-1 atuaria de forma a limitar a ligação do VEGF ao VEGFR-2, modulando a sua atividade. Além disso, teria a capacidade de gerar, de alguma forma, um sinal mitogênico (WALTENBERGER et al., 1994; MARU, YAMAGUSHI, SHIBUYA, 1998; ROBERTS et al., 2004).

Pelos trabalhos disponíveis serem mais unânimes no que se refere às propriedades biológicas do VEGFR-2 promovendo a transdução de sinal envolvida na mitogênese e na migração celular, assim como o aumento da permeabilidade vascular, este receptor foi alvo deste estudo (WALTENBERGER et al., 1994; KEYT et al., 1996; GILLE et al., 2001).

Sabe-se que para ocorrer a transdução do sinal, não basta a proteína estar disponível na MEC, a presença de um receptor protéico é indispensável para permitir a ligação da molécula sinalizadora. A partir desta ligação, uma cascata de sinalização é iniciada e o comportamento celular direcionado de acordo com o tipo de célula-alvo (SHALABY et al., 1995; ALBERTS et al., 1999; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2000; LODISH et al., 2000; COOPER, 2002; NÖR, 2005).

Roberts-Clark, Smith (2000) demonstraram que o VEGF está expresso na matriz dentinária e sugeriram que a sua lenta liberação após uma injúria poderia ser benéfica aos processos reparatórios do complexo dentino-pulpar. No presente estudo, observou-se a presença do VEGFR-2 nas células endoteliais pulpares de dentes decíduos em processo de rizólise. Podemos inferir que este fenômeno, apesar de fisiológico, poderia estar determinando a liberação da proteína da matriz

dentínaria em reabsorção. Simultaneamente, seria um estímulo suficiente para promover a transcrição e a tradução de forma mais intensa do gene que codifica o seu receptor.

Araujo (1982) verificou que a polpa dos dentes decíduos com até metade da raiz reabsorvida se assemelha muito com a de dentes permanentes jovens, inclusive em relação às estruturas vasculares. Nossos achados sugerem que, a nível molecular, a presença do receptor-2 para o VEGF é mais evidente no dente decíduo. Isto provavelmente se deva ao fato deste estar sujeito a um estímulo fisiológico, acima descrito, inerente ao dente decíduo, projetando-se como um mecanismo importante para a viabilidade do complexo dentino-pulpar nestes dentes, independente do seu estágio de reabsorção.

Além disso, há evidência de que diferentes indivíduos possam apresentar diferentes níveis de FC angiogênicos. Existe uma resposta individual de cada paciente, que pode ser justificada pelas diferenças biológicas e morfológicas existentes (DERRINGER, LINDEN, 2003; DERRINGER, LINDEN, 2004).

Trabalhando com dentes decíduos e permanentes por meio de técnica imunohistoquímica, Rodd e Boissonade (2005) observaram que o terço médio coronário da polpa decídua apresentou um aumento significativo da vascularização quando comparado à mesma região do dente permanente. Neste artigo, os autores não encontram sustentação científica para explicar este achado, sugerindo que este aumento da vascularização possa ser explicado pela demanda funcional que a polpa dentária decídua apresenta ou ainda, pela amplitude foraminal presente nestes dentes. Não foi possível a avaliação dos terços pulparem no nosso estudo pelas dificuldades técnicas descritas. Porém, esta relação deve ser avaliada em trabalhos futuros, pois a distribuição da imuno-marcação nas células endoteliais da polpa dental decídua não ocorre da mesma forma.

A observação da presença do VEGFR-2 no dente decíduo em processo de rizólise, provavelmente, esteja indicando a necessidade de um maior aporte sanguíneo para a região, resultando na maior oxigenação e chegada de células clásticas ao local. O VEGF regula o recrutamento, a sobrevivência e a atividade de

osteoclastos (NIIDA et al., 1999). Isto poderia explicar o fato dos vasos situados mais centralmente não apresentarem a mesma distribuição de marcação celular em relação aos situados próximo à região sub-odontoblástica, onde a angiogênese seria mais necessária.

No presente estudo, a menor marcação observada nos dentes permanentes pode ser devido à ausência de uma reserva citoplasmática do receptor associada à ausência de um estímulo que promova a sua expressão. Já foi estabelecido que o LTA e os LPS presentes na parede celular de bactérias G⁺ e G⁻, respectivamente, seriam estímulos capazes de promover a sobre-regulação da proteína VEGF em tipos celulares específicos (TELLES et al., 2003; BOTERO et al., 2004). Nestes casos, um rápido aumento na expressão do VEGF poderia resultar em necrose pulpar devido a um aumento na pressão intrapulpar e no edema causados pela neovascularização induzida pelo VEGF. Este fato acarretaria a necessidade da expressão de seu receptor específico, o que não foi constatado nesta pesquisa, por se tratarem de dentes permanentes hígidos. A marcação uniforme observada em algumas células endoteliais seria explicada simplesmente pela expressão fisiológica do receptor.

Em muitas situações clínicas, um aumento da vascularização é desejado, sendo que tal processo deve ser controlado, pois a polpa está confinada em paredes rígidas de dentina, apresentando limitações em expandir-se (SMULSON, SIERASKI, 1998; SMITH, 2002). Uma analogia da polpa dental pode ser feita com o cérebro humano, sendo este um órgão pouco complacente também contido em paredes rígidas. Sabe-se que existe um importante papel desempenhado pela família de proteínas sinalizadoras Src na permeabilidade vascular mediada pelo VEGF. Verificou-se que uma breve supressão da atividade Src pode reduzir a isquemia induzida em um dano cerebral e prevenir danos neurológicos a longo prazo, sem interromper a neovascularização mediada pelo VEGF (PAUL et al., 2001). Acreditamos que experimentos futuros deverão ser realizados para avaliar a modulação da sinalização do VEGF na polpa dental, assim como as suas vias

de sinalização intracelular, de modo que os resultados laboratoriais possam ser transportados para a clínica odontológica.

Ressaltamos ainda, que novos estudos deverão ser realizados para quantificar a presença do VEGFR-2 na polpa dental humana, assim como avaliar a sua distribuição em zonas periféricas e centrais do tecido pulpar. Além disso, a distribuição deste receptor deveria ser analisada em dentes com lesões cariosas de natureza ativa e inativa, uma vez que os trabalhos nos mostram uma relação da expressão da proteína VEGF com a presença dos LPS e do LTA presentes em bactérias envolvidas no processo carioso. Entretanto, tais experimentos requerem a utilização de técnicas moleculares mais sensíveis, permitindo assim uma avaliação mais criteriosa.

6. CONCLUSÃO

As células endoteliais pulpares de dentes decíduos e permanentes jovens humanos expressaram o VEGFR-2, sendo que uma distribuição maior da imunomarcção foi observada nos dentes decíduos, próxima à região subodontoblática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. Comunicação Celular. In: _____. **Fundamentos da Biologia Celular: Uma Introdução à Biologia Celular**. Porto Alegre: Artmed, 1999. Cap. 15, p. 493-525.

THE ANGIOGENESIS FOUNDATION. Understanding Angiogenesis. About Angiogenesis. Disponível em:
<<http://www.angio.org/understanding/understanding.html>>.
Acesso em: 14 set. 2005.

ARANA, V.; KATCHBURIAN, E. Complexo Dentina-Polpa. In: _____. **Histologia e Embriologia Oral: Texto – Atlas – Correlações Clínicas**. São Paulo: Panamericana, 1999. Cap. 7, p. 181-236.

ARAUJO, F.B. **Estudo Morfológico, Histométrico e Histoquímico da Polpa de Molares Decíduos em Diferentes Fases de Reabsorção Radicular**. 1982. 126 f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ARAUJO, F.B. et al. Abordagem Contemporânea da Terapia Pulpar em Dentes Decíduos. In: Estrela, C. **Ciência Endodôntica**. São Paulo: Artes Médicas, 2004. Cap. 19, p. 941-990.

ARTESE, L. et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Healthy and Inflamed Human Pulp. **J. Endod.**, Baltimore, v. 28, no. 1, p. 20-23, Jan. 2002.

AUERBACH, R.; AUERBACH, W. Vasculogenesis and Angiogenesis. In: FAN, T.D.; KOHN, E.C. **The New Angiotherapy**. Totowa: Human Press, 2001. Cap. 1, p. 1-6.

AVERY, J.K. Polpa Dentária. In: _____. **Fundamentos de Histologia e Embriologia Bucal: Uma Abordagem Clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 9, p. 98-113.

BERKOVITZ, B.K.B.; HOLLAND, G.R.; MOXHAM, B.J. Polpa Dentária. In: _____. **Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. Cap. 10, p. 149-167.

BERKOVITZ, B.K.B.; HOLLAND, G.R.; MOXHAM, B.J. Desenvolvimento das Dentições. In: _____. **Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. Cap. 26, p. 349-363.

BOTERO, T. et al. Effect of Lipopolysaccharides on Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Mouse Pulp Cells and Macrophages. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.111, no.3, p. 228-234, Jun. 2003.

BRASILEIRO FILHO, G.; BARBOSA, A.J.A.; MIRANDA, D. Métodos de Estudo em Patologia. In: BRASILEIRO FILHO, G. et al. **Bogliolo Patologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. Cap. 2, p. 6-19.

BREW, M.C.; FIGUEIREDO, J.A.P. Tecido Conjuntivo. In: _____. **Histologia Geral para a Odontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 4, p. 53-71.

CHIEGO JÚNIOR, D.J. Histology of Pulp. In: AVERY, J.K. **Oral Development and Histology**. 2 ed. Stuttgart: Thieme, 1994. Cap. 16, p. 262-281.

COOPER, G.M. Sinalização Celular. In: _____. **A Célula: Uma Abordagem Molecular**. Porto Alegre: Artmed, 2002. Cap. 13, p. 547-593.

CYTOKINES, Growth Factors & Chemokines: Recombinant Human (sVEGF-2-FC Chimera) sKDR-Fc chimera. Disponível em: <<http://www.researchd.com/cytokines/vegfrag.htm>>. Acesso em: 14 set. 2005. (Pesquisa feita no provedor Google)

DERRINGER K.A.; LINDEN, R.W.A. Angiogenic Growth Factors Released in Human Dental Pulp Following Orthodontic Force. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 48, no. 4, p. 285-291, Apr. 2003.

DERRINGER, K.A.; LINDEN, R.W.A. Vascular Endothelial Growth Factor, Fibroblast Growth Factor-2, Platelet Derived Growth Factor and Transforming Growth Factor Beta Released in Human Dental Pulp Following Orthodontic Force. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 49, no. 8, p. 631-641, Aug. 2004.

FATORES de Crescimento. Disponível em:
<<http://www.virtual.epm.br/cursos/biomol/ciclo/html/fatores.htm>>. Acesso em: 14 set. 2005. (Pesquisa feita no provedor Google)

FERRARA, N. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Pathological Angiogenesis. **Breast Cancer Res. Treat.**, Boston, v. 36, no. 2, p. 127-137, 1995.

FERRARA, N. Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Regulation of Physiological Angiogenesis. **Am. J. Physiol., Cell Physiol.**, Bethesda, v. 280, no. 6, p. C1358-1366, Jun. 2001.

FERRARA, N. VEGF and the Quest for Tumour Angiogenesis Factors. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 2, no. 10, p.795-803, Oct. 2002.

FERRARA, N.; BUNTING, S. Vascular Endothelial Growth Factor, a Specific Regulator of Angiogenesis. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, London, v. 5, no. 1, p. 35-44, Jan. 1996.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LeCOUTER, J. The Biology of VEGF and its Receptors. **Nat. Med.**, New York, v. 9, no. 6, p. 669-676, June 2003.

FERRARA, N.; HENZEL, W.J. Pituitary Follicular Cells Secrete a Novel Heparin-Binding Growth Factor Specific for Vascular Endothelial Cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 161, no. 2, p. 851-858, June 1989.

FIGUEIREDO, J.A.P.; FIGUEIREDO, M.A.Z. Diagnóstico e Prognóstico das Alterações Pulpares. In: CARDOSO, R.J.A.; GONÇALVES, E.A.N. **Endodontia: Trauma**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. v. 2. Cap. 3, p. 39-53.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic Factors. **Science**, Washington, v. 235, no. 4787, p. 442-447, Jan. 1987.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 267, no. 16, p. 10931-10934, June 1992.

FOSSATI, A.C.M. **Integrinas e Proteínas da Matriz Extracelular Durante o Desenvolvimento da Glândula Submandibular de Ratos**. 2000. 105 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FOX, A.G.; HEELEY, J.D. Histological Study of Pulps of Human Primary Teeth. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 25, no. 2, p. 103-110, 1980.

GILLE, H. et al. Analysis of Biological Effects and Signaling Properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A Reassessment Using Novel Receptor-Specific Vascular Endothelial Growth Factor Mutants. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 276, no. 5, p. 3222-3230, Feb. 2001.

GUEDES-PINTO, A.C.; DUARTE, D.A. Pulpoterapia Odontopediátrica. In: GUEDES-PINTO, A.C. et al. **Reabilitação Bucal em Odontopediatria : Atendimento Integral**. São Paulo: Santos, 1999. Cap. 8, p. 105-119.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Comunicações Celulares por Meio de Sinais Químicos. In: _____. **Biologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 6, p. 103-115.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Conjuntivo. In: _____. **Histologia Básica – Texto/ Atlas**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 5, p. 92-124.

KECK, P.M. et al. Vascular Permeability Factor, an Endothelial Cell Mitogen Related to PDGF. **Science**, Washington, v. 246, no. 4935, p. 1309-1312, Dec. 1989.

KEYT, B.A. et al. Identification of Vascular Endothelial Growth Factor Determinants for Binding KDR and Flt-1 Receptors. Generation of Receptor-Selective VEGF Variants by Site- Directed Mutagenesis. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, no. 10, p. 5638-5646, Mar. 1996.

LEUNG, D.W. et al. Vascular Endothelial Growth Factor is a Secreted Angiogenic Mitogen. **Science**, Washington, v. 246, no. 4935, p. 1306-1309, Dec. 1989.

LINDE, A. The Extracellular Matrix of the Dental Pulp and Dentin. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 64, no. 5, Sp. Issue, p. 523-529, Apr. 1985.

LODISH, H. et al. Cell-to-Cell Signaling: Hormones and Receptors. In: _____. **Molecular Cell Biology**. New York: W. H. Freeman & Co, 2000. Cap. 20, p. 848-909.

MARTINEZ, E.F. et al. Immunohistochemical Localization of Tenascin, Fibronectin, and Type III Collagen in Human Dental Pulp. **J. Endod.**, Chicago, v. 26, no. 12, p. 708-711, Dec. 2000.

MARTINS, R.N. **Imunolocalização do Fator de Permeabilidade Vascular (VEGF) em Polpas Dentárias Humanas Inflamadas**. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARU, Y.; YAMAGUSHI, S.; SHIBUYA, M. Flt-1, a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor, has Transforming and Morphogenic Potentials. **Oncogene**, Basingstoke, v. 16, no. 20, p. 2585-2595, May 1998.

MATSUSHITA, K. et al. Lipopolysaccharide Enhances the Production of Vascular Endothelial Growth Factor by Human Pulp Cells Culture. **Infec. Immun.**, Washington, v. 67, no. 4, p. 1633-1639, Apr. 1999.

MATSUSHITA, K. et al. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Dental Pulp Cells: Induction of Chemotaxis, Proliferation, and Differentiation and Activation of the AP-1- Dependent Signaling Pathway. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 79, no. 8, p. 1596-1603, Aug. 2000.

MILLER, R.T.; SWANSON, P.E.; WICK, M.R. Fixation and Epitope Retrieval in Diagnostic Immunohistochemistry: A Concise Review with Practical Considerations. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, Hagerstown, v. 8, no. 3, p. 228-235, Sep. 2000.

MOREIRA, A. **Histologia e Inervação do Complexo Dentino- Pulpar de Dentes Decíduos Humanos em Diferentes Fases de Rizólise**. 2001. 150 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MORSE, A. Formic Acid-Sodium Citrate Decalcification and Butyl Alcohol Dehydration of Teeth and Bones for Sectioning in Paraffin. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.24, p.143-153, 1945.

NIIDA, S. et al. Vascular Endotelial Growth Factor can Substitute for Macrophage Colony- Stimulating Factor in the Support of Osteoclastic Bone Resorption. **J. Exp. Med.**, New York, v. 190, no. 2, p. 293-298, Jul. 1999.

NÖR, J.E. Genética e Biologia Molecular na Promoção de Saúde. In: TOLEDO, O.A. **Odontopediatria: Fundamentos para a Prática Clínica**. 3. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2005. Cap. 7, p. 153-162.

OLIVEIRA, M.A.B.; GODOY, M.F.; SOUZA, D.R.S. Angiogênese e o Fator Endotelial de Crescimento Vascular. **Rev. Brasil. Med.**, São Paulo, v. 59, no. 1-2, p. 81-84, Jan./Fev. 2002.

PAGE, K. et al. Bone. In: BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. **Theory and Practice of Histological Techniques**. 4. ed. New York: Churchill Livingstone, 1996. 776 p. Cap. 15, p. 309-339.

PARK, J.E. et al. Placenta Growth Factor. Potentiation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioactivity *in vitro* and *in vivo* and High Affinity Binding to Flt-1 but not to Flk-1/ KDR. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, no. 41, p. 25646-25654, Oct. 1994.

PARK, J.E.; KELLER, G.A.; FERRARA, N. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Isoforms: Differential Deposition into the Subepithelial Extracellular Matrix and Bioactivity of Extracellular Matrix- Bound VEGF. **Mol. Biol. Cell**, Bethesda, v. 4, no. 12, p. 1317-1326, Dec. 1993.

PAUL, R. et al. Src Deficiency or Blockade of Src Activity in Mice Provides Cerebral Protection Following Stroke. **Nat. Med.**, New York, v. 7, no. 2, p. 222-227, Feb. 2001.

PICOSSE, M. Morfologia dos Dentes Permanentes. In: _____. **Anatomia Dentária**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1977. Cap. 5, p. 85-166.

PIMENTA, F.J.G.S.; SÁ, A.R.; GOMEZ, R.S. Lymphangiogenesis in Human Dental Pulp. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 36, no. 12, p. 853-856, Dec. 2003.

PIVA, E. **Avaliação da Expressão de Componentes da Matriz Extracelular (Fibronectina e Tenascina) após Capeamento Direto com Hidróxido de Cálcio em Polpas Humanas**. 2002. 80 f. Dissertação (Mestrado em Dentística) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

RIBATTI, D. The Crucial Role of Vascular Permeability Factor/ Vascular Endothelial Growth Factor in Angiogenesis: A Historical Review. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v. 128, no. 3, p. 303-309, Feb. 2004.

ROBERTS, D.M. et al. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Flt-1 (VEGFR-1) Modulates Flk-1 (VEGFR-2) Signaling During Blood Vessel Formation. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 164, no. 5, p. 1531-1535, May 2004.

ROBERTS-CLARK, D.J.; SMITH, A.J. Angiogenic Growth Factors in Human Dentine Matrix. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 45, no. 11, p. 1013-1016, Nov. 2000.

RODD, H.D.; BOISSONADE, F.M. Vascular Status in Human Primary and Permanent Teeth in Health and Disease. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 113, no. 2, p. 128-134, Apr. 2005.

ROSS, M.H.; REITH, R.E.; ROMRELL, L.J. Tecido Conjuntivo. In: _____.
Histologia: Texto e Atlas. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1993. Cap. 5, p. 85-115.

SARI, S.; ARAS, S.; GUNHAN, O. The Effect of Physiological Root Resorption on the Histological Structure of Primary Tooth Pulp. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, Birmingham, v. 23, no. 3, p. 221-225, Spring 1999.

SENGER, D.R. et al. Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor that Promotes Accumulation of Ascites Fluid. **Science**, Washington, v. 219, no. 4587, p. 983-985, Feb. 1983.

SHALABY, F. et al. Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis in Flk-1- Deficiente Mice. **Nature**, Basingstoke, v. 376, no. 6535, p. 62-66, July 1995.

SMITH, A.J. Pulpal Responses to Caries and Dental Repair. **Caries Res.**, Basel, v. 36, no. 4, p. 223-232, Jul-Aug. 2002.

SMITH, A.J.; MURRAY, P.E.; LUMLEY, P.J. Preserving the Vital Pulp in Operative Dentistry: I. A Biological Approach. **Dent Update**, London, v. 29, no. 2, p. 64-69, Mar. 2002.

SMULSON, M.H.; SIERASKI, S.M. Histofisiologia e Doenças da Polpa Dentária. In: WEINE, F.S. **Tratamento Endodôntico**. São Paulo: Santos, 1998. Cap. 3, p. 84-165.

SODEN, R.I. **Intracellular Signaling in LTA- Induced VEGF Expression of Dental Pulp Cells**. 2005. 66 f. Dissertation (Master of Science in Endodontics) – Dental School, University of Michigan, Ann Arbor.

SOUZA, M.A.L. Biologia Pulpar. In: ESTRELA, C.; FIGUEIREDO, J.A.P. **Endodontia:** Princípios Biológicos e Mecânicos. São Paulo: Artes Médicas, 2001. Cap. 1, p. 1-24.

TELLES, P.D. et al. Lipoteichoic Acid Up-Regulates VEGF Expression in Macrophages and Pulp Cells. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 82, no. 6, p. 466-470, June 2003.

TEN CATE, A.R. Movimentação Fisiológica do Dente: Erupção e Exfoliação. In: _____. **Histologia Bucal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 14, p. 272-95.

THESLEFF, I.; TUMMERS, M. Stem Cells and Tissue Engineering: Prospects for Regenerating Tissues in Dental Practice. **Med. Princ. Pract.**, Basel, v. 12, Suppl 1, p. 43-50, 2003.

TORNECK, C.D. Complexo Dentina-Polpa. In: TEN CATE, A.R. **Histologia Bucal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 9, p. 143-185.

TRUE, L.D. Principles of Immunohistochemistry. In: _____. **Atlas of Diagnostic Immunohistopathology**. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1990. Cap. 1, p. 1-34.

VIER-PELISSER, F.V. **Efeito da Teleterapia Fracionada em Polpa Dentária de Ratos- Análise em Microscopia Óptica e Eletrônica de Transmissão**. 2005. 131 f. Tese (Doutorado em Estomatologia Clínica) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WALTENBERGER, J. et al. Different Signal Transduction Properties of KDR and Flt-1, Two Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, no. 43, p. 26988-26995, Oct. 1994.

ANEXO 1

Número da amostra:

1. Grupo ao qual o dente pertence:
2. Tipo de dente (incisivo central, incisivo lateral, canino):
3. Localização na arcada dentária (hemiarco superior ou inferior, direito ou esquerdo):
4. Horário de imersão na solução fixadora:
5. Data de imersão na solução fixadora:
6. Data de imersão na solução descalcificadora:
7. Tempo total de descalcificação:

Nome do responsável:

Nome da criança:

Endereço:

Telefone:

Idade:

Sexo:

Razão da exodontia:

Sintomatologia (presente/ ausente, contínua/ intermitente):

Tempo de sintomatologia (por mais de 24 horas ou menos de 24 horas):

História de traumatismo (quando, onde, como, tratamento realizado):

ANEXO 2

Solução de Ana Morse:

Solução A:

Citrato de sódio P.A. (Synth, Diadema, Brasil).....100 g
Água destilada.....500 ml

Solução B:

Ácido fórmico P.A. (Synth, Diadema, Brasil).....250 ml
Água destilada.....250 ml

As soluções A e B, no ato da troca, foram misturadas em partes iguais.

ANEXO 3

Processamento de rotina para inclusão em parafina.

- Lavar as amostras em PB 0,1 M por 1 hora (4 trocas – 1 a cada 15 minutos).
- Álcool 95% por 1 hora.
- Álcool 100% por 1 hora.
- Álcool 100% por 1 hora.
- Xilol por 1 hora e 30 minutos.
- Xilol por 1 hora e 30 minutos.
- Parafina (banho) por 2 horas.
- Parafina (banho) por 2 horas.
- Parafina (inclusão).
- Deixar o material em T.A. até o dia seguinte e, depois armazená-lo em geladeira devidamente identificado.

ANEXO 4

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Caro responsável,

Este estudo está sendo realizado no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Mestrado, da Faculdade de Odontologia da UFRGS e tem como objetivo avaliar a expressão de VEGFR-2 (receptor-2 para o fator de crescimento endotelial vascular) na polpa de dentes de leite com e sem cárie.

A cárie é uma doença causada por uma associação de fatores, como: o consumo exagerado de açúcar, o acúmulo de placa, a má higiene bucal e a ausência do flúor. Se observada precocemente pode ser revertida por técnicas conservadoras evitando as restaurações. Porém, se progredir, pode evoluir a tal ponto, que atinja a polpa dental, responsável pelo suprimento vascular e nervoso do dente, e conseqüentemente, a dor. Portanto, serão observadas neste estudo as mudanças que ocorrem nas células desta polpa. Uma vez que, mais importante do que observar a presença de uma doença é saber como ela realmente acontece, compreendendo o que ocorre “dentro” da célula ou organismos que a causam.

Dessa maneira, as pesquisas são fundamentais para a descoberta de novos conhecimentos que beneficiarão muitos pacientes que buscam, como você, atendimento para seus filhos nesta faculdade. Portanto, a sua ajuda comparecendo às consultas marcadas e doando o dente para a Disciplina de Odontopediatria, é importante para o sucesso deste estudo.

Para participar, é necessário que antes da extração do dente de leite (que será indicada por razões ortodônticas ou por impossibilidade de se realizar uma restauração) uma radiografia e um exame sejam realizados, e após a extração, o dente seja doado para a Disciplina de Odontopediatria. A radiografia será realizada pelo dentista responsável pelo estudo, sem nenhum custo. Este exame

será executado, após uma limpeza dos dentes, através da utilização de um espelho bucal, sem gerar qualquer desconforto para seu filho.

Toda e qualquer dúvida será esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa. Fica, ainda, assegurada a liberdade dos responsáveis pelo paciente, recusarem-se a participar do estudo.

Eu, _____ responsável pelo (a) menor _____, declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa. E, dessa forma, autorizo meu (minha) filho (a) a participar do estudo, estando disposto a trazê-lo nas consultas marcadas, assim como, doar o dente de leite depois da extração.

Porto Alegre, ____ de _____ de 2004.

Participante:

RG:

Pesquisador: Leticia Grando Mattuella

RG: