



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELA FLEURY SEIXAS

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SIgA SALIVAR ANTI-DENTINA
EM PACIENTES ADULTOS JOVENS QUE SOFRERAM
TRAUMATISMO DA DENTIÇÃO DECÍDUA**

GABRIELA FLEURY SEIXAS

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SIgA SALIVAR ANTI-DENTINA
EM PACIENTES ADULTOS JOVENS QUE SOFRERAM
TRAUMATISMO DA DENTIÇÃO DECÍDUA**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós Graduação *Stricto sensu* em Odontologia, Mestrado em Odontologia, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Profa. Dra. Solange de Paula Ramos

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S462a Seixas, Gabriela Fleury.

Avaliação dos níveis de SIgA salivar anti-dentina em pacientes adultos jovens que sofreram traumatismo da dentição decídua / Gabriela Fleury Seixas. – Londrina, 2013.
51 f. : il.

Orientador: Solange de Paula Ramos.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Traumatismos dentários – Teses. 2. Dentina – Teses. 3. Imunoglobulina A. – Teses. 4. Reabsorção da raiz (Dentes) – Teses. I. Ramos, Solange de Paula. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU 616.314

GABRIELA FLEURY SEIXAS

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SIgA SALIVAR ANTI-DENTINA EM
PACIENTES ADULTOS JOVENS QUE SOFRERAM TRAUMATISMO
DA DENTIÇÃO DECÍDUA**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós Graduação *Stricto sensu* em Odontologia, Mestrado em Odontologia, da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Solange de Paula Ramos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Cássia Cilene Dezan Garbelini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2013.

Dedico esse trabalho aos meus
pequenos, Leonardo e Carolina.

AGRADECIMENTOS

Um obrigado especial à minha família, meus filhos Leonardo e Carolina e meu esposo Paulo, que conviveram com minha ausência para que o desejo de concluir o curso de Mestrado em Odontologia, e iniciar uma vida como pesquisadora pudesse ser alcançado; à minha sogra Valéria, que esteve sempre disponível para cuidar dos meus pequenos.

Agradeço a todos os professores do curso do mestrado em Odontologia, especialmente professor Antonio Ferelle, Edwin Fernando Ruiz Contreras, Elisa Emi Tanaka, Fábio Augusto Ito, Márcio Grama Hoepfner, Maria Celeste Morita, Maria Luiza H. Iwakura, pelo apoio e paciência. Agradeço muito a professora Cássia Cilene Dezan Garbelini, por ter acreditado na minha capacidade de enfrentar uma situação nova e desafiadora, e por me dar tanto apoio nesse projeto desde o começo.

Minha orientadora eu deixo para agradecer em um parágrafo separado... porque com a professora Solange de Paula Ramos eu vi de perto a preocupação de um professor com seus alunos, como futuros profissionais e como seres humanos. Ela se tornou, para mim, um exemplo de bom profissional e de pessoa; multitarefas, executando mil coisas ao mesmo tempo, com sabedoria e personalidade, e sempre preocupada em amparar minhas angústias e inseguranças. Master super mega obrigada!

Dentro do laboratório do professor Emerson José Venâncio, fui recebida por ele e sua equipe com muita atenção e amizade. Agradeço especialmente aos alunos Sandy Chambo, Ana Paula Cheirubim e Eduardo Vignoto Fernandes, que me acompanharam com paciência e persistência em cada etapa realizada lá.

Agradeço às colegas Kelly Limi Aida, Márcia Cristina Hirose, Laura Moraes Rocha, que participaram efetivamente da busca pelos pacientes, e atendimentos. Definitivamente esse trabalho é de vocês, também.

A todos os ex-pacientes da Clínica de Bebês da UEL, que se dispuseram a comparecer voluntariamente à Clínica Odontológica Universitária para a participação da pesquisa, somente pelos nossos apelos em prol da pesquisa. Sem

palavras.

Um abraço apertado aos meus companheiros de curso, Mariana Gabriel, Fábio Martins Salomão, Júlio Capellari, Joel Motta Junior, Maria Beatriz Pedriali, Paula Fernanda Kreling Domingues, e um beijo no coração do João Paulo Menck Sangiorgio e da Valéria Campos Mariano.

Aos funcionários da Clínica Odontológica Universitária da UEL, da Biblioteca Setorial do COU, especialmente a todos os funcionários e professores da Clínica de Bebês da UEL, e às equipes do Pronto Socorro Odontológico, por nos receberem em dias e horários inesperados, para que pudéssemos realizar pesquisas e atendimentos .

A CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

A todos que de alguma maneira auxiliaram no desenvolvimento e conclusão desse trabalho, e a todos a quem ele possa contribuir de alguma maneira,

Obrigada!

**“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”**

Mário Quintana

SEIXAS, Gabriela Fleury. **Avaliação dos níveis de SIgA salivar anti-dentina em pacientes adultos jovens que sofreram traumatismo da dentição decídua.** 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

A dentina pode induzir uma resposta imunológica específica, que está associada à reabsorção radicular inflamatória. Reações inflamatórias locais, como traumatismo dentário e aplicação de forças de movimentação ortodôntica estão relacionados a aumento nos níveis de anticorpos específicos contra antígenos dentinários. No entanto, não se conhece os efeitos do trauma da dentição decídua sobre o desenvolvimento de auto-imunidade contra a dentina. O objetivo do presente estudo é avaliar os níveis de Imunoglobulina A secretora (SIgA) salivar anti-dentina em pacientes adultos jovens que sofreram traumatismo da dentição decídua. Participaram da pesquisa 78 indivíduos, com idade entre 18-25 anos, que foram atendidos pela Clínica de Bebês da Universidade Estadual de Londrina, sendo que 34 pacientes sofreram traumatismo na dentição decídua. Foram realizados exames clínico e radiográfico, e coleta de saliva. A saliva foi submetida a ensaio imunoenzimático para determinação de níveis salivares de SIgA anti-extrato dentinário. Não foram encontradas diferenças nos níveis de anticorpos salivares e na taxa de secreção entre os indivíduos que apresentaram traumatismo da dentição decídua ou sem história de trauma ($P>0,05$). A análise de regressão linear não demonstrou associação entre a idade em que ocorreu o traumatismo da dentição decídua, traumatismo da dentição permanente e tratamento ortodôntico prévio com os níveis de anticorpos e taxa de secreção de SIgA anti-extrato dentinário ($P>0,05$). O ensaio de *Western blotting* demonstrou o reconhecimento por anticorpos SIgA da fração específica de proteína de extrato dentinário humano com massa molecular de aproximadamente 45 kDa. Além disso, níveis significativamente mais baixos de anticorpos SIgA anti-dentina foram observados em pacientes com história de trauma da dentição decídua, que realizaram tratamento ortodôntico e apresentaram reabsorção de incisivos permanentes ($P<0,05$). Os resultados obtidos sugerem que o traumatismo na dentição decídua possa modular negativamente a resposta imune humoral local contra a dentina, havendo a necessidade de estudos adicionais para mostrar a participação da fração de 45 kDa nessa modulação.

Palavras-chave: Traumatismo dentário. Autoimunidade. Reabsorção radicular inflamatória. Dentina.

SEIXAS, Gabriela Fleury. **Evaluation of salivary levels of anti-dentin SIgA in young adult patients who have suffered trauma in primary dentition.** 2013. 51 p. – Dentistry Master's Thesis- State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Dentin may induce a specific immune response, which is associated with inflammatory root resorption. Inflammatory responses, such as dental trauma and orthodontic force application are related with differences in levels of specific antibodies against dentin proteins. However, anything is known about the effects of deciduous dental trauma on development of autoimmunity against the dentine. The aim of this study is to evaluate the levels of salivary anti-dentin Immunoglobulin A secretory (SIgA) in young adult patients who have suffered trauma in primary dentition. Seventy eight patients were selected, aged 18-25 years, who were treated at Baby Clinic of the State University of Londrina, witch 34 patients had trauma in the primary dentition. After physical and radiographic examination saliva samples were collected. Salivas samples were submitted to immunoenzimatic assay using human dentin extract for the determination of levels of salivary antidentin SIgA. There were no differences in antibody levels and salivary secretion rate among individuals who had trauma of the primary dentition or no history of trauma ($P > 0.05$). A linear regression analysis showed no association between age when trauma occurred, orthodontic treatment and trauma on permanent dentition with antibody levels and secretion rate of anti-dentin SIgA ($P > 0.05$). The Western blotting assay demonstrated recognition by specific fraction of a salivary human dentin protein extract with molecular weight about 45 kDa. However, significantly lower levels of anti-dentin antibodies were observed in patients with a history of trauma to the primary dentition, which had orthodontic treatment and showed resorption of permanent incisors ($P < 0.05$). The results suggest that the trauma in the primary dentition can negatively modulate the humoral immune response against the dentine, hence the need for adicional studies to show the involvement of the 45 kDa fraction of this modulation.

Keywords: Dental trauma. Autoimmunity. Inflammatory root resorption. Dentin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Níveis de anticorpos SIgA anti-extrato dentinário e taxa de secreção de anticorpos em pacientes que sofreram traumatismo da dentição decídua33
- Figura 2** – Correlação entre os níveis de SIgA salivar anti-extrato dentinário e taxa de secreção de anticorpos, e idade do traumatismo 33
- Figura 3** – Perfil eletroforético do extrato dentinário humano34
- Figura 4** – Perfil de reconhecimento do Extrato dentinário humano pela SIgA, analisado por Western blotting35
- Figura 5** – Níveis de anticorpos anti-extrato dentinário em pacientes com e sem história de traumatismo da dentição decídua, submetidos a tratamento ortodôntico37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Frequência e tratamento indicado nos traumatismos de dentição decídua observados no estudo32
- Tabela 2** – Regressão linear multivariada dos níveis de anticorpos SIgA anti-extrato dentinário e variáveis de estudo36
- Tabela 3** – Regressão linear multivariada da taxa de secreção de anticorpos SIgA anti-extrato dentinário e variáveis do estudo36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
BAG-75	Glicoproteína ácida óssea 75
BSP	Sialoproteína óssea
BMP	Proteína osteomorfogenética
C	Celsius
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	Diaminobenzidina
DMP-1	Proteína da Matriz Dentinária 1
DPP	Fosforina
DSP	Sialoproteína dentinária
DSPP	Sialofosfoproteína dentinária
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
HCl	Ácido clorídrico
HDE	Extrato dentinário Humano (<i>Human Dentin Extract</i>)
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
KDa	Kilodalton
Kv	Kilovoltagem
M	Molar
mA	Miliamperagem
mg	Miligrama
MGP	Proteína Gla da Matriz
ml	Mililitro
MM	Massa Molecular
N	Normal
NCP	Proteína não-colagênica
nm	Nanômetro
OC	Osteocalcina
OPN	Osteopontina

OS	Osteonectina
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel electrophoresis</i>)
PR	Paraná
Rpm	Rotação por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SIgA	Imunoglobulina A secretora
UEL	Universidade Estadual de Londrina
V	Volt
X ²	Qui quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
	REFERÊNCIAS	19
2	OBJETIVO	22
3	CAPÍTULO	23
3.1	CAPÍTULO I –IgA SALIVAR CONTRA DENTINA EM PACIENTES ADULTOS JOVENS QUE SOFRERAM TRAUMATISMO NA DENTIÇÃO DECÍDUA	23
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICES	44
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	45
	APÊNDICE B – Questionário	46
	ANEXOS	50
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos	51

1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é capaz de reconhecer substâncias químicas próprias do organismo, não desenvolvendo resposta imunológica contra elas. Este fenômeno é conhecido como tolerância imunológica e previne o organismo contra o ataque dos tecidos próprios pela resposta imune (Abbas e Lichtmann, 2009).

A auto-imunidade é a reação do sistema imunológico de um indivíduo contra as próprias células e tecidos, e pode apresentar manifestação sistêmica ou órgão-específica (Abbas *et al.*, 2005). Esse tipo de reação pode ocorrer quando: há uma falha dos mecanismos responsáveis por manter a auto-tolerância; há alteração nas proteínas celulares e teciduais do organismo; o sistema imunológico reconhece como antígeno alguma proteína própria ou quando proteínas expressas em locais isolados por barreiras imunológicas (antígenos sequestrados) são expostas repentinamente ao sistema imunológico (Abbas *et al.*, 2005; Consolaro, 2005; Abbas e Lichtmann, 2009).

A perda da auto-tolerância e o desenvolvimento de auto-imunidade podem estar relacionados a polimorfismos de moléculas de histocompatibilidade, dos componentes do sistema complemento e de receptores *Toll-like*, atuação de citocinas, fatores hormonais e genéticos. Fatores ambientais também podem estar associados à auto-imunidade, como infecções bacterianas e virais, e exposições a agentes químicos e físicos (Silva e Souza *et al.*, 2010). A susceptibilidade genética e os desencadeantes ambientais (presença de inflamação, infecção, trauma tecidual, isquemia) são os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da perda de auto-tolerância e desenvolvimento de auto-imunidade (Abbas *et al.*, 2005).

Recentemente, a associação entre a auto-imunidade contra os componentes da dentina e a reabsorção dentária de dentes permanentes tem sido descrita em pacientes que foram submetidos a tratamento ortodôntico e que sofreram traumatismo da dentição permanente (Hidalgo *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2011). Níveis elevados de anticorpos anti-dentina são encontrados na saliva e soro de pacientes susceptíveis a reabsorção dentária ortodôntica, sugerindo que uma resposta imune humoral contra antígenos próprios esteja envolvida no desenvolvimento das lesões (Ramos *et al.*, 2011). Títulos elevados de anticorpos anti-dentina são observados durante o processo de reabsorção radicular inflamatória externa em soro de pacientes que sofreram traumatismo de dentes permanentes

(Hidalgo *et al.*, 2005). No entanto, títulos elevados de anticorpos anti-dentina são observados na população adulta, mesmo na ausência de traumatismo de dentes permanentes, tratamento ortodôntico prévio ou de reabsorção dentária identificável radiograficamente (Ramos *et al.*, 2011).

A dentina é composta de aproximadamente 65% em peso de matéria mineral (principalmente hidroxiapatita), 20% matéria orgânica (principalmente colágeno do tipo I), 10% água, e o restante 5% é formado por citrato, lactato, lipídeos e proteínas não-colagênicas (NCPs). Dentre as proteínas não colagênicas estão: Proteína osteomorfogenética (BMP), Sialoproteína óssea (BSP), Osteopontina (OPN), Osteonectina (OS), Glicoproteína ácida óssea 75 (BAG-75), Proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1), Sialofosfoproteína dentinária (DSPP), Osteocalcina (OC), Proteína Gla da matriz (MGP). Duas proteínas não colagenosas são consideradas mais importantes devido ao seu papel no processo de biomineralização e alta concentração no tecido dentinário: DMP1 (proteína da matriz dentinária 1) e Sialofosfoproteína dentinária: Fosforina (DPP) + Sialoproteína dentinária (DSP). (Mah e Prasad, 2004; Deshpande *et al.*, 2011; Jágr *et al.*, 2012).

A matriz orgânica da dentina compartilha alguns componentes comuns com a matriz protéica dos ossos, como o colágeno tipo I, proteínas não colagenosas e componentes do soro. Embora algumas proteínas consideradas exclusivamente expressas por odontoblastos tenham sido reconhecidas no periodonto e osso, a principal concentração dessas proteínas (DMP-1, DSP, DPP) é na matriz dentinária (Qin *et al.*, 2003; Prasad *et al.*, 2011). A dentina não é um tecido homogêneo, e suas proteínas mudam conforme a idade e maturação radicular (Clarckson *et al.*, 1998).

A resposta auto-imune contra os componentes da dentina pode alterar a produção de citocinas e outros mediadores da resposta inflamatória local, influenciando assim a reabsorção dos tecidos calcificados (Takayanagi, 2007; Abd-Elmeguid *et al.*, 2012). Recentemente, um estudo *in vitro* demonstrou que a DMP-1 é capaz de induzir a produção de mediadores inflamatórios (Interleucina-6 e 8) em fibroblastos da polpa dentária (Adb-Elmeguid *et al.*, 2012).

Estudos indicam que o extrato dentinário humano é capaz de induzir uma resposta imunológica, demonstrando que a dentina pode ser reconhecida como um auto-antígeno (Wheeler e Stroup, 1993; Hidalgo, 2001; Consolaro, 2005; Ramos *et al.*, 2011).

A auto-imunidade contra proteínas da matriz dentinária pode estar relacionada com a susceptibilidade individual em relação à reabsorção radicular inflamatória. Alterações nos níveis de anticorpos anti-dentina foram detectadas em soro de ratos com lesões radiculares experimentais, e de pacientes com histórico de traumatismo na dentição permanente e subsequente reabsorção radicular, e em soro e saliva de pacientes que sofreram movimentação ortodôntica (Wheeler e Stroup, 1993; Hidalgo *et al.*, 2005; Consolaro, 2005; Ramos *et al.*, 2011).

O papel imunomodulador dos antígenos dentinários foi demonstrado em estudos experimentais e em humanos. Procedimentos de imunização inibiram a reabsorção radicular inflamatória e aumentaram os níveis de anticorpos em camundongos, mostrando-se como um fator de proteção contra reabsorção radicular patológica (Wheeler e Stroup, 1993). Ng *et al.*, 1990, demonstraram um decréscimo nos títulos de anticorpos séricos anti-dentina após a indução de reabsorção em incisivos de ratos, e uma posterior reabsorção radicular inflamatória (Ng *et al.*, 1990). Durante o desenvolvimento de reabsorções dentárias induzidas por tratamento ortodôntico ocorre a redução dos níveis séricos e plasmáticos de anticorpos anti-dentina em pacientes susceptíveis (Ramos *et al.*, 2011).

A antigenicidade do extrato dentinário humano foi detectada em soros imunes de coelho (Hidalgo, 2001), e um perfil sorológico característico foi encontrado em pacientes com reabsorção radicular inflamatória substitutiva, com altos níveis de IgG anti-dentina, e baixos níveis de IgM anti-dentina, sugerindo a presença de uma resposta imunológica secundária (Hidalgo *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado por Ramos *et al.*, 2011, observou-se uma resposta imunológica local na saliva, com níveis elevados de imunoglobulina A secretora (SIgA), contra antígenos dentinários em pacientes posteriormente submetidos a tratamento ortodôntico com presença de reabsorção radicular inflamatória externa moderada e severa (Ramos *et al.*, 2011). A SIgA representa a resposta local do sistema imunológico adaptativo, e alterações nos níveis salivares deste anticorpo podem estar associados a um desequilíbrio da resposta do sistema imunológico na cavidade bucal (Hucklebridge *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2011).

O traumatismo dos dentes decíduos é visto como um problema de saúde pública, porque sua freqüência entre crianças é grande, exige profissionais qualificados, e pode ocasionar danos na dentição permanente (Rasmusson e Koch,

2010; Amorim *et al.*, 2011; Assunção *et al.*, 2011; Malmgren *et al.*, 2012). Embora seja sugerido que o traumatismo da dentição permanente possa favorecer o desenvolvimento da resposta imunológica contra os componentes da dentina (Hidalgo *et al.*, 2005), e esta resposta auto-imune esteja associada ao desenvolvimento de reabsorção dentária (Hidalgo *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2011), não se conhece o impacto do trauma da dentição decídua no desenvolvimento da auto-imunidade contra a dentina.

A frequência do trauma na dentição decídua é variada conforme o local estudado. Alguns desses valores podem ser subestimados porque muitas crianças com injúrias dentais leves não procuram atendimento odontológico, ou não recebem diagnóstico preciso (Cardoso e Rocha, 2008; Amorim *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado na cidade de Goiânia em 2011, Amorim *et al.*, 2011, encontraram a prevalência de 11,9% de traumas em dentes decíduos. Esse mesmo estudo não encontrou diferença estatística entre os gêneros, e as faixas etárias que apresentaram maior número de atendimentos registrados por traumatismo foram de 13-24 meses e 25-36 meses (Amorim *et al.*, 2011).

A Clínica de Bebês da Universidade Estadual de Londrina-PR oferece atendimento educativo-preventivo e de urgência para crianças com idade entre 0-5 anos. Em estudo realizado por Assunção *et al.* com 409 pacientes atendidos com queixa de traumatismo na Clínica de Bebês da UEL, observou-se uma distribuição equilibrada de registros em relação ao gênero, e a prevalência do trauma foi maior no grupo de 0-2 anos (Assunção *et al.*, 2011).

A maturação do sistema imunológico ocorre nos primeiros anos de vida, sendo predominantemente do tipo humoral nos dois primeiros anos, enquanto o desenvolvimento de resposta imunológica do tipo celular mais eficaz parece ocorrer mais tardiamente (Maródi, 2006; Martin *et al.*, 2010; Burl *et al.*, 2011; Tulic *et al.*, 2012). A exposição a um ambiente pró-inflamatório pode favorecer o reconhecimento de auto-antígenos e o desequilíbrio na maturação imunológica de crianças, aumentando o risco de doenças crônicas (Kindt *et al.*, 2008; Dietert e Piepenbrink, 2008).

Considerando as evidências de que o traumatismo dos dentes permanentes está associado a uma reação imunopatológica e à reabsorção dentária inflamatória, o presente estudo tem com objetivo avaliar os níveis de SIgA salivar

anti-dentina em pacientes adultos jovens que sofreram traumatismo da dentição decídua.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e molecular**. 5. ed.. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ABBAS, A. K.; LINCHTMAN, A. H. **Imunologia Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- ABD-ELMEGUID, A. Et al Harissios. Dentin Matrix Protein-1 activates Dental Pulp fibroblasts. **Journal of Endodontics**, v.38, n.1, p. 75-80, 2012.
- AMORIM, L. F. G.; DA Costa, L. R.; ESTRELA, C. Retrospective study of traumatic dental injuries in primary teeth in a brazilian specialized pediatric practice. **Dental Traumatology**, v. 27, p. 368-373, 2011.
- ASSUNÇÃO, L. R. S. et al. Luxation injuries in primary teeth: a retrospective study in children assisted at an emergency service. **Brazilian Oral Research**, v.25, n.2, p. 150-156, 2011.
- BURL, S. et al. Age-dependent maturation of Toll-like receptor-mediated cytokine responses in Gambian infants. **PLoS One**, v.6, n.4, p. e18185, 2011.
- CARDOSO, M.; ROCHA, M.J.C. Identification of factors associated with pathological root resorption in traumatized primary teeth. **Dental Traumatology**, v.24, p. 343-349, 2008.
- CHANG, C.K.; COHEN, M.E.; BIENEK, D.R. Efficiency of oral fluid collection devices in extracting antibodies. **Oral microbiology immunology**, v. 24, p. 231-235, 2009.
- CLARKSON, B.H.; CHANG, S.R.; HOLLAND, G.R. Phosphoprotein analysis of sequential extracts of human dentin and the determination of the subsequent remineralization potential of these dentin matrices. **Caries Research**, v. 32, p. 357-364, 1998.
- CONSOLARO, A; HIDALGO, M.M. Reabsorções dentárias: uma resposta imunopatológica por auto-imunidade. Em: Consolaro A. **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas**. 2ª. Edição. Maringá: Dental Press, 2005. p. 90-112.
- DESHPANDE, A.S. et al. Primary structure and phosphorylation of Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) and Dentin Phosphophoryn (DPP) uniquely determine their role in biomineralization. **Biomacromolecules**, v.12, p. 2933-45, 2011.
- DIETERT, R.R.; PIEPENBRINK, M.S. The managed immune system: protecting the womb to delay the tomb. **Human & Experimental Toxicology**, v. 27, n.2, p.129-134, 2008.
- HIDALGO, M.M. Estudo sobre o potencial imunogênico da dentina. Contribuição para a etiopatogenia da reabsorção dentária. Bauru. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2001

HIDALGO M.M; ITANO E.M; CONSOLARO, A. Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. **Dental Traumatology**, v. 21, p. 218-221, 2005.

HUCKLEBRIDGE, F.; CLOW, A.; EVANS, P. The relationship between salivary secretory immunoglobulin A and cortisol: neuroendocrine response to awakening and the diurnal cycle. **International Journal of Psychophysiology**, v. 31, p. 69-76, 1998.

JÁGR, M; ECKHARDT, A; PATARIDIS, S; MIKSÍK, I. Comprehensive proteomic analysis of human dentin. **European Journal of Oral Science**, v. 120, p. 259-268, 2012.

KINDT, Thomas J; GOLDSBY, Richard A; OSBORNE, Barbara A. **Imunologia de Kuby**. 6 ed.. Porto Alegre: Artmed, 2008.

MAH, J.; PRASAD, N. Dentine phosphoproteins in gingival crevicular fluid during root resorption. **European Journal of Orthodontics**, v. 26, p. 25-30, 2004.

MALMGREN, B. et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 3. Injuries in the primary dentition. **Dental traumatology**, v. 28, p. 174-182, 2012.

MARÓDI, L. Innate cellular immune responses in newborns. **Clinical Immunology**, v. 118, n.2-3, p. 137-44, 2006.

MARTIN, R. et al. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. **Beneficial Microbes**, v. 1, n.4, p. 367-82, 2010.

NG, K. T.; KING, G. J.; COURTS, F. J. Humoral immune response to active root resorption with a murine model. **American Journal of Orthodontic Dentofacial Orthopedic**, v. 98, p. 456-62, 1990.

PRASAD, M. et al. Expression of dentin dialophosphoprotein in non-mineralized tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n.11, p. 1009-21, 2011.

RAMOS, S.P. et al. Anti-dentine antibodies with root resorption during orthodontic treatment. **European Journal of Orthodontics**, v. 33, p. 584-591, 2011.

RASMUSSEN, C. G.; KOCH, G. Assessment of traumatic injuries to primary teeth in general practice and specialized paediatric dentistry. **Dental Traumatology**, v. 26, p. 129-132, 2010.

SILVA DE SOUZA, A. W. et al. Sistema Imunitário – Parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, p. 665-694, 2010.

TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. **Nature reviews immunology**, v. 7, p. 292-304, 2007.

TULIC, M.K. et al. Changes in thymic regulatory T-cell maturation from birth to puberty: differences in atopic children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 1, p.199-206, 2012.

QIN, C. et al. Dentin sialoprotein in bone and dentin sialophosphoprotein gene expressed by osteoblasts. **Connective Tissue Research**, v.44, supp 1, p. 179-83, 2003.

WHEELER, T. T.; STROUP, S. E. Traumatic root resorption in dentine-immunized mice. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 103, n.4, p.352- 357, 1993.

2 OBJETIVO

Investigar a presença de anticorpos SIgA salivares anti-extrato dentinário humano em pacientes adultos jovens que sofreram traumatismo da dentição decídua.

3 CAPÍTULO

(Artigo formatado nas normas da revista *Dental Traumatology*)

3.1 SIgA SALIVAR CONTRA A DENTINA EM PACIENTES ADULTOS COM HISTÓRIA DE TRAUMATISMO DA DENTIÇÃO DECÍDUA

Gabriela Fleury Seixas ^{1*}, Cássia Cilene Dezan Garbelini¹, Kelly Limi Aida¹, Ana Paula Cheirubim², Emerson José Venâncio², Solange de Paula Ramos²

RESUMO

A dentina pode induzir uma resposta imunológica específica, que está associada à reabsorção radicular inflamatória. Reações inflamatórias locais, como traumatismo dentário e aplicação de forças de movimentação ortodôntica estão relacionados a aumento nos níveis de anticorpos específicos contra antígenos dentinários. No entanto, não se conhece os efeitos do trauma da dentição decídua sobre o desenvolvimento de auto-imunidade contra a dentina. O objetivo do presente estudo é avaliar os níveis de Imunoglobulina A secretora (SIgA) salivar anti-dentina em pacientes adultos jovens que sofreram traumatismo da dentição decídua. Participaram da pesquisa 78 indivíduos, com idade entre 18-25 anos, que foram atendidos pela Clínica de Bebês da Universidade Estadual de Londrina, sendo que 34 pacientes sofreram traumatismo na dentição decídua. Foram realizados exames clínico e radiográfico, e coleta de saliva. A saliva foi submetida a ensaio imunoenzimático para determinação de níveis salivares de SIgA anti-extrato dentinário. Não foram encontradas diferenças nos níveis de anticorpos salivares e na taxa de secreção entre os indivíduos que apresentaram traumatismo da dentição decídua ou sem história de trauma ($P>0,05$). A análise de regressão linear não demonstrou associação entre a idade em que ocorreu o traumatismo da dentição decídua, traumatismo da dentição permanente e tratamento ortodôntico prévio com os níveis de anticorpos e taxa de secreção de SIgA anti-extrato dentinário ($P>0,05$). O ensaio de *Western blotting* demonstrou o reconhecimento por anticorpos SIgA da

¹ Centro de Ciências da Saúde – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Brasil.

² Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Brasil.

*Autor para correspondência:

Gabriela Fleury Seixas (fleuryseixas@gmail.com)

Rua Prefeito Hugo Cabral, 1145, ap 32

Centro- Londrina - Paraná - Brasil

CEP 86020-110

fração específica de proteína de extrato dentinário humano com massa molecular de aproximadamente 45 kDa. Além disso, níveis significativamente mais baixos de anticorpos SIgA anti-dentina foram observados em pacientes com história de trauma da dentição decídua, que realizaram tratamento ortodôntico e apresentaram reabsorção de incisivos permanentes ($P < 0,05$). Os resultados obtidos sugerem que o traumatismo na dentição decídua possa modular negativamente a resposta imune humoral local contra a dentina, havendo a necessidade de estudos adicionais para mostrar a participação da fração de 45 kDa nessa modulação.

Palavras-chave: Traumatismo dentário. Autoimunidade. Reabsorção radicular inflamatória. Dentina.

INTRODUÇÃO

O traumatismo da dentição decídua é uma situação comum, e pode levar a complicações tanto na dentição decídua quanto na permanente. A reabsorção radicular patológica está entre as seqüelas possíveis de serem observadas após o trauma dentário, e há a possibilidade da perda precoce do elemento dentário envolvido no trauma ^{1, 2}. Bille *et al.*, 2008, propõem que a reabsorção precoce do dente decíduo pode estar relacionada à susceptibilidade de reabsorção após movimentação ortodôntica em dentes permanentes ³.

O mecanismo precursor da reabsorção radicular patológica não é completamente esclarecido, e a propensão para a reabsorção radicular pode estar associada com a resposta auto-imune contra proteínas da matriz dentinária ⁴⁻⁷. Alterações significantes nos níveis de anticorpos anti-dentina foram detectados em soro, em modelos experimentais de reabsorção radicular ^{4, 5}, em soro de pacientes com reabsorção radicular associada a traumatismo dentário, e após movimentação ortodôntica ^{6, 7}. Procedimentos de imunização ativa aumentaram os níveis séricos de anticorpos anti-dentina em camundongos, e inibiram a reabsorção radicular induzida

por trauma ⁵. Níveis elevados de anticorpos anti-dentina foram encontrados em pacientes que sofreram traumatismo da dentição permanente e desenvolveram reabsorção radicular patológica ⁶, e em pacientes susceptíveis à reabsorção radicular devido a movimentação ortodôntica ⁷. Estes resultados sugerem que uma resposta imunológica específica contra auto-antígenos esteja envolvida no desenvolvimento de lesões de reabsorção radicular patológica. A participação de mecanismos efetores da resposta imunológica e da auto-imunidade é reconhecida na reabsorção de tecidos mineralizados, tal como a matriz óssea ⁸.

O traumatismo da dentição decídua é uma situação rotineira no consultório odontopediátrico, e ocorre com maior frequência em crianças até 24 meses ^{2, 9, 10}. O sistema imunológico inato e adaptativo é imaturo no recém-nascido, sendo que nos primeiros dois anos a resposta imunológica é predominantemente do tipo humoral, e antígenos protéicos são mais facilmente reconhecidos ¹¹⁻¹⁴. A presença de um evento inflamatório local crônico, associado à imaturidade do sistema imunológico da criança pode favorecer o reconhecimento de antígenos próprios, aumentando o risco de doenças crônicas e reações auto-imunes contra antígenos próprios ^{15, 16}. No caso do traumatismo dentário, a presença de inflamação local e a exposição da dentina poderia contribuir para o desenvolvimento de auto-anticorpos salivares anti-dentina, e um possível aumento do risco à susceptibilidade individual em relação à reabsorção radicular inflamatória.

Embora seja sugerido que o traumatismo da dentição permanente possa favorecer o desenvolvimento da resposta imunológica contra os componentes da dentina ⁶, e esta resposta auto-imune esteja associada ao desenvolvimento de reabsorção dentária ^{6, 7}, não se conhece o impacto do trauma da dentição decídua

no desenvolvimento da auto-imunidade contra a dentina e possível indução de mecanismos imunopatológicos responsáveis pela reabsorção radicular inflamatória.

Considerando a alta incidência de traumas em crianças na fase de amadurecimento do sistema imunológico, e a possível influência da auto-imunidade contra os componentes da dentina no processo de reabsorção dentária patológica, o objetivo do presente estudo foi investigar a presença de anticorpos salivares contra a dentina em pacientes adultos que sofreram traumatismo da dentição decídua.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos realizados neste estudo foram cumpridos após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido entregue aos participantes, e a aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Parecer CEP/UEL 209/2011).

O delineamento do estudo é uma pesquisa do tipo coorte retrospectiva. Os indivíduos selecionados para estudo apresentavam faixa etária de 18 a 25 anos, e foram atendidos pelo programa educativo-preventivo da Clínica de Bebês da Universidade Estadual de Londrina entre os anos de 1986 a 1994. Os pacientes foram selecionados e localizados por meio das informações obtidas nos prontuários odontológicos, pesquisa em listas telefônicas e redes sociais da internet. O convite para a participação no estudo foi feito por meio de contato telefônico. Foram excluídos do estudo os pacientes que estivessem fazendo uso de medicamentos anti-inflamatórios esteroidais ou que fizeram uso de medicamento anti-inflamatório nos últimos 30 dias, indivíduos que faziam uso de drogas que atuam

sobre receptores colinérgicos e beta-adrenérgicos e que apresentassem doenças inflamatórias crônicas e lesões mucosas bucais, e pacientes em tratamento ortodôntico.

Os dados em relação à presença e ao tipo de traumatismo da dentição decídua, idade do trauma e evolução da lesão foram coletados dos prontuários da Clínica de Bebês. Os traumatismos da dentição decídua foram classificados em relação à frequência em únicos e recorrentes, e em relação à gravidade em não-complicados (subluxação, fratura de tecido coronário sem exposição pulpar) e complicados (luxação lateral, intrusão, avulsão, fratura de tecido coronário com exposição pulpar)¹. Informações sobre traumatismo da dentição permanente, tratamento ortodôntico, e condições gerais de saúde bucal e história médica foram coletadas por meio de anamnese e exame clínico.

Amostras de saliva não estimulada foram coletadas em frascos estéreis, durante 2 minutos, e em seguida congeladas a -20°C até o uso. O fluxo salivar foi calculado em volume de saliva secretado por minuto e o cálculo da taxa de secreção salivar de Imunoglobulina A secretora (SIgA) obtida através da fórmula: *Taxa de secreção salivar SIgA = (Concentração SIgA x Fluxo salivar)*. No momento da realização dos testes imunoenzimáticos, as amostras foram descongeladas, aliquotadas, e então centrifugadas a 12.000 rpm durante 20 minutos.

As radiografias periapicais dos incisivos centrais superiores foram realizadas conforme protocolo da técnica do paralelismo com cone longo com posicionador radiográfico (70kV, 10 mA, tempo de exposição de 0,8 segundos). Dois examinadores realizaram a análise da imagem radiográfica, individualmente, e avaliaram a presença ou ausência de reabsorção radicular externa inflamatória. No caso de discordância entre o diagnóstico, os avaliadores discutiram até o consenso.

Obtenção do extrato dentinário

O extrato dentinário humano (HDE), utilizado como antígeno, foi obtido por meio da técnica de Wheeler e Stroup (1993) modificada, usando terceiros molares íntegros doados por pacientes com extração indicada. O esmalte e cemento dos dentes foram removidos, e a dentina foi desgastada com brocas diamantadas em caneta de alta rotação com água destilada refrigerada.

O precipitado da dentina foi mantido em solução desmineralizadora na proporção 1:1 (guanidina-HCl 0,5M, 10% EDTA, pH 7,0) por 14 dias a 4°C e então centrifugado a 12.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi dializado por 24 horas em tampão salino tamponado com fosfato (PBS, pH 7,2) a 4°C. A concentração do extrato dentinário humano foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina como padrão. O resultado obtido foi de 1,05 mg de proteína/ml, com a utilização de dois terceiros molares. O extrato foi armazenado a -80°C até o uso.

Eletroforese com gel de poliacrilamida com SDS

Para obtenção do perfil eletroforético em SDS-PAGE 10%, foram utilizadas amostras com 10 e 20 µg de proteína de HDE, com tampão de amostra redutor, e água destilada até o volume final de 40 µl. Foi utilizado o padrão de massa molecular P7703S, Biolabs, New England. A eletroforese foi realizada em tampão tris-glicina na voltagem de 100V. Em seguida, o gel foi corado com coloração de Comassie Blue e impregnação com Nitrato de prata.

Ensaio imunoenzimático para determinação dos níveis salivares de SIgA anti-extrato dentinário

Placas de ensaio imunoenzimático de 96 poços com fundo plano foram sensibilizadas com 100 µl de HDE (250µg de proteína/ml) diluído em tampão carbonato-bicarbonato por 1 hora a 37°C. A seguir, as placas foram incubadas 12 horas a 4°C, e então lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (leite em pó desnatado 0,5% em PBS), e foram bloqueadas com 300µl por poço com tampão de bloqueio (leite em pó desnatado 5% em PBS e 0,05% de Tween 20). Após uma hora a temperatura ambiente, as placas foram lavadas como descrito acima e as amostras de saliva (100 µl) foram distribuídas em duplicata, na diluição de 1:2 em PBS, e incubadas por 2 horas a 37°C. Após nova lavagem, foi realizada a incubação com anticorpo conjugado a peroxidase anti-IgA humano (A88-102P, Bethyl Laboratories, Montgomery, EUA) diluído 1:50.000 em PBS, e incubado a temperatura ambiente por 2 horas. Depois de realizada lavagem, as placas foram reveladas com 100µl por poço de solução substrato (tampão citrato, 10% tetrametilbenzidina, 0,1% de peróxido de hidrogênio), durante 15 minutos. A reação foi bloqueada com 50µl de ácido sulfúrico 1N e a leitura da absorbância foi obtida a 450nm.

Western blotting

Foi realizada a corrida eletroforética em SDS-PAGE 10% com amostras de 10 µg de proteína de HDE, como descrito acima, e utilizado padrão de massa molecular P77035, Biolabs, New England.

A transferência para as membranas de nitrocelulose foi feita, a 4°C *overnight* com 150 mA em tampão de tris-glicina metanol. As membranas foram bloqueadas

com PBS leite desnatado 5% por 2 horas a 37 °C, e lavadas com PBS. A seguir as membranas foram incubadas com amostras de saliva não diluídas, 1 ml, por duas horas a temperatura ambiente. Após três lavagens de 5 minutos cada com PBS Tween 0,05% sob agitação, o anticorpo conjugado a peroxidase anti-IgA humano (A88-102P, Bethyl Laboratories, Montgomery, EUA) diluído em PBS (1:10.000) foi incubado por uma hora sob agitação. Depois de três lavagens com PBS Tween 0,05% sob agitação, a revelação foi realizada com solução de DAB (Diaminobenzidina 5% em PBS), e bloqueada com água destilada.

Análise estatística

A distribuição de normalidade dos dados foi obtida com teste de Kolmogorov-Smirnov. Dados com distribuição paramétrica foram avaliados pelo teste t de Student e expressos em média e desvio-padrão. Dados com distribuição não-paramétrica foram analisados com teste de Mann-Whitney U e expressos em mediana e quartis. A análise de frequência com dados categóricos foi avaliada com teste de Qui quadrado.

RESULTADOS

Foram selecionados 559 pacientes, atendidos pela Universidade Estadual de Londrina, no período de 1986 a 1998. Os pacientes selecionados completaram o programa preventivo da Bebe Clínica, na idade de 0 a 5 anos. Duzentos e quarenta e cinco (43,8%) pacientes foram localizados e convidados a participar da pesquisa, dos quais 78 (13,9%) compareceram ao ambulatório da Clínica Odontológica Universitária da Universidade Estadual de Londrina para avaliação.

Foram avaliados 37 (47,4%) pacientes do gênero masculino e 41 (52,7%) do gênero feminino. A idade média dos pacientes foi $20,4 \pm 1,7$ anos, sem diferença entre o gênero masculino ($20,3 \pm 1,6$) e feminino ($20,4 \pm 1,8$, $P > 0,05$). Em relação à etnia, 56 (71,8%) se declararam brancos, 3 (3,8%) negros, 8 (10,3%) amarelos e 11 (14,1%) pardos, sem diferença de frequência entre os sexos ($\chi^2 = 4,03$, $P = 0,25$). Dois pacientes (2,6%) eram fumantes, 37 (47,4%) realizaram tratamento ortodôntico e 9 (11,5%) relataram traumatismo da dentição permanente.

Em relação ao traumatismo da dentição decídua, 34 (43,6%) haviam sofrido traumatismo nos incisivos decíduos. A frequência de traumas da dentição decídua foi significativamente maior (risco relativo = 2,15, IC95% 1,34 a 3,44; $P = 0,0003$) entre os pacientes do gênero masculino (24 pacientes; 64,9%) do que do gênero feminino (10; 24,4%). A idade média do traumatismo da dentição decídua foi $33,4 \pm 16,4$ meses, sem diferença estatística entre o gênero masculino ($34,2 \pm 17,0$ meses) e feminino ($31,1 \pm 15,5$ meses).

A frequência dos traumatismos e o tratamento proposto descritos nos prontuários da Clínica de Bebês podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 - Frequência e tratamento indicado nos traumatismos de dentição decídua observados no estudo

Tipo de trauma	n	Frequência (%)
<i>Não complicados</i>		
Subluxação	14	35,0%
Fratura de esmalte	6	15,0%
Fratura de esmalte e dentina	3	7,5%
<i>Complicados</i>		
Luxação lateral	4	10,0%
Intrusão	8	20,0%
Avulsão	3	7,5%
Fratura de esmalte e dentina com exposição pulpar	2	5,0%
Tratamento realizado		
Acompanhamento	25	73,5%
Tratamento endodôntico	5	14,7%
Exodontia	4	11,8%
Traumatismo recorrente		
Sim	7	20,58%
Não	27	79,42%

O nível mediano de anticorpos anti-dentina foi 0,355 (quartis 0,270 – 0,442) em absorvância a 450nm. Não foram observadas diferenças entre as medianas do grupo de pacientes que sofreu traumatismo da dentição decídua e os pacientes não traumatizados. A taxa de secreção de anticorpos mediana foi 0,259 (quartis 0,192 – 0,455). Não foram observadas diferenças entre os grupos que sofreram traumatismo da dentição decídua ou não (figura 1). A ocorrência de traumatismo recorrente não alterou os níveis de anticorpos (média 0,352 ± 0,05) em relação aos indivíduos que apresentaram um único episódio de trauma (média 0,374 ± 0,12; $P > 0,05$). Não foram observadas diferenças entre os níveis de anticorpos de pacientes que apresentaram traumas complicados da dentição decídua (média 0,368 ± 0,127) em relação aos traumas não-complicados (média 0,355 ± 0,093).

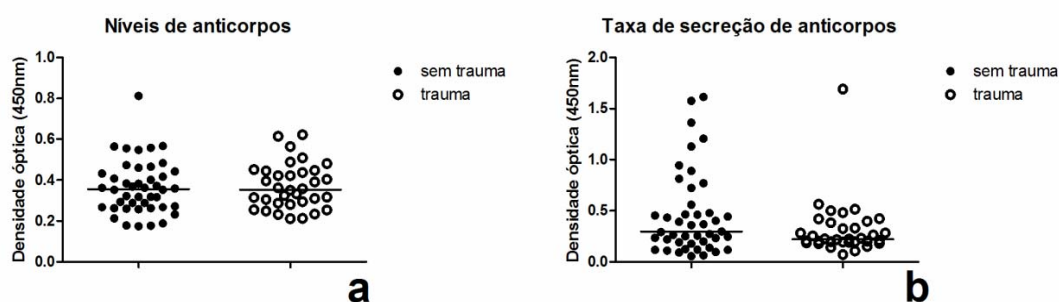


Figura 1. Níveis de anticorpos SIgA anti-extrato dentinário(a) e taxa de secreção de anticorpos (nível de anticorpos/ml de saliva) (b), em pacientes que sofreram traumatismo da dentição decídua. A barra representa mediana. $P>0.05$, teste de Mann-Whitney U.

Não foi observada correlação estatística entre os níveis de anticorpos e taxa de secreção com relação ao tipo de trauma sofrido na dentição decídua. A idade (em meses) de ocorrência do traumatismo da dentição decídua também não apresentou associação (figura 2).

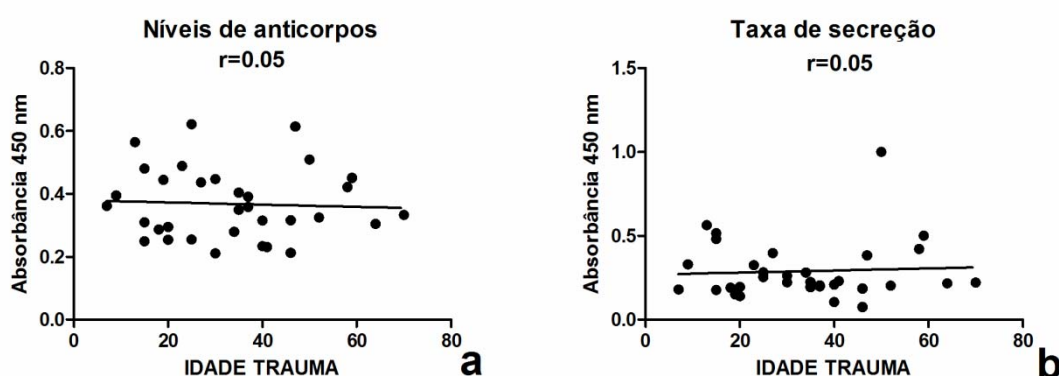


Figura 2. Correlação entre os níveis de SIgA salivar anti-extrato dentinário (a) e taxa de secreção de anticorpos (b) e idade do traumatismo da dentição decídua. Coeficiente de correlação de Spearman.

O extrato dentinário humano usado como antígeno (10 μg e 20 μg de proteína/ μl) quando submetido à eletroforese de gel de SDS- poliacrilamida 10% e posterior coloração por nitrato de prata mostrou ser composto por diversos

fragmentos representados por bandas de diferentes intensidades e com massa molecular (MM) aproximada de 80; 73; 65; 55; 45; 35; 30; 20 e 15 kDa (figura 3).

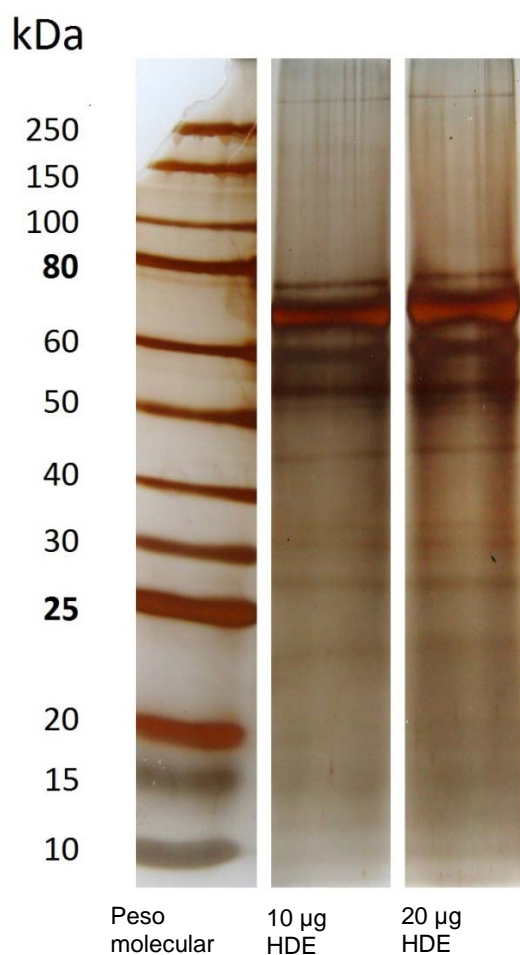


Figura 3. Perfil eletroforético do extrato dentinário humano. À esquerda padrão de massa molecular (MM) e à direita o HDE na concentração de 10 e 20 µg de proteína/µl. Notamos banda de MM aproximada de 80; 73; 65; 55; 45; 35; 30; 20 e 15 kDa.

O ensaio de Western blotting realizado com saliva de pacientes com e sem história de traumatismo da dentição decídua mostrou o reconhecimento predominantemente de um único antígeno de aproximadamente 45 kDa, em todas as amostras (figura 4).

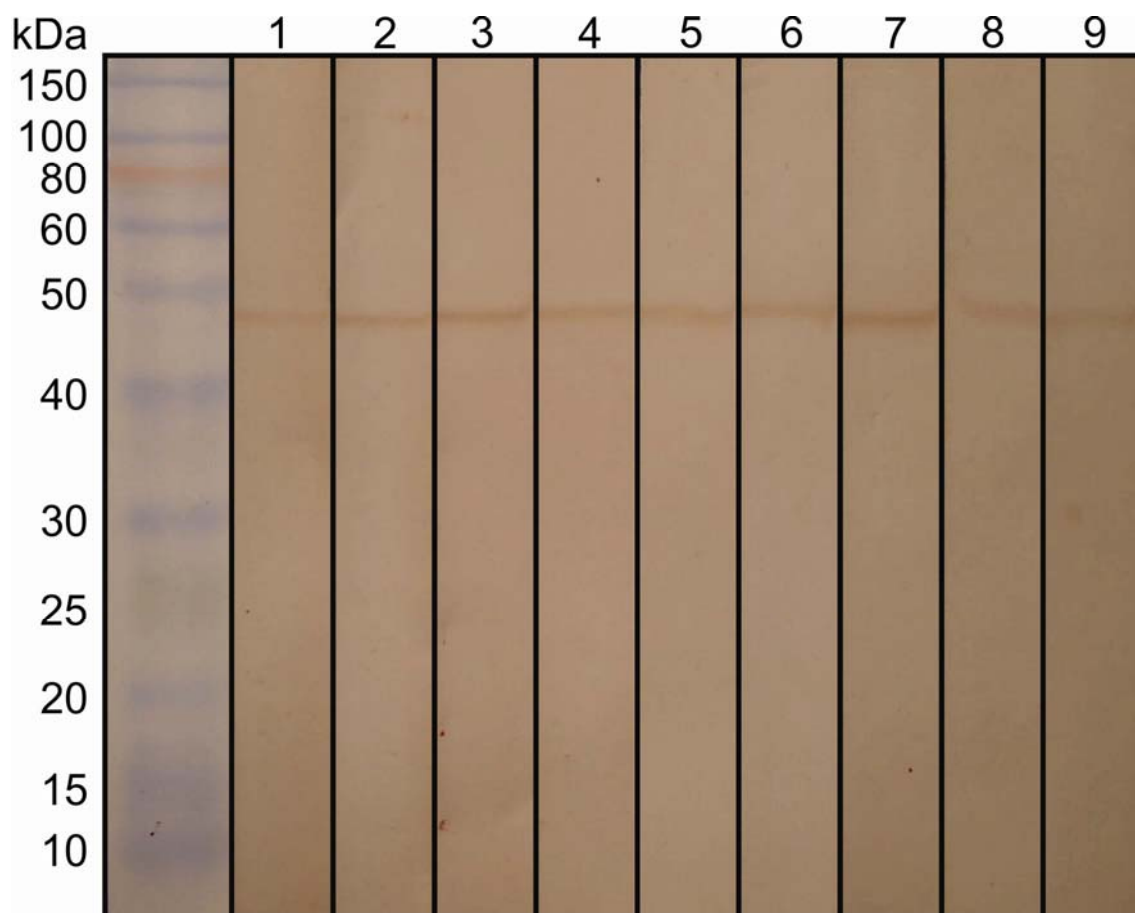


Figura 4. Perfil de reconhecimento do extrato dentinário humano pela Imunoglobulina A secretora (SIgA) salivar, analisado por ensaio de Western blotting, onde podemos notar o reconhecimento de banda de aproximadamente 45 kDa em todos os pacientes. As membranas de 1 a 5 representam pacientes com história de traumatismo na dentição decídua, e as membranas de 6 a 9 representam pacientes sem história de traumatismo na dentição decídua.

A análise de regressão linear não demonstrou associação entre as demais variáveis de estudo e os níveis de anticorpos e taxa de secreção de anticorpos SIgA anti-extrato dentinário (tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Análise de regressão linear multivariada dos níveis de anticorpos SIgA anti-extrato dentinário e variáveis de estudo.

Variável	Coefficiente	Erro padrão	Teste F	P
Alergia	-0,006	0,080	0,006	0,9382
Etnia	-0,011	0,013	0,7235	0,3979
Ortodontia	0,047	0,028	2,7887	0,0994
Reabsorção incisivo central permanente	0,013	0,030	0,2045	0,6525
Gênero	-0,013	0,031	0,1656	0,6853
Trauma decíduo	0,003	0,032	0,0072	0,9326
Trauma permanente	-0,002	0,044	0,0024	0,9610
Constante	0,326	0,213	2,3412	0,1305
Coefficiente de correlação: $r^2 = 0,06$				

Tabela 3. Análise de regressão linear multivariada da taxa de secreção de anticorpos SIgA anti-extrato dentinário e variáveis do estudo.

Variável	Coefficiente	Erro padrão	Teste F	P
Alergia	196,512	251,576	0,6102	0,4374
Etnia	23,593	42,376	0,3100	0,5795
Ortodontia	-5,816	90,026	0,0042	0,9486
Reabsorção incisivo central permanente	112,761	94,576	1,4215	0,2372
Gênero	14,358	99,391	0,0209	0,8855
Trauma decíduo	146,207	99,816	2,1456	0,1475
Trauma permanente	-260,973	139,517	3,4989	0,0657
Constante	-217,787	677,607	0,1033	0,7488
Coefficiente de correlação: $r^2 = 0,10$				

A frequência de reabsorção dos incisivos centrais foi maior nos pacientes submetidos a tratamento ortodôntico (n=20, 57,1%; Teste de Qui-quadrado com correlação de Yates, $P < 0,001$) em relação aos pacientes sem história de tratamento ortodôntico (n=8; 19,5%). No entanto, a frequência de reabsorções não foi diferente entre os indivíduos que realizaram tratamento ortodôntico com história de traumatismo da dentição decídua (n=8; 53,3% Teste de Qui-quadrado com correlação de Yates, $P > 0,05$) ou não traumatizados (n= 12; 60%).

Em relação aos níveis de anticorpos, pacientes sem histórico de trauma na dentição decídua e com reabsorções dentárias pós-tratamento ortodôntico apresentaram níveis mais elevados de auto-anticorpos. No entanto, indivíduos que apresentaram história de traumatismo da dentição decídua apresentaram perfil inverso de auto-anticorpos SIgA anti-dentina. O desenvolvimento de reabsorção de incisivos permanentes pós-tratamento ortodôntico estava associado a níveis mais baixos de anticorpos anti- extrato dentinário nos pacientes que apresentaram trauma na dentição decídua (figura 5).

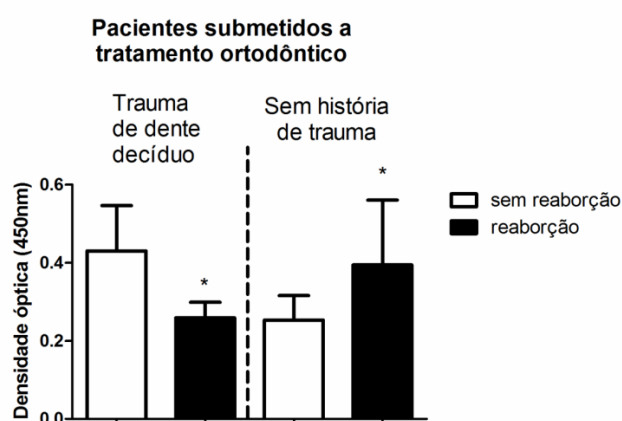


Figura 5. Níveis de anticorpos SIgA anti- extrato dentinário em pacientes com e sem história de traumatismo da dentição decídua, submetidos a tratamento ortodôntico. * $P < 0,05$, teste t de Student.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que o traumatismo da dentição decídua não é um fator correlacionado aos níveis de anticorpos SIgA salivares anti-dentina em adultos e à frequência de reabsorções em dentes permanentes. Curiosamente, a resposta imune local contra a dentina parece ser direcionada a um auto-antígeno de aproximadamente 45kDa.

A reabsorção radicular inflamatória é um fenômeno frequente e multifatorial, mas o mecanismo envolvendo a reabsorção após o traumatismo

dentário é pouco compreendido ⁴. Alguns fatores são comumente associados à reabsorção radicular inflamatória, como idade, gênero, etnia, condições prévias da raiz dentária, fatores relacionados ao tratamento ortodôntico, focos de infecção, hábitos bucais, alergia do trato respiratório e fatores individuais desconhecidos ^{7, 17-20}. Entre os fatores individuais, alguns autores sugerem que níveis elevados de auto-anticorpos contra a dentina estejam associados a reabsorção dentária, presença de trauma dentário e tratamento ortodôntico ^{6, 7}. No entanto, a análise de regressão linear obtida no presente estudo não detectou associação significativa entre níveis de anticorpos com fatores de risco e a presença de trauma em dentes decíduos.

A auto-imunidade contra proteínas da matriz dentinária pode estar associada à susceptibilidade individual à reabsorção radicular inflamatória, considerando que o sistema imunológico tem função importante na reabsorção de tecidos calcificados ^{4, 7, 8}. Esta hipótese é corroborada por achados clínicos que demonstram diferenças significativas nos títulos de anticorpos específicos contra antígenos dentinários em pacientes com reabsorção radicular patológica ⁶ e em pacientes susceptíveis à reabsorção devido a tratamento ortodôntico ⁷. Além disso, em estudos experimentais foi observada a associação entre a reabsorção radicular inflamatória induzida por trauma e presença de anticorpos anti-dentina ^{4, 5}. Por outro lado, em todos os estudos, observou-se a presença do anticorpo específico contra proteínas dentinárias mesmo em indivíduos que não apresentavam reabsorção radicular inflamatória, ou faziam parte do grupo controle, dado que também observamos no estudo atual. Além disso, ao contrário da hipótese de estudo, não observamos associação entre o trauma decíduo e a presença de auto-anticorpos contra a dentina. Estes resultados sugerem que outros fatores estejam associados a altos níveis de anticorpos anti-dentina, e um possível aumento da susceptibilidade a

reabsorção, em pacientes sem sinais radiográficos de reabsorção dentária em dentes permanentes.

Apesar de o traumatismo dos dentes permanentes induzir uma resposta imunológica específica contra componentes da matriz dentinária, nada se conhece a respeito da resposta imunopatológica frente ao traumatismo dos dentes decíduos. O traumatismo na dentição decídua é uma situação comum, principalmente em crianças pré-escolares^{9, 21}, podendo promover a reabsorção rápida e precoce do dente afetado, entre 18-52 meses de idade¹. Billie *et al.*, 2008, propõem uma relação entre a reabsorção patológica dos dentes decíduos e a susceptibilidade à reabsorção radicular inflamatória nos dentes permanentes. O sistema imunológico inato e adaptativo dos neonatos é imaturo, com desenvolvimento predominante da resposta imune humoral contra antígenos protéicos nos primeiros anos de vida^{11, 13}. Uma resposta inflamatória local crônica, como o traumatismo de dentes decíduos, poderia portanto induzir a produção de anticorpos específicos contra dentina e a indução de células de memória. Esta hipótese não pode ser comprovada no presente estudo, uma vez que níveis de anticorpos SIgA anti-dentina não apresentaram-se aumentados em pacientes com trauma da dentição decídua.

Apesar do traumatismo de dentição decídua não produzir um aumento nos níveis de anticorpos anti-dentina em adultos, os resultados sugerem que a resposta imune humoral contra os componentes da dentina seja modulada em resposta a um novo episódio inflamatório sobre a dentina. Os resultados do presente estudo demonstram que níveis elevados de anticorpos anti-dentina são observados em pacientes que apresentam reabsorção dentária pós-tratamento ortodôntico. Estes resultados são corroborados pelo estudo de Ramos e colaboradores (2011).

No entanto, níveis menores de anticorpos foram detectados nos pacientes com reabsorção dentária pós-tratamento ortodôntico e que apresentaram traumatismo na dentição decídua. Este resultado sugere que possa ocorrer um desvio da resposta imunológica anti-dentina nestes pacientes, sendo que a investigação da resposta imune celular e um número maior de sujeitos são necessários para testar esta hipótese.

Também investigamos uma possível diferença no padrão de reconhecimento dos antígenos dentinários pela resposta imune local em pacientes com e sem história de traumatismo da dentição decídua. O HDE usado como antígeno, quando submetido à eletroforese, mostrou ser composto por moléculas de diferentes massas moleculares, e as principais moléculas observáveis apresentaram massa molecular aproximada de 80; 73; 65; 55; 45; 35; 30; 20 e 15 kDa. Baseado no perfil eletroforético descrito por outros autores, as moléculas observadas provavelmente correspondem à: Proteína Gla da matriz, Proteína osteomorfogénica, Fosfoproteína, Osteonectina, Proteína da matriz dentinária 1, Osteopontina, Proteína da matriz extracelular e Sialoproteína dentinária ²²⁻
²⁴ [ENREF 22](#). Nem todas as proteínas dentinárias apresentadas no gel de eletroforese são reconhecidas pelo soro humano, como relatado em estudo de Hidalgo, 2001, cujos resultados demonstraram reação positiva às proteínas com bandas representadas por 170; 135; 110; 55; 30; 18; <6 kDa. O ensaio de *Western blotting* do presente estudo, realizado com saliva, apresentou reconhecimento de um antígeno de 45 kDa por SIgA. Comparando a massa molecular do antígeno evidenciado com moléculas dentinárias descritas no estudo de Jágr *et al.*, 2012, várias moléculas são passíveis de correspondência com o antígeno encontrado, tais como Fator de pigmento derivado do epitélio, Precursor de alfa-1 antitripsina,

Precursor de osteomodulina, Precursor de calreticulina, Alfa enolase, Tubulina, Secernina-1. A história prévia de traumatismo dentário nos dentes decíduos não promoveu reconhecimento de diferentes componentes da dentina. Em estudo realizado com pacientes que tiveram traumatismo dos dentes permanentes, observou-se o reconhecimento do antígeno de 44 kDa em pacientes com história de trauma nos dentes permanentes e no grupo controle ²⁵ e o reconhecimento de um antígeno de 45 kDa também foi observado em pacientes com reabsorção radicular inflamatória após movimentação ortodôntica e no grupo controle ²³. Estes resultados sugerem que o componente de 45 kDa da matriz dentinária é reconhecido pelo sistema imunológico, independente da história prévia de trauma da dentição decídua.

CONCLUSÃO

Os anticorpos SIgA salivares reconhecem predominantemente um antígeno de aproximadamente 45 kDa, independente de história prévia de trauma da dentição decídua. Não são observadas diferenças significantes nos níveis de anticorpos SIgA salivares anti-extrato dentinário em pacientes adultos jovens com história de traumatismo da dentição decídua. No entanto, a exposição da dentina a um segundo evento inflamatório (tratamento ortodôntico) parece modular a resposta aos componentes da dentina em indivíduos com história de trauma da dentição decídua. Considerando os dados obtidos, podemos propor que o traumatismo na dentição decídua não seja fator de risco para o desenvolvimento de reabsorção patológica em dentes permanentes.

REFERENCIAS

1. Cardoso M, Rocha MJ. Identification of factors associated with pathological root resorption in traumatized primary teeth. *Dent Traumatol.* 2008;24:343-349
2. Assuncao LR, Ferelle A, Iwakura ML, Nascimento LS, Cunha RF. Luxation injuries in primary teeth: A retrospective study in children assisted at an emergency service. *Braz Oral Res.* 2011;25:150-156
3. Bille ML, Kvetny MJ, Kjaer I. A possible association between early apical resorption of primary teeth and ectodermal characteristics of the permanent dentition. *Eur J Orthod.* 2008;30:346-351
4. Ng KT, King GJ, Courts FJ. Humoral immune response to active root resorption with a murine model. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1990;98:456-462
5. Wheeler TT, Stroup SE. Traumatic root resorption in dentine-immunized mice. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993;103:352-357
6. Hidalgo MM, Itano EN, Consolaro A. Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. *Dent Traumatol.* 2005;21:218-221
7. Ramos SdP, Ortolan GO, Dos Santos LM, Tobouti PL, Hidalgo MM, Consolaro A, Itano EN. Anti-dentine antibodies with root resorption during orthodontic treatment. *The European Journal of Orthodontics.* 2011;33:584-591
8. Takayanagi H. Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:292-304
9. Rasmusson CG, Koch G. Assessment of traumatic injuries to primary teeth in general practise and specialized paediatric dentistry. *Dent Traumatol.* 2010;26:129-132
10. de Amorim Lde F, da Costa LR, Estrela C. Retrospective study of traumatic dental injuries in primary teeth in a brazilian specialized pediatric practice. *Dent Traumatol.* 2011;27:368-373
11. Marodi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol.* 2006;118:137-144
12. Burl S, Townend J, Njie-Jobe J, Cox M, Adetifa UJ, Touray E, Philbin VJ, Mancuso C, Kampmann B, Whittle H, Jaye A, Flanagan KL, Levy O. Age-dependent maturation of toll-like receptor-mediated cytokine responses in gambian infants. *PLoS One.* 2011;6:e18185
13. Tulic MK, Andrews D, Crook ML, Charles A, Tourigny MR, Moqbel R, Prescott SL. Changes in thymic regulatory t-cell maturation from birth to puberty:

- Differences in atopic children. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:199-206 e191-194
14. Martin R, Nauta AJ, Ben Amor K, Knippels LM, Knol J, Garssen J. Early life: Gut microbiota and immune development in infancy. *Benef Microbes.* 2010;1:367-382
 15. Dietert RR, Piepenbrink MS. The managed immune system: Protecting the womb to delay the tomb. *Hum Exp Toxicol.* 2008;27:129-134
 16. Snell-Bergeon JK, Smith J, Dong F, Baron AE, Barriga K, Norris JM, Rewers M. Early childhood infections and the risk of islet autoimmunity: The diabetes autoimmunity study in the young (daisy). *Diabetes Care.* 2012;35:2553-2558
 17. Roskamp L, Westphalen VP, Carneiro E, Fariniuk LF, Silva Neto UX. The positive influence of atopy on the prognosis of avulsed and replanted teeth despite differences in post-trauma management. *J Endod.* 2011;37:463-465
 18. Owman-Moll P, Kurol J. Root resorption after orthodontic treatment in high- and low-risk patients: Analysis of allergy as a possible predisposing factor. *Eur J Orthod.* 2000;22:657-663
 19. Sameshima GT, Sinclair PM. Predicting and preventing root resorption: Part i. Diagnostic factors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;119:505-510
 20. Sameshima GT, Sinclair PM. Predicting and preventing root resorption: Part ii. Treatment factors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;119:511-515
 21. Malmgren B, Andreasen JO, Flores MT, Robertson A, DiAngelis AJ, Andersson L, Cavalleri G, Cohenca N, Day P, Hicks ML, Malmgren O, Moule AJ, Onetto J, Tsukiboshi M. International association of dental traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 3. Injuries in the primary dentition. *Dent Traumatol.* 2012;28:174-182
 22. Balducci L, Ramachandran A, Hao J, Narayanan K, Evans C, George A. Biological markers for evaluation of root resorption. *Arch Oral Biol.* 2007;52:203-208
 23. George A, Evans CA. Detection of root resorption using dentin and bone markers. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12:229-235
 24. Jagr M, Eckhardt A, Pataridis S, Miksik I. Comprehensive proteomic analysis of human dentin. *Eur J Oral Sci.* 2012;120:259-268
 25. Hidalgo MM. Estudo sobre o potencial imunogênico da dentina. Contribuição para a etiopatogenia da reabsorção dentária. 2001

APÊNDICES

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Condição de saúde bucal de adultos jovens que receberam atenção odontológica precoce.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) participante,

Este projeto de pesquisa pretende conhecer a condição de saúde bucal e colher uma amostra de saliva de pessoas que foram atendidas na Bebê-Clínica na infância.

Será realizada uma análise de seu prontuário correspondente ao período em que foi atendido na Bebê-Clínica, uma entrevista sobre sua condição de saúde e um exame clínico bucal. Todos esses procedimentos são simples, rápidos e indolores, não existem riscos ou desconforto, e os procedimentos realizados serão gratuitos.

Sua participação é voluntária, cabendo-lhe direito de desistência, se assim o quiser, sem ocasionar nenhum ônus para sua pessoa.

Os pesquisadores asseguram que todos os dados coletados serão mantidos em sigilo e comprometem-se a fornecer aos entrevistados todas as informações obtidas durante o estudo, bem como orientações sobre cuidados com saúde bucal. Os dados obtidos serão utilizados de forma global para fazer uma pesquisa científica, incluindo posterior publicação dos resultados em dissertações, teses, revistas e livros especializados.

Suas dúvidas poderão ser esclarecidas com a pesquisadora Cássia Cilene Dezan Garbelini pelo telefone 3371-6757, professora do Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil. Para qualquer esclarecimento quanto aos aspectos éticos desta pesquisa, pode ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (registro CONEP 268) 3371-2490.

Foi-me explicado que a referida pesquisa não implicará em danos à minha saúde e, sendo só para o momento, ratifico minha autorização.

Eu,, estou consciente do acima exposto e concordo plenamente com minha participação nesta pesquisa.

Londrina, de de 20.....

Assinatura do responsável

Assinatura da pesquisadora

APÊNDICE B

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Condição de saúde bucal de adultos jovens que receberam atenção odontológica precoce

Formulário N.:

Data: __/__/__.

I – DADOS PESSOAIS

Nome

completo: _____

Data de Nascimento: _____ Idade: _____ anos.

Endereço:

_____ Telefone p/ contato: _____

Telefone de um parente para contato _____

Ocupação: () trabalha () estuda () trabalha + estuda

Estado civil () solteiro () casado () união estável () divorciado

Escolaridade:

() 1º. Grau incompleto () 1º. Grau Completo () 2º. Grau incompleto () 2º. Grau completo

() 3º. Grau (cursando)

Nome da mãe: _____ Idade: _____ anos.

Escolaridade da mãe:

() 1º Grau incompleto () 1º Grau Completo () 2º Grau incompleto () 2º Grau completo

() 3º Grau (cursando ou completo)

Profissão da mãe:

Nome do pai: _____ Idade: _____ anos.

Escolaridade do pai:

() 1º Grau incompleto () 1º Grau Completo () 2º Grau incompleto () 2º Grau completo

() 3º Grau (cursando ou completo)

Profissão do pai:

Moradia: () própria () própria em aquisição () alugada () cedida () outros

Quantas pessoas residem na sua casa? _____

Quantas pessoas tem algum tipo de renda (trabalho remunerado, pensão, aposentadoria)? Listar os moradores e a renda mensal de cada um

Morador	Renda

Qual é a cor da sua pele ou sua raça?

() branca () preta () amarela () parda () indígena () ignorado

Classificação econômica

	QUANTIDADE DE ITENS				
	0	1	2	3	4 ou +
Televisão em cores	0	1	2	3	4
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	4	5	6	7
Automóvel	0	4	7	9	9
Empregada mensalista	0	3	4	4	4
Máquina de lavar	0	2	2	2	2
Vídeo cassete ou DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	4	4	4	4
Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex)	0	2	2	2	2

II – SAÚDE GERAL

1 - Em geral, acha que sua saúde está :

() excelente () muito boa () boa () razoável () ruim

2 - Teve problemas com sua saúde nos últimos seis meses que te impediram de realizar suas atividades diárias?

() sim () não

Se sim, que tipo de problema?

3 - Está tomando algum medicamento? () sim () não (pular para questão nº 5)

4 - Qual medicamento?

() analgésicos/ antiinflamatórios Qual? _____
 () antiespasmódicos Qual? _____
 () antimicrobianos Qual? _____
 () psicofármacos Qual? _____
 () outros Qual? _____

III – SAÚDE BUCAL

5 - Há quanto tempo foi sua última visita ao dentista?

menos de um ano de 1 a 2 anos 3 ou mais anos

6 – Onde?

serviço público particular(liberal) particular (plano ou convênio)

7 – Por quê?

dor consulta de rotina/reparos/manutenção

sangramento gengival cavidade no dente feridas, caroços ou manchas

outros: _____

8 - Qual é a frequência que vai ao dentista?

regularmente a cada seis meses

uma vez por ano

somente quando apresenta algum problema odontológico

9 - Como você classificaria sua saúde bucal?

não sabe péssima ruim regular boa ótima

10 - Como você classificaria a aparência de seus dentes e gengivas?

não sabe péssima ruim regular boa ótima

11 - Como você classificaria sua mastigação?

não sabe péssima ruim regular boa ótima

12 - O quanto de dor seus dentes e gengivas causaram nos últimos meses?

nenhuma dor pouca dor média dor muita dor

13 - Quantas vezes ao dia você escova os dentes?

uma duas três quatro cinco mais de cinco

14 -Você usa fio dental? sim não (ir para a questão nº 16)

15 - Quando usa?

uma vez ao dia quando se lembra resto alimentar incomoda

duas vezes ao dia

16 - Você considera que necessita de tratamento atualmente? sim não

17 – Você teve algum traumatismo dentário nos dentes permanentes?

sim não

18 – Qual a dimensão do trauma?(especificar) _____

19 – Você fez/faz tratamento ortodôntico?

sim não

IV – HÁBITOS

20 – Com que frequência você come os seguintes alimentos?

	Bolacha doce/ bolos	Balas/ chiclete/ pirulito	Paçoca/ doce	Refrigerante	Suco c/açúcar	iogurte/ similares	chocolate	água
1 X/ dia								
2 Xs/ dia								
Várias								
1 a 2 Xs/ Rara/e								

21 – Você fuma?

() não () sim

22 – Há quanto tempo?

() menos de 6 meses () de 6 meses a 1 ano () mais de 1 ano
() de 2 a 4 anos () mais de 4 anos

23 – Quantos cigarros você fuma por dia?

() 1 a 4 () 5 a 9 () 10 a 14 () 15 a 19 () 20 () mais de 20

24 – Você consome bebidas alcoólicas?

() sim () não

25 - Quantas vezes por semana você consome?

() todos os dias () 5 a 6 dias/semana () 3 a 4 dias/semana () 1 a 2 dias/semana
() quase nunca

26 – Você usa/usou drogas ilícitas?

() sim () não

27 – Se usou, qual?

ANEXOS

ANEXO A

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



Universidade
Estadual de Londrina

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 268

Parecer CEP/UEL:	209/2011
CAAE:	0194.0.268.000-11
Processo:	17682.2011.98
Folha de Rosto:	440727
Pesquisador(a):	Cassia Cilene Dezan Garbelini
Unidade/Órgão:	CCS - COU - Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil

Prezado(a) Senhor(a):

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"CONDIÇÕES DE SAÚDE BUCAL DE ADULTOS JOVENS QUE RECEBERAM ATENÇÃO ODONTOLÓGICA PRECOZE"

Situação do Projeto: **APROVADO**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.

Londrina, 25 de Agosto de 2011.



Prof. Dra. Paula Mariza Zedu Alliprandini
Vice-coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina

Campus Experimental Rodovia Celso Garcia CUPPE nº 464 - Fone: (41) 3174-0000 FAX: (41) 3174-0400 - Caixa Postal 6001 - CEP 86051-900 - Londrina - Paraná
Hospital UNICORRIBS/CRSIO DE CÂNCERES E SAÚDE - Avenida Robert Koch, 10 - Vila Operária - Fone: (41) 331-2400 FAX: (41) 331-2400 - Caixa Postal 701 - CEP 86034-400
LONDRIANA - PARANÁ - BRASIL