



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA LIMA

**NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 E  
TNFA E DE IGG/IGE AOS ANTÍGENOS DENTINÁRIOS EM  
PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTO  
ORTODÔNTICO**

---

Londrina  
2013

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA LIMA

**NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 E  
TNFA E DE IGG/IGE AOS ANTÍGENOS DENTINÁRIOS EM  
PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTO  
ORTODÔNTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa Dra Eiko Nakagawa Itano

Londrina  
2013

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L732n Lima, Carlos Eduardo de Oliveira.

Níveis séricos de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF $\alpha$  e de IgG/IgE aos antígenos dentinários em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico / Carlos Eduardo de Oliveira Lima. – Londrina, 2013.  
87 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Imunoglobulinas – Teses. 2. Citocinas – Teses. 3. Reabsorção da raiz (Dentes) – Teses. 4. Teste imunoenzimático – Teses. 5. Imunologia – Teses. I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA LIMA

**NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 E TNFA E  
DE IGG/IGE AOS ANTÍGENOS DENTINÁRIOS EM PACIENTES  
SUBMETIDOS A TRATAMENTO ORTODÔNTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção de título de doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo  
UEM – Maringá - PR

---

Profa. Dra. Fernanda Akemi Nakanishi-Ito  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Evelise Ono Tanaka  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Emerson José Venâncio  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2013.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina com apoio financeiro da Fundação Araucária e PROPPG/UEL.

Dedico este trabalho,

à Luciana e ao Rodrigo...

filhos amados que alegram meus dias e são,  
neste mundo, meu principal estímulo  
por uma vida melhor.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, pela oportunidade e atenção que me foi dada e por toda a sua experiência em prol da imunologia e da pesquisa, o meu carinho e respeito. É gratificante e motivo de alegria poder tê-la como amiga.

Ao Prof. Dr. Rubens Cecchini, Coordenador do programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental.

Aos meus queridos pais, Carlos José de Oliveira Lima e Neusa Galvão de Oliveira Lima, que dedicaram suas vidas para que seus filhos tivessem as oportunidades que eles não puderam ter, e ensinaram-me respeito, honra e dignidade, fazendo-me um cidadão melhor a cada dia. Que Deus os abençoe e habite em seus corações para todo o sempre, em nome de Jesus.

Aos meus irmãos Renata e Gustavo, por terem sempre me incentivado.

A participação com boa vontade dos pacientes que sempre colaboraram na obtenção periódica das radiografias periapicais, na coleta de sangue, atendendo nossa solicitação e acreditando na importância desta pesquisa.

Aos amigos Luis Rotta e Sérgio Vilhegas, companheiros na Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente – UNOESTE, onde por 16 anos dividimos a alegria do trabalho na especialidade que amamos.

Aos professores do Curso de Especialização em Ortodontia da Associação Odontológica do Norte do Paraná, Prof. Dr. Tio Takahashi, Prof. Dr. Walter Rino, Prof. Dr. Ricardo Takahashi e Prof. Júlio Vargas Neto, pela colaboração com os pacientes incluídos em minha amostra.

Aos alunos da 4ª Turma do Curso de Especialização em Ortodontia da Associação Odontológica do Norte do Paraná, Carlos Eduardo (*in memoriam*), César, Cláudia, Dailton, Etheson, Kelly, Lígia, Máriam, Raphael, Renan, Vanessa e Viviam, pela colaboração com os pacientes incluídos em minha amostra.

Ao Prof. Esp. Lucídio de Jesus Júnior pela realização da estatística deste trabalho.

À Disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da UEL, Departamento MOOI, CCS, por ter realizado a exodontia dos dentes usados em minha pesquisa.

Aos funcionários do Hemocentro de Londrina, Emerson Leandro de Souza Carvalho e Meire Patriarca Duarte pela colaboração e orientações relativas à coleta e armazenamento do material.

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada, pela alegria, atenção, convivência e aprendizado. Tenham a certeza que vocês fizeram parte desta realização: Nilson de Jesus Carlos, Mari Sumigawa Kaminami, Paula Leonello Alvares e Silva, Tânia Costa, Luciene Airy Nagashima, Lilian Cristina Raia de Dio, Juliana Elisa Lima, Fabiana Felipin Rigobello, Wilson Cândido Júnior.

À Mari Sumigawa Kaminami pela mensagem de organização e disciplina no laboratório e pela fundamental ajuda nos experimentos.

À Profa. Dra. Fernanda A. Nakanishi-Ito pelo apoio e colaboração no desenvolvimento do projeto de pesquisa.

À Profa. Dra. Evelise Ono e Profa. Dra. Elisa Tanaka Carlotto pela participação na organização das radiografias e análise destas pelo método de subtração radiográfica digital.

À Profa. Dra. Wanda Terezinha Garbelini Frossard pelo apoio e companheirismo no Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil, CCS.

A todos os professores do doutorado em Patologia Experimental, em especial à Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe, que me incentivou gentilmente em alguns momentos difíceis. O meu reconhecimento!

Às funcionárias da biblioteca setorial da COU (Clínica Odontológica Universitária), Dirce Missae Suzuke, Marcia Marques da Silva Carvalho e Dayse Francis Bulgarelli de C. Augusto, pela atenção e eficiência nos trabalhos solicitados e necessários para elaboração desta pesquisa.

Às Professoras Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, Dra. Maria Ângela Hungria da Cunha e Dra. Marta Inoue pela carta de apresentação e principalmente pelo apoio sincero na oportunidade do concurso.

Ao Jeverson Bueno de Oliveira, pelo apoio e assistência na estruturação desse trabalho.

LIMA, Carlos Eduardo de Oliveira. **Níveis séricos de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF $\alpha$  e de IgG/IgE aos antígenos dentinários em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico.** 2013. 87 fls. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013

## RESUMO

**Objetivo:** A reabsorção radicular decorrente da movimentação dentária induzida é um processo patológico de natureza inflamatória, que pode ser observada em tratamentos ortodônticos. A melhor compreensão de mecanismos imunopatológicos envolvidos nesse processo poderá contribuir para o diagnóstico precoce da reabsorção radicular. O presente estudo teve como objetivo determinar níveis séricos de citocinas e de IgG e IgE aos antígenos dentinários em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico. **Metodologia:** A partir de uma amostra de 34 pacientes, foram analisadas, radiografias periapicais dos incisivos centrais superiores obtidos antes da colocação do aparelho ortodôntico (T0), aos 6-7 meses de tratamento (T1) e aos 12-13 meses de tratamento (T2), e avaliados os níveis séricos de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF $\alpha$  e imunoglobulinas IgG e IgE específicas ao antígeno dentinário humano por ensaio imunoenzimático. O extrato dentinário humano (EDH) foi obtido a partir de terceiros molares íntegros, inclusos ou semi-impactados com indicação cirúrgica, obtendo-se inicialmente, dentina em pó que foi tratada com solução desmineralizadora. Os dados foram comparados à quantidade de perda radicular observada em radiografias periapicais dos incisivos centrais superiores obtidos nas 3 fases do tratamento, analisadas pelo método de subtração radiográfica digital e reconstrução geométrica da imagem. **Resultado:** Os níveis de citocinas IL-10, IL-12 e IL-17 demonstraram alterações significativas, especialmente quando avaliadas em relação à extensão das reabsorções radiculares. Os níveis de anticorpos IgG e IgE ao extrato dentinário total não apresentaram diferenças significativas, todavia os níveis de IgG contra duas principais frações de EDH diminuíram significativamente no decorrer do tratamento ortodôntico sem apresentar correlação com o grau de reabsorção radicular. **Conclusão:** Os níveis sistêmicos de IL-4, TNF $\alpha$  e IgE anti-extrato dentinário permanecem inalterados no decorrer do tratamento ortodôntico, mas ocorre modulação sistêmica de citocinas IL-10, IL-12 e IL-17 dependendo do período e extensão da reabsorção e de anticorpos IgG às frações de extrato dentinário independentemente do grau de reabsorção.

**Palavras-chaves:** Reabsorção radicular. Anticorpo. Imunomodulação. Autoimunidade. Radiografia Digital.

LIMA, Carlos Eduardo de Oliveira. **Serum levels of IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 and TNF cytokines and IgG/IgE dentinal antigens in patients undergoing orthodontic treatment.** 2013. 87 p. Thesis (Ph. D. in Experimental Pathology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## ABSTRACT

**Objective:** The root resorption resulting from induced tooth movement is a pathological process of inflammatory nature, which can be seen in orthodontic treatment. A better understanding of immunopathological mechanisms involved in this process may contribute to the early diagnosis of root resorption. The present study aimed to determine serum levels of cytokines IgG and IgE to dentine antigens in patients undergoing orthodontic treatment. **Methods:** From a sample of 34 patients were analyzed, periapical radiographs of the maxillary central incisors obtained before placement of orthodontic appliance (T0), at 6-7 months of treatment (T1) and at 12-13 months of treatment (T2), and evaluated the serum levels of cytokines IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 and TNF $\alpha$  and IgG and IgE antigen-specific human dentinal by enzyme immunoassay. The human dentine extract was obtained from third molars intact, enclosed or semi-impacted with surgical indication, obtaining initially dentin powder that was treated with demineralizing solution. Data were compared to the amount of root loss observed in periapical radiographs of the maxillary central incisors obtained in 3 phases of treatment, analyzed by digital subtraction radiographic image and geometric reconstruction. **Results:** The levels of cytokines IL-10, IL-12 and IL-17 showed significant changes, especially when assessed in relation to the extension of root resorption. The levels of IgG and IgE to extract full dentin showed no significant differences, however the levels of IgG against two major fractions dentine extract decreased significantly during orthodontic treatment no correlation with the degree of root resorption. **Conclusion:** The systemic levels of IL-4, TNF $\alpha$  and anti-IgE dentine extract remain unchanged during the orthodontic treatment, but occurs modulation of systemic IL-10, IL-12 and IL-17 depending on the length and extent of resorption and antibodies IgG fractions of the extract dentin regardless of the degree of resorption.

**Keywords:** Root resorption. Antibody. Immunomodulation. Autoimmunity. Digital radiograph.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Artigo 1

- Figura 1** – Reabsorção apical em mm nos períodos pré-tratamento a 6-7 meses de tratamento (T0-T1), de 6-7 meses a 12-13 meses de tratamento (T1-T2) e de pré-tratamento a 12-13 meses de tratamento ortodôntico (T0-T2).....27
- Figura 2** – Nível de citocina TNF $\alpha$  (A) e citocina IL-4 (B) em amostras de soros de pacientes no período pré-tratamento (T0), 6-7 meses (T1) e 12-13 meses (T2) de tratamento ortodôntico .....28
- Figura 3** – Nível de citocina IL-10 (A) e citocina IL-12 (B) em amostras de soros de pacientes no período pré-tratamento (T0), 6-7 meses (T1) e 12-13 meses (T2) de tratamento ortodôntico .....28
- Figura 4** – Nível de citocina IL-17 em amostras de soros de pacientes no período pré-tratamento (T0), 6-7 meses (T1) e 12-13 meses (T2) de tratamento ortodôntico. ....29
- Figura 5** – Correlação Linear de Pearson entre IL-10 e a reabsorção radicular de pacientes em tratamento ortodôntico avaliados entre as fases T0 (pré-tratamento) e T1 (6-7 meses de tratamento ortodôntico). Resultado de ELISA expresso em D.O. a 492 nm.....30
- Figura 6** – Correlação Linear de Pearson entre IL-17 e a reabsorção radicular de pacientes em tratamento ortodôntico avaliados entre as fases T0 (pré-tratamento) e T1 (6-7 meses de tratamento ortodôntico). Resultado de ELISA expresso em D.O. a 492 nm.....30

### Artigo 2

- Figura 1** – Nível sérico de IgG anti-EDH .....49

**Figura 2 – Nível sérico de IgE anti-EDH.....50**

**Figura 3 – Nível sérico de IgG anti-EDH de acordo com extensão de  
reabsorção dentária.....50**

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

<b>Tabela 1</b> – Comparação das citocinas IL-10, IL-12 e IL-17, em cada fase avaliada e de acordo com cada grupo dependendo da extensão da reabsorção radicular .....	31
--	----

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Ags</b>	antígenos
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>DO</b>	densidade óptica
<b>ECM</b>	matriz extra celular
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EDH</b>	extrato dentinário humano
<b>ELISA</b>	ensaio imunoenzimático
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>sIgG</b>	Imunoglobulina G salivar
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	água oxigenada
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	ácido sulfúrico
<b>ICSDE</b>	média dos incisivos centrais superiores direito e esquerdo
<b>IL</b>	interleucina
<b>IFN</b>	interferon
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeos
<b>MM</b>	massa molecular
<b>OPG</b>	osteoprotegerina
<b>OPD</b>	orto-fenilenodiamino
<b>PBS</b>	tampão fosfato salino
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>RD</b>	reabsorção dentária
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>RRAE</b>	reabsorção radicular apical externa
<b>SRD</b>	subtração radiográfica digital
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral
<b>T0</b>	fase antes do tratamento ortodôntico
<b>T1</b>	fase com 6 a 7 meses de tratamento ortodôntico
<b>T2</b>	fase com 12 a 13 meses de tratamento ortodôntico
<b>oC</b>	graus centígrados xiii
<b>γ</b>	gama
<b>α</b>	alfa

<b>mm</b>	milímetro
<b>mg</b>	miligrama
<b>mL</b>	mililitro
<b>nm</b>	nanômetro
<b>µg</b>	micrograma
<b>µL</b>	microlitro
<b>%</b>	porcentagem
<b>±</b>	mais ou menos
<b>g/cm<sup>2</sup></b>	grama por centímetro quadrado

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	18
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	18
<b>Artigo 1</b>	
TÍTULO .....	20
RESUMO .....	21
INTRODUÇÃO .....	23
MATERIAL E MÉTODOS .....	24
Casuística .....	24
Amostras de sangue .....	25
Determinação do nível de citocinas em amostras de soro .....	26
Métodos estatísticos .....	26
RESULTADOS .....	26
DISCUSSÃO .....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
<b>Artigo 2</b>	
TÍTULO .....	39
RESUMO .....	40
INTRODUÇÃO .....	42
MATERIAL E MÉTODOS .....	43
Casuística .....	43
Subtração Radiográfica Digital (SRD) .....	44
Obtenção de extrato dentinário humano (EDH) e frações de EDH .....	46
Amostras de soro .....	47
Determinação de nível de IgG anti EDH por ELISA .....	47
Determinação de nível de IgE anti EDH por ELISA .....	47
Métodos estatísticos .....	48
RESULTADOS .....	48
DISCUSSÃO .....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	66
<b>APÊNDICE A (Artigo 1 – Inglês)</b> .....	70
<b>ANEXO A (Aprovação do Comitê de Ética da UEL)</b> .....	87

## INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento ortodôntico requer a obtenção de linhas faciais harmônicas, sistema mastigatório eficiente, estabilidade pós-tratamento e também a preservação das estruturas dentárias e tecidos periodontais. A reabsorção dentária é um fenômeno biológico e ocorre pela perda de cemento e/ou dentina devido a um processo de natureza inflamatória caracterizada por um dano estrutural nas raízes dos dentes permanentes, em consequência do movimento ortodôntico.<sup>1-3</sup> O tratamento ortodôntico com aparelhos fixos é reconhecido como um fator de risco para o desenvolvimento de reabsorções dentárias (RD), em especial nos incisivos superiores, com prevalência de 90 a 100% nos indivíduos tratados.<sup>2, 4, 5</sup> Apenas 3% dos indivíduos não submetidos a tratamento ortodôntico apresentam RD, geralmente limitadas ao remodelamento apical de incisivos e molares.<sup>5, 6</sup> A maioria das RDs provocadas por movimentação ortodôntica se restringem ao remodelamento do cemento apical e, por não comprometerem a função do dente, são consideradas clinicamente sem importância.<sup>7-9</sup> A RD grave e estruturalmente importante ocorre em 10% das pessoas submetidas ao tratamento ortodôntico (são efeitos colaterais quase que inevitáveis na prática ortodôntica), sendo considerada clinicamente aceitável, porém não deve ser considerada normal, fisiológica ou como parte de um processo de remodelação apical. A reabsorção radicular provocada pelo tratamento ortodôntico é também denominada Reabsorção Radicular Apical Externa (RRAE) ou Reabsorção Radicular Inflamatória Induzida Ortodonticamente.<sup>10-12</sup>

A busca incessante por qualidade e saúde nos tratamentos ortodônticos na prática clínica, a preservação do profissional com relação aos aspectos legais da questão, bem como a prevenção para evitar danos aos tecidos dentários e circundantes são fatores que remetem naturalmente ao estudo frequente da reabsorção radicular associada ao tratamento ortodôntico. A resposta imunológica visa dar proteção ao organismo e, para isso, desencadeia vários eventos biológicos para destruição do agente agressor e estranho aos nossos tecidos; esta, como uma resposta natural, não promove danos teciduais. Quando os eventos imunológicos promovem danos teciduais acabam por caracterizar quadros patológicos ou doenças e passam a ser identificados como eventos imunopatológicos. Nesse sentido e naturalmente, procura-se entender cada vez melhor a relação da reabsorção radicular com a Ortodontia, bem como com a Imunologia. Segundo King e Courts

(1989)<sup>13</sup> e Hidalgo et al. (2001)<sup>14</sup>, as reabsorções dentárias podem estar relacionadas com fenômenos que caracterizam a auto-imunidade.

O diagnóstico precoce da reabsorção radicular externa é um desafio. Exames radiográficos criteriosos devem ser utilizados com o objetivo de providenciar medidas preventivas específicas. Quanto mais cedo for detectada a reabsorção radicular inflamatória, melhor ou mais favorável será o prognóstico.<sup>15</sup> Outros autores<sup>16, 17</sup> recomendam a tomada de radiografias periapicais periódicas para detecção precoce da reabsorção. O período ideal para avaliar o grau de reabsorção dentária propiciada pelo tratamento ortodôntico está entre 6 a 9 meses após seu início.<sup>18-20</sup> Levander e Malmgren (1988)<sup>18</sup> classificaram as reabsorções dentárias provocadas por movimentação ortodôntica em:

Grau 0: sem lesão radiograficamente identificável;

Grau 1: remodelamento do cemento apical;

Grau 2 (leve): até 2mm de reabsorção apical;

Grau 3 (moderada): >2mm até 1/3 da raiz;

Grau 4 (severa): > 1/3 da raiz.

O princípio da terapêutica das reabsorções dentárias inflamatórias se baseia na eliminação da causa para cessar o acúmulo de mediadores na área. No caso da Ortodontia, seguindo este princípio de remoção da causa deve-se interromper a força. Os estudos de vários autores<sup>21-26</sup> suportam a hipótese de que reabsorção radicular associada com tratamento ortodôntico cessa com a finalização da mecânica. Em situações de exposição dentinária haverá reabsorção dentária nos primeiros momentos, pois essa exposição implica também na inflamação periférica na área. Após alguns dias, com a eliminação da inflamação, acaba-se a fonte de mediadores químicos, especialmente o exsudato inflamatório. Sem mediadores em níveis adequados, a reabsorção cessa e sobre a dentina há deposição de tecido cementóide ou osteóide, pois células mesenquimais periféricas ou pré-cementoblastos ou pré-osteoblastos colonizam superfícies mineralizadas saudáveis.

A dentina tem sua estrutura inacessível ao sistema imunológico pelo esmalte, cemento e pela camada odontoblástica. Suas proteínas não foram apresentadas ao sistema imunológico durante e após a odontogênese completa. A dentina tem proteínas exclusivas em sua estrutura que podem ser reconhecidas como estranhas quando expostas ao sistema imunológico. Durante a reabsorção dentária há

formação de anticorpos específicos contra as proteínas dentinárias.<sup>10</sup> Assim, na indução e regulação do processo da RD humana, a imunogenicidade da dentina tem mostrado participação.<sup>27</sup> As proteínas dentinárias, uma vez expostas ao sistema imunológico, poderão ser reconhecidas por anticorpos anti-dentina.<sup>28, 29</sup> A autoimunidade contra os componentes da dentina foi recentemente sugerida como um dos fatores etiológicos da RD em especial nos pacientes submetidos a tratamento ortodôntico e traumatismo dentário.<sup>10, 14, 30</sup>

Considerar exames laboratoriais para diagnóstico precoce e prevenção da ocorrência de reabsorção radicular é uma possibilidade, é de fundamental importância e dever dos ortodontistas buscar ou apresentar os meios possíveis para isso.

### **OBJETIVO GERAL**

Determinar os níveis séricos de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF $\alpha$  e de IgG e IgE aos antígenos dentinários em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico e correlacioná-los às possíveis alterações radiculares decorrentes de reabsorção dentária pelo método de Subtração Radiográfica Digital (SRD).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a)** Determinar os níveis séricos de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF $\alpha$  em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico.
  
- b)** Correlacionar os níveis de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF $\alpha$  com o grau de reabsorção observado nas radiografias periapicais.
  
- c)** Determinar os níveis séricos de IgG e IgE aos antígenos dentinários em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico.
  
- d)** Correlacionar os níveis séricos de IgG e IgE aos antígenos dentinários com o grau de reabsorção observado nas radiografias periapicais.

*ARTIGO 1*

## Artigo 1

### **Citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF $\alpha$ séricas em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico**

Carlos Eduardo de Oliveira Lima<sup>1</sup>, Elisa Tanaka Carlotto<sup>1</sup>, Fernanda Akemi Nakanishi Ito<sup>1</sup>, Evelise Ono<sup>1</sup>, Mirian Marubayashi Hidalgo<sup>2</sup>, Paula Leonello Álvares e Silva<sup>3</sup>, Eiko Nakagawa Itano<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil da Universidade Estadual de Londrina.

<sup>2</sup>Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Palavras-chave: Reabsorção radicular. Citocinas. Imunomodulação. Radiografia digital.

Keywords: Root resorption. Cytokines. Immunomodulation. Digital radiograph.

#### CORRESPONDÊNCIA PARA:

Prof. Carlos Eduardo de Oliveira Lima

Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil

Universidade Estadual de Londrina

Rua Pernambuco, 540, CEP 86020-070, Londrina, PR, Brasil

e-mail: eduardolima@uel.br

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Departamento de Ciências Patológicas, CCB

Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, CEP 86.051-990, Londrina, PR, Brasil

e-mail: itanoeiko@hotmail.com

## RESUMO

**Introdução:** São escassos os dados disponíveis na literatura sobre a resposta sistêmica de citocinas durante o tratamento ortodôntico. O objetivo deste estudo foi avaliar se o tratamento ortodôntico induz alterações sistêmicas nos níveis de citocinas e a possível correlação com a reabsorção radicular apical. **Métodos:** Os níveis de citocinas TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-12 e IL-17 foram determinados em amostras de soros de 34 pacientes, obtidas antes do tratamento ortodôntico (T0), com 6-7 meses de tratamento (T1) e 12-13 meses de tratamento (T2), utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA). Os dados foram comparados à quantidade de perda radicular observada em radiografias periapicais dos incisivos centrais superiores obtidos nas 3 fases do tratamento, analisadas pelo método de subtração radiográfica digital e reconstrução geométrica da imagem. **Resultados:** Não foram observadas alterações significativas nos níveis das citocinas avaliadas no decorrer de tratamento ortodôntico. No entanto quando divididos em dois grupos, baseado no grau de reabsorções, os resultados obtidos mostram alterações estatisticamente significativas no nível de citocinas. Uma redução no nível de IL-12 (T0-T1,  $p=0,014$ ; T1-T2,  $p=0,033$ ; T0-T2,  $p=0,034$ ) e IL-17 (T0-T1,  $p=0,01$ ; T0-T2,  $p=0,044$ ) é observada no grupo com reabsorção menor que 1,5 mm; enquanto no grupo com reabsorção maior ou igual a 1,5 mm houve um aumento no nível de IL-10 (T0-T2,  $p=0,006$ ) e diminuição de IL-12 (T0-T2,  $p=0,022$ ). **Conclusões:** O tratamento ortodôntico altera o nível sistêmico de citocinas IL-10, IL-12 e IL-17 dependendo do grau de reabsorção e do período de tratamento. Todavia como essa alteração não é consistente em todos os períodos avaliados, requer estudos adicionais.

**Palavras-chave:** Reabsorção radicular. Citocinas. Imunomodulação. Radiografia Digital.

## ABSTRACT

**Introduction:** There are few data available in the literature on systemic cytokine response during orthodontic treatment. The aim of this study was to evaluate whether orthodontic treatment induces alterations in systemic cytokine levels and possible correlation with apical root resorption. **Methods:** cytokines IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 and TNF $\alpha$  levels were measured in serum samples from 34 patients obtained before orthodontic treatment (T0) with 6-7 months treatment (T1) and 12-13 months of treatment (T2), using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data were compared to the amount of root loss observed in periapical radiographs of the maxillary central incisors obtained in 3 phases of treatment, analyzed by digital subtraction radiographic and geometric reconstruction image. **Results:** No significant changes were observed in the levels of cytokines evaluated in the course of orthodontic treatment. However when divided in two groups, presented statistically significant changes in the cytokines levels with decreased IL-12 (T0-T1,  $p=0.014$ ; T1-T2,  $p=0.033$ ; T0-T2,  $p=0.034$ ) and IL-17 (T0-T1,  $p=0.01$ ; T0-T2,  $p=0.044$ ) in group with resorption smaller than 1.5 mm; in group with root resorption  $\geq 1.5$ mm, increased the levels IL-10 (T0-T2,  $p=0.006$ ) and decreased IL-12 (T0-T2,  $p=0.022$ ). **Conclusions:** The orthodontic treatment does not alter the systemic level of cytokines IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 and TNF $\alpha$ , but depending on the degree of resorption and the treatment period occurs modulation of cytokine IL-10, IL-12 and IL-17. However as this change is not consistent in all periods evaluated, requires additional study.

**Keywords:** Root resorption. Dentine extract. Cytokines. Immunomodulation. Digital radiograph.

## INTRODUÇÃO

O tratamento ortodôntico com aparelhos fixos é reconhecido como um fator de risco para o desenvolvimento de reabsorções dentárias, com prevalência de 90 a 100% nos indivíduos tratados.<sup>1,2</sup> A reabsorção radicular é um fenômeno biológico, e se caracteriza pela perda de cemento e dentina. Em dentes permanentes humanos é um processo imunopatológico que provoca a destruição dos tecidos dentários mineralizados.<sup>1, 3, 4</sup> A reabsorção dentária grave e estruturalmente importante ocorre em 10% das pessoas submetidas ao tratamento ortodôntico, por isso, evitar ou prevenir sua ocorrência é, sem dúvida, uma medida que muito contribui para o sucesso deste tratamento.<sup>5, 6</sup> A resposta imune inata e a resposta imune específica podem ser ativadas por proteínas da matriz dentinária na reabsorção radicular devido ao tratamento ortodôntico. Após agressão tecidual, as células T migram dos vasos sanguíneos para locais de inflamação através da matriz extracelular (ECM). Esse movimento é regulado por mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e enzimas que degradam a ECM.<sup>7</sup>

Citocinas são proteínas que atuam como sinais entre células. São produzidas durante ativação de células do sistema imune e em geral atuam localmente, porém algumas citocinas atuam sistemicamente com sobreposição de funções.<sup>8, 9</sup> A movimentação ortodôntica induz alterações em níveis de citocinas como TNF $\alpha$  e IL-6 em fluido crevicular gengival ou no sulco gengival humano. O envolvimento de algumas citocinas como IL-1, IL-6<sup>10, 11</sup> e especialmente TNF $\alpha$ <sup>12-15</sup> na reabsorção radicular tem sido demonstrado em modelos animais. TNF $\alpha$  é o principal mediador da resposta inflamatória aguda e a sua principal função fisiológica é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar estas células.<sup>8</sup> Mais recentemente, Madureira et al. (2012)<sup>16</sup> investigaram a expressão cinética de citocinas e quimiocinas durante o movimento dentário ortodôntico e detectaram elevados níveis de IL-6 e quimiocinas ligantes 2 e 3 (CCL2 e CCL3, também chamadas de proteína quimiotática de monócitos-1 e proteína inflamatória de macrófagos 1-alfa, respectivamente) em força induzida no ligamento periodontal em tempos distintos após carga mecânica.

Na resposta imune adaptativa os linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens diferenciam em diferentes populações de T helper (Th), chamadas de Th1, Th2 e Th7. As principais citocinas produzidas por estas células são IFN- $\gamma$  por células Th1; IL-4, IL-5 e IL-13

por células Th2 e IL-17 por células Th17. Essas populações apresentam diferentes funções na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos e estão envolvidas em diferentes tipos de lesões de tecidos em doenças autoimunes.<sup>8</sup> A diferenciação em Th1 é impulsionada pelas citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  e ocorre em resposta a microrganismos que ativam as células dendríticas, macrófagos e células NK e a diferenciação em Th2 é estimulada pela citocina IL-4 e ocorre em resposta a helmintos e alérgenos. O desenvolvimento de células Th17 é estimulado por citocinas pró-inflamatórias produzidas em resposta às bactérias e fungos,<sup>8</sup> sendo população celular dominante nas respostas inflamatórias autoimunes.<sup>17</sup> Essas respostas imunes são reguladas pelos linfócitos T regulatórios (Treg) que podem ser derivados do timo ou periféricamente induzidas. As células Treg podem atuar de forma colaborativa na prevenção de respostas auto-imunes via produção e ação da IL-10<sup>17</sup>. A IL-12 é mediadora da inflamação local ou sistêmica, produzida por macrófagos, células dendríticas e mastócitos sendo um dos principais indutores de resposta Th1.<sup>8</sup>

Considerando que não há dados disponíveis na literatura sobre a resposta sistêmica de citocinas de padrão Th1, Th2, Treg e Th17 durante o tratamento ortodôntico, o presente trabalho determinou os níveis séricos das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF $\alpha$  no decorrer do tratamento ortodôntico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Casuística**

A amostra de 34 indivíduos, 14 do gênero masculino e 20 do feminino, com má oclusão de Classe I ou Classe II de Angle, foi submetida a tratamento ortodôntico corretivo com aparelhos fixos (“slots” 0.022” X 0.028”) e técnica ortodôntica “Edgewise”; os arcos utilizados e a sequência destes de acordo com a necessidade ou fase do tratamento foram padronizados, assim como as dobras com suas respectivas intensidades e magnitudes de força dos elásticos. As prioridades quando adotadas foram em função de uma movimentação dentária induzida realizada de acordo com a filosofia mecânica padrão. Os indivíduos eram crianças entre 11 e 16 anos completos que não apresentaram história prévia de traumatismo dentário, doença sistêmica auto-imune, sinais radiográficos de doença periodontal

ou lesões periapicais (sem sinais radiográficos de reabsorção dental). No momento da anamnese, diagnóstico e planejamento ortodôntico, os pacientes apresentaram-se saudáveis, sem sinais ou sintomas que pudessem interferir na normalidade do complexo bucomaxilofacial. Também não utilizavam medicamentos rotineiros que pudessem interferir nos resultados de remodelação óssea, nunca foram submetidos a qualquer tratamento ortodôntico e/ou ortopédico dos maxilares, portadores de dentadura permanente e com boas condições de higiene bucal.

Radiografias periapicais dos incisivos centrais superiores direito e esquerdo (ICSDE) e coleta de sangue foram obtidas antes do tratamento ortodôntico (T0), aos 6-7 meses do tratamento (T1) e aos 12-13 meses do tratamento (T2).

Considerando a maior possibilidade de erros do método no caso de avaliação visual das radiografias periapicais para detecção e classificação das reabsorções radiculares e a eficiência comprovada pela literatura, optou-se pelo Método de Subtração Radiográfica Digital (SRD)<sup>18, 19</sup> para comprovação da reabsorção, bem como na apuração das possíveis alterações estruturais na raiz dos dentes avaliados nas respectivas fases. As variações no comprimento radicular (reabsorção radicular apical externa), induzidas por movimentação ortodôntica foram avaliadas comparando os períodos pré-tratamento (T0), 6 a 7 meses de tratamento (T1) e 12 a 13 meses de tratamento (T2).

As alterações radiculares por reabsorção e os níveis de citocinas foram analisados nas 3 fases; avaliou-se as variáveis em relação às 3 fases e com a extensão de reabsorção radicular dividida em 2 grupos, Grupo 1 (reabsorção <1,5mm) e Grupo 2 (reabsorção radicular  $\geq$ 1,5mm) e finalmente a possível correlação entre a reabsorção radicular e as citocinas.

O Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina aprovou este estudo (CAAE nº 0015.0.268.00-09).

### **Amostras de sangue**

Foram coletados 10 ml de sangue venoso em cada uma das 3 fases de avaliação. Após a coleta, o material foi submetido à centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos para separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

### **Determinação dos níveis de citocinas em amostras de soro**

Os níveis de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF $\alpha$  foram determinados por ELISA utilizando Sistema comercial (Biosource INVITROGEN) e os níveis das citocinas expressos em D.O. a 492 nm.

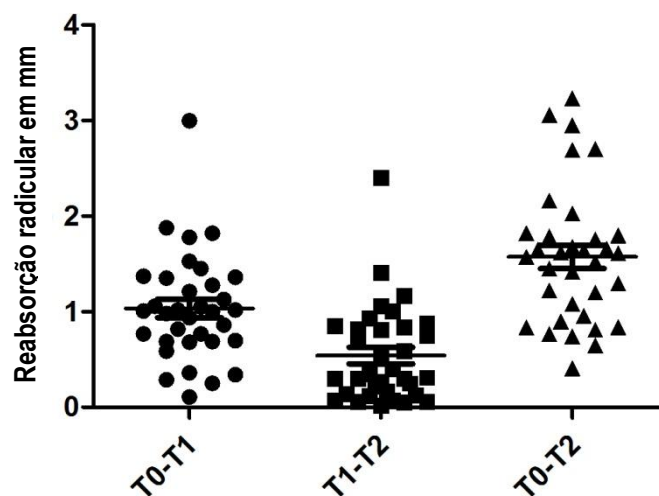
### **Métodos estatísticos**

A análise estatística foi feita por Análise de Variância e teste t-Student (pareado e independente), o teste de Tukey e a Correlação de Pearson. Adotou-se o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

A fim de avaliar o erro do método (SRD), as medidas de cada leitura obtida nos dois tempos foram submetidas à análise de regressão. Por esta análise obtém-se um modelo linear de regressão do tipo  $Y = aX + b$ , onde X e Y representam as medidas realizadas nos dois tempos respectivamente, e “a” e “b” são coeficientes dessa regressão. Para se verificar a ausência de erros aleatórios e sistemáticos, o coeficiente “a” deve ser igual a 1, e o coeficiente “b” deve ser igual a 0, assim,  $Y = X$ . A verificação dessa condição é feita através do teste *t de student*. Uma vez que a diferença entre essas medidas não seja significativa, as médias dos valores das duas medidas podem ser utilizadas para a análise estatística.

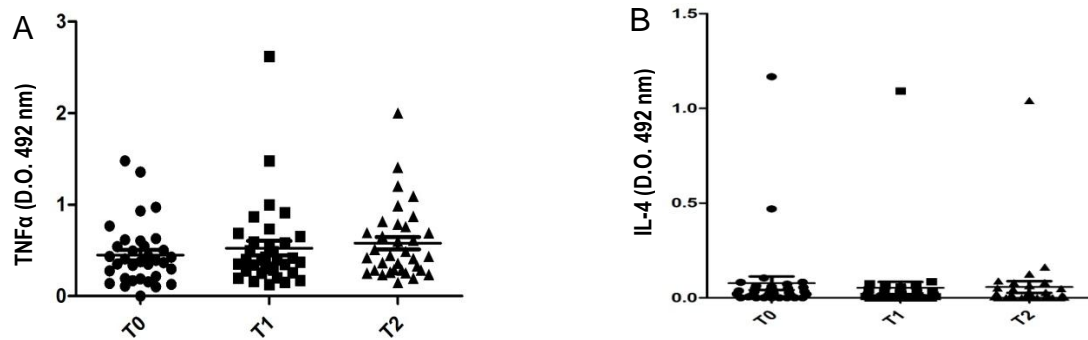
## **RESULTADOS**

A análise dos dados relacionados à reabsorção radicular apical da amostra estudada, nas três fases (T0, T1 e T2), mostrou resultados que nos permitem afirmar a ocorrência de reabsorção apical nos incisivos centrais superiores direito e esquerdo (ICSDE). De acordo com os resultados do teste ANOVA, verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,002$ ) entre as medidas (em mm) dos dentes nas fases: inicial (T0) (média = 16,725) e final (T2) (média = 15,151). O comprimento radicular dos incisivos centrais superiores tinha em média 16,725 mm na fase T0, 15,691mm em média na fase T1 e 15,151mm na fase T2. Ou seja, de T0 para T1, houve uma perda estrutural por reabsorção radicular de 6,19% em média, da fase T1 para a fase T2 de 3,45% e da fase T0 para a fase T2 de 9,42% em média. (Figura 1)

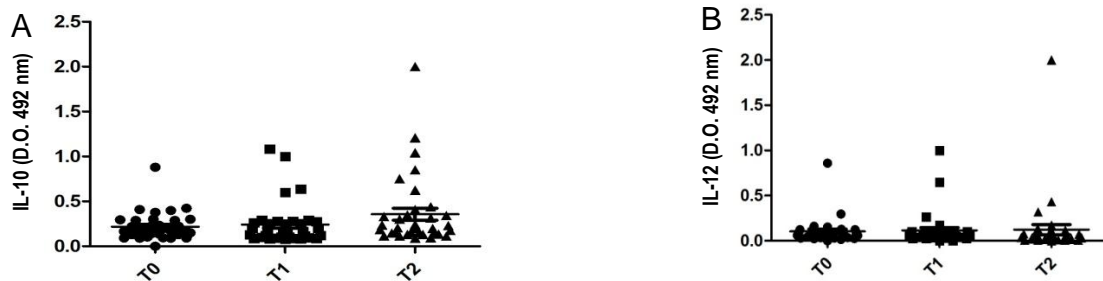


**Figura 1.** Reabsorção apical em mm nos períodos pré-tratamento a ~ 6 meses de tratamento (T0-T1), de 6-7 meses a 12-13 meses de tratamento (T1-T2) e de pré-tratamento a 12-13 meses de tratamento ortodôntico (T0-T2). T0-T1 x T1-T2 e T0-T2  $p=0,0001$ .

Os resultados de níveis séricos de IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF $\alpha$  obtidos foram similares em período anterior ao tratamento (T0) e após 6-7 (T1) ou 12-13 (T2) meses de tratamento ortodôntico ( $p>0,05$ ) (Figuras 2-4). Mas, diferenças significativas foram observadas em níveis de citocinas IL-10, IL-12 e IL-17 após a subdivisão de pacientes em subgrupos com reabsorção  $<1,5\text{mm}$  e  $\geq 1,5\text{mm}$ . No subgrupo com reabsorção  $<1,5\text{mm}$  foi detectada diminuição no nível de IL-12 ( $p=0,014$ ) e de IL-17 ( $p=0,01$ ) entre o período T0 para T1 e de IL-12 ( $p=0,034$ ) e de IL-17 ( $p=0,044$ ) entre o período de T0 para T2 ou no nível de IL-12 no período de T1 para T2 ( $p=0,033$ ). Os resultados da análise de subgrupos apresentando reabsorção  $\geq 1,5\text{mm}$  demonstraram também aumento significativo de IL-10 ( $p=0,006$ ) e diminuição de IL-12 ( $p=0,022$ ) entre o período T0 para T2 (Tabela 1).

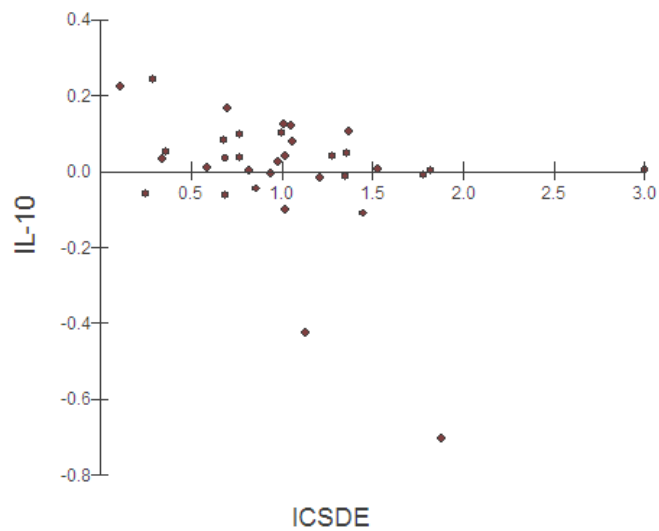


**Figura 2.** Nível de citocina TNF $\alpha$  (A) e citocina IL-4 (B) em amostras de soros de pacientes no período pré-tratamento (T0), 6-7 meses (T1) e 12-13 meses (T2) de tratamento ortodôntico. T0 x T1 x T2.  $p > 0,05$ .

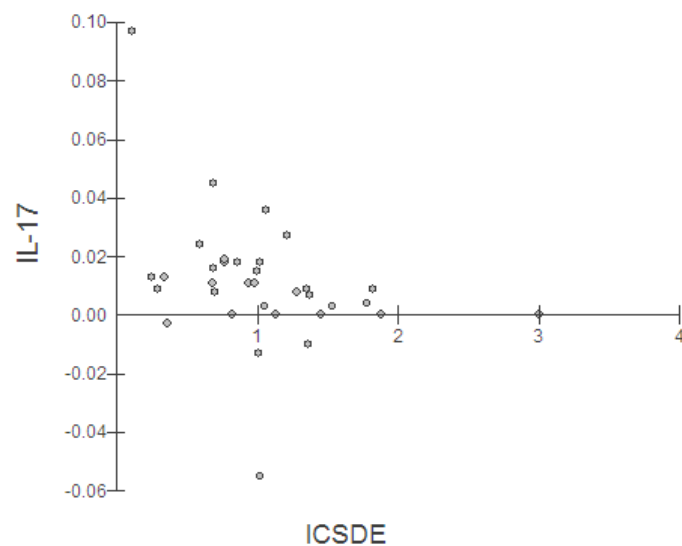


**Figura 3.** Nível de citocina IL-10 (A) e citocina IL-12 (B) em amostras de soros de pacientes no período pré-tratamento (T0), 6-7 meses (T1) e 12-13 meses (T2) de tratamento ortodôntico. T0 x T1 x T2.  $p > 0,05$ .





**Figura 5.** Correlação Linear de Pearson entre IL-10 e a reabsorção radicular de pacientes em tratamento ortodôntico avaliados entre as fases T0 (pré-tratamento) e T1 (6-7 meses de tratamento ortodôntico). Resultado de ELISA expresso em D.O. a 492 nm.  $p=0,0353$ .  $r^2=0,131$ .



**Figura 6.** Correlação Linear de Pearson entre IL-17 e a reabsorção radicular de pacientes em tratamento ortodôntico avaliados entre as fases T0 (pré-tratamento) e T1 (6-7 meses de tratamento ortodôntico). Resultado de ELISA expresso em D.O. a 492 nm.  $p=0,0416$ .  $r^2=0,123$ .

**Tabela 1.** Comparação das citocinas IL-10, IL-12 e IL-17, em cada fase avaliada e de acordo com cada grupo dependendo da extensão da reabsorção radicular.

Citocina	Período	Fase	Reabsorção	N	Média	Desvio-padrão	p-valor
IL-10	T0-T1	T0	< 1,5	29	0,235	0,155	ns
		T1			0,206	0,136	
		T0	≥ 1,5	5	0,162	0,124	ns
		T1			0,300	0,438	
	T1-T2	T1	< 1,5	33	0,207	0,189	ns
		T2			0,282	0,227	
		T1	≥ 1,5	1	0,638	.	**
		T2			1,207	.	
T0-T2	T0	< 1,5	15	0,221	0,085	ns	
	T2			0,229	0,146		
	T0	≥ 1,5	19	0,226	0,191	<b>0,006</b>	
	T2			0,373	0,334		
IL-12	T0-T1	T0	< 1,5	29	0,118	0,153	<b>0,014</b>
		T1			0,096	0,118	
		T0	≥ 1,5	5	0,056	0,053	ns
		T1			0,047	0,042	
	T1-T2	T1	< 1,5	33	0,088	0,113	<b>0,033</b>
		T2			0,071	0,089	
		T1	≥ 1,5	1	0,100	.	**
		T2			0,007	.	
T0-T2	T0	< 1,5	15	0,135	0,203	<b>0,034</b>	
	T2			0,071	0,104		
	T0	≥ 1,5	19	0,088	0,069	<b>0,022</b>	
	T2			0,067	0,077		
IL-17	T0-T1	T0	< 1,5	29	0,058	0,087	<b>0,01</b>
		T1			0,046	0,073	
		T0	≥ 1,5	5	0,017	0,023	ns
		T1			0,014	0,022	
	T1-T2	T1	< 1,5	33	0,042	0,069	ns
		T2			0,037	0,055	
		T1	≥ 1,5	1	0,010	.	**
		T2			0,000	.	
T0-T2	T0	< 1,5	15	0,063	0,102	<b>0,044</b>	
	T2			0,032	0,056		
	T0	≥ 1,5	19	0,043	0,064	ns	
	T2			0,039	0,055		

\*\* Dados insuficientes para análise  
ns: não significativo

## DISCUSSÃO

Citocinas são importantes proteínas reguladoras e o balanço no nível sistêmico de alguns grupos de citocinas é considerado importante para pessoas saudáveis. Este trabalho investigou se o tratamento ortodôntico induz modulação sistêmica de citocinas. Os níveis séricos de TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-12 e IL-17 foram similares quando observados antes do tratamento (T0) e após 6-7 (T1) ou 12-13 (T2) meses de tratamento ortodôntico, sugerindo que tratamento ortodôntico convencional não está associado com uma resposta imune sistêmica na modulação de citocinas, em concordância com MacLaine et al. (2010)<sup>20</sup>, que não encontraram alteração no nível das citocinas TNF $\alpha$  e IL-6. Por outro lado, o aumento do nível de TNF $\alpha$ , IL-1 ou IL-6 em locais teciduais ou fluido crevicular gengival tem sido observado durante o tratamento ortodôntico, em humanos ou experimentos animais<sup>10-13</sup> sugerindo a modulação de citocina em locais de inflamação. Possivelmente a detecção de um aumento no nível de citocinas pró-inflamatórias por estes autores se deve ao tempo de análise.

Madureira et al. (2012)<sup>16</sup> detectaram aumento nos níveis de IL-6 em ligamento periodontal após 3 e 15 horas, 3, 12 e 21 dias de aplicação de força ortodôntica intrusiva. Em nosso estudo, os níveis de citocinas foram avaliados após 6 e 12 meses, portanto um tempo muito mais longo do que nos estudos anteriores.

Embora a análise global não tenha mostrado alterações significativas nos níveis séricos de citocinas, quando a análise estatística foi feita levando-se em conta o grau de reabsorção radicular, observou-se alteração nos níveis de citocinas, dependendo do período do tratamento ortodôntico.

Os resultados obtidos mostram uma diminuição do nível sérico de IL-12 em todas as fases avaliadas no sub-grupo com reabsorção radicular menor que 1,5mm (<1,5 mm); de T0 para T1 ( $p=0,014$ ), de T1 para T2 ( $p= 0,033$ ) e de T0 para T2 ( $p= 0,034$ ). Esta citocina é conhecida por induzir uma resposta imune celular Th1, e por modular negativamente a resposta Th2, considerando modulação oposta<sup>8</sup>. No entanto, não houve nenhuma alteração significativa no nível de IL-4, a citocina associada à resposta Th2, em estágios e nem em qualquer sub-grupo. Como esta citocina é produzida em pequena quantidade e normalmente indetectável no soro, seria interessante<sup>8</sup> fazer a sua avaliação usando métodos mais sensíveis do que ELISA. Também sem alteração significativa, a TNF $\alpha$ , apesar de ser facilmente

detectável no soro, tem sua função voltada para mediação da resposta inflamatória aguda a bactérias gran-negativas e microorganismos infecciosos e é responsável por complicações sistêmicas e infecções graves.

Este estudo também encontrou uma redução significativa no nível da IL-17 no sub-grupo com reabsorção radicular  $<1,5$  mm, mas nenhuma mudança foi detectada no grupo com reabsorção  $\geq 1,5$  mm. Como a IL-17 é produzida por Th17, que é a população celular dominante na resposta inflamatória autoimune<sup>17</sup>, a redução desta citocina pode ser mais benéfica em casos de autoimunidade.

Durante o desenvolvimento do sistema imune, ocorre geração de um grande e diversificado repertório de linfócitos, permitindo que o sistema imune reconheça e responda aos auto-antígenos.<sup>21</sup> A presença de anticorpos contra dentina em casos de reabsorção radicular, sugere uma reação autoimune neste processo.<sup>15, 22</sup> A redução da citocina IL-17 no grupo com menor grau de reabsorção ( $<1,5$  mm) esta de acordo com a hipótese da autoimunidade, onde níveis mais baixos de IL-17 associado com um menor grau de reabsorção pode ser um resultado de modulação negativa desta citocina inflamatória.

Neste estudo, verificou-se também um aumento no nível sérico de IL-10 no subgrupo com reabsorção  $\geq 1,5$  mm no período de T0 para T2 ( $p= 0,006$ ). A citocina IL-10 tem uma importante ação supressora, que é essencial para limitar as respostas imunes aos numerosos patógenos e controlar os efeitos imunopatológicos e doenças autoimunes.<sup>23</sup> Considerando seu papel imunossupressor, a expectativa era que o seu nível fosse maior no grupo com menor grau de reabsorção, como resultado do controle imunossupressor, ou resposta inflamatória por esta citocina ou ainda pela produção de linfócitos primários, as células Treg.<sup>21</sup> Mas por uma maior reabsorção ou maior autoimunidade, foi induzida a produção de IL-10, apenas para controlar a prevenção de danos adicionais. A IL-10, que está envolvida no controle da reação imune natural, também inibe a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas ativadas, além de inibir IFN $\gamma$ . Neste contexto, parece-nos perfeitamente razoável considerar imunodepressão da IL-12 pela ação da IL-10 que, por sua vez, se mostrou ativa na reabsorção radicular como resposta Th2.

As alterações sistêmicas também podem ocorrer indiretamente pelo stress, porque dependendo da força aplicada no movimento dentário, pode induzir a dor e ao stress.<sup>24</sup> A comunicação entre o sistema nervoso central e o sistema imune é

bidirecional e o stress psicológico pode ter significativo impacto sobre o funcionamento do sistema imunológico, tal como uma mudança a partir de um perfil de citocinas Th1 para Th2, com um aumento em IL-10 sintetizando células T.<sup>25, 26</sup> Assim, se as mudanças no nível de citocinas observados durante o tratamento ortodôntico vem da influência do processo inflamatório local, o efeito indireto do stress e outros fatores, podem precisar de estudos adicionais.

Informações e condutas para prevenir ou amenizar os danos causados pela reabsorção radicular apical inflamatória são fundamentais para o sucesso do tratamento ortodôntico. Neste contexto, existem muitas investigações envolvendo o sistema imune e reabsorção radicular<sup>7, 12, 13, 15, 20, 22, 27</sup>, no entanto os mecanismos e fatores envolvidos no processo de reabsorção não são totalmente elucidados.

Este trabalho é pioneiro no estudo de citocinas Th1, Th2 e Th17 no tratamento ortodôntico; concluiu que tratamento ortodôntico não tem impacto sobre o nível de citocinas sistêmicas. No entanto, ocorre modulação de citocinas IL-10, IL-12 e IL-17 de acordo com o grau de reabsorção radicular e o período de tratamento, requerendo estudos adicionais pois estas mudanças não são consistentes em todos os períodos avaliados.

*Agradecemos à Mari Sumigawa Kaminami e ao Nilson de Jesus Carlos, do Departamento de Ciências Patológicas, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina pelo apoio técnico. Também ao Prof. Esp. Lucídio de Jesus Júnior pela realização da estatística deste trabalho.*

## REFERÊNCIAS

- 1- PIZZO, G. et al. Root resorption and orthodontic treatment. **Minerva Stomatol** v.56, n.1-2, p.31-44, 2007.
- 2- HARRIS, E. F.; BAKER, W. C. Loss of root length and cristal bone height before and during treatment in adolescent and adult orthodontic patients. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.98, n.5, p.463-69, November, 1990.
- 3- RAMANATHAN, C; HOFMAN, Z. Root resorption during orthodontic tooth movements. **Eur J Orthod**, Oxford, v.31, p.578-83, 2009.

- 4- FUSS, Z.; TSESIS, I.; LIN, S. Root resorption – diagnosis, classification and treatment choisis based on stimulation factors. **Dent Traumatol** v.19, p.175-82. 2003.
- 5- SEGAL, G.R.; SCHIFFMAN, P.H.; TUNCAY, O.C. Meta analysis of the treatment-related factors of external apical root resorption. **Orthod Craniofac Res**, v.7, n.2, p.71-78, 2004.
- 6- KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.129, n.4, p.469.e1-469.e32, Apr. 2006.
- 7- SILVA, T.A. et al. Cytokine and chemokine response of bone cells after dentin challenge in vitro. **Oral Dis**, v.10, p.258-64, 2004.
- 8-ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILAI, S. **Cellular and molecular immunology**, 7<sup>a</sup> ed., Saunders, 2012.
- 9-BORISH, L.C.; STEINKE, J.W. Cytokines and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v.111, n.2, p. S460-S475, Feb. 2003.
- 10- LOWMEY, J.J. et al. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor a in the human gingival sulcus. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.108, p.519-24, 1995.
- 11- ALHASHIMI, N. et al. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), measure the messenger RNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF-  $\alpha$  at 3, 7, and 10 days after the application of orthodontic force on the maxillary first molars of 12 rats. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.119, p.307-12, 2001.
- 12-BASARAN, G. et al. Interleukins- 1B and Tumor Necrosis Factor-alfa Levels in the human sulcus during orthodontic treatment. **Angle Orthod**, Appleton, v.76, n.5, p.830-36, 2006.

- 13- REN, Y. et al. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. **J Periodontol**, vol.78, n.3, p. 453-8, Mar., 2007.
- 14- YAO, Z. et al. Tumor necrosis factor-alpha increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. **J Biol Chem**, v.281, n.17, p.11846-55, Apr. 2006.
- 15- HIDALGO, M.M.; ITANO, E.N.; CONSOLARO, A. Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. **Dent Traumatol**, v.21, n.4, p.218-21, Aug. 2005.
- 16- MADUREIRA , D.F. et al. Kinetics of interleukin-6 and chemokine ligands 2 and 3 expression of periodontal tissues during orthodontic tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.142, n.4, p.494-500, October, 2012.
- 17- SHETTY, S.K.; MAHESH KUMAR, Y.; SMITHA, P.L. Cytokines and Orthodontic tooth movement. **J Dent Sci Res** 2:1: Pages 132-41, 2011.
- 18- GRONDAHL H.G.; GRONDAHL K.; WEBBER R.L.; A digital subtraction technique for dental radiography. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v.55, n.1, p.96-102, Jan. 1983.
- 19- ONO, E. et al. Evaluation of simulated external root resorptions with digital radiography and digital subtraction radiography. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.139, n.3, p.324-33, Mar. 2011.
- 20- MACLINE, J.K; RABIE, A.B.M.; WONG, R. Does orthodontic tooth movement cause an elevation in systemic inflammatory markers? **Eur J Orthod**, Oxford, v.32, p.435-40, 2010.
- 21- SCHWARTZ, R.S. Diversity of the Immune Repertoire and Immunoregulation. **N Engl J Med**, vol.348, p.1017-26, 2003.

- 22- RAMOS, S.P. et al. Anti-dentine antibodies with root resorption during orthodontic treatment. **Eur J Orthod**, Oxford, v.33, p.584-91, 2011.
- 23- O’GARRA, A. et al. IL-10–producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. **J Clin Invest**, 114(10): 1372-78, 2004
- 24- YOZGATIAN, J.H. et al. Emotional Stress- and Pain-Related Behaviors Evoked by Experimental Tooth Movement. **Angle Orthod**, vol. 78, n.3, p.487-94, May, 2008.
- 25- GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J.K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nat Rev Immunol**, vol. 5, p.243-51, 2005.
- 26- GODBOUT, J.P.; GLASER, R. Stress-Induced Immune Dysregulation: Implications for Wound Healing, Infectious Disease and Cancer. **J Neuroimmune Pharmacol**, vol.1, p.421-27, 2006.
- 27- KING, G.; COURTS, F. **Humoral immune response to active root resorption.** In: NORTON, L.A.; BURSTONE, C.J. The biology of tooth movement. Boca Raton, CRC, p.276-85, 1989.

*ARTIGO 2*

## Artigo 2

### **Imunomodulação negativa de anticorpos aos antígenos dentinários no decorrer do tratamento ortodôntico**

Carlos Eduardo de Oliveira Lima<sup>1</sup>, Luciene Airy Nagashima<sup>2</sup>, Fernanda Akemi Nakanishi Ito<sup>1</sup>, Elisa Tanaka Carlotto<sup>1</sup>, Evelise Ono<sup>1</sup>, Tânia Maris Pedrini Soares da Costa<sup>2</sup>, Eiko Nakagawa Itano<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Docente do Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil, Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Londrina.

<sup>2</sup>Bolsista CAPES, Departamento de Ciências Patológicas, da Universidade Estadual de Londrina.

<sup>3</sup>Docente do Departamento de Ciências Patológicas, da Universidade Estadual de Londrina.

Palavras-chaves: Reabsorção radicular. Dentina. Imunoglobulina. IgG. IgE.

Keywords: Root resorption. Dentin. Immunoglobulin. IgG. IgE.

#### CORRESPONDÊNCIA PARA:

Prof. Carlos Eduardo de Oliveira Lima

Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil

Universidade Estadual de Londrina

Rua Pernambuco, 540, CEP 86020-070, Londrina, PR, Brasil

e-mail: eduardolima@uel.br

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Departamento de Ciências Patológicas, CCB

Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, CEP 86.051-990, Londrina, PR, Brasil

e-mail: itanoeiko@hotmail.com

## RESUMO

**Introdução:** A reabsorção radicular ocorre com frequência em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico, sendo relatado uma possível incidência maior em pacientes alérgicos. Existem poucas pesquisas sobre anticorpos anti-dentina circulantes em pacientes ou animais submetidos ao tratamento ortodôntico e ainda não há consenso se ocorre uma modulação positiva ou negativa sobre a produção de anticorpos anti-dentina e se o mesmo apresenta correlação com a reabsorção dentária. Este estudo teve como objetivo avaliar níveis séricos de IgG e IgE ao extrato dentinário humano (EDH) e os níveis séricos de IgG às frações de EDH em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico. **Métodos:** Foram analisadas 34 amostras de soros de pacientes, antes do tratamento ortodôntico (T0), aos 6-7 meses de tratamento (T1) e aos 12-13 meses de tratamento (T2), por ensaio imunoenzimático. Foram obtidas e analisadas radiografias periapicais de incisivos centrais superiores utilizando o método de subtração radiográfica digital e reconstrução geométrica da imagem e reabsorção, se presente, determinada em mm; a amostra foi dividida em dois grupos de acordo com a extensão da raiz reabsorção, um grupo com a reabsorção inferior a 1,5 mm e um outro com reabsorção igual ou maior do que 1,5 mm. O EDH foi obtido a partir de pó de dentina seguida de desmineralização, centrifugação e o sobrenadante submetido à diálise e cromatografia para desalinização (Sephadex G-15). As frações de EDH foram obtidas por cromatografia por gel filtração em Sephadex G-150. **Resultados:** Não foi observada diferença significativa nos níveis de IgG e de IgE a EDH no decorrer do tratamento ortodôntico, não apresentando também correlação com a extensão da reabsorção dentária. Houve diminuição significativa nos níveis de IgG às duas principais frações de EDH ( $p < 0,05$ ), porém sem correlação com o grau de reabsorção dentária. **Conclusões:** Os níveis de anticorpos IgG e IgE anti-extrato dentinário permanecem inalterados no decorrer de tratamento ortodôntico, todavia ocorre modulação negativa de anticorpos IgG às frações dentinárias de massas moleculares distintas independentemente do grau de reabsorção.

**Palavras-chaves:** Reabsorção radicular. Dentina. Imunoglobulina. IgG. IgE.

## ABSTRACT

**Introduction:** The root resorption occurs frequently in patients undergoing orthodontic treatment, and a possible higher incidence in patients allergic was reported. There are few researches on anti-dentin antibodies circulating in animals or patients undergoing orthodontic treatment and there is still no consensus on whether there is a positive or negative modulation on production of anti-dentin antibodies and whether it correlates with dentine resorption. This study aimed to evaluate serum levels of IgG and IgE to dentine extract human and serum levels of IgG fractions of the dentine extract in patients undergoing orthodontic treatment. **Methods:** We analyzed serum samples from 34 patients before orthodontic treatment (T0), at 6-7 months of treatment (T1) and at 12-13 months of treatment (T2), by enzyme immunoassay. Were obtained and analyzed periapical radiographs of the maxillary central incisors using radiographic digital subtraction method and geometric reconstruction image and resorption, if present, in mm determined, the sample was divided into 2 groups according to the extent of root resorption, a group with resorption less than 1.5 mm and another with resorption equal to or greater than 1.5 mm. The dentine extract was obtained from powdered dentin demineralization followed by centrifugation, and the supernatant subjected to dialysis and chromatography for desalting (Sephadex G-15). The fractions of dentine extract was obtained by chromatography gel filtration on Sephadex G-150. **Results:** No significant difference was observed in the levels of IgG and IgE dentine extract during orthodontic treatment, also showing no correlation with the extent of root resorption. There was a significant decrease in the levels of IgG fractions of the two main ( $p < 0.05$ ), but no correlation with the degree of resorption. **Conclusions:** The levels of IgG and IgE antibodies anti-dentinal extract remain unchanged during the course of orthodontic treatment, however occurs negative modulation of IgG antibodies to the fractions of distinct molecular dentin weights fractions the dentin of various molecular weights regardless of the degree of resorption.

**Keywords:** Root resorption. Dentine. Immunoglobulin. IgG. IgE.

## INTRODUÇÃO

A reabsorção dentária (RD) é um fenômeno patológico que se caracteriza por perdas estruturais na raiz dos dentes e está frequentemente associada à movimentação dentária ortodôntica com prevalência de 90 a 100% nos incisivos superiores de indivíduos tratados.<sup>1-3</sup> As reabsorções radiculares são efeitos colaterais clinicamente aceitáveis na prática ortodôntica, porém considera-se importante a busca de condutas que possam minimizar sua extensão.<sup>2, 4, 5</sup>

A recomendação de radiografias periapicais como documentação pré-tratamento e para controle do desenvolvimento do tratamento é uma indicação quase que unânime,<sup>6-13</sup> em especial entre os 6 e 9 meses iniciais.<sup>14</sup> No entanto, o acompanhamento radiográfico seqüencial e a análise quantitativa de pequenas alterações de estruturas mineralizadas apresentam limitações tais como erros de magnificação, variações angulares entre o dente e o filme e distorção da imagem, processamentos diferentes, e variações de densidade e contraste. Com objetivo de suprimir essas dificuldades, a técnica de subtração radiográfica digital (SRD) tem sido utilizada na detecção de alterações sutis dos tecidos duros, que ainda não são visíveis em radiografias convencionais, e que possam ser mensuradas por um ou vários observadores com pequeno grau de variação. Para muitos autores,<sup>16-20</sup> a SRD é um meio preciso, extremamente eficiente e significativamente superior à radiografia convencional para a detecção de reabsorção radicular, ajudando a estabelecer procedimentos preventivos e eficazes na terapia da movimentação dentária ortodôntica.

O uso da SRD, com recursos de correções de contraste, densidade e projeção geométrica foi pesquisado por Heo et al. (2001)<sup>19</sup> e Ono et al. (2011)<sup>21</sup> que confirmaram a superioridade na interpretação radiográfica obtida em relação a procedimentos convencionais.

As reabsorções dentárias podem estar relacionadas com fenômenos que caracterizam a auto-imunidade.<sup>22-26</sup> A dentina tem sua estrutura inacessível ao sistema imunológico pelo esmalte, cemento e pela camada odontoblástica. Como as suas proteínas não foram apresentadas ao sistema imunológico durante e após a odontogênese completa, podem se comportar como antígeno sequestrado.<sup>24</sup> Neste contexto tem sido detectada a presença de anticorpos específicos ao extrato dentinário no soro de pacientes com reabsorções dentárias após traumatismo<sup>24</sup> e

também após tratamento ortodôntico, sendo mais evidente em indivíduos com maior grau de reabsorção.<sup>25</sup>

Por outro lado tem sido detectada depressão no título de autoanticorpos durante reabsorção dentária ativa em modelos experimentais em cães<sup>22</sup> e em camundongos<sup>27</sup>. Com a hipótese de que títulos elevados de anticorpos anti-dentina seriam positivamente correlacionados com reabsorção radicular, Wheeler e Stroup (1993)<sup>28</sup> examinaram a resposta a reabsorção radicular traumática em ratos após a sua hiperimunização com extrato bruto de dente e concluíram que esta a protege.

Assim, considerando poucas pesquisas sobre anticorpos anti-dentina circulantes em humanos submetidos a tratamento ortodôntico e considerando os dados contraditórios de imunomodulação em animais o presente trabalho investigou níveis séricos de IgG ao extrato dentinário humano (EDH) e às duas principais frações cromatográficas. Ainda, considerando que a maior incidência de reabsorção dentária tem sido observado em pacientes asmáticos e alérgicos<sup>29, 30</sup>, patologias que envolvem aumento no nível de IgE<sup>31</sup>, adicionalmente foi avaliado nível de IgE anti-EDH no decorrer de tratamento ortodôntico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Casuística**

O grupo avaliado de 34 indivíduos, 14 do gênero masculino e 20 do feminino, com má oclusão de Classe I ou Classe II de Angle, foi submetido a tratamento ortodôntico corretivo com aparelhos fixos (“slots” 0.022” X 0.028”) e técnica ortodôntica “Edgewise”; sendo os arcos utilizados e sua sequência padronizados de acordo com a necessidade ou fase do tratamento, assim como as dobras com suas respectivas intensidades e magnitudes de força dos elásticos. As prioridades, quando adotadas, foram em função de uma movimentação dentária induzida realizada de acordo com a filosofia mecânica padrão. A faixa etária compreendeu indivíduos entre 11 e 16 anos completos, que não apresentaram história prévia de traumatismo dentário, doença sistêmica auto-imune, sinais radiográficos de doença periodontal ou lesões periapicais (sem sinais radiográficos de reabsorção dentária). No momento da anamnese, diagnóstico e planejamento ortodôntico, os pacientes apresentaram-se saudáveis, sem sinais ou sintomas que pudessem interferir na

normalidade do complexo bucomaxilofacial. Também não utilizavam medicamentos rotineiros que pudessem interferir nos resultados de remodelação óssea, nunca foram submetidos a qualquer tratamento ortodôntico e/ou ortopédico dos maxilares e eram portadores de dentadura permanente com boas condições de preservação e higiene bucal.

Todos os procedimentos e coleta de amostras de sangue foram realizados após consentimento livre e esclarecido do paciente e dos responsáveis, bem como aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE nº 0015.0.268.000-09).

A coleta de sangue, bem como a obtenção das radiografias periapicais dos incisivos centrais superiores foram realizadas em 3 fases: previamente ao tratamento ortodôntico (T0), 6 a 7 meses após o início da movimentação ortodôntica (T1) e entre 12 e 13 meses após o início do tratamento (T2).

As variações no comprimento radicular (reabsorção radicular apical externa induzida por movimentação ortodôntica) foram avaliadas comparando-se os períodos pré-tratamento (T0), 6 a 7 meses de tratamento (T1) e 12 a 13 meses de tratamento (T2).

### **Subtração Radiográfica Digital (SRD)**

Radiografias periapicais pela técnica do paralelismo dos incisivos centrais superiores foram obtidas de cada indivíduo nas seguintes fases do tratamento ortodôntico:

- Fase 1 (T1): pré-tratamento (antes do início do tratamento ortodôntico);
- Fase 2 (T2): 6 e 7 meses após o início do tratamento ortodôntico;
- Fase 3 (T3): 12 e 13 meses após o início do tratamento ortodôntico.

Para as radiografias periapicais foram utilizados filmes radiográficos (*Kodak Ektaspeed - Eastman Kodak Co. – Rochester – N.Y.*) e aparelho de raios X Spectro (*Dabi Atlante – Ribeirão Preto – SP – Brasil*), operando a 70kV e 10 mA e tempo de exposição de 0.7 segundos. A revelação foi realizada em solução reveladora (*Kodak - Eastman Kodak Co.- Rochester – N.Y.*), seguindo as instruções do fabricante no critério temperatura / tempo.

As radiografias foram digitalizadas por meio do scanner *HP Scanjet G4050* (*Hewlett-Packard – Palo Alto – C.A*) com adaptador de transparência e seu respectivo software para captura de imagem, com resolução fixa de 300ppp e escala de 100%. As imagens capturadas foram arquivadas em formato TIFF (*Tagged Image File Format*) e então, inseridas no programa Regeemy – Image Registration and Mosaicking v.0.2.43-RCB (*DPI-INPE, Sao Jose dos Campos, SP, Brazil, <http://regima.dpi.inpe.br/download.html>*), que permite o registro *a posteriori*, ou correção dos erros de projeção geométricos e de diferenças de contraste entre duas radiografias, assim como a subtração das imagens. Como imagem de referência (imagem A - aquela que serviu como base para reconstrução da imagem subsequente) foi selecionada sempre a imagem da fase 1 (T1). Como imagem B (aquela que foi reconstruída), aquelas da fase 2, quando se comparou fase 1 com fase 2, ou da fase 3, quando se comparou fase 2 com fase 3. O registro dos pontos controle foi realizado de forma manual. Foram selecionados de 9 a 15 pares de pontos que serviram como coordenadas a partir das quais o programa alinha o par de imagens e reconstrói a segunda imagem de acordo com a projeção da imagem de referência.

Após a reconstrução das imagens, foram executadas as subtrações das imagens A e B. Na imagem subtraída, se a coroa e raiz (quase) não pudessem ser distinguidas (método visual) a reconstrução era considerada bem sucedida<sup>19</sup>. Após o sucesso da reconstrução o comprimento da raiz foi medido do centro geométrico da linha traçada entre a junção cimento-esmalte mesial e distal até o ponto médio do ápice radicular, utilizando as ferramentas de mensuração do programa UTHSCSA Image Tool (*University of Texas Health Science Center at San Antonio; <ftp://maxrad6.uthscsa.edu>*). A porcentagem de perda do comprimento dentário foi calculada a partir da fórmula:  $((L1-L2)/L1)*100$ , onde L1 = comprimento do dente antes do tratamento; L2 = comprimento do dente após reabsorção.

Cada medida foi realizada por um único examinador experiente e repetida após um intervalo de 30 dias para avaliação do erro do método.

As variações no comprimento radicular (reabsorção dentária apical externa), induzidos por movimentação ortodôntica foram comparadas entre os períodos pré-tratamento, 6 e 7 meses e 12 e 13 meses de tratamento.

Todas estas variáveis foram analisadas de T0 (pré-tratamento) para T2 (12-13 meses de tratamento); depois cada variável foi analisada de fase para fase e a relação com a extensão de reabsorção radicular dividida em 2 grupos, Grupo 1 (reabsorção menor que 1,5 mm) e Grupo 2 (reabsorção radicular igual ou maior que 1,5mm) e, finalmente, a possível correlação da reabsorção com cada imunoglobulina.

### **Obtenção de extrato dentinário humano (EDH) e frações de EDH**

A dentina foi obtida de terceiros molares humanos, inclusos ou semi-impactados, com indicação de exodontia e que foram extraídos de pacientes adultos saudáveis no Centro Cirúrgico da Clínica Odontológica Universitária da Universidade Estadual de Londrina. Logo após a remoção foram colocados em solução estéril de salina-fosfato (PBS). Após limpeza e remoção dos tecidos moles remanescentes, lavagem e secagem, foram armazenados em solução fisiológica estéril à -20°C. Para obtenção do extrato dentinário, foram realizados desgastes com brocas cilíndricas diamantadas de alta rotação sob irrigação constante com água destilada gelada; descartou-se o esmalte e cimento, obtendo-se a dentina coronária e radicular. A separação entre esmalte e dentina foi feita baseando-se na coloração: esbranquiçada, para o esmalte e amarelada, para a dentina. A dentina em pó foi depositada em bandejas e desidratada em estufa. O pó obtido foi diluído, desmineralizado em solução de guanidina-HCl 5M contendo 10% EDTA pH 5,0, a 4°C, durante 14 dias. O extrato foi centrifugado a 1.100g por 20 minutos a -4°C (Centrífuga *Eppendorf/Brinkmann Instruments Inc.*, USA) e o sobrenadante renaturado por diálise em água ultrapura *Milli-Q (Millipore Co.*, USA) por 24h a 4°C sob agitação. A concentração de proteínas foi estimada pelo método de Bradford e o material liofilizado, ressuspendido em PBS 0,15M estéril e armazenado a -80°C. Tais procedimentos foram baseados nos escritos de Lara et al. (2003)<sup>32</sup> e Hidalgo et al. (2005)<sup>24</sup>, que por sua vez basearam-se na técnica descrita por Wheeler e Stroup (1993)<sup>28</sup>. Dois mililitros de EDH foram aplicadas a uma coluna Sephadex G150 e eluídas com tampão PBS. Amostras eluídas (1,5 mL por tubo) foram coletadas em um coletor de fração automática, seguida de leitura a 280nm em espectrofotômetro (UV / visível, *Ultrospec-2.000; Pharmacia Biotech, Auckland, Northland*).

### **Amostras de soro**

Foram coletados 10 mL de sangue venoso, em cada uma das 3 fases de avaliação. Após coleta, o material foi submetido à centrifugação a 1200 rpm por 4 minutos para separação de soro, que foi devidamente identificado, congelado a -20°C antes de ser utilizado.

### **Determinação de nível de IgG anti EDH por ELISA**

Para detecção de IgG, placas de ELISA foram sensibilizadas com 100µL/orifício, contendo 10µg/mL de EDH ou frações de EDH (Fração I e II) em tampão carbonato-bicarbonato, incubadas por 1 hora a 37°C e “overnight” a 4°C, seguido de bloqueio e lavagens. Amostras de soro diluídas 1/100 foram distribuídas em duplicatas, 100µL/orifício e incubadas por 2 horas a 37°C. Após incubação e lavagens foi adicionado 100µL/orifício de conjugado anti-IgG humano 1:4000 (Sigma- A8775, St. Louis, MO, USA). A revelação foi feita com OPD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µL/orifício) e a reação, bloqueada com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. A leitura foi feita em aparelho Multiskan EX (Uniscience – Labsystems, Helsinki, Finland) em 492nm.

### **Determinação de nível de IgE anti EDH por ELISA**

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100µL/orifício, contendo 100µg/mL de fração de extrato dentinário diluído em tampão carbonato-bicarbonato, e incubada por 1 hora a 37°C e “overnight” a 4°C, seguido de bloqueio e lavagens. A seguir, 100µL de amostras de soros previamente adsorvidas (1:20) foram adicionadas aos orifícios (1h 30 minutos a 37°C). O processo de adsorção foi realizado pela incubação de amostras de soros com partículas de Sepharose proteína A (ligante de IgG) (v/v, 2h a 37°C), seguida de centrifugação, para eliminar IgG presente em alta concentração no soro (interferente que poderia ocupar epítipo impedindo a ligação de IgE presente em nível muito menor).

Adicionou-se IgG de carneiro anti-IgE humana (Sigma- I6284) diluído em tampão de diluição (30 µg/mL, 1h 30 minutos a 37°C), seguido de conjugado peroxidase anti-IgG de carneiro (Sigma- A3415, St. Louis, MO, USA) diluído 1:2000 (1h 30 minutos a 37°C). A revelação e a leitura foram feitas de acordo com o item anterior.

## Métodos estatísticos

A análise estatística foi feita por Análise de Variância (ANOVA), teste de Tukey e a Correlação de Pearson (Graph Pad Prism 5). Adotou-se o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

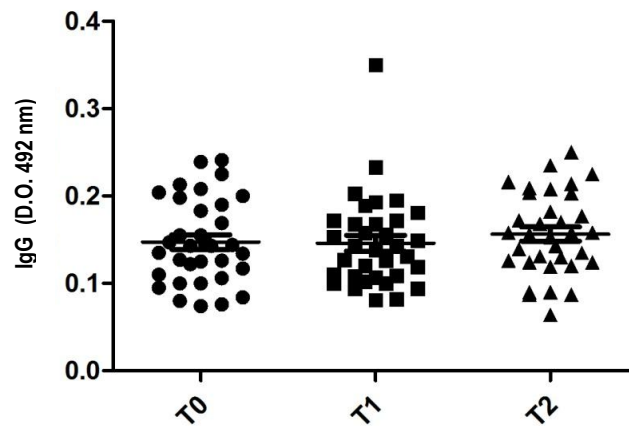
A fim de avaliar o erro do método, as medidas de cada leitura obtida nos dois tempos foram submetidas à análise de regressão. Por esta análise obtém-se um modelo linear de regressão do tipo  $Y = aX + b$ , onde X e Y representam as medidas realizadas nos dois tempos respectivamente, e “a” e “b” são coeficientes dessa regressão. Para se verificar a ausência de erros aleatórios e sistemáticos, o coeficiente “a” deve ser igual a 1, e o coeficiente “b” deve ser igual a 0, assim,  $Y = X$ . A verificação dessa condição é feita através do teste *t de student*. Uma vez que a diferença entre essas medidas não seja significativa, as médias dos valores das duas medidas podem ser utilizadas para a análise estatística.

## RESULTADOS

Os resultados de análise da ocorrência de reabsorção apical nos incisivos centrais superiores direito e esquerdo (ICSDE) resultou em 29 pacientes com extensão de reabsorção apical menor que 1,5 mm e 5 pacientes com reabsorção igual ou superior a 1,5mm no período T0 para T1. No período T0 para T2, 15 pacientes apresentaram extensão de reabsorção menor que 1,5mm e 19 pacientes com extensão igual ou maior que 1,5mm. No período T1 para T2, 33 pacientes apresentaram extensão de reabsorção menor que 1,5mm e um paciente com extensão igual ou maior que 1,5mm.

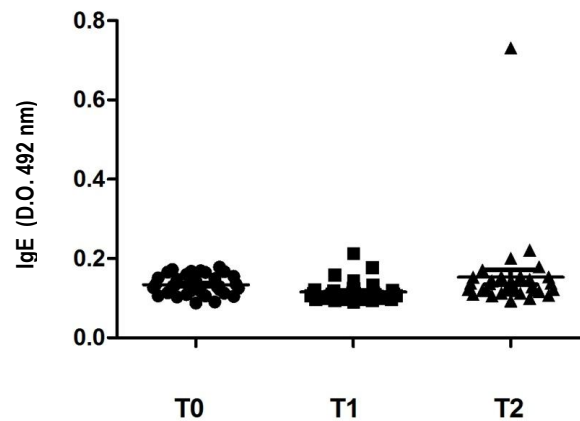
Não houve diferença significativa nos níveis de imunoglobulinas IgE e IgG contra extrato dentinário total entre os períodos T0, T1 e T2 (Figuras 1 e 2). Também não foi detectada diferença significativa quando avaliadas em relação à extensão da reabsorção, considerando os grupos com reabsorção menor que 1,5mm e com reabsorção igual ou maior que 1,5mm ( $p > 0,05$ ) no T1 ou T2 em relação ao controle T0 (Figuras 3 e 4). A cromatografia de EDH em coluna de Sephadex G-150 resultou em dois picos principais de absorção a 280 nm (Figura 5). A fração I apresenta predominantemente antígeno de MM acima de 200kDa e a fração II vários antígenos de MM abaixo de 50kDa identificados por SDS-PAGE (dados não mostrados). A análise dos soros de pacientes utilizando essas duas frações por ELISA, resultou em

menor nível de IgG para a fração I nos tempos T1 e T2 em relação ao controle T0 ( $p < 0.05$ ) e para a fração II diminuição significativa de tempo T0 para T1, de T1 para T2 e de T0 para T2 ( $p < 0,05$ ) (Figuras 6 e 7).



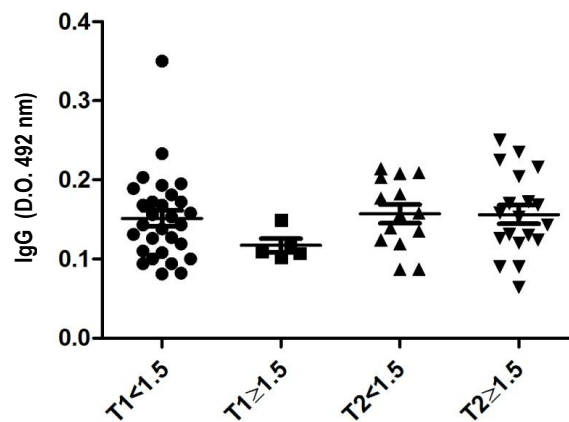
**Figura 1. Nível sérico de IgG anti-EDH.** Resultado do nível de IgG anti-EDH (extrato dentinário humano), por ELISA, em amostras de soros de pacientes antes do tratamento ortodôntico (T0), 6 a 7 meses após o início da movimentação ortodôntica (T1) e entre 12 e 13 meses após o início do tratamento (T2), expressos em D.O. a 492nm. (n= 34).

T0 x T1 x T2  $p > 0.05$ .



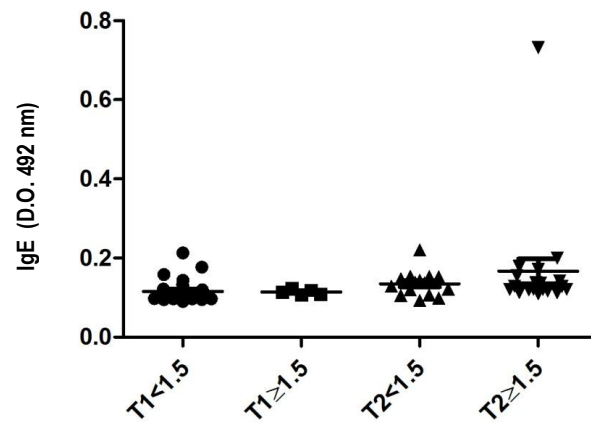
**Figura 2. Nível sérico de IgE anti-EDH.** Resultado do nível de IgE anti-EDH (extrato dentinário humano), por ELISA, em amostras de soros de pacientes antes do tratamento ortodôntico (T0), 6 a 7 meses após o início da movimentação ortodôntica (T1) e entre 12 e 13 meses após o início do tratamento (T2), expressos em D.O. a 492nm. (n= 34).

T0 x T1 x T2  $p > 0.05$ .

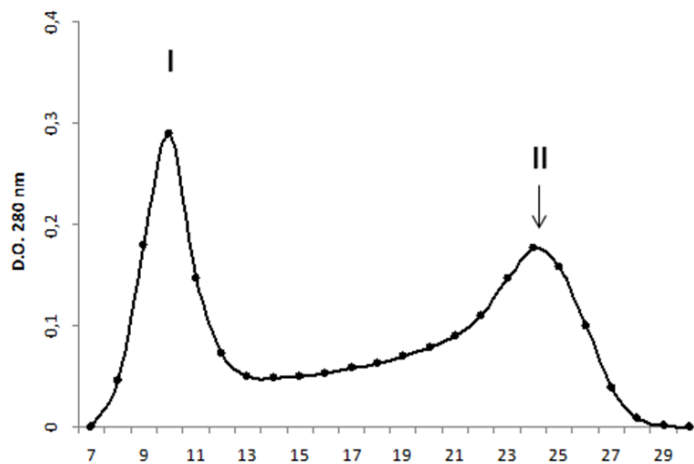


**Figura 3. Nível sérico de IgG anti-EDH de acordo com extensão de reabsorção dentária.**

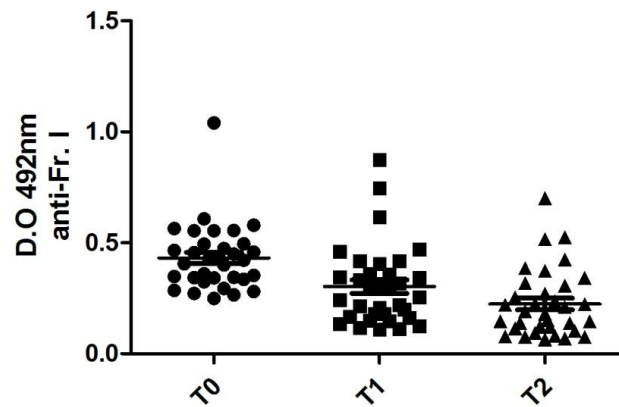
Resultado do nível de IgG anti-extrato dentinário humano (EDH), por ELISA, em amostras de soros de pacientes após 6-7 meses após o início do tratamento (T1) resultando em reabsorção menor que 1,5 mm e igual ou maior que 1,5 mm e após 12-13 meses de tratamento ortodôntico apresentando reabsorção menor que 1,5 mm e maior ou igual que 1,5 mm de extensão de reabsorção dentária. Extensão de reabsorção avaliada por método de subtração radiográfica digital tendo como parâmetro a tomada radiográfica anterior ao tratamento ortodôntico. T1 ou T2  $< 1.5$  x T1 ou T2  $\geq$   $p > 0.05$ .



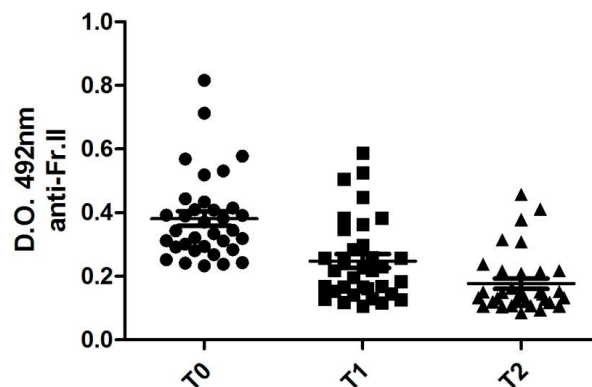
**Figura 4. Nível sérico de IgE anti-EDH de acordo com extensão de reabsorção dentária.** Resultado do nível de IgE anti-extrato dentinário humano (EDH), por ELISA, em amostras de soros de pacientes após 6-7 meses após o início do tratamento (T1) resultando em reabsorção menor que 1,5 mm e igual ou maior que 1,5 mm e após 12-13 meses de tratamento ortodôntico apresentando reabsorção menor que 1,5 mm e igual ou maior que 1,5 mm de extensão de reabsorção dentária. Extensão de reabsorção avaliada por método de subtração radiográfica digital tendo como parâmetro a tomada radiográfica anterior ao tratamento ortodôntico. T1 ou T2 <1.5 x T1 ou T2 ≥ p >0.05.



**Figura 5. Perfil espectrofotométrico a 280 nm de eluatos de extrato dentinário humano (EDH) por cromatografia de gel filtração.** A amostra de EDH foi submetida a cromatografia em coluna de Sephadex G-150 e os eluatos obtidos (7-30) analisados por espectrofotometria a 280nm, obtendo-se o perfil espectrofotométrico contendo dois picos principais (I e II). As frações I e II correspondem a MM acima de 200kDa e menor que 50 kDa, respectivamente.



**Figura 6. Nível sérico de IgG anti-fração I de extrato dentinário humano (EDH).** Resultado de nível de IgG anti-fração I em amostras de soros de pacientes antes do tratamento ortodôntico (T0), 6 a 7 meses após o início da movimentação ortodôntica (T1) e entre 12 e 13 meses após o início do tratamento (T2), por ELISA, expresso em D.O. a 492nm. (n=34). Fração I, obtida por meio de fracionamento de EDH por cromatografia de gel filtração em coluna de Sephadex G-150, MM acima de 200kDa. T0 x T1 ou T0 x T2  $p>0.05$ , T1 x T2  $p>0.05$ .



**Figura 7. Nível sérico de IgG anti-fração II de extrato dentinário humano (EDH).** Resultado de nível de IgG anti-fração II em amostras de soros de pacientes antes do tratamento ortodôntico (T0), 6 a 7 meses após o início da movimentação ortodôntica (T1) e entre 12 e 13 meses após o início do tratamento (T2), por ELISA, expresso em D.O. a 492nm. (n=34). Fração II, obtida por meio de fracionamento de EDH por cromatografia de gel filtração em coluna de Sephadex G-150, MM abaixo de 50kDa. T0 x T1 ou T0 x T2 ou T1 x T2  $p<0.05$ .

## DISCUSSÃO

As reabsorções radiculares são frequentes e aceitáveis como parte do custo biológico para se obter uma oclusão estética e funcional, mesmo sendo considerada patológica em situações clínicas como o tratamento ortodôntico. Porém, em algumas situações onde ocorrem extensões moderadas ou severas pode haver o comprometimento das funções dentárias. Os conhecimentos e condutas para preveni-las e atenuá-las são de fundamental importância. Dentro deste contexto, a Subtração Radiográfica Digital (SRD) é uma metodologia que permite aferir de maneira precisa perdas estruturais ou reabsorção apical de áreas mineralizadas.<sup>16-21, 33-36</sup> Reukers et al. (1998)<sup>16</sup>, Gröndahl et al. (1983)<sup>17</sup> e Zacharaki et al., (2004)<sup>36</sup>, consideraram a SRD um método para diminuição de ruído estrutural (sobreposição de estruturas) capaz de alinhar radiografias adquiridas com ou sem padronização rigorosa *a priori*. A metodologia é baseada nas diferenças de pixels, não requer processo de segmentação antes do alinhamento sendo um modelo confiável para o registro de radiografias intra-buciais. Em 1990, Tyndall et al.<sup>33</sup> escreveram que a SRD representa um importante meio de estabelecer facilidades nos métodos diagnósticos disponíveis para a detecção e avaliação de alterações sutis na região periapical. Kravitz et al. (1992)<sup>18</sup>, Heo et al. (2001)<sup>19</sup>, Eraso et al. (2007)<sup>20</sup>, Eberhard et al. (2000)<sup>34</sup> e Holmes et al. (2001)<sup>35</sup>, concluíram que para detecção precoce de reabsorção radicular externa nas superfícies proximais, a subtração radiográfica foi significativamente superior à radiografia convencional. Ono et al. (2011)<sup>21</sup> realizaram um estudo para comparar a eficácia da radiografia digital e da radiografia com subtração digital na detecção de reabsorção radicular simulada e concluíram que ambos os métodos são precisos para detectar reabsorção radicular apical menores que 0,5mm e reabsorção lingual de 1,0mm ou mais, entretanto, a radiografia com subtração digital foi significativamente melhor que a radiografia digital, na detecção de reabsorção radicular lingual menor do que 1mm.

De acordo com os resultados foi observada uma diferença significativa ( $p= 0,002$ ) entre as medidas (em mm) dos dentes nas fases: inicial (T0) (média = 16,725) e final (T2) (média = 15,151). A perda estrutural por reabsorção radicular foi de 6,19% de T0 para T1, 3,45% da fase T1 para T2 e 9,42% da fase T0 para T2.

Uma vez que pela classificação de Lupi et al. (1996)<sup>37</sup> a amostra seria classificada com uma reabsorção de grau 1 ou ápice radicular ligeiramente romboidal; pela classificação de Levander e Malmgren (1998)<sup>38</sup>, a amostra estaria entre o grau 1, remodelamento do cemento apical, e o grau 2, até 2mm de reabsorção apical ou reabsorção leve, a reabsorção radicular apical média da amostra, com 12-13 meses de tratamento, com perda média estrutural de 1,574 mm foi considerada como uma reabsorção leve. Remington et al. (1989)<sup>39</sup> avaliaram por longo tempo dentes que sofreram reabsorção radicular durante o tratamento ortodôntico e encontraram reabsorção média de 1,9mm nos incisivos centrais superiores. Harris e Butler (1992)<sup>5</sup> estudaram o padrão de reabsorção em incisivos superiores movimentados ortodonticamente e encontraram uma perda no comprimento radicular de 1,7mm ou 15%. Beck e Harris (1994)<sup>40</sup> avaliaram a extensão da reabsorção radicular em casos tratados ortodonticamente e encontraram uma reabsorção média de 2,1mm nos incisivos centrais superiores. Baumrind, Korn e Boyd (1996)<sup>41</sup> analisaram os incisivos centrais superiores movimentados ortodonticamente e encontraram uma reabsorção radicular média de 1,36mm  $\pm$  1,46mm. Sameshima e Sinclair (2001)<sup>42</sup> em estudo para determinar fatores que podem predispor dentes movimentados ortodonticamente à reabsorção radicular, encontraram uma reabsorção média de 1,24mm nos incisivos centrais superiores. Sameshima e Sinclair (2001a)<sup>43</sup> realizaram um estudo para determinar que fatores estão relacionados à reabsorção radicular detectada em radiografias periapicais no fim do tratamento ortodôntico, e encontraram uma reabsorção média de 1,43mm nos incisivos centrais superiores. Segal, Schiffman e Tuncay (2004)<sup>44</sup> relataram que muitos estudos que avaliaram a reabsorção radicular reportaram perda apical entre 1,5 e 3mm; afirmaram que discrepâncias de 1mm nos resultados podem alterar as conclusões de um estudo e que exames mais acurados, resolverão este dilema no futuro.

Alguns trabalhos na literatura <sup>22-25</sup> consideraram a possibilidade real de se construir perfis imunológicos dos pacientes ortodônticos, visando à detecção precoce e prevenção da ocorrência da reabsorção radicular. Ramos et al. (2011)<sup>25</sup>, encontraram em soro, altos níveis de IgG anti-extrato dentinário humano nos pacientes após tratamento ortodôntico que apresentaram reabsorções moderadas ou severas. No entanto no presente trabalho não foi observado alteração

significativa no nível sérico de IgG anti-extrato dentinário. A discordância pode ser devido a pequena extensão da reabsorção média da amostra. Altos níveis de IgG encontrado por Ramos et al.<sup>25</sup> estão relacionados aos casos com reabsorção Grau 2 (reabsorção moderada para severa) enquanto em nossa amostra a média de reabsorção se encontra no grau 1. Neste contexto estaria de acordo com Apajalahti e Peltola (2007)<sup>12</sup> onde a duração média de tratamento ortodôntico sem reabsorção dentária foi de 1,5 anos, enquanto que com reabsorção grave foi de 2,3 anos.

Considerando que EDH é um “pool” protéico e alguns componentes poderiam induzir aumento no nível de IgG específica, realizou-se a análise de duas principais frações (maior absorbância a 280 nm) e surpreendentemente, foi observada diminuição significativa nos níveis de IgG a essas frações. Esses resultados são concordantes com a diminuição nos níveis de IgG anti-extrato total observados em modelos experimentais de tratamento ortodôntico em cães e camundongos<sup>22, 27</sup>. No entanto os níveis de IgG anti-frações não demonstraram correlação com o grau de reabsorção.

Considerando os níveis similares obtidos nessa investigação, não podemos descartar a hipótese de que no EDH contenha componentes que induzam modulação negativa e componentes que induzam modulação positiva na resposta de IgG e conseqüentemente a presença de ambos no extrato total tornem os níveis totais de IgG similares, mesmo com a ocorrência de imunomodulação.

No modelo experimental de movimentação ortodôntica, o rato tem sido utilizado com maior frequência. No entanto algumas diferenças foram descritas, como a maior densidade de tecido alveolar e a menor abundância de tecido osteóide ao longo da superfície alveolar do osso, além da matriz extracelular óssea de rato conter relativamente poucos ácidos mucopolissacarídeos<sup>45</sup>. Assim, considerando que existem algumas diferenças entre espécies, pode ser que a composição de tecido dentinário do rato contenha mais componentes imunossupressores no extrato total do que de humanos, o que requer estudos adicionais.

O processo de reabsorção como consequência de tratamento ortodôntico deve iniciar precocemente antes mesmo da produção de anticorpos. A literatura cita envolvimento de várias citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas, neurotransmissores e células de imunidade inata na fase inicial<sup>23, 46</sup>. Todavia como

existe cooperação entre imunidade inata e imunidade adaptativa, deve ocorrer modulação da imunidade adaptativa em função de resposta induzida pela inata.

O tratamento com corticosteróide induz maior reabsorção dentária em ratos, sendo esse efeito detectado na fase inicial de tratamento, mas não na crônica<sup>47</sup>. Como os corticosteróides atuam como agente imunossupressor pode ser que a indução de resposta imune poderia se favorável controlando a reabsorção dentária. No modelo murino tem sido observado que a hiperimunização com a dentina induz proteção contra a reabsorção dentária traumática, indicando que os anticorpos não mediam o processo de reabsorção traumática e ao contrário, podem apresentar papel protetor<sup>28</sup>.

Macnab et al. (1999)<sup>29</sup> observaram que os pacientes asmáticos apresentaram alta incidência de reabsorção dentária em relação aos pacientes não asmáticos após tratamento ortodôntico. Nishioka et al. (2006)<sup>30</sup> encontraram uma maior incidência de pacientes asmáticos no grupo com reabsorção radicular e concluíram que alergia, morfologia radicular anormal e asma podem ser fatores de alto risco para o desenvolvimento de reabsorção radicular excessiva durante o tratamento ortodôntico. Owman-Moll e Kurol (2000)<sup>48</sup> após observarem possíveis fatores de risco causadores de reabsorção radicular, avaliaram morfologia radicular, gengivite, alergia, onicofagia e medicação e encontraram um aumento no risco de reabsorção radicular somente nos pacientes com alergia, porém sem significância estatística.

Como os pacientes asmáticos apresentam nível mais elevado de IgE,<sup>31</sup> no presente trabalho foi avaliado o nível de IgE anti-dentina durante o tratamento ortodôntico. O isótipo de anticorpo IgE atua na defesa contra parasitas helmínticos e participa nas reações alérgicas; as funções efetoras isótipo-específicas restringem-se à desgranulação dos mastócitos ou reações de hipersensibilidade imediata.<sup>31, 49</sup> Uma das dificuldades de se avaliar o nível de IgE é a sua baixa concentração e sua meia-vida sérica baixa. No presente estudo para a análise de IgE, as amostras de soros foram previamente adsorvidas com sepharose proteína G para a eliminação de IgG presente em concentração muito maior e que poderia ocupar o sítio de interação de antígeno levando a um resultado falso negativo. Em nossos estudos, a IgE, quando analisada ou relacionada com os grupos de pacientes separados pela extensão da reabsorção radicular não demonstrou diminuição significativa. Esse resultado pode não estar em concordância com a observação de incidência maior de

reabsorção dentária associada às patologias que envolvem aumento de IgE<sup>29, 30</sup>, todavia está de acordo com as observações de Macnab et al. (1999)<sup>29</sup>, onde o grau de reabsorção, moderado e grave, foi similar entre pacientes asmáticos e não asmáticos.

A IgE é produzida de uma forma dependente ao desenvolvimento de linfócitos Th2 enquanto que a IgG, exceto a sub classe IgG4, depende da população Th1, sendo que as citocinas produzidas por Th1 inibem a Th2 e vice versa<sup>31</sup>. Considerando que a hiperimunização pode induzir proteção de reabsorção dentária em ratos<sup>28</sup> e em geral a hiperimunização leva a produção de IgG, sendo a IgG indicativo de desenvolvimento de resposta Th1<sup>31</sup> e considerando a afirmação de King e Courts (1989)<sup>22</sup> de que a depressão no título de autoanticorpo ao antígeno de raiz de dente coincide com reabsorção dentária ativa em cães, possivelmente o desenvolvimento da resposta Th1 e inibição de Th2 seja benéfica para o controle da reabsorção dentária. Investigações futuras com maior amostragem de pacientes apresentando diversos graus de reabsorção, períodos maiores com menores intervalos de análise, incluindo dosagem de IgE e sub-classes de IgG a diversos antígenos de EDH e também incluindo exame parasitológico, pois parasitoses podem interferir no balanço de resposta Th1 e Th2, poderia contribuir para uma melhor compreensão da patogênese de reabsorção dentária.

Concluindo, espera-se que a SRD possa contribuir para o controle clínico da reabsorção radicular, por se tratar de metodologia mais sensível possibilitando a detecção mais precoce da reabsorção radicular. O presente trabalho introduziu pela primeira vez a avaliação de nível de IgE em pacientes em tratamento ortodôntico, demonstrando a não correlação entre grau de reabsorção e nível de anticorpos IgE aos antígenos dentinários. O trabalho também demonstra que ocorre imunodepressão nos níveis de anticorpos da classe IgG às frações da dentina humana sugerindo que no extrato dentinário humano deve conter componentes que induzem imunomodulação negativa de IgG. Mas como essa modulação não foi evidenciada com extrato total e também pela ausência de correlação com grau de reabsorção torna-se importante o estudo de outras frações antigênicas.

*Agradecemos à Mari Sumigawa Kaminami e ao Nilson de Jesus Carlos, Departamento de Ciências Patológicas, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina pelo apoio técnico. Também ao Prof. Esp. Lucídio de Jesus Júnior pela realização da estatística deste trabalho.*

## REFERÊNCIAS

- 1- RAMANATHAN, C; HOFMAN, Z. Root resorption during orthodontic tooth movements. **Eur J Orthod**, Oxford, v.31, p.578-83, 2009.
- 2- PIZZO, G. et al. Root resorption and orthodontic treatment. **Minerva Stomatol**, v.56, n.1-2, p.31-44, 2007.
- 3- FUSS, Z.; TSEH, I.; LIN, S. Root resorption – diagnosis, classification and treatment choices based on stimulation factors. **Dent Traumatol** v.19, p.175-182, 2003.
- 4- HARRIS, E. F.; BAKER, W. C. Loss of root length and crestal bone height before and during treatment in adolescent and adult orthodontic patients. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.98, n.5, p.463-69, November, 1990.
- 5- HARRIS, E. F.; BUTLER, M. L. Patterns of incisor root resorption before and after orthodontic correction in cases with anterior open bites. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.101, n.2, p.112-19, Feb. 1992.
- 6- ANDREASEN F.M. et al. Radiographic assessment of simulated root resorption cavities. **Endod Dent Traumatol**, v. 3, n.1, p. 21-7, Feb. 1987.
- 7- CHAPNIK, L. External root resorption: An experimental radiographic evaluation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v.67, p.578-82, 1989.
- 8- ARMSTRONG, D. et al. Root resorption after orthodontic treatment. **Aust Orthod J**, v.22, n.2, p.153-60, Nov. 2006.

- 9- BRIN, I. et al. External apical root resorption in Class II malocclusion: a retrospective review of 1- versus 2-phase treatment. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.124, n.2, p.151-6, Aug. 2003.
- 10- FRITZ, U.; DIEDRICH, P.; WIECHMANN, D. Apical root resorption after lingual orthodontic therapy. **J Orofac Orthop**, v.64, n.6, p.434-42, Nov. 2003.
- 11- NIGUL, K.; JAGOMAGI, T. Factors related to apical root resorption of maxillary incisors in orthodontic patients. **Stomatologija**, v.8, n.3, p.76-9, 2006.
- 12- APAJALAHTI, S.; PELTOLA, J.S. Apical root resorption after orthodontic treatment – a retrospective study. **Eur J Orthod**, v.29, n.4, p.408-12, Aug, 2007.
- 13- SAMESHIMA, G.T.; ASGARIFAR, K.O. Assessment of root resorption and root shape: Periapical vs Panoramic Films. **Angle Orthod**, Appleton, v.71, n.3, p.185-89, Jun. 2001.
- 14- LEVANDER, E.; MALMGREN, O. Evaluation of the risk of root resorption during orthodontic treatment: a study of upper incisors. **Eur J Orthod**, London, v. 10, no. 1, p. 30-38, Feb. 1988.
- 15- NICOPOULOU-KARAYIANNI K.; BRAGGER U.; LANG N.P. Subtraction radiography in oral implantology. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, v.17, n.3, p.220-31, Jun. 1997.
- 16-REUKERS E. et al. Assessment of apical root resorption using digital reconstruction. **Dentomaxillofac Radiol**, v.27, n.1, p.25-9, Jan. 1998.
- 17- GRONDAHL H.G.; GRONDAHL K.; WEBBER R.L.; A digital subtraction technique for dental radiography. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v.55, n.1, p.96-102, Jan. 1983.
- 18- KRAVITZ L.H. et al. Assessment of external root resorption using digital subtraction radiography. **J Endod**, v.18, n.6, p. 275-84, Jun. 1992.

19- HEO, M.S. et al. Quantitative analysis of apical root resorption by means of digital subtraction radiography. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.91, n.3, p. 369-73, Mar. 2001.

20- ERASO F.E. et al. Density value means in the evaluation of external apical root resorption: an in vitro study for early detection in orthodontic case simulations. **Dentomaxillofac Radiol**, v.36, n.3, p.130-7, Mar. 2007.

21- ONO, E. et al. Evaluation of simulated external root resorptions with digital radiography and digital subtraction radiography. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.139, n.3, p.324-33, Mar. 2011.

22- KING, G.; COURTS, F. **Humoral immune response to active root resorption**. In: NORTON, L.A.; BURSTONE, C.J. The biology of tooth movement. Boca Raton, CRC, p.276-85, 1989.

23- SILVA, T.A. et al. Cytokine and chemokine response of bone cells after dentin challenge in vitro. **Oral Dis**, v.10, p.258-64, 2004.

24- HIDALGO, M.M.; ITANO, E.N.; CONSOLARO, A. Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. **Dent Traumatol**, v.21, n.4, p.218-21, Aug. 2005.

25- RAMOS, S.P. et al. Anti-dentine antibodies with root resorption during orthodontic treatment. **Eur J Orthod**, Oxford, v.33, p.584-91, 2011.

26- KARACAY, S. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  levels during two different canine distalization techniques. **Angle Orthod**, vol.77, n.1, p.142-47, 2007.

27- NG, K.T.; KING, G.J.; COURTS, F.J. Humoral immune response to active root. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.98, n.4, p.352-57, Apr. 1993.

28- WHEELER, T.T.; STROUP, S.E. Traumatic root resorption in dentine-immunized mice. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.103, n.4, p.352-57, Apr. 1993.

- 29- McNAB, S. et al. External apical root resorption of posterior teeth in asthmatics after orthodontic treatment. **Am J Orthod Dentof Orthop**, St. Louis, v.116, n.5, p.545-551, nov. 1999.
- 30- NISHIOKA, M. et al. Root resorption and immune system factors in the Japanese. **Angle Orthod**, Appleton, v.76, n.1, p.103-108, 2006.
- 31- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILAI, S. **Cellular and molecular immunology**, 7<sup>a</sup> ed., Saunders, 2012.
- 32- LARA, V. S. et al. Dentin-induced in vivo inflammatory response and in vitro activation of murine Macrophages. **J Dent Res**, Chicago, v. 82, n.6, p.460-65, 2003.
- 33- TYNDALL D.A.; KAPA S.F.; BAGNELL C.P. Digital subtraction radiography for detecting cortical and cancellous bone changes in the periapical region. **J Endod**, v.16, n.4, p.173-8, Apr. 1990.
- 34- EBERHARD J. et al. Digital subtraction radiography for monitoring dental demineralization: an in vitro study. **Caries Res**, v.34, n.3, p.219-24, May/June, 2000.
- 35- HOLMES J.P.; GULABIVALA K.; VAN DER STELT P.F. Detection of simulated internal tooth resorption using conventional radiography and subtraction imaging. **Dentomaxillofac Radiol**, v.30, n.5, p.249-54, Sep. 2001.
- 36- ZACHARAKI, E.I. et al. A digital subtraction radiography scheme based on automatic multiresolution registration. **Dentomaxillofac Radiol**, v.33, n. 6, p.379-90, nov., 2004.
- 37- LUPI, J.E.; HANDELMAN, C.S.; SADOWSKY, C. Prevalence and severity of apical root resorption and alveolar bone loss in orthodontically treated adults. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.109, n.1, p.28-37, jan. 1996.
- 38- LEVANDER, E.; MALMGREN O. Evaluation of the risk of root resorption during orthodontic treatment: A study of upper incisors. **Eur J Orthod**, Oxford, v.10, n.1, p.30-8, Feb. 1998.

- 39- REMINGTON, D.N. et al. Long-Term evaluation of root resorption occurring during orthodontic treatment. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.96, n.1, p.43-6, Jul. 1989.
- 40- BECK, B. W.; HARRIS, E. F. Apical root in orthodontically treated subjects: Analysis of edgewise and light wire mechanics. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.105, n.4, p.350-61, Apr. 1994.
- 41- BAUMRIND, S.;KORN, E.L.; BOYD, R.L. Apical root resorption in orthodontically treated adults. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.110, n.3, p.311-20, sep. 1996.
- 42- SAMESHIMA, G. T.; SINCLAIR, P. M. Predicting and preventing root resorption: Part I. Diagnostic factors. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.119, n.5, p.505-510, May 2001.
- 43- SAMESHIMA, G. T.; SINCLAIR, P. M. Predicting and preventing root resorption: Part II. Treatment factors. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.119, n.5, p.511-515, May 2001.
- 44- SEGAL, G.R.; SCHIFFMAN, P.H.; TUNCAY, O.C. Meta analysis of the treatment-related factors of external apical root resorption. **Orthod Craniofac Res**, v.7, n.2, p.71-78, 2004.
- 45- REN, Y.; MALTHA, J.C.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M. The rat as a model for orthodontic tooth movement-a critical review and a proposed solution. **Eur J Orthod** Oxford, v.26, n.5, p.483-90, Oct. 2004.
- 46- DI DOMENICO, M. et al. Cytokines and VEGF induction in orthodontic movement in animal models. **J Biomed Biotechnol**, May, 2012.
- 47- VERNA, C. et al. Influence of steroid drugs on orthodontically induced root resorption. **Orthod Craniofac Res**, vol.9, n.1, p.57-62, Feb 2006.

48- 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**, London, v. 22, p. 657-63, 2000.

49- PRUSSIN, C.; METCALFE, D.D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**, v.111, n.2, p. S486-S494, Feb. 2003.

## CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados do trabalho, concluímos que:

**1-)** Ocorre perda estrutural por reabsorção radicular com aumento progressivo nos períodos de 6-7 meses e 12-13 meses de tratamento ortodôntico de forma concordante com a literatura.

**2-)** A perda estrutural por reabsorção radicular no período avaliado e nas condições de trabalho específica foi em média de 9,42% que corresponde a 1,574 mm, estando de acordo com alguns dados da literatura.

**3-)** Ocorre aumento no nível sérico de IL-10 nos pacientes com reabsorção maior ou igual a 1,5mm entre as fases T0 (pré-tratamento) e T2 (12-13 meses de tratamento) com correlação linear negativa com a reabsorção radicular, isto é, à medida que a reabsorção aumenta, os níveis de IL-10 diminuem.

**4-)** Ocorre redução no nível sérico de IL-12 entre as fases T0 (pré-tratamento) e T1 (6-7 meses de tratamento) ou T2 (12-13 meses de tratamento) e de T1 para T2 nos grupos com reabsorção menor que 1,5mm. No grupo com reabsorção igual ou maior que 1,5mm, também sofreu uma redução de T0 para T2.

**5-)** Ocorre redução no nível sérico de IL-17 entre as fases T0 (pré-tratamento) e T1 (6-7 meses de tratamento) ou T2 (12-13 meses de tratamento), no grupo com reabsorção menor que 1,5mm, apresentando uma correlação linear negativa com a

reabsorção radicular no início do tratamento, isto é, à medida que a reabsorção aumenta, os níveis de IL-17 diminuem.

**6-)** As citocinas IL-4 e TNF $\alpha$  não sofrem alterações significativas no decorrer de tratamento ortodôntico (6-7 e 12-13 meses) e não apresentam correlação com o grau de reabsorção dentária.

**7-)** Os níveis sistêmicos de IgG e IgE anti-extrato dentinário não se alteram durante o tratamento ortodôntico (6-7 e 12-13 meses) e não apresentam correlação com o grau de reabsorção radicular.

**8-)** Ocorre modulação negativa nos níveis de IgG às duas principais frações de extrato dentinário humano independentemente da extensão de reabsorção radicular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- 1- RAMANATHAN, C; HOFMAN, Z. Root resorption during orthodontic tooth movements. **Eur J Orthod**, Oxford, v.31, p.578-83, 2009.
- 2- PIZZO, G. et al. Root resorption and orthodontic treatment. **Minerva Stomatol** v.56, n.1-2, p.31-44, 2007.
- 3- FUSS, Z.; TSEKIS, I.; LIN, S. Root resorption – diagnosis, classification and treatment choices based on stimulation factors. **Dent Traumatol** v.19, p.175-182. 2003.
- 4- HARRIS, E. F.; BAKER, W. C. Loss of root length and crestal bone height before and during treatment in adolescent and adult orthodontic patients. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.98, n.5, p.463-69, November, 1990.
- 5- HARRIS, E. F.; BUTLER, M. L. Patterns of incisor root resorption before and after orthodontic correction in cases with anterior open bites. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.101, n.2, p.112-19, Feb. 1992.
- 6- LUPI, J.E.; HANDELMAN, C.S.; SADOWSKY, C. Prevalence and severity of apical root resorption and alveolar bone loss in orthodontically treated adults. **Am J Orthod Dentof Orthop**, St. Louis, v.109, n.1, p.28-37, jan. 1996.
- 7- REMINGTON, D.N. et al. Long-Term evaluation of root resorption occurring during orthodontic treatment. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.96, n.1, p.43-6, Jul. 1989.
- 8- NIGUL, K.; JAGOMAGI, T. Factors related to apical root resorption of maxillary incisors in orthodontic patients. **Stomatologija**, v.8, n.3, p.76-9, 2006.
- 9- MOHANDESAN, H.; RAVANMEHR, H.; VALAEI, N. A radiographic analysis of external apical root resorption of maxillary incisors during active orthodontic treatment. **Eur J Orthod**, Oxford, v.29, n.2, p.134-9 Apr. 2007.

- 10- CONSOLARO, A. **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas**. Dental Press Editora, Maringá, 2<sup>a</sup> ed., 2005.
- 11- SEGAL, G.R.; SCHIFFMAN, P.H.; TUNCAY, O.C. Meta analysis of the treatment-related factors of external apical root resorption. **Orthod Craniofac Res**, v.7, n.2, p.71-78, 2004.
- 12- KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.129, n.4, p.469.e1-469.e32, Apr. 2006.
- 13- KING, G.; COURTS, F. **Humoral immune response to active root resorption**. In: NORTON, L.A.; BURSTONE, C.J. The biology of tooth movement. Boca Raton, CRC, p.276-85, 1989.
- 14- HIDALGO, M. M.; ITANO, E. N.; CONSOLARO, A. Recognition of human dentin extract fractions by sera of immunized rabbit and patients showing radicular resorption. **J Dent Res**, Chicago, v.80, n.4, p. 1035, Apr. 2001. Abstract n. 291.
- 15- COHEN S.; BLANCO L.; BERMAN L.H. Early radiographic diagnosis of inflammatory root resorption. **Gen Dent**, v.51, n.3, p.235-40, May/Jun 2003.
- 16- HARTSFIELD, J.K.; EVERET, E.T.; AL-QAWASMI, R.A. Genetic factors in external apical root resorption and orthodontic treatment. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.15, n.2, p.115-22, 2004.
- 17- CERNOCHOVA, P.; KRUPA, P.; IZAKOVICOVA-HOLLA, L. Root resorption associated with ectopically erupting maxillary permanent canines: a computed tomography study. **Eur J Orthod**, Oxford, v.33, p.483-91, 2011.
- 18- LEVANDER, E.; MALMGREN, O. Evaluation of the risk of root resorption during orthodontic treatment: a study of upper incisors. **Eur J Orthod**, London, v. 10, no. 1, p. 30-38, Feb. 1988.

- 19- BREZNIAK, N.; WASSERSTEIN, A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The Basic Science Aspects. **Angle Orthod**, Appleton, v.72, n.2, p.175-79, 2002.
- 20- MALMGREN, O. et al. Root resorption after orthodontic treatment of traumatized teeth. **Am J Orthod**, St. Louis, v.82, n.6, p.487-91, Dec. 1982.
- 21- COPELAND, S.; GREEN, L. J. Root resorption in maxillary central incisors following active orthodontic treatment. **Am J Orthod**, St. Louis, v.89, n.1, p.51-55, Jan. 1986.
- 22- BRUDVIK, P.; RYGH, P. Transition and determinants of orthodontic root resorption-repair sequence. **Eur J Orthod**, Oxford, v.17, p.177-88, 1995.
- 23- SISMANIDOU, C.; HILLIGES, M.; LINDSKOG, S. Healing of the root surface-associated periodontium: an immunohistochemical study of orthodontic root resorption in man. **Eur J Orthod**, Oxford, v.18, 435-44, 1996.
- 24- OWMAN-MOLL, P.; KUROL, J.; LUNDGREN, D. Effects of a doubled orthodontic force magnitude on tooth movement and root resorption. An inter-individual study in adolescents. **Eur J Orthod**, Oxford, v.18, p.141-50, 1996.
- 25- JIMENEZ-PELLEGRIN, C.; ARANA-CHAVEZ, V.E. Root resorption in human mandibular first premolars after rotation as detected by scanning electron microscopy. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.126, n.2, p.178-84, Aug. 2004.
- 26- LEVANDER, E.; MALMGREN, O.; ELIASSON, S. Evaluation of root resorption in relation to two orthodontic treatment regimes. A clinical experimental study. **Eur J Orthod**, Oxford, v.16, n.3, p.223-28, 1994.
- 27- SILVA, T.A. et al. Cytokine and chemokine response of bone cells after dentin challenge in vitro. **Oral Dis**, v.10, p.258-64, 2004.

28- HIDALGO, M.M.; ITANO, E.N.; CONSOLARO, A. Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. **Dent Traumatol**, v.21, n.4, p.218-21, Aug. 2005.

29- RAMOS, S.P. et al. Anti-dentine antibodies with root resorption during orthodontic treatment. **Eur J Orthod**, Oxford, v.33, p.584-91, 2011.

30- CONSOLARO, A. O conceito de Reabsorções Dentárias ou as Reabsorções Dentárias não são multifatoriais, nem complexas, controvertidas ou polêmicas! **Dental Press J Orthod**, Maringá, v.16, n.4, p.19-24, Jul-Aug. 2011.

## APÊNDICE A – Artigo 1 (Inglês)

### **Systemic cytokine IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 and TNF $\alpha$ levels in patients following orthodontic treatment**

Carlos Eduardo de Oliveira Lima<sup>1</sup>, Elisa Tanaka Carlotto<sup>1</sup>, Fernanda Akemi Nakanishi Ito<sup>1</sup>, Evelise Ono<sup>1</sup>, Mirian Marubayashi Hidalgo<sup>2</sup>, Paula Leonello Álvares e Silva<sup>3</sup>, Eiko Nakagawa Itano<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Medicine and Pediatric Dentistry, Universidade Estadual de Londrina.

<sup>2</sup>Department of Dentistry, Universidade Estadual de Maringá.

<sup>3</sup>Department of Pathological Sciences, Universidade Estadual de Londrina.

Keywords: Root resorption. Cytokines. Immunomodulation. Digital radiograph.

#### **Correspondence to:**

Professor Carlos Eduardo de Oliveira Lima

Department of Oral Medicine and Pediatric Dentistry, School of Dentistry  
Universidade Estadual de Londrina  
Pernambuco Street, 540, CEP 86020-070, Londrina, PR, Brazil  
e-mail: eduardolima@uel.br

Professora Dra. Eiko Nakagawa Itano

Department of Pathological Sciences, CCB  
Universidade Estadual de Londrina  
Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, CEP 86.051-990, Londrina, PR, Brazil  
e-mail: itanoeiko@hotmail.com

## **ABSTRACT**

**Aims:** Limited data exists regarding the systemic cytokine response following orthodontic treatment. The aim of this study was to evaluate whether orthodontic treatment induces alterations to systemic cytokine levels and to establish correlations with apical root resorption that represents a pathological condition associated with orthodontic procedures.

**Methods:** Serum TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-12, and IL-17 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from samples collected from 34 patients before orthodontic treatment (T0), 6-7 months into the treatment (T1), and 12-13 months into the treatment (T2). Periapical radiographs of maxillary incisors were analyzed by digital subtraction radiography.

**Results:** No significant changes in cytokine levels were observed during the course of orthodontic treatment ( $p > 0.05$ ). However when divided in groups, presented statistically significant changes in the cytokines levels with decreased IL-12 (T0-T1,  $p = 0.014$ ; T1-T2,  $p = 0.033$ ; T0-T2,  $p = 0.034$ ) and IL-17 (T0-T1,  $p = 0.01$ ; T0-T2,  $p = 0.044$ ) in group with resorption smaller than 1.5 mm; in group with root resorption  $\geq 1.5$ mm, increased the levels IL-10 (T0-T2,  $p = 0.006$ ) and decreased IL-12 (T0-T2,  $p = 0.022$ ).

**Conclusions:** The orthodontic treatment does not alter the systemic level of cytokines IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 and TNF $\alpha$ , but depending on the degree of resorption and the treatment period occurs modulation of cytokine IL-10, IL-12 and IL-17. However as this change is not consistent in all periods evaluated, requires additional study.

**Keywords:** Root resorption, cytokines, immunomodulation, digital radiograph.

## INTRODUCTION

Orthodontic treatment with fixed appliances is recognized as a risk factor for the development of root resorption, with a prevalence of 90 to 100% in treated individuals.<sup>1,2</sup> Root resorption is a complex biological phenomenon, characterized by the loss of cementum and dentin and in permanent human teeth represents a pathological process that causes inflammatory destruction of mineralized dental tissues.<sup>1,3,4</sup> Severe and structurally important resorption occurs in 10% of individuals that undergo orthodontic treatment, therefore developing ways of avoiding or preventing its development would be a benefit to this form of treatment.<sup>5,6</sup>

Both innate and specific immune responses can be activated by dentin matrix proteins associated with root resorption. Following immune stimulation, T cells migrate from blood vessels to sites of inflammation through the extracellular matrix (ECM), and migration is regulated by pro-inflammatory mediators including cytokines, chemokines, and enzymes that degrade the ECM.<sup>7</sup>

Cytokines are multifunctional proteins with local and systemic effects produced by both immune and epithelial cells and have the potential of altering the nature of the developing immune response.<sup>8,9</sup> Orthodontic procedures induce changes to cytokine levels (e.g., TNF $\alpha$  and IL-6) in gingival crevicular fluid or in the human gingival sulcus. The involvement of certain cytokines such as IL-1, IL-6<sup>10,11</sup> and especially TNF $\alpha$ <sup>12-15</sup> on root resorption has been demonstrated in animal models. TNF $\alpha$  is one of the primary mediators of the acute inflammatory response although its primary physiological function is to activate neutrophils and monocytes and recruit them to sites of infection.<sup>8</sup> More recently, Madureira et al. (2012)<sup>16</sup> investigated the kinetics of cytokine and chemokine expression during orthodontic tooth movement and detected elevated levels of IL6 and chemokine ligands 2 and 3 (CCL2 and CCL3, monocyte chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein 1-alpha, respectively) in force-induced periodontal ligament at distinct time after mechanical loading.

During progression of the adaptive immune response, CD4+ T cells differentiate into different T helper (Th) subpopulations including Th1, Th2, and Th17 cells. The primary cytokines produced by these cells are IFN- $\gamma$  (Th1 cells), IL-4, IL-5, and IL-13 (Th2 cells), and IL-17 (Th17 cells). These subpopulations play different roles in mediating host defenses against different types of pathogens and are

involved in different types of tissue injuries resulting from autoimmune diseases.<sup>8</sup> Th1 differentiation is driven by IL-12 and IFN- $\gamma$  and occurs in response to microorganisms which activate dendritic cells, macrophages, and NK cells, and Th2 cells differentiate in the presence IL-4 and develop typically in response to allergens and helminth infections. Th17 cell differentiation is mediated by proinflammatory cytokines produced in response to bacterial and fungal infections<sup>8</sup> and are also the dominant cell population involved in inflammatory autoimmune responses.<sup>17</sup> These significantly distinct immune responses are regulated by regulatory T lymphocytes (Tregs) that can be derived from thymic or peripheral tissues. These Treg populations can act collaboratively in the prevention of autoimmune responses by producing IL-10.<sup>17</sup>

The serum levels of Th1, Th2, Th17, or Treg cytokines such IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, and TNF $\alpha$  were defined following an orthodontic procedure since little information regarding these types of responses in these patient groups is available.

## **METHODS**

### **Casuistry**

Patients (n=34) consisting of 14 males and 20 females, 11-16 years of age with no history of dental trauma, systemic autoimmune disease, radiographic signs of periodontal disease, or periapical lesions (without radiographic signs of tooth resorption), and presenting with either Class I or Class II malocclusion were treated with orthodontic fixed appliances (slots 0.022" X 0.028") using the 'Edgewise' orthodontic technique. At the time of the interview and diagnosis, patients were healthy with no signs or symptoms that might interfere with the normal maxillofacial complex. Patients were also not under the influence of drugs that could interfere with bone remodeling nor had they been subjected to previous orthodontic treatments and/or orthopedic jaw and presented with good oral hygiene.

Periapical radiographs of the 'central maxillary incisors both right and left' (CMIRL) and blood samples were obtained before orthodontic treatment (T0), 6-7 months into treatment (T1), and 12-13 months into treatment (T2).

Considering that visual assessment of periapical radiographs for detection and classification of root resorption has been associated with high error rates, we opted

to use the Digital Radiographic Subtraction (DRS)<sup>18, 19</sup> method as a means of analyzing resorption and calculating possible structural changes to the roots of teeth being evaluated during respective treatment phases. Changes in root length (external apical root resorption) induced by orthodontic treatment were evaluated by comparing the pre-treatment (T0), the 6-7 month treatment (T1) and the 12-13 month treatment (T2) time points.

Changes in root resorption and cytokine levels were analyzed during the 3 treatment phases and patients were divided into 2 groups based on the extent of root resorption: group 1 (root resorption <1.5 mm) and group 2 (root resorption  $\geq$  1.5mm).

The Ethics Committee of the State University of Londrina, approved this study (CAAE n<sup>o</sup> 0015.0.268.000-09).

### **Blood samples**

Ten mL of venous blood was collected at each of the 3 evaluation periods. After collection, serum was separated by centrifugation at 1200 rpm for 10 min and then stored at -20°C until analyzed.

### **Determination of cytokine levels in serum**

IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, and TNF $\alpha$  levels were quantified by commercial ELISA kits (Invitrogen) as described by the manufacturer.

### **Statistical Methods**

Statistical analyses were performed using the ANOVA, Student's *t* test (paired and independent), the Tukey test, or the Pearson's correlation test. *p* values <0.05 were considered significant.

## **RESULTS**

The analysis of data related to apical root resorption of the studied sample, in all three phases (T0, T1 and T2) showed results that allow us to confirm the existence in apical resorption of the central maxillary incisors left and right (CMIRL). According to the results of the ANOVA test, there was a statistically significant difference (*p*= 0.002) between the measurements (in mm) of the teeth phases:

baseline (T0) (average = 16.725) and final (T2) (average = 15.151). The root length of the upper central incisors had an average of 16.725 mm in the T0 stage, 15.691mm an average during T1 and 15.151mm on the T2 phase. That is, from T0 to T1, there was a structural loss of root resorption of an average of 6.19%, of from T1 to T2 phase, of 3.45% and from T0 to T2 phase a loss of 9.42% average. (Figure 1).

TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-12, and IL-17 serum concentrations were similar before treatment (T0) and at 6-7 (T1) or 12-13 (T2) months of orthodontic treatment ( $p < 0.05$ ) (Figures 2-4). Significant differences were observed only in the levels of IL-10, IL-12, and IL-17 after dividing the patients into 2 groups based on their level of resorption: that is individuals with resorption  $< 1.5$  mm or  $\geq 1.5$  mm. The levels of IL-12 ( $p = 0.014$ ) and IL-17 ( $p = 0.01$ ) were decreased in the  $< 1.5$  mm resorption group between T0 and T1 and IL-12 ( $p = 0.034$ ) and IL-17 levels ( $p = 0.044$ ) were decreased between T0 and T2. IL-12 levels were also reduced between T1 to T2 ( $p = 0.033$ ). Cytokine levels in the  $\geq 1.5$  mm resorption group had significantly increased IL-10 ( $p = 0.006$ ) and decreased IL-12 levels ( $p = 0.022$ ) between T0 and T2 (Table 1).

Pearson's correlation analysis identified a negative correlation ( $r^2 = 0.131$ ) between CMIRL, and IL-10 levels at the beginning of orthodontic treatment (T0 to T1,  $p = 0.0353$ ). In other words, the greater the root resorption the lower the IL-10 levels (Figure 5).

There was also a low negative linear correlation between central maxillary incisors, both right and left (CMIRL), and serum IL-17 ( $r^2 = 0.123$ ) between T0 and T1 (Pearson's test,  $p = 0.0416$ ), suggesting that when root resorption is increased IL-17 levels decreased (Figure 6).

## DISCUSSION

Cytokines are important regulatory proteins that need to be present in limited, well-defined quantities systemically for maintenance of health. This work determined whether orthodontic treatment induced systemic changes to cytokine levels. This analysis determined that serum levels of TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-12, and IL-17 remained unchanged during 6-7 (T6) or 12-13 (T12) months of orthodontic treatment, suggesting that conventional orthodontic treatment was not associated with changes to systemic immune responses as previously reported by MacLaine et al. (2010)<sup>20</sup> who found no changes to the TNF $\alpha$  and IL-6 cytokine levels.

The expressions or increased TNF $\alpha$ , IL-1, or IL-6 levels in local tissue or gingival crevicular fluids has been observed during orthodontic treatment, in both human or experimental animals<sup>10-13</sup> suggesting that modulation of cytokines occurred locally.

Madureira et al. (2012)<sup>16</sup>, detected increased IL-6 levels in periodontal ligament after 3 and 15 hours, 3, 12 and 21 days of orthodontic force application but on day 21 reached to control levels. In this study cytokine levels were assessed after 6 and 12 months, considering that evaluated cytokines are produced mainly by cells of adaptive immune response that develop late.

Although a cursory analysis of the data suggested that there were no changes to cytokine profiles in the present study, statistical analysis following separation of the patients into 2 groups based on the degree of resorption (<1.5 vs.  $\geq$ 1.5 mm) demonstrated that cytokines levels were altered depending on the duration of the orthodontic treatment. This analysis demonstrated that there was a decrease in serum IL-12 levels in root resorption group with <1.5 mm between the pre-treatment period (T0) and during 12/13 months of treatment (T2). This cytokine is known to induce Th1 (cellular) immune responses, therefore lower levels of this cytokine were suggestive of a polarized Th2 response<sup>8</sup>. There was no significant change in the Th2 associated IL-4 levels in any group at any time point examined. Since this cytokine is produced in low quantities and normally undetectable in serum, it would be interesting to re-evaluate the serum levels of IL-4 using more sensitive detection methods<sup>8</sup>.

The levels of IL-17 were also significantly decreased in individuals in the <1.5 mm root resorption group, but no change was detected in the  $\geq$ 1.5 mm resorption group. As IL-17 is produced by Th17 cells (the primary cell population associated with autoimmune inflammatory responses<sup>17</sup>) reductions in the level of this cytokine could be beneficial in cases of autoimmunity.

During the development of the immune system, a diverse repertoire of lymphocytes is stimulated, allowing the immune system to recognize and respond to self-antigens.<sup>21</sup> The presence of antibodies in the dentine in cases of radicular resorption suggests an autoimmune response is involved.<sup>15, 22</sup> Reductions in the levels of IL-17 in patients with a lower degree of absorption (<1.5 mm) was in agreement with the hypothesis of autoimmunity, where lower levels of IL-17 were

associated with a lower degree of resorption as a result of negative modulation by this inflammatory cytokine.

A significantly higher concentration of serum IL-10 in the  $\geq 1.5$  mm resorption group between T0 and T2 ( $p= 0.006$ ) was associated with increased IL-12 levels in this group. IL-10 mediates suppression of immune responses which are essential to limiting immune responses elicited in response to numerous pathogens, controlling immunopathological effects, and autoimmune diseases.<sup>23</sup> Considering its immunosuppressive role, we hypothesized that IL-10 levels would be highest in patients with the lowest degree of resorption due to immune suppression mediated by Tregs.<sup>23</sup> Conversely, elevated IL-10 levels may be due to higher resorption rates or autoimmune responses associated with the production of IL-10 as a means of preventing further immune-mediated damage. The IL-10, which is involved in the control of natural immune reaction also inhibits the production of IL-12 by activated macrophages and dendritic cells, in addition to inhibiting IFN $\gamma$ . In this context, it seems quite reasonable to consider immunosuppression IL-12 by the action of IL-10 which, in turn, has proved active in the root resorption as Th2 response.

Systemic changes to cytokine profiles may also occur indirectly as a consequence of stress relating to pain elicited following application of force to teeth.<sup>24</sup> Communication between the central nervous system and the immune system is bidirectional, and psychological stress may have a significant impact on immune function, for example, shifting the Th response from Th1 to Th2 in association with an increase in IL-10 synthesizing T cells<sup>25, 26</sup>. Thus, if the changes in cytokine levels observed during orthodontic treatment are a result of local inflammatory processes, indirect effects caused by stress or other factors will need to be studied further.

Prevention or mitigation of damage resulting from inflammatory apical root resorption are critical to the success of orthodontic treatment. In this context there are many studies describing the involvement of the immune system and root resorption<sup>7,12,13,15,20,22,27</sup>, however, the mechanisms and factors involved in the resorption process have not been fully elucidated.

In conclusion, this work is pioneering research in cytokine of Th1, Th2 and Th17 in orthodontic treatment and had no impact on systemic cytokine levels. However, orthodontic treatment modulated the IL-10, IL-12, and IL-17 serum levels in relation to the degree of resorption as it related to duration of treatment. Additional

studies will be needed to better understand the changes in cytokine expression over time since there was variability in the cytokine profiles described depending on the duration of treatment.

**Contributors:** All of the authors have contributed to this work. CEOL and ENI collected and analysed data and wrote the paper; CEOL, FANI, PLAS and ENI performed the experiments; CEOL, PLAS and ENI collected and analysed data; CEOL, ETC and EOT collected and analyzed data radiographic; ENI and MMI conceived the idea for the paper.

**Acknowledgements:** The authors would like to thank Mari Sumigawa Kaminami and to Nilson de Jesus Carlos, from the Pathological Sciences Department, from the Biological Sciences Center from Londrina`s State University for the technique support.

**Competing interests:** None. The authors did not report any comercial, property or financial interest, on products or companies mentioned on this article.

**Funding:** Araucária Foundation and PROPPG – UEL.

**Ethics approval:** Ethics approval was provided by The Ethics Committee of the State University of Londrina.

**Provenance and peer review:** Not commissioned; externally peer reviewed.

## REFERENCES

- 1- **Pizzo G**, Licata ME, Guiglia R, et al. Root resorption and orthodontic treatment. *Minerva Stomatol* 2007;**56**:31-44.
  
- 2- **Harris EF**, Baker WC Loss of root length and cristal bone height before and during treatment in adolescent and adult orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1990;**98**:463-69.
  
- 3- **Ramanathan C**, Hofman Z Root resorption during orthodontic tooth movements. *Eur J Orthod* 2009;**31**:578-83.
  
- 4- **Fuss Z**, Tsesis I, Lin S Root resorption – diagnosis, classification and treatment choisis based on stimulation factors. *Dent Traumatol* 2003;**19**:175-82.

5- **Segal GR**, Schiffman PH, Tuncay OV Meta analysis of the treatment-related factors of external apical root resorption. *Orthod Craniofac Res* 2004;**7**:71-78.

6- **Krishnan V**, Davidovitch Z Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;**129**:469.e1-469.e32.

7- **Silva TA**, Lara VS, Rosa AL, et al. Cytokine and chemokine response of bone cells after dentin challenge in vitro. *Oral Dis* 2004;**10**:258-64.

8- **Abbas AK**, Lichtman AH, Pilai S Cellular and molecular immunology, 7<sup>a</sup> ed., Saunders 2012.

9- **Borish LC**, Steinke JW Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**111**:S460-S475.

10- **Lowmeyer JJ**, Norton LA, Shafer DM, et al. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor  $\alpha$  in the human gingival sulcus. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995;**108**:519-24.

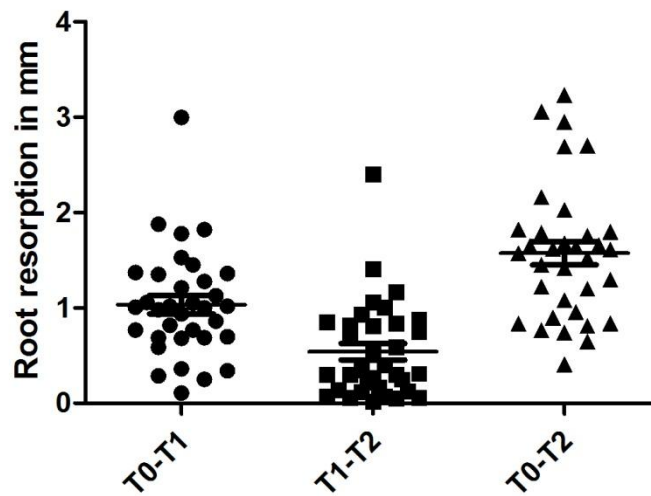
11- **Alhashimi N**, Frithiof L, Brudvik P, et al. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), measure the messenger RNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF-  $\alpha$  at 3, 7, and 10 days after the application of orthodontic force on the maxillary first molars of 12 rats. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;**119**:307-12.

- 12- **Basaran G**, Özer T, Kaya FA, et al. Interleukins- 1B and Tumor Necrosis Factor- alfa Levels in the human sulcus during orthodontic treatment. *Angle Orthod* 2006;**76**:830-36.
- 13- **Ren Y**, Hazemeijer H, Haan B, et al. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *J Periodontol* 2007;**78**:453-8.
- 14- **Yao Z**, Li P, Zhang Q, Schwarz EM, et al. Tumor necrosis factor-alpha increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. *J Biol Chem* 2006;**281**:11846-55.
- 15- **Hidalgo MM**, Itano EN, Consolaro A Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. *Dent Traumatol* 2005;**21**:218-21.
- 16- **Madureira DF**, Taddei SA, Abreu MHNG, et al. Kinetics of interleukin-6 and chemokine ligands 2 and 3 expression of periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;**142**:494-500.
- 17- **Shetty SK**, Mahesh Kumar Y, Smitha PL, Cytokines and Orthodontic tooth movement. *J Dent Sci Res* 2011;**2**:132-141.

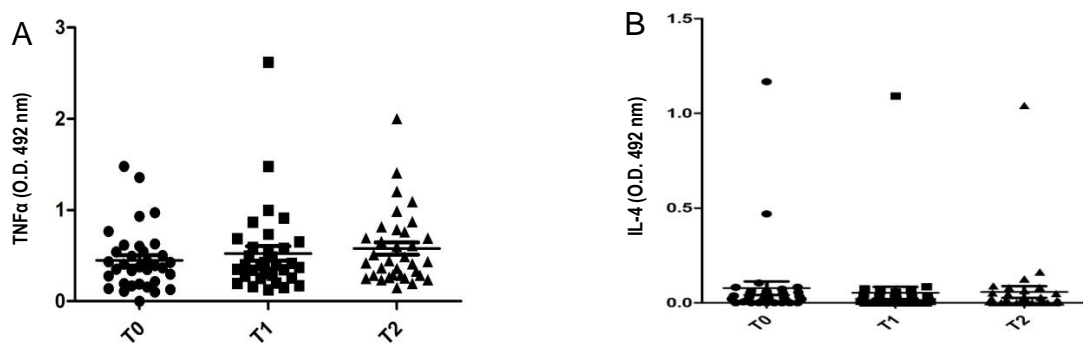
- 18- **Grondahl HG**, Grondahl K, Webber RL A digital subtraction technique for dental radiography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983;**55**:96-102.
- 19- **Ono E**, Medici Filho E, Leite HF, et al. Evaluation of simulated external root resorptions with digital radiography and digital subtraction radiography. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;**139**:324-33.
- 20- **Macline JK**, Rabie ABM, Wong R Does orthodontic tooth movement cause an elevation in systemic inflammatory markers? *Eur J Orthod* 2010;**32**:435-40.
- 21- **Schwartz RS** Diversity of the Immune Repertoire and Immunoregulation. *N Engl J Med* 2003;**348**:1017-26.
- 22- **Ramos SP**, Ortolan GO, Santos LM, et al. Anti-dentine antibodies with root resorption during orthodontic treatment. *Eur J Orthod* 2011;**33**:584-91.
- 23- **O'Garra A**, Vieira PL, Vieira P, et al. IL-10–producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004;**114**:1372-78.
- 24- **Yozgatian JH**, Zeredo JL, Hotokezaka H, et al. Emotional Stress- and Pain-Related Behaviors Evoked by Experimental Tooth Movement. *Angle Orthod* 2008;**78**:487-94.
- 25- **Glaser R**, Kiecolt-Glaser JK Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* 2005;**5**:243-51.

26- **Godbout JP**, Glaser R Stress-Induced Immune Dysregulation: Implications for Wound Healing, Infectious Disease and Cancer. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006;1:421-27.

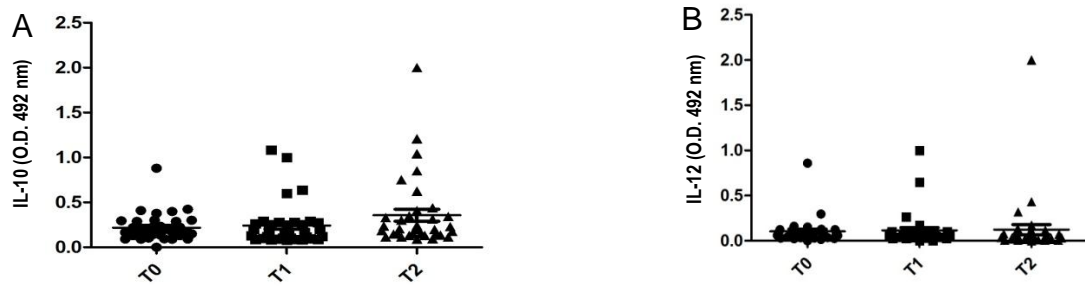
27- **King G**, Courts F Humoral immune response to active root resorption. In: Norton LA, Burstone CJ The biology of tooth movement. Boca Raton, CRC 1989:276-85.



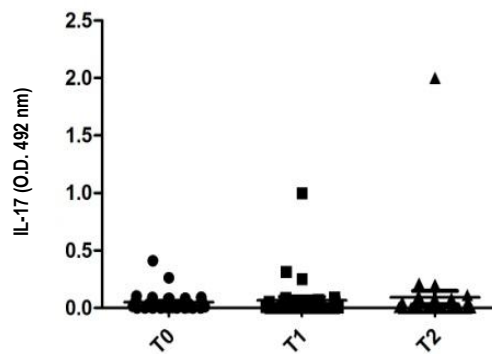
**Figure 1.** Resorption apical mm in the pre-treatment at 6-7 months of treatment (T0-T1), 6-7 months at 12-13 months of treatment (T1-T2) and pretreatment at 12-13 months of orthodontic treatment (T0 - T2). T0 -T1 x T1-T2 and T0 -T2.  $p = 0.0001$ .



**Figure 2.** Level of cytokine TNF-alpha (A) and cytokine IL-4 (B) in serum samples from patients before treatment (T0), 6-7 months (T1) and 12-13 months (T2) treatment orthodontic. T0 x T1 x T2.  $p > 0.05$ .



**Figure 3.** Level of cytokine IL-10 (A) and cytokine IL-12 (B) in serum samples from patients before treatment (T0), 6-7 months (T1) and 12-13 months (T2) of orthodontic . T0 x T1 x T2.  $p > 0.05$ .



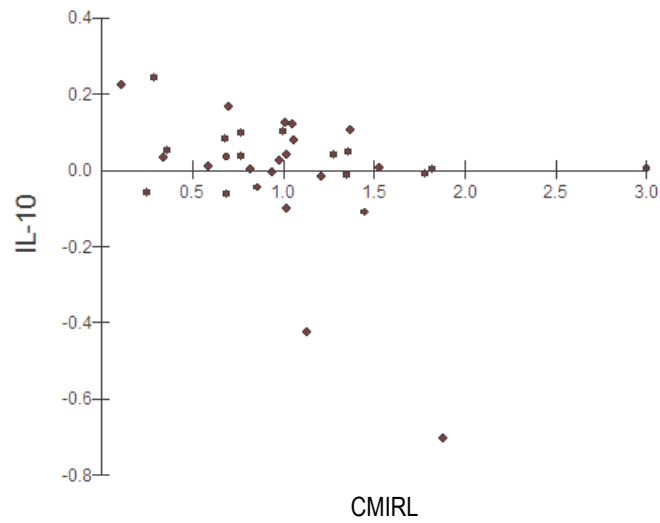
**Figure 4.** Level of cytokine IL-17 in serum samples from patients before treatment (T0), 6-7 months (T1) and 12-13 months (T2) of orthodontic . T0 x T1 x T2.  $p > 0.05$ .

**Table 1.** Comparison of IL-10, IL-12 and IL-17 in each stage and evaluated in accordance with each group depending on the extent of root resorption.

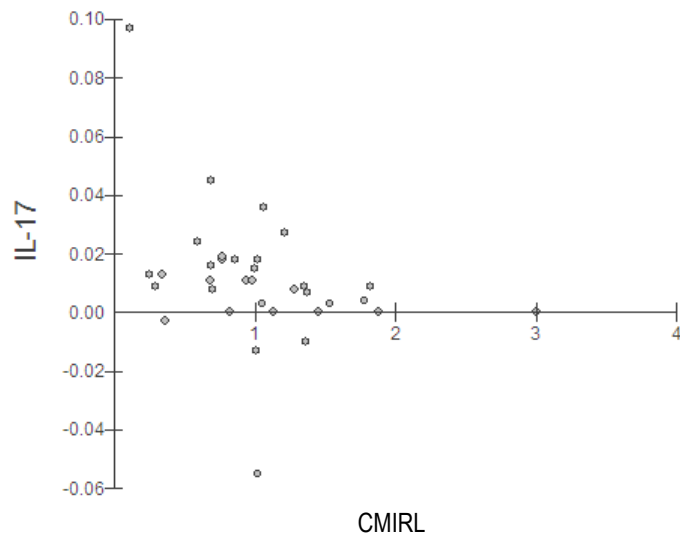
Cytokine	Period	Phase	Resorption	N	Average	Standart deviation	p-value
IL-10	T0-T1	T0	< 1.5	29	0.235	0.155	ns
		T1			0.206	0.136	
		T0	≥ 1.5	5	0.162	0.124	ns
		T1			0.300	0.438	
	T1-T2	T1	< 1.5	33	0.207	0.189	ns
		T2			0.282	0.227	
		T1	≥ 1.5	1	0.638	.	**
		T2			1.207	.	
T0-T2	T0	< 1.5	15	0.221	0.085	ns	
	T2			0.229	0.146		
	T0	≥ 1.5	19	0.226	0.191	<b>0.006</b>	
	T2			0.373	0.334		
IL-12	T0-T1	T0	< 1.5	29	0.118	0.153	<b>0.014</b>
		T1			0.096	0.118	
		T0	≥ 1.5	5	0.056	0.053	ns
		T1			0.047	0.042	
	T1-T2	T1	< 1.5	33	0.088	0.113	<b>0.033</b>
		T2			0.071	0.089	
		T1	≥ 1.5	1	0.100	.	**
		T2			0.007	.	
T0-T2	T0	< 1.5	15	0.135	0.203	<b>0.034</b>	
	T2			0.071	0.104		
	T0	≥ 1.5	19	0.088	0.069	<b>0.022</b>	
	T2			0.067	0.077		
IL-17	T0-T1	T0	< 1.5	29	0.058	0.087	<b>0.01</b>
		T1			0.046	0.073	
		T0	≥ 1.5	5	0.017	0.023	ns
		T1			0.014	0.022	
	T1-T2	T1	< 1.5	33	0.042	0.069	ns
		T2			0.037	0.055	
		T1	≥ 1.5	1	0.010	.	**
		T2			0.000	.	
T0-T2	T0	< 1.5	15	0.063	0.102	<b>0.044</b>	
	T2			0.032	0.056		
	T0	≥ 1.5	19	0.043	0.064	ns	
	T2			0.039	0.055		

\*\* Insufficient data for analysis

ns: not significant



**Figure 5.** Pearson Linear Correlation between IL-10 and root resorption in orthodontic treatment of patients evaluated between phases T0 (pre-treatment) and T1 (6-7 months of orthodontic treatment). Results expressed as ELISA O.D. at 492 nm.  $p = 0.0353$ .  $r^2 = 0.131$ .



**Figure 6.** Pearson Linear Correlation between IL-17 and root resorption in orthodontic treatment of patients evaluated between phases T0 (pre-treatment) and T1 (6-7 months of orthodontic treatment). Results expressed as ELISA O.D. at 492 nm.  $p = 0.0416$ .  $r^2 = 0.123$ .

## ANEXO A



167

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná  
Registro CONEP 268

<b>Parecer Nº 047/09</b> <b>CAAE Nº 0015.0.268.000-09</b> <b>FOLHA DE ROSTO Nº 244773</b>	Londrina, 10 de outubro de 2009.
<b>PESQUISADOR: EIKO NAKAGAWA ITANO</b> (Processo 1644/09)	
Prezado(a) Senhor(a)  <p style="text-align: center;">O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p style="text-align: center;"><b>"ANÁLISE DE NÍVEL DE IGE, SUB-CLASSES DE IGG AOS ANTÍGENOS DENTINÁRIOS E DE NÍVEL DE CITOCINAS IL-4, IL-10, IL-17 TNFA EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTO ORTODONTICO"</b></p> <p style="text-align: center;">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.</p>	
Situação do Projeto: <b>APROVADO</b>	
<p style="text-align: center;">Atenciosamente,</p> <p style="text-align: center;"><i>Ester M. O. Dalla Costa</i>  <b>Prof. Dra. Ester M. O. Dalla Costa</b>  Coordenadora  Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UEL</p>	