

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

**IMUNOLocalização de células positivas para a enzima
DIACILGLICEROL QUINASE α (DGK α) em polpas de ratos expostas
à contaminação**

GABRIELA XAVIER FAGUNDES

PORTO ALEGRE / 2014

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

GABRIELA XAVIER FAGUNDES

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA A ENZIMA
DIACILGLICEROL QUINASE α (DGK α) EM POLPAS DE RATOS EXPOSTAS
À CONTAMINAÇÃO**

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos obrigatórios para a obtenção do
título de Mestre na área de Endodontia

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO POLI DE FIGUEIREDO

PORTO ALEGRE / 2014.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido esposo, **Pedro Castiel Lima**, pois sem o seu apoio, carinho, paciência e compreensão nada disso seria possível.

E à minha amada avó, **Alba Ione de Moraes Xavier**, que nos deixou durante esse percurso, porém seus ensinamentos e a sua forma alegre e positiva na maneira de ver a vida, trouxeram lições que levarei sempre comigo. A ela, meu amor eterno!

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Simone Xavier Fagundes e Inocêncio Kirchoff Fagundes**, pelo apoio e pela compreensão. Obrigada por terem oportunizado minha formação me dando asas para voar. Vocês são a minha base. Amo vocês!

À minha irmã, **Helena Xavier Fagundes**, pelo carinho, paciência e admiração. Sei que, em muitos momentos da tua vida, te espelhas em mim e isso é um estímulo permanente na minha busca em ser uma pessoa melhor.

À família do meu esposo, minha segunda família, pelo apoio incondicional em todos os momentos da nossa vida, em especial à minha sogra, **Lúcia Amada Castiel Lima**, e ao meu sogro, **Antônio Ernani Martins Lima**. Sem vocês, tudo seria bem mais difícil. A vocês, todo meu carinho e admiração.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelas oportunidades oferecidas para o desenvolvimento deste estudo.

Ao meu orientador, professor **José Antônio Poli de Figueiredo**, por todos os ensinamentos, por instigar a nossa evolução, pela sua dedicação e incentivo à pesquisa. Foi uma grande honra ser sua orientada.

Ao professor **Eraldo Luiz Batista Júnior**, por ter acreditado no meu potencial, me desafiando a ir além na busca do conhecimento. Isto me fez crescer tanto como profissional, quanto como pessoa. A nossa convivência, embora breve, trouxe muitos ensinamentos.

À professora **Roberta Kochemborger Scarparo**, por ter dividido comigo seus conhecimentos e por toda paciência, empenho e dedicação para com este trabalho. Contar com a tua ajuda foi fundamental. Sempre serás lembrada de uma maneira especial por mim.

À professora **Maria Martha Campos**, por disponibilizar o laboratório de toxicologia pré-clínica e pelas brilhantes aulas ministradas. És uma pessoa admirável e um exemplo de pesquisadora.

À minha colega e amiga **Cauana Oliva Tavares**, por estar comigo durante todas as etapas desta pesquisa, dividindo aflições, angústias, medos e também bons momentos. Contar com o teu apoio e com tuas ideias brilhantes, foi fundamental construção deste trabalho. És uma pessoa iluminada e especial.

Aos colegas **Magda de Sousa Reis, Rafael Chies Hartmann e Natália Pradella Cignachi**, pela ajuda na parte experimental do trabalho e pela oportunidade de maravilhosos momentos de convívio.

Às colegas e amigas **Daiana Flores Gonçalves Giannastasio e Helena Fetter Fillippini**, pelo companheirismo e por todas as vezes que dedicaram um pouquinho de seu tempo para me escutar e me apoiar. Vocês estão no meu coração.

Às pós-doutorandas **Renata Dornelles Morgental e Silvana Beltrami Gonçalves Waltrick**, pela ajuda nesta pesquisa e por dividirem comigo seus conhecimentos.

À professora **Patrícia Maria Poli Köpper Móra**, sempre presente na minha vida desde a especialização. Durante o mestrado, me incentivou e me apoiou em alguns momentos difíceis. Tenho por ti um imenso carinho e admiração.

Às professoras **Anna Christina Mediros Fossati e Liziane Bernardi**, por terem dividido comigo ideias e dado sugestões que ajudaram no desenvolvimento do trabalho.

À professora **Fabiana Vieira Vier-Pelisser**, pelas ótimas aulas de didática e por partilhar comigo momentos de construção do conhecimento.

Aos colegas e amigos **Tiago André Fontoura de Mello e Luiza Wessel**, pelas conversas, troca de conhecimentos e momentos de descontração.

Aos demais colegas pela oportunidade de compartilharmos o conhecimento.

À **Tiago Giuliani** pelo empenho na realização da imunohistoquímica deste estudo.

À **Luciana Adolfo Ferreira** pelo cuidado e dedicação no processamento histológico deste trabalho

À professora **Fernada Morrone**, por disponibilizar o laboratório de Farmacologia Aplicada.

Aos **professores do programa de pós-graduação**, pelas aulas ministradas.

Aos **funcionários da PUCRS**, que de alguma forma participaram e contribuíram para a realização desta pesquisa

A todos os **amigos e familiares**, por me apoiarem e torcerem por mim, contribuindo para minha realização pessoal e profissional.

A todos vocês, o meu muito obrigada!!

Resumo

RESUMO

Introdução: A polpa dentária é formada por um tecido conjuntivo frouxo, que reage frente a um agente agressor patogênico, sendo a inflamação uma de suas manifestações iniciais. A DGK α é uma das enzimas-chave envolvida em eventos celulares da inflamação. A mesma participa do recrutamento de neutrófilos para o local da injúria e da regulação da produção de superóxido. O objetivo deste estudo foi avaliar, em ratos, a localização da DGK α em polpas saudáveis e em polpas inflamadas/infectadas. **Metodologia:** Foram utilizados dezoito (18) ratos machos *Wistar*. Os animais foram divididos em três grupos de seis animais cada. No grupo 1 (grupo controle), não foi realizado nenhum procedimento. Nos grupos 2 e 3, a polpa dentária dos primeiros molares do lado esquerdo foi exposta ao meio bucal por 24 horas e por 7 dias, respectivamente. A eutanásia foi realizada após os períodos experimentais, e as mandíbulas foram dissecadas para análise histológica e imunolocalização da enzima DGK α . **Resultados:** A avaliação histológica da polpa dentária mostrou que a exposição tecidual levou a eventos inflamatórios e degenerativos, que variaram de acordo com o período de tempo. Nos grupos 2 e 3, houve marcação da DGK α em neutrófilos e áreas próximas a abscessos, sendo detectada em uma maior amplitude no período de 24 horas. **Conclusões:** A DGK α é expressa em estágios iniciais da inflamação, não sendo relacionada com a extensão da inflamação pulpar. O entendimento do papel da DGK α na cascata de eventos da inflamação pulpar pode trazer informações para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que promovam o reparo pulpar.

Palavras-chaves: inflamação pulpar, diacilglicerol, diacilglicerol quinase α , neutrófilos, modelos animais.

Abstract

ABSTRACT

Introduction: Dental pulp is composed of loose connective tissue, which reacts when facing a pathogenic agent, and the inflammation is the first response. DGK α is one of the key enzymes involved on inflammations cellular events. It participates on the neutrophils recruiting to the injury site and on the regulation of superoxide production. The aim of this study was to evaluate the localization of the DGK α in healthy and inflamed/infected dental pulp of rats.

Methods: Were used eighteen (18) male Wistar rats. The animals were divided into three groups of six rats each. In Group 1 (control group), no cavity opening was performed. In Groups 2 and 3 dental pulp of the left first molars was exposed to oral environment for 24hours and 7 days respectively. Euthanasia was performed after the experimental periods and the jaws were dissected for histological evaluation and immunodetection of DGK α enzyme.

Results: Histological analysis of the dental pulp showed that tissue exposure led to inflammatory and degenerative events, which varied in their extension according to the experimental period of time. In groups 2 and 3, DGK α immunolabeling was observed in neutrophils and abscessed areas, being detected on a greater amplitude of pulp tissue in the 24 hour period.

Conclusions: DGK α is expressed on the initial stages of pulp inflammation, although there is no relation with its extent. The understanding of the DGK α role in the pathways of pulp inflammation can help the development of new therapeutic strategies to promote pulp repair.

Key words: pulp inflammation, diacylglycerol, diacylglycerol Kinase α , neutrophils, animal models.

LISTA DE ABREVIATURAS

- DAG – Diacilglicerol
- DGK – Diacilglicerol quinase
- DGK α – Diacilglicerol quinase alpha
- DGK β – Diacilglicerol quinase beta
- DGK γ – Diacilglicerol quinase gamma
- DGK δ – Diacilglicerol quinase delta
- DGK ϵ – Diacilglicerol quinase epsilon
- DGK ζ – Diacilglicerol quinase zeta
- DGK η – Diacilglicerol quinase eta
- DGK θ – Diacilglicerol quinase theta
- DGK ι – Diacilglicerol quinase iota
- DGK κ – Diacilglicerol quinase kappa
- fMLP – N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
- GP – proteína G
- Ins3 – Inositol Trifosfatase
- IP3 – inositol 1,4,5 trifosfato
- LAP – periodontite agressiva localizada
- mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
- PA – ácido fosfatídico
- PAP – fosfohidrolase do ácido fosfatídico
- PC – fosfatidilcolina
- PIP2 – fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
- PKC – proteína quinase C
- PKD – proteína quinase D
- PLC – fosfolipase C
- PLD – fosfolipase D
- PMNs – neutrófilos polimorfonucleares

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1 Etiopagenia das alterações pulpares	10
1.2 Inflamação	12
1.3 Diacilglicerol (DAG) como um mediador lipídico da função celular	14
1.4 DAG como um mediador da função e do desenvolvimento dos neutrófilos	17
1.5 Diacilglicerol quinase (DGK) como reguladora dos níveis de DAG	18
1.6 A isoforma alpha da diacilglicerol quinase (DGK α) no processo inflamatório	19
1.7 Objetivos	20
1.7.1 Objetivo geral	20
1.7.2 Objetivos específicos	21
2. ARTIGO	22
3. DISCUSSÃO GERAL	39
4. CONCLUSÕES	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
6. ANEXO	53
7. APÊNDICES	55

1. Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Etiopatogenia das alterações pulpares*

A polpa dentária é um tecido conjuntivo enclausurado por paredes rígidas de dentina mineralizada. Polpa e dentina estão estrutural e funcionalmente integradas, formando o chamado complexo dentino-pulpar. O tecido conjuntivo é responsável por diversas atividades que iniciam e orquestram as reações contra a invasão patogênica, servindo como um local essencial de defesa do hospedeiro. Também apresenta capacidade de cicatrização e reparo (1). Diante de qualquer agressor patogênico que ultrapasse o limiar de tolerância fisiológico da polpa, o tecido conjuntivo reagirá (2).

Dentre os potenciais agressores do complexo dentino-pulpar, existem agentes de origem química (ácidos, materiais oriundos de restaurações de resina), física (térmicos) e biológica (micro-organismos). Os agentes de origem biológica são os mais importantes no que tange à indução e, principalmente, à perpetuação das patologias pulpares e perirradiculares (3). Quando o complexo dentino-pulpar é infectado, os tecidos reagem à invasão bacteriana em uma tentativa de erradicá-la, porém, se a infecção não é controlada pelo próprio organismo ou por intervenção profissional, surgem doenças pulpares tais como pulpites e necroses (4).

Em 1894, Miller realizou o primeiro estudo que sugeriu a associação entre bactérias e patologias pulpares. O autor observou, através de bacterioscopia do esfregaço de material coletado do interior de canais radiculares infectados, três tipos de células bacterianas: cocos, bacilos e espirilos. Não foi possível, porém, o cultivo de outras bactérias tendo em vista as técnicas de cultivo disponíveis na época (5).

Já em 1965, Kakehashi, Stanley e Fitzgerald, em um estudo clássico da literatura, avaliaram as alterações patológicas pulpares que ocorriam após a exposição pulpar ao meio bucal em dentes de ratos convencionais e em dentes de ratos "germ-free". Os resultados mostraram que, após a exposição pulpar, em animais convencionais, ocorreu o desenvolvimento de inflamação

pulpar crônica, necrose, granulomas e abscessos. Ao contrário, em animais “germ-free”, após exposições pulpare, não ocorreu necrose pulpar, nem formação de granulomas ou abscessos. Ocorreu mínima inflamação pulpar e formação de ponte de dentina, evidenciando, dessa forma, o papel dos micro-organismos na patogênese das doenças pulpare. A partir desse estudo, ficou estabelecida a relação causa-efeito entre micro-organismos e patologias pulpare e perirradiculares (6).

Os micro-organismos podem atingir o complexo dentino-pulpar através de lesões de cárie, procedimentos cirúrgicos, fraturas, traumas, exposição de túbulos dentinários e anacorese hematogênica (7). Diferente de outros tecidos conjuntivos, o complexo dentino-pulpar apresenta um tipo de defesa e reação de reparo próprios (1). Ele tenta promover o bloqueio das injúrias através de três mecanismos: a esclerose dentinária, a dentina reparadora e a inflamação pulpar (8).

Uma das formas mais comuns de dano dentário, através da invasão microbiana, é a cárie. Em um primeiro momento, quando os processos odontoblásticos estão presentes, a polpa é capaz de reagir diminuindo a permeabilidade dentinária, com o objetivo de minimizar a agressão das toxinas microbianas, através da esclerose dentinária, preenchendo os túbulos dentinários com íons cálcio. Outra tentativa para impedir o avanço da cárie é a formação de dentina reparadora na porção coronária da câmara pulpar. Essa formação é proporcional à quantidade de destruição na dentina primária (8). A velocidade de progressão da cárie influencia na resposta pulpar. Quando ocorre intensa invasão microbiana no complexo dentino-pulpar, dá-se início a um processo inflamatório pulpar, que pode ser agudo ou crônico (8).

Após o dano tecidual, mediadores químicos endógenos (como leucotrienos e citocinas) e exógenos (de origem bacteriana) são liberados e, por sua vez, dão origem aos primeiros sinais de inflamação. Os mediadores químicos exógenos atuam recrutando neutrófilos para o local da injúria, que agem na fagocitose de micro-organismos e de restos celulares. Às vezes, porém, o conteúdo dos grânulos de neutrófilos pode ser, inadvertidamente,

derramado no meio extracelular, causando danos no tecido local e amplificação de sinais agudos inflamatórios. Os mediadores químicos endógenos, liberados pelas células que se infiltram no local da injúria, são importantes para a defesa do hospedeiro, mas também podem, inadvertidamente, levar a danos teciduais (9).

A polpa dental é equipada a fim de montar uma resposta inata contra a invasão de bactérias da cárie, o que pode retardar a irrupção bacteriana. Entretanto, em muitas circunstâncias, a localização de bactérias da cárie pode dificultar que elas sejam mortas ou eliminadas por fagócitos. Em vez disso, a infecção persistente leva à ativação da imunidade adaptativa, à inflamação acentuada e ao aumento de edema resultante da pressão intrapulpal, tornando-se prejudicial à polpa. Por outro lado, a experiência clínica indica que polpas inflamadas podem se recuperar, se a maioria dos antígenos forem removidos suficientemente cedo (10).

1.2 Inflamação

A inflamação pode ser definida como um processo de reação da microcirculação diante de uma injúria aos tecidos, com a consequente movimentação de elementos intravasculares como fluidos, moléculas e células para o espaço extravascular (11). Trata-se de uma resposta protetora dos tecidos que permite a sobrevivência dos órgãos a agressões e os prepara para o processo de reparo (12). Tal processo está diretamente relacionado com o desenvolvimento de sinais e sintomas das patologias pulpares e periodontais apicais, e com a patogênese e mecanismos de reparo dessas doenças (3).

Quando ocorre agressão tecidual, é desencadeada uma resposta inflamatória. Esta induz o rompimento da homeostasia mantida por meio da relação célula-meio (fluidos extracelulares e a microcirculação). Logo que ocorre intensa invasão bacteriana no complexo dentino-pulpar, dá-se início a um processo inflamatório agudo, que é independente do agente agressor. Os objetivos de tal processo são localizar e eliminar o antígeno, remover os

tecidos degenerados e preparar a área que sofreu a injúria para a reparação tecidual (3,12). A polpa dentária responde a uma irritação avançada de forma compartimentalizada, sendo que as áreas mais próximas da irritação são as mais afetadas, pois sofrem manifestações inflamatórias mais severas. Em contrapartida, regiões pulpares vizinhas e distantes podem ter inflamações suaves ou até apresentarem aspectos normais (13).

Após a agressão tecidual, as arteríolas sofrem vasoconstrição, mediada por fibras nervosas autônomas. Logo ocorre a vasodilatação, que, inicialmente, é arteriolar, com conseqüente aumento da pressão hidrostática vascular (hiperemia), que provoca um aumento da passagem de fluidos com baixo conteúdo proteico em nível de capilares. Também estão envolvidos nessa fase mediadores químicos endógenos.

À medida que mais sangue passa pelos vasos, capilares e vênulas também dilatam e ocorre um aumento da permeabilidade vascular em função da ação de mediadores químicos e da pressão intravascular elevada. As vênulas são os principais vasos envolvidos no aumento de permeabilidade mediado por substâncias vasoativas. Em conseqüência, ocorre a saída de fluido rico em proteínas (exsudato) para o meio extravascular. A exsudação resulta no aumento do fluxo sanguíneo e no aumento da viscosidade do sangue. A saída anormal de fluidos dos vasos induz aumento da pressão hidrostática tecidual, com conseqüente formação de edema. Em certo momento, ocorre uma queda acentuada do fluxo sanguíneo e os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) deixam sua posição mais periférica, próxima ao revestimento endotelial. A marginação de neutrófilos aumenta a resistência ao fluxo sanguíneo, favorecendo a estase vascular. Em seguida, os neutrófilos começam a circular pelo endotélio, até aderirem firmemente a ele. Uma vez aderidos, os neutrófilos emitem pseudópodos entre as junções endoteliais ampliadas e migram para o espaço extravascular (diapedese). Os neutrófilos são as primeiras células que deixam os vasos e adentram no local da agressão. Eles fagocitam bactérias, substâncias estranhas, complexos imunes e tecidos degenerados. Também podem perpetuar a resposta inflamatória por liberarem enzimas, mediadores químicos e radicais livres tóxicos(3).

Neuropeptídios, liberados pelas terminações nervosas periféricas, podem atuar diretamente no tecido-alvo pela estimulação de quimiotaxia leucocitária, regulando a liberação de mediadores inflamatórios dos macrófagos e linfócitos e, também aumentando a proliferação de fibroblastos (3).

Os eventos que ocorrem durante essa fase visam ao recrutamento de células de defesa à região afetada. Tal processo ocorre de acordo com a intensidade da agressão, e após o antígeno ser removido, os tecidos são reparados. Caso o antígeno não seja eliminado, os microorganismos colonizam o sistema de canais radiculares, e uma inflamação crônica é instalada, com envolvimento adicional de células imunocompetentes, como os linfócitos T e B, que são células que agem na eliminação de agentes agressores persistentes (3,12).

1.3 Diacilglicerol (DAG) como um mediador lipídico da função celular

O DAG é reconhecido como um importante mensageiro lipídico de sinalização intracelular. Também atua como um lipídio biossintético de caminho intermediário (14). É muito conhecido por agir como um segundo mensageiro que modula a atividade da proteína Kinase C (PKC) na transdução do sinal celular. Sua atividade desempenha um papel central no controle da proliferação, função e diferenciação de muitos tipos diferentes de células (15, 16). Também ativa outras proteínas, afetando potencialmente outras funções celulares, tais como a reorganização citoesquelética, o crescimento celular e a carcinogênese (14).

Ele sofre aumento transitório dos níveis intracelulares após a conexão de ligantes estimulatórios (17) e, para manter a homeostase celular, seus níveis devem ser muito bem regulados (18). Frequentemente, o aumento dos níveis de DAG citosólicos está correlacionado a mudanças no comportamento das células pela rápida resposta a hormônios, neurotransmissores e fatores agonistas de crescimento (19). Portanto, níveis alterados do segundo mensageiro (DAG) desempenham um papel importante na transformação celular.

Os mensageiros e os intermediários que conduzem à ativação de fatores de transcrição são compostos de produtos e enzimas efetoras em um padrão de células / tecido-específico (20). Tem sido demonstrado que a maioria das proteínas mitogênicas e estimulantes não pode penetrar diretamente na barreira fosfolipídica imposta pela membrana celular. Assim, a conexão específica de um ligante ao seu receptor deve desencadear extracelularmente o sinal efetor. Este é um processo altamente regulado que, em última instância, conduz à ativação de funções celulares específicas. Defeitos neste sistema têm sido associados à alteração do comportamento celular normal (18,21). Dentro deste sistema complexo, lípidos são mediadores importantes de transdução de sinal, que são geralmente associados com a membrana plasmática ou são parte integrante da mesma (22).

DAGs estão envolvidos em diferentes funções tais como a ativação de fatores de troca de nucleotídeos de guanina como vav e Ras-GRP (23, 24), síntese dos principais fosfolípidos (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) e triacilgliceróis (25). Tem sido mostrado que o DAG é necessário para o recrutamento da proteína quinase D (PKD) citosólica para a rede trans-Golgi e que, também, desempenha um papel importante no carregamento de transportadores para a superfície celular (26).

O DAG é enzimaticamente gerado através de vias diferentes. Pode ser formado por hidrólise do diacilglicerol-3-fosfato-(ácido fosfatídico), um produto de glicerol-3-fosfato (22), ou por hidrólise de 4,5 fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) através da fosfolipase C (19,27).

Um dos mecanismos clássicos de geração de DAG envolve a ativação da fosfolipase C (PLC). Após a junção de ligantes a receptores acoplados à proteína G e ativação do complexo multimérico por guanosina trifosfato (GTP), o PLC é ativado e promove a hidrólise do componente integral da membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2). Esta reação origina dois subprodutos, DAG e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (18). IP3, um produto polar, regula a taxa de fluxo de Ca^{2+} através de um canal de condutividade elevado a partir do retículo endoplasmático (28,29). Ao atuar alostericamente, o DAG

ativa a proteína quinase C (PKC) e aumenta a sua afinidade pelo Ca^{2+} (30), que, por sua vez, propaga efeitos de sinalização do fluxo através da fosforilação. No caso de um processo inflamatório, o sinal é propagado, com o objetivo de ativar neutrófilos para que eles cheguem até a área injuriada, levando, em última análise, à ativação de fatores de transcrição exclusivos e, mais especificamente, com relação aos PMN, à montagem de NADPH oxidase, que é o componente chave na produção de superóxido (Fig. 1).

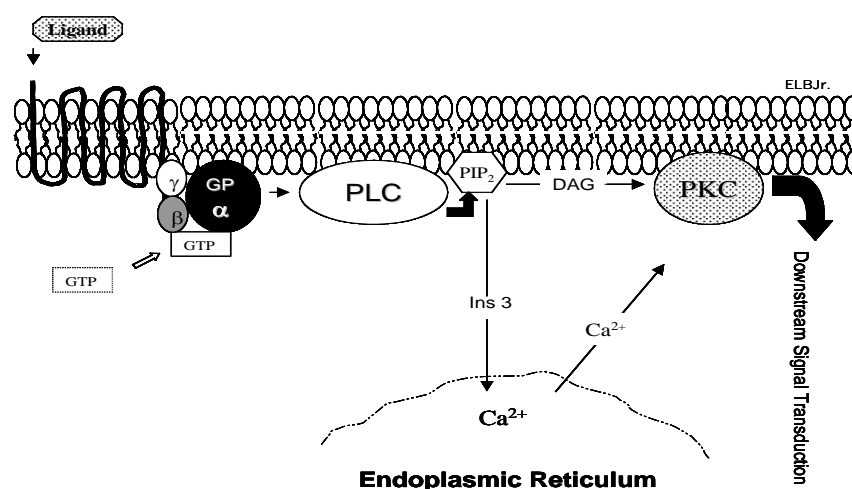


Figura 1. Visão geral da proteína G, mediada em cascata pela Fosfolipase C. A GTP liga-se a GP causando a ativação da PLC, que cliva PIP_2 em inositol 3,4,5fosfato e diacilglicerol (DAG). Ins3 promove a liberação de Ca^{2+} do RE, enquanto DAG ativa diretamente e aumenta a afinidade da PKC para o Ca^{2+} . Uma vez ativada, a PKC irá prosseguir com o fluxo de transdução de sinal. (PLC = Fosfolipase C; Ins3 = Inositol TriFosfatase; GP = Proteína G; PIP_2 = Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato; DAG = Diacilglicerol). Fonte: Batista (31) .

Os níveis de DAG e IP_3 estão apenas temporariamente sobrerregulados após a hidrólise do PIP_2 e são convertidos em produtos inativos para a célula retornar ao seu estado basal (18). Na maioria das células agonista-estimuladas, o DAG parece ser gerado através da ativação de mais de uma via de sinalização (19,27). Três vias principais têm sido envolvidas na geração de DAG, envolvendo PLC, PLD e a conversão de ceramida para esfingomielina catalisada por fosfatidilcolina (colinofosfotransferase ceramida). A fosfolipase D (PLD) também medeia o

aumento de DAG através de uma série de reações bioquímicas diferentes. O produto primário de ação PLD em fosfatidilcolina (PC) é o ácido fosfatídico (PA), que é rapidamente convertido em DAG, uma vez que a enzima de conversão, a fosfohidrolase do ácido fosfatídico (PAP), parece ser regulada pela concentração de substrato (32).

Parece haver alguma controvérsia no que diz respeito à via principal geradora de DAG, embora sugerindo que as diferentes vias podem atuar como alternativa para manter os níveis de DAG (19). Curiosamente, em certos sistemas celulares, PLC parece regular a atividade da PLD. Linhas de fibroblastos de células 3T3 transfectadas com vetores de expressão que não possuem a 1cDNA PLC- λ , sofrem uma redução de dez vezes na ativação de PLD quando comparadas com linhas de células do tipo original após ativação com PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) (33).

1.4 DAG como um mediador da função e do desenvolvimento de neutrófilos

Duas funções básicas relacionadas à fagocitose dos neutrófilos: quimiotaxia e produção de radicais oxidativos têm sido associadas à proteína G e o DAG. Os neutrófilos humanos ativados por diferentes peptídeos respondem pela redução do oxigênio molecular para os metabolitos reativos, tal como o ânion superóxido (O_2^-) (34). Essa reação é conduzida através da redução de um único elétron de oxigênio molecular catalisado pela NADPH oxidase, levando à formação de O_2^- , o que, por sua vez, é rapidamente convertido em uma série de intermediários, tais como H_2O_2 e HOCl (35).

A NADPH oxidase é uma enzima multimérica. Sua ativação é um fator chave na função de neutrófilos e seu funcionamento tem sido associada com DAG e PA. Observações de Waite et al. (36) sugeriram que o PA gerado pela PLD poderia ativar o fluxo da proteína quinase capaz de fosforilar o p47-phox (componente fagocítico da oxidase) da NADPH oxidase. Tais observações têm sido questionadas por outros (35), que constataram que um modelo PA semelhante de células livres foi capaz de ativar diretamente a geração de O_2^- .

sem qualquer exigência de ATP, o que seria esperado para uma quinase ser funcional. Os resultados também salientam que, uma vez que o DAG foi adicionado ao sistema, sua influência na ativação da NADPH oxidase depende da sua conversão para PA através da fosforilação da enzima DGK. Quando um inibidor DGK foi adicionado ao sistema, os níveis de PA foram subótimos para ativação da NADPH oxidase, mas um efeito sinérgico foi observado com o DAG não metabolizado, o que levou à ativação da oxidase. Embora essas experiências tenham sido realizadas num sistema isento de células, que não reproduziu exatamente todas as condições fisiológicas do ambiente celular, elas apontam que, mesmo na ausência de DGK, a ativação sustentada da NADPH oxidase pode ser influenciada sinérgicamente pela acumulação de DAG. Um aumento dos níveis de mensageiros secundários tem sido relacionado à sustentação ou ao aumento no metabolismo oxidativo em PMNs periféricos isolados do sangue de indivíduos normais e estimulados com fMLP (37).

Levando em consideração que o DAG participa da quimiotaxia de neutrófilos, é possível concluir que ele desempenha um papel importante no processo inflamatório.

1.5 Diacilglicerol quinase (DGK) como reguladora dos níveis de DAG

DGK é uma família conservada de proteínas encontradas em diversas espécies, como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, mamíferos e plantas. Também é expressa por bactérias (*Escherichia coli*), embora não tenha homologia com as espécies mencionadas anteriormente (17). DGKs têm sido identificadas em diferentes tecidos e células humanas e são classificadas em cinco grupos: Tipo I (DGKs α , β 1, β 2, γ 1, γ 2), tipo II (DGKs δ 1, δ 2, η 1, η 2, κ), tipo III (DGK ϵ), tipo IV (DGKs ζ 1, ζ 2, ι 1, ι 2, ι 3) e tipo V (DGK θ) (14).

Acredita-se que a DGK é uma das enzimas-chave intimamente ligada a eventos celulares que sinalizam mediadores lipídicos, porque ela está diretamente envolvida no controle das duas moléculas mensageiras de

lipídios (38). Ela afeta a regulação dos níveis intracelulares do conjunto de DAG (20, 25), metabolizando-o e convertendo-o em ácido fosfatídico (PA), um precursor de fosfatidilinosítes (38, 39).

Embora a DGK contribua para o aumento dos níveis de PA, o glicerolfosfolípido parece ser igualmente acionado por conversão de PLD em fosfatidilcolina (40). Eritrócitos de ratos espontaneamente hipertensos apresentaram aumento na atividade de PLC causando a acumulação de DAG (21). Essas alterações foram acompanhadas pela diminuição dos níveis de DGK, sugerindo que a ativação sustentada da proteína quinase C pode estar relacionada à constrição sustentada do músculo vascular nestes animais. Portanto, DGKs são consideradas elementos importantes, que atuam não só como fatores de limitação da taxa de níveis de DAG, mas também de transdução de sinal de PKC (18).

1.6 A isoforma alpha (α) da DGK no processo inflamatório

Diferentes isoformas de DGK são codificadas por genes distintos (41, 42) e parecem estar envolvidas na regulação do DAG gerado em diferentes compartimentos celulares. As DGKs foram agrupadas de acordo com suas semelhanças estruturais (18), algumas apresentando variantes da mesma isoforma (43 - 45). A expressão de diferentes isoformas de DGK é tecido-específica (46 - 48) e está relacionada às diferentes espécies moleculares de DAG encontradas em repouso e em células estimuladas (49). A variedade de isoformas DGK caracterizadas até agora salienta a importância reguladora do DAG como um mensageiro secundário e a diversidade e complexidade do regulamento de lipídios mediando a transdução de sinal.

Tem sido observado que uma rápida mudança nos níveis de DAG nuclear ocorre na leucemia humana em linhas de células HL-60, após a adição de solventes polares, conduzindo a um aumento progressivo de DAG ao longo da diferenciação (50). Buscou-se caracterizar a expressão das DGKs durante a diferenciação celular de HL-60 através de cultura de células e isolamento de neutrófilos do sangue periférico de células HL-60. Das nove

isoformas de DGK avaliadas (α , δ , ϵ , γ , ζ , β , θ , ι e η), apenas cinco (α , δ , ϵ , γ e ζ) foram expressas em células HL-60. A DGK α estava virtualmente ausente em células não diferenciadas, mas foi regulada positivamente durante a diferenciação de células HL-60 para neutrófilos. As outras isoformas (δ , ϵ , γ e ζ) foram expressas em células HL-60 indiferenciadas, sendo substancialmente reduzidas durante a diferenciação (15), mostrando que a DGK α parece estar envolvida no controle do DAG gerada no citosol por fosfolipase C de hidrólise mediada de PIP₂, que é conhecido por mediar a ativação de PKC e a síntese de NADPH (51 - 53).

Os níveis de mRNA de diferentes isoformas de DGKs foram avaliados através da coleta de sangue de pacientes normais e pacientes com periodontite agressiva localizada (LAP). As DGKs α , γ e δ foram as que apresentaram maiores níveis de mRNA em neutrófilos. Os níveis das isoformas α e γ aumentaram em neutrófilos de pacientes normais e diminuíram levemente em pacientes com LAP sobre a estimulação de N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (54).

Pelo fato de a isoforma α da DGK ser umas das de maior expressão na diferenciação celular de neutrófilos e a primeira isoforma a ser descoberta, será caracterizada neste estudo. Em particular, é necessário compreender como se expressa em tecido pulpar, pois até o momento, não existe nenhum estudo que tenha investigado a presença dessa enzima em tal tecido.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo geral

Caracterizar o processo inflamatório e fazer a imunolocalização da enzima DGK α em polpas dentárias de ratos expostas e não expostas ao meio bucal.

1.7.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as alterações patológicas observadas e determinar diferentes subpopulações celulares, por meio de análise histológica, nos tempos experimentais de 24 horas e 7 dias;

- Avaliar a distribuição de células positivas para a DGK α por meio de imunohistoquímica;

- Avaliar o efeito da contaminação pulpar sobre a imunoreatividade da DGK α nos grupos experimentais de 24 horas e 7 dias.

2. Artigo

*2. ARTIGO***DGK α enzyme immunolocalization in dental pulp of rats in the earliest phases of inflammation**

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

DGK α enzyme immunolocalization in dental pulp of rats in the earliest phases of inflammation

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

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

Corresponding Author:

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

Associate Professor of Periodontology | Department of Diagnostics and
Surgical
Sciences

Faculty of Dentistry | University of Manitoba

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

Phone: (204) 789-3367

eraldo.batista@me.com

Abstract

Introduction: DGK α is one of the key enzymes involved on cellular inflammation events. It participates on the neutrophils recruiting to the injured spot and on the regulation of superoxide production. The aim of this study was to evaluate the localization of the DGK α in healthy and inflamed/infected dental pulp of rats.

Methods: Eighteen (18) male Wistar rats were used. The animals were divided into three groups of six animals each. In Group 1 (control group), no cavity opening was performed. In Groups 2 and 3, pulp exposure was performed in the left lower first molars, which remained opened for 24h and 7 days respectively. Euthanasia was performed after the experimental periods and the jaws were dissected for histological evaluation of inflammation and immunodetection of DGK α enzyme.

Results: Histological analysis of the dental pulp showed that tissue exposure led to inflammatory and degenerative events, which varied in their extension and intensity according to the experimental period of time. In groups 2 and 3, DGK α immunolabeling was observed in neutrophils and abscessed areas, being detected on a greater extension of pulp tissue in the 24 hours period.

Conclusions: DGK α is expressed on the initial stages of pulp inflammation, being not related to the extent of pulp inflammation. The understanding of DGK α role in the pathways of pulp inflammation can help the development of new therapeutic strategies to promote pulp repair.

Keywords: pulp inflammation, diacylglycerol, diacylglycerol Kinase α , neutrophils, animal models.

Introduction

Dentin and pulp form a tissue complex, which respond to physical, chemical and biological aggressions through degenerative and inflammatory events (1 - 3). In this regard, the initial inflammation involves the release of chemokines and the recruitment of neutrophils, which will act to contain tissue damage. Nevertheless, the continuity of noxious stimulus may lead to irreversible inflammatory damage (4 - 6). Thus, the development of novel strategies aiming at reducing or even abrogating the injury caused by early inflammatory events is a field to be further explored.

Diacylglycerol kinase alpha ($DGK\alpha$) is an enzyme that metabolizes Diacylglycerol (DAG). This lipid act as a second messenger which modulates the activity of protein kinase C in the cellular sign transduction (7, 8). During inflammation, this signaling route triggers superoxide production in neutrophils (NADPH oxidase), by both directly acting on the phosphorylation of these complex subunits and taking part in the cell recruitment (7, 9).

Defects in the route of $DGK\alpha$ are related with acute inflammation and has been previously observed in some diseases, such as leukemia and localized aggressive periodontitis (10, 11). Nevertheless, up to date this enzyme activity was not characterized in dental pulp. Thus, the present investigation aimed at evaluating the localization of $DGK\alpha$ in the pulp tissue of rats. The enzyme baseline localization after tissue exposure to the oral environment were assessed through immunolocalization.

Materials and methods

Preparation of animals

This study was approved by Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul Institutional Animal Care and Use Committees (Protocol 13/00324).

This methodology was previously described (12) and is summarized below. Eighteen (18) 7-week-old male Wistar rats were divided into three groups of six animals each. In Group 1 (control group), no cavity opening was performed. In Groups 2 and 3, dental pulps were exposed to oral environment for 24h and 7 days, respectively. The animals were anesthetized intraperitoneally before the experimental procedures with ketamine (100mg/kg) and xylazine (10mg/kg) (Virbac do Brasil, Juruatuba, SP, Brazil). Pulp exposure was performed in the left lower first molars, by drilling cavities on the central portion of the occlusal surface with a 1011 HL round bur in high speed (KG Sorensen, Cotia, SP, Brazil) to a depth nearly equal to the bur diameter (1,5 mm). Mouth opening was achieved using a specially designed device (13). The rats were euthanized by inhalation of isoflurane after the experimental periods. The jaws were dissected to provide an analysis of the histological and immunostaining aspects of the dental pulp.

Sample preparation

The samples were fixed with buffered 10% paraformaldehyde for 48 hours. After, the specimens were decalcified in 15% EDTA pH 7.5 (Panvel University pharmacy, Porto Alegre, RS, Brazil) for 45 days, and processed for paraffin embedding. Five- μ m serial sections were obtained and mounted on slides, which were then stained with hematoxylin–eosin or processed for immunohistochemistry. After deparaffinization, the samples were submitted to block endogenous peroxidase (H_2O_2) and incubated with normal serum to reduce background. The slides were incubated with primary antibodies by immunohistochemistry, to detect unconjugated DGK α (DGKA Polyclonal Antibody [11547-1-AP] Proteintech, Chicago, IL) for 12 hours at 4°C. Sections were incubated with secondary antibody conjugated with biotin. To provide histological evaluation, the samples were counterstained with hematoxylin/eosin.

The immunohistochemical negative control was performed by using unaccessed rats' teeth. Positive controls consisted of samples of breast tumor (melanoma).

Histological and immunohistochemistry analysis

A histological analysis was performed, with emphasis on the characteristics of the dental pulp tissue. After a training session in which the evaluation parameters were established, two blinded and calibrated examiners (Kappa>0.73; P<0.001) separately scored the intensity and extension of the inflammatory response (Table 1 and 2). These scores were previously described (12). Anytime there was a disagreement after confronting the results, a discussion had to be undertaken until consensus was reached.

Further, histological and immunohistochemistry descriptive analysis of the pulp tissue was carried out. The following aspects were observed: cell types that took part in the inflammatory reaction, features regarding vascularity, abscess formation and degeneration events, odontoblast layer organization and pulp necrosis. The immunolocalization of DGK α receptor positive cells were screened throughout the length of the pulp.

Statistical analysis

Statistical analysis of the results was carried out using ANOVA followed by Tukey test, α being set at 5%. Data was processed by the statistical program GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Results

Histological analysis of dental pulps showed that tissue exposure lead to inflammatory and degenerative events, which varied in their extension and intensity according to the experimental period (Figure 1). In both periods, neutrophils were the most usual cell types, although few macrophages and lymphocytes could also be observed. Abscess formation, hyalinization areas, reduced cellularity, fiber condensation and partial pulp necrosis were usual occurrences in both experimental periods, being even more pronounced after 7 days of tissue exposure. Odontoblastic layer became disrupted along the root 7 days after the experimental procedure (Figure 2).

DGK α immunolocalization

None of the control specimens (non-exposed dental pulps) had a positive staining for DGK. On the other hand, in both experimental groups, DGK immunolabeling was observed in inflammatory cells next to abscessed areas, being detected in a greater extension of pulp tissue in the 24 hours period (Figure 3).

Discussion

This study evaluated, for the first time, the immunolocalization of Diacylglycerol kinase alpha (DGK α) in the dental pulp of rats, comparing samples that did not undergo any surgical intervention with the ones that became contaminated and inflamed after oral exposure. In this regard, the physical trauma, added to the microorganism invasion, activated a host inflammatory and immune defense, and, at the same time, the presence of DGK α enzyme.

Dental pulp first defense is the immediate inflammatory response, in which neutrophils and macrophages take part in the phagocytosis and innate immunity (4, 14, 15). As a matter of fact, in the current study the periods of 24 hours and 7 days after dental pulp exposure were characterized by abundant presence of neutrophils, and enabled the evaluation of the earliest phases of inflammation. These cells receptors recognize microorganism-associated molecular patterns to start phagocytosis. To kill pathogens, they release powerful oxidative and non-oxidative mechanisms as much as inflammatory and immunoregulatory cytokines and chemokines (16,17).

Although such events are essential for tissue recovery, their by-products can further aggravate inflammation and cause tissue damage, which is even more pronounced in an environment confined to rigid walls such as the dental pulp. Ultimately, the progression of inflammation lead to continuous recruitment of inflammatory cells and release of exudate, inducing high blood pressure and favoring pulp ischemia and, consequently, tissue necrosis (1).

In this context, DGK plays a key role in controlling tissue damage. This is the major enzyme that controls Diacylglycerol (DAG) cell levels, which is a secondary lipidic cell messenger. DGK catalyzes DAG and convert it into

phosphatidic acid (PA). This process attenuates DAG-induced cellular response interrupting the activation of superoxide production by neutrophils (18 - 25). Human cells have many different DGK isoforms, such as DGK α , γ , and δ (7). This study investigated DGK α because this isoform was the first to be discovered and, consequently, is the most studied so far. Furthermore, this enzyme seems to be detected in higher levels when neutrophils were analyzed (7, 8).

As observed herein, the immunolocalization of DGK α was detected only in samples in which pulp inflammation was induced, suggesting that this enzyme participates actively of the initial inflammatory events in dental pulp. In this regard, the enzyme staining was mainly observed close to abscessed areas, where many neutrophils were visualized. In agreement, previous investigations (26, 27) have confirmed the synergistic effect of increased rate of superoxide released by neutrophils and elevated concentrations of DAG when localized aggressive periodontitis (LAP) was installed. In another study, the authors compared the mRNA levels of different kinases isoforms for normal and LAP-neutrophils. The α - and γ -isoforms were slightly decreased in LAP-neutrophils, while in normal neutrophils it was increased, suggesting a defect at gene expression level (7).

Moreover, in the present results was clearly observed that DGK α localization was not related to the extent of pulp inflammation, but with the initial inflammatory events. As a matter of fact, earlier stages of inflammation (24 hour experimental time) seemed to present a greater extent of DGK α positive staining compared to the 7 days experimental time, despite of a greater extent of damage in these samples. A greater neutrophil recruitment within initial inflammatory response may be related to this outcome. A previous study (7) suggests that DGK isoforms also are under control of some signal transduction pathway triggered by chemoattractants within the neutrophils. It is likely that the latest experimental period characterizes a transitional phase in which neutrophil recruitment is decreased and chronic events of inflammation start to be stimulated.

Taken into account the immunostaining of DGK α in inflamed dental pulps, as showed herein, and considering the possible influence of this enzyme on the chemotaxis of inflammatory cells (27), and on the reduction of harmful by-products of inflammation, future investigations should be guided to evaluate mechanisms to modulate these inflammatory routes. In this regard, the understanding of DGK α role in the pathways of pulp inflammation is of paramount importance to bring aid for the development of new therapeutic strategies.

REFERENCES

1. Hargreaves KM, Goodis HE. Seltzer and Bender's Dental Pulp. Chicago, USA: Quintessence; 2002.
2. Kim S, Liu M, Simchon S, Dorscher-Kim JE. Effects of selected inflammatory mediators on blood flow and vascular permeability in the dental pulp. Proc Finn Dent Soc 1992;88(Suppl 1):387–92.
3. Estrela C, Endodontic Science São Paulo, Brazil: Artes Médicas; 2009.
4. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nat Rev Immunol 2008;8:349-61
5. Chiego Júnior DJ. Histology of pulp. In: Avery JK, ed. Oral development and histology. 2nd ed. Stuttgart: Thieme, 1994:262– 81.
6. Mattuela LG, Bento LW, Figueiredo JAP, *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor and Its Relationship With the Dental Pulp. J Endod 2007;33:524-530
7. Oyaizu K, Kantarci A, Maeda H, *et al.* Identification of mRNAs for the various diacylglycerol kinase isoforms in neutrophils from patients with localized aggressive periodontitis. J Periodont Res 2003;38:488-95

8. Goto K, Hozumi Y, Nakano T, *et al.* Lipid Messenger, diacylglycerol, and its regulator, diacylglycerol kinase, in cells, organs, and animals: history and perspective. *Tohoku J Exp Med* 2008;214:199-212
9. Van Dyke TE, Zinney W, Winkel K, *et al.* Neutrophil function in localized juvenile periodontitis. Phagocytosis, superoxide production and specific granule release. *J Periodontol* 1980;57:703–708
10. Batista Jr EL, Warbington M, Badwey JA, *et al.* Differentiation of HL-60 cells to granulocytes involves regulation of select diacylglycerol kinases (DGKs). *J Cell Biochem* 2005;94:774-93
11. Batista Jr EL, Kantarci AI, Hasturk H, *et al.* Alternative splicing generates a diacylglycerol kinase α (DGK α) transcript that acts as a dominant negative modulator of superoxide production in localized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2013;1-19 (published on-line 10/30/13;doi:10.1902/jop.2013.130468)
12. Dondoni L, Scarparo RK, Kantarci A, *et al.* Effect of the pro-resolution lipid mediator Resolvin E1 (RvE1) on pulp tissues exposed to the oral environment. *Int Endod J* 2014;1-8 (published on-line 01/13/14;doi: 10.1111/iej.12224).
13. Scarparo RK, Dondoni L, Böttcher DE, *et al.* Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod* 2011;37:1069–73.
- 14 - Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. São Paulo, Brazil: Elsevier; 2012.
15. Weissmann G, Smolen JE, Korchak HM. Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *N Engl J Med* 1980;303:27–34.
16. van Faassen H, KuoLee R, Harris G, *et al.* Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *acinetobacter baumannii* in mice. *Infect Immun* 2007;75:5597–608
17. Reynaud af Geijersstam A, Sorsa T, Stackelberg S, *et al.* Effect of *E. faecalis* on the release of serine proteases elastase and cathepsin G, and collagenase-2 (MMP-8) by human polymorphonuclear leukocytes (PMNs). *Int Endod J* 2005;38:667–77.
18. Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986;233:305–12.

19. Kikkawa U, Nishizuka Y. The role of protein kinase C in transmembrane signalling. *Annu Rev Cell Biol* 1986;2: 149–78.
20. Liu WS, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal* 1998;10:529–42.
21. Palicz A, Fouchert TR, Jesaitis AJ, et al. Phosphatidic acid and diacylglycerol directly activate NADPH oxidase by interacting with enzyme components. *J Biol Chem* 2001;276:3090–7.
22. Waite KA, Wallin R, Qualliotine-Mann D, et al. Phosphatidic acid-mediated phosphorylation of the NADPH oxidase component p47-phox. Evidence that phosphatidic acid may activate a novel protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:15569–78.
23. Kanoh H, Sakane F, Imai S, et al. Diacylglycerol kinase and phosphatidic acid phosphatase-enzymes metabolizing lipid second messengers. *Cell Signal* 1993;5:495–503.
24. Kanoh H, Yamada K, Sakane F. Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal transduction? *Trends Biochem Sci* 1990;15:47–50.
25. Sanjuan MA, Jones DR, Izquierdo M, et al. Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling. *J Cell Biol* 2001;153:207–20.
26. Badwey JA, Robinson JM, Horn W, et al. Synergistic stimulation of neutrophils. Possible involvement of 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoate in superoxide release. *J Biol Chem* 1988;263:2779–86.
27. Heyworth PG, Karnovsky ML, Badwey JA. Protein phosphorylation associated with synergistic stimulation of neutrophils. *J Biol Chem* 1989;264:14935–9.

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

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

Reference: Dondoni (12)

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

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

Reference: Dondoni (12)

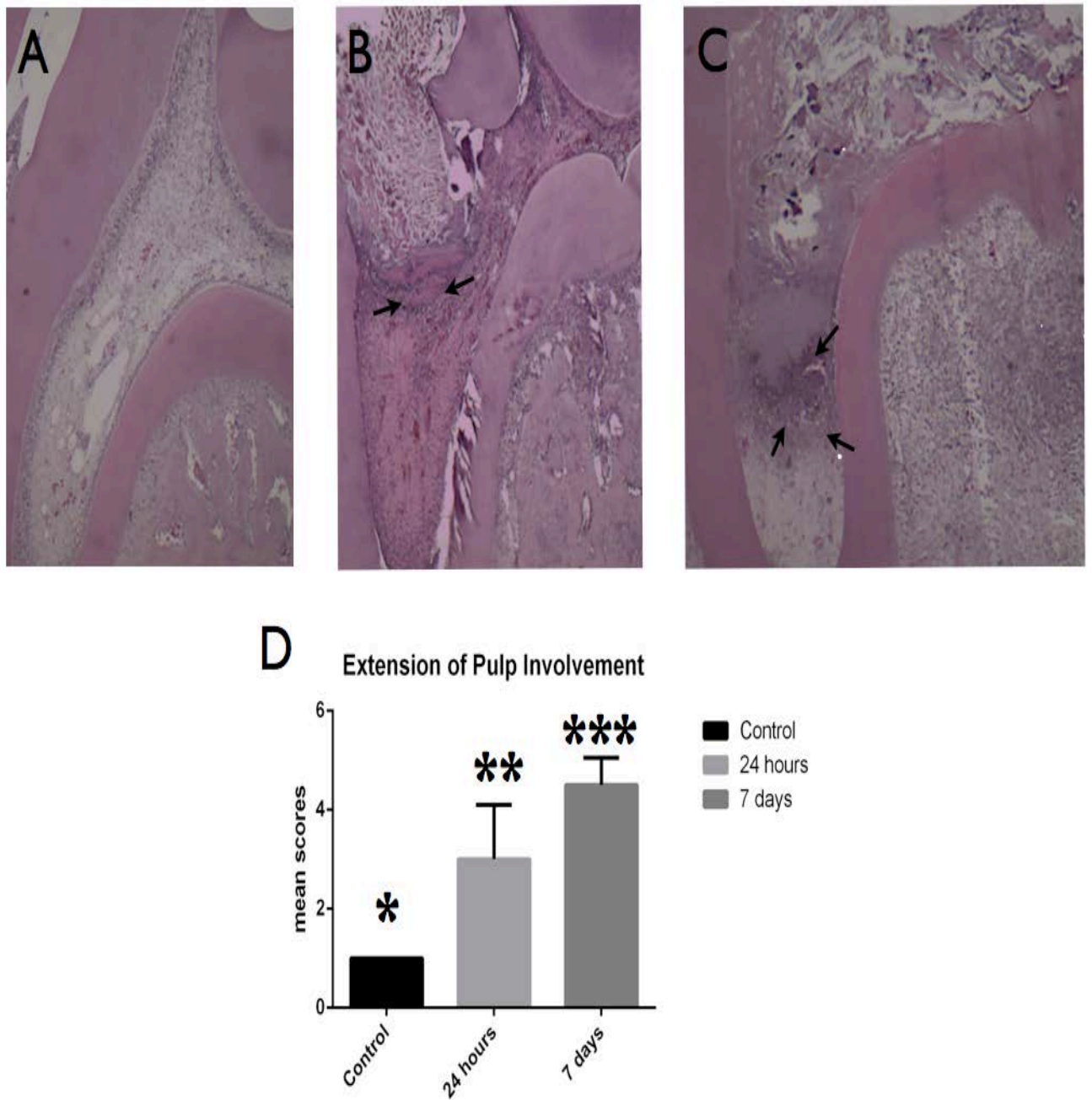


Figure 1: Histological analysis of extent of inflammation: A – control group (40x) displaying normal pulp tissue, score 1; B –24h group (40x), arrows point out inflammatory reaction restricted to the canal entrance, score 3; C – 7 days group (40x), arrows point out inflammatory reaction towards medium third of root, score 5; D – Graph demonstrating statistical differences amongst groups.

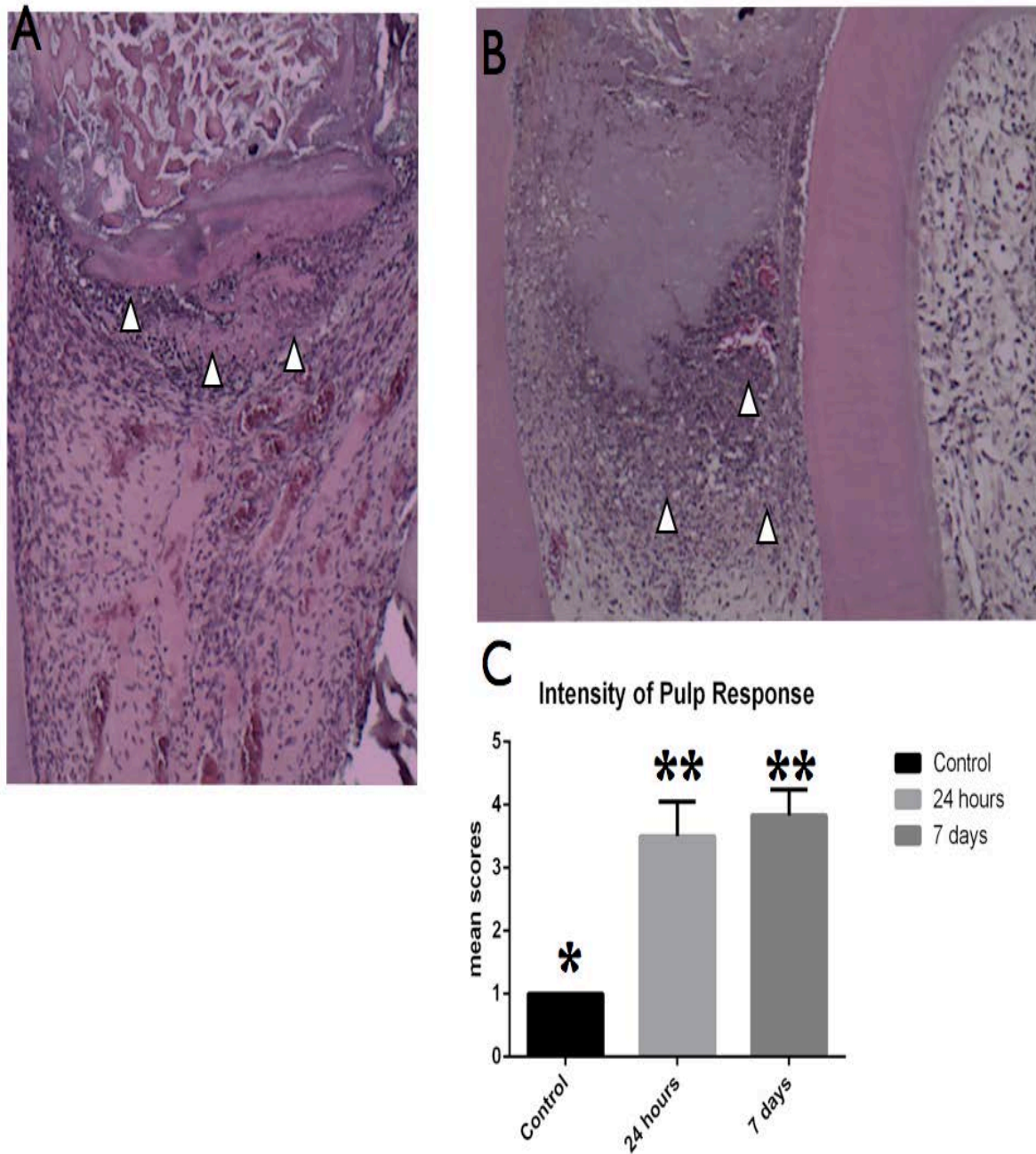


Figure 2: Histological analysis of intensity of inflammation: A –24 hours group (100x), arrows point out inflammatory reaction involved by fibrous tissue and underlying cells surrounded by hyalinization areas, score 3; B – 7 days group (100 x), arrows point out sparse inflammatory cells not contained by fibrous tissue and invading partially the central pulp, score 4. C – Differences were not detected between 24 hours and 7 days groups, but both were statistically different from control group.

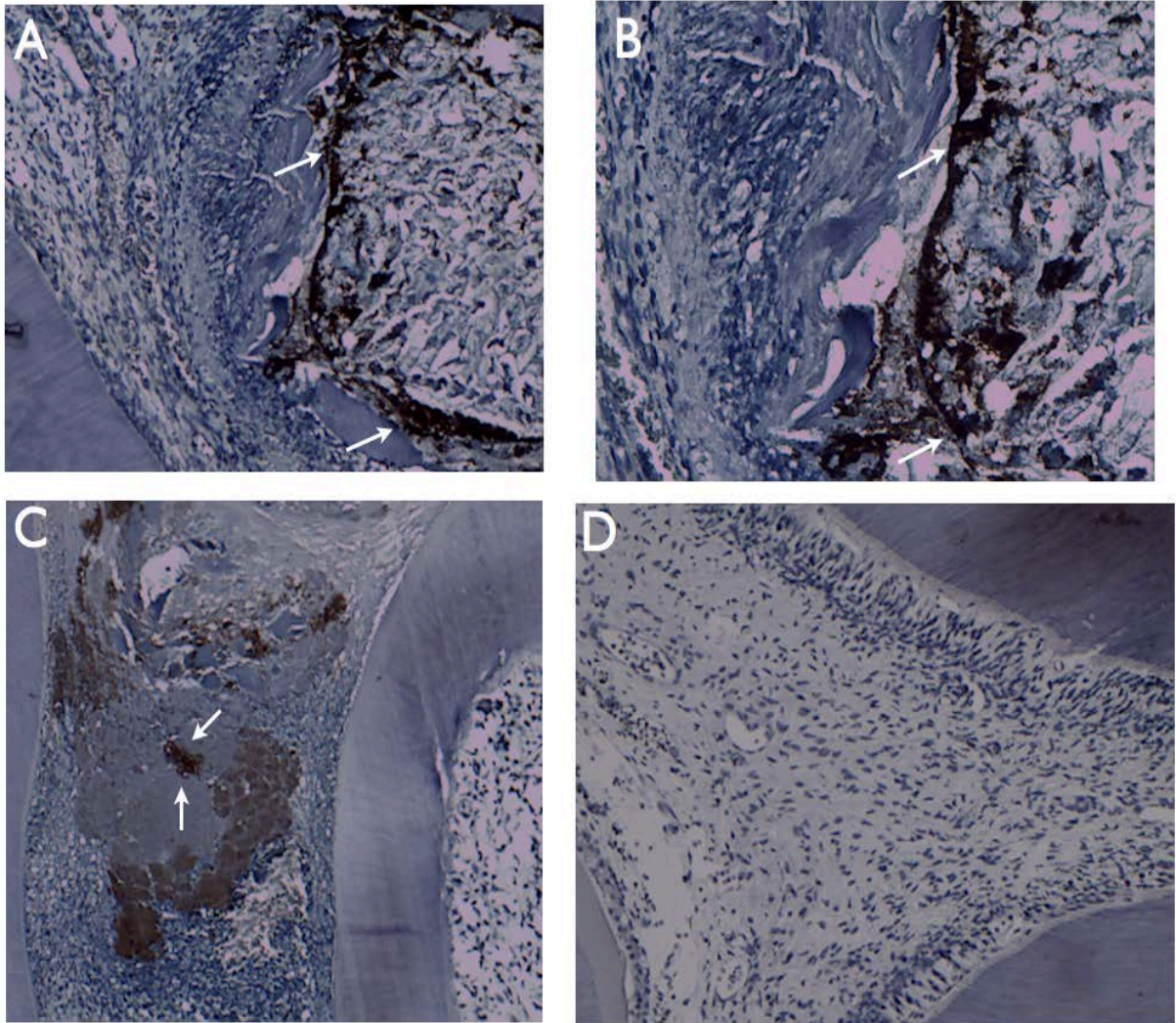


Figure 3: DGK α immunodetection: A -24 hours group (100x), arrows point out great amount of DGK α staining; B – same as A in higher magnification (200x); C – 7 days group (100x), arrows point out slight detection of DGK α ; D – control group (100x), DGK α was not detected.

3. Discussão geral

3. DISCUSSÃO GERAL

Este estudo avaliou, pela primeira vez, a imunolocalização da enzima Diacilglicerol Quinase alpha ($DGK\alpha$) em polpas dentárias de ratos, comparando amostras que não sofreram nenhuma intervenção cirúrgica com aquelas que foram expostas ao meio bucal, tornando-se contaminadas e inflamadas. Neste caso, o trauma físico adicionado à invasão de microorganismos ativou a inflamação e as defesas imunes do hospedeiro e, ao mesmo tempo, a imunolocalização da enzima $DGK\alpha$.

O modelo experimental deste trabalho, utilizando ratos, já vem sendo usado em outras pesquisas (55, 56) e apresentou resultados bastante satisfatórios, pois a microbiota oral e a resposta do hospedeiro são semelhantes às observadas em humanos (6, 57). O custo é relativamente baixo e existem vantagens técnicas, quando comparado com outros modelos (58), além de proporcionar maior rapidez na progressão das respostas biológicas em questão (59).

O primeiro mecanismo de defesa da polpa dentária é a resposta inflamatória imediata, em que neutrófilos e macrófagos participam das fagocitoses e da resposta imunológica inata (9, 60, 61). Aliás, no presente estudo, os períodos de 24 horas e de 7 dias, após a exposição pulpar, foram caracterizados por presença abundante de neutrófilos e permitiram a avaliação dos estágios iniciais da inflamação. Essas células possuem receptores celulares que identificam padrões moleculares dos microorganismos para iniciarem as fagocitoses. Para matar os patógenos, elas liberam potentes mecanismos oxidativos e não oxidativos como citocinas inflamatórias e imunorregulatórias e quimiocinas (62, 63).

Embora tais eventos sejam essenciais para a reparação dos tecidos, seus subprodutos podem agravar a inflamação e causar dano tecidual, que é ainda mais pronunciado em um ambiente revestido por paredes rígidas como a polpa dentária. Em última análise, a progressão da inflamação leva ao recrutamento contínuo de células inflamatórias e à liberação de exsudato,

gerando elevada pressão sanguínea e favorecendo a isquemia pulpar e, conseqüentemente, a necrose tecidual (1).

Nesse contexto, a DGK desempenha um papel-chave no controle de dano tecidual. Ela é a principal enzima que controla os níveis celulares de Diacilglicerol (DAG), que é um lipídio mensageiro secundário. A DGK catalisa o DAG e o converte em ácido fosfatídico (PA). Este processo atenua a resposta celular induzida pelo DAG, interrompendo a ativação da produção de superóxido pelos neutrófilos (33, 64 - 70). Células humanas têm diferentes isoformas de DGK, como a α , γ e δ (54). Este estudo investigou a DGK α , pois esta isoforma foi a primeira a ser descoberta e, conseqüentemente é a mais estudada até o momento. Além disso, esta enzima parece estar em níveis elevados no mRNA de neutrófilos (36, 54).

Como observado aqui, a imunolocalização da DGK α foi feita somente em amostras em que a inflamação pulpar foi induzida, sugerindo que esta enzima participa ativamente de eventos iniciais da inflamação pulpar. A esse respeito, a marcação da enzima foi observada em áreas próximas a abscessos, onde muitos neutrófilos foram visualizados. De acordo com isso, investigações prévias têm confirmado o efeito sinérgico do aumento nas taxas de liberação de superóxido por neutrófilos, com concentrações elevadas de DAG quando existe periodontite agressiva localizada (LAP) (31, 71). Em outro estudo, os autores compararam os níveis de mRNA em diferentes isoformas de DGK em neutrófilos de pacientes normais e de pacientes com LAP. As isoformas α e γ estavam levemente diminuídas em neutrófilos de pacientes com LAP enquanto que, em neutrófilos normais, estavam aumentadas, sugerindo um defeito nos níveis de expressão do gene (54).

Além disso, nos presentes resultados, foi claramente observado que a marcação da DGK α não foi relacionada com a extensão da inflamação pulpar, mas com os eventos iniciais da inflamação. Aliás, nos estágios iniciais da inflamação (tempo experimental de 24 horas), a marcação positiva para DGK α pareceu apresentar uma maior extensão quando comparada ao tempo experimental de 7 dias, apesar de uma maior extensão do dano nessas

amostras. Um maior recrutamento de neutrófilos dentro no período inicial de inflamação pode estar relacionado com este resultado. Um estudo anterior (54) sugere que as isoformas de DGK também estão sob controle de um caminho de sinal de transdução ativado por quimioatrativos dentro dos neutrófilos. É provável que o período experimental posterior caracterize uma fase transicional em que o recrutamento de neutrófilos diminui, e eventos crônicos de inflamação começam a ser estimulados.

Levando em consideração a imunolocalização da DGK α em polpas inflamadas, como mostrado aqui, e considerando a possibilidade da influência desta enzima no controle de quimiotaxias de células inflamatórias (31) e na redução da inflamação por produtos nocivos produzidos por ela, investigações futuras devem ser direcionadas à avaliação de mecanismos para modular as rotas inflamatórias. A esse respeito, o entendimento do papel da DGK α nos caminhos da inflamação pulpar é de suprema importância para trazer novas ideias para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

4. Conclusões

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste estudo, pode-se concluir:

- As polpas dentárias dos grupos 24 horas e 7 dias apresentaram alterações patológicas causadas pela exposição pulpar. Em ambos os grupos, os neutrófilos foram as células predominantes.

- A DGK α apresentou marcação em neutrófilos nos dois grupos experimentais (24 horas e 7 dias), confirmando sua atuação em eventos iniciais da inflamação pulpar.

- Através deste trabalho, foi feita a caracterização de um evento que ocorre na polpa dentária inflamada. Investigações futuras devem ser direcionadas à avaliação de mecanismos para modular as rotas inflamatórias.

5. Referências bibliográficas

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Okiji T. A polpa como um tecido conjuntivo In: Hargreaves KM, Goodis HE. Polpa Dentária de Seltzer e Bender. São Paulo, Brazil: Quintessence; 2009. Cap 5, p. 95-122.
2. Leonardo MR. Semiologia e Diagnóstico Clínico/Radiográfico das Alterações Patológicas Pulpaes In: Leonardo MR. Endodontia – Tratamento de Canais Radiculares Princípios e Técnicas. São Paulo: Artes Médicas; 2008. Cap 2, p. 22-48.
3. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Lopes HP. Patologias Pulpar e Perirradicular In: Lopes HP, Siqueira Jr JF. Endodontia – Biologia e Técnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. Cap 2, p. 21-82.
4. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med 2002; 13 (2): 171-83.
5. Miller WD. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. Dent Cosmos 1894; 36: 505-528.
6. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965; 20 (3): 340-349.
7. Nair PN. Apical periodontitis: a dynamics encounter between root canal infection and host response. Periodontol 2000 1997; 13: 21-48.
8. Estrela C, Figueiredo JAP. Patologia Pulpar In: Estrela C, Figueiredo JAP. Endodontia – Princípios Biológicos e Mecânicos. São Paulo: Artes Médicas; 1999. Cap 5, p. 137-166.
9. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nat Rev Immunol 2008; 8 (5): 349-361.

10. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod* 2007; 33 (6): 643-51.
11. Siqueira Jr JF, Dantas CJS. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Medsi: Rio de Janeiro, 2000.
12. Orstavik D, Ford TRP. Fundamentos da Endodontia – prevenção e tratamento da periodontite apical. São Paulo: Santos; 2004. Cap 3, p. 42-67.
13. Fouad AF. Mediadores moleculares da inflamação pulpar In: Hargreaves KM, Goodis HE. Polpa Dentária de Seltzer e Bender. São Paulo, Brazil: Quintessence; 2009. Cap 11, p. 247-179.
14. Shulga YV, Topham MK, Epanand RM. Regulation and functions of Diacylglycerol Kinases. *Chem Rev* 2011; 111(10): 6186 – 6208.
15. Batista Jr EL, Warbington M, Badwey JA, Van Dyke TE. Differentiation of HL-60 cells to granulocytes involves regulation of select diacylglycerol kinases (DGKs). *J Cell Biochem* 2005; 94: 774-793.
16. Martelli AM, Borgatti P, Bortul R, Manfredini M, Massari L, Capitani S, Neri LM. Phosphatidylinositol 3-kinase translocates to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells in response to insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor but not to the proapoptotic cytokine tumor necrosis factor alpha. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 1716-1730.
17. Van Blitterswijk WJ, Houssa B. Properties and functions of diacylglycerol kinases. *Cell Signal* 2000; 12: 595-605.
18. Topham MK, Prescott SM. Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J Biol Chem* 1999; 274: 11447-11450.
19. Wakelam MJ, Briscoe CP, Stewart A, Pettitt TR, Cross MJ, Paul A, et al. Phosphatidylcholine hydrolysis: a source of multiple lipid messenger molecules. *Biochem Soc Trans* 1993a; 21: 874-877.
20. Olashaw NE, Pledger WJ. Cellular mechanisms regulating proliferation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1988; 22: 139-173.
21. Kato H, Takenawa T. Phospholipase C activation and diacylglycerol kinase inactivation lead to an increase in diacylglycerol content in spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 146: 1419-1424.

22. Mathews CA, GK. Lipid metabolism I: Fatty acids, triacylglycerol and lipoproteins In *Biochemistry*. 3rd edition. San Francisco: Benjamin/Cummings; 2000.
23. Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 1998; 280: 1082-1086.
24. Gulbins E, Coggeshall KM, Baier G, Telford D, Langlet C, Baier-Bitterlich G, et al. Direct stimulation of Vav guanine nucleotide exchange activity for Ras by phorbol esters and diglycerides. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4749-4758.
25. Carman GM, Zeimet GM. Regulation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1996; 271: 13293-13296.
26. Baron CL, Malhotra V. Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* 2002; 295: 325-328.
27. Wakelam MJ, Pettitt TR, Kaur P, Briscoe CP, Stewart A, Paul A, et al. Phosphatidylcholine hydrolysis: a multiple messenger generating system. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1993b; 28: 73-80.
28. Clapham DE. Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature* 1995; 375: 634-635.
29. Stehno-Bittel L, Luckhoff A, Clapham DE. Calcium release from the nucleus by InsP3 receptor channels. *Neuron* 1995; 14: 163-167.
30. Newton AC. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 161-167.
31. Batista EL. Differential expression of DGK alpha in localized aggressive periodontitis neutrophils and the human leukemia cell line HL-60. Boston. Tese [doutorado em biologia oral] – Boston University; 2005.
32. Brindley DN, Waggoner DW. Phosphatidate phosphohydrolase and signal transduction. *Chem Phys Lipids* 1996; 80: 45-57.
33. Lee YH, Kim HS, Pai JK, Ryu SH, Suh PG. Activation of phospholipase D induced by platelet-derived growth factor is dependent upon the level of phospholipase C-gamma 1. *J Biol Chem* 1994; 269: 26842-26847.
34. Heyworth PG, Karnovsky ML, Badwey JA. Protein phosphorylation associated with synergistic stimulation of neutrophils. *J Biol Chem* 1989; 264: 14935-14939.
35. Erickson RW, Langel-Peveri P, Traynor-Kaplan AE, Heyworth PG, Curnutte JT. Activation of human neutrophil NADPH oxidase by phosphatidic

acid or diacylglycerol in a cell-free system. Activity of diacylglycerol is dependent on its conversion to phosphatidic acid. *J Biol Chem* 1999; 274: 22243-22250.

36. Waite KA, Wallin R, Qualliotine-Mann D, McPhail LC. Phosphatidic acid-mediated phosphorylation of the NADPH oxidase component p47-phox. Evidence that phosphatidic acid may activate a novel protein kinase. *J Biol Chem* 1997; 272: 15569-15578.

37. Cooke E, Al-Mohanna FA, Hallett MB. Diacylglycerol kinase inhibitor, R59022, potentiates neutrophil oxidase activation by Ca²⁺-dependent stimuli. Evidence for two separate but convergent pathways. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 3459-3462.

38. Goto K, Hozumi Y, Nakano T, Saino-Saito S, Martelli AM. Lipid Messenger, Diacylglycerol, and its regulator, Diacylglycerol Kinase, in cells, Organs, and animals: History and Perspective. *J Exp Med* 2008; 214 (3): 199-212.

39. Brandt SJ, Niedel JE, Bell RM, Young WS 3rd. Distinct patterns of expression of different protein kinase C mRNAs in rat tissues. *Cell* 1987; 49(1), 57-63.

40. Exton, J. H. Phospholipase D. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1436: 105-115.

41. Endele S, Zabel B, Winterpacht A. Assignment of the human diacylglycerol kinase 4 (DAGK4) gene to chromosome 4p16.3. *Genomics* 1996; 33 (1): 145-146.

42. Hart TC, Price JA, Bobby PL, Pettenati MJ, Shashi V, Von Kap Herr C, et al. Cytogenetic assignment and physical mapping of the human DGKE gene to chromosome 17q22. *Genomics* 1999; 56 (2): 233-235.

43. Ding L, Bunting M, Topham MK, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Alternative splicing of the human diacylglycerol kinase zeta gene in muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(11): 5519-5524.

44. Sakane F, Imai S, Yamada K, Murakami T, Tsushima S, Kanoh H. Alternative splicing of the human diacylglycerol kinase delta gene generates two isoforms differing in their expression patterns and in regulatory functions. *J Biol Chem* 2002; 277 (45): 43519-43526.

45. Murakami T, Sakane F, Imai S, Houkin K, Kanoh H. Identification and characterization of two splice variants of human diacylglycerol kinase ϵ . *J Biol Chem* 2003; 278 (36): 34364–34372.
46. Sakane FI, Imai S, Kai M, Wada I, Kanoh H. Molecular cloning of a novel diacylglycerol kinase isozyme with a pleckstrin homology domain and a C-terminal tail similar to those of the EPH family of protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996; 271 (14): 8394–8401.
47. Houssa B, Schaap D, van der Wal J, Goto K, Kondo H, Yamakawa A, et al. Cloning of a novel human diacylglycerol kinase (DGK θ) containing three cysteine-rich domains, a proline-rich region, and a pleckstrin homology domain with an overlapping Ras-associating domain. *J Biol Chem* 1997; 272 (16): 10422–10428.
48. Ding L, Traer E, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. The cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase, DGK ι . *J Biol Chem* 1998; 273 (49): 32746–32752.
49. Divecha N, Lander DJ, Scott TW, Irvine RF. Molecular species analysis of 1,2-diacylglycerols and phosphatidic acid formed during bombesin stimulation of Swiss 3T3 cells. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1093 (2-3): 184–188.
50. Neri LM, Bortul R, Borgatti P, Tabellini G, Baldini G, Capitani S, et al. Proliferating or differentiating stimuli act on different lipid-dependent signaling pathways in nuclei of human leukemia cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13 (3): 947–964.
51. Muid RE, Twomey B, Dale MM. The effect of inhibition of both diacylglycerol metabolism and phospholipase A2 activity on superoxide generation by human neutrophils. *FEBS Lett* 1988; 234 (1): 235–240.
52. Perkins RS, Lindsay MA, Barnes PJ, Giembycz MA. Early signalling events implicated in leukotriene B $_4$ -induced activation of the NADPH oxidase in eosinophils: Role of Ca $^{2+}$, protein kinase C and phospholipases C and D. *Biochem J* 1995; 310: 795–806.

53. Cipres A, Carrasco S, Merino E, Diaz E, Krishna UM, Falck JR, et al. Regulation of diacylglycerol kinase alpha by phosphoinositide 3-kinase lipid products. *J Biol Chem* 2003; 278 (37): 35629–35635.
54. Oyaizu K, Kantarci A, Maeda H, et al. Identification of mRNAs for the various diacylglycerol kinase isoforms in neutrophils from patients with localized aggressive periodontitis. *J Periodont Res* 2003;38:488-495.
55. Scarparo RK, Dondoni L, Böttcher DE, et al. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod* 2011;37:1069–73.
56. Dondoni L, Scarparo RK, Kantarci A, et al. Effect of the pro-resolution lipid mediator Resolvin E1 (RvE1) on pulp tissues exposed to the oral environment. *Int Endod J* 2014;1-8 (published on-line 01/13/14;doi: 10.1111/iej.12224).
57. Stashenko, P.; Wang, C.Y.; Tani-Ishii, N.; Yu, S.M. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* v.78, n.4, p.494-502, 1994.
58. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim*, v.44, n.1, p.1-6, 2010.
59. Moretton TR, Brown CE, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res* v.52: n.3, p.528-33, 2000.
60. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. São Paulo, Brazil: Elsevier; 2012.
61. Weissmann G, Smolen JE, Korchak HM. Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *N Engl J Med* 1980;303:27–34.
62. van Faassen H, KuoLee R, Harris G, et al. Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with acinetobacter baumannii in mice. *Infect Immun* 2007;75:5597–608

63. Reynaud af Geijersstam A, Sorsa T, Stackelberg S, et al. Effect of *E. faecalis* on the release of serine proteases elastase and cathepsin G, and collagenase-2 (MMP-8) by human polymorphonuclear leukocytes (PMNs). *Int Endod J* 2005;38:667–77.
64. Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986;233:305–12.
65. Kikkawa U, Nishizuka Y. The role of protein kinase C in transmembrane signalling. *Annu Rev Cell Biol* 1986;2: 149–78.
66. Liu WS, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal* 1998;10:529–42.
67. Palicz A, Fouchert TR, Jesaitis AJ, et al. Phosphatidic acid and diacylglycerol directly activate NADPH oxidase by interacting with enzyme components. *J Biol Chem* 2001;276:3090–7.
68. Kanoh H, Sakane F, Imai S, et al. Diacylglycerol kinase and phosphatidic acid phosphatase-enzymes metabolizing lipid second messengers. *Cell Signal* 1993;5:495–503.
69. Kanoh H, Yamada K, Sakane F. Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal transduction? *Trends Biochem Sci* 1990;15:47–50.
70. Sanjuan MA, Jones DR, Izquierdo M, et al. Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling. *J Cell Biol* 2001;153:207–20.
71. Badwey JA, Robinson JM, Horn W, et al. Synergistic stimulation of neutrophils. Possible involvement of 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoate in superoxide release. *J Biol Chem* 1988;263:2779–86.

6. Anexo



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 016/13 – CEUA

Porto Alegre, 21 de março de 2013.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00324, **“Imunolocalização de células positivas para a enzima diacilglicerol quinase α (dgka) em polpas de ratos expostas à contaminação”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Lembramos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação.

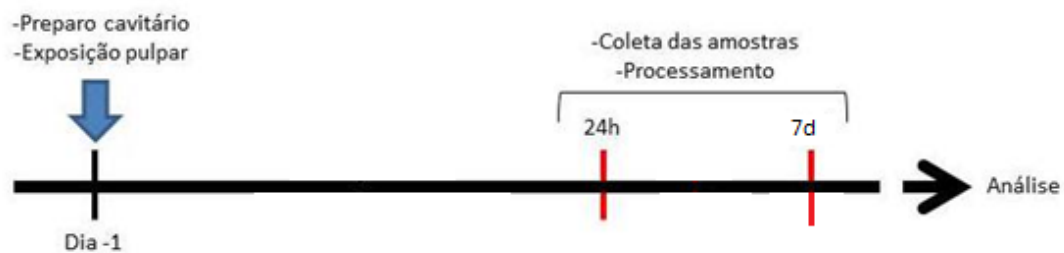
Atenciosamente,


Profª. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora da CEUA/PUCRS

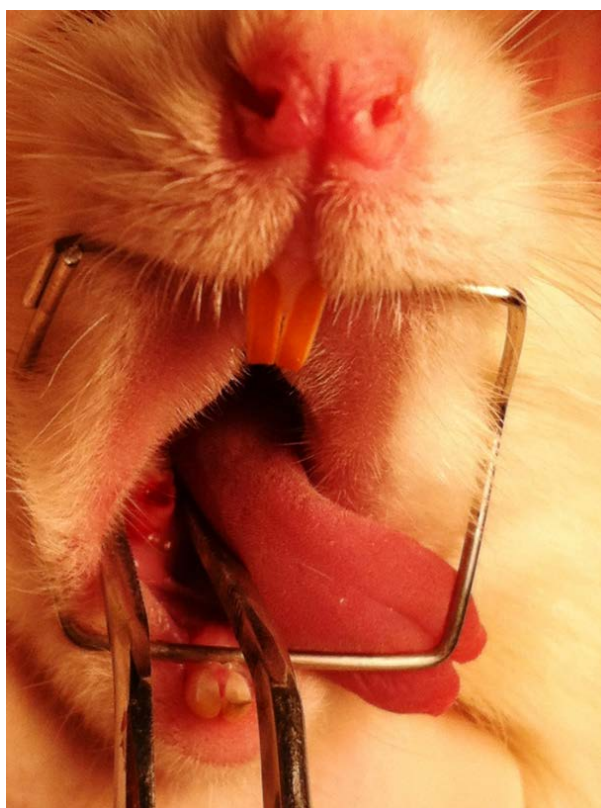
7. Apêndices

7. APÊNDICES

7.1 Linha do Tempo desde a exposição pulpar até a coleta das amostras



7.2 Imagem do dispositivo oral que foi utilizado para abertura bucal



7.3 Imunohistoquímica do controle positivo – tumor de mama

