

Mapeamento bidimensional das proteínas do fluido crevicular gengival de pacientes em tratamento ortodôntico com reabsorção radicular externa.

Giovanni Modesto **VIEIRA**¹, Érico Augusto Rosas **VASCONCELOS**², Victor Almeida **RODRIGUES**³, Cleomar Donizeth **RODRIGUES**⁴

Resumo

A reabsorção radicular inflamatória externa (RRIE) é a mais comum das iatrogenias relativas ao tratamento ortodôntico. As lacunas iniciais de reabsorção são pequenas, sendo identificadas apenas por métodos histológicos e induzem áreas de reabsorção após 7 semanas de tratamento, que somente serão detectadas em radiografias periapicais após 5 a 6 meses de tratamento. O objetivo deste estudo foi identificar e mapear as proteínas diferencialmente expressas e secretadas no fluido crevicular gengival (FCG), de pacientes em tratamento ortodôntico com RRIE. Foram extraídas 3.600 µg de dois “pools” de amostras do FCG de 60 pacientes em tratamento ortodôntico, com e sem a RRIE e realizada a eletroforese bidimensional em triplicata e os perfis protéicos foram escaneados. Foram detectados 13 spots proteicos constitutivos comuns aos grupos com e sem a RRIE porém, apenas 6 foram estatisticamente significantes (ANOVA <0,05). Foram encontrados 122 spots proteicos diferenciais entre as duas amostras (p < 0,005), sendo 15 com peso molecular baixo. Os spots proteicos foram: ID 2, ID 5, ID 6, ID 11, ID 12, ID 14 e aqueles que mais sofreram variação de volume porcentual foram ID 5, ID 6, com maior intensidade no grupo com RRIE. Concluiu-se que há uma diferenciação dos índices de alguns spots proteicos no FCG de pacientes em tratamento ortodôntico, que apresentam RRIE. A busca por marcadores protéicos mais específicos será de grande valia para o diagnóstico precoce de grupos de risco para a RRIE e para o planejamento ortodôntico, minimizando assim sequelas decorrentes desta patologia.

Palavras- chave: Reabsorção da Raiz, Ortodontia, Líquido do Sulco Gengival, Agregados proteicos.

¹Doutor em Ciências Médicas (UNB), Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia (UCB-DF) Ortodontista: clínica privada em Brasília D.F

²Doutor em Biologia Molecular-UNB, Mestre em Bioquímica (UFCE), Biólogo (UFCE). Professor do Instituto Euro-Americano de Educação, Ciência e Tecnologia

³Graduação em Farmácia – UCB-DF. Residente de Farmácia em cuidados paliativos pela Secretaria de Saúde do Distrito Federal.

⁴Doutor em Ciências da Saúde (UFGO). Mestre em Radiologia Odontológica e Imaginologia (SLMandic). Prof. do Centro Universitário do Planalto Central -UNICEPLAC.

RODRIGUES, E. R. A.; RODRIGUES, V. A.; RODRIGUES, C. D. Mapeamento bidimensional das proteínas do fluido crevicular gengival de pacientes em tratamento ortodôntico com reabsorção radicular externa. Revista Odontológica do Planalto Central- ROPLAC. Brasília., n. 11, v. 1, p. 2-13, jan.-jun. 2025.

- Os autores declaram não ter interesses associativos, comerciais, de propriedade ou financeiros, que representem conflito de interesse, nos produtos e companhias citados neste artigo.

Autor para Correspondência: Cleomar Donizeth Rodrigues
Endereço: SMHN Q 02 Bloco A Sala 208 Brasília-DF – DF. CEP 70710-143
Telefone: (61) 33278932

Como citar este artigo: VIEIRA, G. M.; VASCONCELOS, B. F.;

E-mail: cleomar.rodrigues@uniceplac.edu.br

Categoria: Pesquisa
Área: Biologia Molecular

Introdução

A expressão funcional do Genoma é dependente da interação do organismo com o seu meio ambiente, do desenvolvimento fisiológico deste indivíduo e da fisiopatologia de certas enfermidades, portanto, é um estado dinâmico, que se reflete no conjunto de proteínas, que estão presentes naquele instante de tempo e que são estudadas por uma ciência denominada proteômica (WILKINS et al., 1997).

Qualquer tipo de condição patológica pode induzir uma expressão diferencial de proteínas que corresponde à fisiopatologia da doença, que pode ser observada, assim como uma fotografia capta a imagem de um ponto no espaço-tempo, através da exibição de pontos ou “spots” (manchas) de proteínas em géis bidimensionais (WILKINS et al., 1997).

Esses géis bidimensionais são chamados de perfis proteicos e podem refletir a resposta do corpo em um momento exato a qualquer doença, mostrando os constituintes finais e as proteínas estruturais da maioria das reações bioquímicas da célula (WILKINS et al., 1997).

Estas proteínas finais podem ter aplicações úteis no diagnóstico laboratorial e avaliação de inúmeras doenças bucais, como doença periodontal e câncer bucal. Elas são conhecidas como marcadores moleculares proteicos (HARRIS, 2000).

A reabsorção radicular externa inflamatória (RRIE) é a condição iatrogênica mais comum associada ao tratamento ortodôntico (HARRIS, 2000). O encurtamento radicular irreversível ocorre devido à força excessiva ou à diminuição da resistência às forças normais (HARRIS, 2000). Um aumento na RRIE pode ser resultado de um aumento na duração da força ortodôntica e de uma elevada

exposição da dentina radicular (MAVRAGANI et al., 2002). A RRIE pode ser observada preferencialmente na região apical da raiz, pois mais de ¾ da reabsorção ocorre nesta região (ACAR et al., 1999).

O diagnóstico da reabsorção dentária é detectado principalmente nas radiografias periapicais, que apresentam melhor taxa de acurácia do que outros tipos de radiografias. Quando a reabsorção é detectada, o processo já está em andamento há algum tempo. Assim, a técnica radiográfica não consegue identificar uma lesão precoce (ACAR, et al., 1999). Somente após a perda de 60% a 70% dos tecidos mineralizados é que pode ser realizada a detecção radiográfica, que demonstra principalmente alterações apicais e não visualiza a lesão antes deste período (BALDUCCI et al., 2007). A Tomografia Computadorizada *Cone Beam* têm mostrado aumento na sensibilidade para detecção de reabsorção radicular porém, a dose de exposição à radiação maior que das radiografias e o seu custo mais elevado, a torna impraticável, ainda, como uso corriqueiro do dia a dia da clínica ortodôntica (WALKER et al., 2005).

As lacunas de reabsorção precoce são pequenas e só podem ser identificadas por métodos histológicos (BALDUCCI et al., 2007) e as áreas de reabsorção induzida após 7 semanas de tratamento ortodôntico não são visíveis nas radiografias periapicais (OWMANN et al., 1995). Portanto, nos primeiros meses de tratamento ortodôntico o diagnóstico é incerto se utilizarmos radiografias periapicais, e somente após 5 a 6 meses de tratamento, utilizando as mesmas radiografias, é que teremos um diagnóstico confiável de reabsorção radicular (LEVANDER et al., 1998).

O objetivo deste estudo foi identificar e mapear as proteínas diferencialmente expressas e secretadas no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes em tratamento ortodôntico com RRIE

Material e Método

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília sob o parecer número (410.796, 05/09/2013). A amostragem inicial foi realizada em 60 pacientes com idades entre 15 e 29 anos, sendo 25 do sexo masculino e 35 do sexo feminino. A amostra foi restrita a indivíduos saudáveis, sem doença periodontal, doença gengival ou cárie dentária. Além disso, não faziam uso de qualquer medicação sistêmica. Esses pacientes foram divididos em dois grupos: grupo 1 (controle), composto por 30 pacientes que estavam em tratamento ortodôntico há pelo menos seis meses e para os quais não houve reabsorção radicular inflamatória externa (RRIE) detectada em radiografias periapicais; grupo 2, composto por 30 pacientes em tratamento ortodôntico há pelo menos seis meses e que já apresentavam RRIE leve a moderada, conforme exames radiográficos (LEVANDER et al., 1998).

Coleta do fluido Gengival

Foram utilizados cones absorventes estéreis, conforme método proposto por outros autores (BURKE et al., 2002; BANG; CIMASONI et al., 1971).

O fluido crevicular gengival (FGC) foi coletado das faces mesial e distal dos incisivos centrais superiores com cones absorventes – “Tanari cell pack strips” número 15 (Tanariman®) – após profilaxia prévia. Os cones foram inseridos em cerca de 1 a 2 mm de profundidade no sulco gengival por 30 segundos, nos dois grupos de pacientes estudados. O isolamento relativo foi realizado com rolos de algodão e sugador de saliva e a região seca com seringa ar-água. Após a sua remoção do sulco gengival, as “tiras” foram imediatamente seladas e armazenadas a -80°C.

Extração protéica

A extração de proteínas foi realizada conforme descrito por Kojima et al., 2000. Os cones contendo amostras de FGC dos pacientes de cada grupo foram combinados, formando um “pool” de proteínas para cada grupo. A cada dois cones de papel absorvente foram adicionados 100 µl de água ultrapura (Milli-Q RG, Millipore) e inibidor de protease (PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila) e centrifugados duas vezes a 13.400 rpm, por 5 minutos. O processo foi repetido e a proteína sobrenadante foi eluída, liofilizada e armazenada até sua utilização na análise eletroforética.

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando um kit 2-DE Quant (GE Healthcare®) de acordo com as instruções do fabricante.

Eletroforese em gel unidimensional (SDS-PAGE)

A análise preliminar da composição proteica do FGC em pacientes com RRIE foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em temperatura ambiente, conforme descrito por Kojima et al., 2000. Foram utilizados marcadores proteicos da Invitrogen (Bench Marcker, Protein Ladder). O gel foi corado com corante azul brilhante Coomassie G-250.

Eletroforese em gel Bidimensional (2-DE)

A eletroforese bidimensional foi realizada em triplicata. Foram aplicados 600 µg de proteína em cada amostra, os géis foram corados com Coomassie Blue e as imagens foram analisadas com o *software* 2-D Platinum (G.E. Healthcare®).

Para focagem isoeletrica, foram utilizadas tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13 cm com gradiente não linear (pH 3-11, GE Healthcare®). As tiras de IPG foram embebidas durante 14 horas em 250 µl de tampão de reidratação contendo 600 µg de extrato protéico. Extratos de 2 amostras

compostas diferentes foram carregados em três tiras cada.

Foram adicionados 20 µl de tampão IPG a cada 1 ml de solução hidratante. Foram aplicados 3 ml de solução em tiras (500 ml por tira) e agitados suavemente durante 1 minuto. Posteriormente, foi adicionado 1 ml da mesma solução inicial com 20 µl de tampão IPG através dos copos de "carregamento", que normalmente servem para a implementação de amostras, criando uma "sobrecarga", visando atingir níveis máximos de focagem isoeletrica.

A corrida da primeira dimensão foi realizada a 15°C em aparelho "Ettan IPG phor 3" (GE Healthcare®), seguindo as instruções do fabricante (GE Healthcare®), nas seguintes condições: 500 V por 1 hora, 1000 V por 2 horas, gradiente de 1000 V a 8000 V até 1 hora e quarenta minutos, 8000 V até 5 horas, totalizando 50.000 V/h, com limite superior limite de corrente elétrica de 50 mA e potencial de 5 W, totalizando 9 horas e 40 minutos. Após focagem isoeletrica, as tiras foram armazenadas a -80°C até a conclusão da segunda dimensão.

Para a segunda dimensão, que foi realizada no "EttanDalt six" (G.E. Healthcare®), as "tiras" foram incubadas em tampão Tris-HCl pH 8,8 50 mm com uréia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v) e iodoacetamida 2,5% (p/v). ou 1 (p/v) de Ditiotretitol (DTT) por 15 minutos. Posteriormente, as "tiras" foram colocadas no topo da cuba de eletroforese em gel de poli(acrilamida) (18 x 16 x 0,1 cm). O sistema foi selado com solução selante contendo Tris-base 0,25 M, glicina 1,92 M, SDS 1% (p/v), 0,5% de agarose (p/v) e 0,002% de azul de bromofenol (p/v). A corrida eletroforética sob resfriamento de 20°C foi mantida em voltagem constante de 250 Volts por 5 horas. Os seis géis resultantes foram corados com corante azul brilhante Coomassie, digitalizados (*scanner* de imagem de alta precisão TM II, GE Healthcare®) e analisados usando o *software Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare®).

Análise das Imagens

Os géis foram digitalizados utilizando o TM II Image Scanner (GE Healthcare®) com alta resolução. As imagens foram salvas com extensões tiff e analisadas no software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare®). Os volumes relativos de "manchas" para cada amostra foram analisados utilizando um teste ANOVA para determinar a variância, após a utilização dos testes não paramétricos, como o biamostrai de Kolmogorov Smirnov, determinado para avaliar se as duas amostras são provenientes da mesma distribuição (hipótese nula H0), ou se são de distribuições diferentes (hipótese alternativa H1), seguido pelo teste de Shapiro Wilker, que foi empregado para determinar se os dados seguiam uma distribuição normal. Para determinar massas moleculares e pontos isoeletrônicos, foram utilizados marcadores de massa molecular (escala de proteínas "Benchmark" da Invitrogen) e marcadores de pontos isoeletricos (GE Healthcare®: 3-11 não linear). Foram definidos testes de correlação para gráficos de dispersão correspondentes às amostras com e sem RRIE.

Nos géis unidimensionais, foram demonstradas diferenças entre as amostras com RRIE e aquelas sem a patologia, no que diz respeito ao número de bandas protéicas e novas bandas de proteínas (Figura 1). A quantidade de bandas protéicas nas amostras com patologia ficou bem acima das bandas protéicas das amostras sem patologia, inclusive com a apresentação de novas bandas inexistentes nas amostras sem patologia, e isso também foi corroborado no perfil bidimensional das amostras de FGC, obtendo padrões proteicos com perfil semelhante aos géis SDS-PAGE de Balducci et al., 2007.

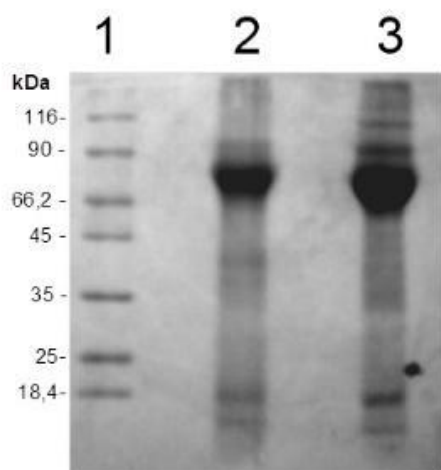


Figura 1 - SDS-PAGE 12% de proteínas extraídas do FGC. 1: marcador de peso molecular; 2: proteínas extraídas de pacientes sem RRIE; 3: proteínas extraídas de pacientes com RRIE. 50 µg de proteínas totais foram aplicados em cada canal. O gel foi corado com corante azul brilhante Coomassie.

A alteração do perfil proteico em resposta ao RRIE foi investigada via análise 2-DE, com alta resolução no padrão de manchas proteicas, em uma faixa de pI entre 3 e 11 e massa molecular de 10 a 220 kDa, que detectou (por coloração azul brilhante de Coomassie G250) uma média de 144 manchas proteicas nos géis triplicados com reabsorção radicular externa, e 49 manchas proteicas médias nos géis triplicados sem a patologia (Figura 2).

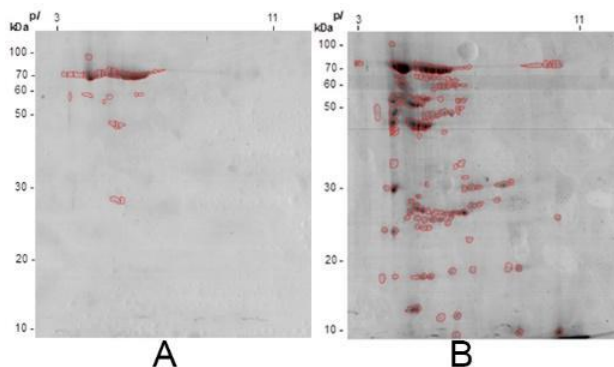


Figura 2 – Perfil diferencial bidimensional das proteínas extraídas do FGC analisadas com o *software* 2-D Platinum (G.E. Healthcare®). A. Amostra de pacientes sem RRIE; B- Amostra de pacientes com RRIE.

A maioria dos agregados proteicos se destacou em 4,0 à 8,0 pI, com poucos IDs de “spots” nesses extremos de pI. No grupo com reabsorção radicular externa havia muitos agregados com proteínas de baixo peso molecular, entre 15 e 20 kDa (cerca de 15 manchas), o que não ocorreu nas amostras sem a patologia, que apresentavam maior concentração de agregados de proteínas de alto peso molecular (acima de 70 kDa).

Havia treze agregados proteicos constituintes, tanto no grupo RRIE, quanto no grupo sem a patologia, mas apenas 6 foram estatisticamente significantes (ANOVA <0,05) e foram encontradas 122 manchas proteicas diferenciais entre as duas amostras (p < 0,005). Os agregados proteicos constituintes foram: ID 2, ID 5, ID 6, ID 11, ID 12 e ID 14, sendo notada maior intensidade de ID 5 e ID 6 (maior percentual de volume) no grupo com a patologia (Figura 3).

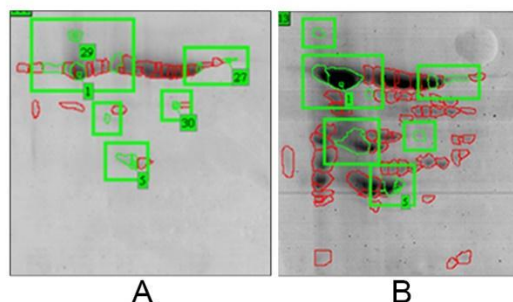


Figura 3 – Agregados proteicos. “Zoom” na região entre 50 e 80 kDa e 3,0 a 6,5 pI onde se podem observar proteínas encontradas em ambas as amostras de pacientes: aquelas sem RRIE (A), e aquelas com RRIE (B). A “correspondência” de “spots” (manchas) foi estatisticamente significativa (ANOVA (p < 0,05)).

Tendo apresentado um aumento significativo dos agregados ID 5, ID 2 e ID 6 na instalação da RRIE (Figura 4), há também uma variação das manchas iniciais durante a instalação da RRIE, principalmente com a nova expressão diferencial de proteínas (não blocos) de menor massa molecular (Figura 2).

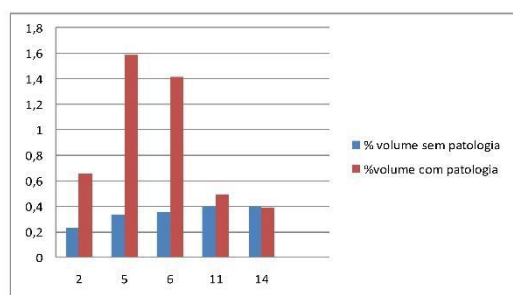


Figura 4 - Gráfico percentual para amostras com e sem RRIE. Os “spots” (manchas) 5 e 6 correspondem ao maior volume de proteínas totais na amostra com RRIE. O eixo X das abscissas corresponde ao respectivos ID dos “spots” (manchas) em ordem numérica, e o eixo Y das ordenadas corresponde ao volume percentual das respectivas amostras.

Houve aumento de 295% no volume do “spot” ID 2, variando de 0,22% em relação ao volume total nas amostras sem patologia a 0,65% em relação ao volume total nas amostras com patologia. Variação semelhante também ocorreu com o “spot” ID 11: 0,40% em relação ao volume total nas amostras sem a patologia e 0,49% em relação ao volume total nas amostras com a doença, causando um aumento de 12,25%.

O “Spot” ID 5 aumentou em volume 0,33% em relação ao percentual de volume total nas amostras sem patologia, e 1,58% em volume em relação ao percentual de volume total nas amostras com RRIE, totalizando um aumento de 478%.

O “Spot” ID 6 aumentou em volume 0,35% em relação ao percentual de volume total nas amostras sem patologia, e 1,41% em volume em relação ao percentual de volume total nas amostras com patologia, totalizando um aumento de 402%.

O coeficiente de correlação entre o FCG repetido três vezes para os pacientes sem RRIE foi de 0,99 e o coeficiente de correlação para os pacientes com RRIE foi de aproximadamente 0,67 (Figura 5).

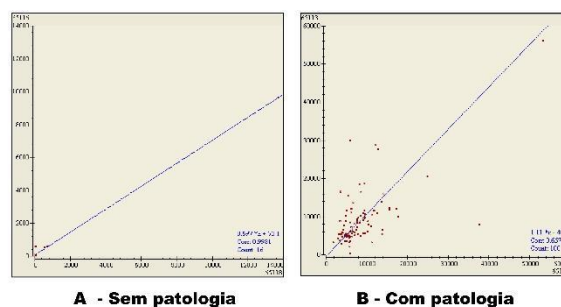


Figura 5 - Gráficos de correlação de réplicas de perfis proteicos bidimensionais do FCG. Os valores dos eixos X e Y mostram o volume de manchas proteicas do FCG de pacientes sem RRIE (A) e com RRIE (B).

Apareceram quinze agregados proteicos que só foram mostrados nas amostras com baixo peso molecular e patologia (entre 15 e 20 kDa): ID 26, ID 37, ID 41, ID 42 ID 43, ID 44, ID 45, ID 46, ID 47, ID 48, ID 49, ID 50, ID 51, ID 99 e ID 104 (Figura 2).

Discussão

Todas as análises do fluido crevicular gengival (FCG) envolvendo RRIE, usando géis SDS-PAGE e/ou *Western Blot*, mostram espectros de resolução limitada de proteínas expressas durante o estado patológico e encontradas no FCG (BALDUCCI, 2007; MAH;PRASAD, 2004;). Este estudo foi conduzido com maior escopo e técnicas de resolução na busca de marcadores específicos para a patologia inflamatória radicular, utilizando eletroforese bidimensional.

A quantidade de FCG coletada por meio de uma tira filtrante cônica colocada dentro do sulco gengival foi muito pequena: 0,5 a 1 µl (LAMSTER et al.,1985). O acréscimo da produção de FCG pelo aumento da permeabilidade vascular ao redor do epitélio juncional e sulcular foi relacionado à presença de aparelhos ortodônticos, assim como o aumento do volume de FCG durante a movimentação ortodôntica (PENDER et al., 1994). Para alguns estudiosos, a qualificação dos constituintes do FCG e seu fluxo podem

indicar a presença de determinadas patologias (PENDER et al., 1994).

Alguns autores não encontraram aumento na concentração total de proteína do FCG após movimentação dentária induzida (BURKE et al., 2002), utilizando análise densitométrica quantitativa de SDS-PAGE; mas encontraram algumas proteínas não amortecidas usando análise de *Western blot*, corroborando achados semelhantes de outros autores (UEMATSU et al., 1996; LOWNEY et al., 1995), que sugerem que há um aumento qualitativo no FCG em algumas proteínas, durante a movimentação dentária induzida, mas mantendo o mesmo número total de proteínas (concentração) devido à sua diluição (BURKE et al., 2002).

Como o FCG é um transudato (BICKEL et al., 1985), a concentração de proteínas presentes no soro sanguíneo foi maior, mas o espectro protéico em relação às proteínas maiores foi muito semelhante ao do plasma sanguíneo (ESTREICHER et al., 1996). Nas amostras sem RRIE, foram apresentadas muitas manchas proteicas de alto peso molecular (acima de 70 kDa), semelhantes às proteínas do plasma sanguíneo.

A movimentação ortodôntica é provavelmente um processo inflamatório controlado, mas que induz um trauma local, com passagem de proteínas de alto peso molecular do plasma sanguíneo para o FCG (aumento da permeabilidade sanguínea do sulco gengival para o fluido crevicular gengival), em especial a albumina sérica (BICKEL et al., 1985), o que nos leva a pensar que o FCG não é um exsudato inflamatório típico, mas provavelmente modulado por um gradiente osmótico (BICKEL et al., 1985).

Bostanci et al., 2010 demonstraram por meio de espectrometria de massas LC (*"label free"*) do FCG de pacientes com doença periodontal, 88 proteínas humanas em amostras sem qualquer patologia, e portanto consideradas "saúdáveis", que foram utilizadas como grupo controle.

Utilizamos uma análise inferencial comparativa, por meio do NCBI (Centro nacional de informação biotecnológica), onde foram identificados os respectivos peso moleculares e ponto isoelétrico das proteínas de Bostanci et al., 2010 e os "*spots*" protéicos identificados nos nossos géis bidimensionais, com o mesmo perfil protéico (pI e MW), e identificou-se 10 proteínas comuns às duas pesquisas (Tabela 1).

Não se pode concluir a partir da comparação do ponto isoelétrico (pI) e do peso molecular (MW), mas apenas através do sequenciamento de proteínas (espectrometria de massa), que um determinado "*spot*" ID corresponde a uma proteína específica, mas podemos supor isso, probabilisticamente falando, ou seja, estimando proteínas "prováveis" em nossas amostras com base na literatura recorrente, como na Tabela 1. Algumas proteínas podem apresentar uma discrepância na massa molecular e no pI teórico e esse fenômeno é comumente encontrado em géis bidimensionais devido a clivagens proteolíticas, migração de diferentes isoformas derivadas de diferentes genes e modificações pós-traducionais que podem ocorrer.

Os maiores constituintes das proteínas do FCG são a albumina (BOSTANCI et al., 2010; SILVA 2013 et al., 2013) (67 kDa), a transferrina (75 kDa) e a imunoglobulina IgG (NGO et al., 2010). O "*Spot*" ID 12 foi o mais abundante em termos de percentual do volume total, sendo provavelmente a proteína albumina. Como a albumina é um carreador protéico, ou seja, um veículo que liga proteínas a hormônios, lipoproteínas e citocinas, talvez tenha havido uma pequena liberação de dipeptídeos e proteínas relacionadas ao sistema imunológico (típicas desta patologia), como as citocinas, mantendo inalterado o equilíbrio na concentração proteica total (BURKE et al., 2002). Em contrapartida, conforme relatado também por estudos anteriores aplicando proteômica, as citocinas não foram detectadas na doença periodontal (BOSTANCI et al., 2010;

SILVA et al., 2013). Esse achado pode ser devido às suas baixas concentrações ou baixo peso molecular, para os quais uma queda no sinal do peptídeo ainda é um fator limitante para detecção, ou devido ao fato de serem mascaradas pela presença de outras proteínas importantes, como a albumina (SILVA et al., 2013).

Por meio desta inferência (Tabela 1) foram encontradas duas proteínas que tiveram aumento significativo nos géis com RRIE: antitripsina R1 (spot ID 5) e antiquimotripsina R1 (spot ID 6). A antitripsina é uma pequena glicoproteína que atua como inibidor de serina proteases, liberadas por leucócitos neutrófilos estimulados: catepsina G e elastase leucocitária neutrófilo, enzima endógena capaz de degradar elastina e colágeno (NGO et al., 2010).

A alfa-1-antiquimotripsina é um inibidor fisiopatológico que controla o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), um fator de fase aguda (HAN et al., 2008), estimula os osteoclastos e promove a reabsorção radicular (HAN et al., 2008). Essa molécula é sintetizada principalmente por monócitos e macrófagos e é um importante participante da inflamação (PASTON et al., 1995). A antiquimotripsina alfa 1 inibe a catepsina B (PASTON et al., 1995), uma cisteína lisossomal típica que tem sido relatada como tendo atividade colagenolítica, e é aumentada pela movimentação dentária ortodôntica (SUGIYAMA et al., 2003). Catepsinas B e G foram encontradas em odontoclastos durante a reabsorção radicular fisiológica e foram detectadas em tecido reabsorvido de dentes decíduos (SASAKI; UENO et al., 1992).

Este aumento significativo em dois agregados, ID 5 e ID 6, que se relacionam com a RRIE, pode caracterizar estas duas proteínas como proteínas relacionadas à resposta imune, uma vez que se trata de uma patologia autoimune, que necessita de confirmação através de análise por espectrometria de massa (ESI-TOF MS).

Os “spots” protéicos de baixo peso molecular, de 15 a 20 kDa, apresentados nas amostras com reabsorção radicular, mas que não estavam presentes nas amostras sem a patologia, podem ter relação direta com a reabsorção radicular, e como a maioria das proteínas imuno-relacionadas são proteínas de baixo peso molecular, e por se tratar de uma patologia autoimune, apresentam os seguintes 16 “spot” IDs como candidatos a marcadores protéicos de RRIE em pacientes em tratamento ortodôntico: ID 27, ID 37, ID 41 ID 42 ID43, ID 44, ID45, ID46, ID 47, ID 48, ID 49, ID 50, ID 51, ID 99 e ID 104.

Porém, existem estudos utilizando cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS), que não necessitam de géis bidimensionais para a sua análise, como o de Rody et al., 2014 que investigaram as diferenças na composição do FCG entre molares decíduos reabsorvidos e dentes permanentes não reabsorvidos, e não encontraram antitripsina R1 e alfa-1-antiquimotripsina em seus resultados. Foi encontrada a proteína albumina, que representa 25% do conteúdo total do sinal proteico, mascarando a identificação de espécies pouco abundantes (RODY et al., 2014).

Mohd Nasri et al., 2020, também, realizaram um análise proteômica quantitativa baseada em cromatografia líquida de massa (LC-MS) do FCG de pacientes ortodônticos, para identificar marcadores da reabsorção radicular externa, e encontraram 186 proteínas, sendo 16 proteínas com significância estatística, entre elas algumas proteínas relacionadas à processos imunológicos, destacando-se a imunoglobulina de cadeia J, a imunoglobulina pesada variável 4-34, e a vitronectina, podendo ser essas proteínas utilizadas como biomarcadores protéicos da RRIE.

Recentemente, Mohammed-Salih et al., 2023 realizaram géis bidimensionais do FCG, de pacientes ortodônticos, e após análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF

MS/MS), dezenove “spots” protéicos foram identificados entre as amostras, com oito proteínas sendo estatisticamente significantes, com destaque para: a imunoglobulina Kappa, a lipocalina associada a neutrofilia gelatinase (NGAL), a neurolisina mitocondrial (NEUL), a queratina citoesqueleto 1 tipo II (K2C1, a S-100-A9, receptor sensível de cálcio extracelular (CASR).

Duas revisões sistemáticas de biomarcadores da reabsorção radicular

externa foram também recentemente publicadas, onde Kappor et al., 2022 citam que foram encontradas vários candidatos para biomarcadores, com uma extensa heterogeneidade de biomarcadores, com uma crítica a limitação do tamanho amostral, bem como na necessidade de uma análise mais profunda de bioinformática, para identificar as interações entre as proteínas, e a inter relação

Tabela 1 - Proteínas do FCG de pacientes com RRIE, identificadas por peso molecular (PM), ponto isoelétrico (pI) e fentimol por Bostanci et al., 2010, em uma técnica sem a utilização de géis bidimensionais. A última coluna à direita corresponde aos nossos dados, com a massa molecular (MW’ “in gel”) e o ponto isoelétrico (pI “in gel”), dos respectivos “spots” ID, dos géis bidimensionais realizados na presente pesquisa.

N.º Acesso	Nome	Função	MW*	pI*	[lim] (fmol)**	MW “in gel”	pI “in gel”	ID
P01009	Antitripsina R1	Resposta Imune	44,32	5,37	30.0 ±15.2	44	5,44	5
P02768	Soro Albumina	Transporte	67,24	5,85	220.4 ±230.9	68	4,72	12
P04406	GAPDH 3	Metabolismo	33,85	6,59	8.3 ±6.5	33	6,28	66
P01861	Imunoglobulina G4 cadeia C	Resposta imune	34,06	6,43	26.4 ±17.9	34	4,2	109
P48668	Keratina tipo II citoesqueleto 6E	Diferenciação celular	55,56	5,72	151.2 ±195.9	55	5,14	16
P00738	Haptoglobina	Metabolismo	43,34	6,13	10.9 ±9.1	43	6,14	68
P01834	Imunoglobulina kapa cadeia C	Resposta imune	9,36	6,04	15.5 ± 13.5	9	4,1	3
Q01201	Fator RelB Transcrição	Organização celular	57,42	5,61	55.8 ± 0.0	57	5,75	116
P02787	Soro transferrina	Transporte	75,18	6,7	16.8 ± 12.06	75	7,06	126
P02774	Proteína ligação vitamina D	Transporte	51,13	5,22	14.6 ± 0.0	51	5,32	82

entre outras condições inflamatórias como a periodontite crônica e a RRIE. O outro trabalho de Fonseca et al., 2022 também critica a falta de homogeneidade dos resultados, pela ausência de metodologias bem definidas, o tamanho amostral, e cita que isso pode ser devido a variações genéticas e que não há ainda um consenso com relação a validação

desses agregados protéicos como biomarcadores, sendo que a padronização futura e desenvolvimento de novas tecnologias pode ser necessária para a sua implementação na prática clínica.

A limitação deste trabalho está na pequena amostra, na dificuldade de manter um sulco gengival livre de bactérias, saliva e contaminantes (apesar dos esforços

metodológicos envolvidos), bem como na falta de protocolos bem definidos para este experimento, devido ao seu caráter único e ao uso de géis bidimensionais. Para evitar a contaminação pela saliva, foi realizado isolamento relativo com algodão e sucção de saliva. A presença de microrganismos e, consequentemente, de suas proteínas exógenas no FCG, foi minimizada por cuidadosa profilaxia profissional realizada antes do processo de coleta de amostras de proteínas.

Conclusão

Há uma diferenciação dos índices de alguns “spots” (*manchas*) proteicos no FCG de pacientes em tratamento ortodôntico, que apresentam RRIE em comparação àqueles sem RRIE. A busca por marcadores protéicos mais específicos será de grande valia para o

diagnóstico precoce de grupos de risco para a RRIE e para o planejamento ortodôntico, minimizando assim sequelas decorrentes desta patologia.

Este trabalho abre oportunidades futuras, com base nos resultados atuais, permitindo a posterior complementação por análise peptídica de proteínas diferenciais por espectrometria de massa, obtendo assim o seu sequenciamento, e posterior análise de banco de dados “*in silico*”, ajudando assim a esclarecer o complexo mecanismo de reabsorção radicular externa. A realização de espectrometria de massa (ESI-TOF MS) para identificação precisa de proteínas em FCG será de grande valia para a produção de anticorpos específicos para ID 5 e ID 6, e proteínas com massa molecular entre 15 e 20 kDa para utilização em imunoenaios (ELISA) voltados à detecção precoce da patologia (kits de diagnóstico).

Abstract

External inflammatory root resorption (EIRR) is the most common iatrogenic complication related to orthodontic treatment. The initial resorption gaps are small, being identified only by histological methods and induce areas of resorption after 7 weeks of treatment, which will only be detected on periapical radiographs after 5 to 6 months of treatment. The aim of this study was to identify and map the proteins differentially expressed and secreted in the gingival crevicular fluid (GCF) of patients undergoing orthodontic treatment with EIRR. A total of 3,600 µg was extracted from two pools of GCF samples from 60 patients undergoing orthodontic treatment, with and without EIRR, and two-dimensional electrophoresis was performed in triplicate and the protein profiles were scanned. Thirteen constitutive protein spots common to the groups with and without EIRR were detected; however, only 6 were validated by ANOVA ($p < 0.05$) and 122 differential protein spots were found between the two samples ($p < 0.005$). The protein stains were: ID 2, ID 5, ID 6, ID 11, ID 12, ID 14 and those that suffered the most percentage volume variation were ID 5, ID 6, with greater intensity in the group with EIRR. It is concluded that there is a differentiation in the levels of some protein spots in the GCF of patients undergoing orthodontic treatment who present EIRR. The search for more specific protein markers will be of great value for the early diagnosis of risk groups for EIRR and for orthodontic planning, thus minimizing sequelae resulting from this pathology

Descriptors: Root Resorption, Orthodontics, Gingival Crevicular Fluid, Protein Aggregates

Referências Bibliográficas

- 1- WILKINS, M.R; WILLIAMS K.L; APPEL R.D; HOCHSTRASSER D.F. *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Berlin: Springer-Verlag 243 p, 1997.
- 2- HARRIS EF. Root resorption during treatment orthodontic therapy. *Semin Orthod*; v.6, n.3, p.183-94. 2000
- 3- MAVRAGANI M, BOE OE, WISTH PJ, SELVIG K.A. Changes in root length during orthodontic treatment: advantages for immature teeth. *Eur J Orthod*, v.24, n.1, p. 91-7. 2002;
- 4- ACAR A, CANYUREK U, KOCAAGA M, ERVERDI N. Continuous vs. discontinuous force application and root resorption. *Angle Orthod*, v.69, n.2, p.159-63. 1999
- 5- BALDUCCI L, RAMACHANDRAN A, HAO J, NARAYANAN K, EVANS C, GEORGE A. Biological markers for evaluation of root resorption. *Ach Oral Biol* v.52, n.3, p.203-8. 2007
- 6- WALKER L, ENCISO R, MAH J. Three –dimensional localization of maxillary canines with cone beam computed tomography. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.128, n.4, p.418-23. 2005
- 7- OWMANN-MOLL P, KUROL J, LUNDGREN D. Continuous versus interrupted continuous orthodontic force related to early tooth movement and root resorptions. *Angle Orthod*, v.65, n.6, p.395-402.1995
- 8- LEVANDER E, BAJKA R, MALMGREN O. Early radiographic diagnosis of apical root resorption during orthodontic treatment: a study of maxillary incisors. *Eur J Orthod*, v.20, n.1, p.57-63.1998
- 9- BURKE JC, EVANS CA, CROSBY TR, MEDNIEKSMI. Expression of secretory proteins in oral fluid after orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.121, n.3, p.310-5.2002
- 10- BANG SJ, CIMASONI G. Total protein in human crevicular fluid. *J Dent Res*, v.50, n.6, p.1683. 1971
- 11- KOJIMA T, ANDERSEN E, SANCHEZ JC, WILKINS MR; HOCHSTRASSER DF, PRALONG W F et al. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S1 0A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 Family. *J Dent Res*, v.79, n.2, p.740-7. 2000
- 12- MAH J, PRASAD N. Dentine phosphoproteins in gingival crevicular fluid during root resorption. *Eur J Orthod*, v.26, n.1, p.25-30. 2004
- 13- LAMSTER IB, HARTLEY L, VOGEL RI. Development of a biochemical profile for gingival crevicular fluid: Methodological considerations and evaluations of collagen degrading and ground substance Degrading enzyme activity during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*, v.56, n.11, p.13-21.1985
- 14- PENDER N, SAMUELS RH, LAST KS. The monitoring of orthodontic tooth movement over a 2 – year period by analysis of gingival crevicular fluid. *Eur J Orthod*, v.16, n.6, p.511-20.1994
- 15- UEMATSU S, MOGIM, DEGUCHI T. Interleukin (IL) -1 beta, IL – 6, tumor necrosis factor – alpha, epidermal growth factor, and beta 2 – microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human Orthodontic tooth movement. *J Dent Res*, v.75, n.1, p.562-56. 1996
- 16- LOWNEY JJ, NORTON LA; SHAFER DM, ROSSOMANDO EF. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor alpha in the human gingival sulcus. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.108, n.5, p.519-24.1995
- 17- BICKEL M, CIMASONI G, ANDERSEN E. Flow and albumin content of early (pre-inflammatory) gingival crevicular fluid from human subjects. *Arch Oral Biol*, v.30, n.8, p.599 -602.1985
- 18- ESTREICHER A, BROGGIATO P, DUROUX E, ANDERSEN; G. CIMASONI G. Low molecular – weight proteins in human gingival crevicular fluid. *Arch Oral Biol*, v.41, n.8-9, p. 733-8.1996
- 19- BOSTANCI N, HEYWOOD W, MILLS K, PARKAR M, NIBALI L, DONOS N. Application of label – free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MSe (gingival exsudatome). *J Proteome Res*, v.9, n.5, p.2191-9. 2010

- 20- SILVA B CM, COLOMBO AP, TANAKA M, RAYO C, XIAO Y, SIQUEIRA WL. Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid in different periodontal conditions. *PLoS One*, v.8, n.10, p.e75898.2013
- 21- NGO LH, VEITH PD, CHEN YY, CHEN D, DARBY IB, REYNOLDS EC. Mass spectrometric analyses of peptides and proteins in human gingival crevicular fluid. *J Proteome Res*, v.9, n.4, p.1683-93.2010
- 22- HAN YP, YAN C, GARNER WL. Proteolytic activation of matrix metalloproteinase-9 in skin wound healing is inhibited by alpha-1-antichymotrypsin. *J Invest Dermatol*, v.128, n.9, p.2334-42.2008
- 23- PASTON PA. Studies on inhibition of neutrophil cathepsin G by alpha 1-antichymotrypsin. *Inflammation*, v.19, n.1, p.75-81.1995
- 24- SUGIYAMA Y, YAMAGUCHI M, KANEKAWA M, YOSHII M, NOZOE T, NOGIMURA A et al. The level of cathepsin B in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod*, v.25, n.1, p.71-6.2003
- 25- SASAKI T, UENO M E. Immunocytochemical localization of cathepsins B and G in odontoclasts of human deciduous teeth. *J. Dental Res*, v.71, n.12, p.1881-4.1992
- 26- RODY WJ JR, HOLLIDAY LS, MCHUGH KP, WALLET SM, SPICER V, KROKHIN O. Mass spectrometry analysis of gingival crevicular fluid in the presence of external root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.145, n.6, p.787-98.2014
- 27- MOHD N FA, ZAINAL A SH, KARSANI SA et al. Label-free quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid to identify potential early markers for root resorption. *BMC Oral Health*, v.20, n.256, p.2-11.2020
- 28- MOHAMMED-SALIH HS, AI-LAMI HA, SALOOM HF, et al. Detection of orthodontically induced inflammatory root resorption-associated biomarkers from the gingival crevicular fluid by proteomics analysis: a randomized-controlled clinical trial. *3 Biotech*, v.13, n.157, p.2-16.2023
- 29- KAPOOR P, CHOWDHRY A, BAGGA DK, BHARGAVA D. Biomarkers in external apical root resorption: An evidence-based scoping review in biofluids. *Rambam Maimonides Med J*, v.13, n.4, p.1-19.2022
- 30- FONSECA AC, LÓPEZ AM. Detection of oral biomarkers as a diagnostic tool for orthodontically induced inflammatory root resorption: a literature review. *Rev Estomatol Herediana*, v.32, n.3, p.305-312.2022