

ELIZABETH FERREIRA MARTINEZ

Estudo da expressão da α -actina de músculo liso em cultura de células de polpas dentárias e gengivas humanas tratadas com o fator de transformação de crescimento- β 1 (TGF- β 1)

ELIZABETH FERREIRA MARTINEZ

ESTUDO DA EXPRESSÃO DA α -ACTINA DE MÚSCULO LISO EM CULTURA DE CÉLULAS DE POLPAS DENTÁRIAS E GENGIVAS HUMANAS TRATADAS COM O FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DE CRESCIMENTO- β 1 (TGF- β 1)

Tese (Doutorado) apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Biologia Celular e Tecidual).

São Paulo
2008

ELIZABETH FERREIRA MARTINEZ

ESTUDO DA EXPRESSÃO DA α -ACTINA DE MÚSCULO LISO EM CULTURA DE CÉLULAS DE POLPAS DENTÁRIAS E GENGIVAS HUMANAS TRATADAS COM O FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DE CRESCIMENTO- β 1 (TGF- β 1)

Tese (Doutorado) apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração
Biologia Celular e Tecidual

Orientador
Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Martinez, Elizabeth Ferreira.

Estudo da expressão da α -actina de músculo liso em cultura de células de polpas dentárias e gengivas humanas tratadas com o fator de transformação de crescimento- β 1 (TGF- β 1) / Elizabeth Ferreira Martinez. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Victor Elias Arana-Chavez.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia dos tecidos mineralizados.

Versão do título para o inglês: Expression of α -smooth muscle actin in cultured human dental pulp and gingival fibroblasts induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1).

Descritores: 1. Polpa dentária humana 2. Fibroblastos de polpa 3. Fator de transformação de crescimento β 1 (TGF- β 1) 4. Miofibroblasto 5. α -actina de músculo liso 6. Cultura celular I. Arana-Chaves, Victor Elias II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Tecidual. III. Título.

ICB/SBIB062/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elizabeth Ferreira Martinez.

Título da Tese: Estudo da expressão da α -actina de músculo liso em cultura de células de polpas dentárias e gengivas humanas tratadas com o fator de transformação de crescimento- β 1 (TGF- β 1).

Orientador(a): Victor Elias Arana-Chavez.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

DEDICATÓRIA

A Deus, sobre todas as coisas, pela força divina concedeu-me a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Maria Amélia e Antonio, companheiros desta jornada e exemplos de coragem e dedicação, ergueram-me nos momentos mais difíceis. Pelo amor incondicional sempre colocaram a educação dos filhos em primeiro lugar. Minha eterna admiração e respeito. Amo muito vocês.

Ao meu sobrinho e afilhado, Leandro, pela alegria contagiante.

À memória de meus avós, **Joaquim & Rosa e Antonio & Evangelina**. Muitas saudades e lembranças carinhosas do meu tempo de criança.

AGRADECIMENTOS

Em especial, ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, meu orientador, exemplo de ética, serenidade, competência e dedicação à docência. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos e pela confiança depositada.

À Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo, pela oportunidade de ingresso na carreira universitária. Sua seriedade e dedicação merecem meu respeito e admiração.

À Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini M. Sousa, pela disponibilidade demonstrada ao longo da realização deste trabalho e utilização das dependências do laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia da USP.

Ao meu amigo, Clóvis de Jesus Pereira, sempre presente nas maiores dificuldades encontradas nesta jornada. A sua amizade é uma dádiva de Deus.

Às minhas amigas, Adriana da Costa Neves e Cristiane Furuse, que me acompanharam com vossa amizade durante todo este período.

À amiga Ariane Andrade Chaves, pelo estímulo e carinho, risadas e confidências.

Ao Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, sempre disponível, nos ensinou com muito critério, técnicas de obtenção de culturas primárias (linhagens osteogênicas).

Às minhas amigas de dança (flamenco), Ana Carolina Vectore, Jéssica Almeida, Sílvia Penhalbel, pelo convívio agradável e prazeroso.

Ao Prof. Dr. Jarbas de Arruda Bauer, o verdadeiro Mestre, por suas aulas formidáveis e descontraídas, amizade e incentivo.

Ao meu irmão, Marcelo Martinez, companheiro e amigo.

Ao Marcel Tonon, pela cumplicidade, amor e carinho.

À Fernanda Ângela Correia Barrence, técnica do Laboratório de Biologia dos Tecidos Mineralizados e amiga, muito prestativa e presente na rotina do laboratório.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biologia dos Tecidos Mineralizados, Tatiani Ayako Donato, Natasha D'Andrea Mateus, Vivian Bradaschia-Correa, Daniela Janones, Márcio Cajazeira Aguiar, Luciana Ferreira Massa, Newton Maciel Oliveira, Taís Oliveira, Karla Resende, Cristina Jimenes-Pellegrin, pela enriquecedora convivência.

Ao Gaspar Ferreira de Lima e Edson de Oliveira, técnicos dos setores de Microscopia Eletrônica e Fotografia do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, respectivamente, pelo zeloso trabalho.

Ao Serviço Social do Comércio (SESC) e a todos os colegas e amigos, em especial a Carla V. de Carvalho ("Persona"), Maria de Lourdes Marques, Silvia Aparecida Nago e Grece Érika, pela convivência sempre alegre e contagiante.

À Celiana Sandreley Silva, secretária da Pós-Graduação do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB da USP, pela disponibilidade e simpatia.

Às funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP, Bia, Elisa e Edna Toddai (in memoriam), pela amizade e carinho desde o curso de Graduação, me ensinaram a cumprir com excelência a rotina de laboratório.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo Auxílio a Pesquisa (processo nº 03/06996-9), cujos recursos permitiram o desenvolvimento parcial (inicial) deste trabalho.

Aos demais funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, pelo auxílio e disponibilidade.

E a todos que direta ou indiretamente, participaram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

*"O rio atinge
seus objetivos
porque aprendeu a
contornar
obstáculos."*

Lao Tse

RESUMO

MARTINEZ, E.F. **Estudo da expressão da α -actina de músculo liso em cultura de células de polpas dentárias e gengivas humanas tratadas com o fator de transformação de crescimento- β 1 (TGF- β 1).** Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Durante o processo de reparação tecidual, o fator de transformação de crescimento-beta 1 (TGF- β 1) apresenta um importante papel na regulação da expressão da α -actina de músculo liso (α -AML) e, portanto, na diferenciação miofibroblástica. Como os fibroblastos pulpares apresentam características peculiares, com a expressão de proteínas específicas que os diferem de fibroblastos de outros tecidos conjuntivos, o presente estudo avaliou *in vitro* se o TGF- β 1 aumenta a expressão de α -AML em fibroblastos pulpares humanos (FP) comparando-os com fibroblastos de gengiva (FG). Para tal, diferentes doses de TGF- β 1 (5 a 10 ng/ml) foram adicionadas às culturas de células, que foram tratadas com dois tipos diferentes de soro, o soro fetal bovino (SFB) e soro de bezerro (DCS), sendo a expressão da α -AML analisada por imunofluorescência e western-blotting. Além disso, as principais características ultra-estruturais foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão, bem como a expressão de outras proteínas da matriz extracelular como a tenascina (TN), osteonectina (ONEC) e vimentina. Ambos os tipos celulares imunoexpressaram α -AML mesmo sem o tratamento com o TGF- β 1. Quando o TGF- β 1 foi adicionado às culturas, a expressão da α -AML aumentou consideravelmente, principalmente quando tratadas com DCS, independente da concentração utilizada. Ultra-estruturalmente, ambos os tipos celulares apresentaram edentação de núcleo e miofilamentos na periferia da célula quando tratados com TGF- β 1. TN e ONEC imunoexpressaram somente em FP, independentemente do tratamento com TGF- β 1. Houve imunomacação para a vimentina em ambos os tipos celulares. Os resultados do presente estudo demonstraram que o TGF- β 1 induz a expressão de α -AML, sugerindo a indução do fenótipo miofibroblástico em fibroblastos pulpares.

Palavras-chave: α -actina de músculo liso. Polpa dentária humana. Fibroblastos de polpa. Fator de transformação de crescimento β 1 (TGF- β 1). Fenótipo miofibroblástico.

ABSTRACT

MARTINEZ, E.F. **Expression of α -smooth muscle actin in cultured human dental pulp and gingival fibroblasts induced by TGF- β 1.** Ph.D. Thesis – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) has been related to induce the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) in fibroblasts during repair. Since pulpal fibroblasts seem to be somewhat different from other fibroblasts, the present study investigated *in vitro* whether TGF- β 1 enhances the expression of α -SMA in human pulpal fibroblasts. TGF- β 1 was added in doses between 5-10 ng/ml to cultures of both dental pulp and gingiva human fibroblasts cultured with fetal bovine serum (FBS) and donor calf serum (DCS). The expression of α -SMA was analyzed by immunofluorescence and western-blotting, while the ultrastructure was evaluated by electron microscopy. In addition, the expression of tenascin (TN), osteonectin (ONEC), and vimentin was also investigated. Both cell types were immunoreactive for α -SMA even without TGF- β 1. When TGF- β 1 was added to cell cultures, the expression of α -SMA increased dramatically in pulpal fibroblasts, mainly when treated with DCS, independent of the concentration used. It was confirmed by the western-blotting analysis. Ultrastructure revealed myofilaments and indented nuclei in both fibroblasts treated with TGF- β 1. TN and ONEC were only immunolabeled in pulpal fibroblasts treated or not with TGF- β 1. Both fibroblast types were positive for vimentin. The present findings showed that TGF- β 1 up-regulated the expression of α -SMA thus inducing pulpal fibroblasts to acquire the myofibroblast phenotype.

Key words: α -smooth muscle actin. Human dental pulp. Pulpal fibroblasts. TGF- β 1. Myofibroblast phenotype.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Representação esquemática da transformação fibroblasto-miofibroblasto.....	30
Figura 2.	Fotomicrografias de fase de culturas primárias.....	43
Figura 3.	Imunomarcação para α -actina de músculo liso em fibroblastos de polpa e gengiva incubados com DCS.....	51
Figura 4.	Imunomarcação para α -actina de músculo liso em fibroblastos de polpa e gengiva incubados com SFB.....	52
Figura 5.	Imunomarcação para tenascina em fibroblastos de polpa incubados com DCS e SFB.....	54
Figura 6.	Imunomarcação para osteonectina em fibroblastos de polpa incubados com DCS e SFB.....	55
Figura 7.	Imunomarcação para vimentina em fibroblastos de polpa e gengiva incubados com DCS.....	57
Figura 8.	Imunomarcação para vimentina em fibroblastos de polpa e gengiva incubados com SFB.....	58
Figura 9.	Detecção por western-blotting de α -AML em fibroblastos de polpa e de gengiva, em DCS e SFB.....	60
Figura 10.	Micrografia eletrônica de transmissão de fibroblastos de polpa tratados com DCS.....	62
Figura 11.	Micrografia eletrônica de transmissão de fibroblastos de polpa tratados com SFB.....	63
Figura 12.	Micrografia eletrônica de transmissão de fibroblastos de gengiva tratados com DCS.....	64
Figura 13.	Micrografia eletrônica de transmissão de fibroblastos de gengiva tratados com SFB.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos primários utilizados, origem e procedência.....	45
Tabela 2. Constituição do gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	sigla em inglês para " <i>bovine serum albumine</i> "
°C	graus Celsius
CO ₂	gás carbônico
colágeno I	colágeno tipo I
colágeno III	colágeno tipo III
DAPI	sigla em inglês para " <i>4'-6-diamidino-2-phenylindole</i> "
DCS	sigla em inglês para " <i>donor calf serum</i> "
DMEM	sigla em inglês para " <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> "
FG	linhagem de fibroblastos cultivados da gengiva inserida humana
FGF	sigla em inglês para fator de crescimento de fibroblastos
FP	linhagem de fibroblastos cultivados de germes de dentes permanentes humanos
IL-1	interleucina do Tipo 1
IL-4	interleucina do Tipo 4
MEM	sigla em inglês para " <i>Minimum Essential Medium</i> "
NIDR	sigla em inglês para " <i>National Institute of Dental Research</i> "
NIH	sigla em inglês para " <i>National Institute of Health</i> "
PBS	sigla em inglês para " <i>phosphate buffer solution</i> "
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	sigla em inglês para " <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> "

rpm	rotações por minuto
SDS	sigla em inglês para " <i>sodium dodecyl sulfate</i> "
SFB	sigla em inglês para soro fetal bovino
TBST	sigla em inglês para " <i>tris-buffered saline tween-20</i> "
TGF	sigla em inglês para " <i>transforming growth factor</i> "
TNF	sigla em inglês para " <i>tumoral necrosis factor</i> "

LISTA DE SÍMBOLOS

%	sinal matemático indicativo de porcentagem
:	sinal matemático indicativo de proporção
α	alfa
β	beta
γ	gama
cm ²	centímetros quadrados
g	gramas
kD	kiloDalton
kV	kiloVolt
M	molar
mL	mililitro
mM	miliMolar
mm ²	milímetros quadrados
ng	nanograma
nm	nanômetro
V	volts
μ L	microlitro
μ g	micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Polpa dentária.....	24
2.2 Miofibroblasto e actina de músculo liso.....	27
2.3 Fator de transformação do crescimento (TGF- β).....	30
2.4 Tenascina.....	32
2.5 Osteonectina.....	36
3 PROPOSIÇÃO.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5 RESULTADOS.....	49
6 DISCUSSÃO.....	66
7 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXOS	91

1 INTRODUÇÃO

A polpa dentária constitui-se de um tecido conjuntivo frouxo representado por elementos celulares e matriz extracelular. As principais macromoléculas que compõem a matriz extracelular da polpa dentária são secretadas por células do tipo fibroblasto e são representadas pelas glicosaminoglicanas e proteínas estruturais ou adesivas (KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

Esta matriz é composta por uma variedade de proteínas e glicoconjugados que são secretados localmente e se acumulam em íntima associação com a superfície das células que os produzem, tendo um importante papel na morfogênese embrionária e diferenciação celular sendo essencial para a formação dos tecidos dentários (GARBARSCH et al., 1994). Além disso, é bem descrita na literatura a sua importância como um arcabouço físico para a manutenção do tecido pulpar (VAN AMERONGEN et al., 1984; HILLMANN e GEURTSSEN, 1997).

Algumas citocinas e fatores de crescimento podem modular a proliferação e diferenciação celular e síntese da matriz pulpar (SHIBA et al., 1998). Os fatores de transformação de crescimento (TGF) são expressos por células mesenquimais e odontoblastos, bem como células odontogênicas de origem epitelial, e influenciam a proliferação celular e formação de dentina, juntamente com componentes da matriz extracelular (DIXON et al., 1991; MELIN et al., 2000).

A reparação pulpar é resultado de sucessivos processos incluindo quimiotaxia, proliferação, neovascularização, remodelação da matriz extracelular e diferenciação celular, levando à formação de dentina reparativa. É bem descrito na literatura o papel dos TGFs, em particular do TGF- β 1 na indução da matriz extracelular para a produção de matrizes mineralizadas após injúria tecidual (MELIN

et al., 2000), bem como um papel imunossupressor na resposta inflamatória (D'SOUZA et al., 1998).

A formação de dentina reparativa, evidência de reparação pulpar, é análoga ao tecido cicatricial de outros tecidos conjuntivos (COHEN e BURNS, 2002). Esta produção de matrizes mineralizadas é induzida por algumas proteínas de matriz além de fatores de crescimento como o TGF- β 1.

Em tecidos moles, a formação de tecido de granulação e contração de ferida são caracterizadas pelo envolvimento de células mesenquimais especializadas com características morfológicas e bioquímicas intermediárias ao fibroblasto e às células do músculo liso, conhecidas como miofibroblastos (GABBIANI et al., 1971). Estas células têm um papel fundamental no fenômeno de retração da ferida, bem como na síntese e secreção de proteínas da matriz extracelular (EYDEN, 2001).

O marcador do fenótipo miofibroblástico é a expressão do isoforma α da proteína actina de músculo liso (AML) que compõe o citoesqueleto de todas as células e faz parte do aparelho contrátil das células musculares (CASELITZ et al., 1981). O TGF- β 1 é provavelmente o fator de crescimento mais importante na indução da AML (DESMOULIÈRE, 1995).

Em vista do exposto, o presente trabalho teve por objetivo estudar *in vitro*, o papel do TGF- β 1 na indução miofibroblástica com a expressão da proteína α -AML em células pulpareas comparando-se com fibroblastos de gengiva, bem como a expressão de outras proteínas da matriz extracelular relacionadas à formação de tecidos mineralizados (tenascina e osteonectina). Como os soros utilizados em cultura apresentam fatores de crescimento, avaliou-se também a influência de dois

tipos de soro [soro fetal bovino (SFB) e soro de bezerro (DCS)] na expressão da proteína α -AML nas culturas estudadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Polpa dentária

A polpa dentária constitui-se de um tecido conjuntivo, histologicamente formada por células e matriz extracelular com organização e localização peculiares, uma vez que se encontra rodeada por um tecido mineralizado e, portanto, rígido, denominado de dentina. Como a polpa e a dentina possuem origem em comum, a partir da papila dentária, além de características topográficas e funcionais intimamente relacionadas, desde a fase de formação até o dente completamente formado, constituem o complexo dentina-polpa (KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

Histologicamente, a polpa dentária é dividida em três porções bem definidas: a camada de odontoblastos, a região subodontoblástica e a região central. Esta última é constituída por um tecido conjuntivo frouxo, caracterizado pela presença de numerosos fibroblastos envolvidos pela matriz extracelular (KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

As principais classes de macromoléculas que compõem a matriz extracelular da polpa dentária são proteínas colágenas (colágenos tipo I e III), proteínas não colágenas (fibronectina, sialoproteína óssea, osteocalcina), proteoglicanas incluindo-se o ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de heparana e fosfolípidos, bem como tenascina e osteonectina, proteínas estas características de tecidos conjuntivos adjacentes a tecidos mineralizados (MARTINEZ et al., 2000; MARTINEZ e ARAÚJO, 2004) constituindo um gel característico que embebe os elementos celulares e fibrilares (LINDE, 1985; GOLDBERG e LASFARGUES, 1995; ARANA-CHAVEZ e MARTINEZ, 2008).

Sabe-se que a matriz extracelular da polpa dentária possui um importante papel na morfogênese embrionária e diferenciação celular sendo essencial para a

formação dos tecidos dentários (LESOT et al., 1981; THESLEFF e HURMERINTA, 1981; RUCH, 1985; THESLEFF et al., 1989; LUKINMAA et al., 1991; CHIQUET-EHRISMANN et al., 1994; GARBARSCHE et al., 1994; SAWADA e NANJI, 1995). Além disso, é bem descrito na literatura a sua importância como um arcabouço físico para a manutenção do tecido pulpar (VAN AMERONGEN et al., 1983; KARJALAINEN et al., 1986; HILLMANN e GEURTSSEN, 1997; KUO et al., 1992).

As principais células presentes na polpa dentária são fibroblastos, células vasculares (sanguíneas e linfáticas), endoteliais, perivasculares, neurais, macrófagos, linfócitos T e mesenquimais indiferenciadas, consideradas também células-tronco (“stem cells”) (GOLDBERG e LASFARGUES, 1995; GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003; SLOAN e SMITH, 2007).

Os fibroblastos da polpa são as células mais predominantemente encontradas na região central da polpa, e apresentam um aspecto característico fusiforme, com um núcleo central e ovóide e longos prolongamentos. Além disso, o citoplasma destas células apresenta típicas organelas de síntese e secreção de proteínas, refletindo sua capacidade de elaboração e renovação da substância intercelular e, portanto, de formação e manutenção da matriz extracelular (KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

Estas células possuem características peculiares se comparadas aos fibroblastos de outros tecidos conjuntivos (MARTINEZ et al., 2004), pois além da síntese e manutenção dos componentes da matriz extracelular, os fibroblastos pulpares respondem a estímulos específicos podendo se diferenciar em células semelhantes a odontoblastos (“odontoblast-like”) (ARANA-CHAVEZ e MARTINEZ, 2008).

Além disso, os fibroblastos pulpares expressam proteínas típicas de tecidos conjuntivos relacionados a tecidos mineralizados, como tenascina e osteonectina (MARTINEZ e ARAÚJO, 2004), fosfatase alcalina (SHIBA et al., 1998), sialoproteína óssea (NAKASHIMA et al., 1994), osteoaderina (BUCHAILLE et al., 2000), osteopontina e osteocalcina (GRONTHOS et al., 2000) sugerindo que estas células assemelham-se mais às células osteoblásticas do que às células fibroblásticas menos diferenciadas, devido à presença em seu citoplasma de proteínas da matriz responsáveis pela formação de tecidos mineralizados.

Inúmeros estudos têm demonstrado a presença, na região central da polpa, de células mesenquimais indiferenciadas conhecidas como células-tronco (“stem cells”), capazes de se auto renovarem, bem como, de se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares, dependendo do microambiente ao qual estão presentes (GRONTHOS et al., 2002).

A principal característica destas células é a possibilidade de regenerarem o complexo dentina-polpa, composto por matriz mineralizada tubular e odontoblastos, formando um arranjo estrutural semelhante ao complexo dentina-polpa encontrado em dentes humanos adultos (GRONTHOS et al., 2000).

A reparação pulpar após um procedimento operatório, traumático (erosivo ou fraturas), e microbiológico (cáries) envolve uma sequência de eventos celulares similares à reparação em tecidos moles. Estes eventos incluem quimiotaxia, proliferação de células mesenquimais no local da injúria e produção de matrizes extracelulares. A formação de dentina reparativa, evidência de reparação pulpar, é análogo ao tecido cicatricial de outros tecidos conjuntivos (STANLEY et al., 1983). Esta produção de matrizes mineralizadas e diferenciação das células mesenquimais

indiferenciadas (“stem cells”) é induzida por algumas proteínas de matriz além de fatores de crescimento como o TGF- β (SHIBA et al., 1998).

2.2 Miofibroblasto e actina de músculo liso

Durante muitos anos, propôs-se que o termo “miofibroblasto” caracterizava-se por células fibroblásticas localizadas nos tecidos de granulação que exibiam um importante aparato microfilamentoso citoplasmático (GABBIANI et al., 1971; 1976).

Atualmente, sabe-se que estas células também se encontram em tecidos normais especializados, onde possuem uma importante função constitutiva e mecânica, bem como, estão presentes durante uma variedade de condições patológicas (ROCHE, 1990; TOMASEK et al., 2002; EYDEN, 2004).

Esta célula tem um papel fundamental no fenômeno de retração da ferida, e síntese e secreção de proteínas da matriz extracelular (EYDEN, 2001).

Os principais microfilamentos que compõem o citoplasma da célula miofibroblástica contém actina e/ou desmina, e proteínas associadas a células de músculo liso, sendo principalmente caracterizada pela presença da isoforma α -actina de músculo liso, tipicamente localizada nas células musculares lisas da parede de vasos sanguíneos (DARBY et al., 1990).

As actinas são proteínas presentes somente nas células eucarióticas envolvidas em diversas funções celulares incluindo contração muscular, motilidade, adesão e divisão celulares, bem como, manutenção da morfologia celular (CHAPONNIER e GABBIANI, 2004). Em vertebrados, constitui uma família de seis proteínas, expressa em padrões específicos no desenvolvimento de cada tecido (McHUGH et al., 1991).

Existem quatro isoformas restritas a tipos teciduais, como, α -actina esquelética, α -actina cardíaca, α -actina de músculo liso e γ -actina de músculo liso, expressas respectivamente em músculos esquelético, estriado cardíaco, musculatura lisa vascular e entérica (CHAPONNIER e GABBIANI, 2004).

A α -actina de músculo liso é um microfilamento (5-8 nm de diâmetro) que compõe o citoesqueleto de todas as células musculares lisas de mamíferos, células mioepiteliais, e particularmente abundante em células musculares lisas de paredes de vasos (DARBY et al., 1990; McHUGH et al., 1991), tendo uma importante função contrátil nestas células (CASELITZ et al., 1981), sendo considerada um marcador do fenótipo miofibroblástico (VAUGHAN et al., 2000; HINZ et al., 2007). Está também presente em células conjuntivas como fibroblastos (DESMOULIÈRE et al., 1993; ARORA e McCULLOCH, 1999; PREMDAS et al., 2001; KINNER et al., 2002) e miofibroblastos (DARBY et al., 1990; HINZ et al., 2003, 2007).

Ultra-estruturalmente, estas células apresentam retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bastante desenvolvidos, vesículas de pinocitose, junções do tipo “gap”, e uma disposição organizada de feixes de miofilamentos de actina localizados focalmente ao longo eixo da célula (fibras de “stress”) ou se ligando a domínios de fibronectina extracelular através de proteínas especializadas de membrana (integrinas), caracterizando especializações da membrana chamadas de fibronexos (SCHÜRCH et al., 1998; EYDEN, 2001, 2004). Funcionalmente, este sistema mecano-transdutor é capaz de transmitir as forças geradas na matriz extracelular (DUGINA et al., 2001), sendo importante no processo de reparação tecidual.

Ainda que controversa, a hipótese mais amplamente aceita na literatura sobre a origem dos miofibroblastos é a partir de fibroblastos quiescentes, que uma vez

ativados, sintetizam abundante quantidade de cisternas de retículo endoplasmático rugoso para produção de matriz, e transdução de genes que codificam a transcrição de miofilamentos de actina de músculo liso, importantes na contratilidade celular (WELCH et al., 1990). O esquema da origem dos miofibroblastos está esquematizado na Figura 1.

Alliot-Licht et al. (2001) demonstraram a presença de células positivas para α -AML em cultura mineralizada de polpas dentárias humanas. Estas células apresentavam, ultra-estruturalmente, numerosas fibras e fibronexos bem desenvolvidos, bem como núcleo indentado e conexões intercelulares do tipo “gap”, caracterizando-as de miofibroblastos. Sugeriram que alguns fatores de crescimento presentes no meio de cultivo celular, combinados ou não a proteínas da matriz extracelular, seriam responsáveis pela diferenciação de células pulpares em miofibroblastos.

Para que ocorra a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos é essencial a ação de citocinas e fatores de crescimento, representados pela família dos TGF (fatores de transformação de crescimento), particularmente do TGF- β 1 (DESMOULIÈRE et al., 1993; DESMOULIÈRE, 1995; CHAPONNIER e GABBIANI, 2004).

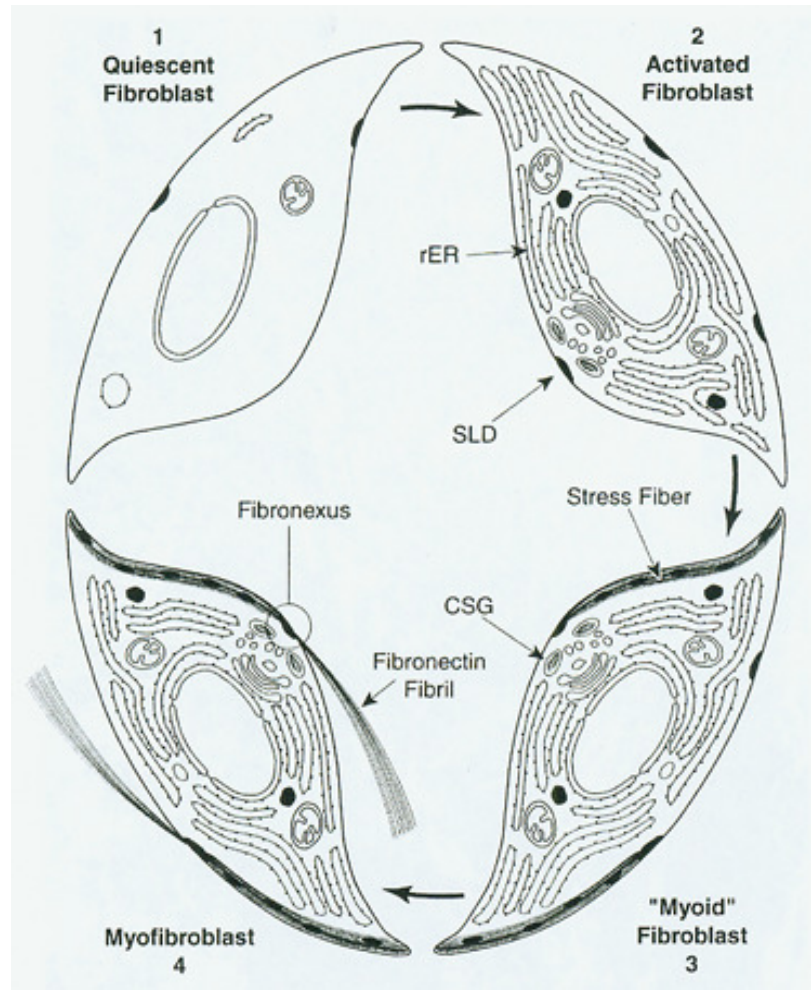


Figura 1. Representação esquemática da transformação fibroblasto-miofibroblasto. Quatro estágios são identificáveis ultra-estruturalmente. Observar que os estágios 3 (“mióide” fibroblasto) e 4 (miofibroblasto) são compatíveis através de microscopia de luz com a caracterização de miofibroblastos positivos para actina de músculo liso. rER, retículo endoplasmático rugoso; SLD, densidade linear submembrana; CSG, grânulos de secreção de colágeno. Fonte: Eyden (2003).

2.3 Fator de transformação do crescimento (TGF- β)

A superfamília dos TGF- β inclui vários fatores de crescimento responsáveis pela diferenciação e morfogênese celular em diferentes células e tecidos, tanto em condições fisiológicas como patológicas, através de receptores de superfície celular. São representadas pelas seguintes subfamílias: TGF- β ($-\beta$ 1, $-\beta$ 2, $-\beta$ 3, $-\beta$ 4 e $-\beta$ 5);

activinas e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (KINGSLEY, 1994; REDDI, 1994).

O TGF- β 1 é um regulador multifuncional do crescimento e diferenciação celular durante desenvolvimento e reparação, influenciando a síntese de componentes da matriz extracelular, como colágenos, fibronectina, laminina e glicosaminoglicanas (IGNOTZ et al., 1987; BORDER e NOBLE, 1994). Além disso, é um importante modulador da síntese de receptores de membrana, as integrinas, aumentando assim a interação célula-célula e célula-matriz (ROBERTS et al., 1988; HEINO et al., 1989).

O TGF- β 1 é provavelmente o fator de crescimento mais importante na indução da AML (DESMOULIÈRE et al., 1993; DESMOULIÈRE, 1995; GREGOIRE e LIEUBEAU, 1995; CHAPONNIER e GABBIANI, 2004). Desmoulière et al. (1993) demonstraram que o TGF- β apresenta um importante papel na diferenciação miofibroblástica durante os fenômenos fibrocontrativos e cicatriciais, por regular a expressão de AML nestas células.

Nos tecidos dentários, é bem descrito na literatura o papel do TGF- β 1 na indução da matriz extracelular para a produção de dentina após injúria tecidual (SMITH et al., 1995; MELIN et al., 2000), bem como um papel imunossupressor na resposta inflamatória (D'SOUZA et al., 1998). Está presente nos tecidos dentários em desenvolvimento, odontoblastos pós-eruptivos, e dentina humana, indicando um possível papel deste fator de crescimento na formação de dentina primária (CAM et al., 1990; D'SOUZA et al., 1990; VAAHTOKARI et al., 1991; FINKELMAN, 1992; CASSIDY et al., 1997).

A expressão coordenada do TGF e seus respectivos receptores possui crucial importância na diferenciação seqüencial dos diferentes tipos celulares envolvidos na formação do tecido pulpar, requerida nos processos patológicos, tais como, odontoblastos, células das linhagens neurais incluindo células de Schwann, e células endoteliais. Além disso, o padrão de expressão do TGF- β pode influenciar na forma e tamanho do elemento dental (NAKASHIMA et al., 1998).

Sabe-se que o TGF- β 1 induz a produção de colágeno tipo I na zona odontoblástica/subodontoblástica, por regular a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em odontoblastos (NAKASHIMA, 1992; TOYONO et al., 1997; HU et al., 1998; SHIBA et al., 1998; TZIAFAS et al., 1998; SLOAN e SMITH, 1999; MELIN et al., 2000; ABOUT e MITSIADIS, 2001; TZIAFAS, 2004). Este processo de reparação pulpar, após uma injúria tecidual, e formação de dentina terciária é influenciado também por proteínas presentes na matriz extracelular.

A tenascina e a osteonectina são glicoproteínas presentes na matriz extracelular dos tecidos conjuntivos e possuem fundamental importância em mediar a formação de matrizes de tecidos mineralizados (LUKINMAA et al., 1991; MARTINEZ et al., 2000). Estão presentes no tecido pulpar e são responsáveis pelas potencialidades mineralizantes deste tecido (MARTINEZ et al., 2000; MARTINEZ e ARAÚJO, 2004).

2.4 Tenascina

A tenascina é considerada uma glicoproteína oligomérica multifuncional da matriz extracelular, que dependendo da espécie possui pesos moleculares que variam de 190 a 320 kD (SPRING et al., 1989).

O nome proposto para esta proteína não implica tenacidade, mas combina as palavras *tendon* (do latim *tenere*) e a associa com *nascent* (do latim *nasci*) representando assim a sua localização e expressão, respectivamente (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1986).

A tenascina é sintetizada em locais e tempos específicos durante o desenvolvimento embrionário, mas tem sua presença restrita nos tecidos adultos, sendo também expressa em uma variedade de neoplasias malignas e processos de cicatrização (BOURDON et al., 1983; MACKIE et al., 1987).

Quatro tipos de tenascina são bem descritos na literatura: tenascina-C (presente em inúmeros tecidos de desenvolvimento, incluindo sistema nervoso central e periférico, bem como em tecidos cicatriciais e tumorais), tenascina-R (especificamente no sistema nervoso central e periférico, principalmente na fase embrionária), tenascina-X (mais proeminente nas células musculares esqueléticas e cardíacas) e tenascina-W (expressa principalmente nos tecidos ósseos em desenvolvimento e periósteo na fase adulta) (ERICKSON, 1993; CHIQUET-EHRISMANN, 1995, 2004; CHIQUET-EHRISMANN e CHIQUET, 2003; SCHERBERICH et al., 2004).

A tenascina-C desempenha um papel importante durante o desenvolvimento, remodelação tecidual e mesmo na patogênese de um grande número de tecidos, através da regulação da adesão celular e propriedades sinalizadoras das células. Suas atividades funcionais podem ocorrer através da interação direta com receptores da superfície celular, como integrinas, ou indiretamente através da modulação de outras proteínas da matrix extracelular - destacando-se a fibronectina - e moléculas de adesão célula-célula (JONES, F. S. e JONES, P. L., 2000), sendo

classificada como uma proteína inibitória da adesão e espreiamento celular (CHIQUET-EHRISMANN e CHIQUET, 2003; CHIQUET-EHRISMANN, 2004).

Na embriogênese, a tenascina-C está intensivamente expressa no mesênquima de órgãos em desenvolvimento tais como glândulas mamárias, dentes, rins, cartilagem embrionária, osso e sistema nervoso. No adulto a mesma fica restrita aos pericôndrios, periosteos, ligamentos, tendões, junções miotendinosas e músculos lisos. Muitos outros órgãos e tecidos tais como coração, músculo esquelético e órgão epitelial geralmente não expressam a tenascina, ou a expressam de forma tênue (BOURDON et al., 1983; CHIQUET-EHRISMANN, 1990; MARTINEZ et al., 2000).

Porém, apesar de estar ausente de tecidos e órgãos já desenvolvidos, a tenascina-C está fortemente expressa em diversas condições patológicas causadas por infecção, inflamação (por exemplo, tecidos de granulação envolvidos no processo de cicatrização) ou tumorigênese (neoplasias malignas de origem epitelial e mesenquimal) (CHIQUET-EHRISMANN e CHIQUET, 2003; CHIQUET-EHRISMANN, 2004).

A expressão da tenascina é célula tipo-específica e pode ser induzida por fibroblastos e células gliais com envolvimento de fatores de crescimento. Em muitos sistemas experimentais têm-se mostrado que as células epiteliais secretam um ou mais fatores de crescimento que estimulam os fibroblastos dos tecidos conjuntivos adjacentes a sintetizarem e secretarem tenascina (ERICKSON e BOURDON, 1989; CHIQUET-EHRISMANN, 1990). No caso de tumores epiteliais parece que há envolvimento do TGF- β (ERICKSON e BOURDON, 1989). Ainda, muitas outras interleucinas e citocinas induzem a produção de tenascina *in vitro*, tais como a IL-1

(McCHAREN e LIGHTNER, 1992); IL-4, TNF α (RETTIG et al., 1994) e FGF (CHIQUET-EHRISMANN, 1995).

É descrito na literatura que a manutenção da expressão desta glicoproteína em polpas dentárias adultas, sendo secretada por fibroblastos, está associada com a regulação da diferenciação celular envolvida na formação de matrizes de tecidos mineralizados (THESLEFF et al., 1987; LUKINMAA et al., 1991; MARTINEZ et al., 2000; MARTINEZ e ARAÚJO, 2004), bem como, migração e diferenciação celulares.

É também sintetizada por osteoblastos (MACKIE e RAMSEY, 1996) sendo sugerida que sua expressão seja também estimulada por TGF- β e desta forma a tenascina-C pode agir como um mediador da neoformação óssea induzida por este fator de crescimento (MACKIE et al., 1998).

Além dos fatores de crescimento, a sua expressão pode ser induzida por esforços mecânicos (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1994; CHIQUET et al., 1996; CHIQUET, 1999; JONES, F. S. e JONES, P. L., 2000; CHIQUET-EHRISMANN e CHIQUET, 2003). Isto explica, por exemplo, porque no desenvolvimento de órgãos tais como os dentes, o epitélio induz a expressão de tenascina não só por fatores de crescimento, mas também porque as células dos tecidos subjacentes estão submetidas a esforços (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1986).

Além de possuir um importante papel na organogênese dentária, a tenascina está envolvida nos processos iniciais de osteogênese e condrogênese, assumindo um papel importante na diferenciação de células mesenquimais formadoras de tecidos duros (MACKIE et al., 1987; THESLEFF et al., 1988).

2.5 Osteonectina

Apesar de representar somente 2 a 3% do total de proteínas constituintes do tecido ósseo, a osteonectina é considerada a proteína não colágena mais abundante presente na matriz óssea, sendo responsável pelas suas características mineralizantes (TERMINE et al., 1981; YOUNG et al., 1986).

A osteonectina é uma glicoproteína fosforilada cujo peso molecular varia entre 32 e 46 kD (FISHER e TERMINE, 1985), com alta afinidade à hidroxiapatita e ao colágeno I (TERMINE et al., 1981; INGRAM et al., 1993; ROBEY, 1996).

O nome proposto para esta proteína associa as palavras *osteo* (do grego osso) e *nectere* (do latim ligante), representando assim a sua localização e função, respectivamente (TERMINE et al., 1981).

Por promover *in vitro* a deposição de minerais de cálcio e fosfato sobre a molécula de colágeno I, sugere-se que a osteonectina possui um importante papel na manutenção da estrutura óssea contribuindo na estabilização da molécula de hidroxiapatita e na organização da matriz de colágeno, no processo de mineralização (TERMINE et al., 1981; OTSUKA et al., 1984; FISHER e TERMINE, 1985). Além disso, Bronckers et al. (1989) sugeriram que a osteonectina influencia localmente a concentração de íons cálcio durante o desenvolvimento embrionário e o processo de reparação.

Isoladamente, a osteonectina não é capaz de promover a mineralização; para que ocorra a precipitação de íons cálcio e fosfato, é imprescindível a presença da molécula colágeno tipo I. Ainda, Termine et al. (1981) sugeriram a competitividade da osteonectina com outra glicoproteína da matriz extracelular, a fibronectina.

A osteonectina é sintetizada principalmente por osteoblastos ativos, osteócitos jovens e células osteoprogenitoras. É considerada um marcador de diferenciação celular dos osteoblastos, uma vez que osteócitos quiescentes deixam de expressar esta glicoproteína (JUNDT et al., 1987).

Diversos outros tipos celulares, incluindo fibroblastos de pele, tendão, esclera (ROBEY e TERMINE, 1985), de ligamento periodontal (WASI et al., 1984), de polpa dentária humana (ABOUT e MITSIADIS et al., 2001; MARTINEZ e ARAÚJO, 2004) sintetizam a osteonectina em condições *in vitro*, tendo um importante papel no desenvolvimento e reparação tecidual (WASI et al., 1984). Ainda, Young *et al.* (1986) sugeriram que os tecidos não mineralizados podem secretar a osteonectina *in vivo*, porém, esta seria rapidamente degradada por digestão proteolítica.

Nos tecidos dentais, durante a odontogênese, a osteonectina está presente na pré-dentina e nos corpos celulares dos odontoblastos e seus prolongamentos, desde o início do processo de dentinogênese. Na cementogênese, os cementoblastos e cementócitos, bem como, os fibroblastos de ligamento periodontal sintetizam esta proteína (REICHERT et al., 1992), estando ausente de todas as células do epitélio interno e externo do órgão do esmalte, ameloblastos, matriz de esmalte e também de fibroblastos presentes no tecido gengival (TERMINE et al., 1981; BRONCKERS et al., 1989; REICHERT et al., 1992; MARTINEZ e ARAÚJO, 2004).

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar:

- se o TGF- β 1, *in vitro*, em diferentes concentrações, aumenta a expressão de α -AML em fibroblastos pulpaes, comparando-se com fibroblastos de gengiva humana, através de imunofluorescência e western-blotting;
- a influência de dois tipos de soro [soro fetal bovino (SFB) e soro fetal de bezero (DCS)] na expressão da α -AML nas células tratadas com TGF- β 1;
- as principais características morfológicas, através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), das células cultivadas com os diferentes soros e concentrações de TGF- β 1, comparando-se o padrão fibroblástico e o miofibroblástico;
- a expressão de duas proteínas da matriz extracelular relacionadas com a mineralização (tenascina e osteonectina), em ambos os fibroblastos (polpa e gengiva), com e sem a estimulação com TGF- β 1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares de fibroblastos de polpa dentária foram obtidas através do cultivo primário de tecido pulpar de germes de terceiros molares em estado inicial de formação radicular através da técnica de *explant*. Esses elementos dentários foram extraídos, por indicações ortodônticas (Figura 2-A).

As linhagens celulares de fibroblastos de gengiva humana foram obtidas através de fragmentos de gengiva inserida humana de pacientes submetidos à cirurgia periodontal (Figura 2-B).

Estes tecidos foram utilizados para a pesquisa com o consentimento dos pacientes e aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa para Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo nº 728) e não apresentaram quaisquer implicações, senão aquelas inerentes aos procedimentos cirúrgicos.

4.2 Cultivo celular

O cultivo das células foi realizado no Laboratório de Cultivo Celular da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os procedimentos foram similares para ambas às linhagens celulares, seguindo os mesmos procedimentos descritos por Martinez (2002).

As células foram cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma), sendo mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. Os soros utilizados foram o soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e o soro fetal de bezerro (DCS) (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá).

Para manutenção da viabilidade celular, todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular.

A monitorização do crescimento celular foi realizada a cada 24 horas utilizando-se de microscópio invertido de fase, sendo feito a troca dos meios de cultivo dos frascos a cada dois ou três dias.

A partir da terceira passagem, os fibroblastos de polpa e de gengiva foram plaqueados na densidade de 20000 células/poço (~ 110 células/mm²) e incubadas com o TGF- β 1 (Sigma), com doses variando entre 5 e 10 ng/ml, já demonstrada induzir a expressão de α -AML em fibroblastos de mama (DESMOULIÈRE et al., 1993). Após 24 horas do plaqueamento dos fibroblastos, o meio foi removido e as células foram incubadas por 7 dias com o TGF- β 1. Após este período, foram realizadas as reações de imunofluorescência, a análise morfológica através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), bem como a semi-quantificação da expressão de α -AML em ambas as linhagens celulares com os diferentes soros e concentrações de TGF- β 1.

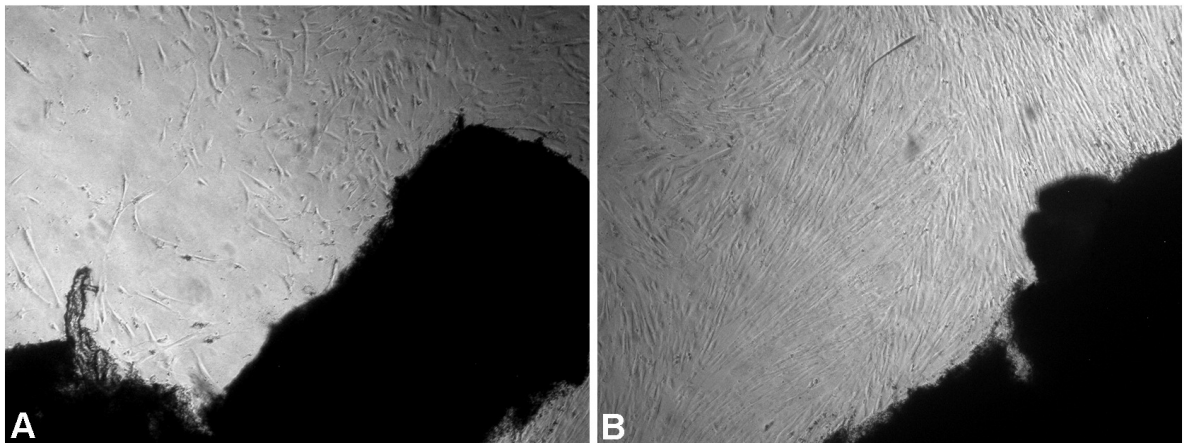


Figura 2. Fotomicrografias de fase de culturas de (A) fibroblastos de polpa dentária humana (FP) e (B) fibroblastos de gengiva humana (FG). Aumentos: A- X200; B- X200.

4.3 Imunofluorescência

Os fibroblastos de polpa e de gengiva, plaqueados nas lamínulas de vidro, foram fixados em metanol a -20°C por 5 minutos. Para o bloqueio da marcação inespecífica, as células foram incubadas em solução de albumina bovina 1% (BSA) (Sigma) em solução tampão fosfato salina (PBS), por 30 minutos em temperatura ambiente. Procedeu-se então a incubação dos anticorpos primários descritos na Tabela 1. Ambas as linhagens celulares foram submetidas à marcação ao anticorpo anti-vimentina, proteína esta tipicamente expressa em células de origem mesenquimal. Como controle negativo, as amostras foram incubadas com imunoglobulina G diluída em PBS na mesma concentração dos anticorpos primários.

Todos os procedimentos descritos foram precedidos de lavagens em PBS.

Os anticorpos secundários utilizados foram anti-mouse biotilado (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) para as células incubadas com a tenascina, vimentina e α -AML, e anti-coelho (DAKO), para as células incubadas com a osteonectina, seguido da incubação com o conjugado estreptavidina-fluoresceína (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA).

As montagens das lamínulas, sobre as lâminas de vidro, foram realizadas utilizando-se meio de montagem Vectashield[®] com DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA).

As observações e fotomicrografias foram realizadas em epi-iluminação em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot, usando objetivas Plan Neofluor de 20x e 63x e abertura numérica de 1,4.

Tabela 1. Anticorpos primários utilizados, origem e procedência

Anticorpo	Hospedeiro	Procedência
Anti-tenascina humana	camundongo	Chemicon
Anti-osteonectina humana (policlonal)-LF37*	coelho	Fisher et al., 1995
Anti-actina de músculo liso (Anti- α -AML)	camundongo	Dako
anti-vimentina (clone V9)	camundongo	Dako

*O anticorpo LF-37 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Larry W. Fisher (NIDR, NIH, Bethesda, USA).

4.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Para análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão, os fibroblastos de polpa e de gengiva foram cultivados conforme os procedimentos de cultivo celular descritos anteriormente em lamínulas de poliestireno (Thermanox, NUNC, NY, USA). Quando atingida a subconfluência, as células foram fixadas com solução de glutaraldeído 0,1% e 4% de formaldeído em tampão cacodilato a 0,1M, pH 7,4 por 2 horas, à temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas na própria solução tampão e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1%, por 1 hora. Procedeu-se a desidratação dos espécimes em uma série crescente de etanol. As amostras foram então infiltradas e incluídas em resina Spurr. Os blocos obtidos foram trimados e cortados em um micrótomo MICRON, com a utilização de facas de vidro feitas com um "knife maker" LKB 7800-B. Os cortes semifinos foram montados em lâminas de vidro, corados em solução alcoólica de azul de toluidina a 0,25% e observados ao microscópio de luz. Selecionada a área, os blocos foram novamente trimados, para a obtenção de cortes ultrafinos, em ultramicrótomo Leica Ultracut R (Leica Instruments, Nussloch, Alemanha) utilizando facas de diamante. Os cortes foram coletados em telas de níquel de 200 ou 300 "meshes", recobertas com

película de Parlodion e examinados em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1010 (Jeol USA Inc., Peabody, MA, USA) operando a 80kV.

4.5 Extração e quantificação de proteínas

Após a sub-confluência (70% da área cultivável), o meio foi removido, as células lavadas com PBS e colocadas sobre o gelo (4°C). Foi adicionado 0,5 ml/placa de tampão RIPA⁺ (10 mM Tris HCl pH 7,5; 10mM desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% dodecil sulfato de sódio (SDS), 2µg/ml aprotinina, 2µg/ml pepstatina, 1Mm PMSF) e as células incubadas por 10 min nesta temperatura sob agitação. O lisado foi centrifugado a 13200 rpm por 15 min e o sobrenadante aliquoteado e estocado a -80°C.

As proteínas do lisado foram quantificadas com o kit BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) (Reagente B + Reagente A (1:50) + 25µl de amostra, analisados em ELISA). A quantificação foi realizada em um aparelho de espectrofotômetro (ELX 800 Bio-Tek Instruments, Inc.) em placas de 96 poços contendo 200µl de BCA, além de 25 µl de cada lisado ou BSA, nas concentrações indicadas pelo fabricante, para realização da curva padrão. A leitura foi realizada com filtro de 562nm.

4.6 Western-blotting

Foi feita a eletroforese seguindo o método SDS-PAGE, sendo feita eletroforese a 110V por 180 minutos, em gel de acrilamida a 10% (Tabela 2). O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad, Hercules, Califórnia, USA).

Tabela 2. Constituição do gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm)

	Gel de Separação	Gel de empilhamento
	10% (total 20 ml)	5% (total 5 ml)
H ₂ O	7,9	3,4
Acrilamida/bisacrilamida 30:1	6,7	0,83
Tampão de separação	5,0	-
Tampão de empilhamento (4X conc.)	-	0,63
10% SDS	0,2	0,05
10% persulfato de amônio	0,2	0,05
Temed	0,010	0,007

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (Hybond; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), foi feita por eletro-transferência úmida em aparelho especial (Hoefer miniVE, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) com o tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) recomendado pelo fabricante. A transferência foi feita com 30V por 180min.

Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em pó desnatado em TBST (10mM Tris, 15mM NaCl, 0,05% Tween 20; pH 7,4), por 2h em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida lavando-se a membrana com TBST.

Os anticorpos utilizados foram anti- α AML (1:100; Dako, Glostrup, Dinamarca) e anti a proteína constitutiva β -actina (1:5000; Santa Cruz, CA) diluídos em solução de bloqueio, por um período de incubação de 1 hora. Seguiram três lavagens para remoção do anticorpo não-absorvido com TBST sob agitação e à temperatura ambiente. Seguiu-se a incubação do anticorpo secundário mouse (BioRad, Hercules, CA) durante 1 hora.

A detecção colorimétrica foi feita através do kit Opti 4CN (BioRad, Hercules, Califórnia, USA). Uma parte do diluente concentrado Opti-4CN foi adicionada a nove partes de água deionizada. Foram utilizados 0,25ml para cada cm^2 da membrana. Para cada 10ml do diluente preparado foi adicionado 0,2ml de substrato Opti-4CN, misturando-se bem e colocando-os sobre a membrana. A membrana foi incubada no substrato por até 30min, depois lavada em água deionizada por 15min, e pronta para documentação.

Utilizou-se o software de domínio público NIH Image 1.37 (NIH, Bethesda, MD, USA) para quantificação relativa das proteínas.

5 RESULTADOS

5.1 Imunofluorescência

A) Actina de músculo liso (α -AML):

Os fibroblastos de polpa e gengiva foram positivos para α -AML, mesmo na ausência de TGF- β 1 (Figuras 3 e 4- A a D). Quando observada a marcação do núcleo com DAPI (azul), os fibroblastos pulpares apresentaram menos células imunoreativas, se comparadas com os fibroblastos de gengiva, sendo encontrado o mesmo padrão de marcação para os dois tipos de soro (SFB e DCS). Aproximadamente, 75% dos fibroblastos gengivais e 50% dos fibroblastos de polpa foram positivos para α -AML.

Nas culturas de fibroblastos de polpa e de gengiva incubadas com 5ng/mL TGF- β 1, observou-se intensa imunomarcação na quase totalidade das células para α -AML, tendo o mesmo padrão para as células incubadas com ambos os soros (SFB e DCS) (Figuras 3 e 4- E e F), bem como para as células tratadas com 7.5 e 10ng/mL de TGF- β (Figuras 3 e 4- G a J).

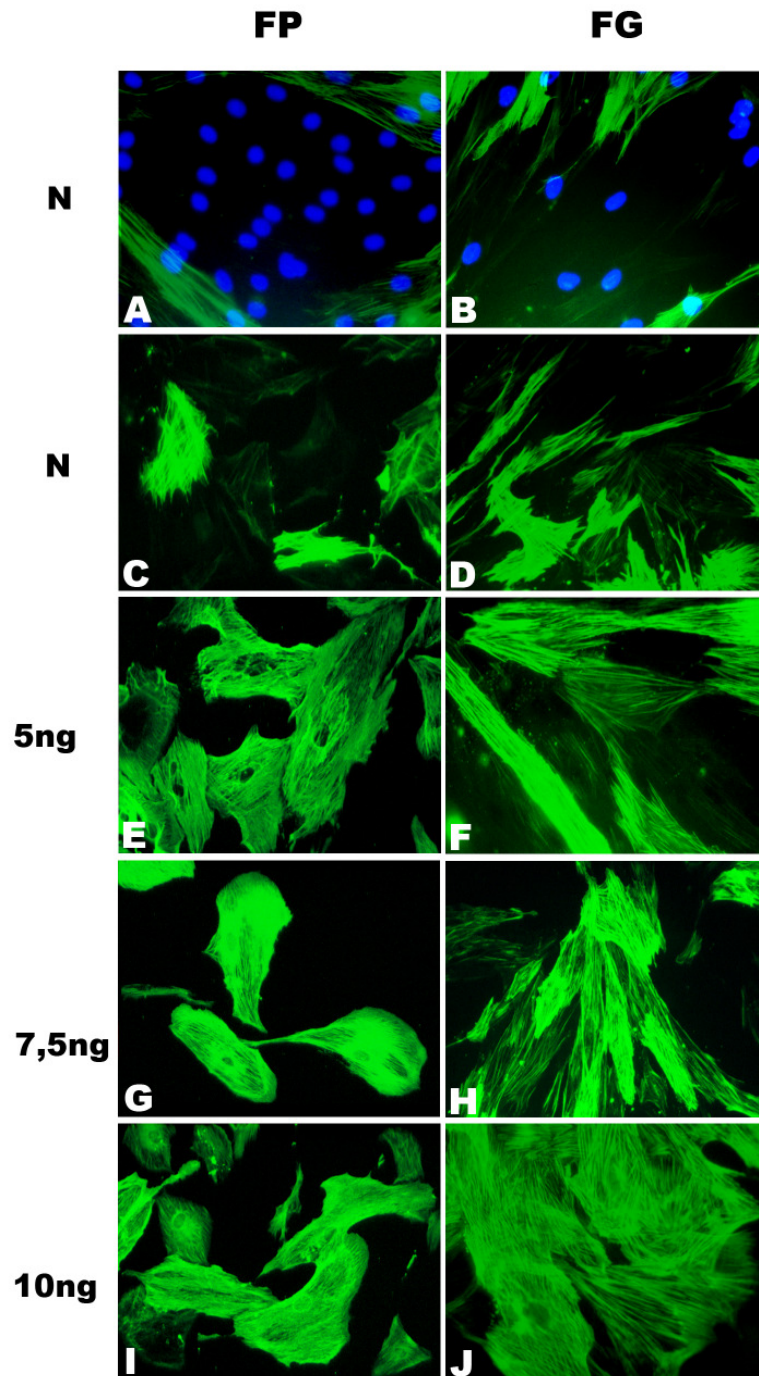


Figura 3. Imunomarcção para α -actina de músculo liso (verde) e marcação para DNA (DAPI, azul) em fibroblastos de polpa (FP) (A, C, E, G, I) e gengiva (FG) (B, D, F, H, J), incubadas com DCS. Notar a presença de numerosas células sem imunoreatividade para α -actina de músculo liso quando não tratadas com TGF- β (A a D). Após o tratamento, nas diferentes concentrações de TGF- β 1 (E a J), pode-se observar forte imunomarcção para α -actina de músculo em ambas as linhagens celulares. Epifluorescência, aumento X400.

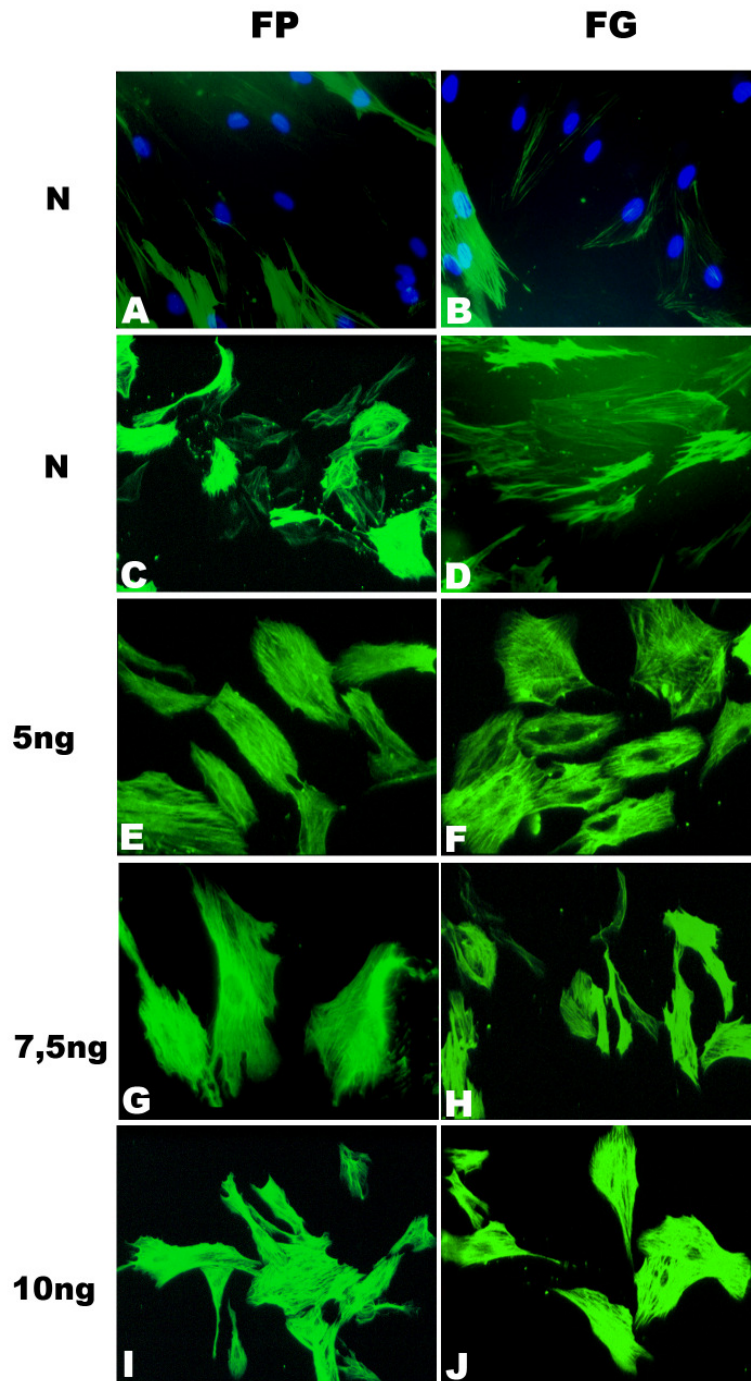


Figura 4. Imunomarcaco para α -actina de músculo liso (verde) e marcao para DNA (DAPI, azul) em fibroblastos de polpa (FP) (A, C, E, G, I) e gengiva (FG) (B, D, F, H, J), incubadas com SFB. Notar a presença de numerosas células sem imunoreatividade para α -actina de músculo liso quando não tratadas com TGF- β (A a D). Após o tratamento, nas diferentes concentraes de TGF- β 1 (E a J), pode-se observar forte imunomarcaco para α -actina de músculo liso em ambas as linhagens celulares. Epifluorescência, aumento X400.

B) Tenascina (TN):

Os fibroblastos pulpares apresentaram imunomarcção para a tenascina independente da incubação com TGF- β 1, bem como, para os dois tipos de soro (DCS e SFB), estando concentrada principalmente na região perinuclear (Figura 5).

Não houve imunoreatividade para a tenascina nos fibroblastos de gengiva, mesmo com o tratamento com as diferentes concentrações de TGF- β 1 (dados não mostrados).

C) Osteonectina (ONEC):

Os fibroblastos pulpares apresentaram imunomarcção para a osteonectina independente da incubação com TGF- β 1, bem como, para os dois tipos de soro (DCS e SFB), estando dispersa por todo o citoplasma, por vezes de forma puntiforme, concentrada principalmente na região perinuclear (Figura 6).

Como para a tenascina, não houve imunoreatividade para a osteonectina nos fibroblastos de gengiva, mesmo com o tratamento com as diferentes concentrações de TGF- β 1 (dados não mostrados).

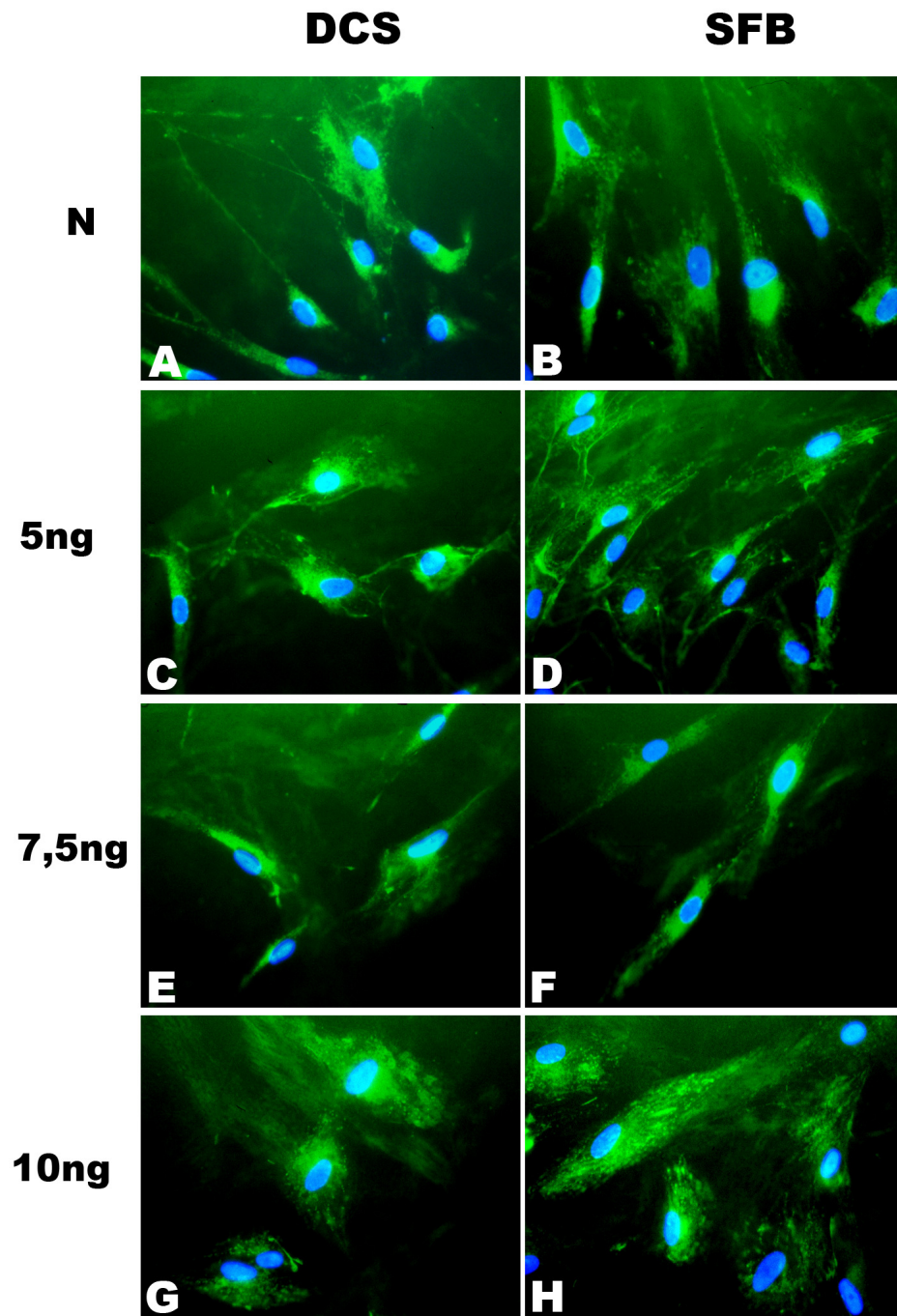


Figura 5. Imunomarcaco para tenascina (TN) (verde) e marcao para DNA (DAPI, azul) em fibroblastos de polpa (FP) incubados com DCS (A, C, E e G) e SFB (B, D, F e H), sem TGF- β 1 (N) (A e B) e incubadas com 5ng (C e D), 7,5ng (E e F) e 10ng (G e H) de TGF- β 1. Observar a marcao positiva em todo citoplasma celular, principalmente na região perinuclear. Epifluorescência, aumento X400.

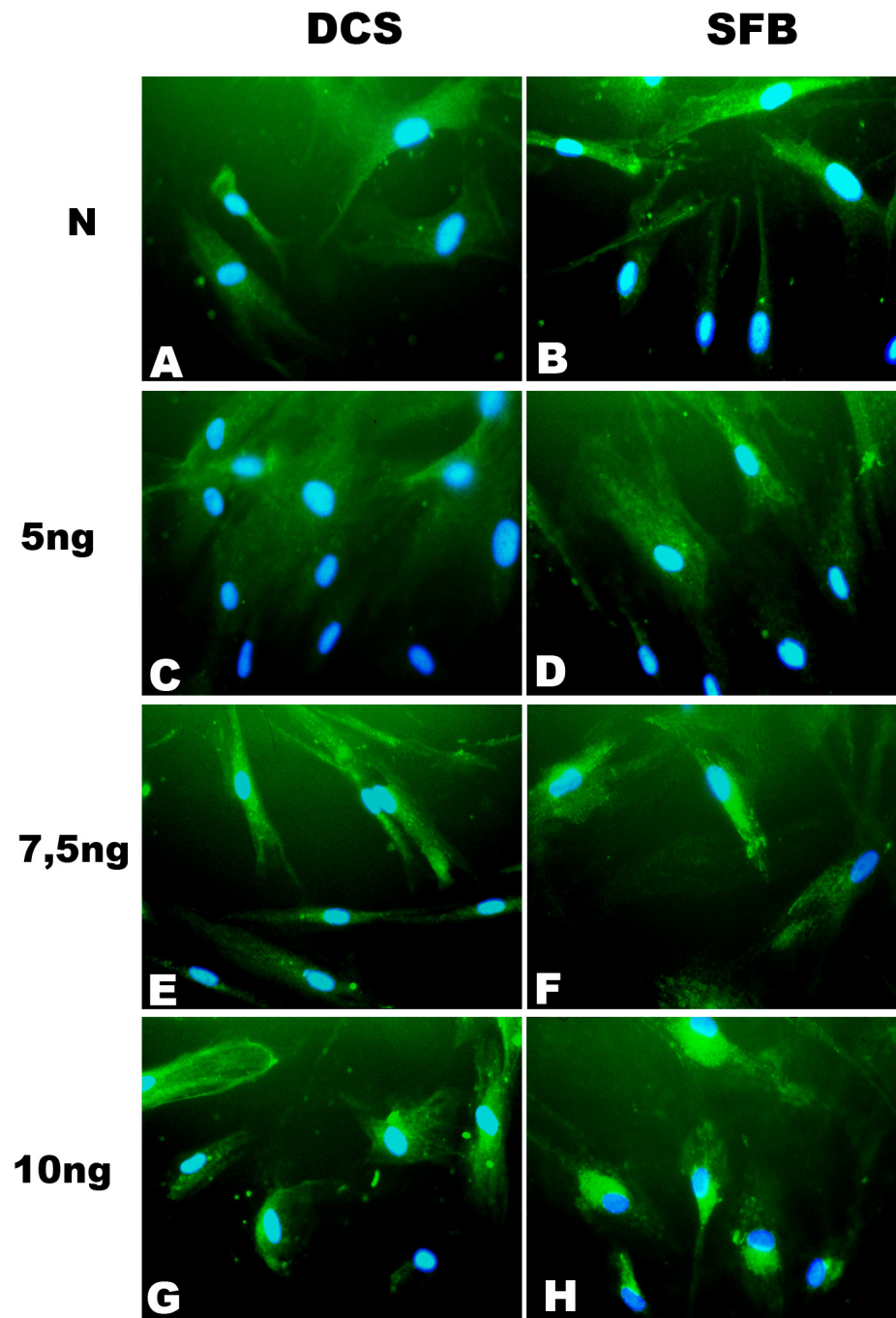


Figura 6. Imunomarcção para osteonectina (ONEC) (verde) e marcação para DNA (DAPI, azul) em fibroblastos de polpa (FP) incubados com DCS (A, C, E e G) e SFB (B, D, F e H), sem TGF- β (N) (A e B) e incubadas com 5ng (C e D), 7,5ng (E e F) e 10ng (G e H) de TGF- β 1. Observar a marcação positiva em todo citoplasma celular, por vezes puntiforme, principalmente na região perinuclear. Epifluorescência, aumento X400.

D) Vimentina:

Ambas as linhagens celulares (fibroblastos de polpa e de gengiva), independente do tratamento com TGF- β 1, e para os dois tipos de soro (DCS e SFB), foram imunoreativas para a vimentina. A marcação apresentou-se dispersa por todo o citoplasma em forma de filamentos (Figuras 7 e 8).

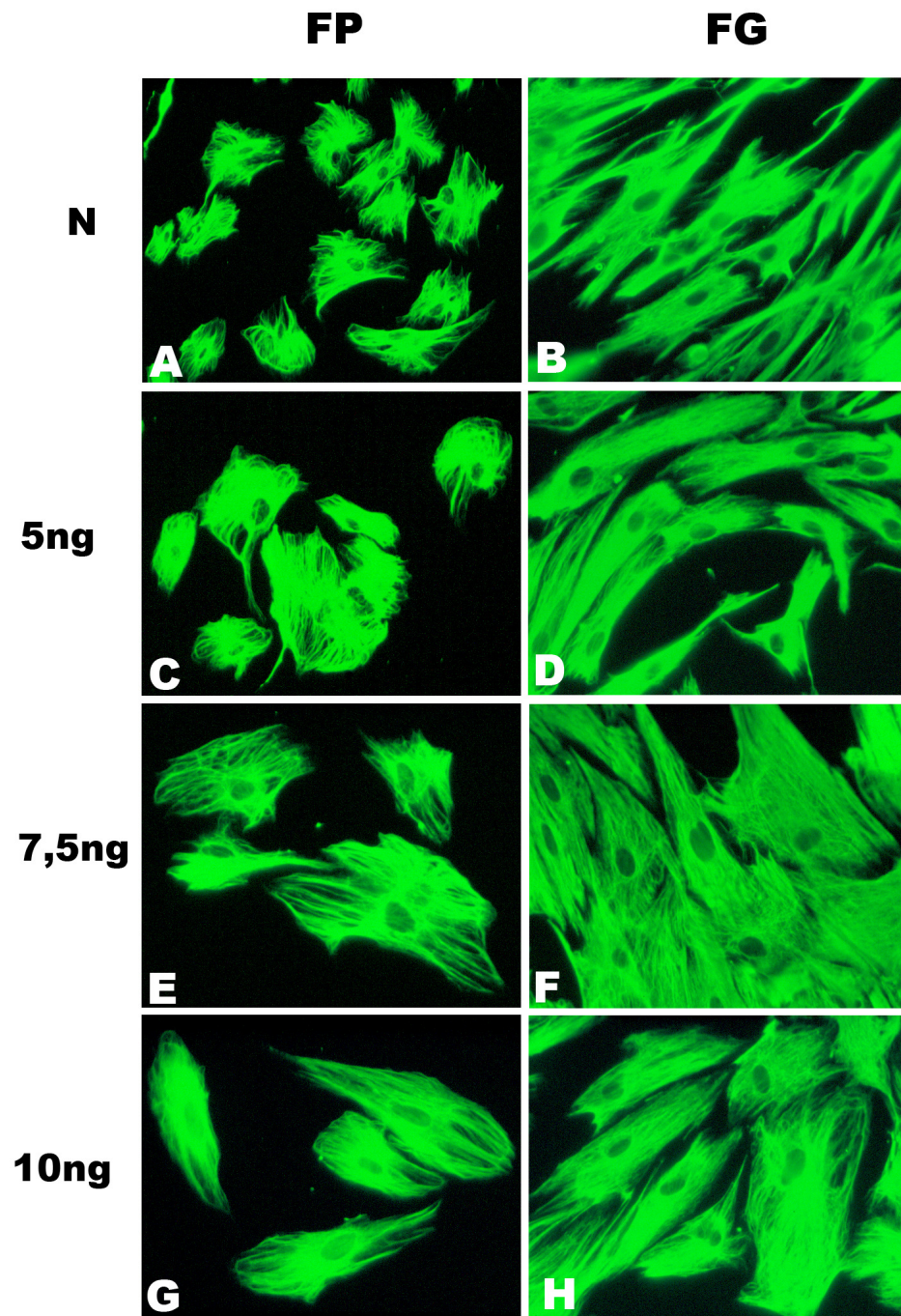


Figura 7. Imunomarcção para vimentina (verde) e marcação para DNA (DAPI, azul) em fibroblastos de polpa (FP) (A, C, E e G) e gengiva (FG) (B, D, F e H), incubados com DCS, sem TGF- β 1 (N) (A e B) e incubados com 5ng (C e D), 7,5ng (E e F) e 10ng (G e H) de TGF- β 1. Notar a disposição da vimentina em forma de filamentos por todo o citoplasma celular. Epifluorescência, aumentos: A- X200; B a H- X400.

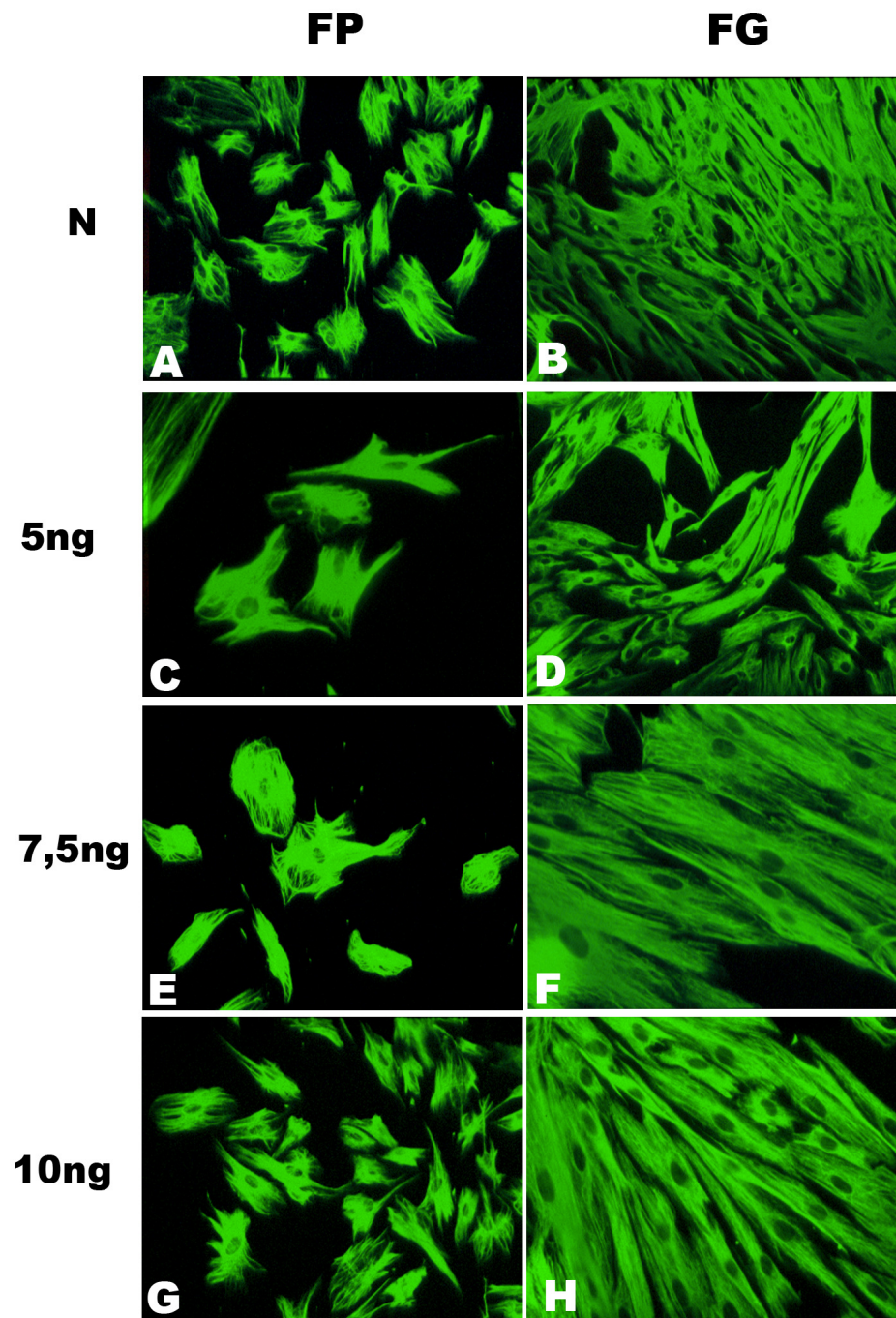


Figura 8. Imunomarcção para vimentina (verde) e marcação para DNA (DAPI, azul) em fibroblastos de polpa (FP) (A, C, E e G) e gengiva (FG) (B, D, F e H), incubados com SFB, sem TGF- β 1 (N) (A e B) e incubados com 5ng (C e D), 7,5ng (E e F) e 10ng (G e H) de TGF- β 1. Notar a disposição da vimentina em forma de filamentos por todo o citoplasma celular. Epifluorescência, aumentos: A- X200; B a H- X400.

5.2 Western-blotting

A análise semi-quantitativa por western-blotting demonstrou um aumento significativo da expressão de α -AML em fibroblastos de polpa, quando tratados com TGF- β 1, independente da concentração utilizada, tendo padrões similares para ambos os soros (DCS e SFB).

Para os fibroblastos de gengiva observou-se padrões diferentes da expressão protéica de α -AML, para os diferentes soros, quando não tratados com TGF- β 1. Para o DCS, observou-se forte expressão da α -AML, padrão este mantido quando as amostras foram tratadas com TGF- β 1, independente da concentração utilizada. Contrariamente, quando os fibroblastos de gengiva foram incubados com SFB, observou-se níveis baixos de expressão de α -AML, porém com um aumento visível da expressão desta proteína quando tratadas com TGF- β 1, mantendo-se o mesmo padrão de expressão para todas as concentrações de TGF- β 1 (Figura 9).

Os dados demonstrados são representativos da média da expressão de três casos, sendo a β -actina utilizada como controle da reação.

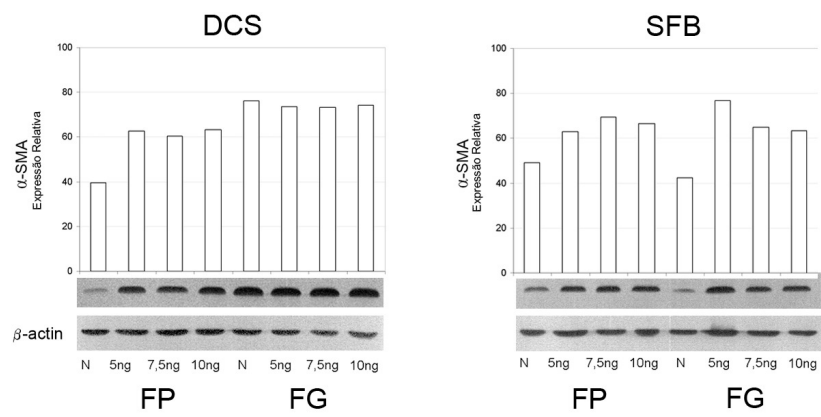


Figura 9. Detecção por western-blotting de α -SMA em fibroblastos de polpa (FP) e de gengiva (FG) não tratados (N) e tratados com 5-10 ng/mL de TGF- β 1, em DCS e SFB. Gráfico representativo da triplicata.

5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos pulpares e de gengiva para ambos os tipos de soros (DCS e SFB) estão representados nas Figuras 10 a 13.

Ambas as culturas celulares, sem o tratamento com o TGF- β 1 e para os dois tipos de soro (SFB e DCS), apresentaram típicas células do tipo fibroblasto contendo no seu citoplasma organelas de secreção e síntese de proteínas bastante desenvolvidas, como o retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. Além dessas organelas, apresentam numerosos vacúolos citoplasmáticos de natureza lisossômica. Algumas destas células exibiram, na sua periferia, alguns miofilamentos, bem como, edentação de membrana nuclear, característica típica do fenótipo miofibroblástico (Figuras 10 a 13- A e B).

Quando as células foram incubadas com as diferentes concentrações de TGF- β 1 e para ambos os tipos de soros, apresentaram comparativamente mais edentação de núcleo e miofilamentos dispostos na periferia da célula, próxima à membrana plasmática (fibras de “stress”), com áreas focais de maior densidade, e eventualmente acúmulo de material extracelular (Figuras 10 a 13– C a F).

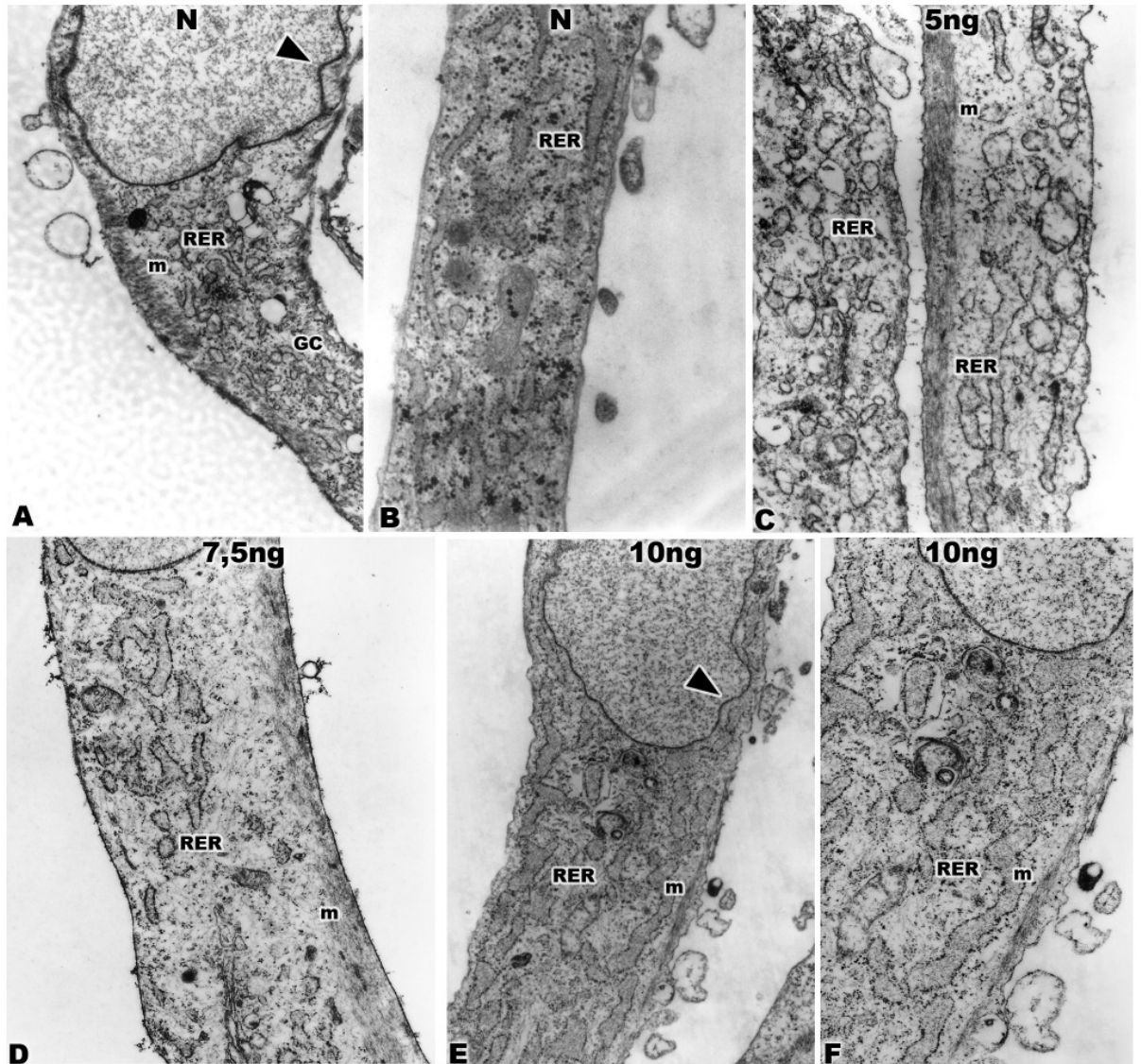


Figura 10. Micrografia eletrônica de transmissão de fibroblastos de polpa (FP) tratados com DCS sem TGF- β 1 (N) (A e B) e com 5ng (C), 7,5ng (D) e 10ng (E e F) de TGF- β 1. Em A, observa-se núcleo edentado (cabeça de seta) e miofilamentos na periferia da célula(m). Em B, observa-se uma típica célula do tipo fibroblasto com inúmeras organelas de secreção e síntese, como o retículo endoplasmático rugoso (RER). Em C-F, pode-se observar miofilamentos na periferia da célula (m), edentação de núcleo (cabeça de seta), bem como, retículo endoplasmático rugoso (RER). Aumentos: A- X4500, B- X20000, C- X5000, D- X12000, E- X6000, F- X18000.

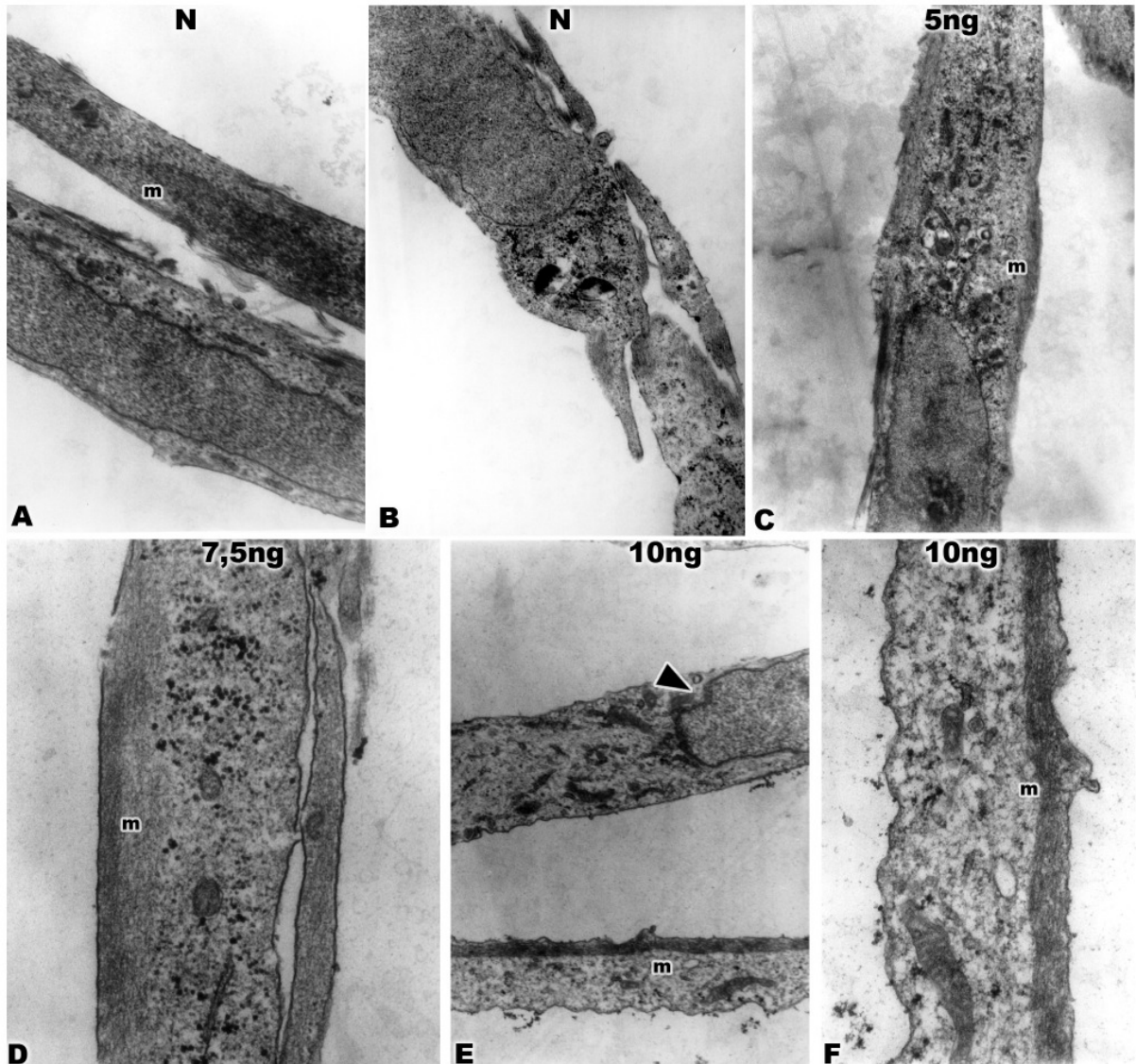


Figura 11. Micrografia eletrônica de transmissão de fibroblastos pulpare (FP) tratados com SFB sem TGF- β 1 (N) (A e B) e com 5ng (C), 7,5ng (D) e 10ng (E e F) de TGF- β 1. Em A, observa-se miofilamentos (m) na periferia da célula. Em B, observa-se uma célula tipo fibroblasto. Em C-F, pode-se observar miofilamentos na periferia da célula (m) e edentação de núcleo (cabeça de seta). Aumentos: A- X15000, B- X13000, C e E- X8000, D- X27500, F- X14000.

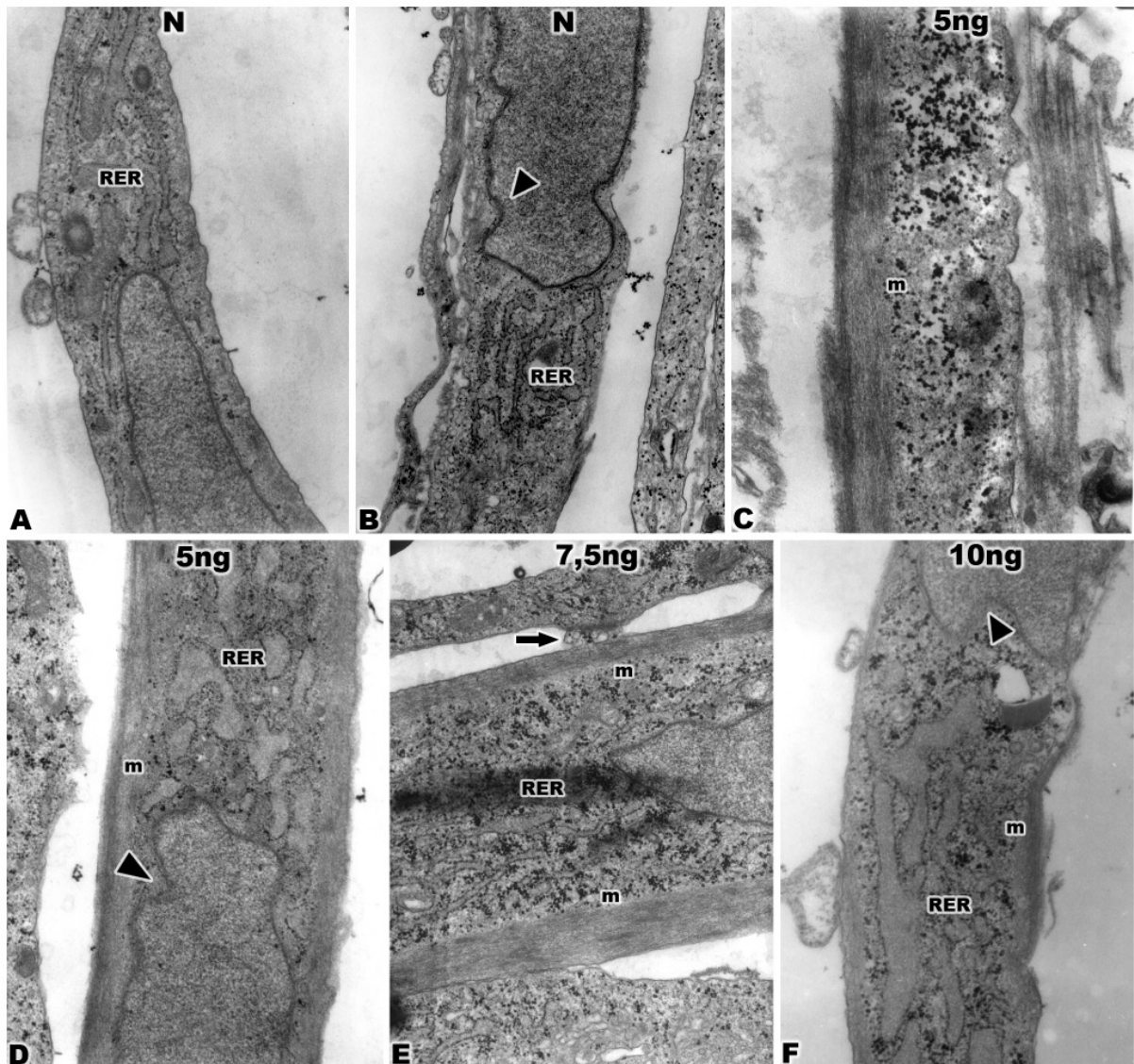


Figura 12. Micrografia eletrônica de transmissão de fibroblastos de gengiva (FG) tratados com DCS sem TGF- β 1 (A e B) e com 5ng (C e D), 7,5ng (E) e 10ng (F) de TGF- β 1. Em A, observa-se uma típica célula do tipo fibroblasto com inúmeras organelas de secreção e síntese, como o retículo endoplasmático rugoso (RER). Em B, observa-se núcleo edentado (cabeça de seta). Em C-F, pode-se observar miofilamentos na periferia da célula (m), edentação de núcleo (cabeça de seta), bem como, uma região de contato intercelular (seta). Aumentos: A e E- X10000, B e D- X12000, C- X14000, F- X15000.

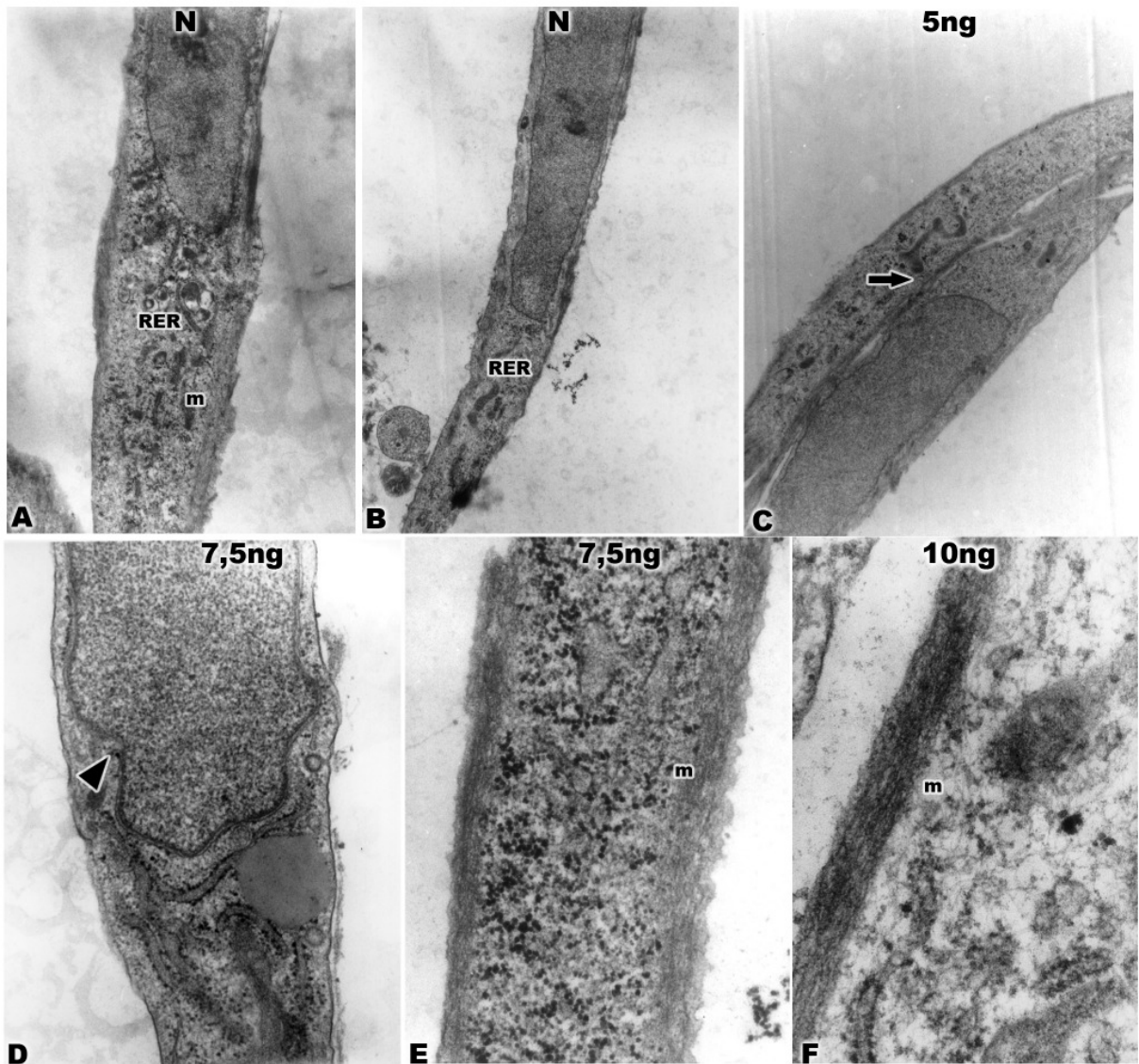


Figura 13. Micrografia eletrônica de transmissão de fibroblastos de gengiva (FG) tratados com SFB sem TGF- β 1 (N) (A e B) e com 5ng (C), 7,5ng (D e E) e 10ng (F) de TGF- β 1. Em A, observa-se miofilamentos (m) na periferia da célula e organelas de secreção e síntese, como o retículo endoplasmático rugoso (RER). Em B, observa-se organelas de secreção e síntese, como o retículo endoplasmático rugoso (RER). Em C-F, pode-se observar miofilamentos na periferia da célula (m) e edentação de núcleo (cabeça de seta), bem como, uma região de contato intercelular (seta). Aumentos: A- X15000, B e C- X8000, D e F- X20000, E- X10000.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o TGF- β 1 aumentou a expressão *in vitro* de α -AML em fibroblastos pulpares humanos, em todas as concentrações estudadas, com padrão similar para ambos os tipos de soro (SFB e DCS). A α -AML expressou-se, em pequenas quantidades, em fibroblastos pulpares. Entretanto, com a suplementação do meio de cultura com TGF- β 1, independente da concentração/dose utilizada, houve aumento considerável da expressão α -AML, demonstrado através de imunofluorescência e western-blotting, sugerindo-se que o TGF- β 1, em pequenas quantidades, pode induzir fibroblastos pulpares a adquirirem o fenótipo miofibroblástico.

Diversas citocinas e fatores de crescimento exercem um papel fundamental na modulação da diferenciação miofibroblástica. Em particular, o TGF- β 1 induz *in vitro* a expressão de α -AML, e, portanto, características contráteis em células fibroblásticas (RØNNOV-JESSEN e PETERSEN, 1996; SCHÜRCH et al., 1998). A indução do fenótipo miofibroblástico por ação do TGF- β 1 já foi demonstrado em outros tipos celulares como fibroblastos de gengiva humana (PREMDAS et al., 2001), células dermais (DESMOULIÈRE et al., 1993), bem como, células tronco (“stem cells”) (KINNER et al., 2002).

Apesar dos fibroblastos pulpares serem os tipos celulares mais predominantemente encontrados na polpa dentária, a polpa dentária é uma importante fonte de células-tronco pluripotentes (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003). Além disso, outros tipos celulares como células mesenquimais indiferenciadas estão presentes, principalmente na zona subodontoblástica rica em células (NANCI, 2003; ARANA-CHAVEZ e MASSA, 2004). A presença destas células é mais evidente na polpa coronária, existindo, portanto, a capacidade de

diferenciação de novos odontoblastos para formação de dentina reparativa, quando ocorre injúria pulpar (KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

Diversos trabalhos *in vitro* têm demonstrado que células pulpaes indiferenciadas podem se diferenciar em células “odontoblast-like” quando há suplementação do meio de cultura com fatores indutores de mineralização tais como ácido ascórbico (COUBLE et al., 2000), β -glicerolfosfato (KASUGAI et al., 1988; NAKASHIMA, 1992; KUO et al., 1992; COUBLE et al., 2000; ABOUT e MITSIADIS, 2001), e dexametasona (KASUGAI et al., 1993; ALLIOT-LICHT et al., 2005), formando uma matriz extracelular mineralizada. No presente trabalho, não houve adição destes fatores nas culturas de células estudadas, a fim de obtermos uma linhagem celular homogênea de fibroblastos de polpa, sem a deposição de matriz mineralizada, ou morfologia colunar típica de células odontoblásticas (COUBLE et al., 2000). Além disso, os resultados em ultra-estrutura demonstraram que estas células apresentaram morfologia semelhante aos fibroblastos gengivais com poucas organelas de síntese e secreção de proteínas.

Apesar de alguns estudos terem demonstrado que o TGF- β 1 é o principal fator responsável pela diferenciação de células pulpaes em células “odontoblast-like” e, portanto, na formação de dentina reparativa (BÈGUE-KIRN et al., 1992; MAGLOIRE et al., 1992; SMITH et al. 1995; TZIAFAS et al., 1998; SLOAN e SMITH, 2007; MELIN et al., 2000; ABOUT e MITSIADIS, 2001; LUCCHINI et al., 2002; LOPEZ-CAZAUX et al., 2006), vale ressaltar que nos mesmos foi adicionado *in vitro* fatores mineralizantes que permitem a diferenciação odontoblástica. No presente estudo, não se evidenciou a formação de nódulos mineralizados nas culturas de células pulpaes mesmo na presença de TGF- β 1, sugerindo que as células estudadas eram fibroblastos de polpa, e mais uma vez confirmando a necessidade de fatores

mineralizantes para a indução de formação de matriz mineralizada independente da presença do TGF- β 1 como já demonstrado por Luisi et al. (2007).

O TGF- β 1 aumentou a expressão de α -AML nos fibroblastos de polpa, independente do soro (DCS ou SFB) ou concentração utilizados, apresentando menos α -AML que os fibroblastos gengivais, nas culturas controles, principalmente quando estas foram tratadas com DCS. Pode-se observar que a expressão da actina nas células pulpares foi inicialmente fraca, para ambos os soros utilizados, com um aumento considerável quando o meio foi suplementado com TGF- β 1, independente das concentrações utilizadas, sugerindo que esta citocina, mesmo em pequenas quantidades, é suficiente para estimular a síntese de α -AML. Os mesmos resultados foram observados em fibroblastos de mama (DESMOULIÈRE et al., 1993) e células tronco adultas (KINNER et al., 2002).

Diferentemente, em fibroblastos gengivais cultivados com DCS e não tratados com TGF- β 1, observou-se elevada quantidade de α -AML, comparável quando tratados com este fator de crescimento. Sugerimos que fatores de crescimento presentes neste soro possam influenciar a expressão de α -AML nos fibroblastos gengivais e, portanto, a diferenciação miofibroblástica antes do tratamento com TGF- β 1, como já demonstrado por Premdas et al. (2001) e Fang e Svoboda (2005). Além disso, estes achados mostram a influência dos soros utilizados nos resultados obtidos em experimentos *in vitro* de cultura celular, principalmente na expressão de proteínas (qualitativa ou quantitativamente), e, portanto, o cuidado na interpretação dos mesmos.

Não se observou diferenças quantitativas significantes na expressão de α -AML para as diferentes concentrações de TGF- β 1. É possível que concentrações de TGF- β 1 mais baixas que as utilizadas no presente estudo (5 ng/mL, 7.5 ng/mL e 10

ng/mL) sejam capazes de induzir a expressão de α -AML de maneira dose-dependente nas células estudadas, como evidenciado para os fibroblastos de gengiva por Sobral et al. (2007). Os parâmetros de concentrações e tempo de TGF- β 1 utilizado no presente estudo foram baseados nos trabalhos de Desmoulière (1995).

Além disso, ultra-estruturalmente, ambas as linhagens celulares exibiram feixes de miofilamentos dispostos paralelamente ao longo eixo da célula principalmente próxima à membrana plasmática (fibras de “stress”), bem como núcleo edentado e organelas especializadas (retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bastante desenvolvidos), que aumentaram na presença do TGF- β 1, caracterizando-as de miofibroblastos (ALLIOT-LICHT et al., 2001; EYDEN, 2001, 2004; SCHÜRCH et al., 1998). Porém, estes resultados ultra-estruturais não foram tão evidentes quanto os do western-blotting, sugerindo que o aumento da expressão da α -AML não é suficiente para refletir em mudanças morfológicas nas células estudadas.

No presente trabalho, houve imunoexpressão para a tenascina e osteonectina somente nos fibroblastos pulpares, independente da suplementação ou não do meio com TGF- β 1, tendo o mesmo padrão de expressão para ambos os soros estudados (SFB ou DCS).

É descrito na literatura que a manutenção da expressão destas glicoproteínas em polpas dentárias adultas, sendo secretada por fibroblastos, está associada com a regulação da diferenciação celular envolvida na formação de matrizes de tecidos mineralizados (THESLEFF et al., 1987; LUKINMAA et al., 1991; MARTINEZ et al., 2000; MARTINEZ e ARAUJO, 2004).

Por analogia aos fibroblastos do ligamento periodontal, que são importantes para o desenvolvimento e reparação deste tecido, podendo se diferenciar em cementoblastos ou células “osteoblast-like”, expressando osteonectina *in vitro* (WASI et al., 1984), os fibroblastos pulpares respondem a estímulos específicos podendo se diferenciar em células semelhantes a odontoblastos (“odontoblast-like”), formando a dentina reparativa (MARTINEZ e ARAÚJO, 2004), confirmando os nossos achados para a expressão desta glicoproteína nos fibroblastos pulpares.

Portanto, as células pulpares mesmo tendo adquirido o fenótipo miofibroblástico, sugerido pelo aumento da expressão da α -AML e características morfológicas ultra-estruturais, estas células não deixam de produzir proteínas da matriz responsável pelas características mineralizantes deste tecido, pois é mantida a expressão da TN e ONEC.

Em fibroblastos gengivais, não houve imunoexpressão da tenascina mesmo com a suplementação do meio de cultura com TGF- β 1. A expressão da tenascina-C em células do tipo fibroblasto é induzida por diversas citocinas e fatores de crescimento pró- e anti-inflamatórios, sendo considerada um marcador molecular de inflamação aguda (CHIQUET-EHRISMANN et al., 2003). Porém, a sua indução, especificamente por TGF- β 1, é moderada e varia consideravelmente entre os fibroblastos de diferentes origens (PEARSON et al., 1988; RETTIG et al., 1994; CHIQUET-EHRISMANN et al., 2003). Isto explica o porquê fibroblastos de gengiva não expressaram a tenascina, mesmo quando incubados com as diferentes concentrações de TGF- β 1 confirmando a hipótese que fibroblastos de polpa e gengiva apresentam funções diferentes, e que fatores de crescimento como o TGF- β 1 não modificam o fenótipo das mesmas.

Assim como para a tenascina, não houve imunexpressão da osteonectina em fibroblastos gengivais, mesmo com a suplementação do meio de cultura com TGF- β 1 e os dois tipos de soro.

Em concordância com trabalhos prévios (REICHERT et al., 1992; MARTINEZ e ARAÚJO; 2004), os fibroblastos gengivais não expressaram a osteonectina, demonstrando que esta glicoproteína, assim como a tenascina, não é um componente da matriz extracelular do tecido gengival. Além disso, mesmo ocorrendo uma injúria, estas células não se diferenciariam, em condições fisiológicas, em células formadoras de tecidos duros (GIANNOPOULOU e CIMASONI, 1996), como ocorre com as células pulpares (FP).

Apesar de alguns trabalhos (WRANA et al., 1991) terem demonstrado a imunexpressão da osteonectina em fibroblastos de gengiva, com e sem a suplementação com TGF- β 1, vale ressaltar que nos mesmos as células foram cultivadas com o meio α -MEM, que já contém ácido ascórbico, um dos indutores de mineralização, associado à ascorbato de sódio, tendo, portanto a possibilidade da mudança do fenótipo celular e expressão de proteínas de matriz reponsáveis por características mineralizantes nos tecidos. No presente trabalho, as células foram cultivadas com o meio DMEM sem adição de qualquer fator mineralizante, a fim de obtermos uma linhagem celular homogênea de fibroblastos de gengiva (FG).

A vimentina esteve imunexpressa nas células estudadas, independente da suplementação do meio com TGF- β 1 e para ambos os soros estudados (SFB e DCS). Todos os tipos celulares em condições *in vitro*, independentemente do tecido de origem, expressam a vimentina, sugerindo-se que este filamento intermediário favorece o crescimento em cultura celular, uma vez que as células estão livres das restrições tridimensionais, como nos tecidos vivos (LAZARIDES, 1982; QUAX et al.,

1983), apresentando uma função estrutural importante, e manutenção da morfologia celular.

No presente estudo, apesar da indução da expressão de microfilamentos de α -AML com a suplementação do meio com TGF- β e, portanto, do fenótipo miofibroblástico, houve manutenção da expressão de filamentos intermediários de vimentina nas células estudadas. A vimentina está presente em todas as células de origem mesenquimal, como fibroblastos (ALBERTS et al., 2002) estando abundantemente expressa em células que recebem esforços mecânicos (SAPPINO et al., 1990; MARKL, 1991). Porém, a sua expressão em ambos os fibroblastos nas culturas estudadas pode estar relacionada ao seu papel estrutural, uma vez que nenhuma força fora aplicada nas culturas celulares. Além disso, no caso das células que adquiriram o fenótipo miofibroblástico sob influência do TGF- β 1, a manutenção da expressão da vimentina era esperada, já que esta proteína está normalmente expressa em células ricas em α -actina de músculo liso, como as células mioepiteliais (EYDEN, 2003), bem como em tumores mioepiteliais (FURUSE et al., 2006).

Desta forma, os resultados apresentados demonstraram a influência *in vitro* do TGF- β 1 em fibroblastos de polpa e de gengiva humanos na indução miofibroblástica, através do aumento da imunoexpressão de α -AML bem como, características morfológicas ultra-estruturais das células cultivadas. No entanto, novos estudos se fazem necessários para o melhor entendimento da participação desta proteína no metabolismo pulpar e gengival.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- o TGF- β 1, *in vitro*, em todas as concentrações estudadas, aumentou a expressão de α -AML em fibroblastos pulpares;
- o padrão de expressão da α -AML foi semelhante em fibroblastos de polpa tratados com ambos os soros estudados (SFB e DCS) e fibroblastos de gengiva tratados com SFB;
- em fibroblastos de gengiva, cultivados com DCS, a expressão basal de α -AML foi comparável a quando houve tratamento com as diferentes concentrações de TGF- β 1;
- as características ultra-estruturais das células cultivadas com os diferentes soros e concentrações de TGF- β 1 sugerem a indução do fenótipo miofibroblástico;
- a tenascina e a osteonectina estiveram presentes somente em fibroblastos de polpa, independente da estimulação com TGF- β 1 ou soro estudado;
- a vimentina esteve imunoexpressa no citoplasma dos fibroblastos de polpa e gengiva, para ambos os soros e suplementação ou não do meio com TGF- β 1.

REFERÊNCIAS

ABOUT, I.; MITSIADIS, T. A. Molecular aspects of tooth pathogenesis and repair : in vivo and in vitro models. **Adv. Dent. Res.**, v. 15, p. 59-62, 2001.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002. 1548 p.

ALLIOT-LICH, B.; BLUTEAU, G.; MAGNE, D.; LOPEZ-CAZAUX, S.; LIEUBEAU, B.; DACULSI, G.; GUICHEUX, J. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. **Cell. Tissue Res.**, v. 321, p. 391-400, 2005.

ALLIOT-LICHT, B.; HURTREL, D.; GREGOIRE, M. Characterization of α -smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. **Arch. Oral Biol.**, v. 46, p. 221-228, 2001.

ARANA-CHAVEZ, V. E.; MARTINEZ, E. F. Conceitos básicos da estrutura de esmalte, dentina e polpa. In: HENOSTROZA, G. (Ed.). **Cárie Dental: Princípios e procedimentos para o diagnóstico**. 1. Madri: Ripano Editorial Médica, 2008. cap. 2, p. 37-47.

ARANA-CHAVEZ, V. E.; MASSA, L. F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 1367-1373, 2004.

ARORA P. D.; McCULLOCH, C. A. G. The deletion of transforming growth factor- β -induced myofibroblasts depends on growth conditions and actin organization. **Am. J. Pathol.**, v. 155, p. 2087-2099, 1999.

BÈGUE-KIRN, C.; SMITH, A. J.; RUCH, J. V.; WOZNEY, J. M.; PURCHIO, A.; HARTMANN, D.; LESOT, H. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 36, p. 491-503, 1992.

BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor-beta in glomerular injury. **Exp. Nephrol.**, v. 2, p. 13-17, 1994.

BOURDON, M. A.; WIKSTRAND, C. J.; FURTHMAYR, H.; MATHEWS, T. J.; BIGNER, D. D. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. **Cancer Res.**, v. 43, p. 2796-2805, 1983.

BRONCKERS, A. L.; LYARUU, D. M.; WÖLTGENS, J. H. M. Immunohistochemistry of extracellular matrix proteins during various stages of dentinogenesis. **Connect. Tissue Res.**, Philadelphia, v. 22, p. 65-70, 1989.

BUCHAILLE, R.; COUBLE, M. L.; MAGLOIRE, H.; BLEICHER, F. Expression of the small leucine-rich proteoglycan osteoadherin/osteomodulin in human dental pulp and developing rat teeth. **Bone**, v. 27, p. 265-270, 2000.

CAM, Y.; NEUMANN, M. R.; RUCH, J. V. Immunolocalization of transforming growth factor beta1 and epidermal growth factor receptor epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of *in vitro* production of transforming activity. **Arch. Oral Biol.**, v. 35, p. 813-822, 1990.

CASSIDY, N.; FAHEY, M.; PRIME, S. S.; SMITH, A. J. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. **Arch. Oral Biol.**, v. 42, p. 219-223, 1997.

CASELITZ, J.; LÖNING, T.; STAQUET, M. J.; SEIFERT, G.; THIVOLET, J. Immunocytochemical demonstration of filamentous structures in the parotid gland. Occurrence of keratin and actin in normal and tumoral parotid gland with special respect to the myoepithelial cells. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 100, p. 59-68, 1981.

CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. **J. Pathol.**, v. 204, p. 386-395, 2004.

CHIQUET, M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. **Matrix Biol.**, v. 18, p. 417-426, 1999.

CHIQUET, M.; MATTHISSON, M.; KOCH, M.; TANNHEIMER, M.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. **Biochem. Cell Biol.**, v. 74, p. 737-744, 1996.

CHIQUET-EHRISMANN, R. What distinguishes tenascin from fibronectin? **FASEB J.**, v. 4, p. 2598-2604, 1990.

CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascin a growing family of extracellular matrix proteins. **Experientia**, v. 51, p. 853-862, 1995.

CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascins. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 986-990, 2004.

CHIQUET-EHRISMANN, R.; CHIQUET, M. Tenascins: Regulation and putative functions during pathological stress. **J. Pathol.**, v. 200, p. 488-499, 2003.

CHIQUET-EHRISMANN, R.; MACKIE, E. J.; PEARSON, C. A.; SAKAKURA, T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. **Cell**, v. 47, p. 131-139, 1986.

CHIQUET-EHRISMANN, R.; TANNHEIMER, M.; KOCH, M.; BRUNNER, A.; SPRING, J.; MARTIN, D.; BAUMGARTNER, S.; CHIQUET, M. Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels. **J. Cell Biol.**, v. 127, p. 1037-1045, 1994.

COHEN, S.; BURNS, R. C. **Pathways of the pulp**. 8. ed. St. Louis: Mosby, 2002. 1031p.

COUBLE, M. L.; FARGES, J. C.; BLEICHER, F.; PERRAT-MABILLON, B.; BOUDEULLE, M.; MAGLOIRE, H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. **Calcif. Tissue Int.**, v. 66, p. 129-138, 2000.

DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab. Invest.**, v. 63, p. 21-29, 1990.

DESMOULIÈRE, A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. **Cell Biol. Int.**, v. 19, p. 471-476, 1995.

DESMOULIÈRE, A.; GEINOZ, A.; GABBIANI, F.; GABBIANI, G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. **J. Cell Biol.**, v. 122, p. 103-111, 1993.

DIXON, M. J.; GARNER, J.; FERGUSON, M. W. J. Immunolocalization of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor and transforming growth factor alpha (TGF- α) during murine palatogenesis in vivo and in vitro. **Anat. Embryol.**, v. 184, p. 83-91, 1991.

D'SOUZA, R. N.; CAVENDER, A.; DICKINSON, D.; ROBERTS, A.; LETTERIO, J. TGF β 1 is essential for the homeostasis of the dentin-pulp complex. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 106, p. 185-191, 1998.

D'SOUZA, R. N.; HAPPONEN, R. P.; RITTER, N. M.; BUTLER, W. T. temporal and spatial patterns of transforming growth factor beta1 expression in developing rat molars. **Arch. Oral Biol.**, v. 35, p. 957-965, 1990.

DUGINA V.; FONTAO, L.; CHAPONNIER, C.; VASILIEV, J.; GABBIANI, G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 3285-3296, 2001.

ERICKSON, H. P. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 5, p. 869-876, 1993.

ERICKSON, H. P.; BOURDON, M. A. Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, Palo Alto, v. 5, p. 71-92, 1989.

EYDEN, B. The myofibroblast: an assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. **Ultrastruct. Pathol.**, v. 25, p. 39-50, 2001.

EYDEN, B. Electron microscopy in the study of myofibroblastic lesions. **Semin. Diagn. Pathol.**, v. 20, p. 13-24, 2003.

EYDEN, B. Fibroblast phenotype plasticity: relevance for understanding heterogeneity in "fibroblastic" tumors. **Ultrastruct. Pathol.**, v. 28, p. 307-319, 2004.

FANG, Y.; SVOBODA, K. K. Nicotine inhibits myofibroblast differentiation in human gingival fibroblasts. **J. Cell Biochem.**, v. 95, p. 1108-1119, 2005.

FINKELMAN, R. D. Growth factors in bones and teeth. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 20, p. 23-29, 1992.

FISHER, L. W.; TERMINE, J. D. Noncollagenous proteins influencing the local mechanisms of calcification. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, v. 200, p. 362-385, 1985.

FISHER, L. W.; STUBBS, J. T.; YOUNG, M. F. Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins. **Acta Orthop. Scand.**, v. 66, p. 61-65, 1995.

FURUSE, C.; CURY, P. R.; ARAUJO, N. S.; ARAUJO, V. C. Application of two different clones of vimentin to the diagnosis of salivary gland tumors. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 14, p. 217-219, 2006.

GABBIANI, G.; LE LOUS, M.; BAILEY, A. J.; BAZIN, S.; DELAUNAY, A. Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. A chemical, ultrastructural and immunologic study. **Virchows Arch. Cell Pathol.**, v. 21, p. 133-145, 1976.

GABBIANI, G.; RYAN, G. B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia**, v. 27, p. 549-550, 1971.

GARBARSCH, C.; MATTHIESSEN, M. E.; OLSEN, B. E.; MOE, D.; KIRKEBY, S. Immunohistochemistry of the intercellular matrix components and the epithelio-mesenchymal junction of the human tooth germ. **Histochem. J.**, v. 26, p. 110-118, 1994.

GIANNOPOULOU, C.; CIMASONI, G. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. **J. Dent. Res.**, v. 75, p. 895-902, 1996.

GOLDBERG, M.; LASFARGUES, J. J. Pulpo-dentinal complex revisited. **J. Dent.**, Bristol, v. 23, p. 15-20, 1995.

GREGOIRE, M.; LIEUBEAU, B. The role of fibroblasts in tumor behavior. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 14, p. 339-350, 1995.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J. Dental Res.**, v. 81, p. 531-535, 2002.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 13625-13630, 2000.

HEINO, J.; IGNOTZ, R. A.; HEMLER, M. E. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- β . Concomitant regulation of integrins that share a common β -1 subunit. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 380-388, 1989.

HILLMANN, G.; GEURTSSEN, W. Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. **Cell. Tissue Res.**, v. 289, p. 145-154, 1997.

HINZ, B.; DUGINA, V.; BALLESTREM, C.; WEHRLE-HALLER, B.; CHAPONNIER, C. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. **Mol. Biol. Cell.**, v. 14, p. 2508-2519, 2003.

HINZ, B.; PHAN, S. H.; THANNICKAL, V. J.; GALLI, A.; BOCHATON-PIALLAT, M-L; GABBIANI, G. The myofibroblast. One function, multiple origins. **Am. J. Pathol.**, v. 170, p. 1807-1816, 2007.

HU, C. C.; ZHANG, C.; QIAN, Q.; TATUM, N. B. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. **J. Endodon.**, v. 24, p. 744-51, 1998.

IGNOTZ, R. A.; ENDO T.; MASAGUÉ, J. regulation of fibronectin and type-I collagen mRNA levels by transforming growth factor- β . **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 6443-6, 1987.

INGRAM, R. T.; CLARKE, B. L.; FISCHER, L. W.; FITZPATRICK, L. A. Distribution of non-collagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity. **J. Bone Miner. Res.**, v. 8, p. 1019-1029, 1993.

JONES, F. S.; JONES, P. L. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. **Dev. Dyn.**, v. 218, p. 235-259, 2000.

JUNDT, G.; BERGHÄUSER, K. H.; TERMINE, J. D.; SCHULZ, A. Osteonectin-a differentiation marker of bone cells. **Cell. Tissue Res.**, v. 248, p. 409-415, 1987.

KARJALAINEN, S.; SÖDERLING, E.; PELLINIEMI, L.; FOIDART, M. Immunohistochemical localization of types I and III collagen and fibronectin in the dentin of carious human teeth. **Arch. Oral Biol.**, v. 31, p. 801-806, 1986.

KASUGAI, S.; ADACHI, M.; OGURA, H. Establishment and characterization of a clonal cell line (RPC-C2A) from dental pulp of the rat incisor. **Arch. Oral Biol.**, v. 33, p. 887-891, 1988.

KASUGAI, S.; SHIBATA, S.; SUZUKI, S.; SUSAMI, T.; OGURA, H. Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. **Arch. Oral Biol.**, v. 38, p. 769-777, 1993.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388 p.

KINGSLEY, D. M. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. **Genes Dev.**, v. 8, p. 133-146, 1994.

KINNER, B.; ZALESKAS, J. M.; SPECTOR, M. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. **Exp. Cell Res.**, v. 278, p. 72-83, 2002.

KUO, M. Y.; LAN, W. H.; LIN, S. K.; TSAI, K. S.; HAHN, L. J. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. **Arch. Oral Biol.**, v. 37, p. 945-952, 1992.

LAZARIDES, E. Intermediate filaments: a chemical heterogeneous developmentally regulated class of proteins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 51, p. 219-250, 1982.

LESOT, H.; OSMAN, M.; RUCH, J. V. Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. **Dev. Biol.**, v. 82, p. 371-381, 1981.

LINDE, A. Session II: cells and extracellular matrices of the dental pulp. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 64, p. 523-529, 1985.

LOPEZ-CAZAUX, S.; BLUTEAU, G.; MAGNE, D.; LIEUBEAU, B.; GUICHEUX, J.; ALLIOT-LICHT, B. Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp-derived cells: technical note. **Eur. Cell Mater.**, v. 11, p. 35-42, 2006.

LUCCHINI, M.; ROMEAS, A.; COUBLE, M. L.; BLEICHER, F.; MAGLOIRE, H.; FARGES, J. C. TGF beta1 signaling and stimulation of osteoadherin in human odontoblasts in vitro. **Connect. Tissue Res.**, v. 43, p. 345-353, 2002.

LUISI, S. B.; BARBACHAN, J. J. ; CHIES, J. A. ; FILHO, M. S. Behavior of human dental pulp cells exposed to transforming growth factor-beta1 and acidic fibroblast growth factor in culture. **J. Endodon.**, v. 33, p. 833-835, 2007.

LUKINMAA, P. L.; MACKIE, E.; THESLEFF, I. Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins - tenascin and the ED - sequence containing form of cellular fibronectin - in human permanent teeth and periodontal ligament. **J. Dent. Res.**, v. 70, p. 19-26, 1991.

MACKIE, E. J.; ABRAHAM, L. A.; TAYLOR, S. L.; TUCKER, R. P.; MURPHY, L. I. Regulation of tenascin-C expression in bone cells by transforming growth factor-beta. **Bone**, v. 22, p. 301-307, 1998.

MACKIE, E. J.; THESLEFF, I.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation *in vivo* and promotes chondrogenesis *in vitro*. **J. Cell Biol.**, v. 105, p. 2569-2579, 1987.

MAGLOIRE, H.; BOUVIER, M. ; JOFFRE, A. Odontoblast response under carious lesions. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, v. 99, p. 257-274, 1992.

MARKL, J. Cytokeratins in mesenchymal cells: impact on functional concepts of the diversity of intermediate filament proteins. **J. Cell Sci.**, v. 98, p. 261-264, 1991.

MARTINEZ, E. F. **Estudo *in vitro* de proteínas da matriz extracelular (tenascina, fibronectina, colágenos I e III e osteonectina) de fibroblastos de polpas dentárias humanas e de mucosa gengival.** 78f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 2002.

MARTINEZ, E. F.; ARAÚJO, V. C. *In vitro* immunexpression of extracellular matrix proteins of pulpal and gingival mucosa fibroblasts. **Int. Endodon. J.**, v. 37, p.749-755, 2004.

MARTINEZ, E. F.; SOUZA, S. O. M.; CORRÊA, L.; ARAÚJO, V. C. Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III collagen in human dental pulp. **J. Endodon.**, v. 26, p. 708-711, 2000.

McCACHREN, S. S.; LIGHTNER, V. A. Expression of human tenascin in synovitis and its regulation by interleukin-1. **Arthritis Rheum.**, v. 35, p. 1185-1196, 1992.

McHUGH, K. M.; CRAWFORD, K.; LESSARD, J. L. A comprehensive analysis of the developmental and tissue-specific expression of the isoactin multigene family in the rat. **Dev. Biol.**, v. 148, p. 442-458, 1991.

MELIN, M.; JOFFRE-ROMEAS, A.; FARGES, J.-C.; COUBLE, M.-L.; MAGLOIRE, H.; BLEICHER, F. Effects of TGF β 1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. **J. Dent. Res.**, v. 79, p. 1689-1696, 2000.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 13, p. 5807-5812, 2003.

NAKASHIMA, M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. **Arch. Oral Biol.**, v. 37, p. 231-236, 1992.

NAKASHIMA, M.; NAGASAWA, H.; YAMADA, Y.; REDDI, A. H. Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. **Dev. Biol.**, v. 162, p. 18-28, 1994.

NAKASHIMA, M.; TOYONO, T.; MURAKAMI, T.; AKAMINE, A. Transforming growth factor- β 1 superfamily members expressed in rat incisor pulp. **Arch. Oral Biol.**, v. 43, p. 745-751, 1998.

NANCI, A. Dentin-pulp complex. In: _____. **Ten Cate's Oral Histology**. 6th. ed. Mosby: St Louis, 2003. cap. 8 , p. 192-239.

OTSUKA, K.; YAO, K. L.; WASI, S.; TUNG, P.; AUBIN, J. E.; SODEK, J.; TERMINE, J. D. Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvarial cells *in vitro*. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 9805-9812, 1984.

PEARSON, C. A.; PEARSON, D.; SHIBAHARA, S.; HOFSTEENGE, J.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. **Embo. J.**, v. 7, p. 2977-2982, 1988.

PREMDAS, J.; TANG, J.-B.; WARNER, J. P.; MEANEY MURAI, M.; SPECTOR, M. The presence of smooth muscle actin in fibroblasts in the torn human rotator cuff. **J. Orthop. Res.**, v. 19, p. 221-228, 2001.

QUAX, W.; EGBERTS, W. V.; HENDRIKS, W.; QUAXJEUKEN, Y.; BLOEMENDAL, H. The structure of the vimentin gene. **Cell**, v. 35, p. 215-223, 1983.

REDDI, A. H. Bone and cartilage differentiation. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 4, p. 914-923, 1994.

REICHERT, T.; STÖRKEL, S.; BECKER, K.; FISHER, L. The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study. **Calcif. Tissue Int.**, v. 50, p. 468-472, 1992.

RETTIG, W. J.; ERICKSON, H. P.; ALBINO, A. P.; GARIN-CHESA, P. Induction of human tenascin (neuronectin) by growth factors and cytokines: cell type-specific signals and signalling pathways. **J. Cell Sci.**, v. 107, p. 487-497, 1994.

ROBERTS, A. B.; FLANDERS, K. C., KONDAIAH, P. Transforming growth factor β : biochemistry and roles in embriogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 44, p. 157-197, 1988.

ROBEY, P. G. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. **Connect. Tissue Res.**, Philadelphia, v. 35, n. 1-4, p. 131-136, 1996.

ROBEY, P. G.; TERMINE, J. D. Human bone cells in vitro. **Calcif. Tissue Int.**, v. 37, p. 453-460, 1985.

ROCHE, W. R. Myofibroblasts. **J. Pathol.**, v. 161, p. 281-282, 1990.

RϕNNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O. W. A function for filamentous smooth muscle actin: retardation of motility im fibroblasts. **J. Cell Biol.**, v. 134, p. 67-80, 1996.

RUCH, J. V. Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. **J. Dent. Res.**, v. 64, p. 489-498, 1985.

SAPPINO, A. P.; MASOUYÉ, I.; SAURAT, J. H.; GABBIANI, G. Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells. **Am. J. Pathol.**, v. 137, p. 585-591, 1990.

SAWADA, T.; NANCI, A. Spatial distribution of enamel proteins and fibronectin at early stages of rat incisor tooth formation. **Arch. Oral Biol.**, v. 40, p. 1029-1038, 1995.

SHIBA, H.; FUJITA, T.; DOI, N.; NAKAMURA, S.; NAKANISHI, K.; TAKEMOTO, T.; HINO, T.; NOSHIRO, M.; KAWAMOTO, T.; KURIHARA, H.; KATO, Y. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. **J. Cell Physiol.**, v. 174. p. 194-205, 1998.

SCHERBERICH, A.; TUCKER, R. P.; SAMANDARI, E.; BROWN-LUEDI, M.; MARTIN, D.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Murine tenascin W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. **J. Cell Sci.**, v. 117, p. 571-581, 2004.

SCHÜRCH, W.; SEEMAYER, T. A.; GABBIANI, G. The myofibroblast. A quarter century after its discovery. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 22, p. 141-147, 1998.

SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. Stimulation of the dentine pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- β isoforms 1-3 in vitro. **Arch. Oral Biol.**, v. 44, p. 149-156, 1999.

SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. **Oral Dis.**, v. 13, p. 151-157, 2007.

SMITH, A. J.; CASSIDY, N.; PERRY, H.; BÈGUE-KIRN, C.; RUCH, J. V.; LESOT, H. Reactionary dentinogenesis. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 39, p. 273-80, 1995.

SOBRAL, L. M.; MONTAN, P. F.; MARTELLI-JUNIOR, H.; GRANER, E.; COLETTA, R. D. Opposite effects of TGF- β 1 and IFN- γ on transdifferentiation of myofibroblasts in human gingival cell cultures. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, p. 397-406, 2007.

SPRING, J.; BECK, K.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Two contrary functions of tenascin: dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. **Cell**, Cambridge, v. 59, p. 325-334, 1989.

STANLEY, H. R.; PEREIRA, J. C.; SPIEGEL, E.; BROOM, C.; SCHULTZ, M. The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. **J. Oral Pathol.**, v. 12, p. 257-289, 1983.

TERMINE, J. D.; KLEINMAN, H. K.; WHITSON, S. W.; CONN, K. M.; MCGARVEY, M. L.; MARTIN, G. R. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. **Cell**, Cambridge, v. 26, p. 99-105, 1981.

THESLEFF, I.; HURMERINTA, K. Tissue interactions in tooth development. **Differentiation**, v. 18, p. 75-78, 1981.

THESLEFF, I.; MACKIE, E.; VAINIO, S.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Changes in distribution of tenascin during tooth development. **Development**, v. 101, p. 289-296, 1987.

THESLEFF, I.; VAINIO, S.; JALKANEN, M. Cell matrix interactions in tooth development. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 33, p. 91-97, 1989.

THESLEFF, I.; KANTOMAA, T.; MACKIE, E.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Immunohistochemical localization of the matrix glycoprotein tenascin in the skull of the growing rat. **Arch. Oral Biol.**, v. 33, p. 383-390, 1988.

TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3, p. 349-363, 2002.

TOYONO, T.; NAKASHIMA, M.; AKAMINE, A. Expression of TGF- β superfamily receptors in dental pulp. **J. Dent. Res.**, v. 76, p. 155-160, 1997.

TZIAFAS, D.; ALVANOU, A.; PAPADIMITRIOU, S.; ASIC, J.; KOMNENOU, A. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor- β 1 on dog dental pulp cells in vivo. **Arch. Oral Biol.**, v. 43, p. 431-444, 1998.

TZIAFAS, D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. **Caries Res.**, v. 38, p. 314-320, 2004.

VAAHTOKARI, A.; VAINIO, S.; THESLEFF, I. Associations between transforming growth factor β 1 RNA expression and epithelial-mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. **Development**, v. 113, p. 985-994, 1991.

VAN AMERONGEN, J. P.; LEMMENS, I. G.; TONINO, G. J. M. The concentration, extractibility and characterization of collagen in human dental pulp. **Arch. Oral Biol.**, v. 28, p. 339-345, 1983.

VAN AMERONGEN, J. P.; LEMMENS, I. G.; TONINO, G. J. M. Immunofluorescent localization and extractibility of fibronectin in human dental pulp. **Arch. Oral Biol.**, v. 29, p. 93-99, 1984.

VAUGHAN, M. B.; HOWARD, E. W.; TOMASEK, J. J. Transforming growth factor- β 1 promotes the morphological and functional differentiation on the myofibroblast. **Exp. Cell Res.**, v. 257, p. 180-189, 2000.

YOUNG, M. F.; BOLANDER, M. E.; DAY, A. A.; RAMIS, C. I.; ROBEY, P. G.; YAMADA, Y.; TERMINE, J.D. Osteonectin mRNA: distribution in normal and transformed cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 14, p. 4483-4497, 1986.

WASI, S.; OTSUKA, K.; YAO, K. L.; TUNG, P. S.; AUBIN, J. E.; SODEK, J.; TERMINE, J. D. An osteonectin-like protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. **Can. J. Biochem. Cell Biol.**, Ottawa, v. 62, p. 470-478, 1984.

WELCH, M. P.; ODLAND, G. F.; CLARK, R. A. F. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. **J. Cell Biol.**, v. 110, p. 133-145, 1990.

WRANA, J. L.; OVERALL, C. M.; SODEK, J. Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor β . **Eur. J. Biochem.**, v. 197, p. 519-528, 1991.

ANEXOS