MÁRCIO CAJAZEIRA AGUIAR

Estudo ultra-estrutural e imunocitoquímico
da dentina reacional e da dentina
reparativa formadas após luxação
extrusiva em incisivos de ratos

MÁRCIO CAJAZEIRA AGUIAR

**ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL E
IMUNOCITOQUÍMICO DA DENTINA REACIONAL
E DA DENTINA REPARATIVA FORMADAS APÓS
LUXAÇÃO EXTRUSIVA EM INCISIVOS DE RATOS**

Tese 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
2007

MÁRCIO CAJAZEIRA AGUIAR

**ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL E
IMUNOCITOQUÍMICO DA DENTINA REACIONAL
E DA DENTINA REPARATIVA FORMADAS APÓS
LUXAÇÃO EXTRUSIVA EM INCISIVOS DE RATOS**

Tese de 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 E. Arana-Chavez

São Paulo
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Márcio Cajazeira Aguiar

Título da Tese: Estudo ultra-estrutural e imunocitoquímico da dentina reacional e da dentina reparativa formadas após luxação extrusiva em incisivos de ratos

Orientador (a): **Victor Elias Arana-Chavez**

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

() **Aprovado**

() **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:

**ESPAÇO DESTINADO AO CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Vera e Gil Graça de Aguiar, fontes de admiração e carinho, por acreditarem no meu sonho e por me ensinarem que a dignidade não tem preço.

Aos meus irmãos

Verena e Vinicius Cajazeira Aguiar que, mesmo longe, apoiaram-me nos momentos mais difíceis.

Aos meus avôs

Maria José Cajazeira (*in memoriam*) e Carlos Rocha Cajazeira (*in memoriam*), pelo amor incondicional e pelas doces lembranças de criança.

À minha namorada

Cléo Anjos, seu carinho, sua perseverança, sua vontade de vencer, me contagia sempre.

Ao Senhor de todas as coisas e homens, Deus, por me dar força divina para persistir na caminhada e fé para não desistir nunca.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, sua parcimônia, seu rigor, me fizeram enxergar que a boa pesquisa é produto de muita dedicação e determinação.

Aos colegas do Laboratório de Biologia dos Tecidos Mineralizados Daniela Janones, Newton Maciel Oliveira, meus companheiros desde o início dessa jornada, Cristina Jimenez-Pellegrin, Natasha D'Andrea, Jaqueline, Diene Tenório, Maurício de Alencar Casa, Vivian Bradaschia-Correa, Sílvia Maria João, Denise Forster, Flávia Bortolotto, Isabela Tomazelli, Taís Oliveira, a “japa falsa” Tatiani Donato, Betinha, Grazielle Berrocozo, Sras. Luciana Massa e Luciene Bonafé, pela amizade e compreensão nos momentos mais difíceis.

À minha amiga Fernanda Barrence, sempre disposta a colocar sua experiência no cotidiano da nossa prática laboratorial. Sem você, “as pedras em meu caminho” seriam maiores.

Ao Gaspar e Edson, pelas conversas vespertinas, pelo café nas horas críticas e pelo inestimável auxílio no trabalho laboratorial e na busca incessante das imagens perfeitas.

Ao Gerson (*in memoriam*), que partiu sem saber o quão foi valioso na minha formação como microscopista.

Aos professores Émer Suavinho Ferro, Marinilce Silva, Dânia Hamassaki-Britto, Anselmo Moriscot, por me fazerem entender que a ciência está no desejo de conhecer as causas e a origem das coisas da vida.

Ao professor Jarbas Arruda Bauer, por nossas conversas filosóficas.

À Celiana, Ana Lúcia, Eloísa e Cleusa, sempre dispostas a ajudar os alunos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual.

Ao Fernando, Cláudio, Leornado, Nanci e Santa, pelo auxílio no manuseio dos animais de experimentação. Sem vocês, a realização desse trabalho seria impossível.

Aos funcionários da biblioteca, pelo auxílio no levantamento bibliográfico e enquadramento desse trabalho nos preceitos da normatização bibliográfica.

À minha sogra Marta Anjos, pela ajuda na correção gramatical do meu trabalho.

Aos meus amigos Marcelo Lamers, José Antônio, José “piranha”, Rodrigo, Zero, irmãos Tomazinho, Mara Rúbia, Sheila, Fausto e Marcio “astrinho”, porque acima de tudo, temos necessidade de alguém que nos incentive a realizar aquilo que somos capazes.

Aos meus amigos Gustavo Góes, Marco Antônio Romeu, Jorge Ribeiro e Atson Fernandes, por me fazerem acreditar que uma das coisas mais belas da amizade é saber quando o amigo precisa de alguém, antes mesmo que ele saiba.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

“Alguns poucos são bem sucedidos por estarem predestinados, a maioria por estarem determinados”

Autor desconhecido

RESUMO

AGUIAR, M.C. **Estudo ultra-estrutural e imunocitoquímico da dentina reacional e da dentina reparativa formadas após luxação extrusiva em incisivos de ratos.** Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O complexo dentina-polpa responde frequentemente a uma agressão pela produção de dentina reacional e/ou dentina reparativa. A dentina reacional é secretada por odontoblastos originais, enquanto a dentina reparativa é formada por células “odontoblast-like”. A osteopontina (OPN), proteína abundante no osso, e a proteína da matriz dentinária 1 (DMP1), encontrada na dentina fisiológica, podem estar presentes na matriz dentinária formada após injúria pulpar, porém nenhum estudo visando a sua detecção na dentina reacional e reparativa foi realizado. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi examinar as características ultra-estruturais e a presença e a distribuição das proteínas não colágenas OPN e DMP1 nas matrizes da dentina reacional e reparativa por meio da extrusão controlada de incisivos de rato. Os incisivos superiores direitos de ratos machos de 3 meses foram extruídos 3 mm e depois reposicionados em seus respectivos alvéolos. Decorridos 3, 7, 10, 15, 20, 30 e 60 dias da extrusão, as maxilas foram removidas e fixadas em formaldeído a 2,5% + 2% glutaraldeído ou em formaldeído a 4% + 0,1% glutaraldeído, ambas tamponadas em cacodilato de cálcio 0,1M, pH 7,2, sob irradiação por microondas, e descalcificadas em EDTA 4,13%. Como controle, um animal de cada período não teve seu dente movimentado. Depois as maxilas foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão e de varredura e imunocitoquímica para OPN e DMP1. Após extrusão, a interface dentina-polpa mostrou a presença de dentina reacional e reparativa, as quais variaram em aspecto, espessura e células secretoras. A OPN não foi detectada na dentina fisiológica e reacional, mas foi observada na forma de acúmulos na matriz de dentina reparativa que continha células inclusas e seus prolongamentos, um aspecto comumente encontrado no osso. Em adição, os odontoblastos originais adjacentes à dentina fisiológica continham imunomarcagem para OPN na região de Golgi. A DMP1 foi imunodetectada na matriz em mineralização das dentinas fisiológica, reacional e reparativa, mas raras partículas de ouro-coloidal para esta proteína estavam presentes nas suas pré-dentinas, o que confirmou o seu papel na mineralização dentinária demonstrado por estudos em outros modelos. Os presentes achados mostraram que a dentina reparativa e o osso primário são também similares com relação às suas composições, além de semelhanças morfológicas apontadas anteriormente na literatura.

Palavras-Chave: Polpa dentária; imunocitoquímica; odontoblasto; osteopontina; proteína da matriz dentinária 1; dentina reacional; dentina reparativa; dentina terciária.

ABSTRACT

AGUIAR, M.C. **Ultrastructural and immunocytochemical study of the reactionary dentine and reparative formed after extrusive luxation in rat incisors.** Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Reactionary dentine and reparative dentine are two strategies used by the dentine–pulp complex to respond to injury. The reactionary dentine is secreted by original odontoblasts, while the reparative dentine is formed by odontoblast-like cells. Osteopontin (OPN) and dentine matrix protein 1 (DMP1), protein present in the physiological dentine, may be present in the matrix secreted after tissue injury, but there are no studies attempting to detect it in reactionary and reparative dentine. The aim of the present study was to examine the ultrastructural characteristics, as well as the presence and distribution of OPN and DMP1 in reactionary and reparative dentine by provoking extrusion of the rat incisor. The right upper incisors of 3-month-old male rats were extruded 3 mm and then repositioned into their original sockets. At 3, 7, 10, 15, 20, 30 and 60 days after surgery, the maxillae were fixed in 2% glutaraldehyde + 2,5% formaldehyde or in 0,1% glutaraldehyde + 4% formaldehyde, both buffered with 0.1M sodium cacodylate, pH 7.2, under microwave irradiation, and then decalcified in 4.13% EDTA. As control, an animal of each group was not operated. They were then processed for scanning and transmission electron microscopy and for immunocytochemistry for OPN and DMP1. After extrusive trauma, the dentine–pulp interface showed the presence of reactionary and reparative dentine, which varied in aspect, thickness and related cells. OPN was not detected in the physiological and reactionary dentine, while it was strongly immunoreactive in the matrix that surrounded the entrapped cells of reparative dentine, an aspect usually found in bone. In addition, original odontoblasts subjacent to the physiological dentine contained OPN in their Golgi region. DMP1 was immunodetected in the physiological, reactionary and reparative dentine matrix, but rare colloidal gold particles for this protein were observed in predentin, what confirmed its role in the dentine mineralization demonstrated by studies in other models. The present findings showed that reparative dentine shares some compositional characteristics with primary bone, especially in relation to its OPN content.

Key words: Dental pulp; immunocytochemistry; odontoblast; osteopontin; dentin matrix protein 1; reactionary dentine; reparative dentine; tertiary dentine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Fotografia mostrando a técnica cirúrgica de extrusão dentária empregada no estudo.....	37
Figura 2.	Eletromicrografia demonstrando a especificidade dos anticorpos OPN e DMP1.....	41
Figura 3.	Fotografia da estrutura do incisivo superior do rato.....	45
Figura 4.	Fotomicrografias mostrando áreas de epitélio odontogênico e de ligamento periodontal observadas após realização da extrusão dentária.....	46
Figura 5.	Eletromicrografia mostrando o ligamento peridontal relacionado com a face vestibular após realização do trauma extrusivo, 60 dias após indução da extrusão dentária.....	48
Figura 6.	Fotomicrografia mostrando a interface dentina-polpa, 3 dias após a indução da extrusão.....	49
Figura 7.	Eletromicrografias mostrando a interface polpa-dentina nos períodos iniciais após injúria pulpar.....	51
Figura 8.	Eletromicrografias mostrando algumas superfícies dentinárias expostas pela destruição dos odontoblastos primários, 3 dias após indução da força extrusiva.....	53
Figura 9.	Eletromicrografia mostrando início da deposição de matriz sobre a dentina exposta, 3 dias após realização da injúria pulpar.....	57
Figura 10.	Fotomicrografia mostrando a interface dentina-polpa, 7 dias após a indução da extrusão.....	58
Figura 11.	Eletromicrografias mostrando interface polpa-dentina, 7 dias após indução da extrusão dentária.....	59
Figura 12.	Eletromicrografias mostrando inúmeras junções celulares entre odontoblastos originais remanescentes, 7 dias após realização da extrusão dentária.....	60
Figura 13.	Eletromicrografia da interface dentina-polpa, 7 dias após indução da injúria pulpar.....	62
Figura 14.	Eletromicrografias da interface entre a matriz de dentina reparativa e as células “odontoblast-like”, 7 dias após realização da injúria pulpar.....	63
Figura 15.	Fotomicrografias mostrando a interface dentina-polpa, 7 dias após indução da extrusão dentária.....	65
Figura 16.	Eletromicrografia da interface entre a matriz de dentina reparativa e uma célula “odontoblast-like”, 7 dias após realização da injúria pulpar.....	66
Figura 17.	Fotomicrografia mostrando a deposição de dentina reacional e reparativa, 10 dias após a extrusão dentária.....	67
Figura 18.	Eletromicrografias da matriz de dentina reparativa observadas 10 dias após injúria pulpar.....	68
Figura 19.	Fotomicrografia da matriz de dentina reparativa observada 20 dias após trauma dentário	71
Figura 20.	Eletromicrografias (de varredura) das matrizes de dentina	

	produzidas, 30 dias após indução de injúria pulpar.....	72
Figura 21.	Fotografia do conduto pulpar do incisivo obliterado, 60 dias após realização da extrusão dentária.....	73
Figura 22.	Imunocitoquímica para OPN, 3 dias após indução da extrusão dentária.....	74
Figura 23.	Imunocitoquímica para OPN, 7 dias após realização da extrusão dentária.....	77
Figura 24.	Imunocitoquímica para OPN, 10 dias após realização da extrusão dentária.....	79
Figura 25.	Imunocitoquímica para DMP1, 7 dias após indução da extrusão dentária.....	80
Figura 26.	Imunocitoquímica para DMP1 na matriz de dentina reparativa com inclusão celular, 7 dias após indução da injúria pulpar.....	82
Figura 27.	Imunocitoquímica para DMP1 na matriz das dentinas fisiológica, reacional e dentina reparativa, 7 dias após realização da extrusão dentária.....	83
Figura 28.	Imunocitoquímica para DMP1 na célula “odontoblast-like” situada na interface dentina-polpa, 7 dias após indução da extrusão dentária.....	85
Figura 29.	Imunocitoquímica para OPN e DMP1 na matriz de dentina reparativa, 7 dias após realização da injúria pulpar.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Anticorpos empregados na reação imunocitoquímica para OPN e DMP1.....	39
------------------	--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Esmalte	17
1.2 Dentina	18
1.2.1 Tipos de dentina	19
1.3 Proteínas não colágenas	22
1.3.1 Osteopontina	23
1.3.2 Proteína da matriz dentinária 1	27
2 PROPOSIÇÃO	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Animais	35
3.2 Procedimento cirúrgico	35
3.3 Obtenção da amostra	36
3.4 Processamento para microscopia eletrônica de varredura	38
3.5 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão	38
3.6 Imunocitoquímica pós-inclusão com ouro coloidal	39
4 RESULTADOS	42
4.1 Morfologia	43
4.1.1 Esmalte	43
4.1.2 Dentina	44
4.2 Imunocitoquímica	70
4.2.1 Osteopontina	70
4.2.2 Proteína da matriz dentinária 1	76
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	102
ANEXOS	109

1 INTRODUÇÃO

Os tecidos dentários e suas estruturas de suporte são formados como resultado da interação entre o epitélio oral e o ectomesênquima, durante a odontogênese. Na odontogênese, cada tecido em particular é formado por um processo específico. Assim sendo, amelogênese e dentinogênese referem-se, respectivamente, à formação do esmalte e da dentina, dois tecidos dentários mineralizados.

1.1 Esmalte

O esmalte que reveste a coroa dentária difere dos demais tecidos mineralizados por ser de origem ectodérmica, desprovido de células e incapaz de reparar-se ou remodelar-se. É composto essencialmente por cristais de fosfato de cálcio sob a forma de hidroxiapatita (97%), por material orgânico (1%) e por água (2%). Os ameloblastos são as células responsáveis pela formação desse tecido, estando envolvidas na síntese e secreção das proteínas da matriz e na mineralização do esmalte.

As proteínas da matriz do esmalte são abundantes no início da amelogênese e parecem influenciar a organização estrutural e a mineralização do esmalte (PAINE et al., 2000). A matriz não mineralizada do esmalte é formada por diversas proteínas incluindo a amelogenina e as não amelogeninas, bem como as proteinases (SMITH, 1998; HU et al., 2001). As amelogeninas são as proteínas mais abundantes da matriz do esmalte. Na fase secretora e no estágio inicial de maturação da amelogênese, distintas isoformas da amelogenina estão distribuídas heterogeneamente sobre a matriz de esmalte e parecem desempenhar papéis específicos na sua formação (NANCI et al., 1998; SMITH, 1998, FINCHAM et al., 1999; SIMMER e HU, 2001). As proteínas do grupo das não amelogeninas compreendem a ameloblastina, enamelina (FINCHAM et al., 1999; SIMMER e HU, 2001), tufelina e proteínas sulfatadas (FINCHAM et al., 1999). As proteinases, proteínas responsáveis pela degradação da matriz orgânica extracelular relacionada com o crescimento dos cristais de hidroxiapatita, incluem enamelisina (MMP-20) e a serina protease (SMITH, 1998; FINCHAM et al., 1999).

1.2. Dentina

A dentinogênese compreende a formação de um tecido mineralizado de natureza conjuntiva, avascular e acelular, a dentina, a qual está revestida na sua porção coronária e na sua porção radicular pelo esmalte e pelo cimento, respectivamente. A dentina aloja no seu interior um tecido conjuntivo frouxo, a polpa dentária, com a qual compartilha características comuns referentes à origem e função (KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

A dentina é caracterizada pela presença de inúmeros túbulos dentinários que atravessam toda a sua espessura. Os túbulos dentinários estão preenchidos por extensões citoplasmáticas dos odontoblastos, diferenciados a partir de células ectomesênquimais da papila dentária, por um processo de indução recíproca com as células do epitélio interno do órgão do esmalte (TEN CATE, 1998).

Os odontoblastos, organizados em uma camada simples, são células pós-mitóticas oriundas da crista neural, que se diferenciam no estágio de sino tardio da odontogênese. Durante a dentinogênese, o odontoblasto sintetiza e secreta os componentes da matriz extracelular da dentina primária e secundária e controla sua subsequente mineralização (SMITH et al., 1995; D'SOUZA et al., 1995; MAGLOIRE et al., 2001; ARANA-CHAVEZ e MASSA, 2004).

A diferenciação dos odontoblastos é marcada pela expressão de vários genes que codificam para proteínas colágenas e não colágenas e por modificações morfológicas. A expressão de alguns desses genes é específica e pode confirmar o fenótipo de odontoblasto completamente diferenciado (RUCH et al., 1995). Tais células, por exemplo, expressam a sialofosfoproteína dentinária (DSPP), um produto de um gene que não é transcrito por outras células como osteoblastos (GAIKWAD et al., 2001). As modificações morfológicas que refletem diferenciação incluem formação de processos citoplasmáticos apicais e polarização celular (RUCH et al., 1995).

A dentina, em relação ao seu peso, é composta por 70% de material inorgânico, 18% de material orgânico e 12% de água. Seu componente inorgânico é constituído por cristais de hidroxiapatita, enquanto a porção orgânica contém principalmente colágeno tipo I, frações de colágeno tipo III e tipo V, glicoproteínas, proteoglicanos e proteínas não colágenas (TEN CATE, 1998; KATCHBURIAN e ARANA, 2004). Outra categoria inclui proteínas não sintetizadas por odontoblastos e

encontradas na circulação sangüínea, mas com grande afinidade pela matriz dentinária. Finalmente, a dentina contém inúmeros fatores de crescimento como proteína morfogenética óssea (BMP), fator de crescimento insulina-like e fator de crescimento transformante (TGF β), cuja célula secretora não foi devidamente identificada (BUTLER e RITCHIE, 1995).

Na odontogênese, muitos eventos são ainda desconhecidos, particularmente na fase em que ocorre a indução recíproca entre as células do epitélio interno do órgão do esmalte e as células ectomesênquimais da papila dentária, fenômeno que leva à diferenciação dos odontoblastos e ameloblastos e ao início da deposição de dentina e esmalte. Uma estratégia empregada no estudo da formação dos tecidos dentários, particularmente a síntese e secreção de proteínas não colágenas pelas suas células formadoras, é a introdução de alterações no processo de odontogênese. Com esse objetivo, vários modelos têm sido empregados, dentre os quais, a administração de drogas (NANCI et al., 1998; YAMADA et al., 2000) e a aplicação de trauma mecânico sobre dentes em formação (TANIGUCHI et al., 1999; SPAHR et al., 2002). Nos ratos, a segunda das estratégias mencionadas pode ser utilizada mesmo em animais adultos, porque seu incisivo apresenta um epitélio odontogênico na região apical por sua face vestibular em permanente proliferação e diferenciação que simula a maioria dos eventos observados na odontogênese.

1.2.1 Tipos de dentina

Nos dentes humanos, pode-se observar a presença de três tipos de dentina: primária, secundária e terciária. A dentina primária refere-se àquele tecido secretado antes do término da formação radicular. A dentina secundária é aquela produzida durante toda vida num ritmo mais lento após a formação radicular. O aspecto mais característico e comum entre ambas é a presença de uma estrutura tubular e regular (SMITH et al., 1995). Nesse contexto, é válido ressaltar que, no incisivo do rato, a dentina primária não pode ser distinguida da dentina secundária, visto que tal dente erupciona continuamente e não há término da formação radicular. Assim, além das dentinas formadas após injúria pulpar, tem-se apenas a dentina fisiológica no incisivo do rato.

A dentina terciária, matriz dentinária depositada em um local específico da interface polpa-dentina em resposta a um estímulo (SMITH et al., 1995; MURRAY et

al., 2003), pode ser classificada como reacional ou reparativa, dependendo da severidade da agressão e das condições do tecido pulpar (MURRAY et al., 2003). Havendo um estímulo de pequena intensidade, haverá aumento da secreção de uma matriz pelos odontoblastos pré-existentes expostos à injúria. Estímulos mais intensos podem destruir os odontoblastos primários, havendo, se as condições pulpares forem favoráveis, a formação de uma nova geração de células secretoras de dentina denominadas de células “odontoblast-like” (SMITH et al., 1995).

A matriz de dentina terciária secretada por um grupo de odontoblastos pós-mitóticos sobreviventes à injúria pulpar (cárie, preparo cavitário ou agressão de outra natureza) é denominada de dentina reacional (SMITH et al., 1995; MAGLOIRE et al., 2001; SMITH et al., 2001; MURRAY et al., 2003). A matriz de dentina secretada por células “odontoblast-like” formadas após destruição dos odontoblastos primários é chamada de dentina reparativa (SMITH et al., 1995; SMITH et al., 2001; MURRAY et al., 2003). A sugestão de que as células “odontoblast-like” substituem os odontoblastos primários na secreção da matriz de dentina advém do fato de se observar imunomarcagem de proteínas dentinárias específicas na matriz produzida por aquelas células (D’SOUZA et al., 1995), além de algumas semelhanças morfológicas (TZIAFAS, 1995). Entretanto, tais informações devem ser analisadas com reservas, pois muitas proteínas consideradas originalmente da dentina têm sido recentemente encontradas na matriz óssea (QIN et al., 2003; PRIAM et al., 2005).

Estruturalmente a dentina terciária pode variar de uma matriz mais organizada semelhante ao da dentina primária para uma matriz atubular, distrófica, com inclusões celulares e aspecto osteóide (SMITH et al., 1995). Essa diversidade de aspecto parece estar associada com o tipo ou estágio de diferenciação da célula responsável pela formação do novo tecido (TEN CATE, 1998). Matrizes atípicas e atubulares são realizadas por células cubóides ou cilíndricas e diferentes dos odontoblastos primários denominadas de células “odontoblast-like” (TZIAFAS, 1995). Diferente da dentinogênese primária que é mediada por interações entre o epitélio odontogênico e as células mesênquimais da papila dentária, a diferenciação das células “odontoblast-like” acontece na ausência do epitélio odontogênico (TZIAFAS, 1994; TZIAFAS, 1995), o que pode explicar diferenças de composição observadas entre a dentina reparativa e a dentina fisiológica como mostrado por Foreman e Soames (1989).

A questão com relação à origem da célula “odontoblast-like” envolvidas na produção da matriz durante a dentinogênese reparativa não está esclarecida, embora tenha sido exaustivamente investigada (TZIAFAS, 1994; D’SOUZA et al., 1995). Muitos estudos sugerem que diferentes grupos de células estão envolvidos na formação da dentina reparativa e incluem as células residentes da zona rica em células da camada sub-odontoblástica, fibroblastos, pericitos, células endoteliais, células progenitoras e células-tronco (TZIAFAS, 1994; TZIAFAS, 1995; SPAHR et al., 2002; GOLDBERG et al., 2003; SLOAN e SMITH, 2007). Um desses grupos reside na camada odontoblástica e seriam pré-odontoblastos que interromperam sua diferenciação terminal. Havendo uma injúria pulpar com destruição dos odontoblastos primários, tais células reiniciariam sua diferenciação transformando-se numa nova geração de odontoblastos (TZIAFAS, 1995; SPAHR et al., 2002).

É possível que as células “odontoblast-like” possam derivar das células-tronco ou das células progenitoras da região perivascular (SLOAN e SMITH, 2007). Téclés et al., (2005) demonstraram que a injúria pulpar estimulou a proliferação e migração de células progenitoras/tronco para o local da injúria pulpar a partir da região perivascular.

Independente do grupo específico celular responsável pela resposta pulpar há evidências de que apenas as populações celulares da polpa têm potencial para se diferenciar em células “odontoblast-like”, competência adquirida nos eventos iniciais da formação dentária, durante interações entre o ectoderma oral e as células ectomesênquimais (TZIAFAS, 1994, 1995).

Os mecanismos celulares e moleculares que regulam a seqüência de eventos observadas na dentinogênese reparativa têm sido estudados por uma variedade de modelos *in vitro* e *in vivo* (COUBLE et al., 2000; GOLDBERG et al., 2001; SPAHR et al., 2002; MATHIEU et al., 2005). Ainda que alguns estudos tenham contribuído significativamente para o entendimento da formação da dentina reparativa, existe pouca informação sobre os passos iniciais desse processo, particularmente a origem, proliferação e migração das células responsáveis pela formação da dentina reparativa (TZIAFAS, 1994; D’SOUZA et al., 1995; MATHIEU et al., 2005; TÉCLÉS et al., 2005).

Além disso, o processo de mineralização da matriz dentinária, em especial a da dentina terciária reparativa, ainda não foi compreendido. Os mecanismos que controlam a mineralização dos tecidos duros têm sido objeto de muita discussão,

especialmente com relação aos componentes e macromoléculas que participam ativamente no processo. A hidroxiapatita, principal componente inorgânico da matriz mineralizada, não se deposita sobre uma matriz orgânica na ausência de moléculas nucleadoras específicas com afinidade pelo cálcio (HE et al., 2003b).

1.3 Proteínas não colágenas

Atualmente as proteínas não colágenas têm sido implicadas na regulação da deposição dos cristais inorgânicos sobre a matriz do osso, dentina e esmalte. Em particular, tais proteínas parecem estar envolvidas no controle da nucleação, inibição, tamanho, forma e orientação dos cristais formados (GEORGE et al., 1993; GOLDBERG et al., 1995).

A mineralização mediada pelas proteínas da matriz obedeceria a uma estratégia básica, na qual células especializadas inicialmente formam componentes estruturais da matriz extracelular e depois liberam pequena quantidade de macromoléculas específicas que modificam as propriedades da matriz, induzindo a deposição de minerais (GEORGE et al., 1993). Na dentina, por exemplo, os odontoblastos secretam um arcabouço não mineralizado, formado por fibrilas colágenas, chamado de pré-dentina, que, a certa distância do corpo celular do odontoblasto, é transformada em dentina. Essa célula, ao se deslocar para o centro da polpa, produz mais pré-dentina que é gradualmente mineralizada, mantendo sua conexão com tecido por meio dos seus processos odontoblásticos. A transformação da pré-dentina em dentina envolve muitos fenômenos que iniciam a deposição e crescimento de cristais de apatita entre e sobre as fibrilas colágenas. Os mecanismos envolvidos na mineralização da dentina não estão completamente entendidos, mas existem diversas evidências sugerindo a participação de proteínas não colágenas neste processo (BUTLER e RITCHIE, 1995; MASSA et al., 2005).

A matriz não colágena da dentina é constituída por várias proteínas, muitas delas altamente fosforiladas, com propriedades de ligação ao cálcio e função variando entre promoção e inibição da deposição de minerais em experimentos *in vitro* (HUNTER et al., 1996). Algumas delas são produtos derivados da clivagem de uma proteína de alto peso molecular chamada sialofosfoproteína dentinária (DSPP) como sialoproteína dentinária (DSP) e fosfoproteína dentinária (DPP), proteína da matriz dentinária 1, 2 e 3 (DMP1, DMP2 e DMP3, respectivamente), osteopontina

(OPN), sialoproteína óssea, osteonectina e osteocalcina (BUTLER e RITCHIE, 1995; HE et al., 2003a,b).

Entre as proteínas não colágenas possivelmente envolvidas na dentinogênese reparativa, está a osteopontina, uma glicoproteína fosforilada envolvida em alguns eventos fisiológicos e patológicos em muitos tecidos mineralizados (DENHARDT et al. 2001; MAZZALI et al. 2002; QIN et al. 2004), mas que não é imunodetectada na dentina primária e secundária. Outra proteína não colágena potencialmente relacionada com a dentinogênese é a DMP1 (MASSA et al., 2005), uma fosfoproteína encontrada particularmente na dentina e no osso (GEORGE et al. 1993; MACDOUGALL et al. 1998). Ainda que a OPN e a DMP1 estejam implicadas na formação dos tecidos mineralizados, não existem estudos indicando a presença destas proteínas na dentina reparativa e sua relação com o aparecimento das células “odontoblast-like”.

1.3.1 Osteopontina

A OPN tem sido caracterizada por diferentes ferramentas de estudo em muitos campos de pesquisa. O termo OPN foi adotado para refletir o potencial desta proteína óssea em servir como ponte de ligação entre as células e a hidroxiapatita (BUTLER, 1989; SODEK et al., 2000; QIN et al., 2004).

A OPN está presente em muitos tecidos mineralizados e moles incluindo rim, cérebro, zona de cartilagem hipertrófica (SODEK et al., 2000), cálculos pulpare (NINOMIYA et al., 2001), osso, cimento, dentina (McKEE e NANJI, 1996c), músculo, tumores e fluidos corporais (BUTLER, 1989; GIACHELLI e STEITZ, 2000; SODEK et al., 2000; DENHARDT et al., 2001). A ampla distribuição tecidual da OPN e sua expressão em células de variadas linhagens indicam uma multiplicidade de funções em diversos eventos biológicos, estando particularmente aumentada sob condições de inflamação e remodelação óssea (GIACHELLI e STEITZ, 2000; SODEK et al., 2000).

A produção de OPN parece ser um evento regulado, visto que a sua expressão pode ser modificada por hormônios, citocinas e fatores de crescimento (BUTLER, 1989; SODEK et al., 2000). Estudos demonstraram variação da expressão da OPN pelo fator de crescimento epidêmico (EGF), pelo fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), pelo TGF β , por BMP (DENHARDT e

NODA, 1998), por hipóxia (SODHI et al., 2001) e por alguns hormônios (SODEK et al., 2000).

Ao contrário de muitos tecidos, o osso contém grande quantidade da proteína OPN, reforçando a possibilidade desta proteína estar envolvida na interação entre os minerais e as células ósseas (GIACHELLI e STEITZ, 2000). O conceito de que a OPN estaria envolvida na formação da matriz óssea foi realizada com base na sua distribuição tecidual, sua afinidade pelo cálcio e sua imunolocalização nas regiões de mineralização (GERICKE et al., 2005). No tecido ósseo, a OPN é sintetizada por preosteoblastos, osteoblastos e osteócitos (BUTLER, 1989, McKEE e NANJI, 1996c) e talvez pelos osteoclastos (SODEK et al., 2000), porque existem controvérsias quanto a sua capacidade de secretar OPN (McKEE e NANJI, 1996b).

Em geral, acúmulos de OPN são detectados em regiões específicas do tecido mineralizado. A OPN, por exemplo, é observada em regiões amorfas e elétron-opacas situadas nos amplos espaços interfibrilares da matriz óssea (McKEE e NANJI, 1996c). Diferenças na sua imunodeteção estão também relacionadas com o estágio de desenvolvimento (fetal ou adulto) e tipo de organização estrutural do osso (osso primário ou secundário). No osso primário, por exemplo, OPN está presente em grande quantidade e se acumula nos espaços interfibrilares de sua matriz, enquanto que no osso secundário, um tecido com espaços interfibrilares menores, a OPN está presente em menor concentração (SODEK et al., 2000). A preferência da OPN pelos espaços interfibrilares pode indicar um papel na mineralização uniforme de toda a matriz garantindo coesão tecidual (NANJI, 1999).

No tecido ósseo, acúmulos de OPN também são observados em muitas interfaces teciduais incluindo linhas cimentantes e *laminae limitans* (McKEE e NANJI, 1996a,c). *Laminae limitans* é uma estrutura delgada, elétron-opaca em microscopia eletrônica, encontrada na periferia do osso e do cimento, estando relacionadas com as células ósseas e cementárias, respectivamente. Tais regiões compreendem a periferia da lacuna do osteócito (ou cementócito), dos canalículos e superfícies ósseas adjacentes às células de revestimento ósseo (McKEE e NANJI, 1996a,c; SODEK et al., 2000).

A linha cimentante corresponde a uma interface, também elétron-opaca quando analisada no microscópio eletrônico de transmissão, entre duas matrizes mineralizadas. É formada sobre áreas previamente reabsorvidas (linhas reversas) ou em áreas onde aposição óssea foi interrompida (linhas incrementais). A afinidade da

OPN por essa estrutura pode indicar um papel na interação entre as células osteoblásticas e a matriz e na regulação da deposição do novo tecido mineralizado sobre outro pré-existente (McKEE e NANJI, 1996a,c; SODEK et al., 2000).

A OPN também está presente em grande quantidade na matriz do cimento, particularmente no cimento celular. Tal proteína acumula-se preferencialmente entre as fibrilas colágenas na junção cimento-dentinária contribuindo possivelmente para reforçar a união entre os dois tecidos (McKEE e NANJI, 1996a,c; BOSSHARDT et al., 2005) e na região de *laminae limitans* em torno dos cementócitos e do seus processos citoplasmáticos (McKEE e NANJI, 1996c).

Sua imunolocalização específica em alguns tecidos pode estar relacionada com as características estruturais da OPN. A OPN é uma proteína ácida, pois contém seqüências consecutivas de ácido aspártico, além de resíduos de serina ou treonina com potencial de fosforilação (BUTLER, 1989; GIACHELLI e STEITZ, 2000, SODEK et al., 2000). O potencial de fosforilação da OPN é um importante fator na determinação do papel desta proteína em alguns tecidos (DENHARDT et al., 2001; QIN et al., 2004; GERICKE et al., 2005) e pode explicar diferenças no grau de fosforilação e função desempenhada pela OPN em diferentes regiões e animais. É sabido que formas desfosforiladas da OPN não têm efeito sobre a nucleação de cristais, enquanto formas muito fosforiladas promovem formação e crescimento da hidroxiapatita. Formas parcialmente fosforiladas como a OPN óssea inibem o crescimento dos cristais de hidroxiapatita (GERICKE et al., 2005). Tal variação pode depender de alterações conformacionais produzidas pela interação entre os grupos fosfato da OPN e a superfície catiônica dos cristais de hidroxiapatita, visto que, a OPN do leite, uma proteína muito fosforilada, sofre um discreto aumento no conteúdo de “ β -sheet” após interação com a hidroxiapatita (GERICKE et al., 2005). Tais características combinadas com a presença de outros domínios com afinidade para o cálcio podem explicar sua interação com os cristais de hidroxiapatita (GIACHELLI e STEITZ, 2000).

Além de sítios de glicosilação (SODEK et al., 2000; QIN et al., 2004; MAZZALI et al., 2002), a OPN contém inúmeros domínios de adesão celular incluindo uma seqüência arginina-glicina-aspartato (RGD), uma região com afinidade para alguns receptores de superfície celular, que incluem as integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$ e $\alpha_v\beta_5$ (RUOSLAHTI e PIERSCHBACHER, 1987; SODEK et al., 2000). Além de adesão celular, a interação entre a OPN e a integrina pode gerar diferentes respostas

celulares como migração e quimiotaxia. As diferentes respostas geradas podem ser explicadas pela existência de múltiplas combinações heterodiméricas das cadeias da integrina e de muitas isoformas da proteína OPN (SODEK et al., 2000). Adicionalmente, outras seqüências dentro da OPN parecem mediar adesão celular. Por exemplo, clivagem da OPN por trombina expõe a seqüência serina-valina-valina-tirosina-ácido glutâmico-leucina-arginina (SVVYGLR) promovendo interação com algumas isoformas da integrina (YOKOSAKI et al., 1999; GRAVALLESE, 2003).

Os domínios relacionados com adesão celular observados na OPN podem ser importantes para sinalização e migração celular, inclusive no tecido mineralizado, no qual tal proteína pode regular sua formação e remodelação (BUTLER e RITCHIE, 1995). Seu papel na sinalização celular é reforçado pelo fato desta proteína modificar a concentração intracelular do íon cálcio em células cultivadas e alterar o grau de fosforilação de proteínas intracelulares (DENHARDT et al., 2001). Muitas vias de sinalização são ativadas por processos alternados de fosforilação e desfosforilação de proteínas intracelulares.

O papel da OPN na remodelação do tecido ósseo inclui o controle da diferenciação, recrutamento, adesão (YOSHITAKE et al., 1999; SODEK et al., 2000) e função dos osteoclastos (McKEE e NANJI, 1996c; GIACHELLI e STEITZ, 2000) e provavelmente ocorre pela interação desta proteína com a integrina $\alpha_v\beta_3$, um receptor envolvido na sinalização intracelular (REINHOLT et al., 1990; ROSS et al., 1993).

Contudo, o efeito da OPN sobre as células clásticas dos demais tecidos mineralizados é discutível. Trabalhos estudando a reabsorção dentinária observaram acúmulos de OPN em lacunas reabsortivas na matriz de dentina após adesão dos odontoclastos (SHIMAZU et al., 2002; BOSSHARDT et al., 2005). Tais resultados indicam que o principal mecanismo para adesão odontoclástica sobre a dentina pode não ser mediado pela proteína OPN.

A OPN também pode estar envolvida na regulação da adesão das demais células ósseas (McKEE e NANJI, 1996c; GIACHELLI e STEITZ, 2000), pois acúmulos de OPN têm sido observados na linha cementária e *laminae limitans*, estruturas relacionadas com a interação da matriz óssea com as células ósseas (McKEE e NANJI, 1996a). Além do seu papel na adesão celular, a OPN pode estar regulando a deposição dos cristais de fosfato de cálcio na matriz óssea, visto que a OPN é encontrada em focos de mineralização no osteóide e na matriz do cimento

(MCKEE e NANJI, 1996c). Estudos *in vitro* mostraram que a OPN é um potente inibidor da formação e crescimento dos cristais de hidroxiapatita (HUNTER et al., 1996; BOSKEY et al., 2002). Alguns elementos estruturais requeridos para interação com cálcio estão presentes na OPN e incluem domínios contendo ácido poli aspártico e resíduos de aminoácidos fosforilados (GIACHELLI e STEITZ, 2000; SODEK et al., 2000).

Na dentina primária, o papel da OPN é menos óbvio e parece estar associado com alguns eventos, como no início da mineralização da dentina do manto da raiz em desenvolvimento. Talvez porque outros constituintes da matriz dentinária substituam a OPN na formação e mineralização da dentina (SODEK et al., 2000).

O papel da OPN na formação de cristais de hidroxiapatita não se limita aos tecidos mineralizados. A presença da OPN nos fluidos biológicos com elevadas concentrações de sais de cálcio e no trato urinário reforçam as evidências de que esta proteína pode prevenir ou limitar a precipitação espontânea dos sais de cálcio, impedindo a formação de cálculos renais (SODEK et al., 2000; MAZZALI et al., 2002).

A OPN parece também estar envolvida na resposta celular a uma injúria. Na presença de OPN, culturas de células epiteliais renais e células tumorais tornaram-se resistentes a hipóxia e a substâncias produzidas por macrófagos ativados, respectivamente (DENHARDT et al., 2001).

A resistência à agressão requer a adesão da OPN às células agredidas e pode estar relacionada com a inibição da apoptose (SCATENA et al., 1998). O mecanismo pelo qual a OPN inibiria a apoptose não está claro, mas pode envolver a regulação do fator Kappa B nuclear (NF- κ B), um fator que regula muitos genes envolvidos na resposta inflamatória e imune. Em células não estimuladas, fator NF- κ B está localizado no citoplasma formando um complexo com uma proteína inibitória, I κ B (BALDWIN, 1996). Havendo remoção dessa proteína, ocorre o translocamento do fator NF- κ B para o núcleo e ativação da transcrição de genes que inibem a apoptose (SCATENA et al., 1998).

1.3.2 Proteína da matriz dentinária 1

Outra proteína não colágena relacionada com a formação dos tecidos mineralizados é a DMP1. A DMP1 foi descoberta a partir de um banco de RNAm de

odontoblastos de ratos (GEORGE et al., 1993), sendo sua existência confirmada por hibridização *in situ* (GEORGE et al., 1994).

A DMP1 foi originalmente considerada uma proteína específica da dentina, porém, mais tarde, seu transcrito primário foi também expresso em osteoblastos e cementoblastos, células específicas do osso e do cimento, respectivamente (MACDOUGALL et al., 1998).

Na dentina, a DMP1 é encontrada nas células e matriz relacionadas com a mineralização. Nos odontoblastos, por exemplo, estudos imunocitoquímicos mostraram sua presença na região de Golgi, nos núcleos dos odontoblastos primários em diferenciação, nas vesículas da matriz e na matriz dentinária completamente mineralizada. Contudo tal proteína não foi imunodetectada na pré-dentina da dentina do manto (MASSA et al., 2005).

Analizando sua estrutura e composição, observa-se que a DMP1 possui um alto conteúdo de ácido aspártico, ácido glutâmico e resíduos de serina (GEORGE et al., 1993; SRINIVASAN et al., 1999), além de uma região RGD, sítios para N-glicosilação e para O-glicosilação (GEORGE et al., 1993; BUTLER e RITCHIE, 1995; MACDOUGALL et al., 1998; SRINIVASAN et al., 1999). A região RGD, uma sequência conservada em muitas espécies, é essencial para a interação entre DMP1 e as células, visto que a modificação do domínio RGD da DMP1 bloqueia sua adesão com células pulpares e osteogênicas (KULKARNI et al., 2000).

A DMP1 é uma proteína carregada negativamente em virtude do grande número de serinas fosforiladas (GEORGE et al., 1993; BUTLER e RITCHIE, 1995; SRINIVASAN et al., 1999; MACDOUGALL et al., 1998). A presença das serinas fosforiladas na estrutura da DMP1 permite interação desta proteína com alguns cátions, em especial o cálcio (SRINIVASAN et al., 1999; NARAYANAN et al., 2003).

Sua possível interação com o cálcio e fosfato permite relacioná-la com o processo de mineralização nos tecidos duros, onde tal proteína poderia iniciar o processo de nucleação e regular o crescimento dos cristais de hidroxiapatita (SRINIVASAN et al., 1999; NARAYANAN et al., 2001; HE et al., 2003a,b). He et al. (2003 a,b) observaram deposição de partículas de mineral, inicialmente amorfas, que evoluíram para a formação de cristais de hidroxiapatita organizados na presença de DMP1.

Além disso, na dentina, a DMP1 é expressa no início da mineralização indicando um possível papel regulador neste processo (HE et al., 2003a; MASSA et

al., 2005). Camundongos com deleção do gene para DMP1 desenvolveram dentes com câmaras pulpares ampliadas, camada anormalmente espessa de pré-dentina com redução e hipomineralização da camada de dentina. Nesses camundongos, a DSPP e seu RNA mensageiro correspondente estavam reduzidos, sugerindo seu controle pela DMP1 durante a dentinogênese (YE et al., 2004). Alguns desses efeitos podem estar relacionados com o fato da DMP1 poder regular a diferenciação terminal dos odontoblastos, visto que a transfecção de um cDNA para DMP1 de rato para as células mesenquimais C3H10T1/2 e MC3T3-E1 induziu sua diferenciação em células “odontoblast-like”, estimulou a formação de uma matriz competente para formar nódulos mineralizados e aumentou a transcrição dos genes DMP2 e DSP, dois marcadores relacionados com fenótipo odontoblástico. Um aspecto interessante foi a alta especificidade de ação da DMP1, pois outras linhagens celulares não expressaram os genes específicos DMP2 e DSP na sua presença (NARAYANAN et al., 2001).

O papel da DMP1 na transcrição de genes pode estar relacionado com a sua localização eventual no núcleo e é dependente de sua fosforilação. Alguns estudos sugerem que osteoblastos e células precursoras podem sintetizar DMP1 e transportá-lo para o núcleo. No núcleo, DMP1 seria responsável pela transcrição dos genes da matriz envolvidos na formação do tecido mineralizado. Posteriormente, quando os osteoblastos tornam-se polarizados, DMP1 seria fosforilada (NARAYANAN et al., 2003), sendo exportada para a matriz extracelular, onde DMP1 iniciaria a nucleação da hidroxiapatita e regularia a formação do tecido mineralizado (NARAYANAN et al., 2003; HE e GEORGE, 2004).

Além de induzir a transcrição de genes específicos da dentina, a DMP1 pode regular a expressão de proteínas relacionadas com a mineralização. Narayanan et al. (2001) mostraram que o bloqueio da expressão da DMP1 reduziu a expressão da fosfatase alcalina e da osteocalcina, duas proteínas envolvidas na mineralização de muitos tecidos.

Em algumas situações, a DMP1 requer uma interação com colágeno tipo I a fim de influenciar o processo de mineralização. Experimentos de mineralização *in vitro* demonstraram acúmulo preferencial de mineral sobre a superfície do colágeno associado à DMP1. Além disso, tal interação parece regular a velocidade de formação e a estrutura das fibrilas colágenas. Ensaio *in vitro* mostraram um

aumento gradual da fibrinogênese com aumento do diâmetro das fibrilas colágenas na presença de DMP1 (HE e GEORGE, 2004).

Embora o processo de mineralização envolva a participação das fibrilas colágenas (HE e GEORGE, 2004), seu papel no processo é passivo, pois foi demonstrado que a deposição de hidroxiapatita sobre o colágeno só ocorre na presença de nucleadores (SAITO et al., 1997). O colágeno tipo I é o principal componente orgânico da matriz mineralizada do osso e da dentina sendo expressa por células osteoblásticas e odontoblásticas. Sendo o colágeno uma estrutura aparentemente passiva na mineralização, toda atenção tem sido destinada às proteínas não colágenas que interagem com as fibrilas de colágeno nos tecidos mineralizados, dentre as quais, a DMP1.

A interação entre a DMP1 e a fibrila colágena é específica e contribui para a imobilização desta proteína na matriz extracelular após sua secreção, com a ligação acontecendo provavelmente entre a região “gap” das fibrilas colágenas e duas seqüências peptídicas, ³⁴⁹DSESSEEDR³⁵⁷ e ⁴²⁴SEENRSDSDSQDSSR⁴³⁷, situadas na extremidade carboxila da DMP1 (HE e GEORGE, 2004).

Sendo assim, em virtude de seu potencial papel na mineralização dos tecidos baseados em colágeno, seria importante estudar a presença da DMP1 na dentina formada após injúria pulpar, um tecido cuja matriz orgânica é também colágena, elemento pelo qual a DMP1 possui grande afinidade. O estudo da OPN, outra proteína não colágena, nesse tecido também é justificável, pelo fato desta proteína ser detectada nas áreas relacionadas com a coesão e integridade tecidual e estar presente na forma de acúmulos nas interfaces célula-matriz em diferentes tecidos mineralizados. Ainda que a DMP1 e a OPN estejam implicadas na formação dos tecidos mineralizados, não existem estudos indicando a presença destas proteínas na dentina reparativa e sua relação com o aparecimento das células “odontoblast-like”. Ilações sobre o papel das proteínas não colágenas na formação do tecido mineralizado podem ser feitas por inúmeras ferramentas de estudo.

Neste sentido, a imunocitoquímica representa uma técnica de imagem poderosa para correlacionar estrutura com composição. Sua aplicação na análise histológica permite identificar e mapear a distribuição de moléculas específicas em várias matrizes e células. Entre os diferentes métodos disponíveis, a imunocitoquímica pós-inclusão com ouro-coloidal, técnica que permite localizar em alta resolução um elemento marcado em um tecido, tem sido utilizada para

caracterizar a presença e distribuição de moléculas nos tecidos mineralizados de muitos modelos animais (NANCI, 1999).

A imunocitoquímica pós-inclusão com ouro-coloidal é a ferramenta ideal para o estudo do arranjo da matriz extracelular e da organização dos tecidos mineralizados, locais onde moléculas interagem entre si e com elementos inorgânicos e onde proteínas acumulam-se e minerais se depositam para definir o padrão espacial e temporal da formação dos tecidos mineralizados (McKEE e NANCI, 1996c).

De fato, no presente trabalho, a imunocitoquímica pode estabelecer não somente a distribuição das proteínas OPN e DMP1, mas examinar em detalhes sua relação física com as estruturas teciduais características das dentinas formadas após uma injúria pulpar. A compreensão do significado funcional da presença dessas proteínas em regiões específicas da dentina reacional e reparativa pode contribuir para o entendimento dos mecanismos que regulam a mineralização dentinária e o reparo pulpar, sendo importante para geração de estratégias para o tratamento clínico das lesões pulpares.

Com base no exposto, percebe-se que os dados disponíveis sobre a formação dos tecidos dentários e as proteínas colágenas envolvidas não são conclusivos, assim como o comportamento das células do epitélio odontogênico e do complexo dentina-polpa a um trauma não é compreendido. O estudo ultra-estrutural associado a técnicas imunocitoquímicas desses tecidos pode indicar uma possível correlação entre o aspecto morfológico e a composição dos diferentes tipos de dentina formada após trauma dentário, relacionando-a com uma célula secretora específica, além de mostrar o papel das proteínas não colágenas como OPN e DMP1 na formação desses tecidos.

2 PROPOSIÇÃO

A literatura disponível sobre o efeito de estímulos externos na amelogênese e na dentinogênese reacional e reparativa é incompleta e não conclusiva. Além disso, o processo pelo qual o epitélio odontogênico e o complexo dentina-polpa são reparados após um trauma dentário não está completamente entendido. O estudo de tais fenômenos e da participação de componentes da matriz na formação desses tecidos é importante e pode trazer subsídios para a compreensão da formação das células “odontoblast-like” e para a caracterização da dentina reacional e da dentina reparativa, esta com muitas características morfológicas similares ao osso primário, formadas após trauma dentário. Além disso, o estudo da localização das proteínas não colágenas como OPN e DMP1 nessas matrizes dentinárias, pode trazer informações adicionais sobre o papel destas proteínas na formação dos tecidos mineralizados.

Assim, com o propósito de avaliar a dinâmica de deposição das proteínas não colágenas sobre a matriz dos tecidos dentários na odontogênese após um trauma dentário e sua relação com as alterações estruturais observadas nestes tecidos, pretende-se avaliar, através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, a estrutura da matriz dentinária formada após injúria pulpar, e por imunocitoquímica, a presença e a distribuição das proteínas OPN e DMP1 nas dentinas fisiológica, reacional e reparativa formadas após indução de um movimento extrusivo sobre incisivos superiores de ratos, em períodos de tempo determinados, bem como o seu efeito sobre o epitélio odontogênico e o esmalte em formação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios de cuidado aos animais de laboratório (Publicação NIH 85-23, 1985) e autorizados pelo comitê de ética em experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo nº 008/03).

Trinta e cinco ratos *Ratus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*, machos, de dois a três meses de idade e com massa corpórea entre 180 a 250 gramas, oriundos do Biotério do ICB, foram escolhidos por seleção aleatória simples. Os ratos foram nutridos com ração sólida moída (Ração peletizada 20 Kg- Nuvital Agropecuária Ltda), excetuando-se as primeiras vinte e quatro horas após o reimplante, e hidratados *ad libitum*.

Os animais foram divididos em dois grupos. O primeiro (experimental) compreendeu os animais cujo incisivo superior direito foi submetido a um movimento extrusivo de 3 mm, sendo em seguida tais dentes colocados em sua posição original (28 animais). O segundo grupo (controle) foi constituído por dentes cujos incisivos não foram luxados (7 animais).

3.2 Procedimento cirúrgico

Em condições ambientais de temperatura, umidade e luminosidade, os animais foram anestesiados com solução aquosa a 2% de Cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4-H-1,3- tiazina (Rompun®) diluído em Quetamina (Francotar®), via intramuscular, na dosagem de 0,1 ml para cada 100 gramas de massa corpórea.

Após assepsia com polivinilpirrolidona- iodo (Povidine®), a extremidade incisal do incisivo superior direito de cada animal foi desgastada por meio de uma ponta diamantada cilíndrica acoplada a um contra-ângulo (Fig. 1A). A seguir, este dente foi submetido a uma sindesmotomia por meio de um sindesmótomo modificado (Fig. 1B). Em seguida, foi realizada uma extrusão de três milímetros no incisivo superior direito, empregando-se um fórceps nº 151 (Colgram Indústria e Comércio Ltda), previamente adaptado para este fim (Fig. 1C,D). Depois, tal dente foi reposicionado, obedecendo à sua posição original, momento no qual foi realizada uma compressão bidigital do rebordo alveolar.

Após o procedimento cirúrgico, em relação à dieta, os animais receberam apenas água *ad libitum* nas primeiras vinte e quatro horas, sendo, em seguida, adicionalmente alimentados com ração sólida moída por mais sete dias. Depois, esses animais foram nutridos com água e ração sólida peletizada até o seu sacrifício.

3.3 Obtenção da amostra

Os animais foram eutanasiados por “overdose” anestésica após 3, 7, 10, 15, 20, 30 e 60 (quatro animais do grupo experimental e um do grupo controle por período). Depois da eutanásia, a peça foi obtida mediante uma incisão com lâmina de bisturi nº 11 na altura da linha média da maxila a partir de um corte com tesoura cirúrgica de ponta romba, tangenciando a face distal dos molares de forma a permitir a separação da maxila direita da esquerda e a obtenção da peça contendo o incisivo superior direito, a qual foi fixada sob irradiação em microondas em uma solução contendo 2% de glutaraldeído e 2,5% de formaldeído (estudo morfológico) ou em solução de 0,1% de glutaraldeído e 4% de formaldeído (estudo imunocitoquímico), ambas tamponadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4. As soluções de formaldeído foram preparadas a partir do paraformaldeído.

A solução fixadora contendo as amostras foi irradiada em um forno de microondas PELCO 3440 a uma temperatura máxima de 37°C. O recipiente com os espécimes foi colocado no centro de uma cuba preenchida com gelo situada na região fria do forno de microondas, enquanto um béquer contendo 300 ml de água e conectado a um recirculador PELCO 3420 LOAD COOLER foi posicionado na região quente (MASSA e ARANA-CHAVEZ, 2000). Estando o microondas calibrado para a potência máxima, a irradiação foi realizada em três ciclos de cinco minutos. A seguir, o material permaneceu na mesma solução fixadora "overnight" a 4°C. Em seguida, com exceção das peças destinadas ao estudo por microscopia eletrônica de varredura (MEV), os demais espécimes foram desmineralizados em uma solução de ácido etileno diamino tetraacético (EDTA) a 4,13%, também sob irradiação com microondas (ARANA-CHAVEZ e NANJI, 2001).

Figura 1 - A técnica de extrusão dentária compreende: (A) desgaste da extremidade incisal, (B) sindesmotomia, (C) extrusão com fórceps nº 151 modificado e (D) confirmação do deslocamento de 3 mm.

3.4 Processamento para microscopia eletrônica de varredura

Depois da adequada dissecação dos incisivos a partir do osso alveolar, o incisivo direito não desmineralizado de cada grupo foi fraturado de forma paralela ao seu longo eixo. Cada fragmento foi imerso em solução de hipoclorito de sódio 2% colocada em um aparelho de ultra-som (Branson 1210, Danbury, CT, USA) por 30 minutos a fim de remover todo o tecido mole remanescente. As secções foram depois lavadas com água destilada, transferidas para uma solução de etanol 30% e depois desidratadas em concentrações crescentes de etanol. Visando evitar a fratura do material durante a secagem, todas as amostras foram imersas em hexametildisilano (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) por 10 minutos e depois colocadas em uma capela de exaustão para sua evaporação completa. A seguir, os espécimes foram montados sobre um “stub” de alumínio sendo sua superfície pulverizada com ouro em um aparelho Bal-Tec SCD 050 (Bal-Tec SCD 050, Liechtenstein). Os espécimes foram examinados em um microscópio eletrônico de varredura JEOL 6100 (Jeol Ltd, Tokyo, Japan), operado em 10–15 kV.

3.5 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após descalcificação, os espécimes destinados ao estudo morfológico foram pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1% durante duas horas. A desidratação foi realizada a partir da imersão das peças em soluções de concentração crescente de etanol até chegar-se ao etanol absoluto, enquanto a infiltração das amostras foi feita com concentrações crescentes de resina Spurr (morfologia), diluídas em acetona ou com concentrações crescentes de resina L.R. White (imunocitoquímica), diluídas em etanol, a uma temperatura de 4°C. A seguir, cada amostra foi incluída e colocada em estufa por três dias a uma temperatura de 65°C. Após sua polimerização, os blocos foram trimados e cortados em um micrótomo Micron HM 360 (Zeiss®). Assim, foram obtidos cortes semi-finos que foram corados com solução alcoólica de azul de toluidina a 1% e observados ao microscópio de luz, com o intuito de selecionar a área a ser cortada no ultramicrotomo. Os cortes ultrafinos de 80 nm de espessura foram montados em telas de níquel de 200 "meshes". As secções destinadas ao estudo imunocitoquímico foram adicionalmente incubadas com os anticorpos a serem descritos posteriormente.

Depois de montados em uma tela e contrastados por dez minutos em uma solução alcoólica de acetato de uranila a 2% e em outra de citrato de chumbo a 0,5% por mais cinco minutos, as secções foram examinadas e fotografadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100 CX II ou JEOL 1010.

3.6 Imunocitoquímica pós-inclusão com ouro coloidal

Tabela 1- Anticorpos empregados na imunocitoquímica para OPN e DMP1.

Anticorpo	Abreviação	Diluição	Tempo de Incubação	Referências
Anti-osteopontina de rato (Hosp.: galinha)	OPNy	1:150	5 hr	NANCI et al., 1996
Anti-proteína da matriz dentinária-1 de rato (Hosp.: coelho)	DMP-1	1:10	3 hr	MASSA et al., 2005

Os cortes ultrafinos não osmicados foram processados para imunocitoquímica para as proteínas OPN e DMP-1, ambas usando anticorpos e condições resumidas na tabela 1. As telas incubadas com anticorpo obtido na galinha (OPNy) foram incubadas adicionalmente com anticorpo secundário de coelho para IgG de galinha diluído de 1:2000 por uma hora. Independente do anticorpo utilizado, os sítios com reação antígeno-anticorpo foram revelados pela incubação com proteína A-ouro coloidal por trinta minutos. Entre as incubações, as telas foram lavadas e bloqueadas com PBS 0,01M pH 7,2 e solução de ovalbumina a 1% em PBS 0,01M pH 7,2 por 15 minutos, respectivamente. Após incubação com proteína A-ouro coloidal, os espécimes foram irrigados com PBS e água destilada. Como controle das imunomarcações, alguns espécimes do grupo experimental e do grupo controle foram incubados somente com o complexo proteína A-ouro coloidal sem terem sido expostos aos anticorpos primário e secundário. Além disso, os achados foram confirmados pelo fato das incubações das secções ultrafinas com algumas regiões

sabidamente imunoreativas para a proteína OPN não exibirem partículas de ouro no esmalte, na dentina fisiológica e nas mitocôndrias (Fig. 2A) e das secções ultrafinas incubadas com a proteína DMP-1 não mostrarem partículas de ouro no esmalte ou nas mitocôndrias (Fig. 2B).

Figura 2 - Em A, eletromicrografia mostrando matriz de esmalte sem partículas de ouro-coloidal para OPN. 41.670X. Em B, eletromicrografia evidenciando área de junção amelodentinária com imunomarcacão positiva para DMP1 apenas na matriz dentinária. Notar que as partículas de ouro-coloidal (setas) estão presentes apenas na matriz de dentina fisiológica. 28.000X. Me, matriz de esmalte; D, dentina fisiológica.

4 RESULTADOS

Os resultados descrevem as características encontradas em duas áreas distintas dos incisivos luxados em períodos determinados. A primeira região a ser estudada foi a interface dentina-polpa localizada entre 4 e 7 mm a partir da extremidade apical, com especial atenção para a observação ultra-estrutural dos odontoblastos originais remanescentes e das células “odontoblast-like”, bem como suas matrizes correspondentes. O epitélio odontogênico da extremidade mais apical, particularmente a matriz de esmalte e os ameloblastos relacionados, também foram examinados (Fig. 3).

Ainda que alguns vasos sangüíneos dilatados ou pequenas áreas de hemorragias tenham sido observados na polpa dentária, nenhuma área de necrose ou infecção foi detectada neste tecido.

4.1 Morfologia

4.1.1 Esmalte

A resposta do epitélio odontogênico ao trauma extrusivo foi muito variável. Em algumas amostras, o epitélio odontogênico mais apical se degenerou permitindo contato da matriz de esmalte com o ligamento periodontal. Tal matriz foi menos basófila quando comparada com aquela revestida por ameloblastos e situada cervicalmente (Fig. 4A). Enquanto alguns espécimes mostraram uma camada íntegra de ameloblastos com aparente preservação de sua função secretora, em outras amostras, a camada de ameloblastos estava danificada e mostrava alguns ameloblastos degenerados (Fig. 4B). Em outros espécimes, foi observada desorganização do epitélio odontogênico com diminuição do comprimento e perda do alinhamento dos ameloblastos, aumento dos espaços intercelulares e desaparecimento prematuro do estrato intermediário. A observação de acúmulos de matriz basófila semelhante ao esmalte entre a camada de ameloblastos e a camada papilar foi freqüente (Fig. 4C). Mesmo alterados, muitos dos ameloblastos preservaram o processo de Tomes e secretaram uma matriz de espessura irregular e com áreas de maior ou menor basofila (Fig. 4D).

Um achado comum nos cortes semi-finos foi a presença de grupos de células com aspecto granuloso no ligamento periodontal relacionado com epitélio odontogênico nos últimos períodos experimentais. Especialmente nas amostras de

10 ou 20 dias, onde parte do epitélio odontogênico havia sido perdida, áreas similares apresentavam cordões de células epiteliais, algumas delas intensamente basófilas (Fig. 4E). Aos 60 dias, o exame das mesmas regiões mostrou a presença de inúmeros grupos celulares menores, porém com um aspecto granuloso (Fig. 4F). Nesse último período, tais estruturas estavam sempre relacionadas com áreas de esmalte maduro que não estavam revestidas por ameloblastos.

O exame ultra-estrutural desses grupos celulares no período de 60 dias revelou a presença de células com aparência de macrófagos contendo muitas estruturas esféricas de variada elétron-opacidade preenchendo todo o seu citoplasma (Fig.5).

4.1.2 Dentina

Por serem dentes que erupcionam continuamente, onde sua porção apical apresenta células que proliferam e se diferenciam por toda a vida do animal, no incisivo do rato não existe dentina primária ou secundária, mas apenas a dentina fisiológica. Assim, como consequência, o termo dentina fisiológica é empregado para designar a dentina formada antes do trauma, enquanto os termos dentina reacional e dentina reparativa são utilizados para as matrizes formadas por odontoblastos primários ou por outras células da polpa como resposta ao trauma mecânico, respectivamente. As características da matriz dentinária e das células relacionadas com a interface dentina-polpa são descritas a seguir em função dos períodos experimentais.

No primeiro período examinado, 3 dias após a extrusão, a maioria das áreas mostravam a interface dentina-polpa com aspecto normal. Em algumas regiões, entretanto, a camada de odontoblastos mostrou sinais de desorganização e degeneração, enquanto outras zonas mostraram redução do número de células ou desaparecimento da camada odontoblástica (Fig. 6A). Muitas vezes, os odontoblastos em degeneração estavam superpostos a células conjuntivas fusiformes intensamente coradas por azul de toluidina nos cortes semi-finos (Fig. 6B).

Figura 3 - Secção de um incisivo superior do grupo controle evidenciando as áreas avaliadas pelo estudo. Notar a matriz de esmalte e o epitélio odontogênico (Eo) na extremidade mais apical e a matriz de dentina (D) e as células associadas localizadas entre 4 e 7 mm acima da extremidade apical. P, polpa dentária.

Figura 4 - Em A, fotomicrografia mostrando uma região de matriz de esmalte mais apical (asterisco) exposta ao ligamento periodontal. Notar que sua matriz é menos basófila quando comparada com àquela situada cervicalmente e revestida por ameloblastos. 265X. Em B, fotomicrografia evidenciando área de epitélio odontogênico com preservação de sua função secretora e degeneração focal (setas) de alguns ameloblastos. 100X. Em C, fotomicrografia mostrando região de epitélio odontogênico apresentando modificação da morfologia e do arranjo dos ameloblastos. Observar acúmulos basófilos (cabeça de seta) entre a camada de ameloblastos e a camada papilar. 530X. Em D, fotomicrografia mostrando áreas de matriz de esmalte com espessura irregular, com zonas de maior ou menor basofilia, distribuídas por toda a matriz. 530X. Em E, fotomicrografia evidenciando agrupamentos celulares oriundos do epitélio odontogênico e separados do epitélio que reveste o esmalte maduro. Notar uma célula intensamente basófila (seta) do epitélio odontogênico assumindo um aspecto granuloso. 530X. Em F, fotomicrografia mostrando pequenos grupos ou células isoladas (setas) exibindo aspecto granuloso no ligamento periodontal de um espécime, após 60 dias do trauma extrusivo. 265X. Lp, ligamento periodontal; Amel, ameloblastos; Me, matriz de esmalte; E, esmalte mineralizado; D, dentina fisiológica; P, polpa dentária. Azul de toluidina.

Figura 5 - Eletromicrografia mostrando macrófago (Mac) com muitas estruturas esféricas (setas) de variada elétron-opacidade em seu citoplasma, 60 dias após realização do trauma extrusivo. Lp, ligamento periodontal. 4.800X.

Figura 6 - Em A, fotomicrografia mostrando região sem odontoblastos (asterisco) com exposição da superfície dentinária ao tecido pulpar ao lado de uma interface dentina-polpa revestida por odontoblastos originais exibindo aspecto morfológico normal, 3 dias após a indução da extrusão. 265X. Em B, fotomicrografia evidenciando uma zona onde os odontoblastos em degeneração (seta) estavam superpostos a células conjuntivas fusiformes (cabeça de seta) intensamente coradas por azul de toluidina, 3 dias após a injúria pulpar. 350X. D, dentina fisiológica; O, odontoblastos originais; P, polpa dentária. Azul de toluidina.

O exame ultra-estrutural dessas áreas mostrou células arredondadas de citoplasma elétron-opaco com retículo endoplasmático bem desenvolvido que se relacionavam com células fusiformes, talvez odontoblastos originais (Fig. 7A). Essas áreas quando examinadas tardiamente, apresentavam células semelhantes a macrófagos contendo estruturas de variada elétron-opacidade em seu citoplasma, compatível com corpos apoptóticos fagocitados (Fig. 7B).

Nas áreas de dentina exposta, ou seja, nas regiões em que os odontoblastos originais foram destruídos, foi observado o aparecimento de células conjuntivas de morfologia variada sobre a dentina fisiológica, algumas delas com organelas de síntese desenvolvidas e associadas a uma camada semelhante a uma pré-dentina (Fig. 8A). Outras células eram imaturas, possuíam retículo endoplasmático pouco desenvolvido e não estavam associadas a uma camada de pré-dentina (Fig. 8B). Em outras áreas, foi observada uma camada de células semelhantes aos osteoblastos, dotadas de delgados prolongamentos citoplasmáticos, os quais se insinuavam para uma matriz bastante irregular de pré-dentina (Fig. 8C). A análise em detalhes de sua estrutura permitiu observar a presença de um citoplasma escasso com poucas organelas de síntese, mas junções celulares bem definidas (Fig. 8D).

Em algumas regiões, os odontoblastos originais não se degeneraram e iniciaram deposição abrupta de matriz de pré-dentina que envolveu hemácias, possivelmente liberadas de vasos sangüíneos rompidos durante o movimento extrusivo (Fig. 9).

Decorridos 7 dias do trauma extrusivo, as superfícies dentinárias estavam revestidas por células colunares altas que se alternavam com células de morfologia variável (Fig. 10). A análise ultra-estrutural das células colunares altas mostrou retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, além de prolongamentos desprovidos de organelas que se insinuavam para a matriz. Apesar do amplo espaço intercelular, tais células estavam relacionadas entre si por meio de inúmeras junções celulares (Fig. 11A) do tipo “gap” (Fig. 11B e Fig 12A) e de adesão (Fig. 12B), as quais estavam também presentes entre o pólo basal dessas células e as células da região perivascular (Fig. 12C).

Algumas células de morfologia variável eram cúbicas, com cisternas bem dilatadas do retículo endoplasmático rugoso e relacionavam-se com as células vizinhas por meio de junções celulares. A matriz de pré-dentina associada com essas células tinha uma estrutura irregular com fibrilas colágenas dispostas em

diversas direções (Fig. 13). Em algumas áreas dessa pré-dentina, grupos de fibrilas colágenas paralelas foram depositados em torno de áreas contendo vários prolongamentos celulares (Fig. 14A). Esse arranjo proporcionou a formação de grandes espaços interfibrilares (Fig. 14B). Na interface desse tecido com a polpa dentária, foram observadas células com vários prolongamentos celulares que se insinuavam para a dentina se ramificando profusamente no interior da matriz (Fig. 14C).

Muitas células colunares baixas exibiram deslocamento do núcleo do pólo basal para o apical. Algumas dessas células perderam o contato com a camada de células adjacentes (Fig. 15A) e tornaram-se completamente envolvidas pela matriz, com o avanço da secreção. Em outros casos, células tornaram-se inclusas na interface entre dentina reacional e dentina reparativa que estavam sendo formadas simultaneamente (Fig. 15B). O estudo ultra-estrutural das células com inversão de polaridade mostrou que o retículo endoplasmático rugoso e a maior parte das mitocôndrias estavam localizados no pólo basal, região destinada originalmente ao núcleo (Fig. 16).

Decorridos 10 dias depois da extrusão, em algumas áreas, houve deposição de uma matriz de dentina atubular de espessura suficiente para ser identificada nos cortes semi-finos corados por azul de toluidina. Tal matriz esteve revestida por uma camada única de células cubóides ou colunares baixas, correspondendo, portanto, a uma dentina reparativa. Ao seu lado, existiam áreas adjacentes de dentina mais organizada, com acentuado desvio dos túbulos dentinários e revestidas por uma camada pseudo-estratificada de odontoblastos originais, correspondendo à dentina reacional. Em geral, a espessura da dentina reacional foi sempre maior àquela observada na dentina reparativa em uma mesma secção (Fig. 17). No estudo ultra-estrutural, a interface entre as dentinas fisiológica e reparativa não foi muito nítida. Sua identificação foi possível em virtude da ausência dos túbulos dentinários e do arranjo aleatório dos grupos de fibrilas colágenas na matriz de dentina reparativa (Fig. 18A), além da presença de inclusões celulares e de células cubóides em sua interface com a polpa dentária (Fig. 18B). Em geral, as células inclusas apresentavam um citoplasma escasso com reduzido número de organelas citoplasmáticas, sendo muitos semelhantes aos osteócitos (Fig. 18C).

Figura 7 - Em A, eletromicrografia mostrando uma célula conjuntiva (Cc) arredondada e intensamente elétron-opaca com retículo endoplasmático bem desenvolvido, próxima aos odontoblastos originais, 3 dias após indução do trauma extrusivo. 6750X. Em B, após 7 dias, eletromicrografia mostrando áreas similares evidenciando macrófagos (Mac) com estruturas de variada elétron opacidade (setas) em seu citoplasma, compatível com corpos apoptóticos fagocitados. Notar relação próxima entre os macrófagos e células conjuntivas com inúmeras mitocôndrias e um retículo endoplasmático relativamente desenvolvido. 5100X. O, odontoblasto primário.

Figura 8 - Em A, eletromicrografia mostrando área de pré-dentina associada a uma célula com retículo endoplasmático bem desenvolvido, 3 dias após indução da força extrusiva. 4250X. Em B, eletromicrografia evidenciando célula de aspecto imaturo, com raras cisternas de retículo endoplasmático associada à matriz de dentina. Observar que não existe camada de pré-dentina, 3 dias após indução da força extrusiva. 5400X. Em C, eletromicrografia mostrando uma camada simples de células semelhantes ao osteoblasto, dotadas de prolongamentos citoplasmáticos, os quais se insinuam para uma matriz bastante irregular de pré-dentina, 3 dias após indução da força extrusiva 2900X. Em D, eletromicrografia mostrando uma imagem ampliada da região avaliada em C, indicando que tais células possuem citoplasma escasso, raras organelas de síntese, mas junções celulares bem definidas (setas). 11.250X. D, dentina fisiológica; Pr, pré-dentina.

Figura 9 - Eletromicrografia mostrando incorporação de hemácias (setas) pela matriz dentinária por células colunares com grande quantidade de cisternas de retículo endoplasmático, semelhantes aos odontoblastos originais (O), 3 dias após indução da injúria pulpar. D, dentina fisiológica; P, polpa dentária. 2.400X.

Figura 10 - Fotomicrografia mostrando superfícies dentinárias revestidas por odontoblastos colunares (O) que se alternavam com células de morfologia irregular (Ci), 7 dias após a indução da extrusão. 350X. D, dentina fisiológica; P, polpa dentária. Azul de toluidina.

Figura 11 - Em A, eletromicrografia mostrando área regular de pré-dentina margeada por odontoblastos originais remanescentes. Notar a presença de amplos espaços e de inúmeras junções celulares (setas) entre essas células, 7 dias após realização da extrusão dentária. 2900X. Em B, ampliação de uma região da eletromicrografia anterior mostra uma junção “gap” (setas) entre os dois odontoblastos, 7 dias após realização da extrusão dentária. 17.100X. D, dentina fisiológica; Pr, pré-dentina; O, odontoblasto original; P, polpa dentária.

Figura 12 - Em A, eletromicrografia mostrando uma junção “gap” (setas) bem desenvolvida entre os pólos apicais de dois odontoblastos originais, 7 dias após extrusão dentária. 33.000X. Em B, eletromicrografia evidenciando inúmeras junções de adesão (setas) entre dois odontoblastos originais, 7 dias após extrusão dentária. 24.000X. Em C, eletromicrografia mostrando a existência de junções celulares (setas) entre o pólo basal de alguns de alguns odontoblastos originais e células das regiões perivasculares (Cpv), 7 dias após indução da extrusão dentária. 6750X. O, odontoblasto original; V, vaso sangüíneo.

Figura 13 - Eletromicrografia mostrando célula cúbica, com cisternas do retículo endoplasmático dilatadas, similar ao osteoblasto, relacionada com o aparecimento de uma matriz de dentina de aspecto irregular com fibrilas colágenas dispostas irregularmente (asterisco), 7 dias após indução da injúria pulpar. Notar a presença de junções celulares entre essa e outra célula (seta). Dp, dentina reparativa; Ol, célula "odontoblast-like". 12.500X.

Figura 14 - Em A, eletromicrografia mostrando região de pré-dentina onde fibrilas colágenas se distribuem em torno de vários prolongamentos citoplasmáticos, 7 dias após indução da injúria pulpar. 15.000X. Em B, eletromicrografia demonstrando prolongamentos celulares em secção transversal envolvidos por alguns feixes de fibrilas colágenas na pré-dentina, 7 dias após realização da extrusão. Notar a formação de grandes espaços interfibrilares (asterisco). 33.000X. Em C, eletromicrografia mostrando a interface da dentina com a polpa dentária onde inúmeros prolongamentos celulares que se insinuam para a dentina, 7 dias após realização da injúria pulpar. 12.000X. Pr, pré-dentina; Pc, Prolongamentos citoplasmáticos.

Figura 15 - Em A, fotomicrografia mostrando a camada de células “odontoblast-like” com núcleo situado no pólo apical (seta), 7 dias após indução da injúria pulpar. Notar que as tais células se desnivelam das demais células vizinhas, porque diminuem seu recuo em direção ao tecido pulpar à medida que secretam matriz. 350X. Em B, fotomicrografia evidenciando regiões onde matrizes de dentina reacional e reparativa estão sendo formadas lado a lado, 7 dias após realização do trauma dentário. Observar a inclusão de uma célula na interface entre dentina reacional e dentina reparativa (cabeça de seta). 350X. D, dentina fisiológica; Dc, dentina reacional; Dp, dentina reparativa; O, odontoblasto original; Ol, células “odontoblast-like”; P, polpa dentária. Azul de toluidina.

Figura 16 - Eletromicrografia mostrando uma célula “odontoblast-like” com núcleo situado no pólo apical (setas), 7 dias após indução da injúria pulpar. Notar que retículo endoplasmático rugoso e a maior parte das mitocôndrias estão localizados no seu pólo basal, região destinada originalmente ao núcleo. 3.100X. D, dentina fisiológica; Dp, dentina reparativa; Ol, células “odontoblast-like”.

Figura 17 - Fotomicrografia mostrando área de matriz atubular e revestida por uma camada de células cubóides ou colunares baixas correspondendo a uma dentina reparativa sendo formada ao lado de uma matriz de dentina mais organizada, com acentuado desvio dos túbulos dentinários (setas) e revestida por uma camada pseudo-estratificada de odontoblastos originais, correspondendo à dentina reacional, 10 dias após a indução da extrusão dentária. Notar que a espessura da dentina reacional é maior do que aquela observada na dentina reparativa na mesma secção. 530X. D, dentina fisiológica; Dc, dentina reacional; Dp, dentina reparativa; O, odontoblasto original; Ol, células “odontoblast-like”; P, polpa dentária. Azul de toluidina.

Figura 18 - Em A, eletromicrografia mostrando interface entre as dentinas fisiológica e reparativa, 10 dias após realização da injúria pulpar. Notar o arranjo aleatório dos grupos de fibrilas colágenas (setas) e o desaparecimento abrupto dos túbulos dentinários na dentina reparativa. 2.400X. Em B, eletromicrografia evidenciando camada de células cubóides semelhantes aos osteoblastos revestindo uma matriz de dentina reparativa com inclusões celulares (setas), 10 dias após indução da extrusão dentária. 3.600X. Em C, eletromicrografia mostrando uma célula inclusa com citoplasma escasso, muito similar a um osteócito (setas). 3500X. D, dentina fisiológica; Dp, dentina reparativa; Ol, célula “odontoblast-like”.

Decorridos 15, 20 e 30 dias da extrusão, as áreas de dentina e suas células relacionadas foram similares às aquelas encontradas nos períodos iniciais, exceto pela maior espessura de ambas e pela modificação do aspecto da matriz de dentina reparativa. Após o período experimental de 20 dias, muitas vezes, a matriz de dentina reparativa mais próxima da interface dentina-polpa era mais organizada, inclusive com túbulos dentinários e sem inclusões celulares, quando comparada com aquela produzida imediatamente após aparecimento das células “odontoblast-like” (Fig. 19). Além disso, como observado em MEV, alguns espécimes mostraram a presença simultânea de dentina fisiológica, dentina reacional e dentina reparativa (Fig. 20A). Algumas vezes, o limite entre a dentina fisiológica e a dentina reacional estava bem demarcado. Quando comparada com a dentina reacional, a dentina reparativa sempre foi a mais próxima da interface polpa-dentina (Fig. 20B). Nessas amostras, o aspecto da dentina reparativa foi bastante irregular, com muitos espaços vazios em sua matriz, similar ao osso primário (Fig. 20C), enquanto a dentina reacional foi semelhante à dentina fisiológica (Fig. 20D).

Aos 60 dias, houve deposição contínua das dentinas reacional e reparativa, o que resultou na obliteração completa do canal pulpar (Fig. 21).

4.2 Imunocitoquímica

A imunolocalização de OPN e DMP1 foi realizada nos períodos mais representativos. Nessas amostras, as imunomarcações para ambas as proteínas foram específicas e eventualmente variaram de acordo com o período estudado.

4.2.1 Osteopontina

Decorridos 3 dias da extrusão dentária, a matriz da dentina fisiológica não mostrou imunomarcção positiva para a OPN, mas esta proteína foi observada no citoplasma dos odontoblastos originais. Nessas células, as partículas de ouro-coloidal estavam distribuídas difusamente na região perinuclear (Fig. 22A,B) ou na forma de acúmulos no interior de estruturas arredondadas e fracamente elétrono-opacas situadas no seu citoplasma (Fig. 22C).

Figura 19 - Fotomicrografia evidenciando as diferenças morfológicas entre a matriz de dentina reparativa produzida nos períodos iniciais e aquela secretada no período experimental de 20 dias. Notar a ausência de inclusões celulares e o aspecto tubular da matriz mais próxima da interface dentina-polpa (setas). 530X. D, dentina fisiológica; Dp, dentina reparativa; Ol, células “odontoblast-like”. Azul de toluidina.

Figura 20 - Em A, eletromicrografia mostrando regiões com os três tipos de dentina, fisiológica, reacional e reparativa, 30 dias após indução da injúria pulpar. 984X. Em B, eletromicrografia evidenciando outra área com os três tipos de dentina, fisiológica, reacional e reparativa, 30 dias após realização do trauma dentário. 3.500X. Em C, eletromicrografia mostrando uma área ampliada da figura B, evidenciando a presença de espaços vazios amplos correspondendo *in vivo* às lacunas onde as células inclusas estão situadas. 7000X. Em D, eletromicrografia evidenciando a presença de túbulos dentinários (setas) na dentina reacional. 4500X. Notar diferença entre as dentinas reacional e reparativa. D, dentina fisiológica; Dc, dentina reacional; Dp, dentina reparativa.

Figura 21 - Secções do incisivo superior mostrando obliteração completa do condutor pulpar (setas) pela deposição de dentina, 60 dias após indução da extrusão dentária. E, esmalte; Os, osso alveolar.

Figura 22 - Em A, eletromicrografia mostrando um odontoblasto original adjacente à dentina fisiológica, 3 dias após realização da extrusão dentária. Observar sua forma colunar típica, núcleo no pólo basal e retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos. 13.100X. Em B, uma imagem em maior aumento do citoplasma do odontoblasto original permite observar imunodeteção de OPN (setas) na região de Golgi. Notar que as mitocôndrias (m) não mostram partículas de ouro no seu interior, confirmando a especificidade da reação imunocitoquímica. 24.450X. Em C, eletromicrografia demonstrando a presença de acúmulos de OPN (setas) no interior de estruturas arredondadas e fracamente elétron-opacas na região perinuclear do citoplasma de um odontoblasto original, 3 dias após realização da extrusão dentária. 50.000X. O, odontoblasto original.

Aos 7 dias, iniciou-se a formação de matriz de dentina reparativa que foi imunoreativa para OPN. Ainda que a OPN estivesse presente em toda a matriz, tal proteína estava presente marcadamente na matriz adjacente aos prolongamentos citoplasmáticos na dentina reparativa (Fig. 23A). A análise criteriosa em maior aumento dos prolongamentos citoplasmáticos permitiu observar um maior acúmulo de OPN sobre uma linha elétron-opaca na matriz dentinária que os delimitava (Fig. 23B). Em outras regiões, a OPN acumulava-se especialmente na matriz que delimitava espaços vazios de aspectos arredondados, provavelmente formados pela degeneração dos prolongamentos das células inclusas (Fig. 23C). Curiosamente, a matriz de dentina que envolvia hemácias não mostrou acúmulos de partículas de ouro-coloidal para OPN (Não mostrado).

Aos 10 dias, a distribuição da OPN pela matriz acompanhou o padrão descrito para o período experimental de 7 dias. Na matriz de dentina reparativa relacionada com as inclusões celulares, a OPN estava presente na forma de acúmulos ou distribuída difusamente, mas sempre demarcando o limite entre a matriz e a lacuna da célula inclusa (Fig. 24 A,B).

Nos demais períodos experimentais, o padrão de imunomarcacão para a OPN foi similar àquele encontrado nos tempos iniciais.

4.2.2 Proteína da matriz dentinária 1

Três dias após extrusão, as partículas de ouro-coloidal para DMP1 estavam distribuídas difusamente pela matriz da dentina fisiológica.

A matriz de dentina reparativa observada no período de 7 dias foi imunoreativa para DMP1. A análise da interface entre a dentina reparativa e sua pré-dentina permitiu observar uma menor concentração de DMP1 nesta última em comparação com a dentina em mineralização (Fig. 25A). Na dentina reparativa, as partículas de ouro-coloidal para DMP1 estavam sempre localizadas sobre as fibrilas colágenas seccionadas longitudinalmente. Em geral, regiões interfibrilares e as fibrilas colágenas seccionadas em sentido transversal não mostraram imunomarcacão para DMP1 (Fig. 25B).

Figura 23 - Em A, eletromicrografia evidenciando partículas de ouro coloidal para OPN distribuídas sobre a matriz de dentina reparativa, 7 dias após realização da injúria pulpar. Observar maior acúmulo de OPN na matriz adjacente aos prolongamentos citoplasmáticos (setas). 27.500X. Em B, uma imagem em maior aumento da secção transversal de um prolongamento citoplasmático incluso na matriz de dentina reparativa, 7 dias após indução da extrusão dentária. Notar maior acúmulo de OPN em uma linha elétron-opaca (setas) que envolve o prolongamento. 32.500X. Em C, eletromicrografia mostrando acúmulos de OPN (setas) sobre a matriz que delimita espaços vazios de aspectos arredondados, formados provavelmente pela degeneração de alguns prolongamentos, 7 dias após indução da extrusão dentária. 37.500X. Dp, dentina reparativa; Pc, prolongamentos citoplasmáticos.

Figura 24 - Em A, eletromicrografia mostrando acúmulos de OPN (setas) sobre a matriz adjacente a uma célula inclusa, 10 dias após realização da extrusão dentária. 30.000X. Em B, eletromicrografia evidenciando a imunodeteção de OPN (setas) sobre a matriz que delimita uma célula inclusa, 10 dias após indução da extrusão dentária. 41.700X. Dp, dentina reparativa; Ol, célula “odontoblast-like”.

Figura 25 - Em A, eletromicrografia mostrando uma matriz de dentina reparativa imunoreativa para DMP1, 7 dias após indução da extrusão dentária. 11.400X. Em B, eletromicrografia de uma área da figura anterior evidenciando a diferença de concentração de partículas de ouro-coloidal para DMP1 (setas) entre áreas com maior e menor concentração de fibrilas colágenas, 7 dias após realização da injúria pulpar. A área de menor concentração de fibrilas colágenas está situada na interface polpa-dentina e corresponde a pré-dentina. 46.700X. Pr, pré-dentina; Dp, dentina reparativa.

Acima dessa região e próxima à dentina fisiológica, a dentina reparativa mostrava inclusões celulares envolvidas por matriz dentinária, cujas fibrilas colágenas dispostas em fibras mostravam intensa imunoreatividade DMP1, particularmente na faixa escura de suas estriações transversais. A DMP1 não foi imunodetectada no núcleo ou citoplasma das células inclusas (Fig. 26).

Decorridos 10 dias do trauma, a observação de amostras contendo quantidades significativas de dentina reacional e reparativa permitiu o estudo da distribuição da DMP1 nas dentinas fisiológica, reacional e reparativa. De forma geral, a DMP1 estava distribuída de forma difusa nesses tecidos, com maior imunomarcção positiva sendo observada sempre nas áreas de grande concentração de fibrilas colágenas nas suas matrizes, principalmente na dentina reparativa. A matriz adjacente aos prolongamentos citoplasmáticos nos três tipos de dentina não mostrou acúmulos de partículas de ouro-coloidal específicas para DMP1 (Fig. 27 A,B,C).

Nos demais períodos experimentais, o padrão de imunomarcção para DMP1 foi similar ao período de 10 dias. As células cúbicas ou cilíndricas altas situadas na periferia da dentina reparativa mostraram fraca marcação intracelular positiva para DMP1. Nessas células, uma pequena quantidade de partículas de ouro para DMP1 estava presente no núcleo (Fig. 28).

Um aspecto interessante foi a diferença de imunolocalização das proteínas OPN e DMP1 na matriz de dentina reparativa, particularmente nas proximidades dos prolongamentos celulares. A OPN se acumulou na matriz circunscrita aos prolongamentos citoplasmáticos das células “odontoblast-like” (Fig.29A), enquanto a DMP1 foi imunodetectada em áreas de grande concentração de fibrilas colágenas (Fig.29B).

Figura 26 - Em A, eletromicrografia mostrando imunodeteção positiva para DMP1 na matriz de dentina reparativa, 7 dias após indução da extrusão dentária. Observar afinidade das partículas de ouro-coloidal para DMP1 (setas) pelas fibrilas colágenas que formam fibras colágenas. Notar também ausência de imunodeteção de DMP1 no núcleo ou citoplasma das células inclusas. 30.000X. O detalhe evidencia a afinidade entre a DMP1 e a faixa escura das estriações transversais das fibrilas colágenas (setas). 83.300X. Ol, célula “odontoblast-like”; Fb, fibra colágena.

Figura 27 - Em A, eletromicrografia demonstrando partículas de ouro coloidal para DMP1 distribuídas sobre a matriz de dentina fisiológica, 7 dias após indução da extrusão dentária. 30.300X. Em B, eletromicrografia evidenciando a imunodeteção de DMP1 na matriz de dentina reacional, 7 dias após realização do trauma dentário. 32.700X. Em C, eletromicrografia mostrando região de dentina reparativa imunoreativa para DMP1, 7 dias após realização da extrusão dentária. Notar grande afinidade das partículas de ouro-coloidal para DMP1 pelas fibrilas colágenas (setas). 35.600X.

Figura 28 - Eletromicrografia mostrando imunodeteção de DMP1 em uma célula “odontoblast-like”, 7 dias após indução da extrusão dentária. Notar pequena deposição de partículas de ouro-coloidal (setas) no núcleo (n). Também observar a ausência de imunomarcagem para DMP1 nas mitocôndrias (m), revelando a especificidade da reação. 54.000X.

Figura 29 - Em A, eletromicrografia evidenciando a imunodeteccção de OPN em uma área de dentina reparativa (setas), 7 dias após realização da injúria pulpar. 30.000X. Em B, eletromicrografia mostrando presença de partículas de ouro-coloidal para DMP1 na matriz de dentina reparativa (setas), 7 dias após indução da extrusão dentária. Notar diferença de imunolocalização das proteínas OPN e DMP1 na matriz de dentina reparativa, particularmente nas proximidades dos prolongamentos celulares (Pc). 21.600X.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a extrusão do incisivo superior do rato afetou o complexo dentina-polpa, levando à formação de quantidades variáveis de dentina reacional e reparativa, as quais evoluíram frequentemente para obliteração do conduto pulpar nos períodos mais tardios. A avaliação desses tecidos pela técnica de imunocitoquímica para as proteínas OPN e DMP1 mostrou que a presença e distribuição destas proteínas variaram de acordo com o tipo de dentina. A dentina reparativa, por exemplo, foi imunoreativa para OPN, uma proteína não colágena abundante na matriz óssea, mas usualmente não imunodetectada na dentina fisiológica. A DMP1 foi imunodetectada na matriz mineralizada de todos os tipos de dentina fisiológica, reacional e reparativa, mostrando-se associada com as fibrilas colágenas.

A formação da dentina após injúria pulpar tem sido exaustivamente estudada pelo preparo cavitário com instrumentos rotatórios com o objetivo de expor a polpa dentária seguida pela aplicação de substâncias nas cavidades (SMITH et al., 1994; GOLDBERG et al., 2001). Embora grande parte do conhecimento sobre dentinogênese terciária tenha sido adquirida por meio desse modelo, seu emprego inclui muitas variáveis clínicas para o estudo da formação da dentina reparativa e dos eventos de diferenciação das células “odontoblast-like”. Essas incluem inflamação decorrente do trauma mecânico e dos agentes capeador e restaurador, contaminação bacteriana, hemorragia e lançamento de detritos dentinários para a polpa dentária durante exposição pulpar (TZIAFAS, 1994).

A indução de traumas sobre o incisivo de crescimento contínuo é um modelo interessante para o estudo da interação entre a matriz dentinária e as células pulpares com conseqüente formação das células “odontoblast-like”. Nesse modelo, um novo tecido duro é formado como resultado do rompimento do feixe vâsculo-nervoso pela realização de uma extrusão de 3 mm do incisivo superior do rato, o que foi confirmado pelo acúmulo de hemácias em algumas áreas do tecido pulpar e na região periapical.

Em comparação com o capeamento pulpar, o presente modelo apresenta algumas vantagens para a investigação do tipo de dentina produzido após trauma, dentre eles, o de introduzir um trauma à polpa dentária sem expô-la à cavidade oral. Assim, as complicações produzidas por agressões químicas, por inflamação e por contaminação bacteriana podem ser evitadas. Além disso, as reações pós-traumáticas provocadas no rato são rápidas quando comparadas com as reações

que ocorrem em dentes humanos, permitindo a observação dos estágios do reparo pulpar num curto período de tempo (SPAHR et al., 2002).

O presente modelo, embora tenha sido útil para o estudo da dentina formada após o trauma, não foi adequado para a avaliação da amelogenese, isto é, da matriz de esmalte e o epitélio odontogênico relacionados com a face vestibular do incisivo superior. A resposta do epitélio odontogênico ao trauma foi variável e compreendeu tanto espécimes cujos ameloblastos foram preservados morfológica e funcionalmente, como amostras que mostraram desorganização do epitélio odontogênico com diminuição da altura, aumento dos espaços intercelulares e alteração do alinhamento característico dos ameloblastos, além da formação de uma matriz de esmalte de aspecto irregular. Em algumas amostras, o epitélio odontogênico mais apical se degenerou permitindo contato do ligamento periodontal com a matriz de esmalte, a qual se tornou menos basófila, provavelmente pela perda da proteção efetuada pelo epitélio odontogênico. Assim, a análise do efeito do trauma extrusivo sobre o epitélio odontogênico e a matriz de esmalte não foi conclusiva, visto que tais tecidos não mostraram um padrão uniforme de resposta à injúria tecidual.

Outro achado foi a observação em cortes semi-finos de grupos de células de aspecto granuloso no ligamento periodontal relacionado com a face vestibular do incisivo. A análise ultra-estrutural mostrou que tais grupos pareciam macrófagos contendo elementos fagocitados de variada elétron-opacidade com aparência de corpos apoptóticos em seu citoplasma. Tais estruturas de aspecto granuloso sempre se relacionavam com esmalte mineralizado e exposto ao ligamento periodontal pela ausência do epitélio odontogênico. É possível, portanto que tais macrófagos estivessem fagocitando os corpos apoptóticos oriundos da fragmentação do epitélio odontogênico induzida por trauma, por um mecanismo similar à apoptose observada durante a formação dos restos epiteliais de Malassez após formação radicular dos molares (CERRI et al., 2000; CERRI e KATCHBURIAN, 2005).

No presente estudo, a avaliação da resposta pulpar à injúria se restringiu a região localizada entre quatro e sete milímetros a partir da extremidade apical. A extremidade mais apical não foi estudada, porque, sendo um dente de crescimento contínuo, tal área corresponde mais a uma papila dentária do que a uma polpa dentária. A dentina da extremidade incisal também não foi avaliada em virtude de

normalmente haver deposição de dentina em resposta ao seu desgaste contínuo durante a mastigação, um fenômeno observado tipicamente em roedores.

O estudo da interface dentina-polpa nos períodos iniciais mostrou grupos de odontoblastos originais sadios e outros com sinais de degeneração nas proximidades da dentina fisiológica. O estudo imunocitoquímico dessas células demonstrou positividade para OPN na região perinuclear do odontoblasto original. Baseado em evidências que indicam que a OPN pode ser um fator que aumenta resistência da célula a uma injúria, inclusive protegendo-a da apoptose (DENHARDT et al., 1995; SCATENA et al., 1998; MAZZALI et al., 2002), sugere-se que sua expressão nos odontoblastos originais, faça parte de um mecanismo de defesa contra o trauma. Em adição, a OPN poderia minimizar os efeitos danosos do influxo de cálcio observados após perda da integridade da membrana plasmática nos odontoblastos injuriados ou reduzir a concentração de oxidantes potencialmente danosos formados durante uma hipóxia (DENHARDT et al., 2001). A presença de células semelhantes a macrófagos contendo corpos apoptóticos fagocitados, provavelmente odontoblastos, nos mesmos períodos indica que a capacidade de proteção da OPN é parcial ou depende da intensidade da injúria. Além disso, baseado na evidência de que a OPN não é usualmente imunodetectada no citoplasma dos odontoblastos originais em repouso, pode-se sugerir que, após a injúria pulpar, a sua presença intracelular seja requerida para a ativação dos odontoblastos originais e secreção da dentina reacional. Tem sido relatado que odontoblastos originais mostram OPN em seu citoplasma quando estão iniciando sua atividade secretória, ainda que esta proteína não seja imunodetectada na dentina fisiológica adjacente (ARANA-CHAVEZ e NANJI, 2001). Nos odontoblastos originais, acúmulos de OPN também foram observados no interior de estruturas arredondadas e elétron-opacas. Considerando tais estruturas como lisossomos, a presença de OPN no citoplasma dos odontoblastos originais pode indicar a sua remoção após ativação da atividade secretora.

Decorridos 7 dias da extrusão, células conjuntivas irregulares invadiram a região, interagiram com a matriz dentinária exposta e iniciaram sua diferenciação em células “odontoblast-like”. A habilidade do complexo dentina-polpa injuriado de produzir uma nova geração de células “odontoblast-like” capazes de secretar dentina sugere a existência de uma população celular com propriedades similares àquelas da papila dentária na odontogênese (TÉCLÉS et al., 2005). Embora o conhecimento

sobre recrutamento e migração dessas células para o local da injúria seja muito pequeno, sabe-se que a formação da dentina terciária tem sido associada com aumento da permeabilidade dentinária pela diminuição da espessura dentinária ou exposição pulpar (SMITH et al., 1995; SMITH et al., 2001; SMITH, 2003). Sendo assim, como explicar a formação de dentina reparativa por uma nova geração de células “odontoblast-like” observada no nosso trabalho, onde a injúria foi provocada por trauma?

Sendo a polpa dentária um tecido muito vascularizado, a formação de dentina reparativa pode ter sido estimulada pela lesão dos vasos sangüíneos pulpares (MATHIEU et al., 2005). A observação de uma grande concentração celular em torno dos vasos sangüíneos da região sub-odontoblástica em muitos espécimes do grupo experimental reforça a sua participação nesse processo. As células formando grupos condensados na área perivascular da polpa dentária injuriada podem ser pericitos ou células-tronco (SLOAN e SMITH, 2007). Pericitos estão associados aos capilares e estão relacionados com a substituição das células musculares lisas, dentre outras. Células-tronco situadas na região perivascular podem ser células migratórias, oriundas da corrente sangüínea, não sendo, portanto derivadas de um grupo específico no tecido pulpar (GOLDBERG et al., 2003). É possível que o acúmulo dessas células nessa região seja mediado por células endoteliais injuriadas fisicamente ou submetidas à hipóxia durante a extrusão. Sua ação se daria pela liberação de fatores que, além de favorecer seu acúmulo, podem estimular sua migração para superfície dentinária e diferenciação em células “odontoblast-like”. Na literatura, está bem estabelecido que células endoteliais injuriadas liberam fatores capazes de recrutar células progenitoras e inflamatórias durante um processo de reparo (MARTIN, 1997). Tais fatores poderiam interagir com receptores específicos na superfície de algumas células pulpares ativando vias intracelulares que regulam a expressão gênica e influenciam a proliferação, migração e diferenciação celular. Um estudo, por exemplo, mostrou células pulpares migrando em resposta a injúria vascular (MATHIEU et al., 2005). Adicionalmente as células endoteliais poderiam liberar moléculas que estimulariam a capacidade secretora dos odontoblastos originais com formação da dentina reacional. Tais moléculas podem estar se difundindo pelas inúmeras junções “gap” bem desenvolvidas observadas em nosso estudo entre os odontoblastos originais e as células da região perivascular. Inúmeras junções “gap” e junções de adesão também foram observadas entre as células

“odontoblast-like” e podem estar envolvidas na integração da nova camada odontoblástica para a formação de uma dentina similar à dentina fisiológica (ARANA-CHAVEZ e MASSA, 2004).

Alguns estudos têm sugerido que moléculas bioativas transportadas do meio externo para o tecido pulpar pelos túbulos dentinários ou liberadas a partir da matriz dentinária podem estimular a formação de dentina reparativa (SMITH et al., 1995; SMITH et al., 2001; SMITH, 2003; SLOAN e SMITH, 2007). Na odontogênese, durante a interação ecto-mesenquimal, moléculas bioativas formadas e imobilizadas na membrana basal controlam temporal e espacialmente a diferenciação dos odontoblastos originais (LESOT et al., 2001). Ainda na odontogênese, a matriz da dentina primária pode desempenhar um papel similar incorporando moléculas que, quando expostas, podem induzir a formação das células “odontoblast-like” após destruição da primeira geração de odontoblastos (ABOUT e MITSIADES, 2001; MAGLOIRE et al., 2001; GOLDBERG et al., 2003; SMITH, 2003). É possível que tais moléculas sejam liberadas pelos odontoblastos injuriados, células pulpares ou células inflamatórias, visto que a formação de dentina na ausência de exposição pulpar ou cárie observada no presente trabalho demonstrou que a difusão de tais moléculas via túbulo dentinário não é imprescindível para a formação de tecido mineralizado após injúria pulpar como sugeriram Magloire et al. (2001).

Uma dessas moléculas pode ser o TGF- β , pois membros de sua família tem sido envolvidos na diferenciação celular (RUCH et al., 1995; GOLDBERG et al., 2003) e secreção de matriz pelos pré-odontoblastos ou odontoblastos (MAGLOIRE et al., 2001; LESOT et al., 2001). Além disso, o TGF- β parece estimular *in vitro* a síntese de OPN (BUTLER, 1989) e pode estar relacionado com o aumento do conteúdo de OPN na dentina reparativa formada em nosso trabalho. Embora a relação entre o TGF β e a regulação da OPN durante a formação da dentina reparativa seja excitante por propiciar oportunidades para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o reparo pulpar, a observação da formação simultânea de dentina reacional e reparativa e a variação de aspecto observada na dentina reparativa em nosso trabalho, indica que o reparo pulpar é um processo complexo e regulado por inúmeros fatores.

Além dos fatores de crescimento, outras moléculas podem estar envolvidas na formação da dentina após injúria pulpar. As proteínas não colágenas podem estar relacionadas com a formação da matriz e mineralização da matriz da dentina

formada após injúria pulpar, visto que algumas proteínas presentes na matriz do osso e dentina estão envolvidas na promoção ou inibição da deposição de mineral em experimentos *in vitro*. (HE e GEORGE, 2004). O isolamento das proteínas não colágenas OPN e DMP1 na matriz extracelular de alguns tecidos mineralizados justifica a identificação de tais proteínas no nosso modelo de indução da dentinogênese a fim de compreender a resposta pulpar a uma injúria.

A análise das amostras incubadas com anticorpos para OPN e DMP1 permitiu observar a presença de DMP1 no núcleo e/ou no citoplasma de células “odontoblast-like” e de algumas células pulpares do complexo dentina-pulpar. As células “odontoblast-like” inclusas na matriz mineralizada da dentina reparativa não mostraram imunomarcção para OPN e DMP1 demonstrando que tais células não estão envolvidas na síntese destas proteínas, o que pôde ser comprovado adicionalmente pela presença de um citoplasma escasso com poucas organelas relacionadas com síntese protéica. Por outro lado, fraca imunodeteção positiva para DMP1 foi observada na região supra-nuclear do citossol e do núcleo das células “odontoblast-like” que margeavam a superfície dentinária pulpar e no núcleo de algumas células pulpares. De fato, alguns experimentos de hibridização *in situ* têm mostrado a expressão de DMP1 na camada de odontoblastos e nas células pulpares precursoras dos odontoblastos (YE et al., 2004), mas nenhum trabalho mostrou a presença da proteína DMP1 nas células “odontoblast-like” formadas após injúria pulpar. Nessas células, a DMP1 localizada no núcleo pode estar envolvida na transcrição de genes que codificam proteínas relacionadas com a formação e mineralização dos tecidos mineralizados (NARAYANAN et al., 2001). A presença de DMP1 no núcleo de algumas células pulpares é surpreendente, pois a localização desta proteína no núcleo tem sido considerada um fenômeno célula-específico dos odontoblastos originais e osteoblastos, não sendo observada em outros tipos celulares (NARAYANAN et al., 2003). Sua presença nas células pulpares pode indicar o seu comprometimento com a formação de uma nova geração de células “odontoblast-like” responsáveis pela formação da dentina reparativa.

Após sua diferenciação, as células “odontoblast-like” iniciaram a formação de uma dentina de aspecto osteóide chamada de dentina reparativa, enquanto odontoblastos originais sobreviventes formaram dentina reacional, as quais foram depositadas progressivamente sobre a dentina fisiológica nos períodos subseqüentes. A análise comparativa da dentina formada permitiu observar

diferenças na estrutura de suas matrizes e nas células relacionadas. Ao contrário da dentina reparativa, a dentina reacional era mais regular, havendo um desvio abrupto dos túbulos dentinários na região de junção entre esta dentina e a dentina fisiológica. Provavelmente, a variação estrutural observada entre as dentinas reacional e reparativa decorreu do tipo de célula responsável por sua secreção. A dentina reacional foi produzida por odontoblastos originais, células pós-mitóticas que se diferenciaram após interação entre o epitélio odontogênico e a papila dentária. A dentina reparativa foi formada por células de fenótipo diferente do odontoblasto original, muito semelhantes aos osteoblastos. Outro aspecto que reforçou a semelhança dessa dentina como osso foi similaridade de imunomarcacão para OPN entre o osso primário e a dentina reparativa. No osso primário e na dentina reparativa, a OPN se acumula preferencialmente nos seus amplos espaços interfibrilares, os quais são escassos no osso secundário e na dentina fisiológica. O arranjo das fibrilas colágenas observado no osso primário e dentina reparativa pode estar relacionado com a sua rápida formação e provavelmente determina o padrão de deposição da OPN nas suas matrizes (NANCI, 1999). Além disso, é possível que a rota de secreção do colágeno seja diferente daquela observada para as proteínas não colágenas. A preferência por uma rota de secreção em detrimento de outra pode ser o fator chave no estabelecimento de deposição dos elementos da matriz (BUTLER e RITCHIE, 1995). No osso primário e na dentina reparativa, a redução da rota secretória relacionada com a síntese de colágeno com um estímulo daquela relacionada com a síntese de proteínas não colágenas seriam responsáveis pela distribuição inusitada da OPN nestes tecidos. Diferente do padrão de imunodeteccão da OPN na dentina reparativa, a DMP1 foi observada sobre as fibrilas colágenas, estando sua concentração relacionada diretamente com um maior conteúdo desse componente em algumas regiões. Tais interações podem estar sendo mediadas por duas seqüências peptídicas (³⁴⁹DSESSEEDR³⁵⁷ e ⁴²⁴SEENRDSQDSSR⁴³⁷) situadas na extremidade carboxila da DMP1, as quais demonstraram ter grande afinidade pelo colágeno em experimentos *in vitro* (HE e GEORGE, 2004).

O colágeno tipo I é o principal componente orgânico da matriz mineralizada do osso e da dentina, sendo secretado por osteoblastos e odontoblastos (HE e GEORGE, 2004). Mas está bem estabelecido que o colágeno não estimula mineralização na ausência de moléculas indutoras (SAITO et al., 1997). Contudo, em virtude do seu arranjo e dos espaços formados entre suas fibrilas, o colágeno é

certamente um arcabouço adequado para acomodar as proteínas não colágenas relacionadas com nucleação e controle do crescimento dos cristais de apatita (GOLDBERG et al., 2003), além de, quando associado às proteínas com afinidade para o cálcio, facilitar a propagação dos cristais de mineral sobre a matriz extracelular (BUTLER e RITCHIE, 1995; HE et al., 2003a,b; HE e GEORGE, 2004). Sendo assim, a co-localização da DMP1 com as fibrilas colágenas na matriz dentinária observada em nosso trabalho confirma a existência de uma interação cooperativa entre esta proteína e o colágeno tipo I, podendo ser um passo essencial na formação e mineralização da dentina reparativa.

Na dentina reparativa, as partículas de ouro-coloidal para DMP1 estavam localizadas sobre as fibrilas colágenas dispostas linearmente, particularmente na faixa escura de suas estriações transversais. Alguns trabalhos mostraram que a DMP1 pode ligar-se ao N-telopeptídeo, que está localizado na região “gap” das fibrilas colágenas (HE e GEORGE, 2004). Em geral, os N-telopeptídeos são seqüências conservadas de aminoácidos em várias espécies e estão envolvidos no estabelecimento do arranjo estrutural do colágeno. Na microscopia eletrônica de transmissão, metais pesados usados na contrastação das amostras se depositam nas regiões “gap” das fibrilas colágenas, as quais aparecem em eletromicrografias como uma série de bandas escuras dispostas transversalmente ao longo eixo das fibrilas de colágeno não mineralizadas. É possível que as partículas de ouro coloidal para DMP1 tenham sido depositadas sobre a região “gap” das fibrilas colágena em mineralização, demonstrando afinidade desta proteína por regiões na fase de mineralização, além de comprovar especificidade da reação imunocitoquímica para DMP1.

O estudo imunocitoquímico para OPN e DMP1 da dentina formada após injúria pulpar permitiu observar diferentes padrões de imunodeteção sugerindo funções distintas para cada proteína. A OPN não foi imunodetectada na matriz da dentina fisiológica, mas foi observada na matriz da dentina reparativa. A diferença de imunodeteção observada entre os dois tecidos pode estar relacionada com o fato da OPN está presente na dentina fisiológica em concentrações abaixo do poder de detectabilidade permitido pela técnica de imunomarcção por ouro-coloidal. Na dentina reparativa, a extrusão pode ativar a expressão e secreção da OPN pelas células “odontoblast-like” resultando na sua imunodeteção nessa matriz. Baseado em estudos *in vitro* onde OPN inibiu o crescimento dos cristais de hidroxiapatita

(HUNTER et al., 1996; BOSKEY et al., 2002), sugere-se que a OPN imobilizada sobre a matriz da dentina reparativa interage com cristais em crescimento, inibindo grandes acúmulos de mineral neste tecido (GIACHELLI e STEITZ, 2000), justificando sua menor mineralização quando comparada à dentina primária (FOREMAN e SOAMES, 1989). Por outro lado, a DMP1 estava distribuída em pequenas quantidades nos três tipos de dentina, fisiológica, reacional e reparativa, sugerindo sua participação na formação destas. Na dentina reparativa, havia raras partículas de ouro-coloidal para DMP1 sobre as escassas e delgadas fibrilas colágenas da pré-dentina que se mostrou pouco significativa quando comparada com a grande imunodeteção de DMP1 na matriz da dentina reparativa. Esses resultados, ainda que analisados em uma matriz de dentina formada após uma injúria, estão de acordo com os achados de Massa et al. (2005), os quais não observaram imunomarcção para DMP1 sobre a matriz de pré-dentina da dentina de manto durante a formação dos molares de rato e indicam uma provável função desta proteína na conversão da pré-dentina em tecido mineralizado.

Curiosamente, as interfaces entre a dentina reparativa e a dentina fisiológica e reacional não apresentaram acúmulos lineares de OPN. Um aspecto característico do osso mineralizado é o acúmulo da OPN nas interfaces entre uma matriz depositada anteriormente e uma secretada recentemente e estaria relacionado com a integridade biomecânica desse tecido (McKEE e NANJI, 1996c). A deposição de dentina reparativa sobre uma matriz mineralizada pré-existente representa uma ocasião onde a integridade tecidual deve ser estabelecida pela formação de uma linha de reforço entre duas matrizes mineralizadas de naturezas diferentes. É possível que o reforço da interface entre essas dentinas seja controlado por outras proteínas não colágenas.

Diferente do padrão difuso de distribuição da DMP1 em toda a matriz de dentina reparativa, a OPN, embora ausente nas interfaces matriz-matriz e em algumas interfaces célula-matriz, acumulou-se marcadamente na matriz que envolvia as células inclusas, que formava uma linha elétron-opaca em volta dos seus prolongamentos citoplasmáticos e em torno dos espaços vazios provenientes da degeneração destes prolongamentos. A linha elétron-opaca imunoreativa para OPN pode corresponder a uma *lamina limitans*, região com afinidade para OPN que envolve os canalículos e as lacunas da matriz do osso e do cimento. Na dentina reparativa, a OPN presente nessas áreas pode posicionar e aderir os

prolongamentos e as células inclusas à matriz extracelular pela interação da OPN com integrina, além de poder “selar” a matriz extracelular adjacente pela interrupção da mineralização (MCKEE e NANJI, 1996c). Curiosamente, a matriz de dentina que envolvia hemácias não mostrou acúmulos de partículas de ouro-coloidal para OPN, confirmando que a presença de OPN na matriz dentinária correlacionou-se especificamente com as células “odontoblast-like” inclusas na dentina reparativa.

Durante a formação da dentina reparativa, algumas células secretoras mostraram inversão de polaridade com seu núcleo voltado para a matriz, uma característica comum aos osteoblastos que estão sendo envolvidos por matriz óssea e estão se transformando em osteócitos (NEFUSSI et al., 1991; FRANZ-ODENDAAL et al., 2006). Mudança na polaridade celular reflete alterações na distribuição de organelas e outras estruturas celulares. A exata relação entre as mudanças na polaridade nuclear e no citoesqueleto e formação de inclusões celulares nos tecidos mineralizados não é conhecida (LESOT et al., 2001).

A matriz inicial de dentina reparativa era estruturalmente distinta daquela secretada nos períodos mais tardios. Nos períodos iniciais, a dentina reparativa tinha um aspecto osteóide, atubular, com alguns espaços contendo células inclusas, enquanto a dentina depositada posteriormente era regular, muitas vezes com túbulos dentinários e sem inclusões celulares. A variação morfológica da dentina reparativa em uma mesma secção tem sido observada em outros trabalhos (SPARHR et al., 2002; TZIAFAS e KOLOKURIS, 1990), inclusive com uma matriz de dentina atubular (TZIAFAS e KOLOKURIS, 1990) ou dentina de aspecto osteóide (DECUP et al., 2000), precedendo a formação de uma dentina reparativa tubular.

É possível que o aspecto morfológico observado na dentina reparativa esteja associado ao tipo de estímulo utilizado no presente trabalho para desencadear a diferenciação das células “odontoblast-like”, modificando-se posteriormente na dependência do estágio de diferenciação apresentado pelas células “odontoblast-like” durante a formação da matriz (SPAHR et al., 2002) ou da velocidade de deposição da matriz de dentina reparativa, esta última sendo modulada pela intensidade da inflamação pulpar provocada pelo trauma (SMITH, 2003). Havendo rápida secreção pelas células “odontoblast-like”, a matriz dentinária incorporaria algumas células e outros elementos do tecido pulpar. As irregularidades observadas na matriz inicial também podem ser atribuídas às células “odontoblast-like” em diferenciação. Em nosso estudo, a matriz inicial com inclusões celulares na dentina

reparativa estava freqüentemente relacionada com células cúbicas. A matriz tubular depositada posteriormente estava associada com células “odontoblast-like” cilíndricas baixas, pretensamente mais maduras. Em um ambiente de reparo favorável como provocado através do nosso modelo de extrusão do incisivo de rato, as células relacionadas com a deposição da matriz inicial, poderiam tornar-se completamente diferenciadas, inclusive com modificações em sua morfologia, permitindo a formação de uma matriz mais estruturada (TZIAFAS, 1995).

Em muitos espécimes, foi observada a superposição das dentinas fisiológica, reacional e reparativa. É possível que o trauma extrusivo não tenha sido suficiente para destruir imediatamente os odontoblastos originais, os quais responderam formando uma delgada camada de dentina reacional como reflexo do aumento de sua capacidade secretória. Posteriormente, tais odontoblastos são destruídos e células pulpares se diferenciam em células “odontoblast-like” que depositam uma camada de dentina reparativa sobre a dentina reacional pré-existente. A presença de ambas as dentinas na mesma região é uma ocorrência rara em estudos com o modelo de capeamento pulpar, onde os odontoblastos são destruídos abruptamente.

Além de sua superposição em algumas regiões, a dentina reparativa revestida por células “odontoblast-like” foi observada freqüentemente ao lado de zonas de dentina reacional relacionadas com odontoblastos originais, sendo a dentina reacional sempre mais espessa. De fato, os eventos celulares observados durante a dentinogênese reacional são muito menos complexos do que os da dentinogênese reparativa desde que as células secretoras de dentina reacional dependem apenas do estímulo a sua atividade secretora (SMITH et al., 1995; SMITH, 2003) e portanto podem responder mais rapidamente a um estímulo.

Em algumas situações, alguns aspectos observados na dentina podem ser eventuais. Por exemplo, foi freqüente a observação de algumas células secretoras sendo envolvidas por matriz na interface entre a dentina reacional e a dentina reparativa depositada ao lado. Nessa região, a matriz de dentina reacional parecia avançar por sobre as células secretoras de dentina reparativa, como reflexo da deposição mais lenta de dentina reparativa e da mudança abrupta da direção dos odontoblastos originais durante deposição da dentina reacional. É possível que algumas inclusões celulares observadas na dentina formada após trauma sejam decorrentes desse fenômeno.

A partir dos resultados analisados, o presente trabalho reforça a idéia de que a formação dos tecidos mineralizados de natureza conjuntiva é um processo regulado por células por meio da secreção de proteínas específicas que são competentes para mediar a formação e mineralização das matrizes, sendo ainda responsáveis pelas características estruturais específicas das dentinas primária, secundária e terciária.

Ainda que o presente estudo tenha focado preferencialmente sua investigação sobre as proteínas não colágenas e a matriz dentinária, seria importante identificar as populações celulares relacionadas com a formação das células “odontoblast-like” no tecido pulpar. Um melhor entendimento de sua origem, natureza e mecanismos de diferenciação, associado à compreensão da regulação e dos papéis das proteínas OPN e DMP1 na formação dos tecidos mineralizados, podem permitir o desenvolvimento de práticas ou agentes terapêuticos que estimulem ou inibam a mineralização ou que aumentem a capacidade das células pulpares em formar uma dentina estruturalmente organizada.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a extrusão controlada do incisivo superior foi capaz de afetar o complexo dentina-polpa, estimulando a formação de quantidades variáveis de dentina reacional e reparativa. A DMP1 foi imunodetectada na matriz mineralizada nas dentinas fisiológica, reacional e reparativa, tendo grande afinidade pelas fibrilas colágenas. Tais achados e a evidência de raras partículas de ouro-coloidal para DMP1 na pré-dentina da dentina reparativa confirmaram o papel desta proteína na mineralização dentinária, como demonstrado por outros modelos de estudo. Enquanto isso, a OPN foi observada apenas na dentina reparativa, acumulando-se preferencialmente na matriz adjacente às células inclusas e prolongamentos odontoblásticos, mostrando que, além de semelhanças morfológicas apontadas por estudos anteriores, esta dentina e o osso primário são também similares com relação às suas composições.

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.
- ARANA-CHAVEZ, V.E.; MASSA, L.F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 1367-73, 2004.
- ARANA-CHAVEZ, V.E.; NANJI, A. High-resolution immunocytochemistry of noncollagenous matrix proteins in rat mandibles processed with microwave irradiation. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 49, p. 1099-109, 2001.
- BALDWIN, A.S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 14, p. 649-83, 1996.
- BOSKEY, A.L.; SPEVAK, L.; PASCHALIS, E.; DOTY, S.B.; McKEE, M.D. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. **Calcif. Tissue Int.**, v. 71, p. 145-54, 2002.
- BOSSHARDT, D.D.; DEGEN, T.; LANG, N.P. Sequence of protein expression of bone sialoprotein and osteopontin at the developing interface between repair cementum and dentin in human deciduous teeth. **Cell Tissue Res.**, v. 320, p. 399-407, 2005.
- BUTLER, W.T. The nature and significance of osteopontin. **Connect. Tissue Res.**, v. 23, p. 123-36, 1989.
- BUTLER, W.T.; RITCHIE, H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 39, n. 1, p. 169-79, Feb., 1995.
- CERRI, P.S.; FREYMÜLLER, E.; KATCHBURIAN, E. Apoptosis in the early developing periodontium of rats molars. **Anat. Rec.**, v. 258, p. 136-44, 2000.
- CERRI, P.S.; KATCHBURIAN, E. Apoptosis in the epithelial cells of the rests of Malassez of the periodontium of rat molars. **J. Periodontal Res.**, v. 40, p. 365-72, 2005.
- 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. 129-38, 2000.
- DECUP, F.; SIX, N.; PALMIER, B.; BUCH, D.; LASFARGUES, J.-J.; SALIH, E.; OLDBERG, M. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. **Clin. Oral Investig.**, v. 4, p. 110-9, 2000.
- DENHARDT, D.T.; LOPEZ, C.A.; ROLLO, E.E.; HWANG, S-M; AN, X-R; WALTHER, S.E. Osteopontin-induced modifications of cellular functions. **Ann. N.Y. Acad.Sci.**, v. 760, p. 127-142, 1995.

DENHARDT, D.T.; NODA, M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. **J. Cell Biochem. Suppl.**, v. 30-31, p. 92-102, 1998.

DENHARDT, D.T.; NODA, M.; O'REGAN, A.W.; PAVLIN, D.; BERMAN, J.S. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. **J Clin Invest**, v. 107, p. 1055-61, 2001.

D'SOUZA, R.N.; BACHMAN, T.; BAUMGARDNER, K.R.; BUTLER, W.T.; LITZ, M. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. **J. Dent. Res.**, v. 73, p. 702-9, 1995.

FINCHAM, A.G.; MORADIAN-OLDAK, J.; SIMMER, J.P. The structural biology of the developing dental enamel matrix. **J. Struct. Biol.**, v. 126, p. 270-99, 1999.

FOREMAN, P.C.; SOAMES, J.V. Comparative study of the composition of primary and secondary dentine. **Caries Res.**, v. 23, p. 1-4, 1989.

FRANZ-ODENDAAL, T.A.; HALL, B.K.; WITTEN, P.E. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. **Dev. Dyn.**, v. 235, p. 176-90, 2006.

GAIKWAD, J.S.; HOFFMANN, M.; CAVENDER, A.; BRONCKERS, A.L.; D'SOUZA, R.N. Molecular insights into the lineage-specific determination of odontoblasts: the role of cbfa1. **Adv. Dent. Res.**, v. 15, p. 19-24, 2001.

GEORGE, A.; GUI, J.; JENKINS, N.A.; GILBERT, D.J.; COPELAND, N.G.; VEIS, A. In Situ Localization and Chromosomal Mapping of the AG1 (Dmpl) Gene. **The J. Histochem. Cytochem.**, v. 42, p. 1527-31, 1994.

GEORGE, A.; SABSAY, B.; SIMONIAN, P.A.L.; VEIS, A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 12624-30, 1993.

GERICKE, A.; QIN, C.; SPEVAK, L.; FUJIMOTO, Y.; BUTLER, W.T.; SORENSEN, E.S.; BOSKEY, A.L. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. **Calcif. Tissue Int.**, v. 77, p. 45-54, Jul., 2005.

GIACHELLI, C.M.; STEITZ, S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomerization. **Matrix Biol.**, v. 19, p. 615-22, Dez., 2000.

GOLDBERG, M.; SEPTIER, D.; LÉCOLLE, S.; CHARDIN, H.; QUINTANA, M.A.; ACEVEDO, A.C.; GAFNI, G.; DILLOUYA, D.; VERMELIN, L.; THONEMANN, B. Dental mineralization. **Int. J. Dev. Biol**, v. 39, p. 93-110, 1995

GOLDBERG, M.; SIX, N.; DECUP, F.; BUCH, D.; SOHEILI-MADJ, E.; LASFARGUES, J-J.; SALIH, E.; STANISLAWKI, L. Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. **Adv. Dent. Res.**, v. 15, p. 91-95, 2001.

GOLDBERG, M.; SIX, N.; DECUP, F.; LASFARGUES, J.-J.; SALIH, E.; TOMPKINS, K.; VEIS, A. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. **Am. J. Dent.**, v. 16, p. 66-76, 2003.

GRAVALLESE, E.M. Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. **J Clin. Invest.**, v. 112, p. 147-49, 2003.

HE G.; GEORGE, A. Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition in vitro. **J. Bio. Chem.**, v. 279, p. 11649-56, 2004.

HE G.; DAHL, T.; VEIS, A.; GEORGE, A. Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation in vitro. **Connect. Tissue Res.**, v. 44, p. 240-5, 2003a. Suppl. 1.

HE G., DAHL, T.; VEIS, A.; GEORGE, A. Nucleation of apatite crystals *in vitro* by self-assembled dentin matrix protein 1. **Nat. Mater.**, v. 2, p. 552-8, 2003b.

HU, J. SUN, X.; ZHANG, C.; SIMMER, J.P. A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 109, p. 125-32, 2001.

HUNTER, G.K.; HAUSCHKA, P.V.; POOLE, A.R.; ROSENBERG, L.C.; GOLDBERG, H.A. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. **Biochem. J.**, v. 317, p. 59-64, 1996.

KATCHBURIAN, E; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**. São Paulo: Panamericana, 2004. 381 p.

KULKARNI, G.V.; CHEN, B.; MALONE, J.P.; NARAYANAN, A.S; GEORGE, A. Promotion of selective cell attachment by the RGD sequence in dentine matrix protein 1. **Arch. Oral Biol.**, v. 45, p. 475-84, 2000.

LESOT, H.; LISI, S.; PETERKOVA, R.; PETERKA, M.; MITOLO, V.; RUCH, J.V. Epigenetic signals during odontoblast differentiation. **Adv. Dent. Res.**, v. 15, p. 8-13, 2001.

MAGLOIRE, H.; ROMEAS, A.; MELIN, M.; COUBLE, M-L.; BLEICHER, F.; FARGES, J-C. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. **Adv. Dent. Res.**, v. 15, p. 46-50, 2001.

MACDOUGALL, M.; GU, T.T.; LUAN, X.; SIMMONS, D.; CHEN, J. Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein 1: spatial expression in mineralized tissues. **J. Bone Miner. Res.**, v. 13, p. 422-431, 1998.

MARTIN, P. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 275-81, 1997.

MASSA, L.F.; ARANA-CHAVEZ, V.E. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 108, p. 74-7, 2000.

MASSA, L.F.; RAMACHANDRAN, A.; GEORGE, A.; ARANA-CHAVEZ, V.E. Developmental appearance of dentin matrix protein 1 during the early dentinogenesis in rat molars as identified by high-resolution immunocytochemistry. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 124, p. 197-205, 2005.

MATHIEU, S.; EL-BATTARI, A.; DEJOU, J.; ABOUT, I. Role of injured endothelial cells in the recruitment of human pulp cells. **Arch. Oral Biol.**, v. 50, p. 109-13, 2005.

MAZZALI, M.; KIPARI, T.; OPHASCHAROENSUK, V.; WESSON, J.A.; JOHNSON, R.; HUGHES, J. Osteopontin- molecule for all seasons. **Q. J. Med.**, v. 95, p. 3-13, 2002.

McKEE, M.D.; NANJI, A. Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. **Connective Tissue Res.**, v. 35, p. 197-205, 1996a.

McKEE, M.D.; NANJI, A. Osteopontin deposition in remodeling bone: an osteoblast mediated event. **J. Bone Miner. Res.**, v. 11, p. 873-5, 1996b.

McKEE, M.D.; NANJI, A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover and repair. **Microsc. Res. Tech.**, v. 33, p. 141-64, 1996c.

MURRAY, P.E.; ABOUT, I.; LUMLEY, P.J.; FRANQUIN, J.-C.; WINDSOR, L.J.; SMITH, A.J. Odontoblast morphology and dental repair. **J. Dent.**, v. 31, p. 75-82, 2003.

NANJI, A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. **J. Struct. Biol.**, v. 126, p. 256-269, 1999.

NANJI, A.; ZALZAL, S.; GOTOH, Y.; McKEE, MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. **Microsc. Res. Tech.**, v. 33, p. 214-31, 1996.

NANJI, A.; ZALZAL, P.; LAVOIE, P.; KUNIKATA, W.; CHEN, Y.; KREBSBACH; YAMADA, Y.; HAMMARSTRÖM, L.; SIMMER, J.P.; FINCHAM, A.G.; SNEAD, M.L.; SMITH, C.E. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 46, p. 911-34, 1998.

NARAYANAN, K.; SRINIVAS, R.; RAMACHANDRAN, A.; HAO, J.; QUINN, B.; GEORGE, A. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, p. 4516-21, 2001.

NARAYANAN, N.; RAMACHANDRAN, A.; HAO, J.; HE, G.; PARK, K.W.; CHO, M.; GEORGE, A. Dual functional roles of dentin matrix protein 1. **J. Bio. Chem.**, v. 278, p. 17500-8, 2003.

NEFUSSI, J.R.; SAUTIER, J.M.; NICOLAS, V.; FOREST, N. How osteoblasts become osteocytes: a decreasing matrix forming process. **J. Biol. Buccale**, v. 19, p. 75–82, 1991.

NINOMIYA, M.; OHISHI, M.; KIDO, J-I; OHSAKI, Y.; NAGATA, T. Immunohistochemical localization of osteopontin in human pulp stones. **J. Endod.**, v. 27, p. 269-72, 2001.

PAINE, M.L.; ZHU, D.; LUO, W.; BRINGAS, P.; GOLDBERG, M.; WHITE, S.N.; LEI, Y.; SARIKAYA, M.; FONG, H.K.; SNEAD, M.L. Enamel biomineralization defects result from alterations to amelogenin self-assembly. **J. Struct. Biol.**, v. 132, p. 191-200, 2000.

PAPAGERAKIS, P.; BERDAL A.; MESBAH, M.; PEUCHMAUR, M.; MALAVAL, L.; NYDEGGER, J.; SIMMER, J.; MACDOUGALL, M. Investigation of osteocalcin, osteonectin and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. **Bone**, v. 30, p. 377-385, 2002.

PRIAM, F.; RONCO, V.; LOCKER, M.; BOURD, K.; BONNEFOIX, M.; DUCHÊNE, T.; BITARD, J.; WURTZ, T.; KELLERMANN, O.; GOLDBERG, M.; POLIARD, A. New cellular models for tracking the odontoblast phenotype. **Arch. Oral Biol.**, v. 50, p. 271-7, 2005.

QIN, C.; BABA, O.; BUTLER, W.T. Post-translational modifications of SIBLING proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 15, p. 126-136, 2004.

QIN, C.; BRUNN, J.C.; CADENA, E.; RIDALL, A.; BUTLER, WT. Dentin sialoprotein in bone and dentin sialophosphoprotein gene expressed by osteoblasts. **Connect. Tissue Res.**, v. 44, p. 179-83, 2003. Suppl. 1

REINHOLT, F.P.; HULTENBY, K.; OLDBERG, A.; HEINEGARD, D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, p. 4473-5, 1990.

ROSS, F.P.; CHAPPEL, J.; ALVAREZ, J.I.; SANDER, D.; BUTLER, W.T.; FARACH-CARSON, M.C.; MINTZ, K.A.; ROBEY, P.G.; TEITELBAUM, S.L.; CHERESH, D.A. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin potentiate bone resorption. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 9901-7, 1993.

RUCH, J.V.; LESOT, H.; BÉGUE-KIRN. C. Odontoblast differentiation. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 39, p. 51-68, 1995.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science**, v. 238, p. 491-7, 1987.

SAITO, T.; ARSENAULT, A.L.; YAMAUCHI, M.; KUBOKI, Y.; CRENSHAW, M.A. Mineral Induction by Immobilized Phosphoproteins. **Bone**, v. 21, p. 305-11, 1997.

SCATENA, M; ALMEIDA, M.; CHAISSON, M.L.; FAUSTO, N.; NICOSIA, R. F.; GIACHELLI, C.M. NF- κ B mediates $\alpha_v\beta_3$ integrin-induced endothelial cell survival. **J. Cell Biol.**, v. 141, p. 1083-93, 1998.

SHIMAZU, Y.; NANJI, A.; AOBA, T. Immunodetection of osteopontin at sites of resorption in the pulp of rats molars. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 50, p. 911-21, 2002.

SLOAN, A.J.; SMITH, A.J. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. **Oral Dis.**, v. 13, p. 151-7, 2007.

SIMMER, JP; HU, JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry, **J. Dent. Educ.**, v. 65, p. 896-905, 2001.

SMITH, CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 9, p. 128-61, 1998.

SMITH, A.J. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. **J. Dent. Educ.**, v. 67, p. 678- 89, 2003.

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

SMITH, A.J.; MURRAY, P.E.; SLOAN, A.J.; MATTHEWS, J.B.; ZHAO, S. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. **Adv. Dent. Res.**, v. 15, p. 51-4, 2001.

SMITH A.J.; TOBIAS, R.S.; CASSIDY, N.; PLANT, C.G.; BROWNE, R.M.; BEGUE-KIRN, C.; RUCH, J.V.; LESOT, H. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. **Arch. Oral Biol.**, v. 39 , 13–22, 1994.

SODEK, J.; GANSS, B.; McKEE, M.D. Osteopontin. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 11, p. 279-03, 2000.

SODHI, C.P.; PHADKE, S.A.; BATLLE, D.; SAHAI, A. Hypoxia stimulates osteopontin expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells: potentiation by high glucose. **Diabetes**, v. 50, p. 1482-90, 2001.

SPAHR, A.; LYGSTADAAS, S.P.; SLABY, I.; HALLER, B.; BOECKH, C.; TSOULFIDOU, F.; HAMMARSTROM, L. Expression of amelin and trauma-induced dentin formation. **Clin. Oral Invest.**, v. 6, p. 51-7, 2002.

SRINIVASAN, R.; CHEN, B.; GORSKI, J.P.; GEORGE, A. Recombinant expression and characterization of dentin matrix protein 1. **Connect. Tissue Res.**, v. 40, p. 251-8, 1999.

TANIGUCHI, K.; OKAMURA, K.; HAYASHI, M.; FUNAKOSHI, T.; MOTOKAWA, W. The effect of mechanical trauma on the tooth germ of rats molars at various developmental stages: a histopathological study. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 15, p. 17-25, 1999.

TÉCLÉS, O.; LAURENT, P.; ZYGOURITSAS, S.; BURGER, A.-S.; CAMPS, J.; DEJOU, J.; ABOUT, I. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. **Arch. Oral Biol.**, v. 50, p. 103-8, 2005.

TEN CATE, AR. **Oral Histology: Development, Structure and Function**. St Louis: Mosby-Year Book, 1998, 439 p.

TZIAFAS, D. Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. **Int. Endod. J.**, v. 27, p. 61-74, 1994.

TZIAFAS, D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 39, p. 281-290, 1995.

TZIAFAS, D.; KOLOKURIS, I. Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. **J. Dent. Res.**, v. 69, p. 75-81, 1990.

YE, L.; MACDOUGALL, M.; ZHANG, S.; XIE, Y.; ZHANG, J.; LI, Z.; LU, Y.; MISHINA, Y.; FENG, J.Q. Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. **J. Bio. Chem.**, v. 279, p. 19141-48, 2004.

YAMADA, Y.; FUANGTHARNTHIP, P.; TAMURA, Y.; TAKAGI, Y.; OHYA, K. Gene expression and immunolocalization of amelogenin in enamel hypoplasia induced by successive injections of bisphosphonate in rat incisors. **Arch. Oral Biol.**, v. 45, p. 207-15, 2000.

YE, L.; MACDOUGALL, M.; ZHANG, S.; XIE, Y.; ZHANG, J.; LI, Z.; LU, Y.; MISHINA, Y.; FENG, J.Q. Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 19141-8, 2004.

YOKOSAKI, Y.; MATSUURA, N.; SASAKI, T.; MURAKAMI, I.; SCHNEIDER, H.; HIGASHIYAMA, S.; SAITOH, Y.; YAMAKIDO, M.; TAOOKA, Y.; SHEPPARD, D. The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 36328-34, 1999.

YOSHITAKE, H.; RITTLING, S.R.; DENHARDT, D.T.; NODA, M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, p. 8156-60, 1999.

ANEXOS

Ultrastructural and immunocytochemical analyses of osteopontin in reactionary and reparative dentine formed after extrusion of upper rat incisors

Marcio Cajazeira Aguiar^{1,2} and Victor E. Arana-Chavez¹

¹Laboratory of Mineralized Tissue Biology, Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

²Department of Morphology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

Abstract

Reactionary dentine and reparative dentine are two strategies used by the dentine–pulp complex to respond to injury. The reactionary dentine is secreted by original odontoblasts, while the reparative dentine is formed by odontoblast-like cells. Osteopontin (OPN) is a non-collagenous protein usually present in the repair of mineralized tissues. It is likely to be present in newly formed dentine but there are no studies attempting to detect it in reactionary and reparative dentine. The aim of the present study was to examine the ultrastructural characteristics, as well as the presence and distribution of OPN in reactionary and reparative dentine by provoking extrusion of the rat incisor. The right upper incisors of 3-month-old male rats were extruded 3 mm and then repositioned into their original sockets. At 3, 7, 10, 15, 20, 30 and 60 days after surgery, the incisors were fixed in glutaraldehyde–formaldehyde and then processed for scanning and transmission electron microscopy and for immunocytochemistry for OPN. After extrusive trauma, the dentine–pulp interface showed the presence of reactionary and reparative dentine, which varied in aspect, thickness and related cells. OPN was not detected in the physiological and reactionary dentine, while it was strongly immunoreactive in the matrix that surrounded the entrapped cells of reparative dentine. In addition, original odontoblasts subjacent to the physiological dentine contained OPN in their Golgi region. The present findings showed that reparative dentine shares some structural characteristics with primary bone, especially in relation to its OPN content. The odontoblast-like cells resemble osteoblasts rather than odontoblasts.

Key words dental pulp; immunocytochemistry; odontoblast; osteopontin; reactionary dentine; reparative dentine; tertiary dentine.

Introduction

Pulp repair is a phenomenon by which the human dentine–pulp complex responds to injury through the deposition of tertiary dentine. Three types of dentine can be present in the mature human tooth. The dentine formed by odontoblasts up to the end of the tooth development is called primary dentine. As odontoblasts

continue slowly to secrete dentine matrix after the apical foramen is formed, a secondary type of dentine is laid down throughout life. Thus, as both primary and secondary dentine are secreted by the same odontoblasts, they have a similar tubular structure. In addition, a tertiary dentine may be laid down in specific regions of the dentine–pulp interface. There are two subtypes of tertiary dentine, that secreted by the original odontoblasts in response to an appropriate stimulus, called reactionary dentine, and the reparative dentine formed by odontoblast-like cells, which arise from cells present in the dental pulp after the death of the original odontoblasts (Arana-Chavez & Massa, 2004). Whereas reactionary dentine is tubular and therefore

Correspondence

Dr Victor E. Arana-Chavez, Laboratory of Mineralized Tissue Biology, Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05580-900 São Paulo, SP, Brazil.
T: +55 11 3091 7308; Fax: +55 11 3091 7402; E: vearana@usp.br

Accepted for publication 27 January 2007

shares similar aspects with primary and secondary dentine, reparative dentine has an dystrophic, atubular matrix with cells entrapped in its mineralized matrix (Smith et al. 1995; Tziafas, 1995). In this context, some animal teeth, such as the rat incisor, which continuously erupts, do not close their apical end; therefore, no primary or secondary dentine can be distinguished, only a physiological dentine. However, reactionary dentine or reparative dentine can be formed in these teeth, although they cannot be considered as tertiary dentine.

As occurs in other mineralized tissues, the mechanism and control of the reparative dentine formation involves cell differentiation and initial organic matrix deposition and mineralization, which may be regulated by a number of factors and by non-collagenous matrix proteins. Among the non-collagenous proteins postulated to be present in these processes is osteopontin (OPN), a phosphorylated glycoprotein composed of approximately 300 amino acid residues that has been linked to several physiological and pathological events (Denhardt et al. 2001; Mazzali et al. 2002; Qin et al. 2004). It is present in many mineralized and soft tissues including bone, cementum, calcified cartilage, kidney stones, tumours, body fluids and brain (Sodek et al. 2000). The idea that OPN is involved in regulation of matrix mineralization and control of cell adhesion arose on the basis of its tissue distribution, particularly within the interfibrillar regions and within the interfacial structures as cement lines and laminae limitans in bone, and the fact that it contains cell-matrix binding motifs in its structure (Nanci, 1999; Giachelli & Steitz, 2000). In addition, OPN exhibits a high affinity for calcium and calcium phosphate crystals, probably due to the quantity of phosphorylation sites (Denhardt et al. 2001; Qin et al. 2004) and the presence of a polyaspartic acid motif in its molecule (Giachelli & Steitz, 2000). Furthermore, OPN contains the arg-gly-asp (RGD) sequence that might mediate cell-matrix interactions (Butler, 1989; Giachelli & Steitz, 2000; Denhardt et al. 2001; Gravallesse, 2003; Gericke et al. 2005; for a detailed review, see Sodek et al. 2000).

In reparative dentine, OPN could be involved in the initial stages of the formation and mineralization of this tissue as well as in inducing some of the events required for the appearance of a new generation of odontoblasts. These events include cell division, chemotaxis, cell migration, cell adhesion, cytodifferentiation (Smith et al. 1995) and intracellular signalling (Sodek et al. 2000).

Despite the importance of the reparative dentine for pulp repair and the high concentration of OPN in some mineralized tissues, there are no studies confirming the presence and distribution of OPN in this tissue as well as its relation to the appearance of odontoblast-like cells (Butler et al. 2003). The exact relationship between OPN of dentine matrix secreted after trauma and its related cells is important in understanding tertiary dentinogenesis as well as the role of OPN in mineralized tissue formation.

Thus, the purpose of the present investigation was to examine the effect of extrusive trauma in the formation of reactionary and reparative dentine deposition as well as the presence and distribution of OPN in these tissues by using post-embedding colloidal gold immunocytochemistry.

Materials and methods

Surgical procedure, fixation and decalcification

All animal procedures were in accordance with principles of laboratory animal care (NIH publication 85-23, 1985) and were authorized by the Ethical Committee for Animal Research of the University of São Paulo, Brazil (Protocol no. 008/03).

Thirty-five male Wistar rats weighing between 180 and 250 g were randomly divided into two groups. The first (experimental) group comprised 28 animals whose upper right incisor was submitted to extrusion. The second (control) group comprised seven animals whose incisors were not extruded.

The animals were anaesthetized intramuscularly with a combination of ketamine hydrochloride (Ketalar®, Parke Davis, Brazil) and xylazine (Rompun®, Bayer SA, Brazil) at concentrations of 6 and 0.7 mg per 100 g body weight, respectively. After a sepsis with an alcoholic solution of iodine, 2 mm of the incisal edge was cut with a diamond cylindrical bur. A sindesmotomy was made then around the right upper incisors with a modified Holleback 3S instrument (Golgran, SP, Brazil) followed by the extrusion of 3 mm with an adapted #151 paediatric dental forceps (Golgran). These teeth were then gently put back to their original positions. The length of the removed incisal edge and amount of displacement of the teeth during extrusion were measured with an endodontic millimetre ruler (Fig. 1). The animals exhibited normal appearance throughout the experiment. Animals from each group were

Fig. 1 Three-millimetre extrusion of the right upper rat incisor.

anaesthetized as described previously and killed at 3, 7, 10, 15, 20, 30 and 60 days after surgery.

The animals were killed via high doses of anaesthetics, following which the hemimaxillae containing the right maxillary incisors were removed and placed in fixative containing 0.1% glutaraldehyde plus 4% formaldehyde at pH 7.2 with 0.1 M sodium cacodylate. After removal of all soft tissues, the right hemimaxillae were immersed in a beaker containing 40 mL of fixative at room temperature, which was subsequently placed in a larger glass recipient full of ice and immediately taken inside a Pelco 3400 laboratory microwave (MW) oven (Ted Pella, Redding, CA, USA). The temperature probe of the oven was submerged in the fixative and the specimens were exposed to MW irradiation at a 100% setting for three periods of 5 min with the temperature programmed to a maximum of 36 °C (Massa & Arana-Chavez, 2000). After MW irradiation, specimens were transferred into fresh fixative and left there overnight at 4 °C. They were then washed in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for 90 min. Apart from the samples for scanning electron microscopy (SEM), all hemimaxillae were decalcified in an aqueous solution of 4.13% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) under MW irradiation for 15 h in the same oven. Specimens were placed in a beaker containing 25 mL of the decalcifying solution, which was placed in a larger glass recipient filled with ice. The temperature probe was submerged in the EDTA solution, and the specimens were immediately exposed to MW irradiation at medium setting for periods of 30 min, with the temperature programmed to a maximum of 37 °C. The decalcifying solution was changed every 2 h over a total period of 15 h. After decalcification, the hemimaxillae were

washed extensively in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2.

Processing for SEM

After careful dissection of incisors from alveolar bone, one undecalcified tooth of each group was fractured parallel to its long axis. Each piece was then treated with 2% sodium hypochlorite for 30 min in an ultrasonic apparatus (Branson 1210, Danbury, CT, USA) to remove all the soft tissues covering bone and teeth. The sections were subsequently washed with distilled water, transferred to 30% ethanol and dehydrated in increasing concentrations of ethanol. To avoid shrinkage of specimens during air-drying, sections were immersed in 100% hexamethyldisilizane (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) for 10 min and left under a fume hood equipped with an exhaust system for complete evaporation of HMDS. Specimens were placed on aluminium stubs using a colloidal silver adhesive and sputter-coated with gold in a Bal-Tec SCD 050 apparatus (Bal-Tec SCD 050, Liechtenstein). The specimens were examined in a Jeol 6100 scanning electron microscope (Jeol Ltd, Tokyo, Japan), operated at 10–15 kV.

Processing for transmission electron microscopy

After decalcification and washing, some specimens were post-fixed in cacodylate-buffered 1% osmium tetroxide for 2 h and then dehydrated in graded concentrations of ethanol and embedded in hard grade LR White resin (London Resin Company, London, UK). Toluidine blue-stained 1-µm-thick sections were examined with a light microscope. Regions containing the portion located between the fourth and the seventh millimetres from the apical end of the incisor were trimmed for ultrathin sectioning. Sections, 80 nm thick, were cut with a diamond knife on a Reichert Ultracut E ultramicrotome and collected on parlodion-coated 200-mesh nickel grids.

Post-embedding colloidal gold immunocytochemistry

Grids containing unossicated sections were incubated with OPN chicken egg yolk primary antibody (Nanci et al. 1996) diluted 1 : 150 for 5 h. They were then incubated with a rabbit anti-chicken IgG secondary antibody (Sigma Chemical Co.) diluted 1 : 2000 for 1 h.

The sites of antibody–antigen binding were then revealed by incubating the grids on a drop of protein A–gold complex for 30 min. Grids were washed with PBS between incubation steps and sections blocked by placing the grids on a drop of PBS–1% ovalbumin for 20 min. After the protein A–gold, the grids were jet-washed with PBS followed by distilled water. All steps were carried out at room temperature (Arana-Chavez & Nanci, 2001). Sections were then stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a Jeol 1010 transmission electron microscope (Jeol Ltd) operated at 80 kV. Controls for the specificity of the labelling consisted of incubating the sections with the secondary antibody followed by protein A–gold, or with protein A–gold alone.

Results

As the rat incisor continuously erupts and the cells at its apical end proliferate and differentiate throughout life, there is no primary and secondary dentine in the rat incisor, but only a physiological dentine. As a consequence, physiological, reactionary and reparative dentine are the terms used in the present study for the types of dentine observed in the rat incisor in order to compare them with their corresponding types in human teeth.

Rat incisors injured by extrusive luxation exhibited extensive areas of both reactionary and reparative dentine. Although dilated blood vessels could be observed, no areas with necrosis or infection were detected in the central region of dental pulp. The characteristics of the extracellular dentine matrix and cells related to the dentine–pulp interface throughout the several periods after trauma are described below.

Morphology

Although 3 days after trauma the specimens showed dentine with a generally normal aspect, several features were noted in the dentine–pulp interface. In some regions the odontoblastic layer showed signs of disarrangement and degeneration of its cells, while in others odontoblasts were reduced in number or even absent (Fig. 2A). When denuded dentine areas were observed, clusters of fusiform cells appeared in close relation to the dentine surface.

Seven days after extrusion, the regions of denuded dentine were coated by an irregular layer of cubic cells,

which often exhibited their nuclei located near the dentine matrix. In the dentine–pulp interface in close relation to remaining original odontoblasts, the start of the formation of a tubular dentine matrix (reactionary dentine) was observed. The zone of reactionary dentine was clearly distinguishable from physiological dentine, because the former had a decreased number of tubules and there was a slight change in tubular orientation in relation to the physiological dentine. An intensely stained line was discerned between both types of dentine in many teeth.

Ten days after extrusion, the cubic or shorter columnar cells coated areas of atubular dentine matrix that corresponded to reparative dentine. Adjacent areas of tubular reactionary dentine were coated with original odontoblasts (Fig. 2B). In addition, some sections showed a reparative dentine matrix that had changed dramatically, sometimes exhibiting entrapped cells. Cubic cells appeared in the dentine–pulp interface (Fig. 2C). They showed several cisternae of rough endoplasmic reticulum, well-developed Golgi complex and many mitochondria. In general, the thickness of the reactionary dentine matrix was greater than that observed in the reparative dentine. Specimens 15 and 20 days after extrusion exhibited similar characteristics.

Thirty days after luxation, areas of reactionary and reparative dentine as well as the same arrangement of odontoblasts and cubic cells were observed, thus resembling the earlier periods. After these periods, some dentine matrix areas displayed a simultaneous presence of physiological, reactionary and reparative dentine. The reparative dentine was always the deepest, i.e. near the dentine–pulp interface (Fig. 3A). The closest reparative dentine to the physiological dentine was more irregular and contained more entrapped cells than reparative dentine related to the dentine–pulp interface. At higher magnifications, the areas of reparative dentine showed a typical primary bone-like appearance (Fig. 3B).

Sixty days after the operation, the amounts of tertiary dentine appeared higher than that at earlier periods. As a consequence, the pulpal chamber was almost completely obliterated.

Immunocytochemistry

Immunolabelling for OPN was visible in the original odontoblasts in contact with physiological dentine in the first periods after extrusion. The intracellular

Fig. 2 Light micrographs showing several regions of the dentine–pulp interface of rat incisors after extrusion. (A) Region without odontoblasts (asterisk) can be seen at the left side of the micrograph 3 days after extrusion, while the dentine–pulp interface at the right side exhibits a normal appearance. (B) Both areas of reactionary and reparative dentine are observed under the physiological dentine in a rat incisor 10 days after extrusion. Note that cubic cells, some of them exhibiting their nuclei (arrows) located near the dentine matrix, are subjacent to reparative dentine, while reactionary dentine is coated by tall columnar odontoblasts. (C) Region from a rat incisor 10 days after extrusion in which the three types of dentine observed in the present study can be discerned: physiological, reactionary and reparative dentine. Note that the regular tubular appearance of physiological dentine remains through the reactionary dentine. That appearance, however, changes dramatically in reparative dentine in which some entrapped cells (arrowheads) are observed. Cubic cells appear in the dentine–pulp interface. A, ameloblast; E, enamel; D, physiological dentine; Rc, reactionary dentine; O, original odontoblasts; Rp, reparative dentine; Ol, cubic odontoblast-like cells; P, dental pulp. Toluidine blue staining.

pattern of staining appeared within the perinuclear area of odontoblasts (Fig. 4A,B). OPN was never immunodetected in the adjacent physiological dentine matrix.

In subsequent periods, a reparative dentine matrix strongly immunoreactive for OPN containing several entrapped cells was noted (Fig. 5A,B). Although the particles of OPN were distributed in all reparative

dentine matrix, they were abundant in the regions near spaces, some of which contained cellular debris (Fig. 5C), while others appeared empty (Fig. 5D) as a result of partial or full degeneration of the entrapped cells. The short columnar cells adjacent to reparative matrix, which exhibited an osteoblast-like aspect, did not contain gold particles (Fig. 5E). The pattern of localization and distribution of the gold particles for

Fig. 3 Scanning electron micrographs. (A) Region of a rat incisor 30 days after extrusion in which physiological, reactionary and reparative dentine are observed, and (B) a higher magnification view of all types of dentine. Note several spaces in reparative dentine that correspond, *in vivo*, to the lacunae into which the entrapped cells are located. D, physiological dentine; Rc, reactionary dentine; Rp, reparative dentine.

Fig. 4 Transmission electron micrographs. (A) Original odontoblast subjacent to the physiological dentine from a rat incisor 3 days after extrusion. It appears with a typical columnar shape, the nucleus in its basal pole and abundant rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. (B) Higher magnification view of the odontoblast cytoplasm shows labelling for OPN in the Golgi region (arrows). Note that mitochondria (m) are free of gold particles, revealing the specificity of immunoreaction. Unosmicated.

OPN on reparative dentine matrix was seen in all periods after 3 days.

Control incubations resulted in the absence of gold particles in the cells of the dentine–pulp interface and

entrapped cells as well as the physiological and tertiary dentine matrix. Ultrathin sections showing immunoreactivity for OPN in the reparative dentine did not show gold particles in the enamel or physiological dentine (Fig. 5F).

Fig. 5 Transmission electron micrographs showing several regions of extruded rat incisors processed for post-embedding colloidal gold immunocytochemistry. (A) Area of reparative dentine secreted after dentine–pulp injury displaying several entrapped cells (Ec). In the higher magnification view of the reparative dentine (B), gold particles immunoreactive for OPN form patches (between arrows) in the dentine matrix in close relation to entrapped cells (Ec). (C) Many patches of gold particles are found in the reparative dentine matrix, especially in the regions near to cellular debris (Cd). (D) Intense immunoreactivity for OPN in the dentine matrix closely related to several empty spaces (between arrows). (E) Interface between reparative dentine (Rp) and short columnar cells (Ol). Note that these cells exhibit numerous cisternae of rough endoplasmic reticulum, well-developed Golgi apparatus and several mitochondria. (F) Enamel of an extruded rat incisor that was incubated in the same section as a negative control for the immunocytochemistry for OPN appears free of gold particles. Unosmicated.

Discussion

The present study shows that extrusive trauma on the upper rat incisor affects the dental pulp and the odontoblast layer, triggering the formation of significant amounts of reactionary and reparative dentine. Only the reparative dentine was strongly immunoreactive for OPN, a non-collagenous protein abundant in bone matrix but not usually immunodetected in primary and secondary dentine.

Formation of tertiary dentine has been studied mainly by performing cavity preparations with rotatory instruments in order to expose the dental pulp followed by placing capping agents and restorative materials into the cavities (Fitzgerald et al. 1990; Smith et al. 1994; Goldberg et al. 2001). In the present study the 3-mm extrusion of upper rat incisor disturbed the dental pulp, including the dentine–pulp interface, mainly due to the vascular damage that occurred during extrusion rather than by external agents such as bacterial contamination. As the rat incisor tip usually contains large amounts of tertiary dentine, the areas evaluated were restricted to the portion located between the fourth and the seventh millimetres from the apical end, i.e. rather than to areas in which dentine deposition had already ceased and in which the dentine–pulp interface is in a resting stage. The first 3 mm, which correspond to the apical end, were not examined because it is an odontogenic area and the tissue subjacent to the forming dentine is more similar to a dental papilla rather than to a dental pulp itself.

An apparently normal odontoblast layer covered some areas of reactionary dentine, while in others predentine was absent and the odontoblast layer disrupted. In addition, several areas displayed the simultaneous presence of physiological, reactionary and reparative dentine. It is possible that the extrusive trauma has not been sufficient to destroy the original odontoblasts immediately, which secreted a thin layer of reactionary dentine. Subsequently, however, odontoblasts disappeared and pulpal cells differentiated into odontoblast-like cells for secreting a layer of reparative dentine over the pre-existing reactionary dentine. The presence of both types of tertiary dentine in the same region is a rare occurrence in studies using the pulp-capping model because dental pulp is often exposed and the original odontoblasts are quickly destroyed.

Regions of odontoblast-like cells subjacent to reparative dentine were found close to areas with original

odontoblasts subjacent to reactionary dentine. Comparing the thickness of both types of dentine, the reactionary dentine was always thicker. Indeed, reactionary dentine matrix formation only requires the up-regulation of secretory activity of original odontoblasts (Smith et al. 1995; Smith, 2003), while secretion of reparative dentine requires a cascade of events involving cell division, chemotaxis, cell migration, cell adhesion and differentiation into the odontoblast-like cells (Tziafas, 1994; Spahr et al. 2002).

The type of tertiary dentine formed after trauma was related to the type of cells subjacent to the dentinal surface. The cells subjacent to reactionary dentine were original odontoblasts. Interestingly, in the first time points after extrusion, the original odontoblasts subjacent to the physiological dentine contained OPN in their Golgi region. As original odontoblasts usually do not contain intracellular OPN at the resting stage, the intracellular presence of this protein may be required for signalling events in order to trigger the reactivation of odontoblasts for secreting the reactionary dentine. It has been reported that odontoblasts contain OPN in their Golgi region when they are differentiating, i.e. when their activity is starting, although this protein is not immunodetected in the adjacent physiological dentine (Arana-Chavez & Nanci, 2001). In addition, OPN may mediate signals for blocking a possible apoptosis of odontoblast in response to trauma perhaps by autocrine mechanisms, as has been postulated in endothelial and kidney epithelial cells (Denhardt et al. 1995; Scatena et al. 1998; Mazzali et al. 2002). On the other hand, the odontoblast-like cells adjacent to the reparative dentine resembled osteoblasts rather than odontoblasts. Some of these cells displayed their nucleus near the dentine matrix, resembling osteoblasts that are entrapping by bone matrix (Nefussi et al. 1991; Franz-Odenaal et al. 2006). In addition to the entrapped cells, reparative dentine was devoid of dentinal tubules, thus resembling primary bone.

OPN was present in the matrix that surrounded the entrapped cells of reparative dentine, while physiological and reactionary dentine showed no immunoreactivity for this non-collagenous protein. Although biochemical studies usually detect small amounts of OPN in physiological dentine (Fujisawa et al. 1993), immunocytochemical studies have failed to find this protein, possibly due to its presence in amounts below the threshold of immunodetection, or because it may be rapidly processed or even masked by other dentine

matrix components (Arana-Chavez & Nanci, 2001). The distribution of OPN in the reparative dentine matrix among the collagen fibrils or forming patches found throughout the matrix resembles the pattern of immunolabelling observed in primary bone (McKee & Nanci, 1996). This implies that the production of OPN was up- and down-regulated during reparative dentine secretion, thus contributing to the local variations observed at certain sites of matrix. The amount and distribution of OPN in the reparative dentine could at least partially depend on its fast rate of formation, similarly to the development of primary bone (Nanci, 1999). However, although OPN is usually a major constituent of the interfaces between mineralized tissues (McKee & Nanci, 1996), the interfaces between physiological, reactionary and reparative dentine showed no immunoreaction for OPN. It is possible that other non-collagenous components may be participating in the adhesion between physiological and tertiary dentine.

In summary, the present findings showed that reparative dentine shares some structural characteristics with primary bone, especially in relation to its OPN content. Correspondingly, the odontoblast-like cells resemble osteoblasts rather than odontoblasts themselves.

Acknowledgements

We thank Mrs Fernanda Barrence for her technical assistance, Mr Gaspar F. Lima for ultrathin sectioning and Mr Edson Oliveira for printing the electron micrographs. This work was partially supported by CNPq (Brazil).

References

- Arana-Chavez VE, Nanci A (2001) High-resolution immunocytochemistry of noncollagenous matrix proteins in rat mandibles processed with microwave irradiation. *J Histochem Cytochem* **49**, 1099–1109.
- Arana-Chavez VE, Massa LF (2004) Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1367–1373.
- Butler WT (1989) The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* **23**, 123–136.
- Butler WT, Brunn JC, Qin C (2003) Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connective Tissue Res* **44**, 171–178.
- Denhardt DT, Lopez CA, Rollo EE, Hwang SM, An XR, Walther SE (1995) Osteopontin-induced modifications of cellular functions. *Ann NY Acad Sci* **760**, 127–142.
- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS (2001) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* **107**, 1055–1061.
- Fitzgerald M, Chiego DJ, Heys DR (1990) Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol* **35**, 707–715.
- Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE (2006) Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* **235**, 176–190.
- Fujisawa R, Butler WT, Brunn JC, Zhou HY, Kuboki Y (1993) Differences in composition of cell-attachment sialoproteins between dentine and bone. *J Dent Res* **72**, 1222–1226.
- Gericke A, Qin C, Spevak L, et al. (2005) Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int* **77**, 45–54.
- Giachelli CM, Steitz S (2000) Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* **19**, 615–622.
- Goldberg M, Six N, Decup F, et al. (2001) Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res* **15**, 91–95.
- Gravallese EM (2003) Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. *J Clin Invest* **112**, 147–149.
- Massa LF, Arana-Chavez VE (2000) Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci* **108**, 74–77.
- Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J (2002) Osteopontin – a molecule for all seasons. *Q J Med* **95**, 3–13.
- McKee MD, Nanci A (1996) Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover and repair. *Microsc Res Tech* **33**, 141–164.
- Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD (1996) Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech* **33**, 214–231.
- Nanci A (1999) Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol* **126**, 256–269.
- Nefussi JR, Sautier JM, Nicolas V, Forest N (1991) How osteoblasts become osteocytes: a decreasing matrix forming process. *J Biol Buccale* **19**, 75–82.
- Qin C, Baba O, Butler WT (2004) Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Medical* **15**, 126–136.
- Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM (1998) NF-kappaB mediates alphasbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* **141**, 1083–1093.
- Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, et al. (1994) Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Arch Oral Biol* **39**, 13–22.
- Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bégue-Kirn C, Ruch J-V, Lesot H (1995) Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* **39**, 273–280.
- Smith AJ (2003) Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ* **67**, 678–689.

Sodek J, Ganss B, McKee MD (2000) Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* **11**, 279–303.

Spahr A, Lyngstadaas SP, Slaby I, et al. (2002) Expression of amelin and trauma-induced dentin formation. *Clin Oral Invest* **6**, 51–57.

Tziafas D (1994) Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. *Int Endod J* **27**, 61–74.

Tziafas D (1995) Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol* **39**, 281–290.