UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Odontologia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Dissertação

Obtenção de RNA odontoblástico de alta qualidade após o armazenamento de dentes em diferentes condições de temperatura

Ac. Pg. Marcus Cristian Muniz Conde

Pelotas, 2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

MARCUS CRISTIAN MUNIZ CONDE

OBTENÇÃO DE RNA ODONTOBLÁSTICO DE ALTA QUALIDADE APÓS O ARMAZENAMENTO DE DENTES EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Odontologia, área de concentração em Dentística pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

Co-Orientador: Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco

Pelotas, 2010.

Banca examinadora

Prof. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquínio

Prof. Dra. Fabiana Kömmling Seixas

Dr. Rodrigo Varella de Carvalho

Prof. Dra. Adriana Fernandes da Silva (Suplente)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais **Justino** e **Elisabeth** pelo amor e confiança depositados em mim ao longo de todos estes anos de minha formação acadêmica. São meus exemplos de seriedade e integridade

Ao **Pablo** meu irmão e melhor amigo. Obrigado por cada minuto de nossa convivência.

À **Mariluci** minha namorada, pelo amor sincero, incondicional e cúmplice que temos. Obrigado por tornar cada dia da minha vida mais belo...
.

Amo-te tanto, meu amor... não cante
O humano coração com mais verdade...
Amo-te como amiga e como amante
Numa sempre diversa realidade.
Amo-te afim, de um calmo amor prestante
E te amo além, presente na saudade
Amo-te, enfim, com grande liberdade
Dentro da eternidade e a cada instante.
Amo-te como um bicho, simplesmente
De um amor sem mistério e sem virtude
Com um desejo maciço e permanente.
E de te amar assim, muito e amiúde
É que um dia em teu corpo de repente
Hei de morrer de amar mais do que pude.

(Soneto do Amor Total - Vinicius de Moraes)

Agradecimentos

À Sandra, minha orientadora. Pela dedicação, durante estes dois anos, na realização deste trabalho. Por me ensinar como ser “um cara mais organizado” e também pela amizade construída durante este período de intensa aprendizagem;

Ao Flávio, meu co-orientador e grande mestre. Obrigado pelo incentivo e confiança depositados em mim, principalmente em momentos difíceis que passei durante este período. És um grande amigo e um exemplo de docente no qual me espelho;

À Fernanda pela troca de conhecimento. Aprendi muito contigo neste período. Foste indispensável na realização deste trabalho;

Ao Baiano, meu grande amigo pela convivência sempre enriquecedora. Apesar de não ter havido nenhum vínculo formal, teus ensinamento foram essências para a realização deste trabalho;

Aos meus sogros Paulo e Mara (Paulete e Maroca) pela torcida e amizade;

Ao meu camarada Tabajara e à dona Edite pela amizade sincera e a acolhida em sua casa e sua família;

Ao professor Evandro Piva pelo incentivo no início de minha vida acadêmica;

Aos componentes da minha banca de qualificação (Adriana Silva, Fernanda Pappen e Rodrigo Carvalho) pelas colocações extremamente pertinentes;

Ao Guilherme (Clodomildo), por elaborar nosso “sofisticado” método de secção dos dentes e pela dedicação durante o trabalho; Valeu mesmo meu velho;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Tiago Collares e Fabiana Seixas pela receptividade e apoio dedicados a mim na faze final de execução do trabalho;

Ao Farias pela paciência e dedicação durante algumas semanas de trabalho intenso no campus. Muito Obrigado;

Aos amigos Roger, Marcel, Elias, Fernandinho, Marquito, Luísa, Tino, Sinval, Damé, Gabriel, Fabrício, Otávio, Lund, Sandrina, Nani, Mineiro, Iolanda, Dieni, pelos momentos felizes;

Aos docentes e discentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia que de alguma forma contribuíram na minha formação acadêmica;

Ao CNPq pelo auxilio financeiro que permitiu dedicar-me exclusivamente ao curso de mestrado.

“A ciência proporciona o sentido mais estupendo de maravilha em relação ao universo e à vida, algo que obscurece o pequeno, pobre, insignificante e mesquinho sentido de admiração que qualquer religião já conseguiu formar”

(Richard Dawkins)

RESUMO

CONDE, Marcus Cristian Muniz. **Obtenção de RNA odontoblástico de alta qualidade após o armazenamento de dentes em diferentes condições** 2010. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

Extrair RNA de qualidade dos tecidos dentais é um passo crítico para a realização da análise de expressão gênica. Em algumas situações não é possível realizar o isolamento do material genético dos tecidos dentários logo após a exodontia, o que conduz ao descarte do dente. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes formas de armazenamento dos dentes na qualidade do RNA odontoblástico isolado de terceiros molares recém extraídos. Os dentes foram separados de forma aleatória em cinco grupos de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento. No grupo controle o RNA foi isolado imediatamente após o procedimento cirúrgico em temperatura ambiente. As condições experimentais avaliadas foram: armazenamento dos dentes em nitrogênio líquido, -80°C e -20°C durante 24h e armazenamento 4°C durante 6h. Para a extração do RNA os dentes foram seccionados e então o tecido pulpar e a pré-dentina foram imersos, separadamente, em TRIzol. RT-PCR foi utilizado para analisar a efetividade dos métodos de armazenamento através da amplificação dos marcadores da diferenciação odontoblástica (DSPP, DMP1, e MEPE), que foram normalizados contra o gene constitutivo GAPDH. DSPP, DMP1, e MEPE foram amplificados de forma clara em todas as condições avaliadas, independentente do método de armazenamento, ou do tecido avaliado. Foi possível obter RNA de qualidade em polpa e dentina, em todas as condições de armazenamento avaliadas, aumentando assim a disponibilidade de RNA para ser utilizado como controle positivo em estudos de diferenciação celular.

Palavras chave: RT-PCR; odontoblasto; DSPP; MEPE; DMP1; RNA

ABSTRACT

CONDE, Marcus Cristian Muniz. **Gene expression of odontoblast markers of human teeth using different RNA extraction protocols** 2010. Master Science Dissertation – Post graduation Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Isolate high quality RNA form dental tissues is a most critical step to perform gene expression analysis. In some situations it is impossible to achieve the RNA isolation after tooth extraction, which leads to tooth discarding. Since, the aim of this experiment was to verify the effect of different teeth storage methods in the quality of RNA obtained from freshly extracted third molars. The teeth were randomly divided in five groups according to the temperature and storage time conditions. In control group RNA was isolated immediately after tooth extraction in room temperature. Experimental storage conditions evaluated were: liquid nitrogen, -80°C, -20°C (24h) and 4°C (6h). To RNA isolation, teeth were longitudinally sectioned and then pulp and pre-dentin were submerged in TRIzol®. Semi-quantitative RT-PCR was used to analyze the expression of odontoblast makers (DSPP, DMP1, and MEPE), which were normalized against the GAPDH gene. DSPP, DMP1 and MEPE were amplified in all storage conditions evaluated, regardless of storage method or tissue analyzed. Was possible to obtaining high quality RNA from pulp and dentin in all storage conditions appraised, increasing the RNA available to be used as positive control in cell differentiation studies

Key Words: RNA; odontoblast; gene expression; DSPP, DMP1, MEPE; storage.

Lista de Figuras

Figura 1 Projeto	Forma de tratamento dos dentes e sua distribuição nos grupos experimentais.....	Pg. 28
Figure 1 Paper	Illustrative representation of teeth storage way and pulp chamber access……...	Pg. 54
Figure 2 Paper	RT-PCR showing gene expression in human dental pulp tissue pre-dentin. Gel images were imported into TotalLab Quant image analyses software and the optical density of amplified products normalized against the GAPDH……...	Pg. 55
Figure 3 Paper	RT-PCR analysis showing no obvious difference was observed in odontoblastic markers amplification among pulp tissue and pre-dentin……..	Pg. 56

Lista de Tabelas

Tabela 1 Projeto	Illustrative representation of teeth storage way and pulp chamber access……...	Pg. 25
Table 1 Paper	Primer sequences and annealing temperatures used for gene expression analyses…….....	Pg. 57

Lista de abreviaturas e siglas

%	Percentual
®	símbolo indicativo de marca registrada
µ	Micron
µl	Micro litro
µl/ml	microlitro por mililitro
°C	graus Celsius
BSP	Bone Sialoprotein
Ca^{++}	Íons Cálcio
cDNA	Complementar desoxirribonucleic acid
CDP	Complexo Dentino Pulpar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DECM	Dentin extracelular matrix
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMP1	Dentin Matrix Protein 1
DPP	Dentin Phosphoprotein
DPSC	Dental Pulp Stem Cell
DSP	Dentin Sialoprotein
DSPP	Dentin Sialophosphoprotein
et *al*.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
Fig.	Figura
FO/UFPel	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas
G	Grama
G	Grupo Experimental
H	Hora
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
KV	Kilo Voltz
MEC	Matriz Extra-Celular
MEPE	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
ml	Mililitro
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro/Messenger ribonucleic acid

n	número de dentes por grupo experimental
NCP	Non-collagenous Protein
NY	New York
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate Buffer Saline
PNC	Proteína não-colágena
RNA	Ácido Ribonúcleico/Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse Trancriptase – Polymerase Chain Reaction
s	Segundo
SIBLING	Small Integrin-Binding LIgand, N-linked Glycoprotein
SHED	Stem Cell From Human Exfoliated Teeth
SP	São Paulo
UK	United Kingdom
X	Vezes

Sumário

RESUMO 07
ABSTRACT..... 08
Lista de Figuras 10
Lista de Tabelas 11
Lista de Siglas e Abreviaturas 12
1. INTRODUÇÃO 15
2. PROJETO DE PESQUISA: Expressão gênica de marcadores odontoblásticos provenientes de dentes humanos utilizando-se diferentes protocolos de extração de RNA..... 21
3. PAPER (Journal of endodontics): High quality odontoblastic RNA isolation after teeth storage in different temperature conditions..... 41

1. INTRODUÇÃO

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado que corresponde à maior parte do volume da estrutura dental. A fase mineral desse tecido compreende 70% de sua estrutura em peso, enquanto 20% são compostos pela matriz orgânica e os outros 10% são água. Entretanto, em volume a fase mineral corresponde a 50% do volume total enquanto a fase orgânica a 30% (Linde e Goldberg, 1993). Este tecido se forma de um processo dinâmico e extremamente complexo orquestrado por fatores de crescimento (TGF-βs e BMPs) e macromoléculas de origem protéica que são secretadas pelos odontoblastos (Ruch et al., 1995). Fatores de crescimento são moléculas de origem protéica que transmitem sinais entre as células e atuam como mediadores de atividades, como crescimento, diferenciação e morte celular (Smith 2003).

O inicio da dentinogênese, processo de formação da dentina, ocorre durante a transição do estágio de capuz para o estágio de campânula. Sinalizações, orquestradas pelos fatores de crescimento, entre o epitélio oral e o ectomesênquima subjacente regem este processo (Smith 2003). Os fatores de crescimento são produzidos células do epitélio interno do esmalte e logo após transpassam a membrana basal atuando de forma direta sobre as células da papila dentária (Smith e Goldberg 2004). Com este estímulo estas células começam a se organizar em fileiras e adquirem característica ovóide com uma alta relação núcleo/citoplasma. Estas células apresentam um retículo endoplasmático rudimentar e um complexo de golgi pouco desenvolvido (Goldberg & Smith, 2004). Estas estruturas são denominadas de pré-odontoblastos e se encontram num processo dinâmico de reorganização para, dessa forma, adquirirem características de células secretoras de proteínas dando origem aos odontoblastos (Ruch et al., 1995). Os odontoblastos maduros são células altas, colunares, com núcleo polarizado basalmente que possuem um complexo de golgi e retículo endoplasmático rugoso extremamente evoluído (Ruch et al., 1995). Os

odontoblastos são estruturas altamente especializadas que se encontram alinhadas em uma camada uniforme ao redor do tecido pulpar e são as células responsáveis pela formação da dentina (Linde e Goldberg, 1993). Após sua completa diferenciação, estas células são responsáveis pela secreção da matriz extracelular dentinária (MECD), denominada pré-dentina, que servirá de base para formação da dentina. Esta matriz é composta por, aproximadamente, 90% de colágeno (Tipo I, Tipo I Trimer, Tipo IV e V) e 10% de proteínas não-colágenas (PNC) (Ruch et al., 1995). Os odontoblastos mantêm sua atividade secretória durante toda a vida do indivíduo, por conta disso, à medida que o elemento dental é submetido aos desafios funcionais cotidianos, os odontoblastos secretam dentina secundária (Ruch et al., 1995).

A dentina possui uma estrutura tubular que a mantém em intima relação com a polpa, devido à presença dos processos odontoblásticos em seu interior (Linde & Goldberg, 1993). Assim, qualquer estímulo imposto a este tecido irá desencadear resposta dos odontoblastos e das demais células pulpares (Smith et al., 2008). É importante ressaltar que as células odontoblásticas são estruturas pós-mitóticas, não possuem a capacidade de regeneração ou multiplicação, logo, o potencial de regeneração do tecido pulpar é limitado (Tziafas et al., 2000; Arana-Chavez & Massa, 2004). Entretanto quando os odontoblastos são submetidos a injúrias de média intensidade há uma sinalização para que estas células intensifiquem sua atividade secretória.

A polpa dental é um tecido conjuntivo de características únicas que apesar de sua limitada capacidade de regeneração (Arana-Chaves & Massa, 2004) possui um requintado mecanismo de defesa que permite a regeneração parcial das estruturas do complexo dentino-pulpar (CDP) (Arana-Chaves & Massa, 2004). Sólidas evidências demonstram que o tecido pulpar, tanto de dentes decíduos quanto de dentes permanentes (Gronthos et al., 2000, Miura et al., 2003), possui em seu interior uma população de células progenitoras multipotentes. Tais células são capazes de se diferenciarem em células odontoblasto simile que produzem tecido

dentinário (Gronthos et al., 2002, Miura et al., 2003). Estas células são capazes de produzir, sob indução adequada, tecido semelhante à dentina, rodeado por células odontoblastos símiles. Também foi demonstrado que as DPSCs têm capacidade de se diferenciação em adipócitos e células nervosas (Gronthos et al., 2002). Isso demonstra que essas células possuem um grande potencial para uso terapêutico e sua utilização não está subordinada a aspectos éticos e religiosos como as células-tronco embrionárias (Morsczec et al., 2008).

Lesões cariosas de progressão lenta desencadeiam eventos moleculares que sinalizam para os odontoblastos intensificarem sua atividade secretória e assim, produzir dentina reacional no local subjacente à injúria (Goldberg & Smith, 2004). Entretanto, quando o CDP é submetido a injúrias de grande intensidade, como lesões de cárie aguda, que proporcionam a destruição dos odontoblastos (Bjorndal & Mjör, 2001) há uma sinalização para que a população de células progenitoras, presente no tecido pulpar, migre para o sitio da injúria (Arana-Chaves & Massa, 2004). Após o processo de migração, essas células se diferenciam em odontoblasto simile e iniciam a secreção de dentina reparadora (Nakashima, 2005). Assim como na dentinogênese, a diferenciação celular é uma premissa para que o reparo do CDP ocorra. Esta diferenciação é orquestrada por moléculas bioativas (TGFβ e BMP) que induzem células indiferenciadas a se tornarem estruturas altamente especializadas com capacidade de secretar matriz extracelular – MEC (Smith, 2008).

O mecanismo envolvido na diferenciação das DPSCs em odontoblastos permanece obscuro, e para se confirmar o processo de diferenciação celular é preciso estudar-se detalhadamente a expressão de marcadores celulares específicos (Wei et al., 2007). A caracterização fenotípica das células odontoblásticas é realizada principalmente pela análise bioquímica das proteínas da matriz extracelular (MEC) da dentina, as quais são consideradas marcadores da completa diferenciação dessas células (Ruch, 1995).

Dentre as PNC da MECD encontra-se um grupo que desempenha importante papel na promoção e controle da mineralização no tecido ósseo e dentinário. Essa classe de proteínas é denominada SIBLING - *Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein* (Qin et *al*., 2004). Essa família de proteínas geneticamente relacionadas está alocada no cromossomo humano 4q21 (Huq et *al*., 2005) e são altamente fosforiladas apresentando característica acídica. As SIBLINGs se ligam fortemente à hidroxiapatita e aprestam motivo RGD com afinidade à integrina (Qin et al., 2004). Essa família protéica inclui: OPN (*Ostepontin*), BSP (*Bone Sialoprotein*), DSPP (*Dentin Sialophosphoprotein*), DMP1 (*Dentin Matrix Protein 1*) e MEPE (*Matrix extracellular phosphoglycoprotein*) sendo as três ultimas, consideras atualmente como marcadores da diferenciação de células odontoblásticas (Qin et *al*., 2004).

A DSP (Dentin sialoprotein), segunda substância mais abundante na MEC dentinária, e a DPP (Dentin phosphoprotein) são codificadas por um gene chamado de DSPP – *Dentin Sialophosphoprotein* – (MacDougall et *al*., 1997, Feng et *al*., 1998). Ambas, DSP e DPP são encontradas na MECD, entretanto DSPP representando a seqüência completa da proteína nunca foi isolada. Anteriormente se acreditava que esse gene era um marcador específico para diferenciação odontoblástica (Gu et *al*., 2000). Entretanto Qin et *al*., (2002) detectou a presença dessa substância em tecido ósseo, em pequena quantidade (1/400) comparada à encontrada na dentina (Qin et *al*., 2002). Os fragmentos protéicos da DSPP desempenham papel crucial na dentinogênese. Enquanto regula o início da mineralização a DPP realiza a função de ligar os íons Ca^{2+} às fibras colágenas. Dessa forma a DPP atua como nucleador de cálcio regulando o crescimento dos cristais de hidroxiapatita influenciando no seu tamanho e forma (Yamakoshi, 2009). Foi demonstrado que a mutação ou ausência de DSPP é responsável por desordens na formação de tecido dentinário, entre elas dentinogênese imperfeita tipo I e II e displasia dentinária tipo II (Macdougall et al., 2006).

A DMP1 é uma importante PNC secretada por pré-odontoblastos e odontoblastos encontrada em relativa abundância na MECD. Esta molécula desempenha importante papel na mineralização da pré-dentina, pois devido à sua natureza ácida, pode se ligar ao cálcio, iniciando assim o processo de nucleação da hidroxiapatita (George et al., 1993). Essa capacidade de agregação de Ca^{++} foi confirmada por He et *al*. (2003), os quais demonstraram que DMP1 recombinante pode iniciar a nucleação da hidroxiapatita *in vitro* (He et *al*., 2003). Foi demonstrado também que essa molécula *in vitro* pode induzir a diferenciação de DPSCs em células odontoblastóides que expressam marcadores odontoblásticos (Narayanan et *al*., 2001; Almushayt et *al*., 2006). Apesar de seu cDNA ter sido clonado (George et al., 1993) a estrutura completa da proteína nunca foi isolada (Qin et al., 2007). Entretanto, foram encontrados dois fragmentos da DMP1, 37KDa N-terminal e 57KDa C-Terminal, na MECD. DMP1 foi isolada originalmente em tecido dentinário (George et al., 1993) e assim era considerado um marcador específico de odontoblastos. Entretanto foi demonstrado que esta NPC é expressa também em tecido ósseo (MacDougall et al., 1997) e mais recentemente em tecido moles como o cérebro, rins e glândulas salivares (Qin et al., 2007). A ausência ou mutações dessa molécula impedem a completa maturação da pré-dentina em dentina o que consequentemente produz um dente com a câmara pulpar maior e consequentemente, tecido dentinário hipomineralizado

A MEPE é uma molécula que foi recentemente descoberta (Petersen et al., 2000) e sabe-se que ela desempenha importante papel no metabolismo dos tecidos mineralizados e foi identificada na matriz extracelular de osso e dentina (Rowe et al. 2000; MacDougall et al., 2002). MEPE é expressa em tecido ósseo por osteoblastos completamente diferenciados e está associada com a mineralização deste tecido (MacDougall et al., 2002). A busca por um fragmento bioativo da MEPE resultou na síntese de uma molécula denominada dentonin (AC-100, Acologix, Emeryville, CA, USA), e foi demonstrado que esse fragmento da MEPE proporciona um aumento na proliferação de DPSCs (Liu et al., 2004).

Por essas características acima citadas, especulou-se que a MEPE poderia ser utilizada, assim como a DSPP e a DMP1, como um marcador da diferenciação de células odontoblásticas. Entretanto, existem ainda controvérsias com relação à utilização da MEPE como marcador odontoblástico. Foi demonstrado que DPSCs, após serem cultivadas em meio capaz de induzir a odontogênese (Liu et al., 2005), não amplificaram o gene referente à MEPE. Entretanto Wei (Wei et al., 2007) revelaram por análises de PCR em tempo real que após as células tronco serem induzidas à diferenciação odontogênica, houve um aumento significativo da expressão dessa molécula.

A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar que funde princípios e inovações da engenharia e das ciências biológicas (Langer & Vacanti, 1993). Este campo da ciência tem por objetivo o reparo ou substituição de um órgão baseado nos princípios do desenvolvimento molecular governado pelos pela bioengenharia (Nör et al., 2006). Os três pilares fundamentais deste campo da ciência são: moléculas bioativas, os scaffolds – estruturas tridimensionais que servem como substrato para a adesão e proliferação celular simulando assim a matriz extracelular – e as células com capacidade de proliferação e diferenciação em uma ampla gama de tecidos (Nör, 2006). Na odontologia, o desenvolvimento de terapias que visam à regeneração ou reparo biológico das estruturas do complexo dentino-pulpar tem produzido um crescente interesse entre os pesquisadores da área (Smith et al., 2008). Dessa forma o objetivo é que, em um futuro na distante, seja possível reestruturar ou reconstruir o tecido pulpar de dentes que tiveram a estrutura pulpar comprometida por cárie através de procedimentos endodônticos regenerativos baseados em engenharia tecidual (Nör et al., 2006). Neste contexto, o conhecimento aprofundado sobre os marcadores odontoblásticos é crucial para o desenvolvimento de novas terapias baseadas na engenharia tecidual.

2. PROJETO DE PESQUISA: Expressão gênica de marcadores odontoblásticos provenientes de dentes humanos utilizando-se diferentes protocolos de extração de RNA

INTRODUÇÃO

A dentina é o maior constituinte mineral do órgão dental. Este tecido é formado pelos odontoblastos, células altamente especializadas alinhadas em uma camada uniforme ao redor do tecido pulpar (Linde e Goldberg, 1993). As células odontoblásticas secretam uma matriz extracelular rica em colágeno chamada de pré-dentina, a qual subseqüentemente sofre a deposição de cristais de apatita para formação de dentina primária. Mesmo após a sua completa diferenciação, estas células mantêm sua atividade secretória, e, à medida que o elemento dental é submetido aos desafios funcionais cotidianos, os odontoblastos secretam dentina secundária (Ruch et *al*., 1995). Quando o complexo dentino-pulpar (CDP) é submetido a injúrias de média intensidade há uma sinalização para as células odontoblásticas subjacentes intensificarem sua atividade secretória para produção de dentina reacional no local correspondente à injúria, com o intuito de criar uma barreira protetora (Smith, 2003). É importante ressaltar que as células odontoblásticas são estruturas pós-mitóticas, não possuem a capacidade de regeneração ou multiplicação, logo, o potencial de regeneração do tecido pulpar é limitado (Tziafas *et al*., 2000; Arana-Chavez & Massa, 2004). Entretanto, quando o CDP é submetido a injúrias de maior intensidade (doença cárie ou trauma, por exemplo), que proporcionam a destruição dos odontoblastos, a polpa dental tem capacidade de ativar células progenitoras presentes no seu interior para diferenciarem-se em células *odontoblasto-símilis* e produzirem dentina regenerativa (Nakashima, 2005; Silva *et al*., 2006).

No início dos anos 2000, uma equipe de pesquisadores isolou pela primeira vez uma população de células-tronco adultas da polpa dental humana (Gronthos et *al.,* 2000). Estas células mostraram-se como estruturas multipotentes, com alta capacidade de proliferação e diferenciação sendo

denominadas *Dental Pulp Stem Cells* – DPSC - (Gronthos et *al*., 2000). Os mesmos pesquisadores ainda observaram que estas células quando implantadas *in vivo* foram capazes de produzir, sob indução adequada, tecido semelhante à dentina, rodeado por células odontoblastos símiles. Em trabalho adicional, as DPSCs demonstraram também ter capacidade de diferenciação em adipócitos e células nervosas (Gronthos et *al*., 2002). Isso demonstra que essas células possuem um grande potencial para uso terapêutico e sua utilização não está subordinada a aspectos éticos e religiosos como as células-tronco embrionárias (Morsczec et *al*., 2008). Apesar disso, o mecanismo envolvido na diferenciação das DPSCs em odontoblastos permanece obscuro, e para se confirmar o processo de diferenciação celular é preciso estudar-se detalhadamente a expressão de marcadores celulares específicos (Wei et *al*., 2007).

A caracterização fenotípica das células odontoblásticas é realizada principalmente pela análise bioquímica das proteínas da matriz extracelular (MEC) da dentina, as quais são consideradas marcadores da completa diferenciação dessas células. A principal substância secretada pelos odontoblastos é o Colágeno Tipo I, além de uma ampla gama de proteínas que não possuem colágeno em sua estrutura. Dentre essas proteínas não-colagenosas (PNC) encontra-se um grupo que desempenha importante papel na promoção e controle da mineralização no tecido ósseo e dentinário. Essa classe de proteínas é denominada SIBLING - *Small Integrin-Binding LIgand, N-linked Glycoprotein* (Qin et *al*., 2004). Estas proteínas compartilham características semelhantes, já que, são encontradas no cromossomo humano 4q21 (Huq et *al*., 2005) e apresentam uma estrutura semelhante de seus exons o que permite que apresentem uma expressão qualitativamente semelhante em dentina e osso, apesar de se manifestarem em concentrações diferentes em cada tecido (Qin et *al*., 2001a). As SIBLINGs conhecidas atualmente são: OPN (*Ostepontin*), BSP (*Bone Sialoprotein*), DSPP (*Dentin Sialophosphoprotein*), DMP1 (*Dentin Matrix Protein 1*) e MEPE (*Matrix extracellular phosphoglycoprotein*) sendo as três ultimas encontradas em maior concentração na MEC dentinária (Qin et *al*., 2004).

A DSP (dentin sialoprotein), segunda substância mais abundante na MEC dentinária, e a DPP (dentin phosphoprotein) são codificadas por um gene chamado de DSPP – *Dentin Sialophosphoprotein* – (MacDougall et *al*., 1997, Feng et *al*., 1998). Anteriormente se acreditava que esse gene era um marcador específico para diferenciação odontoblástica (Gu et *al*., 2000). Entretanto Qin et *al*., (2002) detectou a presença dessa substância em tecido ósseo, em pequena quantidade (1/400) comparada à encontrada na dentina (Qin et *al*., 2002). Apesar disso, estudos (Wei et *al*., 2007; Liu et *al*., 2005) demonstram que quando DPSCs são cultivadas em meios de cultura que proporcionam a diferenciação odontogênica há um aumento na expressão da DSPP.

Também é encontrada na dentina a DMP1 (*Dentin Matrix Protein 1*), uma importante PNC secretada por pré-odontoblastos e odontoblastos. Esta molécula desempenha importante papel na mineralização da pré-dentina, pois devido à sua natureza ácida, a DMP1 pode se ligar ao cálcio, iniciando assim o processo de nucleação da hidroxiapatita (Linde e Goldberg 1993). Essa capacidade de agregação de Ca^{++} foi confirmada por He et *al*. (2003), os quais demonstraram que DMP1 recombinante pode iniciar a nucleação da hidroxiapatita *in vitro* (He et *al*., 2003). Foi demonstrado também que essa molécula *in vitro* pode induzir a diferenciação de DPSCs em células odontoblastóides que expressam marcadores odontoblásticos (Narayanan et *al*., 2001; Almushayt et *al*., 2006).

Mais recentemente foi descoberta a SIBLING denominada MEPE. Esta proteína foi originalmente descoberta em tecido ósseo e demonstrou-se ativa no metabolismo deste tecido. Foi relatado também sua presença nos tecidos dentais e um fragmento chamado *dentonin* foi capaz de promover a diferenciação de DPSCs (Liu et *al*., 2004). No entanto, estudos in vitro demonstraram após a indução de DPSCs em meio adequado para a estimulação odontogênica que houve uma diminuição na expressão do mRNA dessa molécula (Liu et *al*., 2005; Demarco et al. 2008 – Dados não publicados). Tais resultados sugerem que MEPE pode ser utilizado como marcador de diferenciação odontoblástica juntamente com DSPP e DMP1.

Uma das formas de se avaliar a manifestação dessas moléculas é através da expressão de seus mRNAs. Porém poucos estudos avaliaram os métodos de

extração do RNA dos odontoblastos na literatura. McLachlan et *al*., (2005) descreveram um método pelo qual foi realizada a extração do RNA, em dentes recém extraídos, comparando a expressão de marcadores odontoblásticos. Neste trabalho, logo após a extração, os dentes foram imediatamente armazenados em nitrogênio liquido ou em uma solução estabilizadora de RNA à temperatura ambiente. Estes autores puderam observar que em dentes sadios há uma melhor expressão de marcadores odontoblásticos quando há um prévio resfriamento da estrutura dentária. Demarco et *al*. (dados não publicados) também obtiveram RNA de dentes recém extraídos, seccionando-os e, após a remoção da polpa, realizando a raspagem da dentina na região da pré-dentina, sendo o produto obtido colocado em TRIzol, para que então se procedesse à extração do RNA. No entanto, no primeiro estudo foi realizado o congelamento do dente por 1 hora, enquanto no segundo o RNA foi extraído imediatamente após extração do dente.

Há que se considerar que em algumas situações fica extremamente difícil, ou por vezes impossível, realizar a extração do RNA imediatamente após o dente ser removido da cavidade bucal, devido à instabilidade inerente a este ácido nucléico e, quando isto acontece, é recomendado o descarte da amostra. Muitas vezes, pelo aquecimento ocasionado durante o processo de seccionamento, podem ocorrer danos à camada odontoblástica, prejudicando a avaliação de sua expressão gênica (McLachlan et *al*., 2005). A possibilidade de congelamento imediato dos dentes recém extraídos em freezer a -80°C, antes de se realizar a clivagem do elemento dentário para remoção da polpa, parece ser uma alternativa viável de preservação tecidual na realização do método de extração do RNA (McLachlan et *al*., 2005).

OBJETIVO

Estabelecer formas alternativas de armazenamento de dentes para extração mediata de RNA de células odontoblásticas de terceiros molares recentemente extraídos.

HIPÓTESES

Na realização do presente estudo as hipóteses testadas serão as seguintes:

- os dentes dos grupos experimentais que permanecerão armazenados em geladeira durante 6h horas apresentarão significativa degradação de RNA;
- os dentes que forem submetidos ao congelamento prévio apresentarão uma melhor expressão dos marcadores odontoblásticos em tecido pulpar, enquanto os dentes processados em temperatura ambiente apresentarão uma melhor amplificação destes marcadores em tecido dentinário

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

Neste estudo serão utilizados 15 terceiros molares com indicação de extração por motivos ortodônticos obtidos de pacientes, sadios entre 18 e 30 anos, da Faculdade de Odontologia da UFPel (FO-UFPel). Os indivíduos serão previamente informados sobre o projeto através de um termo de consentimento livre e esclarecido (anexos 1a e 1b). Os dentes serão doados mediante a assinatura de um termo obtido junto ao Banco de Dentes da FO-UFPel e a autorização prévia do mesmo para o seu uso imediato após a exodontia (anexo 2). Logo após a realização do procedimento cirúrgico de extração, os dentes serão acondicionados em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), para transporte – composto por 300µl/ml de penicilina, 300 µl/ml de estreptomicina, 0,75 µl/ml de anfotericina – e imediatamente enviados ao laboratório. A partir daí, os elementos dentários serão divididos em cinco grandes grupos experimentais (Figura 1.) da seguinte forma:

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais

Divisão dos grupos experimentais para extração de RNA	
G TA	Extração imediata do RNA sob temperatura ambiente
G -20°C	Armazenamento a -20°C após a exodontia durante 6 horas para posterior extração do RNA
G -80°C	Armazenamento a -80°C após a exodontia durante 6 horas para posterior extração do RNA
G NL	Armazenamento em nitrogênio líquido durante 1 hora para posterior extração do RNA
G 6hTA	Armazenamento durante 6h no meio de transporte em temperatura ambiente para posterior extração do RNA

Figura 1. Forma de tratamento dos dentes e sua distribuição nos grupos experimentais

4.1 Extração de RNA

Devido ao caráter semi-quantitativo da análise de RT-PCR tornou-se inviável a realização de um calculo de amostra. Para definição do “n” amostral foram utilizados como base os estudos de McLachlan et *al*. (2005) e Demarco et *al*. (2008) que realizaram esta metodologia e obtiveram resultados consistentes.

Os dentes de cada grupo experimental serão seccionados longitudinalmente com um disco diamantado em alta velocidade (300.000 RPM), utilizando solução salina estéril como agente de refrigeração. Então o tecido pulpar será previamente removido com a utilização de curetas de dentina estéreis e em seguida será realizada a raspagem da pré-dentina, a qual será imersa em TRIzol®, seguindo o protocolo padrão para extração de ácido ribonucléico (RNA), conforme descrito previamente (McLachlan et *al*., 2005; Demarco et *al*., 2005). Empregando o mesmo protocolo, será também extraído o RNA da polpa dentária dos dentes referentes aos quatro grupos experimentais.

O RNA total extraído será utilizado em RT-PCR (Transcrição reversa – reação em cadeia de polimerize) para amplificar os seguintes marcadores odontoblásticos: DSPP (*senso 5’ gaccccttcattgacctcaact 3’, antisense 5’ tgccatttgctgtgatgttt 3’; 181 bp*), DMP-1 (*sense 5’caggagcacaggaaaaggag 3’, antisense 5’ ctggtggtatcttgggcact 3’; 213 bp*) e MEPE (sense 5’ gcaaaagcacccatcgtatt 3’, antisense 5’ ctgccctctacaaggctgac 3’; 385 bp). Os primers específicos para cada um desses marcadores celulares serão desenvolvidos de acordo com a seqüência de cDNA publicada no GenBank. Os produtos de RT-PCR serão analisados por eletroforese em gel de agarose a 1.5%, contendo SYBR Green, numa voltagem de 80KV durante 30 minutos. Desta forma, será procedida a densitometria óptica das bandas correspondentes aos marcadores celulares analisados, sendo para isso utilizado um software específico. As bandas serão normalizadas contra as densidades das bandas de GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), um gene constitutivo celular. Neste estudo RT-PCR será realizado em uma única etapa com auxílio do *Super Script one step RT-PCR com Platinum Taq Kit*, o que permite que a transcrição reversa e a amplificação dos genes estudados ocorram seqüencialmente em um único tubo sob condições otimizadas.

5. Resultados esperados e Impactos do trabalho

Com a execução deste projeto pretende-se ter o domínio e o conhecimento do melhor protocolo de extração de RNA da estrutura dentinária, bem como da maneira ideal de acondicionamento dos dentes, visando minimizar a degradação de seu RNA.

Com o aprimoramento da técnica de extração de RNA de estruturas dentárias, almeja-se estabelecer um protocolo ideal que gere como produto final, RNA em maior quantidade e mais puro, evitando maiores perdas amostrais. Uma vez estabelecido tal protocolo, o mesmo poderá ser útil para o desenvolvimento de futuros trabalhos de pesquisa envolvendo engenharia tecidual dental, bem como testes de compatibilidade biológica de materiais odontológicos, numa situação mais próxima da realidade clínica.

6. Cronograma – Plano de atividades

Ano 2009

Meses de Fevereiro/Março

- Levantamento Bibliográfico do assunto
- Treinamento para o desempenho das atividades laboratoriais.
- Aquisição de equipamentos e materiais de consumo para a execução do projeto.
- Qualificação e defesa do projeto de pesquisa de dissertação Mestrado em Odontologia – área de concentração em Dentística.

Meses de Abril/Maio/Junho/Julho

- Levantamento Bibliográfico do assunto
- Início das atividades laboratoriais com extração de RNA dos dentes todos os grupos experimentais com o desenvolvimento da técnica de RT-PCR.
- Preparo de géis de agarose para eletroforese.
- Preparo de lâminas histológicas para a realização da técnica imunoistoquímica para DSP.
- Execução da técnica de imunoistoquímica.
- Análise histológica das lâminas coradas para H&E e para a técnica imunoistoquímica.
- Preparo de relatório final do trabalho e de resumos do trabalho desenvolvido para a participação em congressos locais (CIC) e nacionais (SBPqO), bem como a apresentação do trabalho nestes eventos.

Meses de Agosto/Setembro/Outubro

- Levantamento Bibliográfico do assunto.
- Continuidade de todas as atividades laboratoriais descritas no trimestre anterior.
- Início das atividades de redação da dissertação e artigos

Meses de Novembro/Dezembro

- Levantamento Bibliográfico do assunto e finalização das atividades laboratoriais descritas no trimestre anterior.
- Preparo de relatório final do trabalho
- Continuidade das atividades de redação da dissertação e artigos

Ano de 2010

Meses de Janeiro/Fevereiro e Março

- Levantamento Bibliográfico
- Preparo de resumos do trabalho desenvolvido para a participação em congressos locais (CIC) e nacionais (SBPqO), bem como a apresentação do trabalho nestes eventos.
- Finalização das atividades de redação da dissertação e artigos
- Envio dos artigos produzidos para periódicos internacionais indexados na base de dados PubMed
- Defesa da dissertação

8. Orçamento

Os equipamentos e estrutura física a serem utilizados neste projeto encontram-se disponíveis no CDDB e nos Laboratórios de Imunoistoquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFPel, representando a contrapartida da Instituição. A seguir estão listados e orçados os materiais de consumo específicos, necessários para a realização para deste projeto. Apesar do mesmo não contar, até o presente momento, com financiamento próprio, a sua coordenadora dispõe de recursos de outros projetos que poderão ser partilhados com o atual, para que se torne viável a sua execução.

Os primers para DSPP, DMP1, MEPE e GAPDH serão gentilmente doados pelo Prof. Jacque Eduardo Nor – Laboratory of Angiogenesis, UMICH, Ann Arbor, MI, USA.

Material	Quantidade	Montante
TRIzol	1	R$730,00
DMEM 1x	2	R$500,00
Anticorpo anti-DSP humana	1	R$750,00
Total		R$1980,00

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMUSHAYT A., NARAYANAN K., ZAKI A.E.,GEORGE A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. Gene Therapy n.13, p.611–620, 2006.

ARANA-CHAVES V.E., MASSA L.F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v.36, n.8, p.1367-1373, 2004.

FENG J.Q., LUAN X., WALLACE J., JING D., OHSHIMA T., KULKARNI A.B., D'SOUZA R.N., KOZAK C.A., MACDOUGALL M. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. The Journal of Biological Chemistry, v.273, n.16, p.9457-9464, 1998.

GU K., CHANG S., RITCHIE H.H., CLARKSON B.H., RUTHERFORD RB. Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene. European Journal of Oral Sciences, v.108, n.1, p.35-42, 2000.

GRONTHOS S., MANKANI M., BRAHIM J., GEHRON ROBEY P., SHI S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy Science USA, v. 97, n. 25, p.13625–13630, 2000.

GRONTHOS S., BRAHIM J., LI W., FISHER L.W., CHERMAN N., BOYDE A., DENBESTEN P., GEHRON ROBEY P.,. SHI S. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. Journal of Dental Research, v.81, n.8, p.531-535, 2002

HE G., DAHL T., VEIS A., GEORGE A. Dentin matrix protein 1initiates hidroxiapatita formation in vitro. Connective Tissue Research, n.44, p.240-245, 2003.

HUQ N. L., CROSS K. J., UNG M., REYNOLDSE.C. A review of protein structure and gene organization for proteins associated with mineralized tissue and calcium phosphate stabilization encoded on human chromosome 4. Archives of Oral Biology, n.50, p. 599-609, 2005.

LINDE A., GOLDBERG M. Dentinogenesis. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, v.5, n.4, p.679-728, 1993.

LIU H., LI W., GAO C., KUMAGAI Y., BLACHER R.W., DENBESTEN P.K. Dentonin: a fragment of MEPE enhanced dental pulp stem cell proliferation. Journal of Dental Research, n.83, p.496, 2004.

LIU H., LI W., SHI S., HABELITZ S., GAO C., DENBESTEN P. MEPE is down regulated as dental pulp stem cells differentiate. Archives of Oral Biology, n.50, p.923-928, 2005.

MACDOUGALL M., SIMMONS D., LUAN X., NYDEGGER J., FENG J., GU T.T. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. The Journal of Biological Chemistry, v.272, n.2, p.835-842, 1997.

MCLACHLAN J.L., SMITH A.J., BUJALSKA I.J., COOPER P.R. Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, v.1741, n.3, p.271-281, 2005.

MORSCZECK C., SCHMALZ G., REICHERT T.E., VÖLLNER F., GALLER K., DRIEMEL O. Somatic Stem Cells for Regenerative Dentistry. Clinical Oral Investigation, n. 12, p.113-118, 2008.

NAKASHIMA M., AKAMINE A. The Application of Tissue Engineering to Regeneration of Pulp and Dentin in Endodontics. Journal of Endodontics, v.31, n.10, p. 711-718, 2005.

NAKASHIMA M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. Cytokine & Growth Factor Reviews, v.16, n.3, p.369-376, 2005

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. Proceedings of the National Academy Science USA, n.98, p.4516–4521, 2001.

QIN C., BRUNN J.C., JONES J., GEORGE A., RAMACHANDRAN A., GORSKI J.P. A comparative study of sialic acid-rich proteins in rat bone and dentin. European Journal of Oral Science n.109, p.133-141, 2001a.

QIN C, BRUNN JC, CADENA E, RIDALL A, TSUJIGIWA H, NAGATSUKA H. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. Journal of Dental Research n.81, p.392-394, 2002

.

QIN C., BABA O., BUTLER W.T. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, v. 15, n.3, p.126-136, 2004.

RUCH J.V., LESOT H., BEGUE-KIRN C. Odontoblasts differentiation. International Journal of Developmental Biology – Special Reviews. n.39 p.51-68, 1995.

SMITH A.J. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: Growth factors as key mediators. Transfer of Advances in Science into Dental Education, v.67, n.6, p.678-689, 2003.

SILVA F.H., NARDI N.B. From leading role to the backstage: Mesenchymal stem cells as packaging cell lines for in situ production of viral vectors. Medical Hypotheses, v.67, n.4, p. 922-925, 2006.

TZIAFASA D., SMITHB A.J., LESOTC H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. Journal of Dentistry, v.28, n.2, p.77-92, 2000.

WEI X., LING J., WU L., LIU L., XIAO Y. Expression of Mineralization Markers in Dental Pulp Cells. Journal of Endodontics, v. 33, n. 6, p. 703-708, 2007 .

ZHAN X., ZHAO J., LI C. DSSP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. Nature Genetics, v.27, p. 151-152, 2001.

Anexo 1 – Termo de doação

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
GRUPO PET
BANCO DE DENTES HUMANOS

TERMO DE DOAÇÃO

Eu,_____,
natural de, _____, sexo, _____,
residente à,_____
telefone, (__), _____, portador do RG, _____,
aceito doar o(s) dente(s), _____,
para o **BANCO DE DENTES HUMANOS DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – RS,** ciente de que o(s) mesmo(s) será(ão) utilizado(s) pelos alunos desta Faculdade para o estudo e treinamento pré-clínico. Estou consciente de que este(s) dente(s) foi (foram) extraído(s) por indicação terapêutica para melhoria de minha saúde, como documento em meu prontuário. Caso este(s) dente(s) seja(m) utilizado(s) em pesquisa, esta deverá ter sido aprovada pelo **Comitê de Ética em Pesquisa da FO/UFPel,** sendo preservada minha identidade na divulgação

Pelotas,__de _____ de 20__.

_____
Assinatura do paciente

Anexo 2a - Carta de informação.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Carta de Informação ao Paciente

Neste estudo serão utilizados terceiros molares humanos recentemente extraídos para que se realize a avaliação de diferentes métodos de extração do RNA (material genético) dos odontoblastos (células do dente). Logo após a realização do procedimento cirúrgico de extração, os dentes serão acondicionados em um meio de transporte apropriado para que sejam levados ao laboratório. Os dentes serão seccionados longitudinalmente com um disco diamantado em alta velocidade (300.000 RPM), e o tecido pulpar será previamente removido com a utilização de curetas de dentina estéreis e em seguida será realizada a raspagem da pré-dentina, a qual será imersa em TRIzol®, seguindo o protocolo padrão para extração de ácido ribonucléico (RNA). Os protocolos utilizados para a realização deste estudo não implicam em nenhum risco à integridade do ser humano.

Assim sendo, dou pleno consentimento à Faculdade de Odontologia de Pelotas para que, por intermédio de seus professores, alunos de pós-graduação e graduação devidamente autorizados, utilizem meu dente de acordo com os conhecimentos enquadrados no campo dessa especialidade.

Concordo também, que a documentação referente ao estudo constitui propriedade exclusiva dessa Faculdade, à qual dou plenos direitos de uso para fins de ensino e divulgação, respeitando os respectivos códigos de ética.

Pelotas, _____de _____de 2008.

_____ Documento: _____

Assinatura do paciente N.º _____

Anexo 2b - Termo de consentimento ético para pesquisa em seres humanos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Autorização para Pesquisa Clínica e Execução de Tratamento

Projeto: *Expressão gênica de marcadores odontoblásticos provenientes de dentes humanos utilizando-se diferentes protocolos de extração de RNA*

Responsável: Prof. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquínio

NOME DO PACIENTE: _____

FICHA N.º: _____

Por este instrumento que atende às exigências legais, o(a) senhor(a) _____, portador (a) da cédula de identidade n.º _____SSP/____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pelo(s) profissional(is) em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e do explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal pode, a qualquer momento, retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, sem ser prejudicado no tratamento, e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Pelotas, _____ de _____de 2008.

_____ _____

Assinatura do paciente Responsáveis pelo estudo

3. PAPER (Journal of Endodontics): High quality odontoblastic RNA isolation after teeth storage in different temperature conditions

Marcus Cristian Muniz Conde[1]
Fernanda Nedel[2]
Vinicius Farias Campos[2]
Flávio Fernando Demarco [1]
Anthony Smith[4]
Jacques Eduardo Nör[5]
Sandra Beatriz Chaves Tarquinio[3,]

[1] Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas – Brazil

[2] Post graduation program in Biotechnology, Federal University of Pelotas, Pelotas – Brazil

3 Department of Semiology and Clinics, Federal University of Pelotas, Pelotas - Brazil

[4] Oral Biology, School of Dentistry, University of Birmingham, St. Chads Queensway, UK

[5] Department of Cariology, Restorative Sciences and Endodontics, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor – United States of America

Abstract

Introduction: Isolate high quality RNA form dental tissues is a most critical step to perform gene expression analysis. In some situations it is impossible to achieve the RNA isolation after tooth extraction, which leads to tooth discarding. Since, the aim of this experiment was to verify the effect of different teeth storage methods in the quality of RNA obtained from freshly extracted third molars. **Methods:** The teeth were randomly divided in five groups according to the temperature and storage time conditions. In control group RNA was isolated immediately after tooth extraction in room temperature. Experimental storage conditions evaluated were: liquid nitrogen, -80°C, -20°C (24h) and 4°C (6h). To RNA isolation teeth were longitudinally sectioned and then pulp and pre-dentin were submerged in TRIzol®. Semi-quantitative RT-PCR was used to analyze the expression of odontoblast makers (DSPP, DMP1, and MEPE), which were normalized against the GAPDH gene. **Results:** DSPP, DMP1 and MEPE were amplified in all storage conditions evaluated, regardless of storage method or tissue analyzed. **Conclusion:** was possible to obtaining high quality RNA from pulp and dentin in all storage conditions appraised, increasing the RNA available to be used as positive control in cell differentiation studies

Keywords: RNA; odontoblast; gene expression; DSPP; DMP1; MEPE; storage

Introduction

Recent advances in molecular and cellular biology have led to new perspectives in research to provide the pulp regeneration (1). Evidences have shown that the dental pulp from both permanent and primary teeth, contains a high proliferative and multi-lineage subpopulation of cells named Dental Pulp Stem Cells (DPSC's) and Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHED) respectively (2, 3). These cells are capable of differentiating in many directions, according to stimulation, including odontoblastic cells (4). When tooth is submitted to deep cavity preparation, severe carious lesions or trauma, destruction of odontoblastic layer may occur (5), attracting these multipotent progenitor stem cells to the injury site. Thereafter, these cells differentiate into odontoblast-like cells, replacing the necrotic odontoblasts, and starting the reparative dentine matrix deposition (6). In dentistry, the future goal is to repair the tooth structure damaged by deep caries lesions or trauma, based on regenerative endodontic procedures (1). However, the transition of regenerative endodontics to the clinic requires better understanding of specific cellular signals required for the differentiation of stem cells into odontoblasts (6).

The odontoblastic cells characterization is performed trhough biological analysis of non-collagenous proteins (NCP) present in dentin extracellular matrix (DECM), which are considered markers of differentiated odontoblasts (7). Among these molecules figure Dentin Sialoprotein (DSP) and Dentin Phosphoprotein (DPP), two highly phosphorylated noncollagenous proteins secreted by odontoblasts and codified by DSPP gene (8). It has been demonstrated that DSPP mRNA is up-regulated in a time-dependent manner when DPSCs are cultured in odontogenic induction medium (9). Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) is a preodontoblastic protein that due to its acidic nature can bind to calcium, thereby initiating the hydroxyapatite nucleation processes (Linde, 1993; Qin et al., 2007). Also, DMP1 can induce DPSC's differentiation in odontoblast-like cells (10). Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is a member of proteins related with bone metabolism (11) and MEPE fragment called *dentonin* was detected in dental tissues and a was able to promote DPSCs differentiation in odontoblast-like cells (12). Thus, a deep molecular

knowledge of odontoblast markers is crucial to develop new therapies for pulp regeneration (7).

Molecular biology techniques widened the tools required to understand many of the underlying mechanisms involved in cellular structure and function (13), including gene expression, which relies on the isolation of good quality RNA (14). The obtaining of intact RNA is the first and one of the most critical steps to perform quantitative and qualitative gene expression analysis (Lader, 2003). For obtaining high quality RNA is necessary to minimize the RNAses activity, thermo stable enzymes present in cells (15). Thereunto, it has been recommended an immediate RNA isolation, using a powerful protein denaturant – guanidinium isothiocyanate – which blocks the RNAses action (16).

Until now, tissue storage methods for RNA achievement remain none completely standardized (16). One available method to store tissues for mediate RNA isolation is the use of RNAse-retarding solution, commercially known as RNAlater^{TM}, an efficient method for tissues storage before RNA isolation (17). RNAlater^{TM} is effective when penetrates the sample and protects the RNA from nucleases reaching the cells by passive diffusion (16). However, teeth mineralized tissues would hinder the passive diffusion; consequently would be necessary to extract dental tissues of our interest before their storage. Thus, the tissue of interest should be immediately isolated and then immersed in RNAlater^{TM} for posterior RNA extraction and analysis. However, in some situations is impossible to isolate pulp and dentin immediately after the surgical extraction procedure and when that happens, it is recommended the tooth disposal.

Dental tissue storage in low temperatures, for short periods of time, provides optimization in odontoblastic markers amplification (18). Nevertheless, specific equipment like ultra-freezer -80°C or even liquid nitrogen containers might not be available in many laboratories, due to their high cost. Thus, an alternative method to store teeth becomes imperative to avoid their disposal. Regular freezer (-20°C) or domestic fridges (4°C) are frequently available in many health services and they could be used as temporary storage places for teeth that would latter underwent RNA extraction.

Thus, the aim of our experiment was evaluated different teeth storage methods in the RNA quality obtained from odontoblast retrieved from freshly extracted third molars, using two sources, the dental pulp tissue and the scratched pre-dentin.

Material and Methods

Teeth obtaining: The research protocol was approved by the institutional Ethics Committee from Federal University of Pelotas, School of Dentistry, Brazil. Healthy young patients (aged 18 – 30 years) who had non-carious third molars scheduled for extraction, due to orthodontic or periodontal reasons, were selected. Patients signed an informed consent to be enrolled in the study. After the surgical procedure, 15 freshly extracted human third molars were placed in transport medium, (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM; Invitrogen, Grand Island, NY, USA), supplemented with 300µl/ml of penicillin (Invitrogen Grand Island, NY, USA), 300µl/ml of streptomycin (Invitrogen Grand Island, NY, USA), and 0.75 µl/ml of amphotericin (Invitrogen Grand Island, NY, USA). As soon as the surgery finished, a grove of about 2mm depth was performed longitudinally in proximal surface (mesial or distal) of the teeth with a diamond bur n° 4138 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brazil), under cooling with PBS solution. These grooves were prepared to create a critical fracture zone in their middle line.

Teeth were randomly divided in five groups according to the temperature and the storage time conditions. DMEM was discarded before teeth storage. In control group, the RNA was immediately extracted after the surgical procedure in laboratory environment at room temperature. Four other conditions were evaluated: teeth storage in liquid nitrogen for 24 hours; teeth storage in ultra-freezer (-80°C) for 24 hours; teeth storage in regular freezer (-20°C) for 24 hours; and teeth storage in fridge (4°C), for 6 hours. These protocols were established to simulate conditions that could potentially happen in dental health services or laboratory conditions.

RNA Isolation and pooled RNA quantification: The teeth were sectioned longitudinally by using a surgical hammer and forceps (Quinelato; Schobell Industrial LTDA, Rio Claro, SP, Brazil). The pulp tissue was carefully removed from the teeth with a dentin curette and pre-dentin was scratched in order to remove the odontoblast layer (Figure 1), using another sharp curette. Odontoblasts RNA, from pulp and pre-dentin, were separately collected in 1.0 ml TRIzol® (Invitrogen Grand Island, NY, USA) and vortexed thoroughly. Then, 200 µl of Chloroform (Synth®, LabSynth, Diadema, SP, Brazil) was added and

the samples were again vortexed, being the tissues centrifuged (Microcentrifuge 5415 R refrigerated, Eppendorf, NY, USA) for 15 minutes (13.000 RPM at 4° C). The aqueous phase was transferred to a new tube and RNA was precipitated with 500µl of isopropanol (Synth®, LabSynth, Diadema, SP, Brazil) during 10 minutes in room temperature and then centrifuged for 10 minutes (13.000 RPM at 4° C) for pellet attainment. Isopropanol was discarded and pellet washed with 1ml of ethanol 75% (Synth®, LabSynth, Diadema, SP, Brazil) and centrifuged for 5 minutes (10.000 RPM at 4° C). Ethanol was discarded and pellet dissolved in 20µl of nucleases free water (Invitrogen Grand Island, NY, USA) and stored in ultra-freezer. Total RNA extracted was pooled per storage condition, in order to eliminate individual patient differences, and obtaining a more significant amount of RNA. After that, RNA was quantified by using a Qubit™ quantification platform (Invitrogen®, Eugene, Oregon, USA).

Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction:

A 40ng of total obtained RNA was used in a one-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (SuperScript™ III Platinum®, Invitrogen. Grand Island, NY, USA), with a 25 µL reaction system including 12.5 µL 2X Reaction Mix, 1 µL Taq Polymerase, 1 µL sense and 1 µL anti-sense, and 9.5 µL of template. The human-specific sense and anti-sense from odontoblast markers DSPP, DMP1 and MEPE primers designed according to published cDNA sequences of GenBank (Table 1) and GAPDH was used as house-keeping gene to normalize RNA expression. The PCR products were separated by using 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with SYBR Green Safe DNA gel stain (Invitrogen®, Eugene, Oregon, USA). Gel images were imported into TotalLab Phoretix® Quant image analyses software (NonLinear Dynamics, Quayside, Newcastle Upon Tyne, UK) to calculate the densitometry of amplified products.

Results

The storage conditions effectiveness was evaluated through the amplification of odontoblast markers. The data obtained in our experiment indicated that DSPP, DMP1 and MEPE mRNAs were amplified in all storage conditions (Figure 2). When comparing the intensity of bands produced for each individual odontoblast markers, we observed that DMP1 mRNA was amplified more clearly than MEPE mRNA. The lowest optical density was observed for DSPP mRNA (Figure 2).

Our analysis showed no significant differences among control and experimental conditions, demonstrating that the different protocols used were able to preserve the RNA without degradation. When comparing the odontoblast markers expression in pulp tissue and scratched pre-dentin, none significant difference was observed in odontoblastic markers amplification, for each storage condition (Figure 3), demonstrating that the two sites (pulp tissue and pre-dentin) were reliable sources to obtain odontoblastic RNA.

Discussion

Although DSPP and DMP1 are also present in bone, they are considered truly odontoblast markers, since these genes expression is fundamental to the biological functions of odontoblastic cells and dentin formation (19). Here, we demonstrated that odontoblastic markers were amplified in all tested storage conditions.

Surprisingly, in our experiment DSPP mRNA was the lowest readily amplified gene. In fact, DSP is the most abundant NCP in the DECM and together with DPP plays a crucial role in dentinogenesis. While DSP regulates the onset of DECM mineralization, DPP is involved in mineralized dentin maturation (20). Mutations in DSPP cause imperfect dentinogenesis type I and II and dentin dysplasia type II (21), emphasizing more strongly DSPP important role in dentinogenesis. However, a previous report, performing the molecular characterization of odontoblastic cells, showed that mature odontoblasts down-regulated DSPP expression (22), demonstrating that these cells present a temporal DSPP gene expression patterns (19). Unlike DSPP, DMP1 mRNA was strongly amplified in all storage conditions. DMP1 is a NPC found in relative abundance in DECM and expressed by odontoblasts that secrete matrix proteins to form dentin (23). DMP1 absence causes incomplete maturation of pre-dentin into dentin, pulp chamber enlargement and dentin hypomineralization (24).

DSPP and DMP1 amplification may be valuable for identification of cells supposed to be of odontoblastic lineage (19). Thus, being DMP1 a marker of odontoblast maturity (22) and taken together the aforementioned considerations about DSPP, we might conclude that the RNA isolate in this experiment was obtained from odontoblastic cells. In addition to DSPP and DMP1 genes, here we showed that MEPE mRNA amplification was quite clear. According to Liu (25), MEPE is down-regulated when the dental pulp stem cells differentiate into odontoblast-simile cells. However, qRT-PCR (9) analysis revealed that MEPE amplification increases time dependently in odontogenic induction cultures. Despite some contradictory findings for MEPE gene in previous studies, our

findings, in agreement with previous studies (9, 26), indicate that MEPE mRNA can be used as a marker of odontoblastic differentiation.

In our study, we compared odontoblastic markers expression in scratched pre-dentin and pulp tissue. The odontoblastic body cell is located between pulp tissue and pre-dentin (27). Following pulp extirpation in room temperature, the odontoblasts remained lining the pulp chamber close to pre-dentin (18). Generally, studies analyzing gene profile of odontoblastic cells, uses the pre-dentin to obtain odontoblastic mRNA (28-30). It is interesting to note that when teeth are frozen before the pulp extirpation, odontoblastic cells remain attached to pulp core, forming a structure named pulp-odontoblast complex, leaving dentin without odontoblastic cells (18). Thus, we speculated that teeth stored in room temperature could show better odontoblastic markers amplification in pre-dentin chips. In opposite, teeth stored in extreme cold temperatures (Liquid Nitrogen and -80°C) would present better odontoblast markers amplification in pulp tissue. However, when analyzing our RT-PCR results, there was no noteworthy difference between odontoblast markers amplification in scratched pre-dentin and pulp tissue, independently of the temperature storage or the evaluated gene. These finds support that pulp tissue and pre-dentin can be used as an additional source for obtaining odontoblastic RNA. Indeed, DMP1 was observed in several non-mineralized tissues, such as brain, salivary gland, and pulp core (31), while DSPP and MEPE were exclusively expressed in mineralized tissues (12, 32). Here, we demonstrated that DMP1 mRNA, DSPP mRNA and MEPE mRNA can be successfully retrieved from pulp tissue, in a similar manner already obtained from pre-dentin. Thus, pulp tissue and scratched pre-dentin may be used together as odontoblastic RNA control sources in molecular evaluations, increasing the odontoblastic RNA available to be isolated from a unique tooth.

As previously mentioned, the rapid degeneration of RNA is a major obstacle to be overcome in measuring gene expression (16). Tissue storage in liquid nitrogen or in -80°C to avoid the RNAse activity is already well established and is indeed effective (16). However, we demonstrate that teeth can be stored for time periods up to 24h in regular freezer (-20°C), and up to 6h in domestic fridge (4°C) to isolate high quality odontoblastic RNA from teeth. Therefore, our

results show that expensive agents, such as RNAlater™, or specialized equipment's like ultra-freezer, might not be required for short storage periods before odontoblastic RNA isolation. This is a remarkable finding, because in clinical environment, like oral surgery units, or even in non-specialized laboratories, regular freezer (-20°C) or fridges (4°C) are commonly available. Thus, when immediate RNA isolation is not feasible these domestic equipment could be used as temporary storage places for teeth that would latter undergo RNA isolation and thus avoid the disposal of human teeth, which might be used as positive controls in pulp tissue engineering studies (Smith et al., 2008). Certainly, our preservation method by freezing or cooling teeth was efficient to inhibit ribonucleases activity.

Concluding, our experiment provides important insights, demonstrating that is possible to obtain odontoblastic RNA from pulp and pre-dentin, increasing the RNA available to be used as positive control in tissue engineering investigations. Besides, we showed the possibility of teeth storing in household refrigeration equipment, available in the majority of the clinics, dental offices and no specified laboratories, avoiding teeth disposal that could be a source to obtain odontoblastic RNA, saving a valuable material for future gene expression analyses.

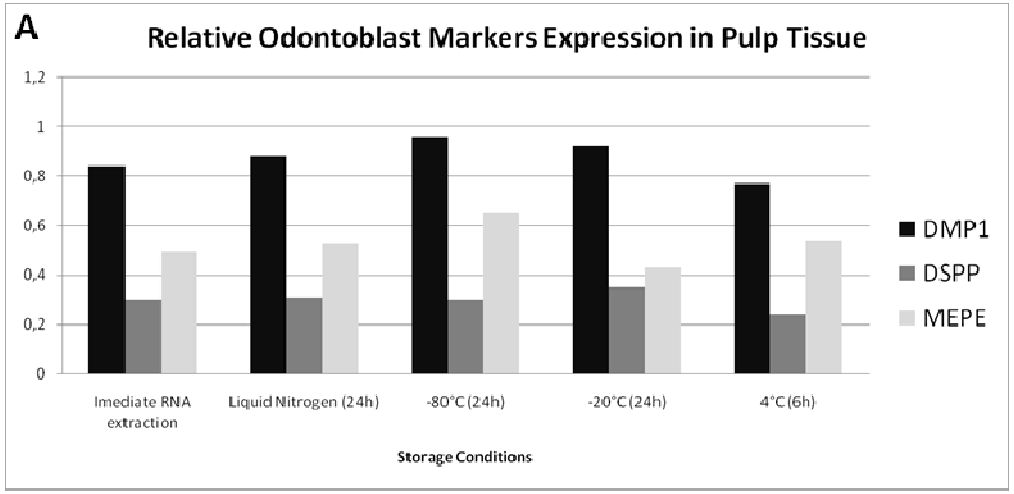
References

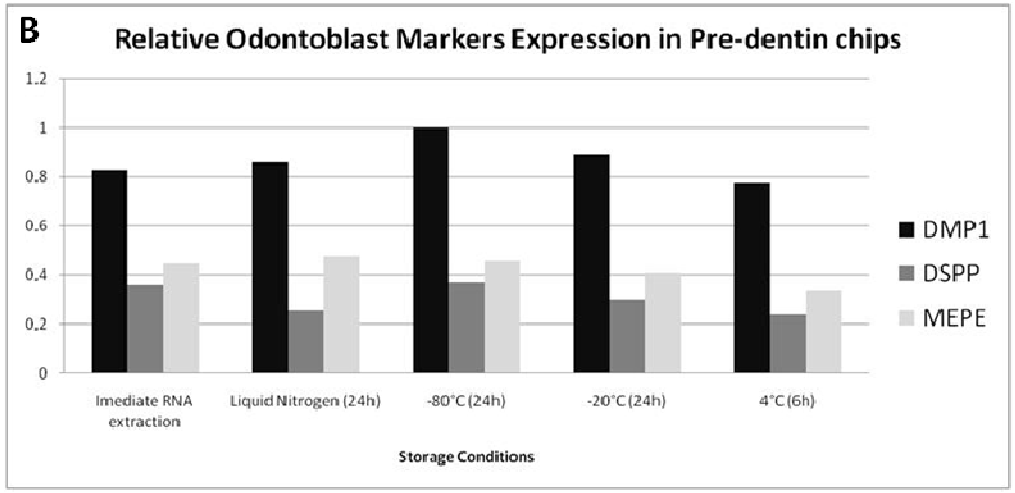
1. Nor JE. Tooth regeneration in operative dentistry. Oper Dent 2006;31(6):633-642.
2. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(25):13625-13630.
3. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(10):5807-5812.
4. Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. J Dent Educ 2003;67(6):678-689.
5. Mjor IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. Braz Dent J 2009;20(1):3-16.
6. Smith AJ, Lumley PJ, Tomson PL, Cooper PR. Dental regeneration and materials: a partnership. Clin Oral Investig 2008;12(2):103-108.
7. Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med 2004;15(3):126-136.
8. MacDougall M, Simmons D, Luan X, Gu TT, DuPont BR. Assignment of dentin sialophosphoprotein (DSPP) to the critical DGI2 locus on human chromosome 4 band q21.3 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 1997;79(1-2):121-122.
9. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. J Endod 2007;33(6):703-708.
10. Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. Gene Ther 2006;13(7):611-620.
11. Petersen DN, Tkalcevic GT, Mansolf AL, Rivera-Gonzalez R, Brown TA. Identification of osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45), a bone-specific cDNA encoding an RGD-containing protein that is highly expressed in osteoblasts and osteocytes. J Biol Chem 2000;275(46):36172-36180.
12. Liu H, Li W, Gao C, Kumagai Y, Blacher RW, DenBesten PK. Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation. J Dent Res 2004;83(6):496-499.
13. Ginsburg GS, Willard HF. Genomic and personalized medicine: foundations and applications. Transl Res 2009;154(6):277-287.
14. Ginsberg SD. RNA amplification strategies for small sample populations. Methods 2005;37(3):229-237.
15. Miyamoto T, Okano S, Kasai N. Irreversible thermoinactivation of ribonuclease-A by soft-hydrothermal processing. Biotechnol Prog 2009;25(6):1678-1685.
16. Lader ES. Methods and reagents for preserving RNA in cell and tissue samples. United States Patent 2003(Patent n° 6,528,641 B2).
17. Mutter GL, Zahrieh D, Liu C, Neuberg D, Finkelstein D, Baker HE, et al. Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. BMC Genomics 2004;5(1):88.

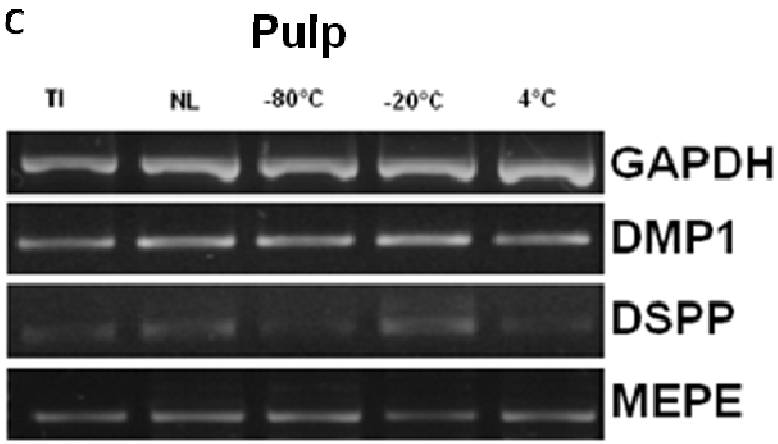
18. McLachlan JL, Smith AJ, Sloan AJ, Cooper PR. Gene expression analysis in cells of the dentine-pulp complex in healthy and carious teeth. Arch Oral Biol 2003;48(4):273-283.
19. Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. Crit Rev Oral Biol Med 2004;15(1):13-27.
20. Yamakoshi Y. Dentinogenesis and Dentin Sialophosphoprotein (DSPP). J Oral Biosci 2009;51(3):134.
21. MacDougall M, Dong J, Acevedo AC. Molecular basis of human dentin diseases. Am J Med Genet A 2006;140(23):2536-2546.
22. Simon S, Smith AJ, Lumley PJ, Berdal A, Smith G, Finney S, et al. Molecular characterization of young and mature odontoblasts. Bone 2009;45(4):693-703.
23. George A, Sabsay B, Simonian PA, Veis A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. J Biol Chem 1993;268(17):12624-12630.
24. Ye L, MacDougall M, Zhang S, Xie Y, Zhang J, Li Z, et al. 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 2004;279(18):19141-19148.
25. Liu H, Li W, Shi S, Habelitz S, Gao C, Denbesten P. MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate. Arch Oral Biol 2005;50(11):923-928.
26. MacDougall M, Simmons D, Gu TT, Dong J. MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21. Connect Tissue Res 2002;43(2-3):320-330.
27. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med 1993;4(5):679-728.
28. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araújo FB, Shi S, Nör JE. Dentin-derived BMP-2 and Odontoblastic Differentiation. J Dent Res 2010;In Press.
29. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. J Endod 2008;34(8):962-969.
30. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Dentin and scaffold porogen effect on the dental pulp stem cells differentiation. J Endod 2010;non published.
31. Qin C, D'Souza R, Feng JQ. Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. J Dent Res 2007;86(12):1134-1141.
32. Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, et al. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. J Dent Res 2002;81(6):392-394.

Figure 1. Illustrative representation of teeth storage way and pulp chamber access

Figure 2. RT-PCR showing gene expression in human dental pulp tissue and pre-dentin. Gel images were imported into TotalLab Quant image analyses software and the optical density of amplified products normalized against the GAPDH.







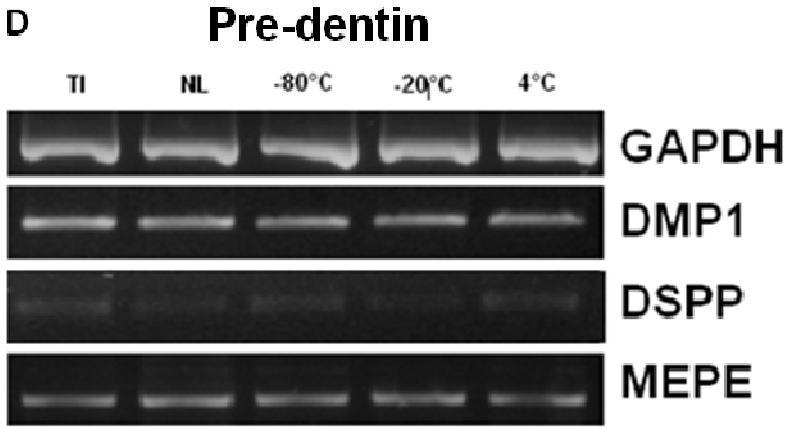


Figure 3. RT-PCR analysis showing no obvious difference was observed in odontoblastic markers amplification among pulp tissue and pre-dentin

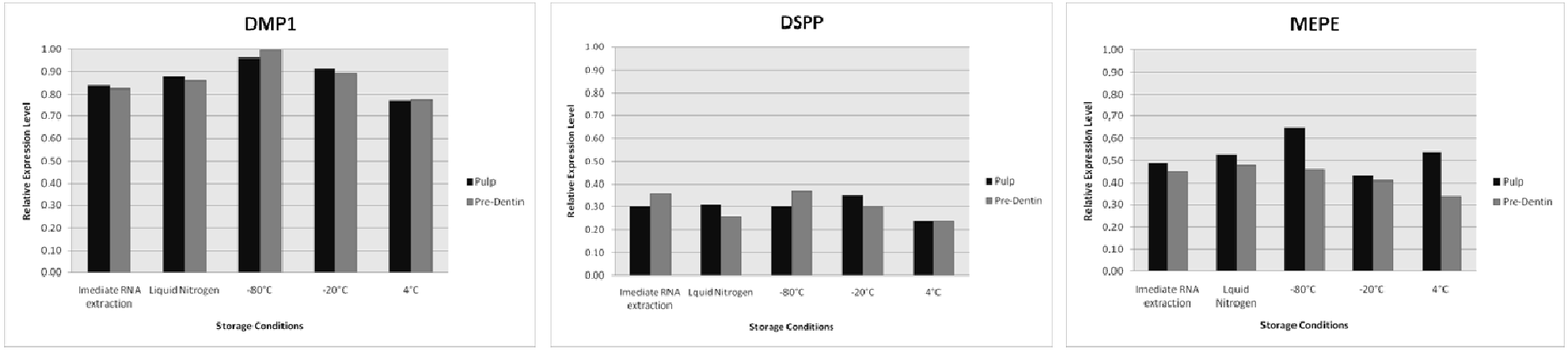


Table 1. Primer sequences and annealing temperatures used for gene expression analyses

Primers Sequence used for gene expression analyses			
	Primer Sequence (Genbank)	Annealing temperature	Product Size
GAPDH	Forward *5' GACCCCTTCATTGACCTCAACT 3'* Reverse *5' CACCACCTTCTTGATGTCATC 3*	55°C	683 bp
DSPP	Forward *5' GACCCCTTCATTGACCTCAACT 3'* Reverse *5' TGCCATTTGCTGTGATGTTT 3'*	50°C	181 bp
DMP1	Forward 5' CAGGAGCACAGGAAAAGGAG 3' Reverse *5' CTGGTGGTATCTTGGGCACT 3'*	50°C	213 bp
MEPE	Forward 5' GCAAAAGCACCCATCGTATT 3' Reverse 5' CTGCCCTCTACAAGGCTGAC 3'	50°C	385 bp

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo