

CRISTIANE LOUREIRO MATNI

**ESTUDO *IN VITRO* DA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE
FIBROBLASTOS 2, FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS-A
FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO β -1 EM CULTURA DE
FIBROBLASTOS DE POLPAS DENTÁRIAS HUMANAS**

CAMPINAS

2008

CRISTIANE LOUREIRO MATNI

**ESTUDO *IN VITRO* DA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE
FIBROBLASTOS 2, FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS-A
FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO β -1 EM CULTURA DE
FIBROBLASTOS DE POLPAS DENTÁRIAS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Centro de Pós-Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo

Co-orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Ferreira Martinez

CAMPINAS
2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"

M426e Matni, Cristiane Loureiro.
Estudo *in vitro* da expressão do fator de crescimento de fibroblastos 2, fator de crescimento derivado de plaquetas-A fator de transformação do crescimento β -1 em cultura de fibroblastos de polpas dentárias humanas / Cristiane Loureiro Matni. – Campinas: [s.n.], 2008.
42f.: il.

Orientador: Vera Cavalcanti de Araújo.
Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação.

1. Fator 2 de crescimento de fibroblastos. 2. Polpa dentária. 3. Patologia bucal. I. Araújo, Vera Cavalcanti de. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação. III. Título.

**C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS
SÃO LEOPOLDO MANDIC**

Folha de Aprovação

A dissertação intitulada: **“ESTUDO *IN VITRO* DA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FILBROBLASTOS 2, FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS-A FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO β -1 EM CULTURA DE FIBROBLASTOS DE POLPAS DENTÁRIAS HUMANAS”** apresentada ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração: **Patologia Bucal** em __/__/__, à comissão examinadora abaixo denominada, foi aprovada após liberação pelo orientador.

Prof. (a) Dr (a)
Orientador

Prof. (a) Dr (a)
1º Membro

Prof. (a) Dr (a)
2º Membro

Dedico esta tese aos meus filhos Hugo,
Olivia, Ligia, ao meu marido Maurício e a
mais nova tripulante de nosso barco,
minha neta Amelie.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela oportunidade da vida e da certeza que tenho de sua companhia em todos os momentos de minha vida.

Aos meus queridos filhos, Hugo, Olivia e Ligia que aprenderam, muitas vezes, a caminharem sozinhos ou apoiando uns nos outros devido da minha ausência física.

Tenho muito orgulho de vocês!

Não se quer consigo escrever de tanta emoção... amo muito vocês!

Ao meu marido Maurício, quantas mudanças nesses três anos, não é mesmo?

Obrigado pela sua compreensão, amizade em fim, amor...

À minha mãe, minha amiga, sempre me socorrendo, obrigado pelo carinho!

Ao meu pai, meu amigo, obrigado pela torcida!

Ao meu avô e avó (in memoriam) e à querida Maria sempre presentes em toda minha vida, obrigado por tudo!

As minhas irmãs obrigado pela amizade e carinho!

Ao meu primo-irmão Nelson e sua bela família, sempre comigo, obrigado pela acolhida.

Aos meus *Amigos* muito obrigado pela força e alegria.

A Professora Dra. Vera Cavalcanti de Araújo pela oportunidade de poder conviver com a senhora pois, muito além dos conhecimentos científicos adquiridos sua determinação frente aos desafios é uma grande lição de vida.

Obrigado por me ajudar a realizar esse sonho!

Ao professor Dr. Ney Soares de Araújo, obrigado pela sua orientação e cordialidade.

A Professora Dra. Cristiane Furuse obrigada pelos conhecimentos, orientações e acima de tudo pela amizade e consideração.

A Professora Dra. Elizabeth Ferreira Martinez, querida Betinha, muito obrigado pela orientação, paciência, companherismo (especialmente com a tese) e amizade!

A Poliana, Audrey e Jeruza, muito obrigado pela ajuda com os trabalhos laboratoriais

Aos meus amigos do mestrado, Alexandre, Ana Cláudia, Cássio, Flávio, Guilherme, Carol, Lari, Lu, Letícia, Sérgio, Zé Antonio obrigado pelo carinho. Agradeço em especial a Lu Miguita pela companhia, incentivo e confiança.

Você é uma grande amiga!

“Todos estamos matriculados na escola
da vida onde o Mestre é o tempo.”
Cora Coralina (1889-1985)

RESUMO

A polpa dentária é formada por um tecido conjuntivo frouxo constituído de elementos celulares e matriz extracelular. Algumas citocinas e fatores de crescimento podem modular a proliferação e diferenciação celular e síntese de matriz pulpar. O presente trabalho se propôs a analisar *in vitro*, através de imunofluorescência, a expressão de alguns fatores de crescimento, a saber, fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), fator de crescimento derivado de plaquetas-A (PDGF-A) e fator de transformação do crescimento β -1 (TGF β -1) em polpas dentárias humanas. Foram utilizadas linhagens celulares de fibroblastos de germes de polpas dentárias humanas obtidas através da técnica de *explant*. Os resultados obtidos revelaram diferentes padrões de expressão das proteínas estudadas. O FGF2 imunoexpressou-se no citoplasma, pontualmente, principalmente próximo aos limites da membrana citoplasmática, bem como o TGF β -1, que esteve mais fortemente expresso em algumas regiões focais do citoplasma. O PDGFA apresentou imunomarcagem em todo citoplasma.

Palavras-chave: Polpa dentária humana. FGF2. PDGFA. TGF β -1. Cultura celular.

ABSTRACT

Dental pulp is a soft connective tissue composed by cells and extracellular matrix. Some cytokines and growth factors can modulate cell proliferation and differentiation and pulpal matrix synthesis. The present study investigated, *in vitro*, the expression of some growth factors, as fibroblast growth factor 2 (FGF2), platelet-derived growth factor-A (PDGF-A) and transforming growth factor β -1 (TGF β -1) in human dental pulp. For that, cell lineages were obtained from human dental pulp germs by *explant* technique. The results indicated different immunoexpression patterns of the growth factors studied. All of the studied growth factors were present in the human dental pulp cells fibroblasts. FGF2, TGF- β 1 and PDGFA were immunoexpressed in all cell cytoplasm. The FGF2 was present mainly nearer of the cytoplasmatic membrane, while the TGF- β 1 was strongly expressed in focal regions of the cell.

Keywords: Human dental pulp. FGF2. PDGFA. Cell culture.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.2 Fator de transformação do crescimento (TGFβ-1)	14
2.3 Fator de Crescimento de Fibroblasto 2 (FGF2)	16
2.4 Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF)	17
3 PROPOSIÇÃO	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Linhagens Celulares	21
4.2 Cultivo Celular	21
4.3 Imunofluorescência	23
5 RESULTADOS.....	25
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS.....	34
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética	42

1 INTRODUÇÃO

A polpa dentária é formada por um tecido conjuntivo frouxo constituído de elementos celulares e matriz extracelular. Esta matriz é composta por uma variedade de proteínas e polissacarídeos que são secretados localmente e se acumulam em íntima associação com a superfície de células que os produzem servindo como arcabouço físico e também com o papel bioativo na regulação do comportamento celular (Albert et al., 2004).

A polpa dentária é um tecido em constante remodelação, em virtude da resposta às diversas agressões do meio externo o que provoca modificação dos seus componentes celulares e extracelulares tais como migração, proliferação e diferenciação celular entre outros (Tziafas, 2000; Tran-Hung et al., 2006).

Algumas citocinas e fatores de crescimento podem modular a proliferação e diferenciação celular e síntese de matriz pulpar (Shiba et al., 1998).

O fator de transformação do crescimento $\beta 1$ (TGF β -1) tem sido relacionado com o processo de reparação pulpar (Finkelman et al., 1990; Rutherford, Gu, 2000), bem como indutor da síntese da matriz dentinária e imunossupressão pulpar (Magloire et al., 2001). Além disso, tem sido relacionado com a expressão de filamentos de α -actina de músculo liso (α -AML) quando suplementado em meio de cultura de células pulpares (Martinez et al., 2007), demonstrando a importância deste fator de crescimento no processo de reparação pulpar.

Já o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) dentre as diversas ações tem papel fundamental na angiogênese, proliferação celular e formação de túbulos dentinários (Tweedden et al., 1989), bem como ação sinérgica na

diferenciação de células pulpares mesênquimais indiferenciadas em células “odontoblast-like”.

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é encontrado na dentina humana em altas concentrações (Roberts-Clark, Smith, 2000) e em estudos realizados com polpas de dentes de ratos revelou-se intensificador da angiogênese no processo reparador tecidual (Kuraguchi et al., 1995).

Com base nesse fato propusemo-nos a estudar a expressão *in vitro* de três fatores de crescimento, a saber, fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), fator de transformação do crescimento β -1 (TGF β -1) e fator de crescimento derivado de plaquetas A (PDGFA) em fibroblastos cultivados a partir de germes dentários humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Polpa Dentária

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo histologicamente formado por células e matriz extracelular, sendo considerado um tecido especializado devido à sua organização e localização, uma vez que se encontra rodeado por um tecido duro e anelástico (Katchuburian, Arana, 1999). As células encontradas na polpa dentária são os fibroblastos, odontoblastos, macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, perivasculares e células-tronco (“stem cells”) (Lyn et al., 1991; Goldberg, Lasfarges, 1995; Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002; Huang et al., 2006).

O tecido pulpar, em sua periferia, é formado principalmente por odontoblastos cuja função é a deposição contínua de dentina (Arana-Chavez, Massa, 2004) enquanto a porção central contém uma população celular heterogênea. Contudo, o tipo celular mais encontrado é o fibroblasto (Martinez, Araújo, 2004).

A odontogênese inicia-se com o espessamento do epitélio, e indução do tecido mesenquimal subjacente. Esse intercâmbio de sinais direciona as fases de formação dentária divididas em fase de botão, fase de capuz e fase de campânula (Berkovitz et al., 2004; Young et al., 2005). A fase de botão representa o verdadeiro início da formação de cada dente; na fase de capuz verificamos intensa proliferação das células epiteliais e na de campânula iniciam-se os processos de morfogênese e diferenciação celular. Wang (2004) sugere também que o epitélio oral possui

potencial odontogênico nos estágios iniciais do desenvolvimento dentário sinalizando o mesênquima.

Durante esses estágios, a sinalização que provém do epitélio induz as células mesenquimais da papila dentária a diferenciarem-se em odontoblastos (Mc Collum, Sharpe, 2001).

As células da papila logo abaixo do epitélio interno do órgão do esmalte se diferenciam em odontoblastos enquanto as demais células da papila originam a polpa dentária. A união do epitélio interno e externo do órgão do esmalte forma uma estrutura conhecida como alça cervical que expressa ao todo dez sinalizadores celulares diferentes incluindo Shh (“sonic hedgehog”) (Berkovitz et al., 2004) e vários membros da família de fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), proteínas ósseas, e proteínas da família Wnt (Jernvall et al., 2000; Thesleff et al., 2001). Além destes, Wang (2004) aponta o fator de necrose tumoral (TNF) como um sinalizador importante.

Os fibroblastos são células de origem mesenquimal e sintetizam componentes fibrilares e não-fibrilares da matriz extracelular do tecido conjuntivo (Carvalho, Collareze-Buzato, 2005).

Esta célula é reconhecida como uma célula versátil do tecido conjuntivo devido à sua capacidade para se diferenciar em células de tecido cartilaginoso, ósseo, adiposo e muscular. Frente a essa diversidade, há diferenças quanto a características morfológicas, especificidade na expressão de receptores de superfície celular e capacidade de renovação celular. Tal diversidade faz com que essas células constituem populações heterogêneas. As várias combinações entre os componentes da matriz extracelular secretados e organizados pelos fibroblastos presentes em diferentes sítios anatômicos, refletem a diversidade de fenótipos para

atender as demandas funcionais. Assim, tais combinações atuam como fatores microambientais e desempenham importante papel no desenvolvimento específico sugerindo então que cada órgão possui fibroblastos com características fenotípicas distintas (Carvalho, Collares-Buzato, 2005).

Particularmente, os fibroblastos pulpares possuem características peculiares se comparados aos fibroblastos de outros tecidos conjuntivos, pois além da síntese e manutenção dos componentes da matriz extracelular, os fibroblastos pulpares respondem a estímulos podendo diferenciar em células semelhantes à odontoblastos (“odontoblast-like”) (Martinez, Araújo, 2004).

Ultraestruturalmente, os fibroblastos pulpares exibem em seu citoplasma inúmeras organelas de secreção e síntese bastante desenvolvida caracterizando sua capacidade de produção e renovação dos elementos da matriz extracelular (Martinez, 2000).

A matriz extracelular dos vertebrados desempenha um papel complexo na regulação do comportamento das células com as quais faz contato, influenciando seu desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função. Na maioria dos tecidos conjuntivos as macromoléculas da matriz são secretadas principalmente pelos fibroblastos. Duas principais classes de macromoléculas extracelulares produzem a matriz: glicosaminoglicanos (normalmente ligadas a uma proteína na forma de proteoglicanos) e as proteínas fibrosas. As moléculas de proteoglicanos formam uma substância semelhante a um gel, altamente hidratada, na qual estão embebidas as fibras protéicas. Além disso, proporcionam resistência a forças de compressão na matriz e difusão rápida dos nutrientes, metabólitos e dos hormônios entre o sangue e as células do tecido. As proteínas fibrosas fortalecem e auxiliam na

organização da matriz, proporcionando maior resistência e além de auxiliar as células a aderirem em locais apropriados (Alberts, 2004).

A matriz extracelular da polpa dentária é composta por uma variedade de proteínas e polissacarídeos que formam um arcabouço físico para manutenção do tecido pulpar e, especificamente envolvida na produção e manutenção da dentina (Hillmann, Geurtsen, 1997; About et al., 2000). As principais classes de macromoléculas que compõem a matriz extracelular da polpa dentária são proteínas colagênicas (colágenos tipos I e III), proteínas não colagênicas (fibronectina, tenascina, osteonectina, sialoproteína, osteocalcina), proteoglicanas incluindo-se o ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de heparana e fosfolipídios, constituindo um gel característico que embebe os elementos fibrilares e celulares (Golberg, Lasfargues, 1995).

A matriz extracelular da polpa dentária possui uma importante função na morfologia embrionária e diferenciação celular, além de proporcionar um leque adicional de mecanismos morfogenéticos e funcionais para a formação dos tecidos dentários (Thesleff et al., 1989; Chiquet-Ehrismann et al., 1995; Garcia et al., 2003; Fukomoto, Yamada, 2005; Ferreira et al., 2006), bem como arcabouço para manutenção da integridade pulpar (Van Amerogen et al., 1983; Hillmann, Geurtsen, 1997).

O mecanismo de diferenciação celular que envolve células pulpares em células “odontoblast-like” não está bem compreendido, porém, sabe-se que novas células surgem após ativação de fatores de crescimento, ocorrendo então uma grande variedade de atividades celulares tais como quimiotaxia, proliferação, diferenciação celulares (Arana-Chavez, Massa, 2004). Dentre os fatores de crescimento importantes para essas funções celulares, tem sido descrito o papel do

TGF β -1 e FGF2 como moléculas sinalizadoras da proliferação e diferenciação celulares (Smith et al., 2001; Smith, 2003; Nie et al., 2005), estando principalmente associados à diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em células “odontoblast-like” (Magloire et al., 2001; He et al., 2008).

Em polpas dentárias, o PDGFA tem sido relacionado como um importante fator de crescimento requerido no desenvolvimento do ectomesênquima dentinário nas fases iniciais da odontogênese (Stephenson et al., 1991).

2.2 Fator de transformação do crescimento (TGF β -1)

A superfamília dos TGF β -1 inclui vários fatores de crescimento responsáveis pela diferenciação e morfogênese celular em diferentes células e tecidos, tanto em condições fisiológicas como patológicas, através de receptores de superfície celular. São representadas pelas seguintes subfamílias: TGF- β ($-\beta$ 1, $-\beta$ 2, $-\beta$ 3, $-\beta$ 4, $-\beta$ 5); activinas e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Este fator tem ação na resposta imune e reparadora em mamíferos através de eventos como proliferação celular, quimiotaxia, síntese e degradação de matriz extracelular, diferenciação celular e apoptose (O'kane, Ferguson, 1997).

Três isoformas de TGF β ($-\beta$ 1, $-\beta$ 2, $-\beta$ 3) foram identificadas em mamíferos, porém, a única isoforma encontrada na dentina é TGF β -1 (Wisithphom, Windsor, 2006).

O TGF β -1 é provavelmente secretado por células epiteliais induzindo diferenciação mesenquimal nos estágios iniciais do desenvolvimento dentário (Magloire et al., 2001), tendo importante papel na formação da dentina primária

(Cam et al., 1990; D'Souza et al., 1990; Vaahtokari et al., 1991; Finkelman, 1992; Cassidy et al., 1997).

Nos tecidos dentários adultos, o TGF β -1 pode regular a produção da matriz extracelular, proliferação celular e principalmente a diferenciação de células pulpares em células “odontoblast-like” (Tziafas, 2001; Chan et al., 2005; Luisi et al., 2007) desempenhando relevante papel no desenvolvimento dentário assim como regulador da resposta do complexo dentina-polpa a agentes agressores (Palosaari et al., 2000; Tjadeerhane et al., 2001; Wisithphroml, 2006; Luisi et al., 2007).

Sabe-se que o TGF β -1 induz a produção de colágeno tipo I na zona odontoblástica/subodontoblástica, por regular a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em odontoblastos (Nakashima, 1992; Toyono et al., 1997; Shiba et al., 1998; Tziafas et al., 1998; Sloan, Smith 1999, About, Mitsiadis, 2001; Tziafas, 2004.). Este processo de reparação pulpar, após injúria tecidual e formação de dentina terciária é influenciado também por proteínas presentes na matriz extracelular.

Smith et al. (2001) relatam que os ácidos provenientes do metabolismo bacteriano da cárie dentária e EDTA solubilizam a matriz dentinária liberando TGF β -1 que por sua vez sinaliza a diferenciação em “odontoblast-like” durante a dentinogênese reparativa.

Além da importância do TGF β -1 na regulação da diferenciação de células pulpares mesenquimais indiferenciadas em células “odontoblast-like”, este fator de crescimento pode induzir *in vitro* estas células a se diferenciarem em miofibroblasto dependendo do micro-ambiente ao qual estão expostas, demonstrando assim a versatilidade deste tipo celular (Martinez et al., 2007).

Também tem sido descrito na literatura uma possível ação do TGF β -1 em promover o acúmulo de células dendríticas na camada odontoblástica sugerindo a sua importância na resposta imunológica na polpa dentária (Farges et al., 2003).

2.3 Fator de Crescimento de Fibroblasto 2 (FGF2)

É uma família de fatores de crescimento cujo peso molecular varia de 17 a 34 kDa e possui importante função no desenvolvimento celular e tecidual, sinalizando a junção epitélio-mesenquimal através dos receptores celulares (Ornitz, Itoh, 2001).

Até então foram identificados 22 genes de FGF no genoma humano, incluindo o FGF-1 (FGF ácido, aFGF), FGF-2 (FGF básico, bFGF), FGF-3 (INT-2), FGF-4 (HST-1/K-FGF), FGF-5, FGF-6 (HST-2), FGF-7 (fator de crescimento de queratinócito), FGF-8 (fator de crescimento andrógeno-indutor), e FGF-9 (fator ativante glial), sendo o FGF-15 o único ainda não isolado em humanos (Myoken, 1997; Ornitz, Itoh, 2001; Yura et al., 2001; Grose, Dickson, 2005).

O FGF1 e FGF2 são os fatores mais estudados, sendo encontrados em células inflamatórias mononucleares (linfócitos T e mastócitos) (Presta et al., 2005), bem como na matriz extracelular de vários tecidos (Myoken et al., 1997; Ornitz, Itoh, 2001).

O FGF2 é um fator de crescimento que induz a proliferação e diferenciação de inúmeras células tais como fibroblastos, células mioepiteliais, endoteliais, tumorais, células mesenquimais indiferenciadas pulpare (‘‘stem cells’’) (Allouche, Bikfalvi, 1996; Ornitz, Itoh, 2001), e estando expresso em fibroblastos pulpare (Tran-Hung et al., 2006).

O FGF2 tem sido relacionado com desenvolvimento de vários tipos teciduais como, por exemplo, glândula salivar (Patel et al., 2006), além de estar envolvido com ação mitogênica e quimiotática para células endoteliais induzindo a expressão de plasminogênio, colagenases e enzimas proteolíticas que mediam a remodelação tecidual (Thomas, 1987).

Estudos ressaltam o importante papel do FGF2 na neovascularização de tecidos lesados (Liebler et al., 1997; Gerwins et al., 2000; Tran-Hung et al., 2006). É sabido que células endoteliais lesadas liberam moléculas sinalizadoras, dentre elas o FGF2 que está envolvido no processo inflamatório e na cicatrização tecidual (Martin, 1997; Tran-Hung et al., 2008) assim como no recrutamento de células “odontoblast-like” para o local da injúria (Mathieu et al., 2005).

Através de estudo imunoistoquímico com dentes de rato, foi demonstrada a presença do FGF2, durante a odontogênese o qual se expressou tanto no órgão do esmalte como na papila dentária indicando sua participação na proliferação e diferenciação de ameloblastos e odontoblastos (Cam et al., 1992).

Nakao et al. (2004) demonstraram que o FGF-2 é responsável pela diferenciação de células pulpares em odontoblastos e pela expressão de sialoproteína dentinária (DSP) em polpas dentárias adultas.

O FGF2 é encontrado na dentina e parece induzir a migração e proliferação de células endoteliais para a formação de túbulos dentinários (Tziafas et al., 2000).

2.4 Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF)

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é um dímero

dissulfeto-ligado constituído de duas subunidades protéicas, a saber, cadeia –A e cadeia –B (Heldin, Westermark, 1990). O PDGF, nos seres humanos, está relacionado a dois genes distintos: PDGF-AA está localizado no cromossomo 7 (Stenman et al., 1992) enquanto, PDGF-BB encontra-se no gene 22 (Dalla Favera et al., 1982).

Este fator juntamente com seus receptores são importantes reguladores da interação entre tecidos controlando a migração, proliferação e manutenção celular, bem como deposição de matriz extracelular durante o desenvolvimento embrionário dos mamíferos (Soriano, 1997; Chai et al., 1998; Hoch, Soriano, 2003).

Também é descrito na literatura que o PDGF está intimamente associado ao fator de crescimento vascular endotelial desempenhando importante função na regulação da angiogênese e hematopoiese (Hoch, Soriano, 2003; Andrae et al., 2008).

O PDGF possui importante papel como sinalizador durante o desenvolvimento embrionário assim como principal regulador da regeneração dos tecidos na vida adulta (Stephenson et al., 1991; Alberts et al., 2004; Xu et al., 2005).

Hu et al. (1995) em estudo, utilizando a técnica de imunistoquímica, mostraram a presença de PDGF e seus receptores no desenvolvimento do tecido dentário, sendo detectado tanto no órgão do esmalte como na papila dentária.

Na dentina humana, o PDGF foi isolado em altas concentrações (Roberts-Clark, Smith, 2000) e em estudos realizados com polpas de dentes de ratos demonstrou ser importante regulador da angiogênese no processo reparação tecidual (Kuraguchi et al., 1995). Também tem sido demonstrado importante fator de

crescimento presente em polpas dentárias humanas de dentes tracionados ortodonticamente estando relacionado com angiogênese (Derringer et al., 1996)

O PDGF é um dos principais fatores de crescimento encontrados no tecido periodontal (Savafi et al., 2007) e possui potente efeito mitogênico e quimiotático sobre as células deste tecido (Berkovitz et al., 2004).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é avaliar a expressão *in vitro*, através da técnica de imunofluorescência, do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), fator de crescimento derivado de plaquetas A (PDGFA) e fator de transformação do crescimento β -1 (TGF β -1) em fibroblastos cultivados a partir de polpas dentárias humanas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens Celulares

As linhagens celulares de fibroblastos de polpa dentária foram obtidas através do cultivo primário de tecido pulpar de germes de terceiros molares em estado inicial de formação radicular através da técnica de *explant* pertencentes ao Banco de Células do Laboratório de Cultivo Celular do Instituto e Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic (Campinas, SP).

Esses dentes foram extraídos, por indicações ortodônticas e utilizados para a pesquisa com o consentimento dos pacientes e aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa para Humanos do Instituto e Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic (protocolo n° 06/264 – Anexo A) e não apresentaram quaisquer implicações, senão aquelas inerentes aos procedimentos cirúrgicos.

4.2 Cultivo Celular

As células foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro de bezerro (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma), sendo mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono.

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

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

Ao atingirem a subconfluência (70% da área cultivável do frasco) as células foram subcultivadas. O meio de cultura do frasco foi removido e reservado em tubo de centrifugação, e a monocamada celular lavada duas vezes com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA), pH 7,2. A seguir, as células foram separadas com 2mL de solução de tripsina 0,25% (Sigma) durante 3 minutos, à temperatura de 37°C. A tripsina foi inativada com meio de cultura anteriormente reservado e as células em suspensão transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 2000rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente.

O precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspenso em 1mL de DMEM fresco. Para perpetuação da linhagem celular dessas frações, as suspensões foram replaqueadas em frascos de 25cm² contendo 5mL de meio e então mantidas à 37°C em atmosfera úmida, procedimento este que originou as novas passagens de cultura. Frações das culturas foram congeladas para manter um estoque dessas linhagens.

As células na passagem 4 foram tripsinadas e transferidas para placa de Petri de 35mm de diâmetro contendo lamínulas de vidro e foram incubadas em estufa à 37°C em atmosfera úmida para realizar as reações de imunofluorescência.

4.3 Imunofluorescência

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

Todos os procedimentos descritos foram precedidos de lavagens em PBS.

Os anticorpos secundários utilizados foram anti-mouse biotilado (Southern Biotech Birmingham, AL, USA) para células incubadas com vimentina, e anti-coelho (Southern Biotech Birmingham) para células incubadas com TGF β -1, PDGFA e FGF2, seguido da incubação com o conjugado estreptavidina-fluoresceína (Southern Biotech Birmingham).

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

As observações e fotomicrografias foram realizadas em microscópio convencional de fluorescência (Carl Zeiss, Axioskop 2Plus) equipado com objetivas 20X e 40X e câmara digital axio-cam (Carl Zeiss, Gottingen, Germany).

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados, hospedeiro, diluição e procedência.

Anticorpo	Hospedeiro	Diluição	Procedência
Anti-FGF2 *	coelho	1:50	*Santa Cruz
Anti-TGF β -1 *	coelho	1:100	*Santa Cruz
Anti-PDGFA *	coelho	1:50	*Santa Cruz
Anti-vimentina (clone V9)**	camundongo	1:300	** Dako

*Santa Cruz Biotechnology, Inc. Delaware, CA, EUA

**Dako, Carpinteria, CA, EUA

5 RESULTADOS

Observamos diferentes padrões de expressão das proteínas estudadas nos fibroblastos pulpaes humanos.

O FGF2 imunoexpressou-se no citoplasma das células estudadas, focalmente, principalmente próximo aos limites da membrana citoplasmática (figura 1 a e b).

O TGF β -1 esteve presente nas células estudadas, por todo citoplasma, estando mais fortemente expresso em algumas regiões focais (figura 2 a e b).

O PDGFA imunoexpressou-se em todo citoplasma das células estudadas (figura 3 a e b).

Os fibroblastos pulpaes foram imunoreativos para a vimentina, estando disperso por todo citoplasma em forma de filamentos (figura 4 a e b).

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram diferentes padrões de imunoexpressão dos fatores de crescimento estudados em cultura celular de fibroblastos pulpares.

A vimentina esteve presente nos fibroblastos pulpares humanos e é o maior filamento intermediário presente em células fibroblásticas considerada um dos mais insolúveis componentes do espaço intracelular. No citoplasma apresenta-se formando uma rede de filamentos que colaboram com a manutenção do arcabouço celular (Lazarides, 1980).

Todos os tipos celulares em condições *in vitro*, independente do tecido de origem, expressam a vimentina, sugerindo-se que este filamento intermediário favoreça o crescimento em cultura celular, uma vez que as células estão livres das restrições tridimensionais; como nos tecidos vivos (Lazarides, 1982; Quax et al., 1983) apresentando uma função estrutural importante e manutenção da morfologia celular.

Nos tecidos dentários a vimentina encontra-se dispersa no citoplasma dos odontoblastos (Lombardi et al., 1992) e dos fibroblastos da polpa e papila dentária (Moxham et al., 1998).

Estudos têm sugerido que a vimentina esteja relacionada com esforços mecânicos além de desenvolver papel importante na estrutura do citoesqueleto celular (Moxham et al., 1998).

Os fibroblastos obtidos a partir da polpa dentária foram cultivados e mantidos em condições *in vitro*, sem qualquer influência do meio. Descarta-se a

possibilidade dessas células serem odontoblastos devido às próprias dificuldades técnicas do cultivo deste tipo celular. Os odontoblastos são células pós-mitóticas incapazes de proliferarem (Tjaderhane et al., 1998). Desta forma, as células cultivadas *in vitro* da polpa de germe dentário humano representam células fibrobláticas isto porque, a partir do cultivo primário, as células menos diferenciadas e mais proliferativas é que se estabelecem e originam a linhagem celular (Freshney, 2005).

Nas diferentes fases da odontogênese, verifica-se a presença de vários fatores de crescimento sendo responsáveis pela diferenciação e morfogênese dentária (Berkovitz et al., 2004). Os fatores de crescimento são moléculas sinalizadoras que desempenham um importante papel na interação epitélio-mesênquima (Smith et al., 2001; Smith, 2003; Unda et al., 2001).

Esta interação epitélio-mesênquima é a base para o início da formação dentária, sendo responsável pela sinalização inicial bem como, a posterior diferenciação do ameloblasto e odontoblasto e portanto, formação de esmalte e dentina (Berkovitz et al., 2004; Young et al., 2005).

No presente trabalho, os fibroblastos pulpares exibiram marcação para o FGF2.

Alguns estudos imunoistoquímicos relatam a presença do FGF2 principalmente na membrana basal da interface epitélio-mesênquima assim como na matriz extracelular da papila dentária e retículo estrelado do órgão do esmalte (Berkowitz et al., 2004). Este fato sugere a possível participação deste fator de crescimento na diferenciação de ameloblastos e odontoblastos (Cam et al., 1992; Unda et al., 2001).

O FGF2 é secretado por odontoblastos e fibroblastos pulpare, e também é armazenado na matriz dentinária (FinKelman et al., 1990; Tran-Hung et al., 2006), bem como em células tronco obtidas de dente decíduos (Miura et al., 2003) Quando há dissolução da dentina devido à ação dos ácidos do metabolismo bacteriano, há liberação de vários fatores de crescimento, dentre os quais, o FGF2 tendo um papel fundamental no processo de reparação tecidual (Bergenholtz, 1997; Mathieu et al., 2005).

Além de estar envolvido no processo inflamatório (Martin, 1997; Tran-Hung et al., 2008), o FGF2 está relacionado com a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas pulpare em células “odontoblast-like” e, formação de dentina terciária (Nakao et al., 2004). Portanto, a expressão deste fator de crescimento nas células estudadas pode estar relacionada com o potencial das mesmas em se diferenciarem em “odontoblast-like” dependendo do estímulo aos quais foram submetidas.

A polpa dentária é um tecido altamente vascularizado, que uma vez lesionado por um estímulo agressor, ocorre injúria das células endoteliais, que por sua vez liberam fatores quimiotáticos e moléculas sinalizadoras que iniciam o processo inflamatório necessário para o recrutamento de células progenitoras fundamentais no processo cicatricial (Tedder et al., 1995; Martin,1997). O FGF2 está intimamente relacionado com a angiogênese e neovascularização do tecido traumatizado, estando associado aos tecidos pulpare com o processo de migração e proliferação de células endoteliais, resultando na formação de dentina terciária (Derringer & Linden,2004).

Além do seu papel no processo de reparação pulpar, o FGF2 atua como agente mitogênico para células pulpare progenitoras (Nugent et al., 2000), já tendo

sido demonstrado o seu efeito na proliferação de células do tipo fibroblasto (Gospodarowicz & Moran, 1975). Estes estudos explicam a expressão deste fator de crescimento nas culturas celulares estudadas.

Na polpa dentária adulta, os fatores de crescimento possuem importante papel na vitalidade do tecido pulpar sendo responsáveis por sinalizar inúmeros processos celulares após injúria tecidual (Robets-Clark et al., 2000; Smith et al., 2003; Huang et al., 2006).

Quando ocorre injúria pulpar, uma seqüência de eventos celulares como recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas, citodiferenciação e controle da atividade secretora celular (Smith, 2003; Nie et al., 2006) ocorrem na polpa dentária. Assim, a dentina terciária é secretada e depositada por células “odontoblast-like” (Smith et al., 2001; Tziafas et al., 2001; Smith, 2003; Arana-Chavez & Massa, 2004).

Apesar do mecanismo de diferenciação celular que envolve células pulpares em células “odontoblast-like” não estar bem compreendido, sabe-se que novas células surgem após ativação de fatores de crescimento, ocorrendo então uma grande variedade de atividades celulares tais como quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular (Arana-Chavez & Massa, 2004).

O TGF β -1 é um outro fator de crescimento que está intimamente relacionado com a diferenciação e proliferação de células pulpares em células “odontoblast-like” (Gronthos et al., 2000; Unda et al., 2001; Chan et al., 2004; Luisi et al., 2007).

No presente estudo, observamos a expressão do TGF β -1 nas culturas celulares de fibroblastos pulpares.

Além de estar relacionado com o processo de reparação pulpar (O’Kane, Ferguson, 1997; Rutheford, Gu, 2000; Chan et al., 2005), o TGF β -1 também induz a migração de células dendríticas na camada odontoblástica e subodontoblástica possuindo um importante papel imunossupressor (Magloire et al., 2001; Nie et al., 2005).

O TGF β -1 e o FGF2 regulam a síntese da matriz extracelular durante a diferenciação odontoblástica (Shiba et al., 2001), suprimindo a ação da fosfatase alcalina. Estudos demonstram que, enquanto o TGF β -1 aumenta a síntese de osteonectina e fibronectina, o FGF2 diminui a síntese de colágeno do tipo I e osteonectina nas células pulpares humanas (Shirakawa et al., 1994; Shiba et al., 1995, 1998).

Portanto, a expressão deste fator de crescimento nas células estudadas, assim como para o FGF2, pode estar relacionada com o potencial das células pulpares em se diferenciarem em “odontoblast-like”.

No presente estudo, o PDGFA imunoexpressou-se em todas as culturas de fibroblastos pulpares estudadas.

Este fator de crescimento possui uma importante função na migração e proliferação celulares, bem como na deposição da matriz extracelular durante a organogênese (Soriano, 1997; Chai et al., 1998; Hoch, Sorano, 2003).

As células pulpares humanas expressam PDGFA (Tran-Hung et al., 2006) estando também presente na dentina humana (Roberts-Clark & Smith, 2000), demonstrando ser importante regulador da angiogênese no processo reparação tecidual (Kuraguchi et al., 1995), bem como estimulador da proliferação de fibroblastos pulpares em cultura (Rutherford et al., 1992).

A angiogênese é regulada por inúmeros fatores inibitórios e estimulatórios (Folkman, Klagbrun, 1987) importantes no processo de cicatrização, resultando em efeitos sinérgicos entre os mesmos. É relatado na literatura que o PDGFA e o TGF β -1 podem agir simultaneamente na estimulação de fibroblastos a produzirem outros fatores de crescimento, como o FGF2 (Goto et al., 1993).

É sabido que diversos fatores de crescimento podem estar presentes no soro fetal bovino, podendo estimular a proliferação celular. O PDGFA, TGF β -1 (Lechner et al., 1981) e o FGF (Gospadarowicz, Moran, 1974) são alguns dos fatores presentes no soro (Freshney, 2005) e provavelmente, a ação em conjunto dos mesmos (Goto et al., 1993) pode ser responsável pela expressão dos diferentes fatores de crescimento nas culturas de fibroblastos pulpares estudados.

Além disso, estes fatores de crescimento (TGF β -1, FGF2 e PDGFA) estão envolvidos com o processo angiogênico nas polpas dentárias em resposta ao tracionamento ortodôntico e, portanto, processo inflamatório (Derringer & Linden, 2004).

Ainda, o PDGFA é um dos fatores de crescimento mais amplamente encontrado nos tecidos periodontais com importante ação mitogênica relacionada aos processos inflamatórios (Savafi et al., 2008). Por analogia aos fibroblastos pulpares que possuem características imunofenóticas muito similares aos fibroblastos do ligamento periodontal e por se assemelharem na resposta a estímulos agressores se diferenciando em células formadoras de tecido mineralizado (“cementoblast-like” ou “osteoblast-like”) (Martinez, Araújo, 2004), podemos indicar, portanto a expressão no presente estudo, do PDGFA em fibroblastos pulpares.

Concluindo, os achados do presente estudo demonstraram a presença do FGF2, TGF β -1 e PDGFA nas culturas de células de fibroblastos pulpare, com diferentes padrões de imunomarcção, sendo importantes no metabolismo deste tipo celular. No entanto, novos estudos se fazem necessários para o melhor entendimento da participação destas proteínas na fisiologia do tecido pulpar.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que os fibroblastos pulparem em cultura imunoexpressaram os fatores de crescimento estudados (FGF2, TGF β -1 e PDGFA) exibindo diferentes padrões de marcação.

REFERÊNCIAS¹

- About I, Botero MJ, de Denato P, Camps J, Franquim JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res*. 2000 July;258(1):33-41.
- About I, Mitsiadis TA. Molecular aspects of tooth pathogenesis and repair: in vivo and in vitro models. *Adv Dent Res*. 2001;15:59-62.
- Alberts B. *Biologia Molecular da Célula*. 4a ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.1054 p.
- Allouche M, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in hematopoiesis. *Progress in Growth Factor Research* 1996;6:35-48.
- Andrae J, Gallini R, Belshutz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008;15(22):1276-1312.
- Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblast: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Aug;36(8):1367-73.
- Bergenholtz G. Effects of bacterial products on inflammatory reactions on dental pulp. *Scan J Dent Res*. 1977;85:122-9.
- Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. *Anatomia, embriologia e histologia bucal*. 3a ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. 378 p.
- Cam Y, Neumann MR, Ruch JV. Immunolocalization of transforming growth factor beta 1 and epidermal growth factor receptor epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of *in vitro* production of transforming activity. *Arch Oral Biol*. 1009;35:813-822.
- Cam Y, Neumann MR, Oliver L, Raulais D, Janet T, Ruch JV. Immunolocalization of acid and basic fibroblast growth factors during mouse odontogenesis. *Int J Dev Bio*. 1992;36:381-9.
- Carvalho FH, Collarez-Buzato CB. *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Barueri: Manole; 2005. 557p.
- Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analyses of transforming growth factor - beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol*. 1997;42:219-23.
- Chain Y, Bringas P. PDGF-A and PDGF-a regulates tooth formation via autocrine mechanism during mandibular morphogenesis in vitro. *Dev Dyn*. 1998;213:500-11.

¹ De acordo com o Manual de Normalização para Dissertações e Teses do Centro de Pós-graduação São Leopoldo Mandic baseado no estilo Vancouver de 2007, e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

Chan CP, Lan WH, Chang MC, Chen YJ, Lan WC, Chang HH, Jeng JH. Effects of TGF- β s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol.* 2005;50:469-79.

Chiquet-Ehrisman TR. A growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia.* 1995 Sept;51(9-10):853-62

Dalla Favera R, Galo RC, Giallongo A, Croce CM. Chromosomal localization of the human homologue (c-sis) of the simian sarcoma virus oncogene. *Science* 1982;218(4573):686-8.

Derringer KA, Jaggars DC, Linden RWA. Angiogenesis in human dental pulp following orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 1996;75(10):1761-6.

Derringer KA, Linden RWA. Vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor 2, platelet derived growth factor and transforming growth factor beta released in human pulp following orthodontic force. *Arch Oral Biol.* 2004;49:631-41.

D'Souza RN, Happonen RP, Ritter NM, Butler WT. Temporal and spatial patterns of transforming growth factor beta 1 expression in developing rat molars. *Arch Oral Biol.* 1990;35:957-65.

Farges JC, Romeas A, Melin M, Pin JJ, Lebeque S, Luchinni M, Bleicher F, Magloire H. TGF- β 1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer. *J Dent Res.* 2003;82(8):652-5.

Ferreira ANS, Silveira L, Genovese WJ, Araújo VC, Frigo L, Mesquita RA, Guedes E. Effect of GaAIALs Laser on Reactional Dentinogenesis Induction in Human Teeth. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(3):358-65.

Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantification of growth factor IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res.* 1990;5:717-23.

Finkelman RD. Growth factors in bones and teeth. *J Can Dent Assoc.* 1992;20:23-9.

Folkman J, Klagsbrun M. A family of angiogenic peptides. *Nature.* 1987;329:671-672.

Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* 5th ed. New York: Wiley; 2005. 642p.

Fukumoto S, Yamada Y. Review: extracellular matrix regulates tooth morphogenesis. *Connect Tissue Res.* 2005;46(4-5):220-6.

Garcia JM, Martins MD, Jarger RG. Immunolocalization of bone extracellular matrix proteins (type I collagen, osteonectin and bone sialoprotein) in human dental pulp and cultured pulp cells. *Int Endod J.* 2003;36(6):404-10.

Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000 June;34(3):185-94.

- Goldberg M, Lasfargues JJ. Pulpo-dentinal complex revisited. *J Dent.* 1995;23(1):15-20.
- Gospodarowicz D, Jones KL, Sato G. Purification of a Growth Factor for Ovarian Cells from Bovine Pituitary Glands. *Proc Nat Acad Sci.* 1974;71(6):2295-9.
- Gospodarowicz D, Moran JS. Mitogenic effect of fibroblast growth factor on early passage cultures of human and murine fibroblasts. *J Cell Biol.* 1975;66:451-7.
- Goto OF, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest.* 1993;69:508-17.
- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, Denbesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81:531-5.
- 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 USA.* 2000;97:13625-30.
- Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Apr;16(2):179-86.
- He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, Jin Y. Effects of FGF2 on the differentiation of human dental stem cells in vitro. *Cell Biol Int.* 2008 July;32(7):827-34..
- Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: Mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul.* 1990;1:555-66.
- Hillmann G, Geurtsen W. Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulp of various age. *Cell Tissue Res.* 1997;289:145-54.
- Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development* 2003;130:4769-84.
- Hu JCC, Zhang C, Slavkin HC. The Role of platelet-derived growth factor in the development of mouse molars. *Int J Dev Biol.* 1995;39:939-945.
- Huang GTJ, Shagranova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod.* 2006;32(11):1066-73.
- Jernvall J, Theslef I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev.* 2000 Mar;92(1):19-29.
- Kachburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral: texto-atlas correlações clínicas.* São Paulo: Panamericana; 1999. 381p.
- Kuraguchi J, Abiko Y, Ochi M, Kaku T. Effects of PDGF in combination with IGF-1 on pulp fibroblast. *J Dent Res.* 1995;74:545-6.

Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*. 1980;283(5744):249-56.

Lazarides E. Intermediate filaments: a chemical heterogeneous developmentally regulated class of proteins. *Annu. Rev Biochem*. 1982;51:219-50.

Lechner JF, Haugen A, Antrup H, McClendon IA, Trump BF, Haris CC. Clonal Growth of epithelial cells from normal adult human bronchus. *Cancer Res*. 1981;41:2294-2304.

Liebler JM, Picou MM, Qu Z, Powers MR, Rosebaum JT. Altered immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor after bleomycin-induced lung injury. *Growth Factors*. 1997;4:25-38.

Lombardi T, Smanson J, Muhlhauser J, Fiore-Donno G, Maggiano N, Castellucci M. Expression of intermediate filaments and actins in human dental pulp and embryonic dental papilla. *Anat Rec*. 1992;234(4):587-92.

Luisi SB, Barbachan JJD, Chies JAB, Filho MS. Behavior of human dental pulp cells exposed to transforming growth factor-beta 1 and acidic fibroblast growth factor in culture. *J Endod*. 2007;33(7):833-5.

Lyn P, Fiore-Donno G, Lombardi T. The connective cells of human dental pulp: an histologic and immunohistochemical study. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*. 1991 Dec;34(3-4):133-7.

Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Adv Dent Res*. 2001 Aug;15:46-50.

Martin P. Wound-healing aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276:75-81

Martinez EF, Araújo VC, Souza SOM, Côrrea L. Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III collagen in human dental pulp. *J Endod*. 2000;26(12):708-11.

Martinez EF, Araújo VC. In vitro immunoexpression of extracellular matrix proteins in dental pulpal and gingival human fibroblasts. *Int Endod J*. 2004;37:749-55.

Martinez EF, Araújo VC, Sousa SOM, Arana-Chaves VE. TGF- β 1 enhances the expression of α -smooth muscle actin in cultured human pupal fibroblasts: Immunohistochemical and ultrastructural analyses. *J Endod*. 2007;33(11):1313-18.

Mathieu S, El-Battari A, Dejou J, About I. Role of injured endothelial cells in the recruitment of human pulp cells. *Arch Oral Biol*. 2005;50:109-13.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SMED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(10):5807-12.

Mc Collum M, Sharpe PT. Evolution and development of teeth. *J Anat*. 2001;199:153-9.

Moxham BJ, Webb PP, Benjamin M, Ralphs JR. Changes in the cytoskeleton of cells within the periodontal ligament and dental pulp of the rat first molar tooth during ageing. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(01):376-83.

Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Kan M, Mckeehan WL, Fujihara M, Takada K. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor -1 (FGF-1), FGF2 and fibroblast growth factor receptor -1 (FGFR-1) in pleomorphic adenoma of the salivary glands. *J Oral Pathol Med.* 1997;26:17-22.

Nakao K, Itoh M, Tomita Y, Tomooka Y, Tsuji T. FGF-2 potently induces both proliferation and DSP expression in collagen type I gel cultures of adult incisor immature pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Dec 17;325(3):1052-9.

Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. *Arch Oral Biol.* 1992 Mar;37(3):231-6.

Nie X, Tian W, Zhang Y, Chen X, Dong R, Jian M, Chen F, Jin Y. Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture patterns. *Cell Biol Int.* 2006 Apr;30(4):295-300.

Nuggent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. *Int J Bio Chem Cell Biol.* 2000;32:115-20.

O'kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor betas and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29:63-78.

Ornitz DM, Itoh Nobuyuki. Fibroblast growth factors. *Gen Biol.* 2001;2(3):1-12.

Palasaari H, Walhgren J, Lamas M, Ronka H, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF- β 1. *J Dent Res.* 2000;79(1):77-84.

Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/ fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Apr;16(2):159-78.

Quax W, Egberts WV, Hendriks W, Quaxjeuken Y, Bloemendal H. The structure of the vimentin gene. *Cell.* 1983;35(1):215-23.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factor in human dentin matrix. *Arch Oral Biol.* 2000 Nov;45(11):1013-6.

Rutherford RB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulp with recombinant bone morphogenetic protein 7. *Eur J Oral Sci.* 2000 June;108(3):202-6.

Rutherford RB, TrailSmith MD, Ryan ME, Charette MF. Synergistic effects of dexamethasone on platelet-derived growth factor mitogenesis in vitro. *Arch Oral Biol.* 1992 Feb;37(2):139-45.

Savafi SM, Kazemi B, Esmaerli M, Fallah A, Modarresi A, Mir M. Effects of low-level He-Ne laser on the gene expression of IL-1beta, TNF – alpha, IFN gamma, TGF-beta, bFGF and PDGF in rat's gingival. *Laser Med Sci.* 2007;23(3):331-5.

Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nkaishi K, Takemoto T et al. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine(SPARC). *J Cell Physiol.* 1998;174:194-205.

Shiba H, Nakamura S, Shirakawa M, Nakanishi K, Okamoto H, Satakeda H. Effects of basic fibroblast growth factors on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. *Dev Biol.* 1995 Aug;170(2):457-66.

Shiba H, Uchida K, Kamihagi K, Sakata M, Fujita T, Nakamura S et al. Transforming growth factor beta 1 and basic fibroblast growth factor modulate osteoclin and osteonectin/SPARC synthesis in Vitamin-D-activated pulp cells. *J Dent Res.* 2001;80(7):1653-1.

Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa T, Noshiro M, Kato Y. Transforming growth factor beta 1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J Dent Res.* 1994;73(9):1509-14.

Sloan AJ, Matthews JB, Smith AJ. TGF- beta receptor expression in human odontoblast and pulp cells. *Histochem J.* 1999;32(8):565-9.

Smith AJ, Tobias RS, Murray PE. Transdental stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res.* 2001 Aug;15:51-4.

Smith AJ. Vitality of dentin-pulp complex in health and disease: Growth factors as key mediators. *J Dent Educ.* 2003;67(6):678-89.

Soriano P. The PDGF alpha receptor is required for neural crest cells development and for normal patterning of the somites. *Development.* 1997;124:2691-2700.

Stenman G, Rorsman F, Huebner K, Beltsholtz Z. The human platelet-derived growth factor alpha chain (PDGFA) gene maps to chromosome 7p22. *Cytogen Cell Genet.* 1992a 59:22-3.

Stephenson DA, Mercola M, Anderson E, Wang C, Stiles CD, Bowen-Pope DF, Chapman VM. Platelet-derived growth factor α -subunit gene (PDGF α) is deleted in the mouse Patch(Ph) mutation. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88:6-10.

Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J.* 1995;9:866-73.

Thesleff I, Vainio S, Jalkanen M. Cell matrix interactions in tooth development. *Int J Dev Biol.* 1989;33(1):91-7.

Thesleff I, Keranen S, Jernvall J. Enamel Knots as Signaling Centers Linking Tooth Morphogenesis and Odontoblast Differentiation. *Adv Dent Res.* 2001 Aug;15:14-8.

Thomas KA. Fibroblast Growth factors. *Faseb J*. 1987;1:434-40.

Tjaderhane L, Salo T, Larmas M, Overall CM. A novel organ culture method to study the function of human odontoblasts in vitro: gelatinase expression by odontoblasts is differentially regulated by TGF β -1. *J Dent Res*. 1998;77(7):1486-96.

Tjaderhane L, Palossari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res*. 2001;15:55-8.

Toyono T, Nakashima M, Kuhara S, Akamine A. Expression of TGF- β superfamily receptors in dental pulp. *J Dent Res*. 1997;76(9):1555-60.

Tran-Hung L, Mathieu S, About I. Role of human pulp fibroblast in angiogenesis. *J Dent Res*. 2006;85(9):819-23.

Tran-Hung L. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol*. 2008;(53):9-13.

Tweeden K, Spadone D, Terranova V. Neovascularization of surface demineralized dentin. *J Periodontol*. 1989;60:460-6.

Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, Asic J, Komnenou A. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor- β 1 on dog dental pulp cells in vivo. *Arch Oral Biol*. 1998;43:431-44.

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J. Dent*. 2000;28(2):77-92.

Tziafas D, Belibasakis G, Veis A, Papadimitiou S. Dentin Regeneration in vital pulp therapy: Design Principles. *Dent Res*. 2001;15:96-100.

Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res*. 2004;39:314-20.

Unda FJ, Martin A, Hernandez C, Pérez-Nanclares G, Hilário E, Arechaga J. FGFs-1 and -2, and TGF β -1 as inductive signals modulating in vitro odontoblast differentiation. *Adv Dent Res*. 2001;15:34-8.

Vaahtokari A, Vainio S, Theslef I. Associations between transforming growth factor β 1 RNA expression and epithelial-mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. *Development*. 1991;113:985-94.

Van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJM. The concentration extractability and characterization of collagen in human dental pulp. *Arch Oral Biol*. 1983;28:339-45.

Wang X. Molecular mechanism underlying tooth morphogenesis and cell differentiation [dissertação]. Helsinki: Viikki Graduate School in Biosciences. University of Helsinki; 2004.

Wisithpromk K, Windsor J. The effects of Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6 and Transforming Growth Factor- β on Pup Fibroblast Mediated Collagen Degradation. *J Endod.* 2006;32(9):853-61.

Xu X, Bringas P, Soriano P, Chai Y. PDGFR- α signaling is critical for tooth cusp and palate morphogenesis. *Dev Dyn.* 2005;232:75-84.

Young CS, Kim SW, Qin C, Baba O, Butler WT, Taylor RR et al. Developmental analysis and computer modelling of bioengineered teeth. *Arch Oral Biol.* 2005 Feb;50(2):259-65.

Yura Y, Yoshioka Y, Yamamoto S, Kusaka J, Bando T, Yoshida H et al. Enhancing effects of fibroblast growth factor on the proliferation of salivary gland carcinoma cells and salivary gland carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2001;30(3):159-67.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

São Leopoldo Mandic
Faculdade de Odontologia
Centro de Pesquisas Odontológicas
Certificado de Cumprimento de Princípios Éticos

C E R T I F I C O que, após analisar o projeto de pesquisa 2ª Via

Título: *Expressão das proteínas da matriz extracelular tenascina, fibronectina e colágenos tipos I e III em cultura de fibroblasto de polpa de dentes decíduos através de imunofluorescência.*

Pesquisador principal: Cristiane Loureiro Matni

Orientador: Vera Cavalcante de Araújo

Data Avaliação: 20/7/2006

o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia e Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic considerou que o projeto está de acordo com as diretrizes para a proteção do sujeito de pesquisa, estabelecidas pela Resolução nº 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde.

Campinas, SP, Brazil, quinta-feira, 18 de dezembro de 2008

CERTIFICATION OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES

I hereby, certify that upon analysis of the Research Project,

Title:

Main Researcher(Author): Cristiane Loureiro Matni

Advisor: Vera Cavalcante de Araújo

the Committee of Ethics for Research of São Leopoldo Mandic School of Dentistry and Research Center, has considered the mentioned project to be in accordance to the guidelines of protection to the subject of the research, established by the Regulation number 196/96, from the National Health Council of the Brazilian Health Ministry.

Profa. Dra. Sônia Vieira
Presidente do Comitê de Ética e Pesquisa