

Vanessa Aparecida Carvalho Santos

**Estudo dos mecanismos envolvidos na expressão
de fator de crescimento de células progenitoras e
fator de crescimento para fibroblastos-2 por
odontoblastos estimulados por lipopolissacarídeos
via p42/44, p38 e PI3K**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor
em Ciência Odontológica.

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Helena Penha de
Oliveira

ARAÇATUBA - SP

2011

Dedicatória

A Deus, sempre em primeiro lugar

*Deus obrigado por ter me dado coragem e determinação para ter
vivido esta etapa da minha vida com plenitude*

*Obrigada por me fazer amparada por este amor eterno, que me
nutre e embala, me fez amar e perdoar todas as desavenças que
por hora apareceram.*

Agradecimentos

A Deus

A meus queridos e amados pais,

Faltaria aqui espaço para descrever vocês, o meu obrigado é pouco diante da grandeza de sentimento que por vocês tenho e me falta gratidão para recompensar tudo que fazem por mim.

À minha querida irmã, Edilene

Di

Minha irmã!!!! Minha irmãzinha, talvez você ainda não faça idéia da responsabilidade que tenha pelo fruto dessa realização, minha fonte de inspiração, te amo muito.

Aos meus avós maternos, Iracema (in memorian) e Agripino e a meus avós paternos, Gerson (in memorian) e Irene (in memorian), que apesar de estarem distante, as suas presenças em vida me transbordaram de êxtase e animo, meu amor e admiração.

Aos meus tios e tias, que vibram e torcem sempre por mim, fazendo que meu exemplo familiar seja invejável, obrigada pela família unida e maravilhosa que somos.

Ao meu namorado,

Di,

Que nestes anos passados foram força e calma nas tribulações enfrentadas, sempre com muito amor e dando sempre a certeza do que é sentir e viver este sentimento te amo!!

Ao meu querido cunhado,

Giu

Obrigada pela amizade, por cuidar tão bem da minha irmãzinha e por todo apoio ao longo destes anos!

A minha sobrinha e afilhada Isabel,

Amo-te de uma maneira inexplicável, te amo involuntariamente e por instinto, meu anjo maior.

Aos meus afilhados Gabriel e Gerson e Ana Júlia que refletem toda alegria que uma pessoa poderia ter amo vocês.

À minhas amadas amigas, obrigada por entenderem essa distância e mesmo assim vibrarem com cada vitória e me esperarem sempre.

Vocês sabem o quanto amo vocês.

À minhas amigas que vieram com esta nova etapa da minha vida, vocês todas são muitíssimo especiais.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba

À Professora Sandra Helena Penha de Oliveira, pela orientação neste trabalho

Ao Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Profª Dra. Rosângela dos Santos Nery, Profª Dra. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar pelo carinho e atenção em todos os momentos.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos Ferreira Fernandes e Mário Luis da Silva, pela amizade, ajuda e convivência minha gratidão.

Aos queridos amigos da minha turma de Doutorado, obrigada pelo bom convívio e aprendizagem. Aprendi muito com vocês.

Aos colegas da Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP, Ana Cláudia, Cláudio, Ivone, Izamar, Luzia, Maria Cláudia e Marina pela atenção e disponibilidade com que sempre me receberam.

Ao Diogo, Marina e Valéria da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, pela paciência, carinho e atenção, com grande carinho serão sempre lembrados.

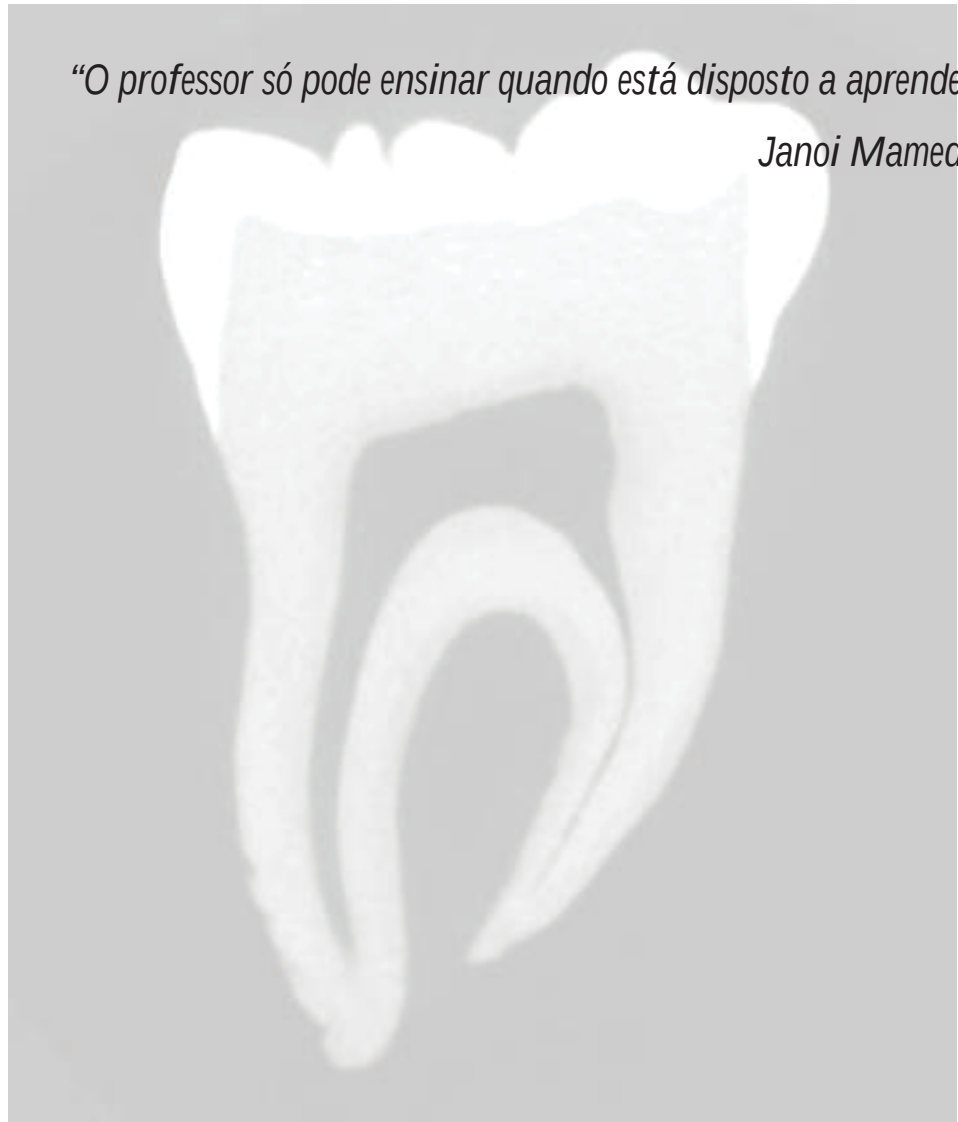
A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização do projeto de pesquisa, processo número 2008/51486-2, do Curso de Doutorado.

EPIGRAFE

“O professor só pode ensinar quando está disposto a aprender”

Janoi Mamedes





Resumo

Santos VAC. Estudo dos mecanismos envolvidos na expressão de SCF e FGF 2 por odontoblastos estimulados por LPS via p42/44,p38 e pI3k [tese] Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, 2011.

RESUMO

Avaliar a expressão de SCF e FGF-2 por odontoblastos (OD) estimulados por LPS, via p42/44, p38 e PI3K no processo. OD line MDPC-23 murino células foram estimuladas com 0,1, 1, 10 e 100 µg / ml LPS por horas 1, 6 e 24. A expressão de SCF e FGF-2 no OD foi avaliada por RT-PCR. Produção de SCF no sobrenadante da cultura foi analisado por ELISA. Examinar se a expressão de SCF e FGF 2eram e produção de citocinas dependentes / ou presença de leucotrienos, as células foram pré-tratados com dexametasona (DEXA) e MK886 (MK) por 30 minutos e então estimulados com LPS (0, 1 µg / mL) para 1 hora. Para avaliar as vias de transdução de sinal, as células foram pré-tratados por 30 minutos com um inibidor específico para p42/44 (PD98059, PD), p38 (SB203580, SB) e PI3K (wortmannin, Wort), logo depois foram estimulados com LPS (0.1µg / mL) por 1 hora. Células estimuladas por LPS após 1 hora expressar SCF em uma concentração de 0,1 µg / mL com concentrações decrescentes de 1, 10 e 100, seguidos por períodos de 6 e 24 hous. A expressão do FGF 2 em odontoblastos estimulados por LPS eram capazes de induzir concentrações 0,1 e 10 µg/mL 1 hora após. A DEXA e MK foram capazes de inibir a expressão de mRNA para SCF e FGF-2. PD, SB e Wort bloqueou a indução da expressão do SCF e FGF-2. DEXA e MK inibiu a expressão de SCF e FGF-2 através da ativação de p42 / 44, p38 e PI3K. : Os dados sugerem que SCF e FGF-2 liberados pela OD podem atuar como moduladores da resposta imune e reparação os tecidos após a inflamação, levando à produção de mediadores químicos que participam na formação de novos tecidos de celulares.

PALAVRAS-CHAVE: Odontoblastos, Inflamação

Abstract



Santos VAC. Study of the mechanisms involved in the expression of SCF and FGF 2 by LPS-stimulated odontoblasts via p42/44, p38 and PI3K [theses] Dental School of Araçatuba, UNESP- Sao Paulo State University; 2011.

ABSTRACT

Evaluate the expression of SCF and FGF-2 by odontoblasts (OD) stimulated by LPS, via p42/44, p38 and PI3K in the process. OD line MDPC-23 murine cells were stimulated with 0.1, 1, 10 and 100 µg / mL LPS for 1, 6 and 24 hours. The expression of SCF and FGF-2 in OD was evaluated by RT-PCR. Production of SCF in the culture supernatant was analyzed by ELISA. To examine whether the expression of SCF and FGF 2 is dependent on cytokine production and / or presence of leukotriene, cells were pretreated with dexamethasone (DEXA) and MK886 (MK) for 30 minutes and then stimulated with LPS (0, 1 µg / mL) for 1 hour. To evaluate signal transduction pathways, cells were pretreated for 30 minutes with a specific inhibitor for p42/44 (PD98059, PD), p38 (SB203580, SB) and PI3K (wortmannin, Wort), soon after were stimulated with LPS (0.1 µg/mL) for 1 hour. Cells stimulated by LPS after 1 hour express SCF in a concentration of 0.1 µg / mL with decreasing concentrations of 1, 10 and 100, followed by periods of 6 and 24 hours. The expression of FGF 2 in odontoblasts stimulated by LPS were capable of inducing concentrations 0.1 and 10 µg/mL 1 hour after. The DEXA and MK were able to inhibit the expression of mRNA for SCF and FGF-2. PD, SB and Wort blocked the induction of expression of the SCF and FGF-2. DEXA and MK inhibited the expression of SCF and FGF-2 via activation of p42 / 44, p38 and PI3K. The data suggest that SCF and FGF-2 released by the OD can act as modulators of immune response and tissue repair after inflammation, leading to production of chemical mediators.

KEYWORDS: Odontoblast, Inflammation

Lista de Figuras

- Figura 1. LPS induz expressão de SCF e FGF-2 em linhagem celular de odontoblastos (MDPC-23). A expressão de SCF e FGF-2 foi analisada pela técnica de reação em cadeia de polimerase da transcriptase reversa (RT-PCR). Para tanto os odontoblastos foram estimulados por LPS nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL. A expressão do RNA mensageiro para SCF e FGF-2 foi avaliada 1, 6 e 24 horas após. Como controle positivo interno foi usado a B-actina. Nota-se a área de expressão das bandas, por densiometria onde o grupo alvo foi comparado com a β-actina. 43
- Figura 2. LPS induz expressão de SCF e FGF-2 em linhagem celular de odontoblastos (MDPC-23). A expressão de SCF foi analisada pelo ELISA. Para tanto os odontoblastos foram estimulados por LPS nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL. A produção do SCF foi avaliada 1, 6 e 24 horas após. Os resultados foram expressos como média±EPM. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3. Dexametasona e MK886 inibem expressão de SCF e FGF-2 em odontoblastos estimulados com LPS (0,1 µg/mL) 1 hora após a estimulação. A análise foi realizada pelo RT-PCR (A). Expressão de SCF e FGF-2 foi suprimida pelo efeito da dexametasona e MK886. (B e C). Observa-se a área de expressão das bandas, por densiometria. 45
- Figura 4. Nível de SCF no sobrenadante de linhagem de células MDPC-23 pré tratadas com Dexametasona (10 µM) e MK886 (1 µM) 1 hora após a estimulação por LPS (0,1 µg/mL). Níveis de SCF foram analisados por ELISA. Os resultados foram descritos como média±EPM. 46
- Figura 5. Odontoblastos estimulados por LPS expressam SCF e FGF-2. Odontoblastos foram estimulados com LPS (0,1 µg/mL). As células foram pré-tratadas com PD (30 µM), SB (30 µM) e Wortmannin (Wort, 0,1 µM), por 30 minutos antes do estímulo (A, B e C). Observa-se a área de expressão das bandas, por densiometria. 47
- Figura 6. Nível de SCF no sobrenadante de linhagem de células MDPC-23 pré tratadas com PD (30 µM), SB (30 µM) e Wort (wort, 0,1 µM) 1 hora após a

Lista de Figuras

estimulação por LPS (0,1 µg/mL). Níveis de SCF foram analisados por ELISA. Os resultados foram expressos como média±EPM 48

Figura 7. Expressão da proteína FGF 2 em linhagem de células MDPC-23 pré tratadas com Dex (10µM) e Mk886 (1µM) e com PD (30 µM), SB (30 µM) e Worthmannin (wort, 0,1 µM) 1 hora após a estimulação por LPS (0,1 µg/mL). As amostras foram analisadas por western blot. Os resultados foram expressos como média±EPM. 49

Sumário

1 Introdução	20
2 Revisão de Literatura	25
2.1 Odontoblastos	25
Origem Celular	25
2.2 Funções: Formação de dentina	26
2.3 Odontoblastos na resposta imune	28
2.4 Fator de Crescimento para Fibroblastos	29
2.5 Fator derivado de células progenitoras	30
2.6 Via de Sinalização Intracelular envolvida na estimulação dos odontoblastos	32
2.7 O papel da via de sinalização intracelular p38	32
2.8 O papel da via de sinalização intracelular PI3Kinase	33
2.9 Papel da p42/44 na via de sinalização intracelular	33
3 Material e Método	36
3.1 Células	36
3.2 Cultura de Odontoblastos	36
3.3 Estimulação dos Odontoblastos	36
3.4 Extração e dosagem do RNA mensageiro dos Odontoblastos.	36
3.5 Avaliação da expressão de mRNA SCF e FGF- 2 pela técnica de RT-PCR	40
3.6 Determinação do nível do SCF por odontoblastos estimulados por LPS	38
3.7 Determinação da participação de citocinas e mediadores químicos sobre a expressão de SCF e FGF-2 por odontoblastos estimulados por LPS	39
3.8 Avaliação das vias de sinalização intracelulares que estarão envolvidas na expressão de SCF e FGF-2 por odontoblastos estimulados por LPS	39
3.9 Análise por Western Blotting da produção de FGF 2 por odontoblastos estimulados por LPS	39
4	Resultados
422	
4.1 Expressão de SCF e FGF-2 por linhagem celular de odontoblastos estimulados por LPS em diferentes concentrações	42
4.2 Determinação do nível de SCF por odontoblastos estimulados por LPS pelo ELISA	43
4.3 Dexametasona e MK886 inibem expressão do RNA mensageiro de SCF e FGF-2 por odontoblastos estimulados por LPS	43

Sumário

4.4 Efeito da Dexametasona e MK886 sobre a produção de SCF por odontoblastos estimulados por LPS	45
4.5 Avaliação das vias de sinalização intracelulares envolvidas na expressão do RNA mensageiro para SCF e FGF-2 por odontoblastos estimulados por LPS	48
4.6 Envolvimento da p42/44, p38 e PI3k na produção de SCF por odontoblastos estimulados por LPS	49
4.7 LPS ativa vias de sinalização intracelulares na produção de FGF 2 em odontoblastos e promove produção de leucotrieno b4 e citocinas	480
5	Discussão
511	
6 Conclusão	57
Referências	59

1 Introdução

A polpa dental é protegida da ação de microrganismos da cavidade oral pelo esmalte de dentina. É composta por vários elementos teciduais, incluindo nervos, tecido vascular, fibras do tecido conjuntivo, substância fundamental amorfa, líquido intersticial, odontoblastos, fibroblastos, células apresentadoras de antígeno e outros componentes celulares menores.¹

As células mais distintas da polpa e talvez as mais prontamente reconhecíveis são os odontoblastos, os quais formam uma camada única limitando a periferia da polpa e apresentam um processo que se estende para o interior da dentina.² Desta forma, são as primeiras células pulpares a encontrar o patógeno dental desempenhando um papel crucial para formação e manutenção da dentina.³ O odontoblasto sintetiza principalmente o colágeno tipo I, embora pequenas quantidades de colágeno tipo V tenham sido encontradas na matriz extracelular. Além de proteoglicanos e colágeno, o odontoblasto ainda secreta a sialoproteína da dentina e fosforina, uma fosfoproteína altamente fosforilada envolvida na mineralização extracelular. A fosforina é exclusiva para a dentina e não é encontrada em outras células da linha mesenquimal. O odontoblasto também secreta fosfatase alcalina, uma enzima que está intimamente associada a mineralização.¹ Pela importância dessa célula residente na polpa dental seria importante desvendar os mecanismos envolvidos na sua ativação e os fatores responsáveis pela indução da angiogênese por elas após o desenvolvimento de um processo inflamatório inicial.

A agressão à polpa pode ser de origem biológica, física e química.⁴ A agressão biológica, representada por microrganismos, é a mais importante no que tange à indução e principalmente perpetuação da patologia pulpar.⁵ As bactérias cariogênicas e seus produtos difundem-se até a polpa através dos canalículos dentinários e é considerada a causa mais comum da pulpíte.⁶ As bactérias Gram-positivas tais como, *Streptococcus* e *Lactobacillus* têm sido encontradas em cáries de dentina⁷ e na presença de glicose, produzem grandes quantidades de ácido lipoteicóico,⁸ uma molécula encontrada na parede celular que tem sido relacionada com inflamação.⁹ As bactérias Gram-negativas tais como *Prevotella* e

Porphyromonas também têm sido encontradas em dentes com cáries de dentina e com sintomas de pulpíte reversível¹⁰ e em dentes com cáries profundas e/ou exposição pulpar com pulpíte irreversível.¹¹ Estas bactérias desempenham um papel significativo no desenvolvimento de sintomas clínicos através da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina (IL)-1 β ,¹² IL-6¹³ e IL-8.¹⁴ Ao contrário do ácido lipoteicoico encontrado na parede celular de bactérias gram-positivas, a parede celular de bactérias gram-negativas contém lipopolissacarídeo (LPS)¹⁵.

Lipopolissacarídeo é uma molécula composta de polissacarídeos e fosfolipídeos. O componente hidrofóbico do LPS (lipídeo A) está na parede celular bacteriana e determina as propriedades de toxicidade e pirogenicidade¹⁵. LPS induz muitas citocinas inflamatórias e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em fibroblastos gengivais¹⁶. Além disso, induz aumento do metabolismo do ácido araquidônico na polpa e aumento de prostaglandinas, resultando em aumento da permeabilidade vascular e infiltração de neutrófilos¹⁷.

Os lipopolissacarídeos derivados da cárie dentinária profunda podem levar a um aumento da vascularização pulpar. As mudanças hemodinâmicas iniciais nos capilares e vênulas são a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular dentro da polpa.¹⁸ A absorção dos fluidos vindos das vênulas, fluxo linfático aumentado e abertura de anastomoses arteriovenosas são mecanismos usados pelo tecido pulpar para manter a pressão intrapulpar¹⁹. Entretanto, a polpa dental é confinada dentro de paredes rígidas²⁰ e a pressão do tecido pulpar tende a aumentar quando é exposta a estímulos nocivos, tal como a cárie. Quando a pressão intrapulpar não puder ser controlada pelos mecanismos de liberação de pressão pode ocorrer inflamação pulpar irreversível ou necrose pulpar.⁵ Assim sendo, a permeabilidade vascular é um fenômeno importante para o controle da pressão pulpar.

A permeabilidade dos vasos é uma das alterações mais significativas que se desenvolve em decorrência da injúria pulpar que pode ser devido à neoformação vascular. Durante o processo de inflamação tecidual, as células endoteliais proliferam e dão origem a novos vasos, o que é denominado angiogênese. À medida que vão sendo formados, os brotos vasculares permitem o escape de fluidos.⁴ O processo da angiogênese é uma etapa importante para o desenvolvimento da

homeostase tecidual, reparo tecidual, processo inflamatório e para progressão de tumores sólidos²¹

A angiogênese é um processo amplo e complexo que é regulado por moléculas que induzem ou inibem neovascularização.^{21,22} O Fator de crescimento para fibroblasto (FGF), o Fator derivado de célula progenitora (SCF) são fatores que podem induzir a angiogênese^{23,24}

O FGF-2 é expresso em células de origem mesodérmica e neuroectodérmica e em uma variedade de células tumorais. FGF-2 é um potente mitógeno para diferentes tipos celulares incluindo células endoteliais vasculares e fibroblastos.²⁵ Estudos *in vivo* têm detectado FGF-2 na lâmina basal de capilares sangüíneos e no endotélio de capilares de alguns tumores²¹, sugerindo que células endoteliais que originam FGF-2 podem mediar angiogênese de maneira autócrina. Esta hipótese é confirmada pela observação que FGF-2 tem efeito autócrino sobre muitas funções celulares exigidas para angiogênese, incluindo proliferação, migração, produção de proteínas e expressão de integrinas.²³

Outro fator de crescimento angiogênico é o SCF que se liga e ativa o c-kit (CD117), que é um receptor tirosina quinase III e produto do c-Kit proto-oncogene.²⁶ SCF é secretado por células da medula óssea, e mantém a sobrevivência e a proliferação das células hematopoiéticas tais como mastócitos e eosinófilos. Algumas células de origem mesenquimal são conhecidas em expressar SCF, incluindo fibroblastos da mucosa oral²⁷ Este fator tem papel importante no crescimento e diferenciação de mastócitos²⁸, além de potencial mitógeno com propriedades quimiotáticas sobre células endoteliais primárias *in vitro* e também pode induzir resposta angiogênica em tumores associados a angiogênese *in vivo*.²⁴

Biologicamente, as respostas inflamatórias consistem em reações vasculares e celulares por meio do quais muitos tecidos e células, fluidos e proteínas plasmáticas desempenham funções interativas em vários estágios. Neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas são células circulantes, os mastócitos circundam os vasos sangüíneos e os fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e macrófagos são células residentes nos tecidos conjuntivos. Durante a inflamação a interação entre essas células e os mediadores químicos (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimentos, enzimas e espécies de nitrogênio e oxigênio reativos) pode causar, mediar ou potencializar os sinais da inflamação.^{29,30}

A via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) é um dos maiores sistemas capazes de mediar sinais de transdução para diversos estímulos extracelulares.³¹ Todas as MAPKs apresentam a sequência de aminoácidos Thr-Xxx-Tyr na qual X difere de acordo com a isoforma podendo ser ácido glutâmico (Glu) na MAPK tipo p44/42 (ERK), prolina (Pro) na MAPK, JNK e glicina (Gly) na MAPK p38 formando assim os três maiores grupos de MAPK até o presente conhecidos.³² As MAPKs regulam um número de fatores de transcrição com subsequente ativação de metaloproteínas e expressão de citocinas e recentemente foi observado que a produção de MMP-2 por cultura de células da polpa dental humana foi regulada pela via da enzima ciclooxigenase 2, NF- κ B e tirosina quinases.³¹ A produção de fator ativador plasminogênico em polpas humanas estimuladas com IL-1 α foram inibidas pelas vias de transdução de sinal p38, e PI3K.³³ Assim, é importante conhecer a via de sinalização envolvida, uma vez que a via pode regular a produção de citocinas.

O FGF-2 e o SCF são reguladores de respostas neovasculares por todo corpo, no entanto sua função na polpa dental é desconhecida. O objetivo deste estudo será avaliar a expressão e produção de FGF-2 e SCF por odontoblastos estimulados por LPS e os mecanismos envolvidos na expressão destes fatores de crescimento. Além disso, avaliaremos a participação da via das mapquinases que podem estar envolvidas na ativação de odontoblastos para a produção de FGF-2 e SCF.

O objetivo deste estudo será avaliar a expressão e produção de FGF-2 e SCF por odontoblastos estimulados por LPS e os mecanismos envolvidos na expressão destes fatores de crescimento.

2 Revisão da Literatura

2.1 Odontoblastos

Origem Celular

Odontoblastos são derivados de células do tecido conjuntivo embrionário, que são chamadas de células ectomesenquimais, porque a sua origem se dá a partir da crista neural.

Células da crista neural tem seu início ao migrar para preencher as primeiras regiões arco branquial (faringe) formando o ectomesênquima que dá suporte para todas as estruturas, moles e duras do tecido conjuntivo craniofacial. Primeiro, o epitélio oral primitivo engrossa e se prolifera no ectomesênquima subjacente que sofre uma condensação visível celular, o que resulta no estabelecimento da papila dental. Uma variedade de interações deste epitélio, são responsáveis pela iniciação da formação dental.³⁴ Quando odontogênese começa, a proliferação de células epiteliais é um evento notável. A diferenciação dos odontoblastos começa somente após o germe do dente atingir a forma da ponta das cúspides da coroa dental.

Os odontoblastos são células que apresentam um núcleo de alta relação com seu citoplasma. Eles possuem várias prologamentos e contêm polirribossomos, mas poucos retículos endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e mitocôndrias.

Moléculas sinalizadoras surgem a partir de células epiteliais que começam a sua diferenciação em ameloblastos, possivelmente modificando a lâmina basal interna, a fim de induzir as células pós-mitóticas externa da papila dental a se diferenciar em odontoblastos.³⁵ Alguns fatores de crescimento, como TGF-1, tem se mostrado expressos pelas células epiteliais, neste momento, no início de desenvolvimento da sequência de interações de células do epitélio-mesenquimais.³⁶ Também é possível que moléculas de

amelogenina, que são secretadas pelos ameloblastos diferenciados ou outras formas de amelogenina ou mesmo peptídeos podem participar na indução de diferenciação deste fenômeno.³⁷ A diferenciação dos odontoblastos começa pela secreção de dentina antes do início da secreção da matriz do esmalte por ameloblastos.

2.2 Funções: Formação de dentina

Dentina é o tecido mineralizado que constitui a maior parte do dente. Está intimamente relacionada com a polpa dental com o qual compartilha a mesma origem embriológica a partir da papila dental. A deposição da matriz extracelular da dentina começa quando as células da papila dentária externa são induzidas a diferenciar em odontoblastos. Os odontoblastos diferenciados então secretam a matriz orgânica para o estabelecimento da camada dentinária. No início da formação da dentina, essa matriz é composta principalmente por fibras de colágeno, que são depositadas na superfície da papila dental. A dentina inicial que é composta por fibras de colágeno que são visivelmente grandes e que a longo prazo, alinham para formar ângulos retos com a lâmina basal, com o depósito de colágeno os odontoblastos e outros componentes da dentina inicial, formam numerosas esferas, membranas limitadas, em variados tamanhos. Elas estabelecem uma estreita relação de proteoglicanos / glicosaminoglicanos que são associados à ligação de íons de cálcio.³⁸

A diferenciação dos odontoblastos começa quando a célula começa a se mover em direção ao centro da papila dental enquanto um dos processos da célula se torna gradualmente mais acentuada. Este processo celular que é deixado para trás na formação da dentina constitui o processo odontoblástico, em torno do qual a matriz de dentina mineraliza, assim formando o túbulo dentinário.

Os odontoblastos totalmente diferenciados são capazes de secretar produtos que incluem sialoproteína da dentina (DSPP), uma proteína grande dos quais que, posteriormente, podem originar dois produtos, a dentina

sialoproteína (DSP) e dentina fosfoproteína (DPP), dentina proteínas de matriz 1, 2 e 3 (DMP-1, DMP-2, e DMP-3, respectivamente), e pequenas quantidades de quatro proteínas (osteopontina, sialoproteína, osteonectina e osteocalcina), que são proteínas abundantes no osso.³⁹⁻⁴¹

A dentina formada até a conclusão do desenvolvimento da raiz é definida como a dentina primária. Porque a dentina depositada pelos odontoblastos durante toda a vida, é uma dentina secundária e esta é prevista em um ritmo muito mais lento do que a dentina primária. Dentina primária e secundária possuem uma estrutura similar. A formação de dentina secundária ocorre principalmente no teto e assoalho da câmara, levando a uma redução crescente da altura da cornos pulpares. É importante dizer que os odontoblastos são células pós-mitóticas que permanecem para a vida do dente. Odontoblastos podem, no entanto, formar um terceiro tipo de dentina, a dentina terciária. Existem dois subtipos de dentina terciária. A dentina terciária formada pelo odontoblastos em resposta ao atrito, cáries ou outros estímulos, tais como alguns procedimentos restauradores é chamado dentina reacionária. Em geral a espessura dos tubulos dentinários da dentina recém-formada está relacionada com a intensidade e duração do estímulo. A dentina possui uma matriz orgânica reacionária bem como um teor de minerais semelhantes aos encontrados na dentina primária e secundária. Em outros casos, no entanto, alguns fatores externos, tais como a cárie dentária pode afetar de forma irreversível o camada odontoblástica em uma dada região. Preparo cavitário durante procedimentos restauradores em odontologia podem também afetar a camada odontoblástica. Considerando cavidades rasas estas podem produzir perturbação das junções entre odontoblastos, em preparação de cavidade profunda tem sido demonstrado que, podem causar aspiração do corpo odontoblástico, portanto, prejudicando sua formação citoplasmática e resultando em morte celular. Estas situações em última análise, podem promover patologias diversas. Fazendo com que células semelhantes possam surgir para formar um outro subtipo de dentina terciária que é chamada dentina reparadora.⁴² Acredita-se que células ectomesenquimais indiferenciada presentes na polpa, especialmente na camada subodontoblástica, são as

células que produzem a dentina reparadora. Embora os mecanismos exatos que induzem a diferenciação de células pulpares em odontoblastos ainda são desconhecidas, as novas células surgem após uma sinalização de fatores de crescimento que desencadeia uma cascata de eventos que envolvem a divisão celular, quimiotaxia, migração celular, adesão celular e citodiferenciação.

2.3 Odontoblastos na resposta imune

O dente humano é o alvo de um grande número de agentes orais bacterianos que iniciam o desenvolvimento de lesões de cárie, que desmineralizam o esmalte que, normalmente, constitui uma barreira impermeável para proteger a dentina e tecidos pulpares (Hamilton, 2000). Após a agressão do esmalte, a dentina é exposta ao meio bucal e torna-se degradada por produtos de bactérias. Bactérias cariogênicas é o gatilho para um evento inflamatório e eventos de respostas imune nas células por meio da difusão dos subprodutos nos túbulos dentinários. Estes eventos podem eliminar o insulto bacteriano e bloquear a via de infecção quando acompanhada pela formação de dentina na interface polpa-dentina.¹⁰ Sua eficácia existe, mas permanece resultados relativos, muitas vezes insatisfatório. Novos agentes terapêuticos capazes de limitar estes eventos inflamatórios dentro da polpa dentária vem sendo descobertos, assim, se fazem necessário para manter a vitalidade do tecido e aumentar a capacidade de reparação. Eles devem visar células e/ou moléculas responsáveis pelo desencadeamento e ampliação de tais eventos celulares que atuem na resposta imune. Dados recentes têm sugerido que odontoblastos estão envolvidos na iniciação, desenvolvimento e manutenção da polpa em respostas imunológicas desencadeadas em resposta a processos inflamatórios causados por bactérias orais.^{44,45} Odontoblastos são, portanto, as primeiras células encontradas por bactérias, e produtos bacterianos que entram a partir da dentina, e eles representam no dente a primeira linha de defesa contra o ataque. Todos os organismos multicelulares desenvolveram mecanismos para afastar os invasores microbianos em potencial de prejudicar sua forma. Ter domínio para lidar

contra a infecção com um sistema imune inato para a defesa, inclui a secreção de citocinas e fatores de crescimento celular com atividade pró-inflamatórias.^{46,47}

2.4 Fator de Crescimento para Fibroblastos

O fator de crescimento fibroblástico FGF-2 é conhecido por desempenhar um papel importante na fase inicial da cicatrização, influenciando a proliferação e migração e de produção da matriz extracelular.^{48,49}

Recentemente, FGF-2 foi localizado em dentina,⁵⁰ sugerindo que o FGF-2 encontrados na dentina advém de estímulos químicos, bacterianos e estímulo mecânico.⁵¹ Quando liberado pode desempenhar um papel fundamental na cicatrização de injúrias que acometem a dentina e podem ajudar na regeneração da polpa. Frente à uma lesão os fibroblastos da polpa dental liberam fatores de crescimento angiogênicos incluindo FGF-2.⁵² O FGF-2, é então lançado no tecido pulpar dental durante o processo de cicatrização de feridas.^{53,54} Depois da lesão do tecido pulpar dental, ocorre o acúmulo de células inflamatórias, seguido pela migração de células para a área da injúria que são responsáveis pela regeneração de novos tecidos através de interação com um fator quimiotático e da matriz extracelular. Portanto, quando o complexo dentina-polpa está acometido, eventos da reparação tecidual ocorrem, em células da polpa dental humana (HDPC). Estas células podem ser expostas ao FGF-2 e submetidas a ativação por este fator. Já vem sendo realizado, a aplicação tópica de FGF-2 em lesões de furca e foi demonstrado que o FGF 2 foi capaz de induzir a regeneração,^{55,56} sugerindo que FGF-2, potencializa a atividade das células do ligamento periodontal e osso alveolar através da sua migração, citodiferenciação proliferação. No entanto, os efeitos da FGF-2 sobre as funções biológicas, em células da polpa humana(HDPC) ainda precisam ser esclarecidos. Na base destes achados da literatura, a hipótese de que o FGF-2 desempenha um papel significativo na proliferação, migração, mineralização em HDPC, vem sendo cada vez elucidada.

A produção e liberação do FGF-2 por células endoteliais são acionados por mediadores inflamatórios.⁵⁷ Assim sendo, o FGF-2 pode amplificar a resposta das células endoteliais a estímulos inflamatórios⁵⁸ e aumentar a expressão de quimiocinas, como foi visto para a quimiocina MCP-1 em células endoteliais⁵⁹. Outras quimiocinas como, SDF-1 e CXCR4 também podem ter sua produção aumentada por FGF2, em momentos iniciais durante a neovascularização nas células endoteliais através do sistema de sinalização autócrina.⁶⁰ Podemos destacar, que o FGF-2 aumenta a expressão de um número de quimiocinas envolvidas na recrutamento de diferentes células inflamatórias, como monócitos / macrófagos (CCL2, CCL7 e CX3CL1), neutrófilos (CXCL1), células NK (CX3CL1), e linfócitos T (CXCL16 e CX3CL1).⁶¹ Também, FGF-2 também induzido por genes ⁶¹incluem citocinas inflamatórias (IL-6, fator inibidor da leucemia) e receptores de citocinas, bem como chave mediadores inflamatórios como a cicloxigenase e o receptor de prostaglandina em células endoteliais.

2.5 Fator derivado de células progenitoras

Fator derivado de células progenitoras (SCF), é uma citocina com propriedades bem documentadas, associada à regulação e funções das células-tronco, que se mostra essencial para a remodelação das células das vias aéreas em modelos animais e em humanos asmáticos.^{62,63} Além disso, evidências, já há alguns anos sugerem que o SCF pode ser importante na remodelação na doença de asma humana e é altamente expresso após o transplante de pulmão;^{64,65} No entanto o mecanismo exato de como estes fatores poderiam recrutar e ativar os fibroblastos na remodelamento das vias aéreas in vivo ainda pouco compreendida. Dados científicos sobre a plasticidade da medula óssea de células-tronco de adultos e a presença de circulação de fibroblastos conhecidas como fibrócitos, geraram consideráveis aceitações sobre a origem do potencial de remodelação de fibroblastos e miofibroblastos extrapulmonar nas vias aéreas. Além disso, a importância do

SCF na medula óssea é a função que ele exerce nas células-tronco sendo capaz de recrutar as células tronco e também os fibroblastos⁶⁶⁻⁶⁸

A capacidade de SCF para recrutar células-tronco são bem documentadas, talvez devido à suas propriedades quimiotáticos e sua capacidade de promover a sobrevivência dessas células.^{69,70}

Um papel adicional para o SCF é sugerido pelo achado de que esta citocina poderia aumentar a expressão de IL-31, embora a importância da IL-31 na doença das vias aéreas e remodelação requer esclarecimentos adicionais. Nível significativamente elevado de IL-31 no plasma de pacientes com asma alérgica foi recentemente documentado⁷¹ Quando houve uma neutralização dos SCF resultou em redução na remodelação e uma acentuada redução no recrutamento destas células derivadas da medula óssea. Em conjunto, estes descobertas nos revela um novo papel para a SCF, talvez em conjunto com IL-31, no remodelamento das vias aéreas que está relacionado com o seu envolvimento no recrutamento de células derivados da da medula óssea, com capacidade para promover a diferenciação em miofibroblastos endógenos como os fibroblastos pulmonares.⁷¹

SCF é identificado predominantemente como um fator importante em células hematopoiéticas que tem um papel fundamental na maturação de várias populações de leucócitos bem como eritrócitos^{72,73} Além disso, SCF é um fator de diferenciação de mastócitos e inibe a sua apoptose em tecidos periféricos.^{74,75} Possivelmente, o aspecto mais importante do SCF é a sua capacidade diretamente em ativar as populações locais de mastócitos dentro das vias aéreas^{76,77} Estudos têm demonstrado que a administração exógena de SCF pode induzir a ativação das vias aéreas significativamente, resultando em hiperresponsividade na ausência de qualquer outro estímulo. Este dado, parece estar relacionado à indução e liberação de leucotrienos dentro dos pulmões que foram estreitamente associados a indução de respostas asmáticas graves.^{78,79}

2.6 Via de Sinalização Intracelular envolvida na estimulação dos odontoblastos

Seria clinicamente valiosa a capacidade de ativar odontoblastos para reparação de dentina, e, portanto, é importante compreender o controle e a regulação das sinalizações celulares e moleculares nessas células. No entanto, apenas informações limitadas existem atualmente sobre esses eventos moleculares que ocorrem durante a dentinogênese reacionária. Estudos anteriores forneceram evidências de que mudanças na atividade secretora dos odontoblastos refletem no controle da diferenciação odontoblástica e evolui à medida que a célula amadurece.^{80,81}

Um poderoso mecanismo de regulamentação em resposta a sinais extracelulares que determina o destino das células é a ativação de cascatas e sinalização através das vias de transdução de sinais celulares, via MAP quinases.^{82,83}

2.7 O papel da via de sinalização intracelular p38

A isoforma primeiro a ser identificada foi a isoforma p38⁸⁴. Estudos e análise da seqüência revelou que há pelo menos quatro diferentes isoformas.^{85,86} Ambas são amplamente expressa em vários tecidos e pode ser inibida por compostos pyridinylimidazole, como SB203580^{85,87} Em um estudo⁸⁸, comprovou-se uma regulação mais complexa da MAP quinase p38 onde a ativação foi observada durante o desenvolvimento de eritróide. Em células tronco a via de sinalização p38 foi expressa durante estágio inicial de diferenciação de células eritróides progenitoras de desenvolvimento, embora que a expressão tenha pequena, a expressão da via p38 foi detectada, e já a expressão da p38 durante a diferenciação terminal destas progenitores foi observada.

Está bem estabelecido que a via da MAP quinase p38 é ativados em resposta a sinais de estresse físico, como choque térmico, e luz UV, bem como em resposta a pró-inflamatórias, tais como citocinas, como a interleucina-1 (IL-1) e de fator necrose tumoral (TNF- α). Além disso, fatores de crescimento, tais

como a do fator de crescimento tumoral (TGF- β), também podem ativar a via de sinalização da p38.^{86,89}

2.8 O papel da via de sinalização intracelular PI3Kinase

O fosfatidilinositol 3-quinase da família (PI3K) é um grupo de enzimas que geram "segundos mensageiros" de lipídios que mediam a transdução de sinal. A sinalização da PI3K das quais inicia processos celulares normais são conhecidas tais como : crescimento, diferenciação (a estrutura e / ou função de uma célula é alterada), a sobrevivência, proliferação, migração, metabolismo e metástase do câncer . O primeiro gene PI3K em humanos foram isolados e clonados por equipes ILPC no Branch London College University.^{90,91}

Além do câncer, a sinalização PI3K também tem sido implicada na angiogênese, a formação de novos vasos sanguíneos, que por si só contribui para o crescimento e propagação de novas células.^{92,93}

Uma das isoformas da p13k é expressa em células brancas do sangue, e também em tecido mamário, e melanócitos. A expressão de p13k nas células brancas do sangue levou a investigar sinalização PI3K na imunidade. Especificamente quando houve a desativação do PI3K verificou-se que a houve um comprometimento importante no desenvolvimento e função dos linfócitos B e T. Estes resultados, tomados com os resultados de outros pesquisadores, sugerem que a atividade PI3K pode levar à auto-imunidade e enquanto uma redução na atividade PI3K pode levar a imunodeficiência⁹⁴⁻⁹⁷

2.9 O Papel da p42/44 na via de sinalização intracelular

P42/44 ou ERK, como também é denominada é dividida em dois subtipos: ERK1 e ERK2. Acredita-se geralmente que a ativação da sinalização da ERK ocorre através de caminhos distintos, tais como: (a) receptor tirosina quinase e estimulação da ativação Ras: fator de crescimento receptor tirosina quinase Ras MAPKKK MAPKK ERK. (b) Ca²⁺ + ativação Ras: Ca²⁺ ativa Ras por vários mecanismos., e através da família Src quinase mediada por

proteínas, (c) ativação da proteína quinase C (PKC) da via ERK, regulada a por mecanismos diferentes de isoenzimas, e este regulamento é específico para cada tipo de célula.⁹⁸⁻¹⁰¹

A via de sinalização p42/44 é um das vias mais ativamente estudadas. Ela é ativada por uma variedade de fatores de crescimento celulares e substâncias que promovem a atividade mitótica, e transmite sinais extracelulares da superfície da célula para o núcleo, ainda tendo um papel importante no processo de proliferação celular e diferenciação. Nos últimos anos, evidências mostrou que a via de sinalização p42/44 tem um elo importante com as funções de aprendizagem e memória.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Sendo assim uma via de grande importância para ser estudada, podendo trazer a cada descoberta uma função diferenciada.

3 *Material e Métodos*

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Farmacologia, setor de Inflamação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Não houve necessidade de se apresentar ao comitê de ética em pesquisa devido a natureza do trabalho não implicar à danos nos seres vivos e humanos.

3.1 Células

Foram utilizadas células de linhagem de odontoblastos (MDPC-23), que foram gentilmente cedidas pelo pesquisador Jacques Nor da Universidade de Michigan EUA, as quais foram armazenadas em diferentes microtubos e mantidas em nitrogênio líquido.

3.2 Cultura de Odontoblastos

A linhagem celular dos odontoblastos (MDPC-23) foram mantidos em garrafas de cultura com meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contendo 15 % de soro fetal bovino, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 300 ng/mL anfotericina B e 200 mM de glutamina. As culturas foram mantidas a 37⁰ C com 5% de CO₂.

3.3 Estimulação dos Odontoblastos

Os odontoblastos foram plaqueados em placas de 24 poços e após atingirem confluência foram estimulados na presença de LPS (0,1,1,10 e 100 µg/mL). Após 1, 6 e 24 horas os odontoblastos foram coletados em 1 mL de Trizol para extração do RNA mensageiro. Estas amostras foram armazenadas no freezer -70⁰C e utilizadas para a detecção da expressão de SCF e FGF-2, por meio da técnica de RT-PCR em tempo convencional.

3.4 Extração e dosagem do RNA mensageiro dos Odontoblastos.

A extração do RNA consistiu em acrescentar 200 µL de clorofórmio nos tubos das amostras descongeladas. Os tubos foram homogeneizados com agitação vigorosa e então centrifugados a 4°C e 1300 rpm por 15 min em centrifuga e a seguir a fase aquosa foi coletada para um novo tubo. O RNA total foi precipitado com 500 µL de isopropanol com incubação a -20°C por cerca de 24 horas. Após esse período os tubos foram centrifugados por 15 min 4°C 1300 rpm, e em seguida o RNA total precipitado foi lavado com etanol 75%, novamente centrifugado por 10 min 4°C 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e seco à temperatura ambiente e solubilizado em 20 µL de água tratada com DEPC 0,1% (Gibco).

A quantificação do RNA total extraído foi feita em espectrofotômetro Spectramax 190 com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando-se que 1 DO em 260nm equivale a 40 µg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas. O valor ideal dessa relação deve estar contido na faixa de 1,8 a 2,0.

3.5 Avaliação da expressão de mRNA SCF e FGF- 2 pela técnica de RT-PCR.

O RNA total foi extraído a partir dos odontoblastos estimulados ou não com LPS utilizando o reagente Trizol (Life Technologies). A fita de DNA complementar foi obtida em 20µL de uma mistura contendo as seguintes substâncias: 6µL de RNA, 1µL de oligo DT, 2µ de água de MilliQ, essa primeira mistura ficou no termociclador por 10 minutos a 70°C, depois foi acrescentado 11µL do MIX (4µL de DNTP, 4µL de buffer, 2µL de DTT e 1µL de superscript por amostra) foi dado um pulso a 13.000 RPM e retornado ao termociclador para a continuação da ciclagem, (5:00-4°C, 60:00-42°C, 5:00-90°C, 4°C) e por fim armazenado a -20°C para a realização da reação de polimerase em cadeia (PCR). A solução mix de PCR foi preparada em um volume final de 20µl contendo as seguintes substâncias: 2µl de dNTP 2,5 µM, 2,5µl de buffer 10x, 1,5µl de MgCl₂ 50 mM, 1µl do primer , 0,1µL da enzima Taq polimerase 5U/ml e 12,3µl de água de MilliQ por amostra. A mistura foi adicionada em tubo de microcentrífuga com 1µl de cDNA e 4µl de água de milliQ e incubada em termociclador seguindo-se as temperaturas que foram previamente padronizadas de acordo com o primer utilizado. As amostras de PCR correram em gel 2% de agarose

que foi corado com 10mg/ml de brometo de etídio e o produto foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado. Os primers da SCF e FGF-2 foram utilizados no ensaio:

SCF

Sense: 5'-CACTCAGCTTGACTACTCTT-3'

Antisense: 5'-GTCATTCCTAAGGGAGCTGG-3'

FGF-2

Sense: 5'-GCAGAAGAGAGAGGAGTTGTC-3'

Antisense: 5'-GCAGACATTGGAACAAAGAG-3'

3.6 Determinação do nível da citocina SCF por odontoblastos estimulados por LPS

Os odontoblastos foram plaqueados em placas de 24 poços e após atingirem confluência foram estimulados na presença ou ausência de LPS (0,1, 1, 10 ou 100 µg/mL). Após 1, 6 e 24 horas os sobrenadantes foram coletados para dosagem de SCF por meio da técnica de ELISA.

Placas de 96 poços foram recobertas e incubadas durante 15-18 horas a 4°C, com anticorpo anti-mouse SCF (R&D Systems). Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS 1% , contendo 0,5% de Tween 20 (Wash Buffer) e encubadas com 50 µL PBS 1% contendo ovalbumina bovina 1% (BSA) por 2 horas a 37°C. As placas então, foram lavadas com Wash Buffer e incubadas com as amostras dos sobrenadantes da linhagem celular MDPC 23, e com a curva padrão (Recombinant Mouse SCF) durante 2 horas a 37°C. Após este período, as placas foram lavadas com Wash Buffer e incubadas com biotinilado (Biotinylated Anti-mouse SCF Antibody, Biotinylated) por 1 hora à 37°C. As placas foram lavadas com Wash Buffer e adicionado 50ul da solução de Estreptoavidina (Sigma) com PBS 1% contendo ovalbumina bovina 1% (BSA) por aproximadamente 30 minutos à 37°C. As placas foram novamente lavadas com Wash Buffer e finalmente adicionado o substrato (peróxido de Hidrogênio 30% e tetrametilbenzidina na proporção de 1:1) conforme instruções do fabricante. Após 15 minutos, foi adicionada a solução de

ácido sulfúrico a 1M e a leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 450nm.

3.7 Determinação da participação de citocinas e mediadores químicos sobre a expressão de SCF e FGF-2 por odontoblastos estimulados por LPS

Os odontoblastos foram plaqueados em placas de 24 poços e após atingirem confluência foram pré-tratados 30 minutos antes com dexametasona (10µM)(Calbiochem CA), um glicocorticoide e MK 886, inibidor da 5-lipoxigenase (1 µM)(Calbiochem CA). Após este período, os odontoblastos foram estimulados por LPS (0,1 µg/mL). Após 1 hora as células foram coletados em 1 mL de Trizol para extração do RNA mensageiro para detecção da expressão de SCF e FGF-2, por meio da técnica de RT-PCR como descrito anteriormente.

3.8 Avaliação das vias de sinalização intracelulares que estarão envolvidas na expressão de SCF e FGF-2 por odontoblastos estimulados por LPS

Os odontoblastos foram plaqueados em placas de 24 poços e após atingirem confluência foram pré-tratados com o inibidor da proteína quinase ativadora de mitógeno p42/44, PD98059 (30 µM)(Calbiochem CA), com o inibidor da proteína quinase ativadora de mitógeno p38, SB 203580 (30 µM) (Calbiochem CA) e com o inibidor de fosfatidilinositol 3 quinase, Wortmannin (0,1 µM)(Calbiochem CA). Após 30 minutos, os odontoblastos foram estimulados com LPS (0,1 µg/mL) por um período determinado de 1 hora. Após este, o sobrenadante foi armazenado em tubos de 1,5 mL para dosagem de SCF por ELISA e as células foram coletados em Trizol para detecção da expressão do RNA mensageiro para de SCF e FGF-2 por meio da técnica de RT-PCR convencional conforme descrita anteriormente.

3.9 Análise por Western Blotting da produção de FGF 2 por odontoblastos estimulados por LPS

Os odontoblastos foram plaqueados em placas de 24 poços e após atingirem confluência foram pré-tratados com o inibidor da proteína quinase ativadora de

mitógeno p42/44, PD98059 (30 μ M)(Calbiochem CA), com o inibidor da proteína quinase ativadora de mitógeno p38, SB 203580 (30 μ M) (Calbiochem CA) e com o inibidor de fosfatidilinositol 3 quinase, Wortmannin (0,1 μ M)(Calbiochem CA). Após 30 minutos, os odontoblastos foram estimulados com LPS (0,1 μ g/mL) por um período determinado de 1 hora. Após este, o sobrenadante foi preparado armazenado no tampão RIPA completo com coquetel de inibidores da protease (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Deste tampão foi feita a dosagem de proteína, a qual foi utilizada para o ensaio na concentração de 20 μ g/mL. Esta concentração foi colocada no gel, o qual se utiliza electroforese para separar as proteínas desnaturadas pelo comprimento do polipeptídeo. As proteínas são então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foram detectada a proteína alvo utilizando anticorpos específicos para a proteína. Foram utilizados anticorpo para FGF 2 e β -actina para detecção. A concentração utilizada do anticorpo de detecção foi realizada na concentração de 1:100, diluída em leite em pó desnatado. Após a incubação com os anticorpos adequados, a expressão das bandas foram visualizadas através do sistema de luminescência química avançada (Santa Cruz).

Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA.

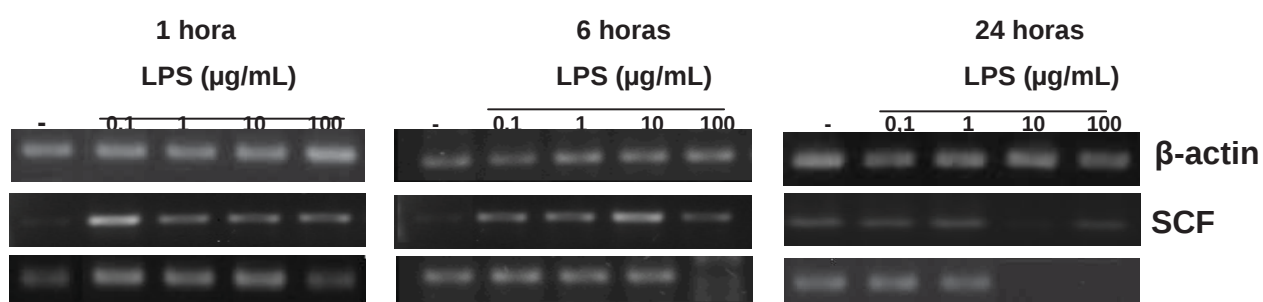
4 Resultados

4.1 Expressão de SCF e FGF-2 por linhagem celular de odontoblastos estimulados por LPS em diferentes concentrações

No sentido de avaliar se odontoblastos estimulados por LPS expressam SCF e/ ou FGF-2, a linhagem celular foi estimulada por LPS nas concentrações 0.1; 1 ; 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e após um período de 1, 6 e 24 horas foi avaliado a expressão de SCF e FGF-2 . Podemos notar que a expressão do RNA mensageiro para SCF foi maior já 1 hora após o estímulo na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. As concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de inibir parcialmente a expressão dessa citocina. Nota-se que a expressão de SCF também foi observada nos períodos de 6 e 24 horas após a estimulação por LPS, no entanto a concentração de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS não se mostrou tão efetiva quanto 1 hora após o estímulo. Observamos que a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi mais efetiva em induzir a expressão do RNA mensageiro para o SCF e a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ inibiu essa expressão. A estimulação das células ocorrida 24 horas após não mostrou indução da expressão de SCF visto que após estimulação os resultados ficaram iguais ao grupo controle (figura 1).

Com relação ao FGF-2, observamos em nossos resultados a expressão do fator de crescimento FGF-2, nos odontoblastos estimulados por LPS, nas concentrações 0.1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ 1 hora após, no entanto, o mesmo não foi observado na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ onde houve uma inibição da expressão. Observamos ainda que 6 e 24 horas após a estimulação, não houve diferença da expressão do RNA mensageiro para FGF-2 quando comparada ao grupo controle, sem estímulo (Figura 1).

(A)



FGF 2

4.2 Determinação do nível de SCF por odontoblastos estimulados por LPS pelo

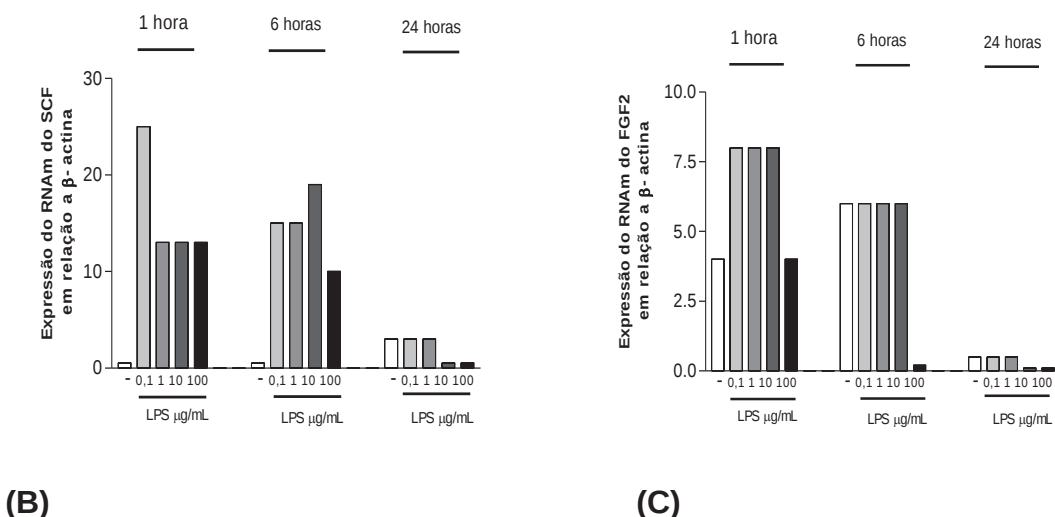


Figura 1. LPS induz expressão de SCF e FGF-2 em linhagem celular de odontoblastos (MDPC-23). A expressão de SCF e FGF-2 foi analisada pela técnica de reação em cadeia de polimerase da transcriptase reversa (RT-PCR). Para tanto os odontoblastos foram estimulados por LPS nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$. A expressão do RNA mensageiro para SCF e FGF-2 foi avaliada 1, 6 e 24 horas após. Como controle positivo interno foi usado a B-actina (A). Nota-se a área de expressão das bandas, por densiometria onde o grupo alvo foi comparado com a β -actina (B, C).

ELISA

Nosso próximo objetivo foi avaliar se a linhagem celular de odontoblastos estimulada por LPS foi capaz de produzir SCF. Como visto no gráfico abaixo, podemos observar que os odontoblastos estimulados com LPS são capazes de produzir SCF. O pico de produção de SCF foi com a concentração de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS observado 1 hora após o estímulo, e nos seguintes períodos e concentrações de estímulo nota-se uma queda na produção de SCF (Figura 2).

Apartir dos resultados do ensaio de concentração resposta, os demais experimentos foram feitos com estímulos de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ no intervalo de 1 hora, considerando essa concentração e tempo de estímulo ideais para produção e expressão de SCF.

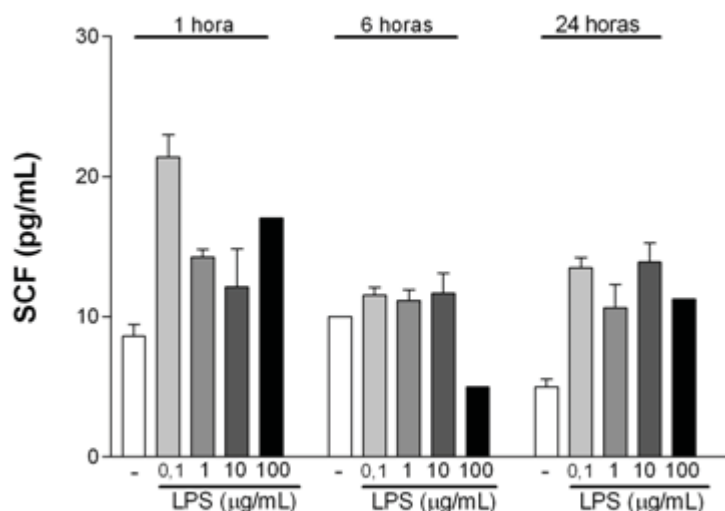
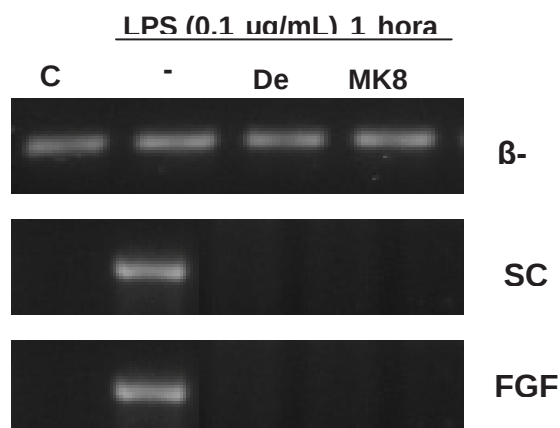


Figura 2 -LPS induz produção de SCF em linhagem celular de odontoblastos (MDPC-23). A expressão de SCF foi analisada pelo ELISA. Para tanto os odontoblastos foram estimulados por LPS nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL. A produção do SCF foi avaliada 1, 6 e 24 horas após o estímulo. Os resultados foram expressos como média±EPM.

4.3 Dexametasona e MK886 inibem expressão do RNA mensageiro de SCF e FGF-2 por odontoblastos estimulados por LPS

Para investigar se a expressão de SCF e FGF-2 é dependente da produção de citocina e/ou quimiocina e/ou da presença de leucotrieno B₄, as células foram pré-tratadas com Dexametasona (10 uM) e MK886 (1 uM) por 30 minutos e em seguida estimuladas com LPS (0,1ug/mL). Nós observamos 1 hora após o estímulo, tanto a dexametasona quanto o MK886 foram capazes de inibir a expressão do RNA mensageiro para SCF e FGF-2 (Figura 3).



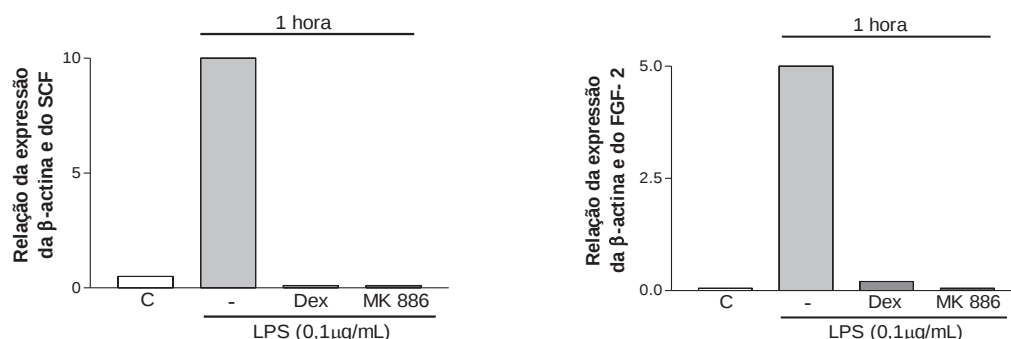


Figura 3. Dexametasona e MK886 inibem expressão de SCF e FGF-2 em odontoblastos estimulados com LPS (0,1µg/mL) 1 hora após a estimulação. A análise foi realizada pelo RT-PCR. Expressão de SCF e FGF-2 foi suprimida pelo efeito da dexametasona e MK886. . Observa-se a área de expressão das bandas, por densiometria.

4.4. Efeito da Dexametasona e MK886 sobre a produção de SCF por odontoblastos estimulados por LPS

Para determinar se a produção de SCF é dependente da produção de citocina e/ou quimiocina e da presença de leucotrieno B4, as células foram pré-tratadas com Dexametasona (10 µM) ou MK886 (1 µM) por 30 minutos e em seguida estimuladas com LPS (0,1 µg/mL). Nós observamos que 1 hora após a estimulação por LPS, tanto a dexametasona quanto o MK 886 foram capazes de inibir a produção de SCF (Figura 4).

4.5. Avaliação das vias de sinalização intracelulares envolvidas na expressão do RNA mensageiro para SCF e FGF-2 por odontoblastos estimulados por LPS

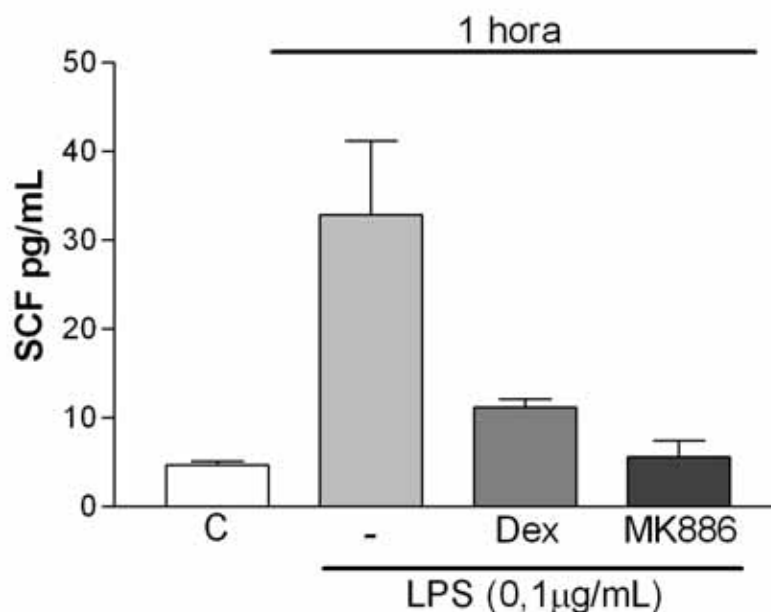
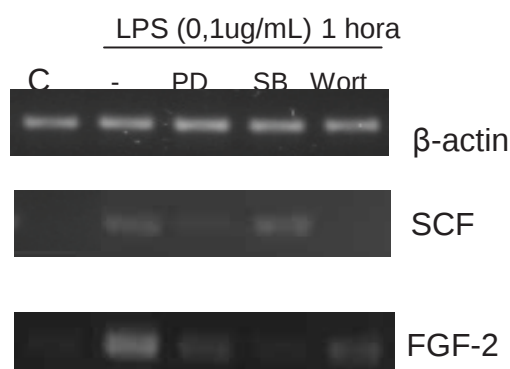


Figura 4. Nível de SCF no sobrenadante de linhagem de células MDPC-23 pré tratadas com Dexametasona (10 μ M) e MK886 (1 μ M) 1 hora após a estimulação por LPS (0,1 μ g/mL). Níveis de SCF foram analisados por ELISA. Os resultados foram descritos como média $\pm$ EPM.

Para avaliar quais as vias de transdução de sinais intracelulares que estão envolvidas na indução da expressão do RNA mensageiro do SCF e FGF-2 por LPS, as células foram pré-tratadas com PD 30 μ M, SB 203580 30 μ M e Wort 0,1 μ M. Observamos que a expressão do RNA mensageiro do SCF foi inibida pelo PD e pela wortmannin, e inibida pelo pré-tratamento com o SB. Em relação à expressão do RNA mensageiro do FGF-2 vimos que a expressão do FGF-2 foi inibida pelo pré-tratamento com PD, SB e wortmannin (Figura 5).



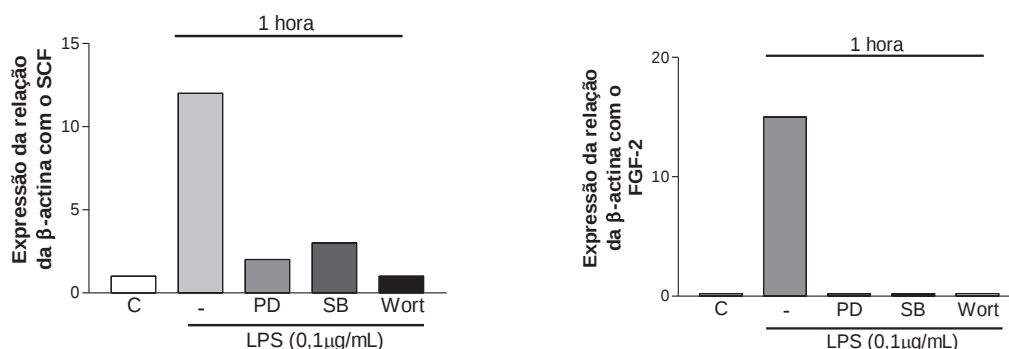


Figura 5. Odontoblastos estimulados por LPS expressam SCF e FGF-2. Odontoblastos foram estimulados com LPS (0,1 ug/mL). As células foram pré-tratadas com PD (30 uM), SB (30 uM) e Worthmannin (Wort, 0,1uM), por 30 minutos antes do estímulo. Observe-se a área de expressão das bandas, por densitometria.

4.6. Envolvimento da p42/44, p38 e PI3k na produção de SCF por odontoblastos estimulados por LPS

Para determinar se as vias p42/44, p38 e PI3k estavam envolvidas na produção de SCF por odontoblastos estimulados por LPS, as células foram pré-tratadas com PD 30 µM, SB 203580 30 µM e Wort 0,1 µM por 30 minutos e em seguida estimuladas com LPS (0,1 µg/mL). Nós observamos que o tratamento com PD, SB e wortmannin foi capaz de inibir a produção de SCF após um estímulo inflamatório com LPS nos odontoblastos (Figura 6).

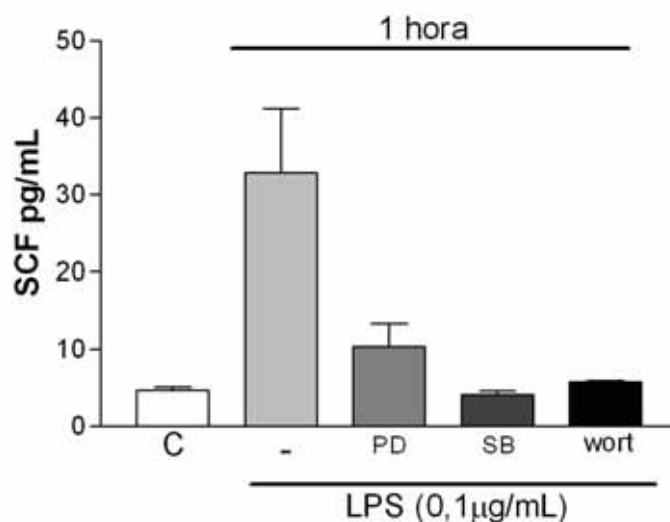


Figura 6. Nível de SCF no sobrenadante de linhagem de células MDPC-23 pré tratadas com PD (30 μ M), SB (30 μ M) e Worthmannin (wort, 0,1 μ M) 1 hora após a estimulação por LPS (0,1 μ g/mL). Níveis de SCF foram analisados por ELISA. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM.

4.7. LPS ativa vias de sinalização intracelulares na produção de FGF 2 em odontoblastos e promove produção de leucotrieno b4 e citocinas, envolvidas com a produção de FGF2

A proteína FGF 2 foi detectada como se nota a produção por análise de Western blot (Figura 7). A expressão pode estar sendo ocasionada por vários mecanismos, incluindo a presença de citocinas e/ou quimiocinas. Para tanto, usamos as drogas Dexametasona (10 μ M) e MK886 (1 μ M) e pré-tratamos as células por 30 minutos e em seguida estimulamos com LPS (0,1 μ g/mL). Após 1 hora do estímulo, tanto a dexametasona quanto o MK886 foram capazes de inibir a expressão da proteína FGF-2. Outros mecanismos avaliados foram as vias de transdução de sinal, PI3k, p42/44 e p38. Onde o gráfico da figura 8 nos mostra que quando as células foram tratadas com inibidores das respectivas vias descritas acima, houve uma queda da produção da proteína FGF 2, sugerindo que a expressão de FGF 2 dos odontoblastos sejam ativadas por estas vias.

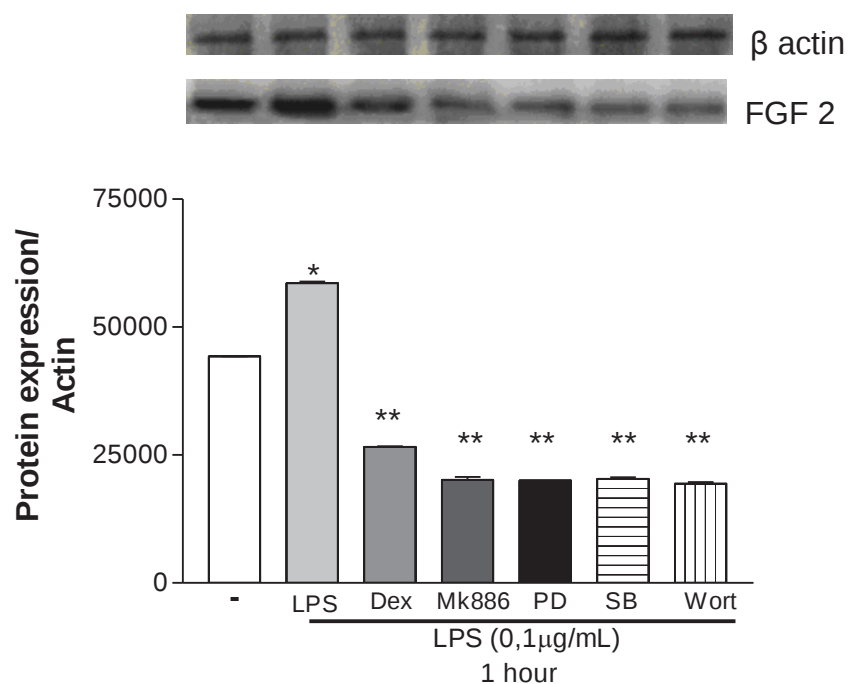


Figura 7. Produção da proteína FGF 2 em linhagem de células MDPC-23 pré tratadas com Dex (10 μ M) e Mk886 (1 μ M) e com PD (30 μ M), SB (30 μ M) e Worthmannin (wort, 0,1 uM) 1 hora após a estimulação por LPS (0,1 μ g/mL). As amostras foram analisadas por western blot. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM.

5 Discussão

Nosso estudo mostrou que os odontoblastos são células capazes de produzir SCF e FGF- 2 quando estimuladas por LPS. De acordo com a literatura, até o presente momento, não existe relato sobre a expressão de SCF e de FGF-2 por odontoblastos. Acreditamos ser um dado importante, visto que sugere um novo papel para os odontoblastos na biologia pulpar, na sua interação com fibroblastos, podendo atuar na regulação e potencialização de defesa, frente a agentes bacterianos.

Nosso trabalho se mostra inovador porque, relata a expressão desta importante citocina pelos odontoblastos, tais como célula do epitélio brônquico¹⁰⁵, miofibroblastos subepiteliais brônquico¹⁰⁶, fibroblastos pulmonares^{107,108} células da musculatura lisa brônquica¹⁰⁷, células endoteliais, eosinófilos,^{109,110} mastócitos^{111,112} e também por fibroblastos da mucosa oral e células mesenquimais orais.^{27,28}

O SCF é uma importante citocina, conhecida como fator de crescimento para mastócitos que se liga ao seu receptor c-kit, um receptor do tipo tirosina quinase.¹¹³

Em condições inflamatórias a expressão do SCF é aumentada, e que portanto o SCF se torna um importante alvo terapêutico nas doenças inflamatória^{64,107,108,114,115}. O SCF foi capaz de induzir a ativação dos mastócitos e estes liberaram IL-13¹¹⁶ Estas células quando ativadas pelo SCF liberaram IL-6, essas citocinas desempenham papel importante na mediação dos processos inflamatórios¹¹⁷. O SCF teve efeito direto sobre os eosinófilos, promovendo sua degranulação e consequente liberação de leucotrieno B4 e a síntese de quimiocinas CC¹¹⁰. Tais informações nos levam a sugerir que os odontoblastos produzindo SCF, após contato com um antígeno derivado de bactéria, pode contribuir para ativação de células pulpares que possam interagir com os odontoblastos, como fibroblastos da polpa, favorecendo uma produção de citocinas e fatores de crescimento que podem estar envolvidos no reparo tecidual da polpa após o período de inflamação. Em nossos estudos observamos que a produção de SCF ocorre já na primeira hora, sugerindo o favorecimento dos odontoblastos serem a célula alvo para que ocorra logo de imediato a ativação dos fibroblastos pulpares serem ativados para produção dos fatores de crescimento juntamente com os odontoblastos.

O FGF-2 é o fator básico de crescimento para fibroblastos. Este fator tem efeito pleiotrópico em diferentes células e sistemas. O FGF-2 é um potente fator angiogênico que estimula o crescimento de células da musculatura lisa, cicatrização e reparo tecidual.¹¹⁸. Além disso, é capaz de estimular a hematopoiese ¹¹⁹ e tem um importante papel na diferenciação e função do sistema nervoso .^{120,121}

Juntamente ao que foi descrito anteriormente, o FGF 2 pode ser produzido por células endoteliais e células tumorais,¹¹⁸ contudo sua relação com os odontoblastos, ainda não foi descrita. Em nossos estudos observamos que odontoblastos expressam FGF-2 logo 1 hora após a estimulação com antígeno de bactéria. Dessa forma, podemos sugerir que o FGF-2 nos odontoblastos esteja juntamente com o SCF estimulando essa célula a produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que podem ser úteis para o processo de cicatrização e reparação tecidual da polpa.

No sentido de investigar se a expressão desses fatores é dependente da produção de citocinas e/ou quimiocinas ou de produção de derivados da ciclooxigenase nossas células foram tratadas com dexametasona e observamos que este fármaco com atividade anti-inflamatória foi capaz de inibir a expressão de SCF e FGF, favorecendo a suspeita de que as citocinas e quimiocinas são produzidas para ativar os odontoblastos para produção de SCF e FGF que podem auxiliar no reparo da polpa após ativação dos fibroblastos pulpares. Dados de literatura mostram que a dexametasona foi capaz de inibir a produção de IL-5 e de reduzir a síntese de IL-13 após um processo inflamatório alérgico das vias aéreas^{122,123} viram que a dexametasona bloqueou a produção de SCF por mastócitos e que por essa razão não houve produção de TNF “alfa” e de IL-6. Portanto os autores sugerem que a produção de SCF é via produção de TNF- α e IL-6.

A dexametasona suprimiu completamente a proliferação de células epiteliais gástricas de rato estimuladas por FGF-2.¹²⁴ Além disso, o mesmo grupo também demonstrou que a dexametasona inibiu a migração de células epitelial gástrica induzida pelo TNF- α e que esta inibição foi dependente da produção de prostaglandinas.¹²⁴ Em nossos resultados, o fato da dexametasona inibir a expressão de FGF 2 em odontoblastos estimulados por LPS sugerem que: a) a produção de FGF-2 é dependente da produção de derivados da enzima ciclooxigenase; b) a produção de FGF-2 é dependente da produção de derivados da

enzima lipoxigenase; visto que a dexametasona inibe fosfolipase A2, e c) a produção de FGF-2 é dependente da produção de citocinas e/ou quimiocinas. Futuros ensaios serem realizados para responder estes questionamentos.

Para verificar se a produção de SCF e FGF-2 pelos odontoblastos estimulados por LPS é dependente da enzima 5-lipoxigenase, tratamos as células com MK 886, que é um inibidor farmacológico da enzima 5-lipoxigenase e consequentemente de leucotrieno B4. Observamos que houve inibição da expressão de SCF e FGF 2 pelos odontoblastos estimulados por LPS. Dessa forma, sugerimos que a produção de SCF e FGF-2 é dependente da produção de leucotrieno. Os leucotrienos são moléculas que apresentam importante papel tanto na resposta imune como na patogênese de doenças inflamatórias, tais como asma, artrite e glomerulonefrite, participa na fibrose cística, doenças pulmonares crônicas obstrutivas, esclerose múltipla, psoríase, arteroclesrose^{125,126} demonstraram que esta molécula tem a capacidade quimiotática para neutrófilos. Além da atividade quimiotática, o LTB4 também induz inibição da apoptose celular¹²⁷ O LTB4 estimula várias funções de leucócitos, incluindo aderência, fagocitose¹²⁸ E estudos anteriores mostraram que a inflamação alérgica induzida por SCF em animais pré-tratados com MK 886 foi reduzida, sugerindo que o Leucotrieno B4 é um mediador envolvido na indução da inflamação pelo SCF . Embora na literatura não haja relatos da relação entre a expressão de FGF-2 e leucotrieno, o resultado obtido nos nossos estudos, mostrando que a expressão de FGF2 é dependente da produção de leucotrieno, nos levando a uma possível dependência deste mediador para acionar a atividade de reparação e cicatrização induzida pelo odontoblastos via produção de FGF-2. O que favorece um adicional para futuras terapêuticas, embora ainda necessite de estudos para elucidar tal hipótese. Atualmente, a participação das MAPKs tem sido alvo de estudos para utilização terapêutica de fármacos inibidores das MAPKs em diferentes tipos de processo inflamatório. No presente trabalho, demonstramos que a produção de SCF e FGF 2, nos odontoblastos está sendo mediada pelas vias p42/44, p38k e pela PI3K.

A inibição farmacológica da via p42/44 pelo seu inibidor específico PD foi capaz de inibir completamente a expressão de SCF e FGF 2. Em trabalhos já descritos na literatura mostraram que o SCF é capaz de atuar como fator protetor de apoptose dos neurônios através da ativação desta via em camundongos diabéticos,

os resultados sugerem que SCF pode proteger o cérebro de apoptose em pacientes com diabetes e que o mecanismo dessa proteção pode, ao menos em parte, envolver a ativação da p42/44 (ERK1/2).¹²⁹ Outros autores observaram que fibroblastos de polpa e células da polpa expressam TLR4 (toll- like receptor-4) e que a exposição dessas células por LPS de *P. gingivalis* ativa proteína quinase C e fosforilação da via p42/44.¹³⁰ Em nosso modelo, sabemos que odontoblastos estimulados por LPS de *E. coli* produz SCF e FGF-2 e que a via ERK1/2 está sendo ativada para que este fenômeno esteja ocorrendo.

Já em relação ao FGF-2, Makino et al., 2009¹³¹, mostraram que o FGF-2 tem efeito preciso na proliferação de fibroblastos da derme humana, e que este efeito é mediado pela ERK. Dessa forma, podemos sugerir em nosso trabalho uma possível atuação do FGF-2 liberado pelos odontoblastos nas células da polpa induzindo proliferação e conseqüentemente renovação das células migratórias após processo inflamatório favorecendo ao reparo tecidual.

Neste estudo analisamos também a ativação da p38, na sinalização celular mediada por SCF e FGF- 2. A via p38 foi primeiramente isolada como uma proteína tirosina fosforilada, 38-kDa, em resposta a estímulo com LPS^{132,133} Embora as primeiras descrições desta via, tenham sido relatadas em processos inflamatórios^{134,135} a sua ativação abrange um amplo campo de consequências biológicas. A família da p38 ativada pode ter como consequência induzir apoptose celular¹³⁶, proliferação, desenvolvimento celular¹³⁷ diferenciação celular¹³⁸ senescência e supressão tumoral¹³⁹ Em cultura de odontoblastos, o LPS foi capaz de estimular a ativação da p38 para a expressão de SCF. Sugerindo que a ativação da p38 pode estar envolvida no processo inflamatório, decorrente de estímulo bacteriano, quando a presença do SCF é requerida para cooperar com a ativação ou migração de células que esteja chegando ao foco. A ativação desta via neste trabalho também foi analisada para expressão de FGF-2. Tendo em vista que os odontoblastos estimulados por LPS, são capazes de expressar FGF-2, e que a p38k é ativada, podemos sugerir que neste caso, o FGF-2 esteja atuando na proliferação celular pela ativação da via p38k.

Ainda neste trabalho vimos o envolvimento da PI3k, na expressão do SCF e do FGF-2. Nossos resultados mostraram que tanto para expressão do SCF quanto do FGF-2 há ativação da PI3k. A PI3k é uma via que regula muitas funções

celulares, como proliferação e produção de citocinas, degranulação de mastócitos, quimiotaxia, produção de anticorpos, migração de eosinófilos e desenvolvimento celular¹⁴⁰ A literatura não relata o envolvimento da ativação desta via com a expressão de SCF e/ou FGF-2, mas mostra que o TGF-beta através da ativação da PI3k é capaz de modular o fenotipo de células do músculo liso¹⁴¹.

Chanteux et al.¹⁴², já havia relatado que um processo inflamatório causado por LPS era capaz de produzir IL10 via ativação da p42/44, p38. E que estas vias ativam uma variedade de fatores que coordenam a indução de genes envolvidos com mediadores inflamatórios. Choi et al.¹⁴³, mostrou que FGF2 é capaz de promover proliferação celular pela Pi3k. Maffucci et al.¹⁴⁴ também mostrou que a PI3k regula o FGF2 na formação de novos vasos. E é importante salientar que nosso estudo não é capaz de completar toda resposta do mecanismo da produção de FGF2 e do SCF, mas já favorece condições de detectar informações de mecanismos antes desconhecidos.

Nosso trabalho mostra em primeira mão o papel do odontoblasto na modulação da resposta imune e de reparo tecidual. Futuros estudo estão em andamento para esclarecer nossos resultados.

6 Conclusão

Baseados na metodologia utilizada e nos resultados obtidos, nossos dados indicam que após estímulo com LPS os odontoblastos expressam FGF 2 e SCF.

E os mecanismos envolvidos nesta expressão provavelmente são mediados pela ativação das vias de sinalização intracelular p42/44, p38 e PI3k e pela vigência do processo inflamatório e leucotrieno B4.

A dexametasona foi capaz de inibir a produção e expressão de FGF 2 e SCF, sugerindo que estes são produzidos na vigência do processo inflamatório.

MK886 foi capaz de inibir a expressão de FGF2 e SCF, sugerindo que estes fatores são mediados pela presença de leucotrieno B4.

Referências

Ali, K.; Bilancio, A.; Thomas, M.,ET al. Essential role for phosphatidylinositol 3-kinase in the allergic response p110delta. *Nature*. 2004;431 :7011: 1007-11.

Al-Muhsen Sz, Shablovsky G, Olivenstein R, Mazer B, Hamid Q: The expression of stem cell factor and c-kit receptor in human asthmatic airways. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:911-6..

Anderson,D.M.,Williams,D.E.,Tushinski,R.,et al. Alternates plicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22–q24.*Cell GrowthDiffer*. 1991;2,373–378.

Andre´ S G, Leali D, Mitola S, et al. A pro-inflammatory signature mediates FGF2-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med*; 2009;13:2083–108..

Basilico C, Moscatelli D The FGF family of growth factor sand oncogenes.*Adv Cancer Res*. 1992.:59:115–165.

Berlin Aa, Hogaboam Cm, Lukacs Nw: Inhibition of SCF attenuates peribronchial remodeling in chronic cockroach allergen-induced asthma. *Lab Invest* 2006.:86:557–565.

Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin Db. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*; 1997;18:26–45.

Bikfalvi A, Hanz C. Angiogenic growth factor sarehemato-poietic growth factor sand vice versa. *Leukemia* 1994;8:523–529.

Bonucci, E. Crystal ghosts and biological mineralization: Fancy spectres in an old castle, or neglected structures worthy of belief. *Journal of Bone Mineral and Metabolism*, 2002;20, 249–265.

Botero Tm, Son Js, Vodopyanov D,et al.MAPK signaling is required for LPS-induced VEGF in pulp stem cells.*J Dent Res*. 2010;Mar;89 (3):264-9.

-
- Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, et al. Mechanism of p38MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* . 2003;17:1969-78.
- Butler WT. Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci*. 1998 Jan;106 Suppl 1:204-10.
- Butler, W. T., & Ritchie, H. H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *International Journal of Developmental Biology*, 1995;39, 169–179.
- Campbell E, Hogaboam C, Lincoln P, Lukacs Nw. Stem cell factor-induced airway hyperreactivity in allergic and normal mice. *Am J Pathol*; 1999;154 1259–65.
- Cantley, .L.C The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296(5573):1655–1657,.
- Caraglia M, Marra M, Pelaia G, et al. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. *J. Cell. Physiol*. 2005;202:323–335..
- Chanteux, Hugues ;Amélie C Guisset, et al.LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKinases- and Sp1-dependent mechanisms. *Respiratory Research*. 2007.
- Choi Sc, Kim Sj, Choi Jh, et al. Fibroblast growth factor-2 and -4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways.*Stem Cells Dev*. 2008;Aug;17 (4):725-36.
- Cobourne, M. T., & Sharpe, P. T. Tooth and jaw: Molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Archives of Oral Biology*, 2003;48, 1–14..
- Cullen, P.J.; Lockyer, P.J. Intergration of calcium and Ras signaling. *Nat. Rev Mol. Cell Biol.*, 2002;3, 339–348..
- Da Silva Ca, Adda M, Stern M, et al. Marked stem cell factor expression in the airways of lung transplant recipients. *Respir Res*, 2006: 7:90.
- Da Silva,C. A., Heilbock,C., Kassel,O.,et al. Transcription of stem cell factor (SCF) is potentiated by glucocorticoids and interleukin-1beta through concerted regulation of a GRE-like and an NF-kappaB response element. *FASEBJ*.17,2334–2336. 2003.

-
- Da Silva,C.A., Kassel,O.,Mathieu, E., et al.Inhibition by glucocorticoids of the interleukin-1beta-enhanced expression of the mast cell growth factor SCF.Br.J.Pharmacol. 2002:135, 1634–1640.
- Da Silva,C.A.,Kassel,O.,Lebouquin,R.,et al. Paradoxical early glucocorticoid induction of stem cell factor (SCF) expression in inflammatory conditions.Br.J.Pharmacol. 2004:141,75–84.
- De Paulis,A.,Minopoli,G.,Dalpiaz,F.,et al. Novel autocrine and paracrine loops of the stem cell factor/chymase network.Int.Arch. AllergyImmunol. 1999:118,422–425.
- Durand Sh, Flacher V, Roméas A, Carrouel, et al. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in *in vitro* differentiated human odontoblasts. J Immunol 2006:176:2880-2887.
- Eisinger, D.A.; Ammer, H. Delta-opioid receptors activate ERK/MAP kinase via integrin-stimulated receptor tyrosine kinases. Cell Signal. 2008;20, 2324–2331..
- Engelman Ja, Lisanti Mp, Scherer Pe. Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3- L1 adipogenesis. J Biol Chem; 1998:273:32111-20..
- English, J.D.; Sweatt, J.D. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. J. Biol. Chem. 272, 19103–19106. 1997.
- Erlandsson A, Larsson J, Forsberg-Nilsson K: Stem cell factor is a chemoattractant and a survival factor for CNS stem cells. Exp Cell Res, 2004;301:201–210.
- Eum S, Maghni K., Hamid Q, Eidelman D, Campbell H,Isogai S,Martin ^a Inhibition of allergic airways inflammation and airway hyperresponsiveness in mice by dexamethasone: Role of eosinophils, IL-5, eotaxin, and IL-13*1.Journal of Allergy and Clinical Immunology, Volume 111(5) 1049-1061.
- Finotto S, Buerke M, Lingnau K, Schmitt E, Galle Pr, Neurath Mf. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the c-kit ligand, stem cell factor, suppresses airway inflammation and IL-4 production in a murine model of asthma. J Allergy Clin Immunol. . 2001:107:279–86.

-
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;Jun 5; 267(16):10931-4..
- Ford-Hutchinson Aw, Bray Ma, Smith Mj. Lipoxygenase products and the polymorphonuclear leucocyte. *Agents Actions*. 1980;Dec;10 (6):548-50.
- Gagari E, Rand Mk, Tayari L, Vastardis H, Sharma P, Hauschka Pv, Damoulis Pd. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, in human oral mesenchymal cells. *Eur J Oral Sci*. 2006;Oct;114 (5):409-15.
- Gagari, E., Tsai, M., Lantz, C.S., Fox, L.G., Galli, S.J., Differential release of mast cell interleukin-6 via c-kit. *Blood* 1997;89,2654–2663..
- Galli Sj, Tsai M, Wershil Bk. The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am J Pathol* 1993;142 :965–74.
- Gao, L.; Chao, L.; Chao, J. A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: Activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor. *Exp. Cell Res* 2009;. 316, 376–389.
- Ghigo A, Damilano F, Braccini L, Hirsch E. PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. *BioEssays* 2010;32;185-196.
- Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis*. 2002;Mar;2(3):171-9.
- Giovannini, M.G. The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in memory encoding. *Rev. Neurosci*. 2006; 17, 619–634..
- Hahn CI, Falkler Wa Jr, Minah Ge. Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. *Arch Oral Biol*.; 1991;36 (2):147-53.
- Hamilton Ir . Ecological basis for dental caries. In: *Oral bacterial ecology: the molecular basis*. Kuramitsu HK, Ellen RP, editors. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press, 2000: 219-274.
- Han J, Lee Jd, Bibbs L, Ulevitch Rj. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994;265:808-11.

-
- Han J, Lee Jd, Tobias Ps, Ulevitch Rj. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem* 268:25009-14. 1993.
- Han J, Richter B, Li Z, Kravchenko V, Ulevitch Rj. Molecular cloning of human p38 MAP kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1265:224–227. 1995.
- Hartman, M., Piliponsky, A. M., Temkin, V., Levi-Schaffer, F., Human peripheral blood eosinophils express stem cell factor. *Blood* 97, 1086–1091. 2001.
- He, G., Dahl, T., Veis, A., & George, A. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein *Nature Materials*, 2, 552–558. 2003.
- Hébert Mj, Takano T, Holthofer H, Brady Hr. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J Immunol.* Oct 1;157 (7):3105-15. 1996.
- Herlaar E, Brown Z. p38 MAPK signaling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 5: 439-447. 1999.
- Heyeraas Kj, Kvinnsland I. Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation. *Proc Finn Dent Soc.* 88 Suppl 1:393-401. 1992.
- Heyeraas Kj, Kvinnsland I. Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation. *Proc Finn Dent Soc.* 88 Suppl 1:393-401. 1992.
- Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, et al. Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J*; 13:1550-2. 2004.
- Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod.* Jan;23(1):39-42. 1997.
- Huang Fm, Tsai Ch, Chen Yj, Chou My, Chang Yc. Examination of the signal transduction pathways leading to upregulation of tissue type plasminogen activator by interleukin-1alpha in human pulp cells. *J Endod.* Jan;32 (1):30-3. 2006.

-
- Huang Fm, Yang Sf, Hsieh Ys, Liu Cm, Yang Lc, Chang Yc. Examination of the signal transduction pathways involved in matrix metalloproteinases-2 in human pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Mar;97(3):398-403. 2004.
- Huttunen, M., Naukkarinen, A., Horsmanheimo, M., Harvima, I. T., Transient production of stem cell factor in dermal cells but increasing expression of Kit receptor in mast cells during normal wound healing. *Arch. Dermatol. Res.* 294, 324–330. 2002.
- Hyun-Ja Jeong, Ho-Jeong Na, Seung-Heon Hong And Hyung-Min Kim . Inhibition of the Stem Cell Factor-Induced Migration of Mast Cells by Dexamethasone. *Endocrinology*, doi:10.1210/en. -0115 *Endocrinology* Vol. 144, No.9 .4080-4086. 2003.
- Ichihara M, Hotta T, Asano H *et al.* Effects of stem cell factor (SCF) on human marrow neutrophil, neutrophil/macrophage mixed, macrophage and eosinophil progenitor cell growth. *Int J Hematol* 59 :81–9. 1994.
- Ji, R.R.; Gereau, R.W.; Malcangio, M.; Strichartz, G.R. MAP kinase and pain. *Brain Res. Rev.*, 2009 60, 135–148..
- Johnson Gv, Bailey Cd. The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*; . 2003. 183:263-8
- Kanbe, N., Kurosawa, M., Yamashita, T., Kurimoto . Cord-blood-derived human cultured mast cells produce interleukin 13 in the presence of stem cell factor . *Int. Arch Allergy Immunol.* 1999.119, 138–142.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001.17:615–675.
- Kim S, Liu M, Simchon S, Dorscher-Kim Je. Effects of selected inflammatory mediators on blood flow and vascular permeability in the dental pulp. *Proc Finn Dent Soc.*;88 Suppl 1992.1:387-92.

-
- Kumar S, Boehm J, Lee Jc. p38 MAP kinases: key signaling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*; 2003.2:717–726.
- Lapidot T, Dar A, Kollet O: How do stem cells find their way home *Blood* 2005.106:1901–1910.
- Lee Jc, Kumar S, Griswold De,et al. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology* 47:185–201. 2000.
- Lei Z, Liu G, Huang Q,et al: SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma. *Allergy* 2008.63:327–332.
- Leigh Br, Webb S, Hancock SI, Knox SJ. Stem cell factor enhances the survival of irradiated human bone marrow maintained in SCID mice. *Stem Cells*.1994.12 :430–5.
- Li JW, Li LI, Chang LI,et al.Stem cell factor protects against neuronal apoptosis by activating AKT/ERK in diabetic mice. *Braz J Med Biol Res.* 2009.Nov;42(11):1044-9.
- Lien SC, Usami S, Chien S,Chiu JJ. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in transforming growth factor-beta1-induced phenotypic modulation of 10T1/2 cells to smooth muscle cells. *Cell Signal.* 2006.Aug;18(8):1270-8.
- Loesche WJ, Syed SA. The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentine.*Caries Res.*;7(3):201-16. 1973.
- Logan A,Frautschy A S,Baird A . Basic fibroblast growth factor and central nervous system injury.*AnnNY Acad Sci USA* 63:474–476. 1991.
- Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria.*Crit Rev Oral Biol Med.* 13(2):171-83. 2002.
- Lukacs NW, Kunkel SI, Strieter RM,et al.The role of stem cell factor (c-kit ligand) and inflammatory cytokines in pulmonary mast cell activation. *Blood* 87:2262–2268.(a) 1996.

-
- Lukacs Nw, Strieter Rm, Lincoln Pm *et al.* Stem cell factor (c-kit ligand) influences eosinophil recruitment and histamine levels in allergic airway inflammation. *J Immunol*; 1996;156 :3945–51.(b).
- Luo J.C , Hsiao-Yi Lin, Ching-Liang Lu, *et al.* Dexamethasone inhibits basic fibroblast growth factor-stimulated gastric epithelial cell proliferation. *Biochemical pharmacology* 2008.76 841–849.
- Luo Jc, Cho Ch, Ng Km, *et al.* Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor- α -stimulated gastric epithelial cell migration. *Journal Chinese Med Assoc.* 2009.Oct;72(10):509-14.
- Maffucci T, Raimondi C, Abu-Hayyeh S, *et al.* A Phosphoinositide 3-Kinase/Phospholipase C γ 1 Pathway Regulates. 2009.
- Makino T, Jinnin M, Muchemwa Fc, *et al.* Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of human dermal fibroblasts via the ERK1/2 and JNK pathways. *Br J Dermatol.* 2009.Dec 1.
- Mancuso P, Standiford Tj, Marshall T, *et al.* Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 1998.Nov;66 (11):5140-6.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677-686. 2004.
- Mcneil PI, Muthukrishnan L, Warder E, D'amore Pa. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol*; 109:811–22. 1989.
- Morooka T, Nishida E. Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem.* 273:24285-8. 1998.
- Moscatelli D, Presta M, Joseph-Silverstein J, Rifkin Db. Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol.* Nov;129 (2):273-6. 1986.

Murakami S, Takayama S, Kitamura M, et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res.* 2003;38:97–103.

Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T, Taketoshi Y, Tamura M, Takada H, Kawagoe M. Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod.* 1996;Jan;22 (1):9-12.

Nakamura Y, Tajima F, Ishiga K, Yamazaki H, Oshimura M, Shiota G, Murawaki Y: Soluble c-kit receptor mobilizes hematopoietic stem cells to peripheral blood in mice. *Exp Hematol.*, 2004;32:390–396.

Nugent Ma, Iozzo Rv. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol*; 32:115–20. 2000.

Okazaki M, Yoshimura K, Uchida G, Harii K. Elevated expression of hepatocyte and keratinocyte growth factor in cultured buccal-mucosa-derived fibroblasts compared with normal-skin-derived fibroblasts. *J Dermatol Sci*2002.. Nov; 30 (2):108-15.

Okiji T, Morita I, Sunada I, Murota S. Involvement of arachidonic acid metabolites in increases in vascular permeability in experimental dental pulpal inflammation in the rat. *Arch Oral Biol.*; 1989;34 (7):523-8.

Okkenhaug K., A. Bilancio, G. Farjot. Lymphocyte B and T antigen receptor signaling in cell p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 2002;297 (5583) :1031-1034.

Okkenhaug Vanhaesebroeck K. E B.. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nature Reviews Immunology* 3 (4) :317-330, 2003.

Okumura N, Tsuji K, Ebihara Y: Chemotactic and chemokinetic activities of stem cell factor on murine hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87:4100–4108.1996.

Oliveira Sh, Hogaboam Cm, Berlin A, Lukacs Nw. SCF-induced airway hyperreactivity is dependent on leukotriene production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 280:L1242–9. 2001.

-
- Oliveira Sh, Lukacs Nw: Stem cell factor: a hemopoietic cytokine with important targets in asthma. *Curr Drug. Targets Inflamm Allergy*. 2:313–318. 2003.
- Oliveira,S.H.,Taub,D.D.,Nagel,J.et al. Stem cell factor induces eosinophil activation and degranulation:mediator release and gene array analysis.*Blood*100, 4291–4297. 2002.
- Papagerakis, P., Berdal, A., Mesbah, M., et al.Investigation of osteocalcin,osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developinghuman teeth. *Bone*, 30, 377–385. 2002.
- Pashley Dh. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 7(2):104-33. 1996.
- Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.*; 1987.56: 727–777.
- Platanias Lc. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. *Pharmacol. 2003.Ther* ;98:129–142.
- Polverini Pj. The pathophysiology of angiogenesis.*Crit Rev Oral Biol Med.*; 1995.6(3):230-47.
- Presta M, Dell'era P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*;16:159–78. 2005.
- Pulendran B, Kumar P, Cutler Cw,et al. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol*. 2001.Nov 1;167 (9):5067-76.
- Rietschel Et, Kirikae T, Schade F.,et al. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology*. Apr;187 (3-5):169-90. 1993.
- Roberts-Clark Dj, Smith Aj. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*; 2000.45:1013–6.
- Rolla G, Oppermann Rv, Bowen WH, Ciardi JE, Knox KW. High amounts of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque in vivo. *Caries Res*.14 (4):235-8. 1980.

-
- Ruch, J. V., Lesot, H., & Begue-Kirn, C. Odontoblast differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 39, 51–68. 1995.
- Sawyer C., J. Sturge, Dc Bennett, et al. Regulation of chemotaxis of breast cancer cells by the phosphatidylinositol 3-kinase p110delta. *Cancer Research* 63 (sete):1667-1675, 2003.
- Seghezzi G, Patel S, Ren Cj, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol.* Jun 29;141(7):1659-73. 1998.
- Seltzer S, Farber Pa. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 78: 634-45. 1994.
- Serhan Cn, Arita M, Hong S, Gotlinger K. Resolvins, docosatrienes and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids*; 2004.39: 1125-1132.
- Simon S, Smith Aj, Berdal A, et al. Molecular Characterization of young and mature odontoblasts. *Bone*. 2009.
- Simon S, Smith Aj, Lumley Pj, et al. Molecular characterization of young and mature odontoblasts. *Bone*; 2009.45: 693–703.
- Siqueira Júnior Jf, Rôças In, Lopes Hp. Patologias pulpar e perirradicular. In Lopes HP, Siqueira Júnior JF. *Endodontia* p.17-77. ed. Guanabara Koogan, 2004.
- Smith, A. J., Cassidy, N., Perry, H., Begue-Kirn, C., Ruch, J. V. & Lesot, H. Reactionary dentinogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 39, 273–280. 1995.
- Sperr Wr, Agis H, Czerwenka K *et al.* Effects of cyclosporin A and FK-506 on stem cell factor-induced histamine secretion and growth of human mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 98:389–99. 1996.

-
- Sun L, Hui Am, Su Q, Vortmeyer A, et al. Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell*. 2006.Apr;9(4):287-300.
- Sweatt, J.D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2004.14, 311–317.
- Tager Am, Luster Ad. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. Aug-Sep; 2003.69(2-3):123-34.
- Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada S. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect Immun*.1991. Jan;59(1):295-301.
- Takahashi K. Pulpal vascular changes in inflammation. *Proc Finn Dent Soc*. 88: 381-5. 1992.
- Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y. Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res* 80: 2075 –9. 2001.
- Tanaka Y, Kimata K, Adams Dh, Eto S. Modulation of cytokine function by heparin sulfate proteoglycans: sophisticated models for the regulation of cellular responses to cytokines. *Proc Assoc Am Physicians* 110:118–25. 1998.
- Thesleff, I. Epithelial-mesenchymal signaling regulating tooth morphogenesis. *Journal of Cell Science*.2003., 116, 1647– 1648.
- Tokuda M, Sakuta T, Fushuku A, Torii M, Nagaoka S. Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod*. 2001.Apr;27(4):273-7.
- Torneck CD. Dentin-pulp complex. In: Ten Cate AR. *Oral histology – development, structure, and function*. 4Th.ed. St. Louis: Mosby; p.169-217. 1994.
- Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol*. 2008.53:9–13.
- Tran-Hung L, Mathew S, About I. Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis. *J Dent Res*. 2006.85:819–23.

-
- Trowbridge Ho, Kim S. Desenvolvimento, estrutura e função da polpa. In: Cohen S, Burns RC. Caminhos da polpa. p.364-97.ed. Guanabara Koogan, 2000.
- Uddin S, Ah-Kang J, Ulaszek J, Mahmud D, Wickrema A. Differentiation stage specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004.101:147–152.
- Unsicker K,Engels S,Hamm C,et al. Molecular control of neuralplasticity by the multifunctional growth factor families of the FGF sand TGF-b. *Anat Anz* 1992.174:405–407.
- Veerayutthwilai O, Byers Mr, Pham T-Tt, Darveau Rp, Dale Ba Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol* 22:5-13. 2007.
- Veis, A. Amelogenin splice gene products: potential signaling molecules. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 200360, 30–55..
- VOGT PK, BADER AG, KANG S PI 3-kinases: hidden potentials revealed. *Cell Cycle* 5(9):946–949. 2006.
- Vogt PK, Kang S Kinase inhibitors: vice becomes virtue. *Cancer Cell* 9(5):327–328. 2006.
- Wempe F, Lindner V, Augustin Hg. Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulates the expression of the CC chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in autocrine-activated endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 1997.17: 2471–8.
- Wen,L.P.,Fahrni,J.A.,Matsui,S.,Rosen,G.D., Airwayepithelialcells producestemcellfactor. *Biochim.Biophys. Acta* 1996.1314,183–186.
- Williams De, Eisenman J, Baird A, et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell*. 1990.Oct 5; 63(1):167-74.
- Winyard G. Doctors, managers and politicians. *Clin Med*. 2003.3:465-69.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, et al.Effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*; 1995.270:1326-31.

Yoon Ka, Chae Ym, Cho Jy. FGF2 stimulates SDF-1 expression through the Erm transcription factor in Sertoli cells. *J Cell Physiol.* 2009.220:245–56.

Yoshie O, Imai T, Nomiyama H Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 2001.78:57-110.

Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.*; 2005.15:11–18.

Zhang,S.,Anderson,D.F.,Bradding,P.,et al. Human mast cells express stem cell factor.*J.Pathol.*186,59–66.

Zhang,S.,Howarth,P.H.,Roche,W.R., Cytokine production by cell cultures from bronchial subepithelial myofibroblasts.*J.Pathol.* 1996.180,95–101.

Zittermann Si, Issekutz Ac. Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) potentiates leukocyte recruitment to inflammation by enhancing endothelial adhesion molecule expression. *Am J Pathol.* 168:835–46. 20.