



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE ARAÇATUBA

Mariana Alvarez Quinta Reis

**Estudo da função do Fator Transformador de Crescimento (TGF)- β 1
no reparo da polpa dental de camundongos**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ARAÇATUBA

Mariana Alvarez Quinta Reis

**Estudo da função do Fator Transformador de Crescimento (TGF)- β 1
no reparo da polpa dental de camundongos**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba, da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Graduação em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Sandra Helena Penha
de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Renata
Sipert

Araçatuba – SP

Dedico não só este trabalho como todas as minhas outras vitórias aos meus pais, Tércio e Maria Lúcia, pelo exemplo de vida, pela educação, pela vida e pelos ensinamentos que me passaram. Por tudo que eles me proporcionaram e continuam me proporcionando até hoje, muitas vezes abdicando de seus próprios sonhos para realizarem os meus. Por toda a paciência, dedicação, apoio e confiança que sempre tiveram comigo.

Aos meus irmãos Bruno e Gabriel por todo companheirismo, paciência, ajuda e por estarem sempre ao meu lado.

Obrigado por fazerem do meu sonho uma realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as coisas que tem proporcionado em minha vida, principalmente saúde e força para que eu seguisse sempre em frente.

Agradeço à minha família por todo o apoio que me deram durante a pesquisa e também durante toda a faculdade, não permitindo que eu desistisse quando tudo pareceu tão difícil.

Agradeço a minha orientadora Prof.^a Sandra Helena Penha De Oliveira, por me guiar durante esse período de pesquisa, por todos os ensinamentos e principalmente por toda a paciência, compreensão e apoio durante essa fase.

Agradeço a minha co-orientadora Carla Renata Sipert pela elaboração desse trabalho e pelos ensinamentos mesmo distantes em um último momento.

Agradeço aos colegas de laboratório Flávia, Thamine, Vitor, Carluce e em especial Caril Amaral por tudo que me ensinou, por toda a ajuda e por toda a paciência durante a pesquisa.

Agradeço aos meus amigos que de forma direta ou indireta me ajudaram, em especial Fernanda e Thainan.

A Fortaleza

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.”

Bertrand Russell

REIS, M.A.Q. **Estudo da função do Fator Transformador de Crescimento (TGF)- β 1 no reparo da polpa dental de camundongos.** 2014. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

A capacidade de reparo da polpa dental é limitada e os mecanismos envolvidos neste fenômeno são complexos, porém, não completamente compreendidos. O fator transformador de crescimento (TGF) β -1 vem sendo relatado em diversos fenômenos importantes para a biologia pulpar como a odontogênese e reparo tecidual. Entretanto, não se sabe até o momento, o papel inequívoco deste fator no reparo da polpa dental lesada. Este estudo teve como objetivo investigar o perfil do reparo pulpar na ausência das funções biológicas de TGF- β 1. Camundongos Balb/c foram tratados com um antagonista do receptor de TGF- β 1 (TGFBRI) (SB-431542) ou com seu veículo somente e submetidos à indução de exposição dentinária. Após 1, 3, 7 e 15 dias, os animais foram eutanasiados e espécimes foram coletados e fixados. As mandíbulas foram submetidas a processamento histotécnico e coloração por Hematoxilina e Eosina e tricrômio de Masson. A análise morfológica foi realizada por meio de descrição subjetiva com base nos parâmetros (I) integridade da ponte de tecido dentinário; (II) presença de áreas de necrose; (III) presença de infiltrado inflamatório; (IV) áreas de fibrose/hialinização. Adicionalmente, foi realizada a contagem do recrutamento de neutrófilos e células mononucleares nas amostras tratadas e não tratadas. Por meio de imunoistoquímica, foi feita a marcação para a proteína de matriz dentinária-1. A análise comparativa destes parâmetros foi feita entre os animais tratados e não tratados com SB-431542 utilizando o teste ANOVA a um critério com pós-teste de Tukey.

Os resultados demonstram um pequeno processo inflamatório na polpa, com a migração de neutrófilos e vasodilatação, como observado nos cortes histológicos de pós-operatório de um, três e sete dias.

Além disso, pode-se observar que a expressão de DMP-1 aumenta com os períodos experimentais, como observado no período de pós-operatório de quinze dias, mesmo a inflamação não estando mais presente. No entanto, a marcação é mais

intensa no grupo em que o TGF- β 1 foi inibido, sugerindo assim, que este fator de crescimento regula negativamente a DMP-1.

Palavras chave: Fator de crescimento, Polpa dentária, Odontoblastos.

REIS, M.A.Q. **Study of the function of the Transforming Growth Factor (TGF- β 1) in mice dental pulp repair.** 2014. 37 f. Final course work (Graduation in Dentistry) – Dentistry School, Paulista State University, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

The pulp response is limited and the mechanisms involved in this phenomenon are complex, however, not completely understood. The transforming growth factor-beta (TGF- β 1) has been reported in several important biological phenomenon to the pulpal as odontogenesis and tissue repair. However, it is unknown yet, the clear role of this growth factor on repair of injured. This study aimed to investigate the profile of pulpal response in the absence of the biological functions of TGF- β 1. Balb/c mice were treated with an inhibitor of TGF- β 1 receptor (TGFBRI) (SB-431542) or your vehicle only and subjected to induction of direct dentin exposure. After 1, 3, 7 and 15 days, animals were euthanized and specimens were collected and fixed. The mandibles were subjected to histotechnical processing and hematoxylin and eosin (H-E) and Masson Trichrome methods. Morphological analysis was performed by subjective description parameters based on (I) dentin bridge integrity; (II) necrotic areas; (III) presence of inflammatory infiltrate and (IV) fibrosis/hyalinization areas. Additionally, counting the recruitment of neutrophils and mononuclear cells was performed on treated and untreated samples. For immunohistochemical staining was done for protein-1 dentin matrix. Comparative analysis of parameters was made between treated and untreated animals with SB-431542 using the ANOVA test with a Tukey post-test.

The results show a little pulpal inflammation, including the migration of neutrophils and vasodilation, as observed in histological postoperative one, three and seven days.

Additionally, we can note that the expression of DMP-1 increases with the experimental periods, as observed in the postoperative period of fifteen days, even the inflammation being no longer present. However, the labeling is more intense in the group that inhibited TGF β 1, then suggesting that it negatively regulates growth factor-1 DMP-1.

Key Words: Growth Factor, Dental Pulp, Odontoblast.

LISTA DE ABREVIATURAS

TGF- β	Fator transformador de crescimento
IGF	Fator de crescimento de insulina
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
ALK5	Receptor TGF- β 1 quinase
TBRI	Receptor de superfície celular I
TBRII	Receptor de superfície celular II
DMP1	Proteína de matriz dentinária 1
TGFBRI, SB-431542	Inibidor específico de TGF-BRI
g	Gramas
mg/kg	Miligrama por quilo
μ L	Microlitro
DMSO	Dimetil sulfoxido
μ m	Micrometro
HE	Hematoxilina e eosina
TM	Tricromio de Masson
BMP-4	Proteína morfogenética óssea 4
DSPP	Sialofosfoproteína de dentina
BMP-2	Proteína morfogenética óssea 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	Indução da pulpíte experimental	16
3.2	Tratamento dos animais com o um inibidor específico de TGFBRI, SB-431542	16
3.3	Análise Histológica e Quantificação Imunoistoquímica	17
4	RESULTADOS	19
5	DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÃO	30
7	REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

A polpa dentária consiste num tecido conjuntivo frouxo derivado das células da crista neural ou de células ectomesenquimáticas, e está confinada dentro da câmara pulpar e dos canais radiculares do dente. A polpa contém células que a munem com função odontogênica, nutritiva, sensorial e defensiva, e que permitem a preservação da vitalidade durante a manutenção da homeostase normal e durante o reparo da ferida após lesão (Chiego, Jr.). O tecido pulpar é afetado por impactos ambientais durante a vida humana como toxinas microbianas, calor e trauma mecânico. Uma vez lesada, a polpa dental possui uma capacidade limitada de regeneração. Se o dano ao tecido for leve ou de progressão lenta, os odontoblastos sobrevivem e produzem dentina reacionária no local correspondente à lesão patológica. Quando o estímulo agressor for tão severo a ponto de levar à perda dos odontoblastos originais, células mesenquimais indiferenciadas serão recrutadas e induzidas à diferenciação em odontoblastos-*like* e então secretarão dentina reparadora (Fitzgerald et al. 1990).

Após lesão acometendo o tecido pulpar, as células pulpares possuem a capacidade de se repararem produzindo proteínas de matriz extracelular ou de se diferenciarem em odontoblastos-*like* produzindo proteínas de matriz dentinária no local da lesão tecidual. Estes processos são modulados por diversos fatores de crescimento (Cassidy et al. 1997; Roberts-Clark e Smith 2000) que são capazes de regular o comportamento das células pulpares. O reparo pulpar é um fenômeno complexo, uma vez que muitos destes fatores estão envolvidos como *Transforming Growth Factor* (TGF- β)s, *Bone Morphogenetic Protein* (BMP)s, *Insulin Growth Factor* (IGF)s, *Fibroblast Growth Factor* (FGF) e *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) (Tziafas et al. 2000). A importância de TGF- β na odontogênese e reparo da polpa dental vêm sendo demonstrada pela literatura. Cassidy et al. 1997 detectaram isoformas de TGF- β no conteúdo inorgânico e orgânico de dentina, sendo TGF- β 1 a predominante. Este fator de crescimento tem sido sugerido como um fator central na regulação da resposta pulpar à cárie dental (Magloire et al. 1992; Smith et al. 1995). Em quadros de pulpíte irreversível, maior expressão de TGF- β 1 foi encontrada nas camadas odontoblásticas e sub-odontoblásticas (Piattelli et al. 2004). Os receptores tipo I e II para TGF- β foram relatados em células de polpa por Toyono et al. 1997, o

que sugere fortemente a funcionalidade desta citocina no tecido pulpar. Estes autores correlacionam ainda a expressão de TGF- β 1 durante a fase de síntese protéica por células odontoblastos-*like*. A aplicação de TGF- β 1 e TGF- β 3 em tecido pulpar de ratos em cultura induziu a produção de dentina reparadora (Sloan e Smith 1999). De fato, TGF- β 1 levou ao aumento da síntese de DNA por células pulpares *in vitro*, o que sugere seu potencial indutor de proliferação (Shirakawa et al. 1994). Shiba et al. 1998 demonstraram o aumento do conteúdo proteico, produção de fibronectina, e indução de proliferação (Shiba et al. 1998). Este último fenômeno induzido por TGF- β 1 também foi demonstrado por Melin et al. 2000, em cultura tecidual de polpa dental humana. A implantação de TGF- β 1 em polpas de cães induziu a formação de dentina reparadora e a diferenciação células com aspecto polarizado e alongado (Tziafas et al. 1998). Dentre os efeitos de TGF- β , destaca-se o aumento da síntese de colágeno, fator crucial para o reparo tecidual (Chan et al. 2005, Magloire et al. 1992; Smith et al. 1995). Wisithphrom & Windsor, 2006 relataram que TGF- β 1 foi capaz de aumentar a degradação de colágeno por células pulpares.

O fator transformador de crescimento (*Transforming Growth Factor* – TGF) beta é um fator de crescimento constituído por proteínas de baixo peso molecular que, ao transcreverem as mensagens bioquímicas na interação com seus receptores celulares, interferem na diferenciação, proliferação ou na síntese celular. Este fator de crescimento possui ainda propriedades quimiotáticas para fibroblastos e macrófagos, desempenha papel imunossupressor pulpar e interfere na produção de colágeno. Está envolvido no processo de contração da ferida, onde este fator estimula as células mesenquimais indiferenciadas em miofibroblastos.

Durante a dentinogênese, a diferenciação dos odontoblastos a partir de células ectomesenquimais derivadas da crista neural ocorre devido à interação entre o epitélio e o mesênquima, sendo esta relação mediada pela membrana basal. Quando odontoblastos primários são destruídos, como ocorre com a cárie e procedimentos restauradores, a substituição desta camada de células ocorre por meio da diferenciação de células mesenquimais em odontoblastos-*like* sob condições adequadas. Considerando que TGF- β 1 foi identificado no desenvolvimento dentário (D'Souza et al., 1990), em odontoblastos maduros (Jepsen et al., 1992), e na dentina humana (Cassidy et al., 1997), sugere-se que

este fator de crescimento possa desempenhar um papel de grande importância tanto na indução de dentina primária como na produção de dentina reparadora após exposição pulpar.

Dos fatores transformadores de crescimento, TGFB-1 é o mais importante fator envolvido na reparação dental, pois é sobre-regulado pelas células recrutadas para o sítio da injúria. Juntamente com algumas citocinas antiinflamatórias, TGFB-1 estimula subunidades de integrinas que facilitam a migração das células que vão iniciar a diferenciação em odontoblastos e outros tipos celulares comprometidos com a cura do tecido afetado (Mitisiadis et al., 2004). Outra ação do TGFB-1 é a estimulação da sobre regulação de NGF pelos odontoblastos. As terminações nervosas sensoriais são sensíveis aos sinais liberados durante a injúria dental, resultando num rápido crescimento neural no sítio da lesão.

Como alternativa a tratamentos convencionais para reparação de tecidos bucais, tem-se empregado tratamentos bem prósperos, incluindo terapia gênica e administração local de arcabouços ou guias (scaffolds) com a presença de fatores de crescimento como as BMPS, TGFB, bFGF, PDGF, e IGF-1 (Shi et al., 2005; Murray et al., 2007).

Todos os membros da família TGF- β se ligam a receptores de superfície celular tipo I e II (TBRI e TBRII) que por sua vez formam complexos heteroméricos na presença de ligantes dimerizadores. São descritos sete TBRI, também nomeados ALKs (*activin-like receptor kinases*), bem como cinco TBRIIs (Shi e Massague 2003; Bernabeu et al. 2009; Gatza et al. 2010). Os ligantes solúveis se ligam primeiramente ao TBRII, que é constitutivamente ativo. Em seguida, ocorre a incorporação de TBRI com sua conseqüente fosforilação formando um complexo ligante-receptor ativado (Kang et al. 2009). Na seqüência, o TBRI ativado fosforila moléculas efetoras *downstream* denominadas Smads. Esta família de proteínas é responsável pela sinalização intracelular de TGF- β . Os membros desta família são bem conservados e são classificados em três grupos: (i) R-Smads (Smads associadas a Receptor), (ii) Co-Smads (Smads Cooperadoras) e (iii) I-Smads (Smads inibitórias) (Ross e Hill 2008; Huminiecki et al. 2009).

A importância de TGF- β 1 na manutenção da homeostasia tecidual da polpa e periápice foi demonstrada por D'Souza et al. 1998 em um estudo empregando camundongos *knockout* para este fator de crescimento. Uma vez adultos, pôde ser

observada nos dentes destes animais a presença de inflamação e necrose difusas tanto em um tecido como em outro, além de um desgaste por atrição acentuado. Entretanto, apesar do grande número de estudos que demonstram a presença de TGF- β 1 nos tecidos dentários e sua importância em eventos celulares relacionados ao desenvolvimento dos tecidos dentários e ao reparo pulpar, dentro do nosso conhecimento não existem relatos de estudos que demonstrem *in vivo* o perfil de reparo da polpa dental após dano tecidual na ausência das atividades biológicas do fator de crescimento TGF- β 1. Para tanto, nosso objetivo foi avaliar em estudo *in vivo* o papel do Fator Transformador de Crescimento- β 1 sobre o reparo da polpa dental após exposição pulpar.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o padrão do reparo tecidual da polpa dental de molares murinos frente à exposição dentinária na presença do inibidor específico do Fator Transformador de Crescimento $\beta 1$ ao seu receptor ALK5.
- Avaliar o padrão de resposta da deposição de fibras colágenas, recrutamento de neutrófilos, síntese da proteína de matriz dentinária 1 nos espécimes tratados ou não com o antagonista de TGF- $\beta 1$.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Indução da pulpíte experimental

O modelo experimental de indução de pulpíte foi reproduzido a partir do estudo de Zhang et al. 2006 com modificações. As cúspides dos molares inferiores foram desgastadas com uma broca esférica nº ¼ (SS White, Rio de Janeiro, Brasil) de forma a levar à exposição dentinária. Após secagem, a superfície foi condicionada com ácido fosfórico a 37% por 10 s com o objetivo de deixar os túbulos abertos à cavidade oral. Em seguida, a superfície foi lavada e secada.

3.2 Tratamento dos animais com o um antagonista específico de TGFBR1, SB-431542

Camundongos Balb/c provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP com 5 semanas de vida pesando em média 20g foram utilizados. Foram tomadas todas as medidas necessárias para utilizar o menor número possível de animais e evitar seu sofrimento. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão Local de Ética para Experimentação Animal (Processo FOA-2410-2011). Os animais foram tratados com injeção intraperitoneal de um antagonista específico de TGF-BRI, SB-431542 (Sigma-Aldrich) (10 mg/kg – 100µL – diluído em DMSO estéril) (n=20), ou com veículo somente (n=20) uma vez ao dia (Segawa et al. 2010) até o fim dos períodos experimentais (1, 3, 7 e 15 dias). Após 1 (n=10¹), 3 (n=10), 7 (n=10) e 15 (n=10) dias, os animais foram eutanasiados por meio de injeção intraperitoneal da solução anestésica em concentração três vezes superior à dose para anestesia (180mg/kg). As mandíbulas foram removidas

¹ Sendo 5 animais tratados com SB-431542 e 5 tratados com veículo somente.

por dissecação sendo posteriormente divididas em duas hemimandíbulas e fixadas em solução de formalina a 10% com tampão fosfato. Estes espécimes foram destinados ao processamento histotécnico para análise morfológica por hematoxilina e eosina e tricrômio de Masson (lado direito) e o lado esquerdo para avaliação da expressão de DMP-1 por imunistoquímica.

3.3 Análise Histológica e Quantificação Imunoistoquímica

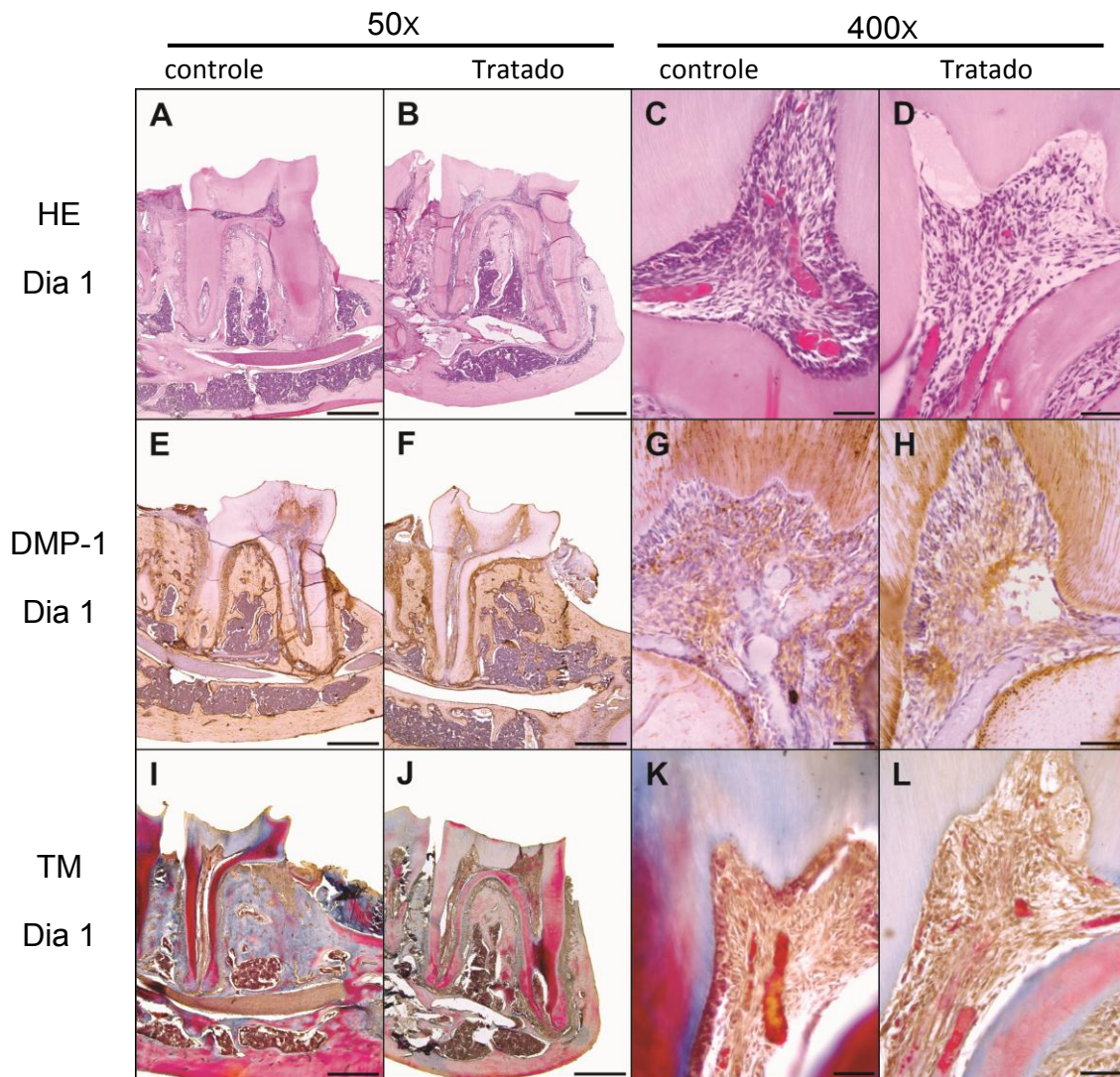
As hemi-mandíbulas foram removidas e fixadas em paraformaldeído tamponado neutro a 4% por um período de 24 h. Os espécimes foram lavados e descalcificados com uma solução contendo 10% de ácido dietilaminotetracético (EDTA) por 30 dias. Após este procedimento, as hemi-mandíbulas foram desidratadas em séries crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes longitudinais contendo 0,6 µm de espessura e imunologicamente marcado para determinar a expressão da Proteína de matriz dentinária 1 (DMP-1). Foram utilizadas as concentrações de anticorpos primários anti-DMP-1 (AF4386 – R&D Systems, Minneapolis, EUA) produzido em ovelha. O anticorpo secundário biotilado anti-ovelha (Jackson Immuno research Laboratories, West Grove, PA, USA) teve a concentração de 1:500. Para a amplificação da reação foi utilizado o kit contendo o complexo avidina-biotina, e o cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB). Com o objetivo de aprimorar a técnica para uma correta identificação das moléculas-alvo, toda a imunomarcação foi padronizada previamente. Adicionalmente, foi feito controle negativo para avaliar possíveis marcações inespecíficas. Ao final do procedimento, as estruturas basofílicas foram coradas com Hematoxilina de Harry's. As imagens selecionadas foram digitalizadas em magnificação de original de 50x ou 400x com uma câmera

acoplada a um microscópio óptico. O background decorrente da digitalização, balanço de cor, brilho e contraste foram corrigidos com o auxílio de software específico. Para a análise qualitativa da imunoistoquímica, seis cortes foram aleatoriamente selecionados para o exame da polpa coronária.

4. RESULTADOS

Na prancha 1, figura A observamos lesão feita com broca esférica no esmalte do primeiro molar inferior do camundongo. Na figura C podemos observar, no interior da câmara pulpar, áreas de hiperemia, sem neutrófilos e a camada odontoblástica íntegra. Na figura B observamos lesão feita com broca esférica no esmalte do primeiro molar inferior do camundongo. Na figura D observamos, no interior da câmara pulpar, áreas hiperêmicas com intenso infiltrado inflamatório neutrofílico e a perda da integridade da camada odontoblástica. Na figura E podemos observar a presença de DMP-1 na dentina coronária, na câmara pulpar, no ligamento periodontal e no tecido ósseo (alveolar e basal). Na figura G, em maior aumento, podemos observar a DMP-1 nos prolongamentos odontoblásticos (canalículos dentinários) e discreta marcação no interior da câmara pulpar. No entanto, ressalta-se a ausência desta proteína no corpo dos odontoblastos. Na figura F podemos observar novamente a presença de DMP-1 na dentina coronária, na câmara pulpar, no ligamento periodontal, osso alveolar e osso basal. Na figura H, em maior aumento, podemos observar a DMP-1 nos prolongamentos odontoblásticos (canalículos dentinários) e no interior da câmara pulpar. No entanto, ressalta-se novamente a ausência desta proteína no corpo dos odontoblastos. Na figura I podemos observar a presença de colágeno na dentina (em azul), no osso alveolar, no ligamento periodontal e na região periapical. Já na figura K, em maior aumento, podemos observar ausência das fibras colágenas no interior da câmara pulpar, estando presentes somente na dentina. Na figura J podemos observar a presença de colágeno na dentina coronária e radicular, no ligamento periodontal e no osso

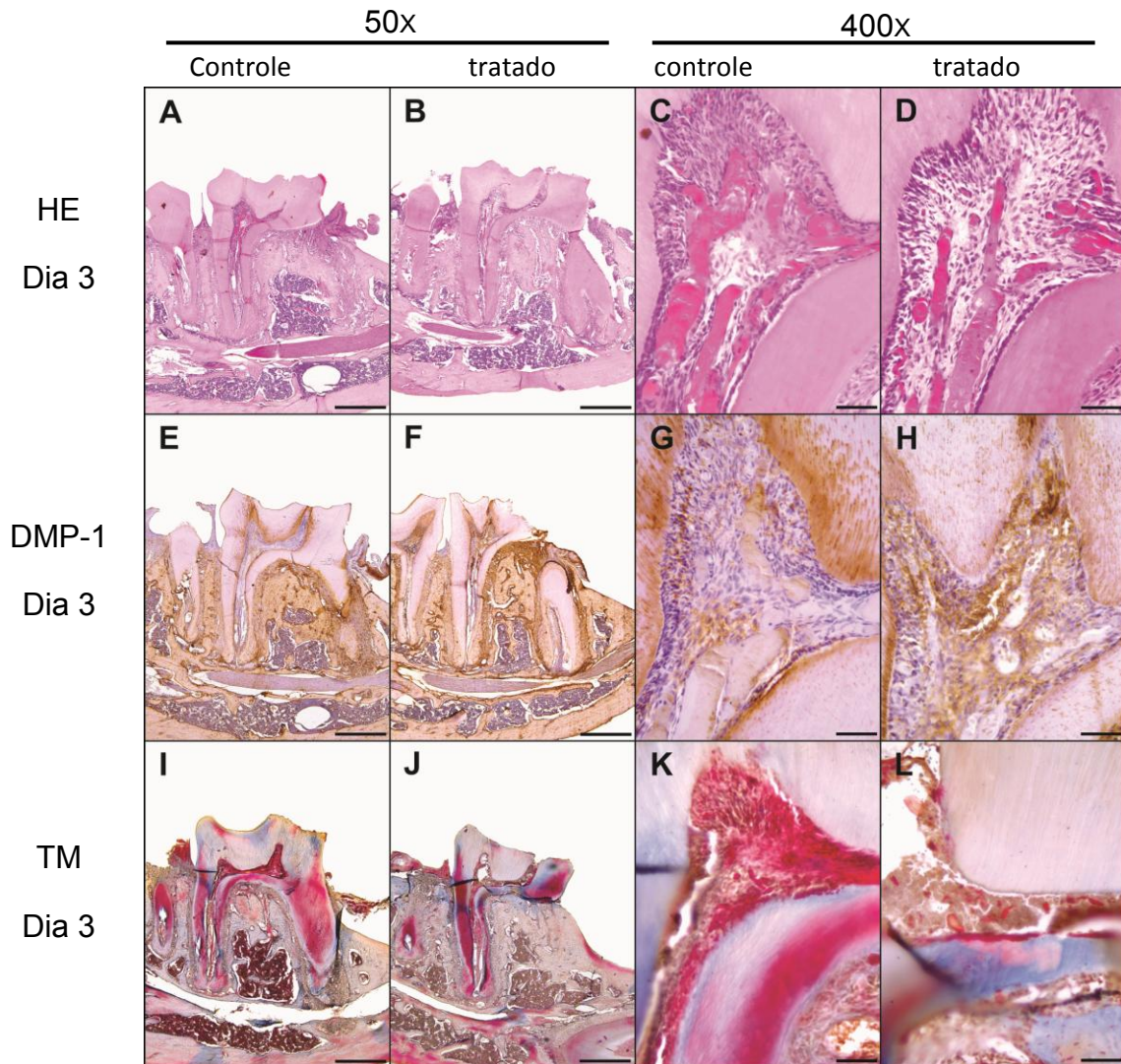
alveolar. Por outro lado, na figura L, em maior aumento, observamos marcação mais intensa de fibras colágenas na dentina.



Prancha 1. Fotomicrografias dos primeiros molares inferiores de camundongos Balb/c com ou sem tratamento com inibidor de TGF- β 1, 1 dia após serem submetidos à lesão pulpar. Em **A, B, C e D**: coloração de Hematoxilina e Eosina; **E, F, G e H**: imunomarcacão para DMP-1; **I, J, K e L**: Trocômico de Masson. **A, C, E, G, I e K**: Grupo Controle (sem tratamento). **B, D, F, H, J e L**: Grupo Tratado. Barra de escala em **A, B, E, F, I e J**: 500 μ m; e em **C, D, G, H, K e L**: 50 μ m.

Na prancha 2, na figura A podemos observar lesão feita com broca esférica no esmalte do primeiro molar inferior do camundongo. Na figura C, em maior aumento, podemos observar no interior da câmara pulpar, áreas de degeneração hialina e presença de infiltrado inflamatório neutrofílico. Além disso, observamos a integridade da camada de odontoblastos. Na figura B podemos observar lesão feita com broca esférica no esmalte do primeiro molar inferior do camundongo. Já na figura D, em maior aumento, podemos observar no interior da câmara pulpar, áreas de degeneração hialina, presença de infiltrado inflamatório em menor número do que aquele observado na prancha 1, figura D e a camada de odontoblastos desorganizada. Na figura E podemos observar a presença de DMP-1 na dentina coronária, na câmara pulpar coronária, no ligamento periodontal, no osso alveolar e no osso basal. Já na figura G, em maior aumento, podemos observar a presença de DMP-1 no prolongamento dos odontoblastos (nos canalículos dentinários) e também no corpo celular de algumas destas células além de discreta marcação no centro da polpa. A marcação da DMP-1 é maior no prolongamento dos odontoblastos do que no interior da câmara pulpar. Na figura F podemos observar a presença de DMP-1 na dentina coronária, na câmara pulpar coronária, no ligamento periodontal, no osso alveolar e no osso basal. Já na figura H, em maior aumento, podemos observar a presença de DMP-1 no prolongamento dos odontoblastos (nos canalículos dentinários), porém não no corpo destes, e também no interior da câmara pulpar. A marcação de DMP-1 é maior no interior da câmara pulpar. Na figura I podemos observar a presença de colágeno na dentina coronária e radicular, no ligamento periodontal e no osso alveolar. Já na figura K, em maior aumento, podemos observar a presença de colágeno na dentina e não no interior da câmara pulpar. Na figura J podemos observar a presença de colágeno na dentina coronária, no

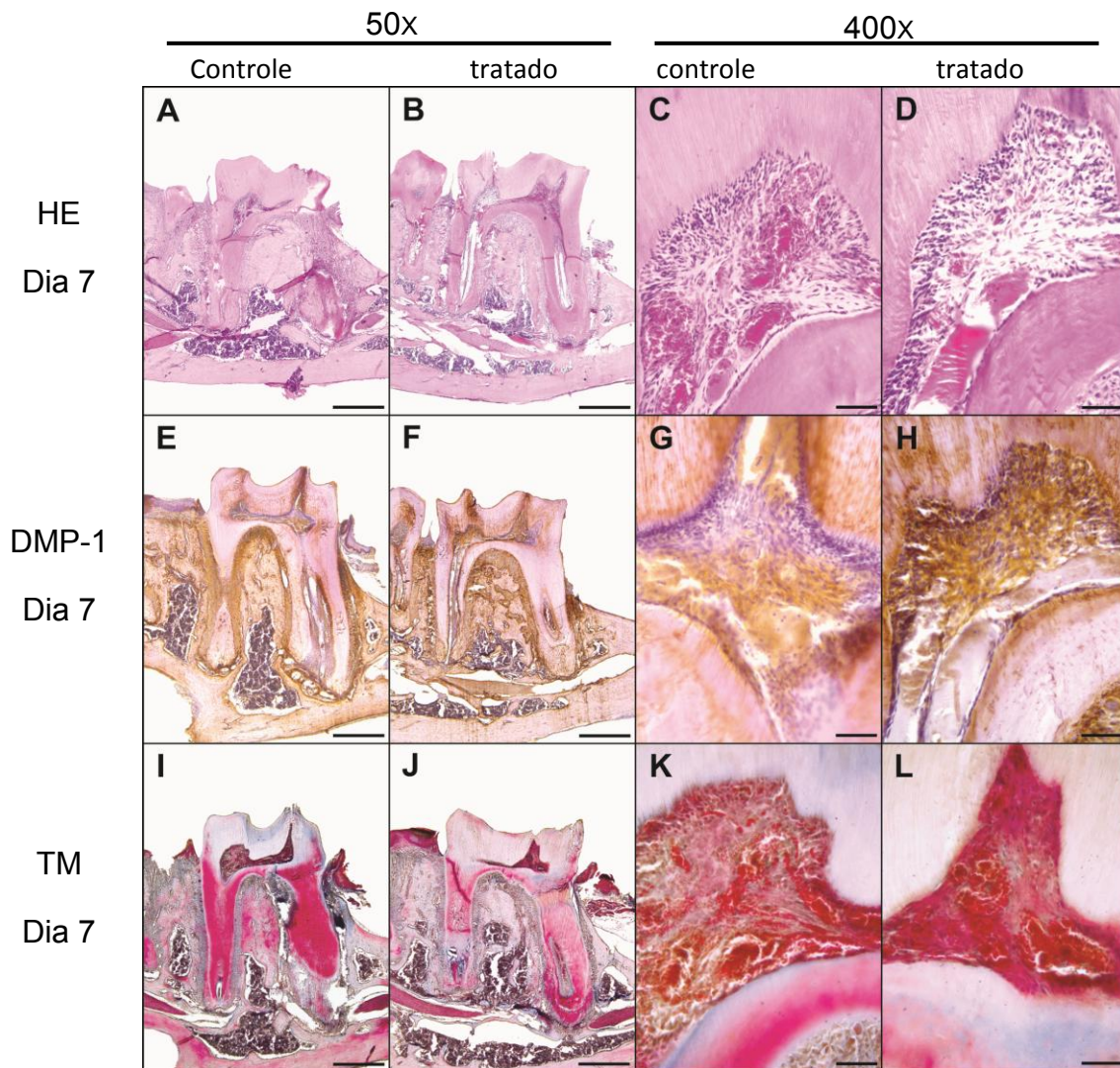
ligamento periodontal e no osso alveolar. Já na figura L, em maior aumento, podemos observar a presença de colágeno na dentina e não no interior da câmara pulpar.



Prancha 2. Fotomicrografias dos primeiros molares inferiores de camundongos Balb/c com ou sem tratamento com inibidor de TGF- β 1, 3 dias após serem submetidos à lesão pulpar. Em **A, B, C e D**: coloração de Hematoxilina e Eosina; **E, F, G e H**: imunomarcacão para DMP-1; **I, J, K e L**: Trocômico de Masson. **A, C, E, G, I e K**: Grupo Controle (sem tratamento). **B, D, F, H, J e L**: Grupo Tratado. Barra de escala em **A, B, E, F, I e J**: 500 μ m; e em **C, D, G, H, K e L**: 50 μ m.

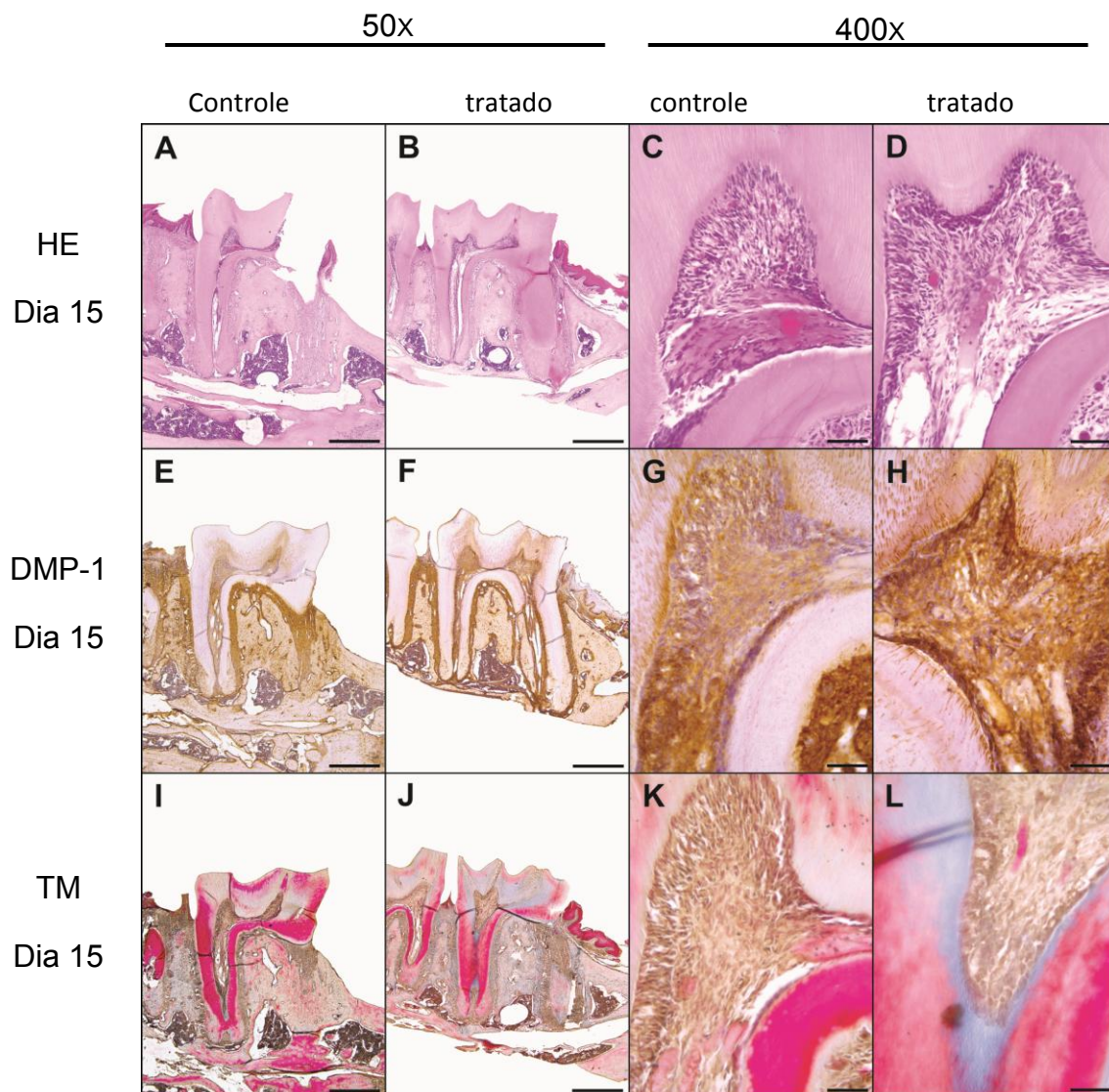
Na prancha 3, na figura A podemos observar a lesão feita com broca esférica no esmalte do primeiro molar inferior do camundongo. Já na figura C, em maior aumento, podemos observar hiperemia no interior da câmara pulpar, presença de neutrófilos em número igual ao encontrado na prancha 2 figura C e a camada de odontoblastos organizada. Na figura B podemos observar a lesão feita com broca esférica no esmalte do primeiro molar inferior do camundongo e hiperemia intensa na câmara pulpar (lado direito). Já na figura D, em maior aumento, podemos observar no interior da câmara pulpar uma degeneração hialina, presença de neutrófilos, porém em menor número do que no observado na prancha 2, figura D e camada de odontoblastos desorganizada. Na figura E podemos observar a presença de DMP-1 na dentina, no interior da câmara pulpar coronária e radicular, no ligamento periodontal, no osso alveolar e no osso basal. Já na figura G, em maior aumento, podemos observar a presença de DMP-1 no prolongamento dos odontoblastos (no interior dos canalículos dentinários) e no centro do tecido pulpar. No corpo dos odontoblastos, esta marcação não é observada. Na figura F podemos observar a presença de DMP-1 na dentina, no interior da câmara pulpar coronária e radicular, no ligamento periodontal, no periápice, no osso alveolar e no osso basal. Já na figura H, em maior aumento, podemos observar a intensa marcação para DMP-1 tanto no prolongamento dos odontoblastos como no tecido pulpar com um todo. Na figura I podemos observar a presença de colágeno na dentina coronária, no ligamento periodontal e no osso alveolar. Já na figura K, em maior aumento, podemos observar a presença de colágeno na dentina e não no interior da câmara pulpar. Na figura J podemos observar a presença de colágeno na dentina, no ligamento periodontal e no osso alveolar e no interior da polpa radicular. Já na figura

L, em maior aumento, podemos observar a presença de colágeno na dentina e não no interior da câmara pulpar coronária.



Prancha 3. Fotomicrografias dos primeiros molares inferiores de camundongos Balb/c com ou sem tratamento com inibidor de TGF- β 1, 7 dias após serem submetidos à lesão pulpar. Em **A, B, C e D**: coloração de Hematoxilina e Eosina; **E, F, G e H**: imunomarcacão para DMP-1; **I, J, K e L**: Trocômico de Masson. **A, C, E, G, I e K**: Grupo Controle (sem tratamento). **B, D, F, H, J e L**: Grupo Tratado. Barra de escala em **A, B, E, F, I e J**: 500 μ m; e em **C, D, G, H, K e L**: 50 μ m.

Na prancha 4, na figura A podemos observar a lesão feita com broca esférica no esmalte do primeiro molar inferior de camundongo. Já na figura C, em maior aumento, podemos observar no interior da câmara pulpar a presença de pequena área hialina, e um número bem reduzido de infiltrado neutrofílico, muito pouco mesmo e a camada de odontoblastos organizada. Na figura B podemos observar a lesão feita com broca esférica no esmalte do primeiro molar inferior de camundongo. Já na figura D, em maior aumento, podemos observar no interior da câmara pulpar a presença de pequena área hialina, infiltrado neutrofílico bem reduzido quando comparado à prancha 3, figura D e a camada de odontoblastos organizada. Na figura E podemos observar a presença de DMP-1 na dentina coronária, no interior da câmara pulpar coronária e radicular, no ligamento periodontal, no periápice, no osso (alveolar e basal). Já na figura G, em maior aumento, podemos observar a presença de DMP-1 no prolongamento dos odontoblastos, nos seus corpos celulares e no interior da câmara pulpar. Na figura F podemos observar a presença de DMP-1 na dentina, no interior da câmara pulpar coronária e radicular, no ligamento periodontal, no periápice, no osso alveolar e no osso basal. Já na figura H, em maior aumento, podemos observar intensa marcação para DMP-1 no prolongamento dos odontoblastos e, principalmente, em todo o tecido pulpar. Nas figuras I e J podemos observar a presença de colágeno no ligamento periodontal e em dentina. Em ambas as figuras K e L, em maior aumento, não podemos observar a presença de colágeno no interior da câmara pulpar coronária.



Prancha 4. Fotomicrografias dos primeiros molares inferiores de camundongos Balb/c com ou sem tratamento com inibidor de TGF- β 1, 15 dias após serem submetidos à lesão pulpar. Em **A, B, C e D**: coloração de Hematoxilina e Eosina; **E, F, G e H**: imunomarcagem para DMP-1; **I, J, K e L**: Trocômico de Masson. **A, C, E, G, I e K**: Grupo Controle (sem tratamento). **B, D, F, H, J e L**: Grupo Tratado. Barra de escala em **A, B, E, F, I e J**: 500 μ m; e em **C, D, G, H, K e L**: 50 μ m.

5. DISCUSSÃO

A capacidade de reparo da polpa dental é sabidamente limitada. Devido à estrutura e constituição celular do complexo dentino-pulpar, estímulos agressores são capazes de induzir um processo inflamatório intenso muito antes de alcançarem o tecido pulpar propriamente dito. Estímulos de baixa intensidade levam comumente à quimiotaxia de células de defesa, produção de dentina reacional, alterações vasculares e calcificações distróficas. Apesar do conhecimento a respeito de alterações teciduais que acometem o tecido pulpar como resultado da instalação de processos inflamatórios, pouca informação existe a respeito da modulação do fenótipo celular nestes quadros. (Fitzgerald et al. 1990, Cassidy et al. 1997; Roberts-Clark e Smith 2000)

Os resultados do presente estudo demonstram que o desgaste do esmalte dentário com consequente exposição de dentina ao meio bucal foi capaz de induzir um processo inflamatório de baixa intensidade, porém suficiente para levar à migração de neutrófilos e à vasodilatação, como observado pelos cortes histológicos de pós-operatório de um, três e sete dias. Além destes achados, destaca-se o aumento da expressão de DMP-1 ao longo dos períodos experimentais. No período de 15 dias, a imunomarcagem para esta proteína se mostra de intensidade semelhante àquela encontrada no tecido ósseo, ainda que as demais características inerentes à instalação da inflamação (infiltrado neutrofílico e vasodilatação) tenham retornado às condições de normalidade.

O TGF- β 1 que se encontra aprisionado na matriz extracelular durante a dentinogênese primária é liberado quando a dentina sofre desmineralização, como por exemplo, quando o dente sofre algum tipo de injúria e então estimula

odontoblastos a produzirem dentina terciária abaixo da lesão. No entanto, quando a lesão é maior, pode haver a morte desses odontoblastos próximos à lesão, estimulando os *odontoblasto-like*, células indiferenciadas que quando estimuladas por TGF- β 1 se transformam em células semelhantes à odontoblastos a repovoarem este local e produzirem dentina terciária (Cooper et al. 2011).

Piattelli et al. 2004 compararam polpas saudáveis com polpas isoladas a partir de dentes com pulpite irreversível e concluíram que a expressão de TGF β 1 foi maior na camada odontoblástica-subodontoblástica de dentes com pulpite irreversível, mostrando que tal fator de crescimento está associado com a reparação de dentina após a inflamação pulpar. Em nosso estudo, o aumento da marcação para DMP-1 foi mais intenso para o grupo tratado com inibidor de ALK5 em comparação ao grupo não tratado. Nossos dados corroboram os achados de Unterbrink et al. 2002 que observaram regulação negativa de DMP-1 e DSPP por TGF- β 1. Essa regulação provavelmente ocorreria por meio do receptor de tipo I ALK5 e transduzidas por *Smads*.

De forma semelhante, Magne et al. 2004 relataram que o aumento da expressão do TGF- β 1 *in vivo* leva a uma hipomineralização semelhante ao observado em dentinogênese imperfeita do tipo II. Os autores observaram diminuição de mineralização e inibição da expressão de DSPP. Por outro lado, o tratamento com BMP-4 (outro membro da família TGF) aumentou significativamente a mineralização.

De forma antagônica, Rosa et al. 2011, avaliaram o efeito de TGF- β 1 na mineralização intratubular e na formação de dentina terciária, concluindo que este

fator de crescimento permite estes processos, podendo esta molécula ser usada em um dessensibilizante dentinário.

Em cultura de células pulpare, Nie et al. 2006 demonstraram a formação de nódulos de mineralização na presença de TGF- β 1 com aumento significativo da síntese de proteínas como DMP-1 e DSPP.

Com base em nossos achados e em estudos prévios da literatura, podemos sugerir que TGF- β 1 pode ser capaz de regular negativamente a produção de DMP-1 *in vivo*. Casagrande et al. 2010 demonstraram que a produção de DMP-1 é dependente do fator de crescimento BMP-2. O aumento da imunomarcação de DMP-1 no grupo tratado com inibidor de TGF- β 1 pode ser em parte explicado por este mecanismo, uma vez que estes fatores de crescimento atuam de forma antagônica em modelos experimentais como em células de musculatura lisa (Upton et al. 2013). Em microambiente anti-inflamatório promovido pelo uso de sinvastatina, Dalcico et al. 2013 demonstraram o aumento da síntese protéica de BMP-2. Com base nestes estudos, podemos especular que o ambiente anti-inflamatório instalado após a redução do infiltrado neutrofílico e vasodilatação pode ter resultado no aumento de BMP-2 com consequente aumento da síntese de DMP-1. Entretanto, uma vez que TGF- β 1 é bloqueado neste microambiente, a sinalização via BMP-2 estaria potencialmente aumentada levando a um aumento ainda maior de DMP-1 do que aquele observado no grupo não tratado. Estudos futuros serão necessários para compreender os mecanismos que podem levar à alteração da produção de DMP-1 por células pulpare e, principalmente, se esta alteração fenotípica teria alguma relação com a ocorrência de calcificações distróficas em dentes com histórico de pulpites reversíveis.

6. CONCLUSÃO

O TGF- β 1 teve um papel anti-inflamatório nos períodos iniciais do reparo pulpar e regulou negativamente a DMP1.

7. REFERÊNCIAS

- Abd-Elmeguid, A., Yu, D.C., Kline, L.W., Moqbel, R., Vliagoftis, H. Dentin Matrix Protein-1 Activates Dental Pulp Fibroblasts. (2012) **J Endodontics.**, v.38, p.75-80, 2012.
- Abraham, D. J., B. Eckes, V. Rajkumar and T. Krieg. New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. **Curr Rheumatol Rep.**, v.9, n.2, p.136-143, 2007.
- Alliot-Licht, B., D. Hurtrel and M. Gregoire. Characterization of alpha-smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. **Arch Oral Biol.**, v.46, n.3, p.221-228, 2001.
- Alvarez-Garcia, I. and E. A. Miska. MicroRNA functions in animal development and human disease. **Development.**, v.132, n. 21, p.4653-4662, 2005.
- Ambros, V. The functions of animal microRNAs. **Nature.**, v.431, n.7006, p.350-355, set. 2004.
- Bartel, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v.116, n. 2, p. 281-297, jan. 2004.
- Bartel, D. P. and C. Z. Chen. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. **Nat Rev Genet.**, v.5, n.5, p. 396-400, maio 2004.
- Bernabeu, C., J. M. Lopez-Novoa and M. Quintanilla. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. **Biochim Biophys Acta.**, v.1792, n.10, p. 954-973, out. 2009.
- Bi R. W, Xu G.T, Lv L.X. and Yang Q.C. The ratio of transforming growth factor- β 1/bone morphogenetic protein-7 in the progression of the epithelial-mesenchymal transition contributes to rat liver fibrosis. **Genet. Mol. Res.**, v.13, n.1, p. 1005-1014, fev. 2014.
- Braun, C. J., X. Zhang, I. Savelyeva, S. Wolff, U. M. Moll, T. Schepeler, et al. P53-responsive microRNAs 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. **Cancer Res.**, v.68, n.24, p.10094-10104, 2008.
- Brouty-Boye, D., C. Pottin-Clemenceau, C. Doucet, C. Jasmin and B. Azzarone (2000). Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. **Eur J Immunol.**, v.30, n.3, p.914-919, março 2000.
- Calderwood, D. A. (2004). Integrin activation. **J Cell Sci.**, v.117, Pt 5, p.657-666, 2004.
- Casagrande L., Demarco F.F, Zhang Z., Araujo F.B, Shi S. and Nör J. E. Dentin-derived BMP2 and odontoblastic differentiation of SHED. **J Dent Res.**, v.89, n.6, p.603-608, 2010.
- Cassidy, N., M. Fahey, S. S. Prime and A. J. Smith. Comparative analysis of transforming growth factor-beta (TGF- β) isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. **Arch Oral Biol.**, v.42, n.3, p. 219-223, 1997.
- Chan, C. P., W. H. Lan, M. C. Chang, Y. J. Chen, W. C. Lan, H. H. Chang, et al. Effects of TGF- β s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. **Arch Oral Biol.**, v.50, n.5, p.469-479, maio 2005.

Chan, M. C., A. C. Hilyard, C. Wu, B. N. Davis, N. S. Hill, A. Lal, et al. Molecular basis for antagonism between PDGF and the TGF β family of signalling pathways by control of miR-24 expression. **EMBO J.**, v.29, n.3, p.559-573, fev. 2010.

Chen, C. H., Y. L. Zhou, Y. F. Wu, Y. Cao, J. S. Gao and J. B. Tang. Effectiveness of microRNA in Down-regulation of TGF-beta gene expression in digital flexor tendons of chickens: in vitro and in vivo study. **J Hand Surg Am.**, v.34, n.10, p.1777-1784, e1771, dez. 2009.

Cheng, Y., X. Liu, S. Zhang, Y. Lin, J. Yang and C. Zhang. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. **J Mol Cell Cardiol.**, v.47, n.1, p.5-14, julho 2009.

Chiego Jr., D. Histology of the pulp.(2002). **Oral development and histology**. J. Avery. Stuttgart, Georg Thieme Verlag p.206-228, 2002.

Coil, J., E. Tam and J. D. Waterfield. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. **J Endod.**, v.30, n.2, p.88-91, fev. 2004.

Cooper PR, McLachlan JL, Simon S, Graham LW and Smith AJ. Mediators of inflammation and regeneration. **Adv Dent Res.**, v.23, n.3, p.290-5, julho 2011.

Dalcico R., de Menezes A. M. A., Deocleciano B. O., Reinaldo B. Oria' B. R., Vale L. M., Ribeiro A. R. and de C. Brito A. G. Protective Mechanisms of Simvastatin in Experimental Periodontal Disease. **J. Periodontol.**, v.84, n.8, p.1145-1157, ago. 2013.

Derynck, R. and R. J. Akhurst. Differentiation plasticity regulated by TGF- β family proteins in development and disease. **Nat Cell Biol.**, v.9, n.9, p.1000-1004, set. 2007.

Desmouliere, A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. **Cell Biol Int.**, v.19, n.5, p.471-476, 1995.

Fitzgerald, M., D. J. Chiego, Jr. and D. R. Heys. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. **Arch Oral Biol.**, v.35, n.9, p.707-715, 1990.

Galat, A. Common structural traits for cystine knot domain of the TGF β superfamily of proteins and three-fingered ectodomain of their cellular receptors. **Cell Mol Life Sci.**, v.68, n.20, p. 3437-51, out. 2011.

Gatza, C. E., S. Y. Oh and G. C. Blobe. Roles for the type III TGF- β Receptor in Human Cancer. **Cell Signal.**, v.22, n.8, p.1163-1174, fev. 2010.

Gu, J. and V. R. Iyer. PI3K signaling and miRNA expression during the response of quiescent human fibroblasts to distinct proliferative stimuli. **Genome Biol.**, v.7, n.5, R42, 2006.

Hakkinen, L., L. Koivisto, H. Gardner, U. Saarialho-Kere, J. M. Carroll, M. Lakso, et al. Increased Expression of β 6-integrin in skin Leads to Spontaneous Development of Chronic Wounds. **Am J Pathol.**, v.164, n.1, p.229-242, jan. 2004.

Hennessy, E. J., A. E. Parker and L. A. O'Neill. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? **Nat Rev Drug Discov.**, v.9, n.4, p.293-307, abril 2010.

- Hinz, B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. **J Invest Dermatol.**, v.127, n.3, p. 526-537, 2007.
- Hosokawa, Y., I. Hosokawa, K. Ozaki, H. Nakae, K. Murakami, Y. Miyake, et al. CXCL12 and CXCR4 expression by human gingival fibroblasts in periodontal disease. **Clin Exp Immunol.**, v.141, n.3, p.467-474, 2005.
- Huminiecki, L., L. Goldovsky, S. Freilich, A. Moustakas, C. Ouzounis and C. H. Heldin. Emergence, development and diversification of the TGF- β signalling pathway within the animal kingdom. **BMC Evol Biol.**, v.9, n.1, p.28, 2009.
- Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v.110, n.6, p.673-687, set. 2002.
- Itoh, S. and P. ten Dijke. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. **Curr Opin Cell Biol.**, v.19, n.2, p.176-184, abril 2007.
- Jheon, A.H., C.Y. Li, T. Wen, F. Michon, O.D. Klein. Expression of microRNAs in the stem cell niche of the adult mouse incisor. **Plos One**, v.6, n.9 e24536, set. 2011.
- Kang, J. S., C. Liu and R. Derynck. New regulatory mechanisms of TGF- β receptor function. **Trends Cell Biol.**, v.19, n.8, p.385-394, ago. 2009.
- Kato, M., H. Yuan, Z. G. Xu, L. Lanting, S. L. Li, M. Wang, et al. Role of the Akt/FoxO3a Pathway in TGF- β 1-Mediated Mesangial Cell Dysfunction: A novel Mechanism Related to Diabetic Kidney Disease. **J Am Soc Nephrol.**, v.17, n.12, p.3325-3335, 2006.
- Kielty, C. M., M. J. Sherratt and C. A. Shuttleworth. Elastic Fibres. **J Cell Sci.**, v.115, Pt 14, p.2817-2828, 2002.
- Killough, S. A., F. T. Lundy and C. R. Irwin. Substance P Expression by Human Dental Pulp Fibroblasts: A Potential Role in Neurogenic Inflammation. **J Endod.**, v.35, n.1, p.73-77, jan. 2009.
- Lawler, J. The functions of thrombospondin-1 and -2. **Curr Opin Cell Biol.**, v.12, n.5, p.634-640, 2000.
- Magloire, H., M. Bouvier and A. Joffe. Odontoblast response under carious lesions. **Proc Finn Dent Soc.**, v.88, Suppl 1, p.257-274, 1992.
- Magne D., Bluteau G., and Guicheux J. Development of an odontoblast in vitro model to study dentin mineralization. **Connect Tissue Res.**, v.45, n.2, p.101-108, 2004.
- Mahanonda, R., N. Sa-Ard-Iam, P. Montreekachon, A. Pimkhaokham, K. Yongvanichit, M. M. Fukuda, et al. IL-8 and IDO Expression by Human Gingival Fibroblasts via TLRs. **J Immunol.**, v.178, n.2, p.1151-1157, jan. 2007.
- Mallick, B., J. Chakrabarti and Z. Ghosh. MicroRNA reins in embryonic and cancer stem cells. **RNA Biol.**, v.8, n.3, 2011.
- Martinez, E. F., V. C. Araujo, S. O. Sousa and V. E. Arana-Chavez. TGF- β 1 Enhances the Expression of α -Smooth Muscle Actin in Cultures Human Pulpal Fibroblasts: Immunochemical and Ultrastructural Analyses. **J Endod.**, v.33, n.11, p.1313-1318, 2007.
- Martinez, E. F., S. O. Machado de Souza, L. Correa and V. Cavalcanti de Araujo. Immunohistochemical Localization of Tenascin, Fibronectin, and Type III Collagen in Human Dental Pulp. **J Endod.**, v.26, n.12, p.708-711, dez. 2000.

- Melin, M., A. Joffre-Romeas, J. C. Farges, M. L. Couble, H. Magloire and F. Bleicher. Effects of TGF β 1 on Dental Pulp Cells in Cultures Human Tooth Slices. **J Dent Res.**, v.79, n.9, p.1689-1696, 2000. J Appl Physiol April (Artigo no prelo).
- Mendias, C.I., Gumucio, J.P., Lynch, E.B. Mechanical loading and TGF- β change the expression of multiple miRNAs in tendon fibroblasts. **J. Appl. Physiol.**, v. 113,n. 1, p. 56-62. Julho 2012.
- Morandini, A. C., C. R. Sipert, T. H. Gasparoto, S. L. Gregghi, E. Passanezi, M. L. Rezende, et al. Differential Production of Macrophage Inflammatory Protein-1 α , Stomal-Derived Factor-1, and IL-6 by Human Cultured Periodontal Ligament and Gingival Fibroblasts Challenged With Lipopolysaccharide From *P. gingivalis*. **J Periodontol.**, v.81, n.2, p.310-317, 2010.
- Morandini, A. C., C. R. Sipert, E. S. Ramos-Junior, D. T. Brozoski and C. F. Santos. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of the TGF- β ; interleukin (IL)-8 and IL-10. **Braz Oral Res.**, v.25, n.2, p.157-162, 2011.
- Muro, A. F., A. K. Chauhan, S. Gajovic, A. Iaconcig, F. Porro, G. Stanta, et al. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin woun healing and normal lifespan. **J Cell Biol.**, v.162, n.1, p.149-160, julho 2003.
- Murphy-Ullrich, J. E., S. Gurusiddappa, W. A. Frazier and M. Hook. Heparin-binding peptides from thrombospondins 1 and 2 contain focal adhesion-labilizing activity. **J Biol Chem.**, v.268, n.35, p.26784-26789, dez. 1993.
- Murphy-Ullrich, J. E. and M. Hook. Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. **J Cell Biol.**, v.109,n.3, p.1309-1319, set. 1989.
- Murphy-Ullrich, J. E. and M. Poczatek. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.11, n.1-2, p.59-69, mar., jun. 2000.
- Narayanan, A. S., L. D. Engel and R. C. Page. The effect of chronic inflammation on the composition of collagen types in human connective tissue. **Coll Relat Res.**, v.3, n.4, p.323-334, jul. 1983.
- Neilson, E. G. Mechanisms of disease: fibroblasts—a new look at an old problem. **Nat Clin Pract Nephrol.**, v.2, n.2, p.101-108, 2006.
- Piattelli, A., C. Rubini, M. Fioroni, D. Tripodi and R. Strocchi. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis (2004). **Int Endod J.**, v.37, n.2, p.114-119, 2004.
- Piattelli, A., C. Rubini., M. Fioroni., D.Tripodi and R. Strocchi. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis. **Int Endod J.**, v.37, n.2, p.114-9, fev. 2004.
- Rifkin, D. B. Latent Tansforming Growth Factor- β (TGF- β) Binding Proteins: Orchestrators of TGF- β Availability. J Biol Chem., v.280, n. 9, p.7409-7412, 2005.
- Roberts-Clark, D. J. and A. J. Smith. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. **Arch Oral Biol.**, v.45, n.11, p.1013-1016, nov. 2000.
- Roberts, A. B. Molecular and Cell Biology oh TGF- β . **Miner Electrolyte Metab.**, v.24, n.2-3, p.111-119, jun. 1998.

Rosa, W. L. O., Silva, A. F., Demarco, F. F., Piva, E. Extração de TGF- β 1 para o futuro desenvolvimento de um dessensibilizante dentinário biológico. Anais do XX Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas. http://www2.ufpel.edu.br/cic/2011/anais/pdf/CS/CS_01181.pdf. 2011.

Ross, S. and C. S. Hill. How the Smads regulate transcription. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.40, n.3, p.383-408, 2008.

Salako, N., B. Joseph, P. Ritwik, J. Salonen, P. John and T. A. Junaid. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. **Dent Traumatol.**, v.19, n.6, p.314-320, dez. 2003.

Santibanez, J. F., M. Quintanilla and C. Bernabeu. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond).**, v.121, n.6, p.233-251, 2011.

Segawa, S., D. Goto, Y. Yoshiga, M. Sugihara, T. Hayashi, Y. Chino, et al. Inhibition of transforming growth factor- β signalling attenuates interleukin (IL)-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease in mice. **Clin Exper Immunol.**, v.160, n.3, p.394-402, jun. 2010.

Shi, Y. and J. Massague. Mechanism of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell.**, v.113, n.6, p.685-700, jun. 2003.

Shi, Y. L., J. P. Bai and W. P. Wang. Ion-channels in human sperm membrane and contraceptive mechanisms of male antifertility compounds derived from Chinese traditional medicine. **Acta Pharmacol Sin.**, v.24, n.1, p.22-30, jan 2003.

Shiba, H., T. Fujita, N. Doi, S. Nakamura, K. Nakanishi, T. Takemoto, et al. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. **J Cell Physiol.**, v.174, n.2, p.194-205, fev. 1998.

Shirakawa, M., H. Shiba, K. Nakanishi, T. Ogawa, H. Okamoto, K. Nakashima, et al. Transforming growth factor- β 1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. **J Dent Res.**, v.73, n.9, p.1509-1514, 1994.

Simon S., P. Cooper, A. Smith, B. Picard, C. Naulin Ifi, A. Berdal. Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study. **Int Endod J.**, v.41, n.9, p.781-790, set. 2008.

Sipert, C. R., I. G. Moraes, N. Bernardinelli, R. B. Garcia, C. M. Bramante, T. H. Gasparoto, et al. Heat-killed *Enterococcus faecalis* alters nitric oxide and CXCL12 production but not CXCL8 and CCL3 production by cultures human dental pulp fibroblasts.(2010). **J Endod.**, v.36, n.1, p. 91-94, 2010.

Sloan, A. J. and A. J. Smith. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- β isoforms 1-3 in vitro. **Arch Oral Biol.**, v.44, n.2, p.149-156, 1999.

Sloan, A. J. and A. J. Smith. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. **Oral Dis.**, v.13, n.2, p.151-157, mar. 2007.

Smith, A. J., N. Cassidy, H. Perry, C. Begue-Kirn, J. V. Ruch and H. Lesot. Reactionary dentinogenesis. **Int J Dev Biol.**, v.39, n.1, p.273-280, 1995.

- Toyono, T., M. Nakashima, S. Kuhara and A. Akamine. Expression of TGF- β superfamily receptors in dental pulp. **J Dent Res.**, v.76, n.9, p.1555-1560, 1997.
- Tziafas, D., A. Alvanou, N. Panagiotakopoulos, A. J. Smith, H. Lesot, A. Komnenou, et al. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. **Arch Oral Biol.**, v. 40, n.10, p.883-893, out. 1995.
- Tziafas, D., A. Alvanou, S. Papadimitriou, J. Gasic and A. Komnenou. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor-beta 1 on dog dental pulp cells in vivo. **Arch Oral Biol.**, v.43, n.6, p.431-444, 1998.
- Tziafas, D., A. J. Smith and H. Lesot. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **J Dent.**, v.28, n.2, p.77-92, 2000.
- Unterbrink A, O'Sullivan M, Chen S and MacDougall M. TGF-beta 1 downregulates DMP-1 and DSPP in odontoblasts. **Connect Tissue Res.**, v.43, n. 2-3, p. 354-8, 2002.
- Upton D. P., Davies J. R., Tajsic T. and Morrell W. N.. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v.49, n.6, p.1135–1145, 2013.
- van Amerongen, J. P., I. G. Lemmens and G. J. Tonino. The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp. **Arch Oral Biol.**, v28, n.4, p.339-345, 1983.
- van Rooij, E., W. S. Marshall and E. N. Olson. Toward MicroRNA-based Therapeutics for heart disease: The sense in Antisense. **Circ Res.**, v.103, n.9, p.919-928, 2008.
- Vaughan, M. B., E. W. Howard and J. J. Tomasek. Transforming growth factor- β 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. **Exp Cell Res.**, v.257, n.1, p.180-189, 2000.
- Xin Nie, Weidong Tian, Yongjie Zhang, Xizhe Chen, Rui Dong, Ming Jiang, Famin Chen and Yan Jin. Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture patterns. **Cell Biology International**, v. 30, n. 4, p.295–300, abril 2006.
- Wisithphrom, K. and L. J. Windsor. The effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, interleukin-6, and transforming growth factor-beta1 on pulp fibroblast mediated collagen degradation. **J Endod.**, v.32, n.9, p.853-861, set. 2006.
- Worm, J., J. Stenvang, A. Petri, K. S. Frederiksen, S. Obad, J. Elmen, et al. Silencing of microRNA-155 in mice during acute inflammatory response leads to derepression of c/ebp Beta and down-regulation of G-CSF. **Nucleic Acids Res.**, v.37, n.17, p.5784-5792, set. 2009.
- Yang, L. C., F. M. Huang, C. S. Lin, C. M. Liu, C. C. Lai and Y. C. Chang. Induction of vascular endothelial growth factor expression in human pulp fibroblasts stimulated with blackpigmented Bacteroides. **Int Endod J.**, v.36, n.11, p.774-779, 2003.
- Yang, L. C., C. H. Tsai, F. M. Huang, C. M. Liu, C. C. Lai and Y. C. Chang. Induction of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines and black-pigmented Bacteroides in human pulp cell cultures. **Int Endod J.**, v.36, n.5, p.352-357, 2003.
- Yang, L. C., C. H. Tsai, F. M. Huang, Y. F. Su, C. C. Lai, C. M. Liu, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression in human pulp fibroblasts stimulated with black-pigmented Bacteroides. **Int Endod J.**, v.37, n.9, p.588-592, 2004.

Yoshida, K., N. Yoshida, H. Nakamura, M. Iwaku and H. Ozawa. Immunolocalization of Fibronectin during Reparative Dentinogenesis in Human Teeth after pulp Capping with Calcium Hydroxide. **J Dent Res.**, v.75, n.8, p.1590-1597, 1996.

Jepsen, S., Schiltz, P., Strong, D.D., Scharla, S.H., Snead, M.L., Finkelman, R.D. Transforming growth factor-beta 1 mRNA in neonatal ovine molars visualized by in situ hybridization: potential role for the stratum intermedium. **Arch Oral Biol.**, v.37, n.8, p.645-53, 1992.

D'Souza, R.N., Happonen, R.P., Ritter, N.M., Butler, W.T. Temporal and spatial patterns of transforming growth factor-beta 1 expression in developing rat molars. **Arch Oral Biol.**, v.35, n.12, p.957-65, 1990.