

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO 1 E FIBRONECTINA POR CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES TRATADAS COM AS PROTEÍNAS BIOATIVAS.

Daniela Cristina Barbosa, Carlos Alberto de Souza Costa, Pedro Pedro Chaves de Souza, Cláudio M. Costa-Neto, Antony John Smith. - Inter-áreas – Odontologia - Departamento de Fisiologia e Patologia - Faculdade de Odontologia de Araraquara – Campus de Araraquara.

Vários estudos têm demonstrado que os fatores de crescimento, principalmente os membros da família TGF β , participam no processo de reparação e alteração homeostática da polpa, sinalizando para vários aspectos da regeneração tecidual, os eventos associados com a injúria dental e subsequente reação de defesa. Todavia, o mecanismo de ação das moléculas bioativas sobre as células e tecidos ainda não está bem compreendido.

Com a finalidade de avaliar a participação dos fatores de crescimento extraídos da dentina de terceiros molares humanos (hESDP) na modulação da expressão dos genes que codificam para fibronectina (FN) e colágeno tipo 1 (Col-1), foi realizado o experimento de RT-PCR semi-quantitativo. Células MDPC-23 (30.000 células/cm²) foram semeadas em placas de 24 compartimentos (~60.000 células/compartimento) em meio de cultura DMEM completo e mantidas em incubadora por 72 horas. Em cada um dos compartimentos, foram adicionadas diferentes concentrações de hESDP, originando os seguintes grupos: Grupo 1- 0 μ g/mL; Grupo 2 – 0,001 μ g/mL; Grupo 3 – 0,01 μ g/mL; Grupo 4 – 0,1 μ g/mL; Grupo 5 - 1 μ g/mL. O RNA total extraído após 24 horas de exposição, utilizando-se para isto o TRIzol, foi submetido ao ensaio de RT-PCR, utilizando o número de ciclos determinado para cada gene em estudo. Após eletroforese em gel de agarose a 2% de todos os produtos de PCRs, foi realizada a fotodocumentação para análise de densitometria. A partir dos valores das áreas de cada banda, foi calculada a razão entre a expressão do gene de interesse e de GAPDH para cada amostra. Desta maneira, foi gerado um gráfico, que representa os níveis de expressão relativa de FN e Col-1 pelas células expostas a diferentes concentrações de proteínas.

Neste experimento, pôde-se observar que não houve diferença na expressão dos genes que codificam para FN e Col-1 nos grupos em que as células foram expostas a diferentes concentrações de proteínas. A figura 1 representa o gel de agarose a 2% contendo os produtos de PCR de dois experimentos independentes. As bandas foram submetidas a densitometria e os gráficos com os valores numéricos obtidos estão representados nas figuras 2 (FN) e 3 (Col-1).

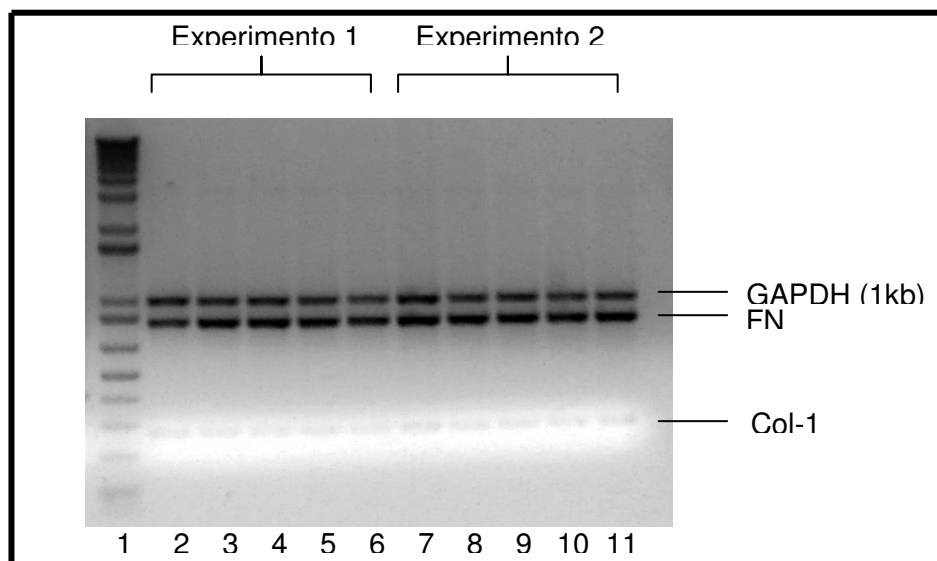


Figura 1 – Produtos de PCR dos genes que codificam para Col-1, FN e GAPDH em gel de agarose 2%. 1- Ladder 1kb, 2 e 7 – Controle negativo. 3 e 8 – 0,001 μ g/mL de ESDP, 4 e 9 – 0,01 μ g/mL, 5 e 10 – 0,1 μ g/mL, 6 e 11 - 1 μ g/mL.

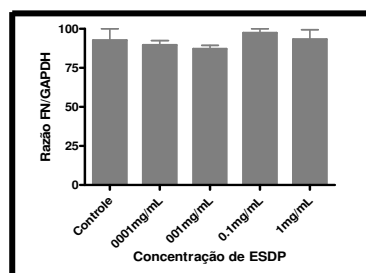


Figura 2 – Representação gráfica dos níveis de expressão do RNAm de FN em relação aos de GAPDH nas células expostas a diferentes concentrações de hESDP.

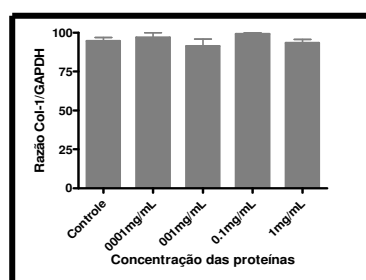


Figura 3 – Representação gráfica dos níveis de expressão do RNAm de Col-1 em relação aos de GAPDH nas células expostas a diferentes concentrações de hESDP.

Para avaliação da síntese de colágeno, foi utilizado o kit SIRCOL, as células foram distribuídas nos grupos já descritos para o experimento de RT-PCR. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540nm, utilizando o reagente alcalino como branco. Para calibração do experimento, uma curva-padrão foi construída com o padrão de colágeno que acompanha o kit previamente à realização do experimento.

A síntese de colágeno foi analisada devido ao fato de que as proteínas (hESDP) poderiam estar agindo na tradução do RNAm e não na sua transcrição. A curva padrão obtida forneceu uma equação de reta $y=0,0224x$, onde y é a densidade ótica obtida para que se determine a quantidade de colágeno secretada no meio de cultura.

No experimento com as células expostas a diferentes concentrações de hESDP, observamos que houve uma diminuição na síntese e secreção de colágeno para algumas concentrações testadas (Figura 4).

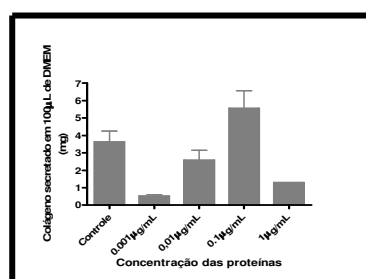


Figura 4 – Quantidade de colágeno secretado após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de proteínas.

Assim, foi possível concluir, dentro das condições experimentais, que o hESDP não apresenta efeito sobre a transcrição dos genes que codificam para Col-1 e FN, mas afeta a tradução do gene que codifica para Col-1. Este estudo evidenciou também que o hESDP regula a síntese de COL-1 de

maneira dose-dependente. Desta maneira, dependendo da concentração de hESDP aplicada sobre as células MDPC-23, este extrato pode ter ação estimulatória ou inibitória na síntese de COL-1.

Referências Bibliográficas

Butler WT. Dentin-specific proteins. *Methods Enzymol.* 1987;145:290-303.

Butler WT, Brunn JC, Qin C, McKee MD. Extracellular matrix proteins and the dynamics of dentin formation. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):301-7.

Deng M, Shi J, Smith AJ, Jin Y. Effects of transforming growth factor beta1 (TGFbeta-1) and dentin non-collagenous proteins (DNCP) on human embryonic ectomesenchymal cells in a three-dimensional culture system. *Arch Oral Biol.* 2005 Nov;50(11):937-45.

Duque C, Hebling J, Smith AJ, Giro EMA, Oliveira MF, Costa CAS. Reactionary dentinogenesis after applying restorative materials and bioactive dentin matrix molecules as liners in deep cavities prepared in nonhuman primate teeth. *J Oral Rehab.* 2006;.33:452-461.

Fujimoto, R., T. Tanizawa, *et al.* Local effects of transforming growth factor-beta1 on rat calvaria: changes depending on the dose and the injection site. *J Bone Miner Metab*, v.17, n.1, p.11-7. 1999.

Galler KM, Schweikl H, Thonemann B, D'Souza RN, Schmalz G. Human pulp-derived cells immortalized with Simian Virus 40 T-antigen. *Eur J Oral Sci.* 2006 Apr;114(2):138-46.

He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J, Smith AJ. TGF-beta activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol.* 2004 Nov;49(11):911-8.

Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res.* 2004 Aug;83(8):590-5.

Lesot H, Fausser JL, Akiyama SK, Staub A, Black D, Kubler MD, Ruch JV. The carboxy-terminal extension of the collagen binding domain of fibronectin mediates interaction with a 165 kDa membrane protein involved in odontoblast differentiation. *Differentiation.* 1992 Mar;49(2):109-18.

Lesot H, Karcher-Djuricic V, Kubler MD, Ruch JV. Membrane-cytoskeleton interactions: inhibition of odontoblast differentiation by a monoclonal antibody directed against a membrane protein. *Differentiation.* 1988;37(1):62-72.

Lindquist, J. N., W. F. Marzluft, *et al.* Fibrogenesis. III. Posttranscriptional regulation of type I collagen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.279, n.3, Sep, p.G471-6. 2000.

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

McLachlan JL, Smith AJ, Sloan AJ, Cooper PR. Gene expression analysis in cells of the dentine-pulp complex in healthy and carious teeth. *Arch Oral Biol.* 2003 Apr;48(4):273-83.

Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells.* 2002 Dec;7(12):1191-204. Review.

Sloan AJ, Couble ML, Bleicher F, Magloire H, Smith AJ, Farges JC. Expression of TGF-beta receptors I and II in the human dental pulp by in situ hybridization. *Adv Dent Res.* 2001 Aug;15:63-7.

Bolsa: CNPq/PIBIC.

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

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. Int J Dev Biol. 1995 Feb;39(1):273-80. Review.

Smith AJ, Leaver AG. Non-collagenous components of the organic matrix of rabbit incisor dentine. Arch Oral Biol. 1979;24(6):449-54.

Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. Adv Dent Res. 2001 Aug;15:51-4. Review.

Smith SJ, Tobias RS, Murray PE. Transdentinal stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentine matrix components. J Dent. 2001;29:341-6.

Staquet MJ, Couble ML, Romeas A, Connolly M, Magloire H, Hynes RO, Clezardin P, Bleicher F, Farges JC. Expression and localization of alpha_v integrins in human odontoblasts. Cell Tissue Res. 2006 Mar; 323(3):457-63. Epub 2005 Dec 8.

Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Bègue-Kirn C, Wataha JC, Hanks CT, Butler WT. Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. Connect Tissue Res. 1998;37(3-4):233-49.

Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. Int J Dev Biol. 1995 Feb;39(1):281-90. Review.

Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. Caries Res. 2004 May-Jun;38(3):314-20. Review.

Tziafas D, Panagiotakopoulos N, Komnenou A. Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine or calcium hydroxide-containing cement. Arch Oral Biol. 1995 Jan;40(1):23-31.

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

Unterbrink A, O'Sullivan M, Chen S, MacDougall M. TGF beta-1 downregulates DMP-1 and DSPP in odontoblasts. Connect Tissue Res. 2002;43(2-3):354-8.