

## AMELOGENINA E BIOMINERALIZAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS RECRUTADAS PELA IMPLANTAÇÃO DA AMELOGENINA NA MUCOSA BUCAL MURINA

Sally LACERDA-PINHEIRO\*  
Dominique SEPTIER  
Michel GOLDBERG  
Hélène CHARDIN

**Résumé :** L'amélogénine est la protéine majeure de l'émail. Le but de notre travail a été d'étudier les effets de peptides d'amélogénine lors d'une implantation ectopique. Ainsi, des billes d'agarose témoins ou imprégnées de peptides ont été implantées dans la muqueuse jugale des murines. Les animaux ont été sacrifiés à J3, J8 et J30, et une étude histologique et immunohistochimique réalisée. Un recrutement cellulaire massif a été observé autour des billes. Les cellules recrutées sont CD45<sup>+</sup> et I-A<sup>k+</sup>. Dans les groupes des peptides, les cellules expriment de marqueurs ostéochondrogénique (OPN<sup>+</sup>, BSP<sup>+</sup>, Sox9<sup>+</sup> et RP59<sup>+</sup>). Cette étude indique que l'amélogénine recrute de cellules du compartiment vasculaire et stimule la différenciation vers un phénotype mésenchymateux.

**Mots-clés :** amélogénine ; développement dental ; réparation dentinaire ; différenciation cellulaire.

**Resumo:** A amelogenina é a principal proteína do esmalte. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos desses peptídeos quando implantados ectopicamente. Para isso, micro-esferas de agarose controles ou impregnadas com os peptídeos foram implantadas na mucosa jugal de murinos. Os animais foram sacrificados à D3, D8 e D30, e estudos histológicos e imunohistoquímicos foram realizados. Observou-se um recrutamento celular massivo ao redor das micro-esferas. As células recrutadas são CD45<sup>+</sup> e I-A<sup>k+</sup>. Nos grupos dos peptídeos, as células exprimiram marcadores osteo-condongênico (OPN<sup>+</sup>, BSP<sup>+</sup>, Sox9<sup>+</sup> e RP59<sup>+</sup>). Este estudo indica que a amelogenina recrute células do compartimento vascular e estimula a diferenciação a um fenótipo mesenquimatoso.

**Palavras-chave:** amelogenina; desenvolvimento dental; reparação dentinária; diferenciação celular.

### I. INTRODUÇÃO

A carie e a doença periodontal são as patologias mais comuns na clínica odontológica. Os tratamentos das consequências dessas doenças apresentam alguns limites. Uma nova perspectiva é a utilização da engenharia tecidual como terapêutica para regenerar os tecidos lesados ou perdidos à causa dessas doenças.

---

\* Sally Lacerda Pinheiro est doctorante au Laboratoire de Différenciation Cellulaire et Prions – CNRS Villejuif - attaché à l'Université René Descartes – Paris 5

A engenharia tecidual procura induzir o processo de auto-reparação ou auto-regeneração utilizando ou manipulando os recursos do próprio organismo. Neste contexto, as pesquisas atuais em biologia bucal se interessam: às células tronco, ao potencial de diferenciação ou re-diferenciação celular, as proteínas da matriz extracelular e as moléculas de sinalização implicadas no desenvolvimento e na reparação dos tecidos dentais.

No plano molecular, alguns trabalhos estudaram o potencial de regeneração pulpar após implantação de esferas de colágenos impregnadas de *bone morphogenic proteins-7* (BMP-7) em polpas de macacos (37) ou de ratos (42) ou os efeitos da implantação de esferas de gelatina impregnadas de *bone sialoprotein* (BSP) na polpa de molares de rato (12). O efeito da amelogenina na polpa também foi estudado a partir da implantação de esferas de agarose embebidas nesta molécula.

Durante décadas, a amelogenina tem sido considerada como um grupo de moléculas secretadas especificamente pelos ameloblastos num estado precoce da formação do esmalte. Uma vez secretadas, elas são re-internalizadas depois de uma degradação enzimática pelos ameloblastos secretores durante o espessamento da camada de esmalte, e pelos pós-secretores durante a maturação do esmalte (1). As variações do peso molecular da amelogenina podem ser devido a uma degradação pelas MMPs (2) ou por um *splicing* alternativo (3). Duas isoformas de amelogenina foram encontradas na biblioteca odontoblástica (6-8): **A+4** (8.1kDa) é resultado da expressão de todos os exons (2,3,4,5,6d e 7), enquanto a **A-4**(6.9kDa) é expressa por todos os exons menos o exon 4 (6). Em cultura de fibroblastos gengivais, A+4 induziu a expressão do fator de transcrição Sox9, um regulador do gene do colágeno tipo II, característicos dos condrócitos (20). Enquanto A-4 elevou a expressão do fator de transcrição Cbfa1, um fator de diferenciação dos condrócitos e dos osteoblastos (6). Dados recentes sugerem que A+4 e A-4 são potentes molécula sinalizadoras (9).

Recentemente, a amelogenina foi introduzida na prática clínica como terapêutica de regeneração periodontal. Na verdade, trata-se de um extrato purificado de proteínas derivadas da matriz do esmalte – Emdogain® (EMD; Biora AB, Malmo-Sweden) o qual a amelogenina é o principal componente (22). O EMD favorece a cementogênese e a formação de osso alveolar (11). As experiências *in vitro* mostraram também que EMD induz a síntese de proteínas e a formação de nódulos mineralizados pelas células do ligamento periodontal humano (39).

Quando implantadas na polpa dental de 1° molares, a amelogenina (A+4 e A-4) mostrou também um efeito de molécula sinalizadora, induzindo a formação de uma ponte de dentina reparadora (A+4) ou uma mineralização completa da polpa coronal e radicular (A-4) (10). Entretanto, os mecanismos envolvidos nesse processo de regeneração precisam ser mais bem esclarecidos. O papel do processo inflamatório não foi elucidado. A reação inflamatória pode ser um evento separado devido à preparação da cavidade seguido da implantação do material exógeno. Alternativamente, a reação inflamatória pode estar associada de alguma forma ao processo reparador. Desta forma esse estudo investigou a origem e o fenótipo das células recrutadas pela implantação da

A+4 e A-4 na polpa dental e quando essas moléculas foram implantadas em sítio ectópico.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

Vinte sete camundongos machos (C3H/HeN) com seis semanas de idade e pesando 20 gramas foram utilizados nesse estudo. No dia 0, os animais foram repartidos aleatoriamente e anestesiados por uma injeção intra-peritoneal de hidrato de cloral. As esferas de agarose foram implantadas na mucosa jugal direita e esquerda. O primeiro grupo recebeu as esferas de agarose embebidas com a A+4, o segundo grupo recebeu as esferas embebidas com a A-4 e o último grupo recebeu esferas de agarose sem nenhuma molécula (controle).

Os animais foram sacrificados por deslocação cervical nos dias 3, 8, 30. A mucosa jugal direita foi fixada em IHC Zinco (5BD Biociências, EUA) durante 48hs a 23°C, desidratadas em grau crescente de álcool e em seguida, embebidas em Paraplast. A mucosa esquerda foi fixada por congelação (Cryomahit/Shandon).

Foram realizados exames histológicos (tricroômico de Masson, azul de toluidina e reação de Von Kossa) e imunohistoquímicos (anti-PCNA, anti-CD45, anti-I-A<sup>k</sup>, anti-RP59, anti-OPN, anti-BSP, anti-DSP e anti-Sox9). A coloração por tricroômico de Masson serviu para mostrar o panorama geral de implantação das esferas. Em seguida foi avaliado se as implantações eram capazes de induzir uma proliferação celular, associada à expressão do fator nuclear PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*) (anti-PCNA, Oncogene TM Research Products, EUA), ou se elas favorisavam o recrutamento de células que migram de outros tecidos (células vasculares por exemplo). Assim, interessou-se a caracterizar as células inflamatórias que aparecem no momento de implantação das esferas sozinhas ou das esferas carregadas de A+4 e A-4. Em seguida avaliou-se a capacidade da A+4 e A-4 induzirem uma diferenciação osteocondrogênica.

A resposta inflamatória as implantações foi caracterizada por uma coloração de azul de toluidina que permite evidenciar os mastócitos, e as marcações com anticorpos anti-CD45 e anti-I-A<sup>k</sup>. Anti-CD45 (BD Biociências, EUA) foi usado para detectar leucócitos e linfócitos. Uma marcação com anti-I-A<sup>k</sup> (BD Biociências, EUA) foi usada para caracterizar especificamente as células que exprimem o MHC (major histocompatibility human) classe II.

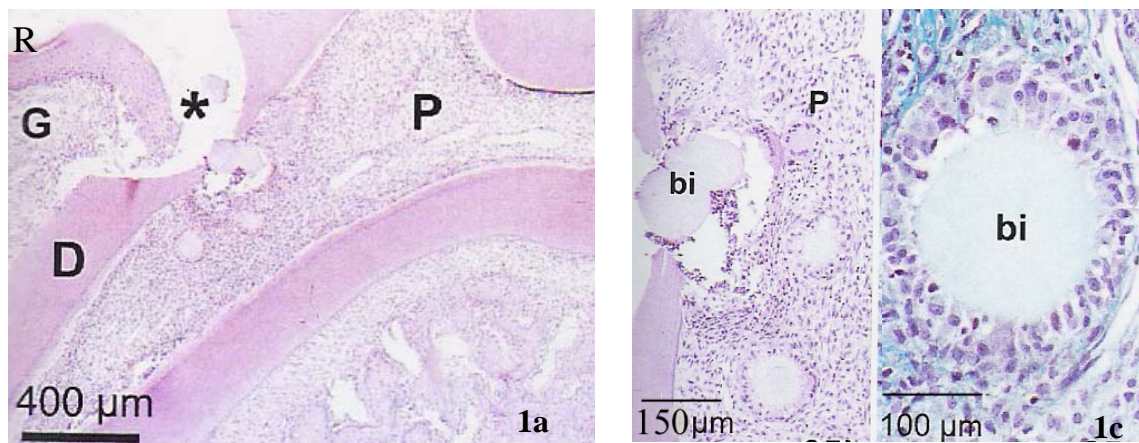
O potencial de diferenciação osteocondrogênica foi estudado pela expressão de proteínas como RP59, Sox9 e a síntese de moléculas características dos tecidos mineralizados tal com OPN (osteopontina), BSP e DSP (*dentin sialoprotein*). A aparição de nódulos de mineralização foi avaliada por uma reação do tipo Von Kossa. O anticorpo anti-RP59 (doado por Tilmann Wurtz, INSERM, Paris, França), permite marcar células precursoras mesenquimatosas (osteoblasto e condroblasto), o anti-Sox9 (doado por Anne Poliard, CNRS, Villejuif, França), marca as células condroprogenitoras e os condrócitos diferenciados. A imunomarcação continuou com a

utilização de anticorpos anti-DSP, anti-OPN, anti-BSP (doados por Larry Fisher, Bethesda, Maryland, EUA), pois esses antígenos têm um papel na iniciação, crescimento e na estabilização dos cristais de hidroxiapatita dos tecidos mineralizados (16-18). Controles negativos foram realizados omitindo o anticorpo primário em cada reação. Controles positivos foram realizados no baço de camundongos, quando pertinentes.

### III. RESULTADOS

#### Implantações em polpa dental *in vivo*:

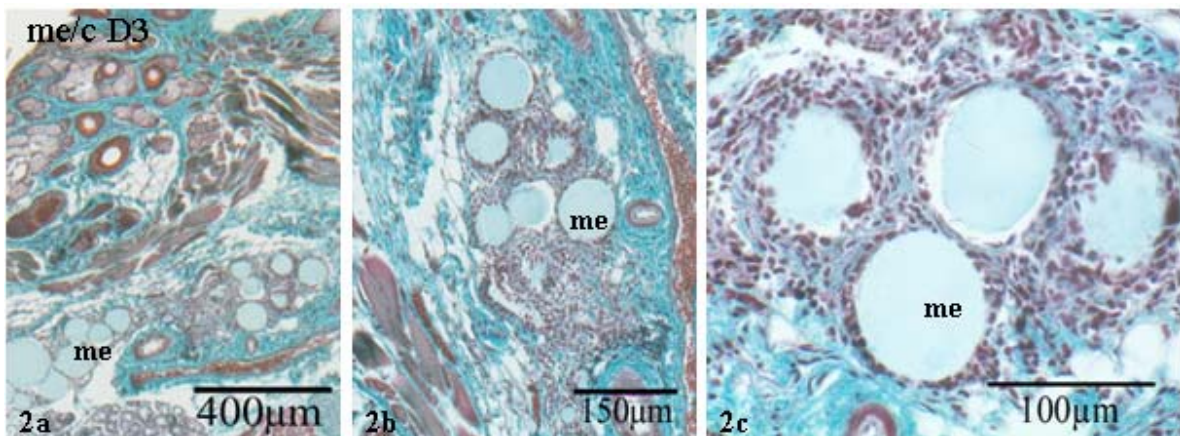
Entre 1 e 3 dias, uma forte reação inflamatória foi vista em polpas implantadas com esferas de agarose controles e embebidas com A+4 e A-4. O maior achado dessa experiência à curto prazo foi que o processo inflamatório que ocorre formou um anel celular ao redor das esferas (Fig. 1). Estas células apresentaram um fenótipo do tipo osteoblástico.



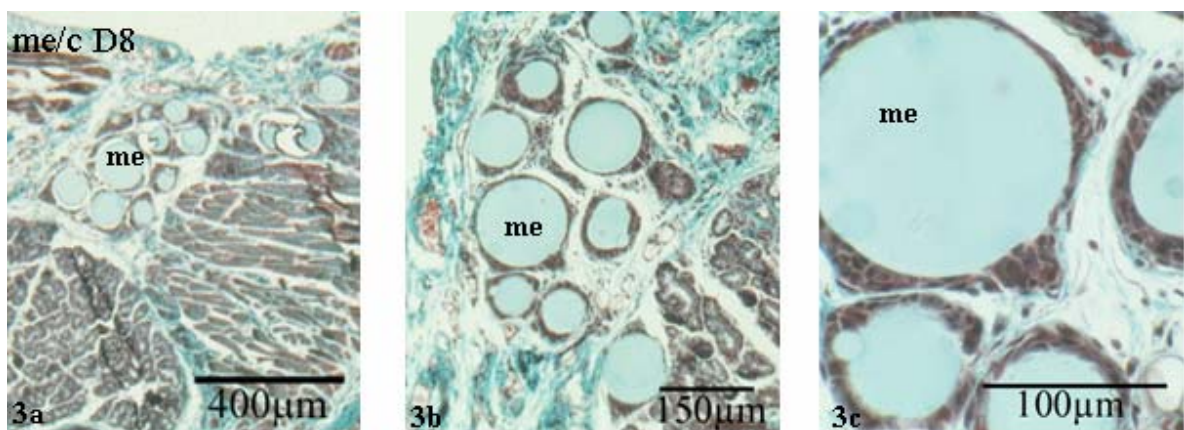
**Figura 1:** Implantações das micro-esferas de agarose (me) na polpa (P) de ratos (R) ocasionam um recrutamento celular. (D – dentina, G- gengiva e \* - a cavidade). (1a,b Hématoxilina/Eosina, 1c tricromo de Masson). Figuras fornecidas generosamente pelo Laboratoire de Biologie et Physiopathologie Cranio-Faciales.

#### Implantação ectópica das micro-esferas de agarose:

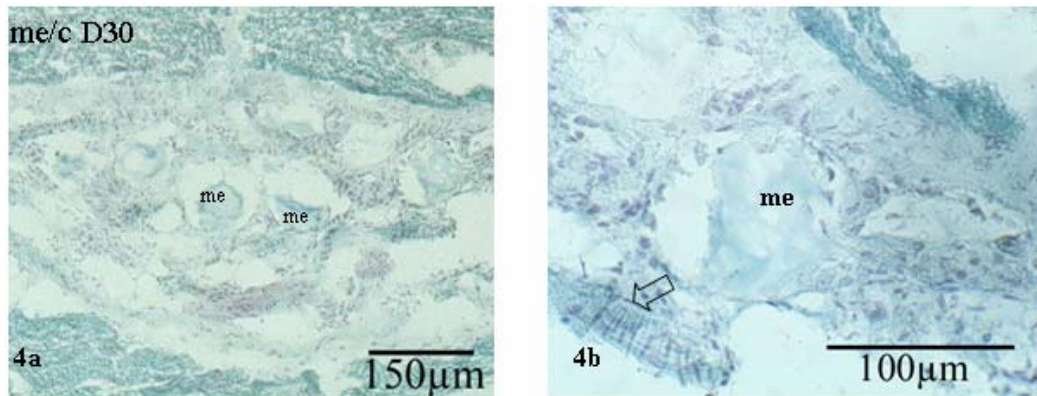
Houve uma indução importante do fenômeno inflamatório, o qual foi mais intenso nos 3-8 primeiros dias, e aumentou depois dos trigésimo dia (Fig.2 a 6).



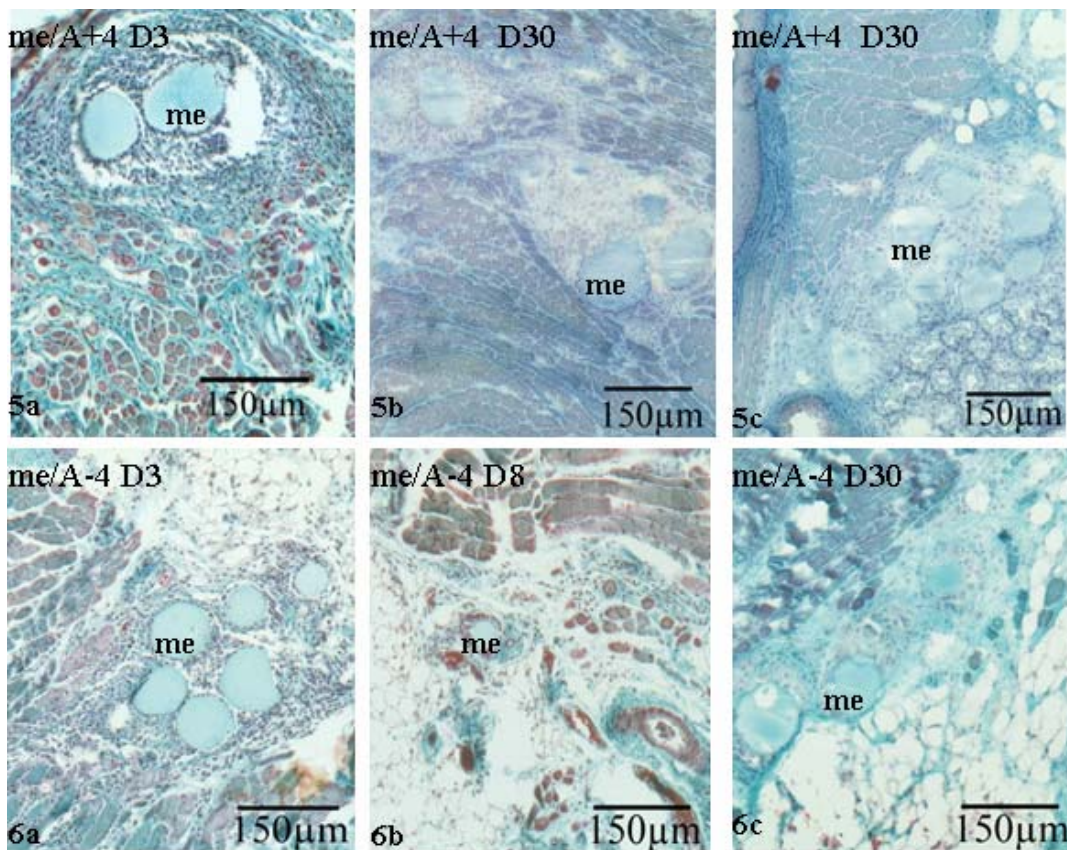
**Figura 2:** Tricrômico de Masson. As implantações das esferas controles (me/c) ocasionam um recrutamento celular nos camundongos, observados a partir do D3.



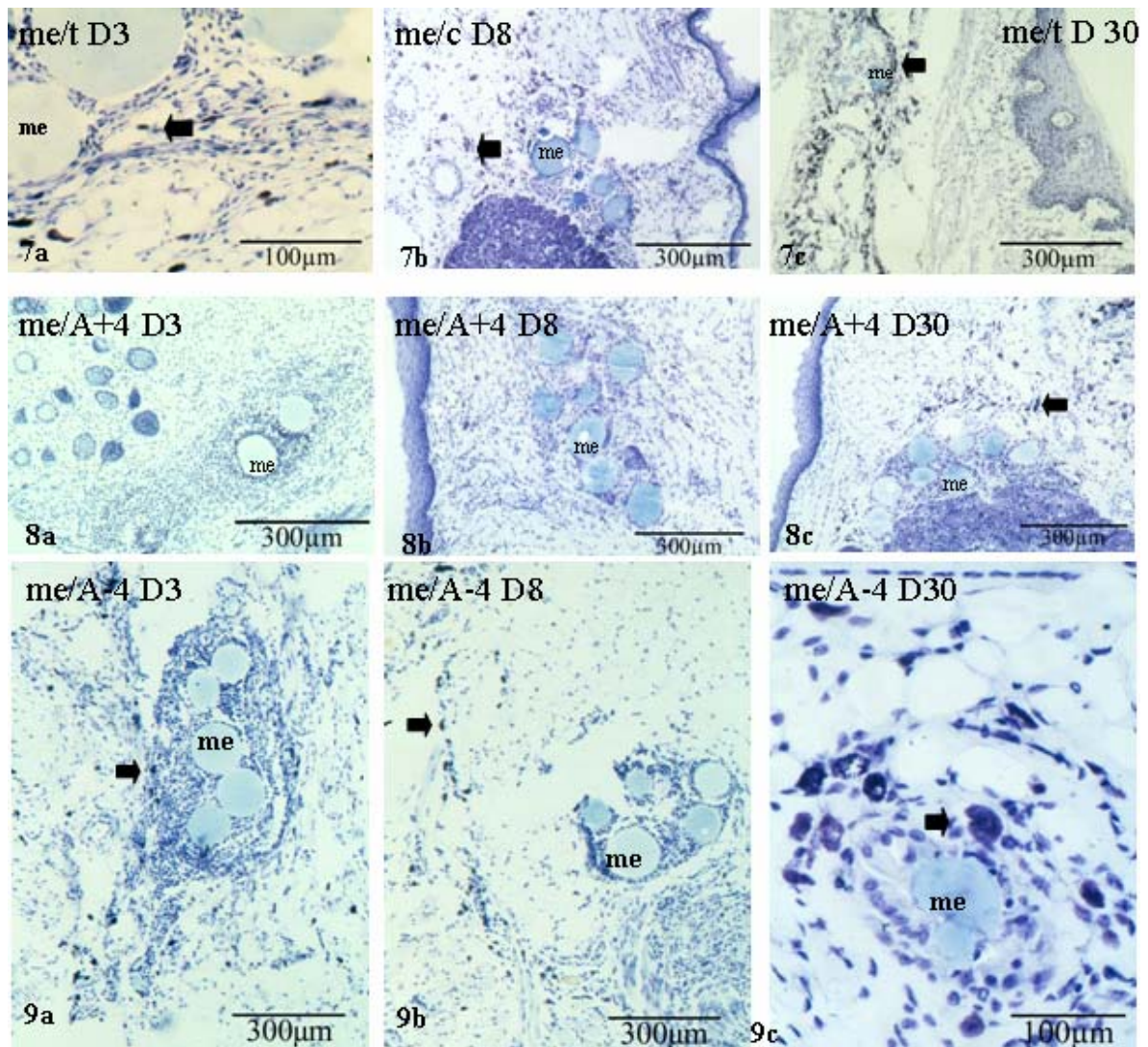
**Figura 3:** Tricrômico de Masson. No D8, as esferas estão ainda cobertas por uma condensação celular.



**Figura 4:** Tricrômico de Masson. No D30 as implantações das esferas controles mantêm um aglomerado celular ocasionando a formação de um tecido fibroso (seta). As esferas são parcialmente degradadas.



**Figuras 5 e 6:** Tricrômico de Masson. As esferas são impregnadas de A+4 ou A-4. Elas se situam na profundidade do tecido conjuntivo e recrutaram um volume celular importante.



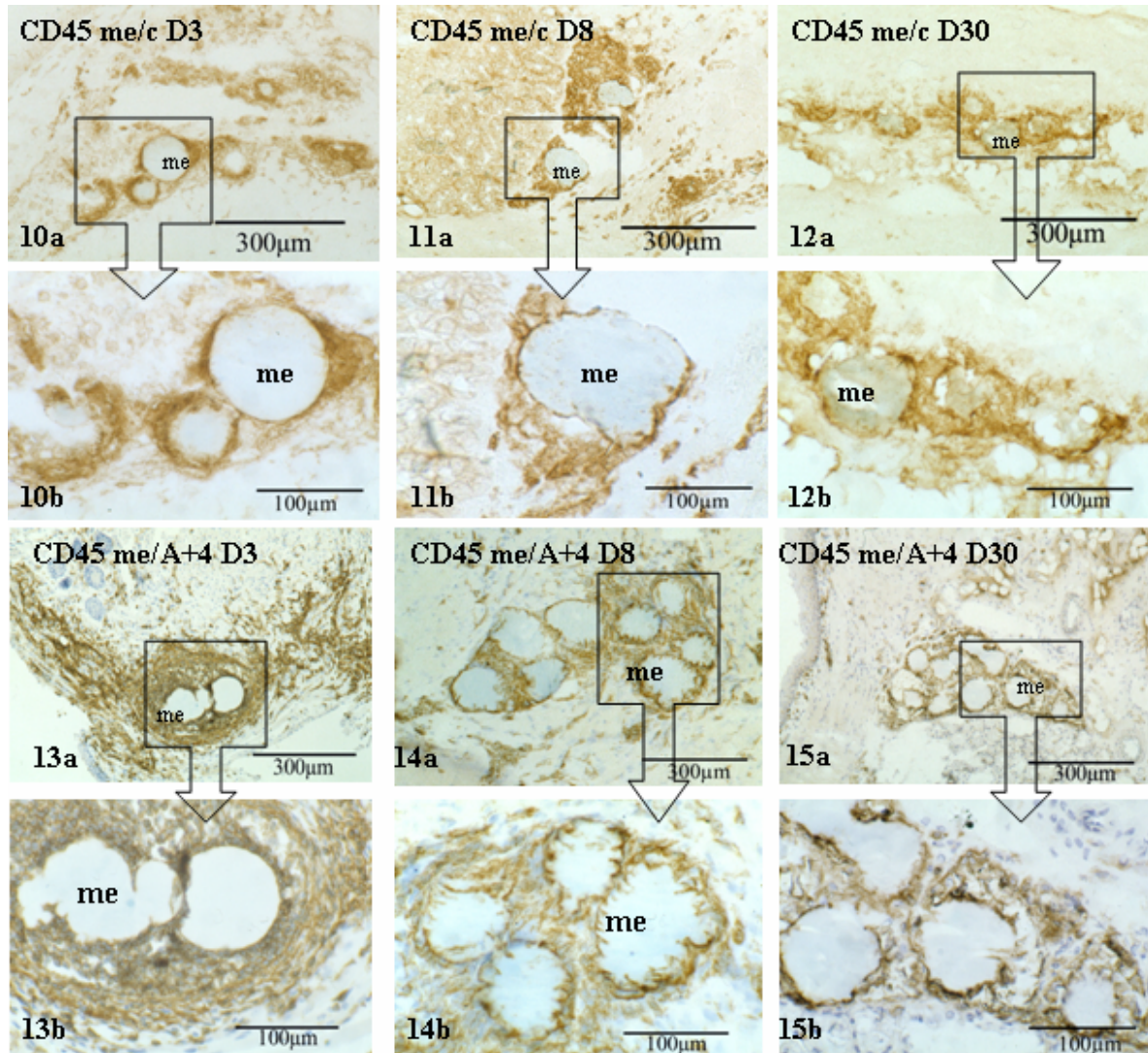
**Figura 7:** Coloração com azul de toluidina. No grupo de micro-esferas controle (me/c), os mastócitos (seta) se encontram longe das esferas à D3 (a) e à D8 (b), mas eles estão em contato com as esferas à D30 (c).

**Figura 8:** Coloração com azul de toluidina. Os mastócitos são pouco numerosos no grupodas micro-esferas com A+4 (me/A+4) à D3 (a) e D8 (b), alguns aparecem no D30, mas longes da esferas.

**Figura 9:** Coloração com azul de toluidina. Alguns mastócitos encontram-se localiazdos longes da esferas de A-4 (me/A-4) no D3 (a) e D8 (b), mas proximo das esferas no D30(c).

Visualizando a proliferação celular, a marcação com anti-PCNA não revelou nenhuma antígeno, sugerindo assim que as células presentes na vizinhança e ao redor das esferas não resultaram de uma proliferação local, mas sim de uma migração de células

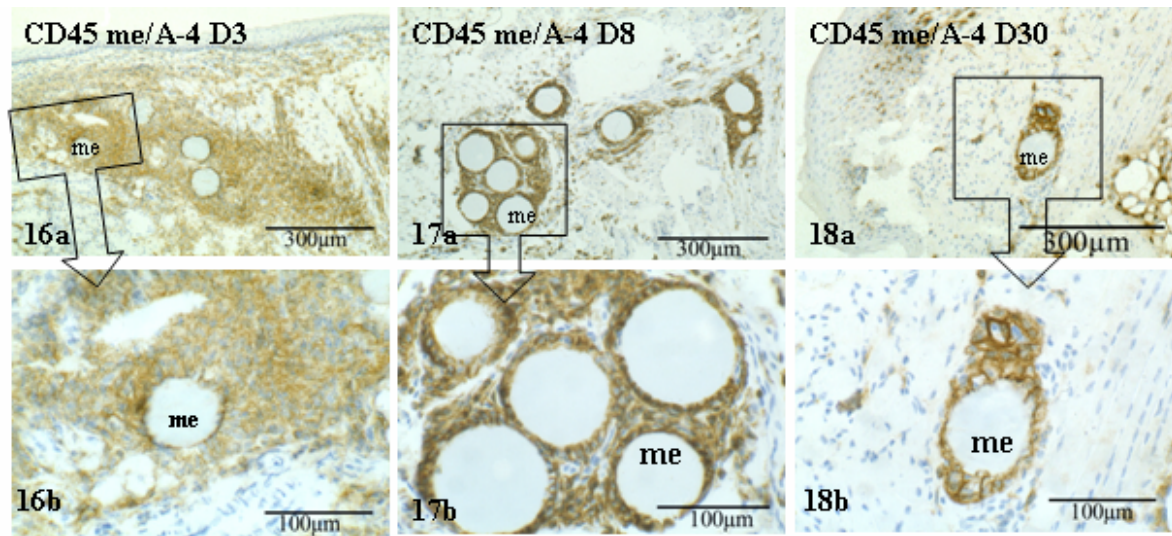
inflamatórias para a área implantada (dados não mostrados). Mastócitos foram detectados pelo azul de toluidina ao redor das esferas controles entre 3 e 8 dias e mais próximas depois de 30 dias (Fig.7). O que não foi observado ao redor das esferas embebidas em A+4 e A-4 (Fig.8 e 9).



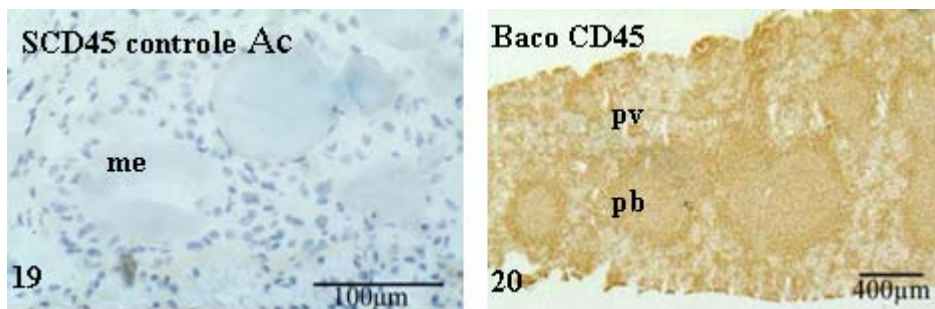
**Figuras 10 a 15:** Marcação com anticorpos anti-CD45. Observa-se uma forte marcação anti-CD45 nas células recrutadas pelas micro-esferas do grupo controle(me/c) e das esferas com A+4 (me/A+4), em todos os tempos.

Uma marcação CD45 foi vista nos estágios precoces, confirmando que a população de células inflamatórias era principalmente linfócitos (Fig. 10-20). Dentre essa população de linfócito, uma marcação I-A<sup>k</sup> positiva foi visualizada, demonstrando a presença de células do complexo maior de histocompatibilidade do tipo classeII (Fig. 21-26). Esta marcação serviu para identificar monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos-B.



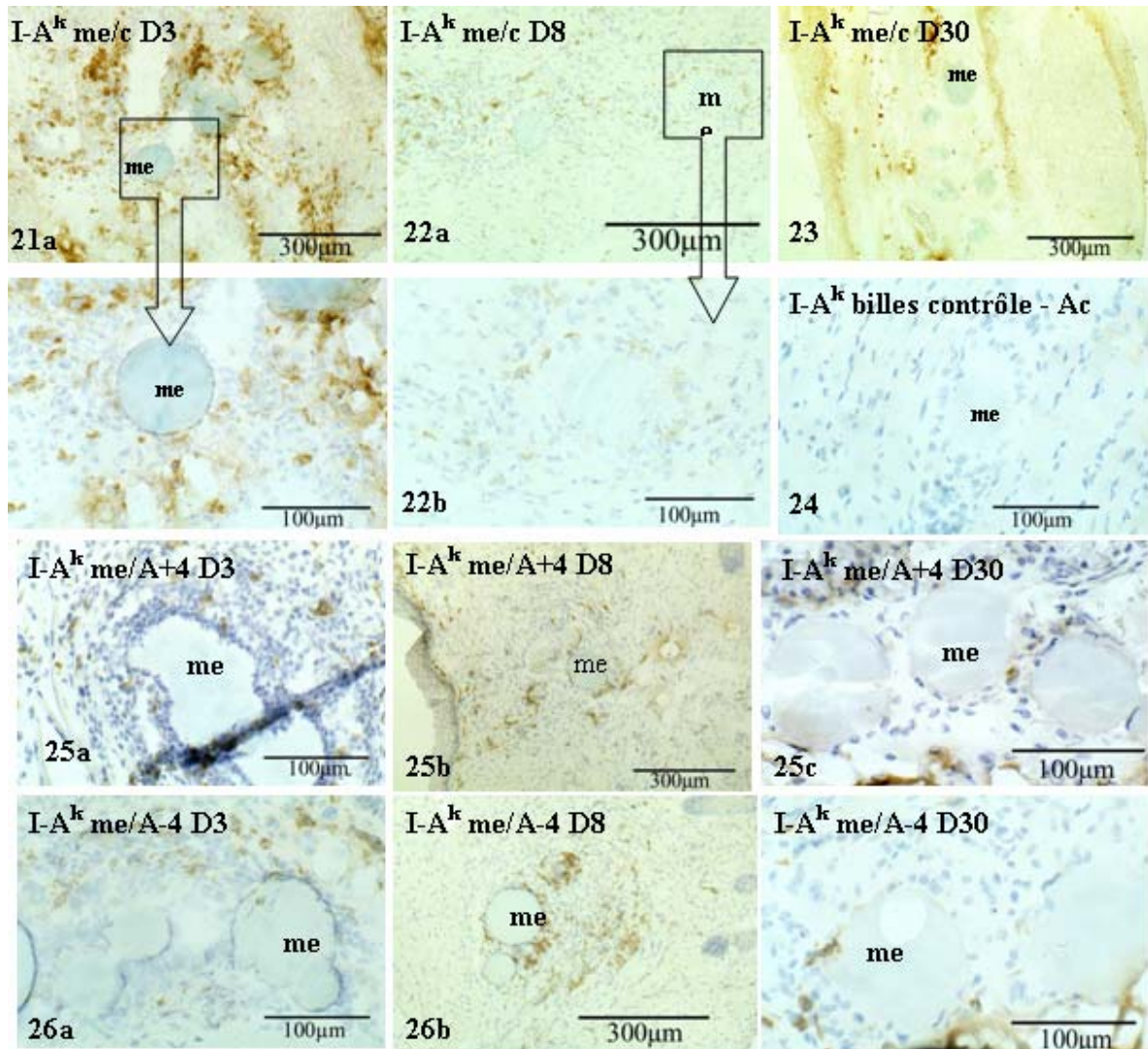


**Figuras 16 a 18:** Marcação com anticorpos anti-CD45. Observa-se uma forte marcação anti-CD45 das células recrutadas pelas micro-esferas com A-4 (me/A-4) em todos os tempos.



**Figura 19:** Controle negativo. O controle unicamente com anticorpo secundário é completamente negativo.

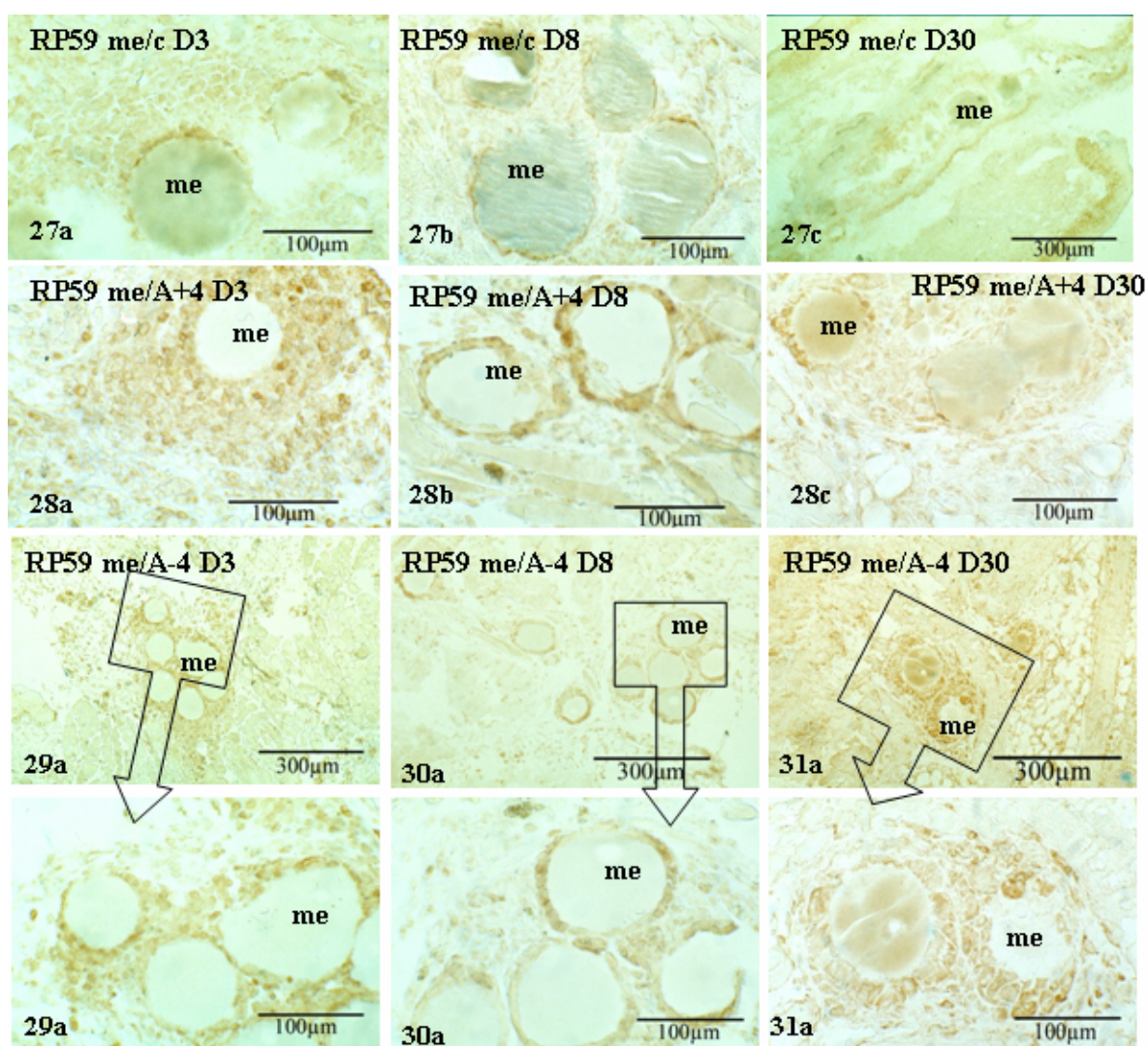
**Figura 20:** Baço de camundongo marcado pelo anticorpo anti-CD45. A marcação da polpa branca (pb) serve como controle positivo.



**Figuras 21 a 23:** Marcação com anticorpos anti I-A<sup>k</sup>. No D3, observa-se a presença de células I-A<sup>k</sup> (21a,b) ao redor das esferas controle (me/c). A presença dessas células diminuem à D8 e D30 (22a,b et 23).

**Figura 24:** Controle negativo. O controle da reação sem o Ac primario é negativo.

**Figuras 25 e 26:** Marcação com anticorpos anti I-A<sup>k</sup>. Algumas células I-A<sup>k+</sup> são visualizadas ao redor das esferas A+4 e A-4 à D3 (25a,26a) e à D8 (25b, 26b) ; mas são ausente no D30 (25c, 26c).



**Figura 27:** Marcação com anticorpos anti-RP59. Ao redor da micro-esferas (me) uma fraca marcação das células RP59<sup>+</sup> está presente à D3 e à D8 (a,b), à D30 (c) a marcação está ausente.

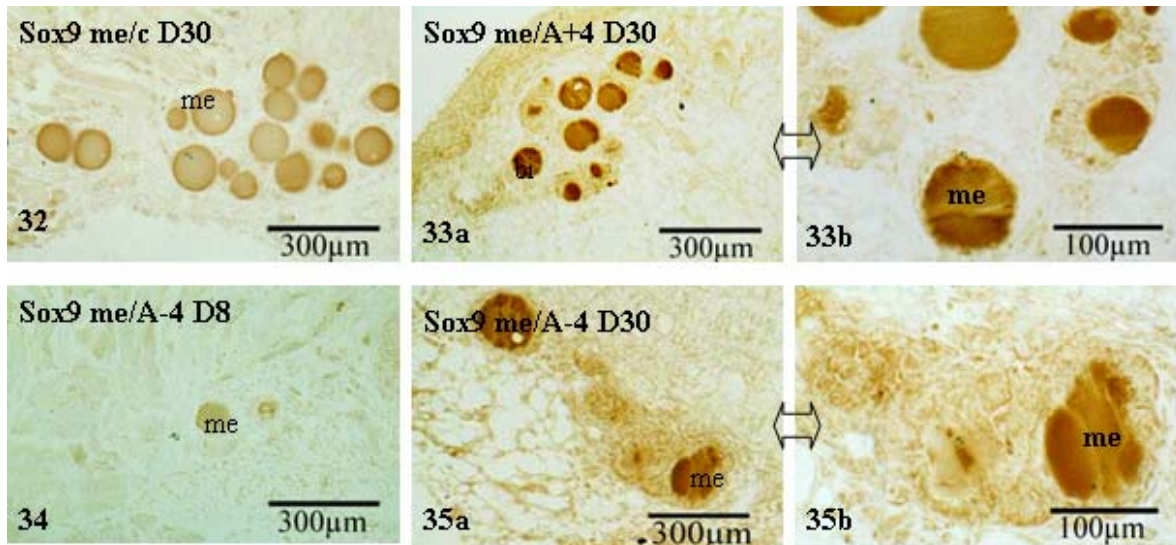
**Figura 28:** Marcação com anticorpos anti-RP59. O recrutamento das células RP59<sup>+</sup> é induzido a todos os tempos do grupo A+4 (me/A+4).

**Figuras 29 a 31:** Marcação com anticorpos anti-RP59. As esferas com A-4 (me/A-4) recrutaram células RP59<sup>+</sup> em todos os tempos.

RP59 é uma molécula detectada ao longo da diferenciação da linhagem osteoblástica, como também em células mesenquimais primitivas: eritrócitos e megacariócitos (11, 12). Depois da implantação das esferas controles, uma marcação foi observada no 3º dia, diminuindo no 8º e desaparecendo no 30º dia (Fig. 27). Com as esferas com A+4,

uma fraca marcação foi vista no dia 3, e diminui nos dias 8 e 30 (Fig. 28). Entretanto, com as esferas embebidas em A-4 a situação foi inversa (Fig. 29). As células ao redor das esferas apresentaram uma fraca marcação no dia 3 e aumentou quando se avançou no tempo.

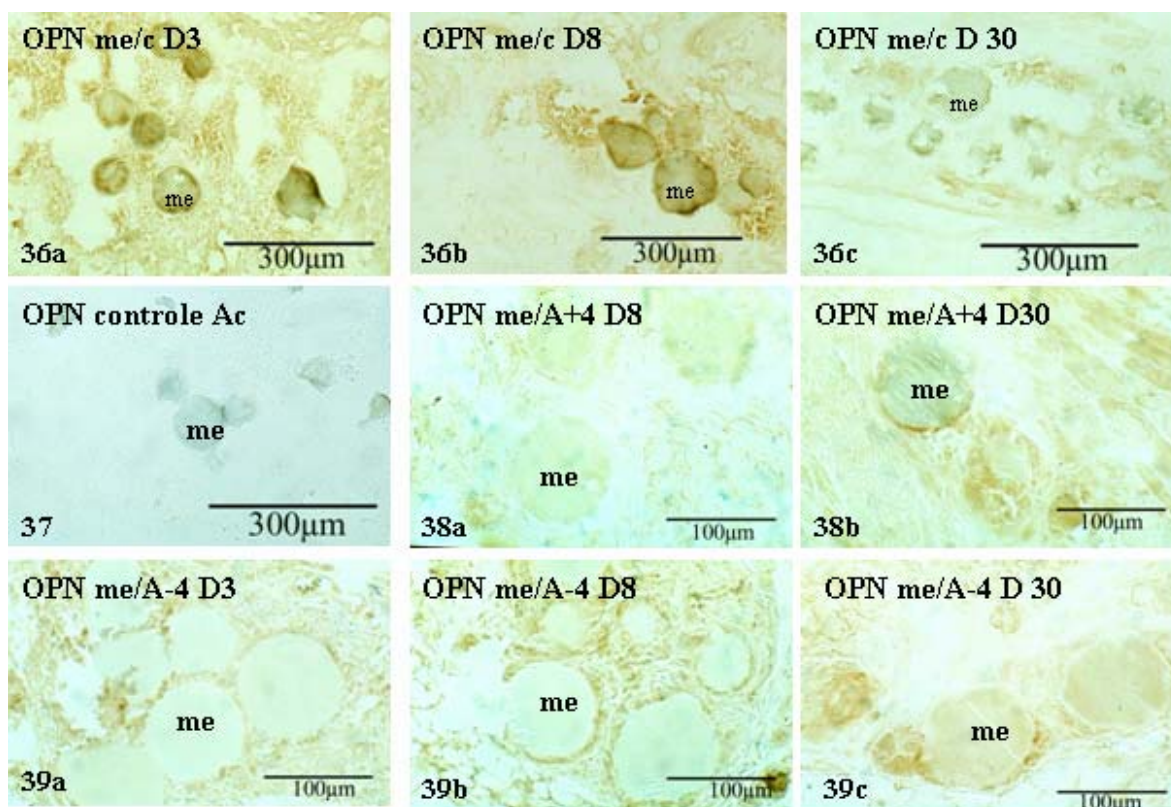
Poucas células tiveram uma marcação Sox9 positiva depois da implantação da A+4, (Fig.33) e menos ainda quando implantadas com A-4 (Fig.34 e 35). A implantação de esferas controles não revelou a expressão de fatores de transcrição (Fig.32).



**Figuras 32 e 33:** Marcação com anticorpos anti-Sox9. Nenhuma marcação foi observada nos camundongos do grupo controle e A-4 à D8.

**Figuras 34 e 35:** Marcação com anticorpos anti-Sox9. Ao redor das esferas A+4 e A-4 no D30 nos camundongos, as células são Sox9<sup>+</sup>.

A marcação anti-DSP foi negativa com e sem A+4/A-4 (dados não mostrados). Entretanto uma marcação OPN foi negativa em esferas controles (Fig.36 e 37), e detectável em pequeno número no 3º dia de implantação com a A+4 (Fig.38). Com A-4 a marcação celular foi vista ao redor de esfera no 3º, 8º e 30º dia (Fig.39). BSP não foi expressa depois da implantação de esferas controles (Fig.40). Oito dias após a implantação da A+4 e 30 dias com a A-4, uma marcação positiva BSP foi vista nas células ao redor das esferas (Fig.41-42).

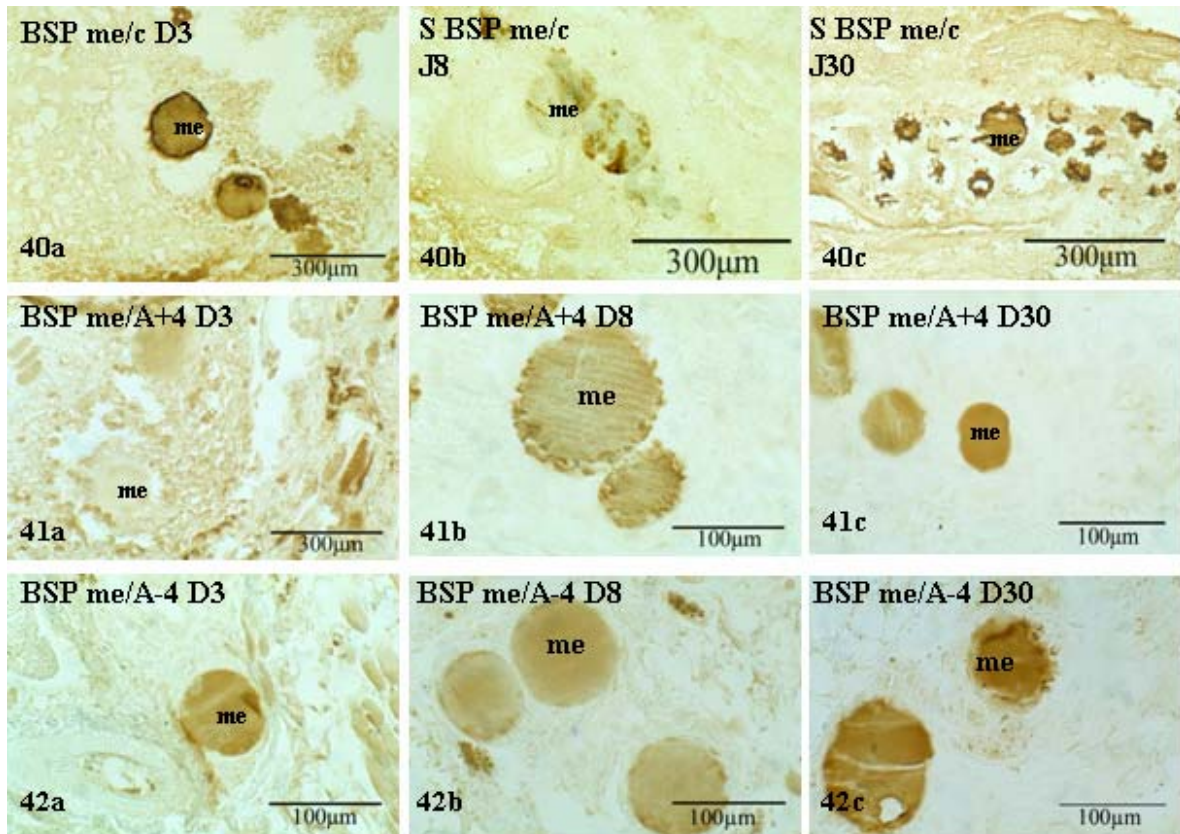


**Figura 36:** Marcação com anticorpos anti-OPN. A matriz extra-celular ao redor das esferas do grupo controle (me/c) exprime OPN, mas nenhuma marcação celular é observada.

**Figura 37:** Controle negativo. O controle unicamente com o anticorpo secundario foi completamente negativo. Esse anticorpo foi o mesmo utilizado para a marcação com anti-BSP, anti-RP59, anti-DSP e anti- Sox9.

**Figura 38:** Marcação com anticorpos anti-OPN. As células ao redor das micro-esferas com A+4 (me/A+4) exprimem OPN unicamente no D30 (b).

**Figura 39:** Marcação com anticorpos anti-OPN. Ao redor das micro-esferas com A-4 (me/A-4) a expressão celular da proteína OPN é observada à partir do D8.



**Figuras 40 a 42:** Marcação com anticorpos anti-BSP. A única marcação observada da proteína BSP é no D8 no grupo da A+4 e no D30 no grupo da A-4 (me/A-4) (c).

#### IV. DISCUSSÃO

Implantar um transportador impregnado de moléculas num dado tecido é um meio de experimentação largamente descrito na literatura. A implantação na polpa de colágeno com BMP-7 (41-42), de gelatina com BSP (12,41) e de micro-esferas de agarose com A+4/A-4 (19,20,23,43) fornecem alguns exemplos da associação transportador/molécula já estudados. As polpas de ratos que receberam as micro-esferas de agarose controles não apresentaram nenhuma mineralização, exceto ao redor dos fragmentos de dentinas que foram projetados no momento do procedimento operatório. Inversamente, as micro-esferas carregadas com A+4 ou A-4 implantadas na polpa, induziram à formação de uma ponte dentinária e/ou à obliteração da raiz (19,20,43), o que demonstra que o processo de mineralização é consequência do efeito dessas moléculas.

PCNA é um antígeno nuclear de proliferação celular. Uma imunomarcações com anticorpo anti-PCNA permite afirmar se as células aglomeradas ao redor das micro-esferas provêm da proliferação de células já presente no tecido. Nesse trabalho, as

células presentes ao redor das micro-esferas controles e experimentais formam PCNA<sup>+</sup>. Logo, essas células não resultaram da proliferação de células presentes no tecido o qual elas foram implantadas. A importante marcação CD45<sup>+</sup> indica que essas células pertencem à linhagem leucocitária. É absolutamente normal que a implantação de um corpo estranho induza uma inflamação imediata e que diminua com o tempo. O recrutamento de leucócitos na vizinhança e em contato com as micro-esferas é particularmente maior no dia 3, diminui no dia 8 à distância das micro-esferas e persiste no dia 30 próximo as esferas, tendo praticamente desaparecido nos arredores. A persistência de uma leve inflamação local no dia 30 é confirmada pela presença de mastócitos nos tecidos que acolhem as esferas. Levando em conta a alteração das micro-esferas observadas de maneira constante no dia 30, nossa hipótese era que a implantação das esferas pudesse recrutar células fagocitárias, notadamente macrófagos. Entretanto, a marcação I-A<sup>k</sup> mostra somente uma fraca proporção de células corresponde a esse tipo celular. Outros tipos celulares CD45<sup>+</sup> tais como os neutrófilos polinucleares, podem igualmente participar à inflamação e à alteração das esferas. Assim, as implantações das esferas controles ou impregnadas de A+4 e A-4 ocasionam uma inflamação imediata equivalente nos três grupos, que regressam com o tempo, mas não desaparecem totalmente em 30 dias.

#### **IV. 1. O efeito da A+4 e A-4 sobre a indução de uma diferenciação celular osteocondrocitária.**

A cultura de matrizes dentinárias de incisivos de rato com fibroblastos musculares induziu uma condrogênese. A princípio, os peptídeos indutores dessa condrogênese foram chamados *Chondrogenic-Inducing Agent* (CIA) (1). A matriz dentinária desmineralizada mostrou igualmente uma atividade osteogênica (4,55). As moléculas da matriz dentinária são dois produtos derivados do *splicing* alternativo do gene da amelogenina de baixo peso molecular (30), identificadas na biblioteca de ADNc dos odontoblastos de incisivos de ratos (56). Essas moléculas são desprovidas de cisteínas e apresentam propriedades a princípio distintas daquelas dos membros da família de BMP-TGF (1;5). Frações comparáveis foram isoladas da dentina bovina, o que permitiu de determinar a função principal da amelogenina e de suas isoformas. Ao longo da amelogênese, a amelogenina desempenha um papel na organização tridimensional da matriz amelar, e contribui ao favorecimento da sua mineralização (40). As funções das amelogeninas dentinárias são perfeitamente desconhecidas.

Como na polpa, as implantações das micro-esferas controles não ocasionaram a expressão de marcadores da mineralização tais como a síntese da OPN, BSP, DSP ou a expressão de Sox9 pelas células recrutadas pelas esferas(19,20). Entretanto as esferas controles ocasionaram uma inflamação crônica, que não foi resolvida depois de 30 dias, contrariamente à polpa a qual, no dia 15, não havia mais inflamação (19,20).

A implantação das esferas de agarose impregnadas de A+4 e A-4 no tecido conjuntivo da mucosa bucal de camundongos ocasionou um recrutamento massivo de células CD45<sup>+</sup> como foi observado no grupo controle. Entretanto, o estudo fenotípico das células presentes nesse infiltrado ao redor das esferas implantadas mostra que somente

as esferas impregnadas de A+4 e A-4 são capazes de induzir a expressão de marcadores osteo-condrocitários. Na verdade, nos grupos A+4 e A-4 a marcação RP59 aparece no infiltrado celular ao redor das esferas logo no dia 3. No dia 8 e, sobretudo no dia 30, RP59 foi expresso pelo conjunto de células em contato das esferas. O fator de transcrição Sox9 foi expresso a partir do dia 30. Entretanto, as diferenças aparecem entre o grupo A+4 e A-4 para a expressão da OPN e da BSP. No grupo A+4 as células são BSP<sup>+</sup> no dia 8 e tornaram-se OPN<sup>+</sup> no dia 30. Porém, no grupo A-4 as células são OPN<sup>+</sup> a partir do dia 8 e exprimem BSP no dia 30. Esta diferença demonstra que A+4 e A-4 têm efeitos distintos. O efeito distinto entre os dois peptídeos foi mostrado precedentemente por um estudo *in vitro*, no qual A+4 estimulou a expressão de Sox9 pelos fibroblastos gengivais de ratos enquanto A-4 favoreceu a transcrição de Cbfa1 no mesmo tipo de cultura (56). Uma diferença foi também observada nas implantações na polpa: A+4 originou a mineralização da parte coronária do dente e a formação de uma ponte dentinária no dia 14 enquanto que A-4 estimulou a formação de uma dentina reparadora na parte coronária e ocasionou um fechamento completo da raiz no dia 30 (19, 20).

A capacidade de induzir a diferenciação de células osteo-condrogênicas em sítio ectópico já foi mostrado pela BMP (38) e por produtos do *splicing* do gene da amelogenina (30,56). Entretanto, contrariamente ao que foi mostrado depois do tratamento com a A+4 e A-4 sobre *explants* de polpa dental humana (23) ou nos tecido muscular de rato (56), as implantações de esferas impregnadas de A+4 ou A-4 na mucosa bucal de camundongos não permite a aparição de nódulos de mineralização. Esta particularidade é confirmada por esse estudo, pois a reação Von Kossa não mostrou nenhum nódulo de mineralização no dia 30, apesar da expressão de alguns marcadores da osteoblásticos.

Nossos resultados mostram que as células ao redor da micro-esfera A+4 e A-4 são fortemente CD45<sup>+</sup> qualquer que seja o tempo estudado e exprimem RP59 com uma intensidade crescente de 3 dias a 30 dias, principalmente para A-4. CD45 é expresso pelas células hematopoiéticas nucleadas e seus precursores (52). RP59 marca os precursores osteoblásticos e condrocitários da medula óssea (24,59). Estas células osteo-condrocitárias fazem parte do compartimento mesenquimatoso e são CD45<sup>-</sup> (36). A princípio, trata-se de marcadores opostos (10,24), como foi constatado nas marca feitas sobre as lâminas do baço.

A ligação entre as células hematopoiéticas e os osteoclastos é clara, pois estes últimos são originados da linhagem monócitos/ macrófagos (2), enquanto que os osteoblastos e os condroblastos têm por origem as células mesenquimatosas (35). Recentemente, os dados da literatura mostram que as células primitivas da medula óssea podem torna-se precursoras de células hematopoiéticas e mesenquimatosas (13,32). Também foi mostrado no rato que as células derivadas do baço produzem, em condições de cultura osteogênica (FGF-2 e dexametasona), uma matriz mineral com expressão de proteínas como a BSP, a osteocalcina (OCN), e também Cbfa1 e a fosfatase alcalina (2). Esses autores mostraram que algumas células do baço podem se diferenciar em osteoblastos, sob o efeito de fatores locais(2). Enfim, o trabalho de um grupo japonês mostrou que em



humanos uma linhagem de monócitos CD14<sup>+</sup> do sangue circulante pode se diferenciar em osteoblasto ou em condroblastos (25). Essas células foram chamadas *monocyte-derived mesenchymal progenitor* (MOMP) e funcionam como células troncos mesenquimatosas capazes de dar, segundo o estímulo, um fenótipo osteoblástico, mioblástico, adipocitário ou condrocitário. Assim, nossos resultados sugerem que as células recrutadas pelas micro-esferas e que provêm do compartimento hematopoiético são capazes, quando estimuladas por moléculas como a A+4 ou A-4 de se diferenciar num fenótipo osteo-condrocitário. Esta hipótese é confirmada pela expressão progressiva ao longo do tempo de marcadores como Sox9, OPN ou BSP.

## V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em conclusão, esses resultados sugerem que as moléculas A+4 e A-4 implantadas em sítio ectópico são capazes de induzir a diferenciação osteo-condrocitária de células do sangue circulante exprimindo um marcador leucocitário. Numerosos trabalhos recentes se interessaram a caracterização das células troncos medulares e ao estudo de sua capacidade de diferenciação em direção a linhagens hematopoiéticas ou mesenquimatosas. Esses resultados se inscrevem nos tipos de trabalhos que tratam da plasticidade de células diferenciadas. Estudos complementares serão necessários para identificar o potencial de diferenciação funcional dessas células. Assim, será interessante de prosseguir esse estudo em longo prazo a fim de avaliar se os marcadores de diferenciação terminais dos condrocitos ou dos osteoblastos tais como o colágeno tipo II, a fosfatase alcalina ou a OCN, são expressos por essas células e se a obtenção de uma mineralização matricial será possível. Será necessário também trabalhar com diferentes concentrações de amelogenina, pois uma variação desse parâmetro pode modificar a via de diferenciação celular.

A engenharia tecidual utiliza e manipula a capacidades de regeneração do organismo. Em relação aos tecidos mineralizados, a perspectivas é de avaliar o potencial de regeneração dentinária estudando a plasticidade de células pulpares e as condições que permitem uma diferenciação osteo-condroblástica.

## BIBLIOGRAFIA

- AMAR S., SIREB B., SABSAY B., CLOHISY J. and VEIS A. (1991). The isolation and partial characterization of a rat incisor dentin matrix polypeptide with chondrogenic activity. *J Biol Chem* 266: 8609-8618.
- ASH P, LOUTIT J.F and TOWNSEND K.M. (1980). Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. *Nature* 283:669-70.
- AZEVEDO C.L., MARQUES M.M. and BOMBANA A.C. (2003). Cytotoxic effects of cyanoacrylates used as retrograde filling materials. An in vitro analysis. *Pesqui Odontol Bras* 17: 113-118.
- BANG G. and URIST M.R. (1967). Bone induction in excavation chambers in matrix of decalcified dentin. *Arch Surg* 94: 781-789.

- BESSHO K., TANAKA N., MATSUMOTO J., TAGAWA T. and MURATA M. (1991). Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 70: 171-17.
- BI W., DENG J.M., ZHANG Z., BEHRINGER R.R. and de CROMBRUGGHE B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22: 85-9.
- BRAVO, R. (1986). Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res* 163: 287-93.
- BRAVO, R. and MACDONALD-BRAVO, H. (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 105(4): 1549-54.
- CHEN J.L., HUNT P., MCELVAIN M., BLACK T., KAUFMAN S. and CHOI E.S. (1997). Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow. *Stem Cells* 15: 368-77.
- CHEN Y.J., WURTZ T., WANG C.J., KUO Y.R., YANG K.D., HUANG H.C. and WANG F.S. (2004). Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res* 22(3):526-34.
- COCHRAN D.L., KING G.N., SCHOOLFIELD J., VELASQUEZ-PLATA D., MELLONIG J.T. and JONES A. (2003). The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as determined by histological analyses. *J Periodontol* 74: 1043-1055.
- DECUP F., SIX N., PALMIER B., BUCH D., LASFARGUES J.J., SALIH E. and GOLDBERG M. (2000). Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig* 4: 110-119.
- DERUBEIS A.R., MASTROGIACOMO M., CANCEDDA R. and QUARTO R. (2003). Osteogenic potential of rat spleen stromal cells. *Eur J Cell Biol* 82(4):175-81.
- DUCY P. (2000) Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Den Dyn* 219: 461-471.
- FINCHAM A.G., MORADIAN-OLDAK J., SIMMER J.P., SARTE P., LAU E.C., DIEKWISCH T. and SLAVKIN H.C. (1994). Self-assembly of a recombinant amelogenin protein generates supramolecular structures. *J Struct Biol* 112 :103-9.
- FISHER L.W., MSBRIDE O.W. and TERMINE J.D. (1990). Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J Biol Chem* 265: 2347-2351.
- FISHER L.W., TORCHIA D.A., FOHR M.F., YOUNG M.F. and FEDARKO N.S. (2001). Flexible structures of SIBILING proteins, bone sialoprotein and osteopontin. *Biochem Biophys Res Com* 280: 460-465.
- FISHER L.W., WHITSON S.W. AVIOLI L.V. and TERMINE J.D. (1983). Matrix sialoprotein of developing bone. *J Biol Chem* 258:12723-12727.
- GOLDBERG M., SIX N., DECUP F., BOURD K., PALMIER K., SALIH E., VEIS A. et LASFARGUES J.J. (2002). Minéralisation de la pulpe dentaire : apports de l'ingénierie tissulaire aux thérapeutiques de demain odontologie. *Pathol Biol* 50: 194-203.
- GOLDBERG, M., SIX N., DECUP F., LASFARGUES J.J., SALIH E., THOPKINS K. and VEIS A. (2003). Bioactives molecules and the future of pulp therapy. *Am J Dent* 16: 66-76.
- GROTHOS S., MANKANI M., BRAHIM J., ROBEY P.G. and SHI S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13625-13630.
- HAMMARSTRÖM L. (1997). Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* 24: 658-668.

- JEGAT N. (2003). Effets de l'implantation d'amelogenine sur la pulpe de molaires de rats et des cellules pulpaires humaines en culture. Mémoire du D.E.A., Université Paris 5.
- KRÜGER A., ELLERSTRÖM C., LUNDMARK C., CHRISTERSSON C. and WURTZ T. (2002). RP59, a marker for osteoblast recruitment, is also detected in primitive mesenchymal cells, erythroid cells, and megakaryocytes. *Dev Dyn* 223: 414-418.
- KUWANA M., OKAZAKI Y., KODAMA H., IZUMI K., YASUOKA H., OGAWA Y., KAWAKAMI Y. and IKEDA Y. (2003). Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukocyte Biol* 74: 833-845.
- LACERDA-PINHEIRO S.F., PINHEIRO JR R.F.F. (2003). Rapport de Stage de MSBM. Laboratoire de Biologie et Physiopathologie Cranio-Faciales, responsable Chardin H.
- LANGER R. and VACANTI J.P. (1993). Tissue engineering. *Science*. 260: 920-6.
- LAU E., MOHANDAS T., SHAPIRO L., SLAVIKIN H. and SNEAD M. (1989). Human and mouse amelogenine gene loci are on the sex chromosomes. *Genomics* 4: 162-168.
- NAKASHIMA M. (1990). The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. *Arch Oral Biol* 35: 277-281.
- NEBGEN D.R., INOUE H., SABSAY B., WEI K., HO C.S. and VEIS A. (1999). Identification of the chondrogenic-inducing activity from bovine dentin (bCIA) as a low-molecular-mass amelogenin polypeptide. *J Dent Res* 78: 1484-1494.
- NG L.J., WHEATLEY S., MUSCAT G.E., CONWAY-CAMPBELL J., BOWLES J., WRIGHT E., BELL D.M., TAM P.P., CHEAH K.S. and KOOPMAN P. (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 183:108-21.
- OLMSTED-DAVIS E.A., GUGALA Z., CAMARGO F., GANNON F.H., JACKSON K., KIENSTRA K.A., SHINE H.D., LINDSEY R.W., HIRSCHI K.K., GOODELL M.A., BRENNER M.K. and DAVIS A.R. (2003). Primitive adult haematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:15877-82.
- PAPAGERAKIS P., MACDOUGALL M., HOTTON D., BAILLEUL-FORESTIER I., OBOEUF M. and BERDAL A. (2003). Expression of amelogenin in odontoblasts. *Bone* 32: 228-40.
- PIETTE E., GOLDBERG M. (2001). *La Dent*, Paris, ed. De Boeck, p386
- PITTENGER M.F., MACKAY A.M., BECK S.C., JAISWAL R.K., DOUGLAS R., MOSCA J.D., MOORMAN M.A., SIMONETTI D.W., CRAIG S and MARSHAK D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-7
- REYES-BOTELLA C., MONTES M.J., VALLECILLO-CAPILLA M.F., OLIVARES E.G. and RUIZ C. (2002). Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem* 12: 359-64.
- RUTHEFORD R. B., WAHLE J., TUCKER M., RUEGER D. and CHARETTER M. (1993). Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 38: 571-576.
- SAMPATH T.K., MALIAKAL J.C., HAUSCHKA P.V., JONES W.K., SASAK H., TUCKER R.F., WHITE K.H., COUGHLIN J.E., TUCKER M.M. and PANG R.H. (1992). Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vivo. *J Biol Chem* 267: 20352-62.
- SCHWARTZ Z., SOMERS A., MELLONIG J.T., CARNES D.L. JR, DEAN D.D., COCHRAN D.L. and BOYAN B.D. (1998). Ability of commercial demineralized freeze-dried bone

- allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *J Periodontol* 69: 470-478.
- SIMMER JP. (1995). Alternative splicing of amelogenins. *Connect Tissue Res* 32: 131-136.
- SIX N., DECUP F., LASFARGUES J-J., SALIH E. and GOLDBERG M. (2002). Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J Mat Sci Mat Med* 13: 225-232.
- SIX N., LASFARGUES J.J. and GOLDBERG M. (2002). Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Biol* 47: 177-187.
- SIX N., TOMPKINS K., SEPTIER D., VEIS A. and GOLDBERG M. (2004) Recruitment and characterization of the cells involved in reparative dentin formation in the exposed rat molar pulp after implantation of amelogenin gene splice products A+4 and A-4. *Oral Biosciences & Medicine* 1: 35-44.
- SMITH A.J., TOBIAS R.S., CASSIDY N., PLANT C.G., BROWNE R.M., BEGUE-KIRN C., RUCH J.V. and LESOT H. (1994). Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Arch Oral Biol* 39: 13-22.
- STANISLAWSKI L., CARREAU J.P., POUCHELET M., CHEN Z.H. and GOLDBEG M. (1997). In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cells emerging early from the explant. *Clin Oral Investig* 1: 131-140.
- STEINMAN R.M. (1991). The dendritic cells system and its role in immunogenesis. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296.
- TAKATA T., D'ERRICO J.A., ATKINS K.B., BERRY J.E., STRAYHORN C., TAICHMAN R.S. and SOMERMAN M.J. (1998). Protein extracts of dentin affect proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in vitro. *J Periodontol* 69: 1247-125.
- TAKEDA K., OIDA S., GOSEKI M., IIMURA T., MARUOKA Y., AMAGASA T. and SASAKI S. (1994). Expression of bone morphogenetic protein genes in the human dental pulp cells. *Bone* 15: 467-70.
- TAKEDA K., OIDA S., ICHIJO H., IIMURA T., MARUOKA Y., AMAGASA T. and SASAKI S. (1994). Molecular cloning of rat bone morphogenetic protein (BMP) type IA receptor and its expression during ectopic bone formation induced by BMP. *Biochem Biophys Res Com* 204: 203-9.
- THESLEFF I., VAAHTKARI A., VAINIO S. and JOWETT A. (1996). Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development. *Anat Rec* 245: 833-8.
- TOYONO T., NAKASHIMA M., KUHARA S. and AKANIME A. (1997). Expression of TGF-superfamily receptors in dental pulp. *J Dent Res* 76: 1555-60.
- TROWBRIDGE I.S. and THOMAS M.L. (1994). CD45/ an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12: 85-116.
- TZIAFAS D., SMITH A.J. and LESOT H. (2000). Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 28: 77-92.
- URIST M.R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899.
- URIST M.R., MIZUTANI H., CONOVER M.A., LIETZE A. and FINERMAN G.A. (1982). Dentin, bone, and osteosarcoma tissue bone morphogenetic proteins. *Prog Clin Biol Res* 101: 61-81.
- VEIS A., TOMPKINS K., ALVARES K., WEI K., WANG L., WANG X.S., BROWNELL A.G., JENGH S.M. and HEALY K.E. (2000). Specific amelogenin gene splice products have

signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. *J Biol Chem* 275: 41263-41272.

WANG J. and GLIMCHER M.J. (1999). Characterisation of matrix-induced osteogenic in rat calvarial bone defects: I. Differences in the cellular response to desmineralized bone matrix implanted in calvarial defects and in subcutaneous sites. *Calcif Tissue Int* 65: 156-65.

WANG J., KENNEDY J.G., GLIMCHER M.J. and SALIH E. (1999). Novel bioactive property of purified native bone sialoprotein in bone repair of cranial defect. *Orthopaedic Trans* 22: 951.

WURTZ T., KRÜGER A., CHRISTERSSON C. and LUNDMARK C. (2001) A new protein expressed in bone marrow cells and osteoblasts with implication in osteoblast recruitment. *Exp Cell Res* 263, 236-242.

ZANDER H.A. (1939).Reaction of the pulp to calcium hydroxide. *J Dent Res* 18: 373-379.