

## EXTRAÇÃO DE TGF-B1 PARA O FUTURO DESENVOLVIMENTO DE UM DESSENSIBILIZANTE DENTINÁRIO BIOLÓGICO

**ROSA, Wellington Luiz de Oliveira<sup>1</sup>; SILVA, Adriana Fernandes<sup>2</sup>; DEMARCO, Flávio Fernando<sup>3</sup>; PIVA, Evandro<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Curso de Odontologia (UFPel). [wellington\\_xy@hotmail.com](mailto:wellington_xy@hotmail.com); <sup>2</sup> Departamento de odontologia restauradora. [adrisilvapiva@gmail.com](mailto:adrisilvapiva@gmail.com); <sup>3</sup> Departamento de odontologia restauradora. [ffdemarco@gmail.com](mailto:ffdemarco@gmail.com); <sup>4</sup> Departamento de odontologia restauradora. [evpiva@gmail.com](mailto:evpiva@gmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

Atuando em vários processos celulares, como na proliferação e diferenciação das células, os fatores de crescimento exercem um papel central na regulação das reações de defesa do complexo dentino-pulpar (PIATTELLI et al., 2004). Na morfogênese dentária, por exemplo, a sinalização da proteína TGF- 1, um desses fatores, é vital para mediar interações entre o epitélio e o tecido mesenquimal (FARGES et al., 2003) Ele tem sido sugerido na regulação do desenvolvimento dentário, ficando sequestrado na dentina, onde pode ser liberado durante processos que levam a dissolução de minerais da matriz dentinária (PAAKKONEN et al., 2007).

Recentemente, Kalyva, Papadimitriou e Tziafas (2010) avaliaram os efeitos desses fatores nos processos de formação de dentina terciária e na mineralização intratubular após sua aplicação em cavidades de dentes de cães. O TGF- 1 mostrou os melhores resultados em ambos os processos, evidenciando a importância dessa proteína também na mineralização dos túbulos dentinários (KALYVA; PAPADIMITRIOU; TZIAFAS, 2010). A presença de fatores de crescimento na matriz dentinária fornece um potente reservatório de moléculas bioativas, que podem ser capazes de influenciar o comportamento celular do complexo dentino-pulpar (LUCCHINI et al., 2002; PIATTELLI et al., 2004).

Enquanto isso, um dos principais objetivos no tratamento da hipersensibilidade dentária se baseia no princípio de selamento dos túbulos dentinários, que impede o movimento do fluido no interior da dentina e não permite que haja estímulo às fibras nervosas pulpares que causam a dor (CIANCIO, 1986). Contudo, a maioria dos dessensibilizantes dentinários que obliteram os túbulos não se adere adequadamente à superfície da dentina, possuindo efeitos apenas temporários (ORCHARDSON; GILLAM, 2006).

Baseado nesse princípio, o TGF- 1 (Fator de Crescimento Transformador Beta 1), seria uma molécula de grande importância a ser usada em um dessensibilizante dentinário biológico, já que ao promover a mineralização intratubular da dentina, seria possível obter um resultado efetivo para o problema. Com base nisso, esse projeto foi dividido em duas fases, sendo que a primeira visou a extração de TGF- 1 da dentina de dentes humanos hígidos; e a segunda o desenvolvimento de um novo dessensibilizante biológico a partir de um hidrogel, que funcionaria como sistema de liberação para o TGF- 1.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foi realizada a primeira fase do projeto, que consiste na extração de TGF-1 da dentina de dentes humanos hígidos com posterior confirmação da sua presença por meio de *western blotting*. Dentes humanos não cariados foram coletados da clínica de Cirurgia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia (UFPel), sendo removidos o tecido mole e a polpa, assim como o cimento e o esmalte. As secções de dentina foram pulverizadas e o pó de dentina foi extraído com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% contendo inibidores de protease (Fluoreto de sulfonil fenilmetil e n-etilmaleimida). Para trocar o EDTA, a mistura de dentina com EDTA foi centrifugada e o sobrenadante retirado. O extrato do sobrenadante sofreu então diálise e foi liofilizado.

Do extrato liofilizado, foram realizadas várias concentrações das amostras a fim de otimizar os resultados. Duas amostras principais, uma a 37,5% (37,5mg do extrato liofilizado + 80µl de PBS + 20µl de tampão da amostra) e outra a 50% (25mg do extrato liofilizado + 20µl de PBS + 5µl de tampão de amostra), foram preparadas. Volumes diferentes (de 1,5µl até no máximo 10µl) das amostras foram carregadas para um pré-preparado gel de poli(acrilamida) a 12% (Tab. 1).

Tabela 1 - Concentrações variadas da amostra aplicadas no gel I da Fig. 1

Poços	Concentrações
I	5µl do padrão molecular ( <i>BenchMark Protein Ladder, Invitrogen</i> )
II	1,5µl da amostra a 37,5%
III	5µl da amostra a 37,5%
IV	10µl da amostra a 37,5%

Tabela 2 - Concentrações variadas da amostra aplicadas no gel da Fig. 2

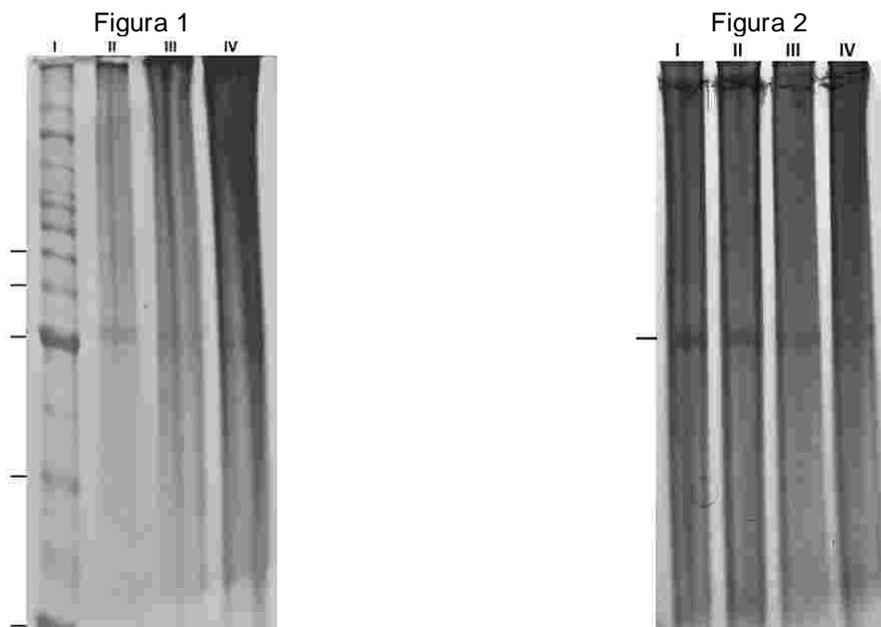
Poços	Concentrações
I	5µl da amostra a 37,5%
II	5µl da amostra a 37,5%
III	5µl da amostra a 50%
IV	5µl da amostra a 50%

As amostras foram, então, submetidas a eletroforese por 1h a 150V e 45mA em um sistema de separação protéica (Mini-PROTEAN 3 System, Bio-Rad Laboratories Inc.), que separou as proteínas por peso molecular no gel (Fig. 1 e Fig. 2). Com a finalidade de fazer as proteínas acessíveis à detecção do anticorpo, a amostra a 50% foi movida do gel para uma membrana de PVDF (*BioAgency*). A transferência para a membrana ocorreu por 1 hora a 100V usando Biorad Miniblot System (Bio-Rad Laboratories, Cambridge, MA), sendo que a membrana sofreu bloqueio com leite desnatado e foi incubada com anticorpo policlonal TGF-1 (*Santa Cruz Biotechnology Inc.*). A detecção foi realizada com DAB (Diaminobenzidina). A metodologia utilizada foi baseada em artigos publicados (WISE; FAN, 1991, TORRES et al., 2006).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O TGF-1 está envolvido na regulação da diferenciação dos odontoblastos e formação de dentina, além de ser um potente regulador das respostas pró-inflamatórias e reações de defesa no complexo dentinho-pulpar (UNTERBRINK et al., 2002; PIATTELLI et al., 2004). Normalmente, ele fica

armazenado na matriz dentinária e, quando a dentina está sendo destruída por cáries, se difunde pelos túbulos dentinários até chegar na polpa (FARGES et al., 2003).



**Figura 1:** Gel referente às concentrações da Tab. 1. O padrão molecular mostra os seguintes pesos moleculares (de cima para baixo): 70kDa, 60kDa, 50kDa, 25kDa e 10 kDa. Foi encontrada marcação da amostra nos poços II, III e IV entre 50kDa e 60kDa.

**Figura 2:** Gel referente às concentrações da Tab. 2. Encontrada marcação da amostra em todos os poços entre 50 e 60kDa. A amostra do poço III foi transferida para membrana de PVDF (BioAgency), mostrada na Fig. 3.

Nos testes realizados na primeira fase do projeto, após detecção imunistoquímica com o anticorpo para TGF- 1, foi encontrada marcação na membrana de PVDF (*BioAgency*) na altura de aproximadamente 56kDa na amostra de 50% (Fig. 3), semelhante ao encontrado em um estudo de Mozes, Hodics e Kopp (1999), que avaliou por *western blotting* a especificidade dos anticorpos para fatores de crescimento. A marcação encontrada na membrana de PVDF é compatível com a observada no gel de poliacríamida a 12% (Fig. 1 e Fig. 2).



**Figura 3:** Marcação na membrana de PVDF referente à amostra a 50% após detecção com DAB.

Mais estudos são ainda necessários para que sejam feitos o controle positivo e negativo da primeira fase, confirmando a presença de TGF- 1 na amostra. Além disso deve ocorrer a quantificação da proteína obtida, para que assim possa ser empregada em outras metodologias na área da biotecnologia pulpar. Na literatura não há informações referentes à extração de TGF- 1 da matriz dentinária, tanto de dentes humanos como de outras espécies.

A segunda fase do projeto a ser desenvolvida consiste na preparação de um hidrogel de alginato para servir de *delivery system* para o TGF- 1. Isso possibilitará a verificação de seu uso em um novo dessensibilizante dentinário biológico com resultados efetivos para a obliteração dos túbulos. Além disso, em *scaffolds* já foi demonstrada a ação do TGF- 1 em induzir a formação de dentina e a diferenciação dos odontoblastos da polpa (LI et al., 2011). O emprego desse fator de crescimento é também importante na área de engenharia tecidual e em estudos de

cultivo celular. Ele pode ainda integrar materiais restauradores possibilitando novas formas de tratamento.

#### 4 CONCLUSÃO

Com a realização da primeira fase do projeto, foram encontradas evidências da presença de TGF- 1 na amostra de dentina, sendo que mais estudos ainda devem ser feitos para otimizar os resultados, juntamente com o desenvolvimento do novo dessensibilizante dentinário biológico.

#### 5 REFERÊNCIAS

- CIANCIO, S. G. Delivery systems and clinical significance of available agents for dentinal hypersensitivity. **Endod Dent Traumatol**, v.2, n.4, p.150-2, 1986
- FARGES, J. C.; ROMEAS, A.; MELIN, M.; PIN, J. J.; LEBECQUE, S.; LUCCHINI, M.; BLEICHER, F. ; MAGLOIRE, H. TGF-beta1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer. **J Dent Res**, v.82, n.8, p.652-6, 2003.
- KALYVA, M.; PAPADIMITRIOU, S.; TZIAFAS, D. Transdentinal stimulation of tertiary dentine formation and intratubular mineralization by growth factors. **Int Endod J**, v.43, n.5, p.382-92, 2010
- LI, Y.; LU, X.; SUN, X.; BAI, S.; LI, S.; SHI, J. Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF-beta1. **Arch Oral Biol**, 2011.
- LUCCHINI, M.; ROMEAS, A.; COUBLE, M. L.; BLEICHER, F.; MAGLOIRE, H. ; FARGES, J. C. TGF beta 1 signaling and stimulation of osteoadherin in human odontoblasts in vitro. **Connect Tissue Res**, v.43, n.2-3, p.345-53, 2002
- MOZES, M. M.; HODICS, T. ; KOPP, J. B. Isoform specificity of commercially-available anti-TGF-beta antibodies. **J Immunol Methods**, v.225, n.1-2, p.87-93, 1999.
- ORCHARDSON, R.; GILLAM, D. G. Managing dentin hypersensitivity. **J Am Dent Assoc**, v.137, n.7, p.990-8; quiz 1028-9, 2006
- PAKKONEN, V.; VUORISTO, J.; SALO, T. ; TJADERHANE, L. Effects of TGF-beta 1 on interleukin profile of human dental pulp and odontoblasts. **Cytokine**, v.40, n.1, p.44-51, 2007.
- PIATTELLI, A.; RUBINI, C.; FIORONI, M.; TRIPODI, D. ; STROCCHI, R. 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, 2004.
- TORRES, C. B.; GOES, V. S.; GOES, A. M.; PACIFICO, L. G.; SILVA, G. A.; JUNIOR, N. L. ; ALVES, J. B. Fibroblast growth factor 9: cloning and immunolocalisation during tooth development in *Didelphis albiventris*. **Arch Oral Biol**, v.51, n.4, p.263-72, 2006.
- UNTERBRINK, A.; O'SULLIVAN, M.; CHEN, S.; MACDOUGALL, M. TGF beta-1 downregulates DMP-1 and DSPP in odontoblasts. **Connect Tissue Res**, v.43, n.2-3, p.354-8, 2002.
- WISE, G. E. ; FAN, W. Immunolocalization of transforming growth factor beta in rat molars. **J Oral Pathol Med**, v.20, n.2, p.74-80, 1991.