Avaliação da eficácia de três marcadores imunoistoquímicos envolvidos nos diferentes tempos da cicatrização da ferida cirúrgica

Comparative efficacy of immunohistochemical markers in surgical healing evaluation

Octávio Antônio Azevedo da Costa Filho, ACBC-PR; Jurandir Marcondes Ribeiro Filho, TCBC-PR; Bruno Luiz Aríde; Tereza Cavalcanti; João Guilherme Seifert Scapini; Camila Vitola Pasetto.

INTRODUÇÃO

O aprimoramento das investigações no processo de cicatrização tecidual tem levado a novos rumos. Um deles é interpretá-lo através da imunologia que investiga as reações tissulares e bioquímicas intrínsecas na reparação da agressão tissular. Contudo, ainda são poucos os estudos que usam marcadores imunoistoquímicos para esta finalidade, abrindo-se assim caminho profícuo para o desenvolvimento da pesquisa cirúrgica. Dos marcadores reconhecidos com esse potencial destacam-se três: metaloproteínas e metaloproteína da matriz 9 (MMP-9), fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) e miofibroblasto e alfa actina de músculo liso (α-AML).

As metaloproteínas (MMPs) formam uma família de endopeptidases Zn^{2+} dependente, que promovem a degradação da matriz extracelular, podendo também ser chamadas de matrixinas. Todos os membros dessa família são secretados como pró-enzimas liberadas por neutrófilos, monócitos, macrófagos e fibroblastos. Também podem ser secretadas pelas células tumorais em resposta a vários estímulos. O primeiro relato sobre as metaloproteínas foi publicado em 1962 por Gross e Lapière que encontraram uma enzima ativa em cultura de pele que degrava colágeno tipo I.

O fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) e seu papel na cicatrização é tema mais recente. Desmouliér et al., em 1993, demonstraram que o TGF-β apresenta importante papel na diferenciação miofibroblástica durante os fenômenos fibrocontrativos e cicatriciais, por regular a expressão de α-AML nestas células. Por sua vez, o TGF-β1 é regulador multifuncional do crescimento e diferenciação celular durante desenvolvimento e reparação, influenciando a síntese de componentes da matriz extracelular, como colágenos, fibronectina, laminina e glicosaminoglicanas. Além disso, é importante modulador da síntese de receptores de membrana, as integrinas, aumentando assim a interação célula-célula e célula-matriz. O TGF-β1 é provavelmente o fator de crescimento mais importante na indução da α-AML. Já o α-AML não se mostrou um bom sinalizador da evolução da reparação tissular.

Descritores: Cicatrização. Cirurgia Geral. Imuno-Histoquímica. Fatores de Crescimento de Fibroblastos.

RESUMO

Objetivo: avaliar a eficácia de três marcadores imunoistoquímicos envolvidos no processo de cicatrização de ferida cirúrgica. Métodos: estudo experimental em 40 ratos da raça Wistar, dos marcadores metaloproteínas e metaloproteína da matriz 9 (MMP-9), fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) e miofibroblasto e alfa actina de músculo liso (α-AML), estudados a partir de fragmentos de cicatriz cirúrgica de incisão abdominal envolvendo pele, aponeurose e peritônio. Os animais foram distribuídos em quatro subgrupos de dez de acordo com o dia da morte, programada em três, sete, 14 e 21 dias. Resultados: na expressão da MMP-9 ocorreu aumento progressivo de sua concentração, mais evidente do 7º ao 14º dias variando a imuno-expressão tecidual entre 2,65% e 11,50%. TGF-β mostrou expressão em nível alto no 3º dia, caiu no 7º, voltando a subir no 14º, com pequena queda no 21º dia variando a imuno-expressão tecidual entre 0,03% e 2,92%. A α-AML apresentou níveis com pouca variação e discreto aumento variando a imuno-expressão tecidual entre 0,88% e 3,23%. Conclusão: a MMP-9 se apresentou como melhor marcador, seguido pela TGF-β. Já o α-AML não se mostrou um bom sinalizador da evolução da reparação tissular.
dos, onde possuem função constitutiva e mecânica, bem como, estão presentes em diversas condições patológicas. Eles tem papel fundamental no fenômeno de retração da ferida, e na síntese e secreção de proteínas da matriz extracelular. Os principais microfilamentos que compõem o citoplasma da célula miofibroblastica contêm actina e/ou desmina e proteínas associadas às células de músculo liso, sendo principalmente caracterizada pela presença da isoforma α-actina de músculo liso, tipicamente localizada nas células musculares lisas da parede de vasos sanguíneos.

O objetivo da pesquisa foi avaliar a eficácia de três marcadores imunoistoquímicos envolvidos no processo de cicatrização da ferida operatória.

MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Instituto de Pesquisas Médicas do Programa de Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia da Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba.

Foram utilizados 40 ratos (Rattus norvergicus albinus, Rodentia mammalia) da linhagem Wistar, machos, adultos com três meses de idade e peso variando de 250-300 g. Eles foram subdivididos em quatro subgrupos de dez com morte programada em três, sete, 14 e 21 dias. Os animais permaneceram em condições claro/escuro por 12 h com temperatura estável. Foram acondicionados em gaiolas, e nutridos com ração própria para a espécie e água ad libitum. Para o procedimento operatório ficaram em jejum pré-operatório de 12h. A anestesia foi feita com ketamina 10% e cloridrato de xilazina 2%. Após anestesiado e fixado pelas extremidades, foi realizada tricotomia da parede abdominal ventral e antissepsia local com iodo polipovidona a 10%. O procedimento cirúrgico iniciou-se pela incisão cutânea abdominal igualmente feita em todos os 40 animais para exposição da linha alba em 7cm. Em seguida foi incisada a aponeurose até o peritônio em 6cm. O fechamento da aponeurose e do peritônio foi realizado com sutura de polipropileno continua e a pele com mononáilon, ambos 5-0.

Os animais foram repostos nas mesmas condições de alojamento do pré-operatório e anotados a data do procedimento e o cronograma da morte programada em cada subgrupo de dez. Usou-se para analgesia pós-operatória paracetamol 200mg/ml via oral na dose de 40 gotas para cada 50ml de água durante 48h. Todos tiveram avaliação da ferida diariamente. Obedecendo o cronograma de avaliação foram mortos por injeção intraperitoneal de anestésicos no dobro da dose usada para a anestesia. Confirmada a morte, foi analisada a parede abdominal para verificar eventuais complicações como hematomata, infecção, dessecação de sutura e aderências. A seguir, fez-se incisão da pele e subcutâneo no sentido crânio caudal, com secção da totalidade da parede ventral em 8x6 cm, interessando toda incisão. A avaliação macroscópica considerou a ocorrência de complicações como presentes ou ausentes.

AVALIAÇÃO PELOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

Preparo para análise imunoistoquímica

Usou-se a técnica padronizada de micro arranjo tecidual (Tissue Micro Array - TMA) no ponto médio da cicatriz, padrão em todos os animais, e realizado bloco doador parafinado. As amostras para análise foram retiradas com instrumento cortante (punch) resultando em cilindros de tecido de 4mm de diâmetro com toda a espessura da parede abdominal. Os cilindros foram introduzidos em bloco receptor e cada amostra foi marcada em planilha da forma de eixos X e Y conseguindo-se um bloco receptor com dez amostras independentes que sofreram preparo histológico sequencial numerados em lonas com adesivo para múltiplas reações. Cada bloco receptor continha um subgrupo com dez amostras correspondentes à morte programada em três, sete, 14 e 21 dias.

Preparo para coloração imunoistoquímica

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo com espessura de 3μm e distendidos em lâminas histológicas previamente preparadas com Organosilano (Sigma-Aldrich A3648) com o intuito de promover maior aderência dos cortes às lâminas, evitando a perda do material durante o procedimento imunoistoquímico. As lâminas foram estocadas em estufa com temperatura entre 55 e 58°C por 24h, e transferidas para cubas de vidro vertical para iniciar o processo.

Rev. Col. Bras. Cir. 2017; 44(4): 367-373
A desparafinização foi realizada com dois banhos em xilol de 30min cada em temperatura ambiente e realizado com passagens em álcool 95º, em álcool absoluto (três vezes de três min), álcool 95º e álcool 85º. O bloqueio da peroxidase endógena (bloqueio dos radicais livres provenientes do fixador) foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% (para diluir o peróxido em metanol) e lavado com água destilada.

A recuperação antigênica pelo calor foi feita como objetivo de permitir a liberação dos epitopos antígenicos do tecido. As lâminas foram mergulhadas no recuperador ImunoRetriver (Dako®) à cuba de banho-maria à 99º C por 40min, deixado esfriar à temperatura ambiente. Realizou-se lavagem em água destilada identificando-se lâmina por lâmina com caneta hidrofóbica Dako pen (Dako®). Delimitou-se a área do corte antes de pingar as aliquotas de anticorpos e deixou-se em tampão TBS tris pH 7.3, para evitar que o corte secasse.

Na sequência, pingou-se as aliquotas de anticorpos primários monoclonais MMP-9, TGF-β e α-AML e levou-se para câmara úmida por 18 h à 4ºC (overnight). Foram lavadas as lâminas em tampão TBS tris pH 7.3 e deixado por 15 min. Novamente lavado em tampão, e quando seco pingou-se Advance link (Dako®) e aguardou-se por 30 min. Nova lavagem em tampão e pingou-se Advanceenzyme (Dako®), ligante secundário (marcador) e deixado por 30min.

As lâminas foram lavadas em tampão. Após consideradas secas, foi adicionado o cromogênio DAB (1:1), marcador, até a visualização da cor castanha e lavou-se rápido em água destilada. A seguir, foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 5min, para fundo de imagem; lavadas em água de torneira e aguardados 5min; desidratadas com álcool etílico absoluto (3x1 min); disfaniizadas com xilol (3 x 5min); e realizada a montagem.

Leitura das lâminas

As lâminas imunomarcadas foram submetidas à leitura, através de microscópio óptico Olympus® BX50 (Tóquio, Japão), acoplado a câmera de vídeo Dinoeye e a computador com software de análise de imagem ImagePro Plus™ (Maryland, USA). Foram capturadas quatro imagens em Campo de Grande Aumento (CGA=400x), com área total de 115226,1μm² e resolução de 1024x768 pixels. O controle positivo da reação foi digitalizado e uma imagem em CGA foi escolhida como máscara, contendo a positividade adequada para o biomarcador escolhido. A máscara foi então sobreposta às imagens digitais dos casos. Baseado na imunopositividade ideal da máscara, o software encontrou as áreas imunopositivas nas amostras do estudo transformando este dado em área imunopositiva por micrômetro quadrado (μm²). A área em μm² gerada por este método foi então dividida pela constante 115.226,1μm² que é a área total do campo avaliado, gerando porcentagem de área imunopositiva por CGA. A porcentagem média em quatro CGA foi calculada para cada caso.

Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas através das estatísticas de média e desvio-padrão. Para comparação dos momentos dois a dois, foi considerado o teste t de Student para amostras independentes, considerando-se o modelo de análise de variância para estimar a variância dentro dos momentos de avaliação. Para manutenção do nível de significância global foi considerado o procedimento de Bonferroni. No caso de rejeição da hipótese de normalidade foi investigada transformação nos dados que permitisse atender a referida condição. Para a comparação dos momentos de avaliação, dentro de cada subgrupo, em relação à classificação de hematoma, deiscência e aderência, foi considerado o teste de qui-quadrado. Para a comparação dos grupos em cada momento de avaliação, em relação à classificação de aderência, foi usado o teste exato de Fisher. Para a análise da variância do tipo de colágeno e sua concentração foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de p menores do que 0,05 indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.

RESULTADOS

Avaliação macroscópica

Nenhum animal morreu do procedimento como também não ocorreu infecção e deiscência de sutura. Um animal do subgrupo de três dias apresentou hematoma, sem significância estatística (p=1). Em relação às aderências, utilizou-se os parâmetros de Gonçalves et al.13, que as classifica quanto a sua intensidade (Tabela 1).
Costa Filho

Avaliação da eficácia de três marcadores imunoistoquímicos envolvidos nos diferentes tempos da cicatrização da ferida cirúrgica

Foram observadas somente as aderências de intensidade 1 (Tabela 2).

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA**

**Metaloproteinase da Matriz 9 (MMP-9)**

Na expressão da MMP-9, no acompanhamento evolutivo, ocorreu aumento progressivo de sua concentração, mais evidente do sétimo ao 14º dia, com menor progressão até o 21º, com significância estatística ao 3º, 7º e 21º dia (Tabela 3).

A expressão de MMP-9 foi observada em todos os casos das amostras variando a sua imunoexpressão tecidual entre 2,65% e 11,50% (Figura 1).

**Fator de Transformação Crescimento Beta (TGF-β)**

Em relação ao TGF-β, sua expressão mostrou nível alto ao 3º dia, caiu no 7º, voltando a subir no 14º, com pequena queda no 21º dia com significância estatística aos 14º e 21º dia (Tabela 4).

A expressão de TGF-β foi observada em todos os casos variando a sua imunoexpressão tecidual entre 0,03% e 2,92% (Figura 2).

**Alfa-Actina do músculo liso (α-AML)**

Como resultado, a expressão de α-AML apresentou níveis pouco variáveis na série com discreto aumento do 3º para o 7º dia; discreto decréscimo do 7º ao 14º dia; e ligeiro aumento até o 21º dia; com significância estatística ao 14º dia (Tabela 5).

A expressão de α-AML foi observada em todos os casos (Figura 3) variando a sua imunoexpressão tecidual entre 0,88 % e 3,23 %.

**DISCUSSÃO**

A pesquisa com imunomarcadores na cicatrização tem universo muito grande e polimorfo. Muitos anos serão necessários para definir os mais variados processos de reparação tecidual, frente as mais diversas agressões que podem ou não estar associadas à processos infeciosos, que naturalmente alteram a reação normal. A amplitude da pesquisa na cicatrização cirúrgica pode ser estimada pelas inúmeras formas imunológicas de reação somente interpretando os três marcadores aqui estudados.

A família das MMPs inclui cerca de 25 proteínas que podem ser divididas em: colagenases (MMP-1,8 e 13),

### Tabela 1. Classificação das aderências abdominais.**

| Intensidade | Parâmetros                                      |
|-------------|-------------------------------------------------|
| 0           | Ausência completa de aderências                 |
| 1           | Aderência do omento maior à ferida cirúrgica     |
| 2           | Aderências do omento maior e do intestino delgado à ferida cirúrgica |
| 3           | Aderências múltiplas intracavitárias             |

### Tabela 2. Resultados das aderências classificadas em tipo e momento.

| Aderência | 3 dias | 7 dias | 14 dias | 21 dias |
|-----------|--------|--------|---------|---------|
| Grau 0    | 9      | 9      | 9       | 10      |
| Grau 1    | 1      | 1      | 1       | 0       |
| Grau 2    |        |        |         |         |
| Grau 3    |        |        |         |         |
| Total     | 10     | 10     | 10      | 10      |

Figura 1. Fotomicrografia imunocorada com MMP-9 (200x): caso com 2,65% de área de imunoexpressão tecidual média – subgrupo 3 dias.
Avaliação da eficácia de três marcadores imunoistoquímicos envolvidos nos diferentes tempos da cicatrização da ferida cirúrgica

---

Tabela 3. Média, desvio-padrão e análise estatística em micrômetros quadrados por CGA (MMP-9).

| Subgrupos | 3 dias | 7 dias | 14 dias | 21 dias |
|-----------|--------|--------|---------|---------|
| Micrômetro| 4.739,95 ± 1.676,9 | 6.633,82 ± 1.867,31 | 10.560,1 ± 1.653,4 | 11.533,89 ± 1.161,7 |
| Valor de p | < 0,001* | < 0,001* | 0,099 | 0,001* |

*Teste t de Student para amostras independentes; p<0,05.

---

gelatinases (MMP-2 e 9), estromelinas (MMP-3, 7 e 10), matrilisinas (MMP-7 e 26), MMPs tipo membrana (MMP-14, 15, 16, 17 e 24) e outras MMPs, que são classificadas pela especificidade ao substrato e, principalmente, de acordo com a sua estrutura. A participação das MMPs em diversos eventos biológicos deve-se ao fato de que elas podem influenciar potencialmente o comportamento celular através de algumas ações, como clivagem de proteínas que fazem a adesão célula–célula, liberação de moléculas bioativas na superfície celular ou por clivagem de moléculas presentes na superfície celular, as quais transmitem sinais no ambiente extracelular. Diversos processos biológicos ocorrem com a participação das metaloproteinases como determinação da arquitetura da matriz extracelular, desenvolvimento embrionário, implantação do blastocisto, morfogênese dos órgãos, desenvolvimento do sistema nervoso, ovulação, dilatação cervical, regressão uterina pós-parto, desenvolvimento e remodelação do tecido oral, cicatrização, angiogênese e apoptose. Neste estudo, à semelhança de Nagase et al., a MMP-9 em sua expressão apresentou significância aos 3º, 7º e 21º dia, demonstrando ser um bom sinalizador, pois em apenas um subgrupo, 14º dia, não apresentou significância estatística.

Já a superfamília dos TGF-β inclui vários fatores de crescimento. As actinas são proteínas presentes somente nas células eucarióticas envolvidas em diversas funções celulares incluindo contração muscular, motilidade, adesão e divisão celulares, bem como, manutenção da morfologia celular. Em vertebrados, constitui uma família de seis proteínas, expressa em padrões específicos no desenvolvimento de cada tecido. Existem quatro isóformas restritas a tipos teciduais, como, α-actinaesqueletal, α-actina cardiaca, α-actina de músculo liso e γ-actina de músculo liso, respectivamente em músculos esquelético, striado cardíaco, musculatura lisa vascular e entérica. A α-actina de músculo liso é um microfilamento (5 a 8 nm de diâmetro) que compõe o citoesqueleto de todas as células musculares lisas de mamíferos, células mioepiteliais, e é particularmente abundante em células musculares lisas de paredes de vasos tendo importante função contrátil nestas células e considerada marcador do fenótipo miofibroblástico. Está também presente em células conjuntivas como fibroblastos e miofibroblastos. Ultra-estruturalmente elas apresentam retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bastante desenvolvidos, vesículas de pinocitose, junções do tipo “gap”, e disposição organizada de feixes de miofilamentos de actina localizados focalmente ao longo eixo da célula (fibras de “stress”) ou se ligando a domínios de fibronectina extracelular através de proteínas especializadas de membrana (integrinas), caracterizando especializações da membrana chamadas de fibronexos. Funcionalmente, este sistema mecano-transdutor é capaz de transmitir as forças geradas na matriz extracelular, sendo importante no processo de reparação tecidual. Ainda que controversa, a hipótese mais amplamente aceita na literatura sobre a origem dos miofibroblastos é a partir de...
Objective: to evaluate the efficacy of three immunohistochemical markers involved in the wound healing process. Methods: experimental study of 40 Wistar rats of the markers metalloproteinases and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), beta transforming growth factor (TGF-β) and myofibroblasts and smooth muscle actin alpha (α-MLA) markers, studied from fragments of surgical scar of abdominal incision involving skin, aponeurosis and peritoneum. The animals were divided into four subgroups of ten according to the day of death, scheduled in three, seven, 14 and 21 days.

Results: MMP-9 expression showed a progressive increase of its concentration, more evident from 7th to 14th days, varying the tissue immunoexpression between 2.65% and 11.50% . TGF-β showed expression at high level on the 3rd day, fell in the 7th, rising again in the 14th, with a small decrease in the 21st day, varying the tissue immunoexpression between 0.03% and 2.92%. The α-AML presented levels with little variation and a slight increase, varying the tissue immunoexpression between 0.88% and 3.23%.

Conclusion: MMP-9 presented as the best marker, followed by TGF-β. However, α-AML was not a good indicator of the evolution of tissue repair.

Keywords: Wound Healing. General Surgery. Immunohistochemistry. Fibroblast Growth Factors.
**REFERÊNCIAS**

1. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. J Cell Biol. 1993;122(1):103-11.

2. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3(5):349-63.

3. Eyden B. The myofibroblast: an assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. Ultrastruct Pathol. 2001;25(1):39-50.

4. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003;92(8):827-39.

5. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J. 1991;5(8):2145-54.

6. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci U S A. 1962;48:1014-22.

7. Pais-Costa SR, Farah JF, Artigiani-Neto R, Martins SJ, Goldenberg A. Evaluation of P53, E-cadherin, Cox-2, and EGFR protein immunoexpression on prognostic of resected gallbladder carcinoma. Arq Bras Cir Dig. 2014;27(2):126-32.

8. Grégoire M, Lieubeau B. The role of fibroblasts in tumor behavior. Cancer Metastasis Rev. 1995;14(4):339-50.

9. Serigiolle LC, Barbieri RL, Gomes HM, Rodrigues DA, Studart SV, Leme PL. Critical analysis of experimental models for study of adhesions after incisional hernias in rats. Rev Col Bras Cir. 2000;27(3):147-52.

10. Magalhães CR, Malafaia O, Torres OJ, Moreira LB, Tefil SC, Pinheiro MR, et al. Liver regeneration with l-glutamine supplemented diet: experimental study in rats. Rev Col Bras Cir. 2014;41(2):117-21.

11. Eyden B. Fibroblast phenotype plasticity: relevance for understanding heterogeneity in “fibroblastic” tumors. Ultrastruct Pathol. 2004;28(5-6):307-19.

12. Kagueyama FM, Nicoli FM, Bonatto MW, Orso IR. Importance of biopsies and histological evaluation in patients with chronic diarrhea and normal colonoscopies. Arq Bras Cir Dig. 2014;27(3):184-7.

13. Gonçalves RM, Esquedo CRM, Petroianu A, Barbosa AJA. Influência de aderências peritoneais e fio cirúrgico na tensão de ruptura da parede abdominal em ratos. Rev Col Bras Cir. 2000;27(3):147-52.

14. Yong VW, Zabad RK, Agrawal S, Goncalves da Silva A, Metz LM. Elevation of matrix metalloproteinases (MMPs) in multiple sclerosis and impact of immunomodulators. J Neurol Sci. 2007;259(1-2):79-84.

15. de Oliveira RP, Portari Filho PE, Iglesias AC, de Oliveira CA, Pannain VL. Comparative study of the different degrees of risk of gastrointestinal stromal tumor. Rev Col Bras Cir. 2015;42(1):32-6.

16. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999;274(31):21491-4.

17. McHugh KM, Crawford K, Lessard JL. A comprehensive analysis of the developmental and tissue-specific expression of the isoactin multigene family in the rat. Dev Biol. 1991;148(2):442-58.

18. Vaughan, MB, Howard, EW, Tomasek, JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation on the myofibroblast. Exp Cell Res. 2000;257(1):180-9.

19. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. Am J Pathol. 2007;170(6):1807-16.

20. Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. Arch Oral Biol. 1999;44(2):149-56.

21. Schürch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast: a quarter century after its discovery. Am J Surg Pathol. 1998;22(2):141-7.

22. Dugina V, Fontao L, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. J Cell Sci. 1999;114(Pt 18):3285-96.

23. Alliot-Licht B, Hurtrel D, Gregoire M. Characterization of alpha-smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. Arch Oral Biol. 2001;46(3):221-8.

Recebido em: 21/12/2016
Aceito para publicação em: 28/04/2017
Conflito de interesse: nenhum.
Fonte de financiamento: nenhuma.

**Endereço para correspondência:**
Jurandir Marcondes Ribas Filho
E-mail: zeiduardo@yahoo.com / ribas6015@gmail.com