REABSORÇÃO DENTÁRIA FISIOLÓGICA:

Estudo dos Mecanismos (Apoptose) e das Moléculas Desencadeadoras (Bmp-4 e Gelatinase B) em Dentes Decíduos de Gatos

SIMONE DE QUEIROZ CHAVES LOURENÇO

**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Bauru,
da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Odontologia,
área de Patologia Bucal.**

BAURU

1999

REABSORÇÃO DENTÁRIA FISIOLÓGICA:

Estudo dos Mecanismos (Apoptose) e das Moléculas Desencadeadoras (Bmp-4 e Gelatinase B) em Dentes Decíduos de Gatos

SIMONE DE QUEIROZ CHAVES LOURENÇO

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Bauru, da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Odontologia, área de Patologia
Bucal.

**Orientadores: Prof. Dr. Alberto Consolaro
Prof^a. Dr^a. Irma Thesleff**

BAURU

1999

Ficha Técnica

Simone de Queiroz Chaves Lourenço - concepção original, experimento, histotécnica, digitalização das imagens, redação e digitação

Alberto Consolaro - concepção original, orientação geral e revisão final

Irma Thesleff - orientação dos experimentos na Finlândia

Eduardo José Veras Lourenço - arte final das imagens, figuras, impressão e formatação

Nilce Santos de Melo - colaboração na redação

David Rice - supervisão dos experimentos na Finlândia

Ritva Härönen - colaboração nos experimentos na Finlândia

Thomas Åberg - colaboração nos experimentos na Finlândia e digitalização das imagens

Fátima Aparecida Oliveira - histotécnica no Brasil

André Luis da Silva - histotécnica no Brasil

Juracy do Nascimento - histotécnica no Brasil

Merja Mäkinen - histotécnica na Finlândia

Riikka Santalahti - histotécnica na Finlândia

Ricardo Auib - assistência veterinária

Carlos Meireles - assistência veterinária

Valdir João Afonso - revisão final e vernáculo

Cybelle Assumpção Fontes - normatização técnica

Marcus Thame - cópias e encadernação

Lourenço, Simone de Queiroz Chaves

L934r Reabsorção dentária fisiológica: estudo dos mecanismos (apoptose) e das moléculas desencadeadoras (Bmp-4 e gelatinase B) em dentes decíduos de gatos / Simone de Queiroz Chaves Lourenço - - Bauru, 1999.

104 p.:il.; 28cm.

Tese. (Doutorado)- -Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientadores: Prof. Dr. Alberto Consolaro

Prof^a. Dr^a. Irma Thesleff.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data: Bauru, 12 de setembro de 1999.

Simone de Queiroz Chaves Lourenço

06 de março de 1970

Nascimento

Rio de Janeiro - RJ

1988 – 1992

Curso de Odontologia - Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ.

1993 – 1994

Colaboradora na Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ e Cirurgiã - Dentista no Rio de Janeiro.

1995 – 1997

Curso de Mestrado em Patologia, na Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, Bauru - SP.

1997 – 1999

Curso de Doutorado em Patologia, na Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, Bauru - SP.

Associações

ABO - Associação Brasileira de Odontologia - Seção - Rio de Janeiro.
SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas.
IADR - International Association of Dental Research.

Agradeço e dedico este trabalho...

A **Deus,**

Aos meus pais, **Ronaldo e Maria Luiza,**

Ao meu marido, **Eduardo,**

Aos meus irmãos, **Gustavo e Rodrigo,**

Aos meus padrinhos, **Ramiro e Yolanda,**

Pelos ensinamentos, apoio e por vivenciarem plenamente a busca dos verdadeiros valores...

“ Cada um hospeda dentro de si uma águia. Sente-se portador de um projeto infinito. Quer romper os limites apertados de seu arranjo existencial. Há movimentos na política, na educação e no processo de mundialização que pretendem reduzir-nos a simples galinhas, confinadas aos limites do terreiro. Como vamos dar asas à águia e ganhar altura? ”

Leonardo Boff

Minha admiração !!!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro** pela minha formação no curso de graduação;

À **Faculdade de Odontologia da Bauru, Universidade de São Paulo**, na pessoa do Diretor **Professor Doutor Aymar Pavarini**, pela minha formação no curso de pós-graduação;

Ao **Instituto de Biotecnologia da Universidade de Helsinki, Finlândia**, na pessoa do Diretor **Professor Doutor Mart Saarma**, pela realização deste trabalho;

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, em nome do Presidente **Professor Doutor Luiz Fernando Pegoraro**;

Aos Professores da **Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Universidade de São Paulo, **Dr. Alberto Consolaro**, **Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, **Dra. Denise Tostes Oliveira** e **Dra. Vanessa Soares Lara**;

Aos **Pós-graduandos, Técnicos e Pesquisadores do Grupo de Pesquisa Desenvolvimento Biológico**, coordenado pela Professora Doutora Irma Thesleff, no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Helsinki, Finlândia;

À **Disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Universidade de São Paulo, em especial ao **Professor Doutor Orivaldo Tavano**, **Célio** e **Gilberto**, pelo apoio na realização das tomadas radiográficas.

A todos os **Funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Universidade de São Paulo, especialmente **Ademir**, **Cybelle**, **Marcelo**, **Mônica** e **Tamara**;

Aos **Funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Universidade de São Paulo, **Ana Maria, Aurélio, Cleusa, Heloísa, Giane e Neide**;

Ao **Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Universidade de São Paulo, em especial ao **Luís Carlos**;

À **Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de Doutorado e Doutorado Sanduíche.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Ao meu querido marido **Eduardo** pela sua generosidade e dedicação integral na realização deste trabalho;

A todos os meus familiares e amigos, em especial **Rosanne Fraga**, pelo altruísmo e bondade;

Aos familiares do Eduardo, principalmente a **D. Édia Lourenço**, pelo seu desprendimento e constante apoio;

À querida amiga **Nilce Santos de Melo**, pela sua verdadeira e dedicada amizade e inesgotável companheirismo;

À Professora Doutora **Sandra Rivera Fidel**, da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelo seu apoio, estímulo e amizade;

Ao Professor Doutor **Luís Antônio de Assis Taveira**, da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, pela grandeza de coração e sua vontade de sempre ajudar a todos;

Aos queridos amigos, **David, Merja, Ritva e Thomas**, pelo carinho, apoio e fraternidade com que me acolheram;

Aos **Funcionários da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Universidade de São Paulo, **Bernadete, Cristina, Fátima, Juracy, Maria Aparecida e Valdir** pelo carinho, amizade e auxílios sempre oferecidos;

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação, principalmente aos companheiros do Mestrado e Doutorado de Patologia, **Alessandro, Denis,**

Washington, Cássio, Francisco e Fernanda, pelas alegrias compartilhadas, presteza e respeito demonstrados;

Ao Professor Doutor **Carlos Eduardo Bacchi**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP, Botucatu, Professor Doutor **Oslei Paes de Almeida** do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da UNICAMP, Piracicaba e a Professora Doutora **Ana Lúcia Capellozza**, da Disciplina de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, pela presteza no atendimento às solitações;

Aos Médicos Veterinários Dr. **Carlos Meireles** e Dr. **Ricardo Aiub**, pela dedicação dispensada durante a realização da parte experimental;

Meu reconhecimento e gratidão...

“ ... precisamos dizer às pessoas que este mundo é uma aventura incrível. Sabemos que não é fácil abrir os olhos das pessoas para que elas vejam o quanto é imenso e imperscrutável este nosso mundo, que a olho nu é um mistério... Estaremos salvos enquanto existirem curingas perambulando no mundo e perguntando: Quem somos? De onde viemos?”

Jostein Gaarder

Ao meu querido orientador e amigo, Professor Doutor **Alberto Consolaro**, por ter representado o curinga na minha formação pessoal e profissional, meu respeito e eterno obrigado.

A minha orientadora no exterior, Professora Doutora **Irma Thesleff**, pelo exemplo de determinação e competência como pesquisadora e mulher, agradeço pela generosidade e oportunidade no convívio amplamente enriquecedor.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiv
1 - INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA APLICADA	01
2 - PROPOSIÇÃO	16
3 - MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 - Amostragem	19
3.2 - Tomada radiográfica convencional	19
3.3 - Preparo laboratorial dos espécimes	22
3.4 - Técnica TUNEL modificada	23
3.5 - Técnica hibridização in situ com radioisótopos e sondas RNAm	25
3.6 - Análise microscópica e registro dos resultados	27
4 - RESULTADOS	30
4.1 - Coloração de hematoxilina e eosina (HE)	31
4.2 - Técnica TUNEL modificada	35
4.3 - Técnica hibridização in situ com sonda RNAm Bmp-4	41
4.4 - Inter-relação entre Bmp-4 ligante e apoptose	41
4.5 - Técnica hibridização in situ com sonda RNAm gelatinase B	49
5 - DISCUSSÃO	54
5.1 - Concepção do trabalho	55
5.2 - Apoptose e reabsorção dentária fisiológica	57
5.3 - Modelo de estudo	58

5.4 - Estímulo da apoptose na rizólise	59
5.5 - Metodologia	63
5.6 - Síntese do mecanismo de reabsorção dentária fisiológica	68
5.7 - Perspectivas e aplicações clínico-terapêuticas	72
6 - CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ABSTRACT	90
APÊNDICE	92

LISTA DE ABREVIATURAS

mg - microgram

ml - microlitre

mm - micrometer

3'OH ends - hydroxyl ends

³⁵S - sulphur

A - ampere

BCIP - bromo-chloro-indolyl-phosphate

bcl-2 - B-cell lymphoma/leukemia 2

BMP - bone morphogenetic protein

BMPR - bone morphogenetic protein receptor

BMU - bone multicellular unit

bp - base pairs

BSA - bovine serum albumin

CCD - charged coupled device

c-DNA - complementary DNA

c-fos - não encontrado

CHAPS - [(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]1propanesulfonate

c-myc - cell-myc

C° - centigrade degree

cpm - counts/min

CSF-1 - colony-stimulating factor 1

c-src - cell sarcoma Rous

dATP - deoxyadenine triphosphate

DNA - deoxyribonucleic acid

Dpp - decapentaplegic

dUTP - deoxyuridine triphosphate

EDTA - ethylenediaminetetracetate

EGF - epidermal growth factor

FACS - fluorescence-activated cell sorter

Fas - não encontrado

FasL - Fas ligant
FGF-4 - fibroblast growth factor 4
GDF - growth and differentiation factors
HE - hematoxylin and eosin
IL-1a - interleukin-1a
kb - kilobase
kDa - kilodalton
kVp - kilovolt
mA - milliamperes
mg - milligram
MHC - major histocompatibility complex
ml - milliliter
mM - millimolar
MMP - matrix metalloproteinase
mRNA - messenger RNA
Msx-1/2 - muscle segment 1/2
Myc - avian myelocytomatosis
NBT - NTM+nitro blue tetrazolium chloride
NGF - nerve growth factor
NIH - National Institutes of Health
nM - nanomolar
NTM - NaCl+Tris+HCl+MgCl₂
op - osteopetrotic
p53 - protein 53kDa
PBS - phosphate-buffered saline
PBT - phosphate-buffered saline triton
PFA - paraformaldehyde
pH - hydrogen ion concentration
PI - propidium iodide
PTH - parathyroid hormone
PTHrP - parathyroid hormone related protein
RNA - ribonucleic acid

TBT - tris HCl+NaCl+Triton X

TdT - terminal deoxynucleotidyl transferase

TGFb - transforming growth factor b

TNF - tumor necrosis factor

TNFR1 - tumor necrosis factor receptor 1

TRAP - tartrate-resistant acid phosphatase activity
triton

TUNEL - TdT dUTP - biotin Nick End Labeling

*** Os genes são descritos com letras minúsculas e suas respectivas proteínas com letra maiúsculas, com exceções.**

RESUMO

A reabsorção dentária fisiológica em dentes decíduos representa um fenômeno natural e programado pelo organismo, seguido pela substituição da dentição temporária pela permanente. Para estudar os mecanismos e moléculas desencadeadoras envolvidas na indução da reabsorção fisiológica foram utilizados caninos e incisivos decíduos de gatos com dois meses de vida. O caráter programado da reabsorção dentária fisiológica motivou o estudo da participação da apoptose neste processo e sua marcação positiva foi evidenciada pela técnica TUNEL modificada nos cementoblastos, fibroblastos do tecido pulpar, do ligamento periodontal e nos restos epiteliais de Malassez dos dentes decíduos. Uma das proteínas envolvidas na indução da apoptose em eventos fisiológicos, a proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4), foi detectada nos cementoblastos e células do ligamento periodontal do dente decíduo por hibridização in situ com radioisótopos. Topograficamente observou-se uma similaridade entre a expressão de Bmp-4 e a técnica TUNEL modificada em cortes idênticos. Uma intensa marcação de Bmp-4 foi também observada nos ameloblastos do dente permanente. Para a análise da participação dos clastos na rizólise, foi avaliada via hibridização in situ, a expressão de gelatinase B, uma metaloproteinase da matriz extracelular sintetizada por estas células. Os resultados encontrados indicam a morte celular programada como o provável “gatilho biológico” da reabsorção dentária fisiológica e a proteína BMP-4 como uma das moléculas indutoras da apoptose na reabsorção dentária fisiológica, por mecanismo autócrino e Parácrino. A marcação de gelatinase B nos clastos presentes na reabsorção foi a mesma localizada nos clastos, da reabsorção óssea, indicando semelhança entre estas células.

1 - INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA APLICADA

1 – INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA APLICADA

As reabsorções dentárias têm grande importância por impedirem o transplante de dentes no mesmo indivíduo ou entre indivíduos diferentes, por impossibilitarem reimplantes intencionais e limitarem as movimentações dentárias induzidas. O estudo da reabsorção dentária significa, no futuro, estabelecer protocolos para estes tratamentos, revolucionando a odontologia.

A Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, tem como uma de suas linhas de pesquisa, o estudo das reabsorções dentárias. Sob este enfoque, desenvolveram-se experimentos e teses, como as de CUOGHI¹¹, "Avaliação das alterações teciduais periodontais durante a movimentação dentária induzida nas primeiras 24 horas com força ativa, interrompida e retomada em dentes de macaco"; GODOY²⁴, "Reabsorção radicular em molares decíduos - análises morfológicas, macro e microscópicas", MAZZIERO⁴⁸, "Ácido diclometilefosfônico C12MDP na movimentação dentária induzida em ratos . Avaliação histológica"; PEREIRA⁵⁶, "Avaliação microscópica da influência de anticoncepcionais e gravidez na movimentação dentária induzida, em especial nos fenômenos da reabsorção dentária"; MARQUES⁴⁵, "Influência de alterações endócrinas nas estruturas dentárias e osso alveolar – avaliação microscópica e padronização da metodologia" e VASCONCELOS⁹⁶, "Análise morfológica comparativa do periodonto de sustentação submetido a forças biologicamente excessivas, em ratos adultos, sem e sob o uso de anticoncepcionais e ratas prenhes".

O estudo da reabsorção fisiológica do dente decíduo intrigou os pesquisadores desde o século passado, como descrito elegantemente por KRONFELD³⁷, em 1932. As questões levantadas nesta revisão permanecem atuais. A primeira descrição foi publicada em 1851, por Linderer, onde ressaltava a participação do folículo do dente permanente no processo de rizólise decídua. Em 1859, John Tomes relatou a presença de reabsorção clástica na superfície dos dentes decíduos. Seu filho, Charles S. Tomes, em 1876, fez uma extensa revisão dos conhecimentos contemporâneos sobre a exfoliação dos decíduos, enfatizando três pontos essenciais:

- a reabsorção radicular dos dentes decíduos inicia-se em regiões próximas do dente permanente, embora possa ocorrer do lado oposto;
- a rizólise dos dentes decíduos funciona de forma intermitente, havendo deposição de tecido ósseo em áreas reabsorvidas;
- o cemento apresenta-se primeiramente atingido e eventualmente a dentina e o esmalte, tendo-se observado maior resistência à reabsorção da dentina próxima à polpa.

Para KRONFELD³⁷ a erupção do dente permanente não funciona como estímulo primário responsável pela reabsorção fisiológica, pois mesmo na sua ausência, desencadeia-se a rizólise. Segundo este autor, a dentina desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da reabsorção dentária. Em 1998, KANNARI et al.³³, abordaram indiretamente o papel da dentina na reabsorção fisiológica. Os autores analisaram a distribuição de células apresentadoras de antígenos do complexo maior de histocompatibilidade classe II (MHC) em polpas, de dentes decíduos humanos, durante a rizólise. As células MHC classe II distribuíam-se na fase ativa da reabsorção, ao longo da dentina exposta pelo desaparecimento de odontoblastos focais e adjacentes aos clastos. Os autores atribuíram as células MHC classe II, um papel na indução da diferenciação, migração e/ou ativação de odontoclastos e cementoblastos-like durante a reabsorção fisiológica.

Os mecanismos da reabsorção dentária fisiológica, em essência, são semelhantes aos evidenciados na reabsorção dentária inflamatória e óssea. As células envolvidas nas reabsorções dentárias e ósseas são os clastos, mononucleares¹³ e multinucleares, os osteoblastos e os macrófagos, constituindo a unidade osteorremodeladora ou BMU^{13,20,37,51,69,73,74,76}. Mediadores bioquímicos sintetizados e liberados durante a reabsorção medeiam os eventos celulares e a manutenção deste processo⁶⁹.

A degradação do tecido dentário durante a reabsorção ocorre em dois estádios, o primeiro extracelular, havendo a fragmentação enzimática das matrizes

orgânicas e inorgânicas do tecido e o outro intracelular, quando há a digestão das matrizes fragmentadas por enzimas celulares orquestradas pela BMU⁷³.

Nos trabalhos sobre clastos na reabsorção fisiológica dos dentes decíduos, utilizando histoquímica e microscopia eletrônica, os principais enfoques são: avaliação do número médio de núcleos em clastos multinucleados¹⁴; citodiferenciação e degeneração destas células⁷⁴; a caracterização dos clastos reabsorvendo dentina^{66,69,70} e esmalte^{5,71} e a marcação de enzimas liberadas pelos clastos durante a reabsorção dentária^{42,77}. Nestes estudos não foram identificadas diferenças morfológicas e histoquímicas entre odontoclastos e osteoclastos^{37,51,69,70,73}. Somente MATSUDA⁴⁷, em 1992, usando os mesmos métodos de estudo em clastos na rizólise, concluiu que estas células não são semelhantes a osteoclastos e macrófagos, apresentando provavelmente diferenciação terminal distinta, pela diferença de comportamento frente ao paratormônio.

A marcação da atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) possibilita localizar especificamente clastos e pré-clastos mononucleares^{63,69,70,71}. Esta glicoproteína catiônica sintetizada pelos clastos, dentro das áreas de reabsorção e próximas as bordas ativas ou em escova, atua cataliticamente na remoção de fosfato antes da solubilização da hidroxiapatita⁶³. A enzima TRAP caracteriza-se como um excelente marcador histoquímico para clastos^{63,69,70}.

REPONEN et al.⁶², em 1994, indicaram um novo marcador para clastos, a gelatinase B. A metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9) ou 92 kDa collagenase IV ou ainda gelatinase B, tem capacidade de degradar colágeno desnaturado (gelatina), justificando seu nome. Ainda degrada pontos específicos do colágeno IV, colágenos tipos III, V, VII, XI e elastina. Evidências também indicam seu papel na remoção de fragmentos de colágenos desnaturados, seguido da ação de outras MMPs e proteinases cisteínicas durante a fase inicial da reabsorção óssea. A gelatinase B pertence à família das metaloproteinases da matriz extracelular de mamíferos, tendo seus produtos relacionados geneticamente. Estas enzimas apresentam propriedades estruturais e funcionais diferentes, porém todas exibem capacidade de degradar uma ou mais moléculas constituintes da matriz extracelular. Normalmente, estas

moléculas encontram-se desativadas por específicos inibidores e são secretadas como zimogênios. A família das metaloproteinases apresenta até o momento nove membros geneticamente diferentes, atuando na remodelação dos tecidos durante o desenvolvimento embrionário e em outras situações de degradação da matriz extracelular, como na inflamação e no processo de invasão de tumores^{53,62,63,97}.

A gelatinase B, expressada principalmente por clastos, participa da reabsorção óssea, no compartimento subclástico e em sítios de neoformação. A MMP-9 ou gelatinase B apresenta capacidade de degradar fibrilas de colágeno do osso em conjunto com MMP-1 e proteinases cisteínicas, como as catepsinas B, G, L e N^{53,62,63,77,97}. A expressão desta enzima também foi localizada em cultura de macrófagos alveolares, neutrófilos, trofoblastos, queratinócitos, células tumorais e linfócitos humanos T. A síntese desta enzima pela maioria das células, tem como objetivo degradar a matriz extracelular, às vezes, até a membrana basal, para permitir a migração das células no tecido. Esta enzima é uma das responsáveis pelo turnover do colágeno nos tecidos conjuntivos^{53,62,63,97}.

Os clastos expressando gelatinase B geralmente apresentam marcação positiva também para TRAP, embora em tecidos ósseos maduros estas marcações nem sempre estão correlacionadas^{62,63}. RICE; KIM; THESLEFF⁶³, em 1997, discutiram sobre as possíveis razões na diferença de expressão destas moléculas pelos clastos. Os autores identificaram nos clastos a transcrição de gelatinase B predominantemente nas áreas em neoformação de tecido ósseo e de crescimento rápido, enquanto a marcação por TRAP revela-se em maior proporção na remodelação de osso maduro⁶³. A diferença na transcrição destas moléculas foi justificada como sendo dependente do microambiente dos clastos. A produção de TRAP está relacionada com a degradação da matriz mineralizada e a gelatinase B de matriz osteóide não mineralizada. Até o momento não foi descrita na literatura a utilização de gelatinase B para marcação de clastos relacionados com reabsorção dentária, como proposta deste trabalho.

A reabsorção dentária fisiológica caracteriza-se como um processo programado, alternando períodos de reabsorção com períodos de repouso,

configurando um caráter intermitente^{20,51,67,68}. Na rizólise decídua, observa-se reabsorção dentária externa e interna como padrão de normalidade, sendo evidenciado em dentes decíduos de humanos, cães e felinos. Nas fases ativas de reabsorção dentária são observadas nas superfícies radiculares, lacunas de Howship preenchidas por clastos, enquanto nas etapas de repouso observa-se formação de tecido de reparo de aspecto cementóide, podendo restabelecer as inserções periodontais^{24,51,65,67,68}.

A quantidade de tecido cementóide apostado no processo reparador encontra-se sempre inferior ao tecido reabsorvido, com o tempo as raízes tornam-se cada vez mais curtas até a coroa ficar presa à borda gengival^{20,67,68}. Nesta fase, o epitélio gengival prolifera e migra por debaixo da coroa do dente decíduo, recobrindo parcialmente o remanescente pulpar e posteriormente, sobrepondo-o totalmente. Este fenômeno ocorre em diferentes superfícies do dente, até que a migração gengival forme uma ponte de tecido estreita, unindo coroa e gengiva, rompendo esta união antes da exfoliação². A ocorrência destes dois processos explica a alternância de mobilidade e fixação detectado clinicamente nos dentes decíduos^{2,37,49}.

A reabsorção dentária fisiológica nos dentes decíduos representa um processo fisiológico, sem forma e simetria, desenvolvendo-se de acordo com o dente e o indivíduo^{37,61}.

FRANCINNI et al.¹⁸, em 1992, descreveram detalhadamente a existência de diferentes padrões de reabsorção para diversos dentes. Dentes unirradiculares geralmente exfoliam antes da completa reabsorção da raiz, não sendo encontrados clastos dentro da câmara pulpar e a camada de odontoblastos permanece intacta. A reabsorção nestes dentes começa no terço apical, mais precisamente na superfície lingual da raiz, prosseguindo em direção dentoaxial até atingir o canal radicular. Entretanto, nos molares, as raízes são completamente reabsorvidas, mas a coroa encontra-se também reabsorvida parcialmente antes da exfoliação. Nestes dentes, o processo de reabsorção muitas vezes inicia-se nas superfícies internas da bi ou trifurcação. A localização desta reabsorção reflete a expansão de seus sucessores permanentes em desenvolvimento, posicionados entre as raízes dos molares

decíduos. A presença das reabsorções nas superfícies inter-radiculares, proporcionando comunicações diretas entre a cavidade pulpar e os tecidos periodontais circunjacentes, ressalta a importância do conhecimento das principais características da rizólise durante medidas terapêuticas.

Em 1995, GODOY²⁴ estudando morfologicamente a reabsorção radicular de molares decíduos, ressaltou importantes alterações ocorridas na morfologia das raízes e principalmente na posição do forame apical. Simultaneamente, dentina secundária depositada no interior do sistema de canais radiculares, determina modificações no número e tamanho dos canais. As alterações na região de furca dos molares decíduos, têm também um significado especial, em decorrência de sua íntima relação com o folículo de germe do permanente subjacente.

As alterações morfológicas próprias da dentição decídua apresentam implicações clínico-terapêuticas importantes e peculiares^{20,24,37,49,51,67,68,90}.

Uma reação inflamatória muitas vezes associada à época de exfoliação, freqüentemente tem como causa o trauma mecânico da mobilidade e a penetração de microorganismos ou seus produtos, bem como estabelecimento de biofilmes microbianos em suas superfícies^{2,18,37}.

Dentes decíduos com pulpite crônica e lesão inter-radicular apresentaram grandes áreas de reabsorção e discretas áreas de reparação quando comparadas à rizólise em dentes decíduos hígidos. ANDIA-MERLIN; ARANA-CHAVES⁴ atribuíram aos mediadores da inflamação esta alteração no processo de aposição de tecido cementóide. Entretanto dentes tratados endodonticamente e livres de infecção são reabsorvidos aparentemente com um padrão de normalidade. Traumas oclusais e lesões cariosas profundas normalmente aceleram a rizólise decídua e como consequência adiantam a exfoliação^{17,27,52,64,90}.

Paralelamente ao desenvolvimento da rizólise do dente decíduo, tem-se a odontogênese e a erupção do dente permanente. Estudos centrados na inter-relação ou não destes eventos são pouco freqüentes, são em geral estudados isoladamente.

Durante a fase de erupção do dente permanente, tanto o osso alveolar quanto o dente decíduo são reabsorvidos em largas dimensões e o excesso pode ser reparado por osso e cimento, respectivamente. No entanto, o tecido reparado mostra-se estruturalmente inferior ao tecido reabsorvido e em menor quantidade, resultando na exfoliação do dente primário e erupção do dente permanente. A erupção dentária caracteriza-se pela interação de mecanismos relacionados ao folículo dentário, ao remodelamento do osso e do colágeno, à formação do ligamento periodontal, bem como a rizogênese e à pressão hidrostática^{84,89}.

O estudo dos mediadores bioquímicos liberados pelos folículos dentários estão se desenvolvendo desde a década de 70 por MARKS JR.⁴⁴; CAHILL⁷; WISE e LIN¹⁰¹. Estes autores estudaram a IL-1, CSF-1, TGF- β e EGF, como moléculas atuantes na erupção dentária, promovendo a reabsorção do osso alveolar^{7,44,81,82,86,87,101} e possivelmente acelerando a reabsorção do dente decíduo. Estes mediadores oriundos do folículo dentário podem participar acelerando a rizólise, porém não são essenciais no desencadeamento do fenômeno, visto que a reabsorção fisiológica ocorre mesmo na sua ausência.

Estudos in vitro e in vivo evidenciaram a cascata de sinais moleculares, iniciando com EGF ou TGF- β 1 que ativa a produção de IL-1 α no retículo estrelado e o aumento concomitante destes receptores no folículo dentário. O EGF também aumenta a expressão gênica do TGF- β 1 nas células do retículo estrelado, participando na transcrição de IL1 α nestas células. A IL-1 α por sua vez ativa CSF-1 no folículo dentário capaz de atuar no influxo de monócitos, os quais se diferenciam em clastos e iniciam a reabsorção óssea essencial para a erupção dentária^{100,101}.

A ausência do CSF-1 observada em camundongos op/op, um modelo experimental para estudar osteopetrose, os dentes não irromperam como consequência de defeitos na formação de clastos. No mesmo modelo experimental, mas com ausência de c-fos e c-src, a erupção dentária não foi observada devido a alterações na diferenciação e ativação dos clastos, respectivamente^{35,89}. A proteína PTHrP também participa na ativação de clastos na erupção dentária, como demonstraram PHILBRICK et al.⁵⁷ em 1998, num trabalho desenvolvido em

camundongos com este gene alterado, nos quais, entre outras alterações, não houve erupção dos dentes.

A erupção dentária do permanente acontece paralelamente a reabsorção dentária fisiológica o que nos permite inferir sobre uma inter-relação de mecanismos e mediadores bioquímicos. A reabsorção dentária fisiológica apresenta-se como um processo programado e silencioso, sem danos para o organismo, no qual se observa desde o início, o desaparecimento de cementoblastos, odontoblastos e fibroblastos no dente decíduo. O desaparecimento destas células muitas vezes foi descrito como degenerações ou regressões associadas às características gerais do processo^{3,12,33,37,69}, e nos conduziu a hipótese da possível participação da apoptose regulando ou mesmo desencadeando este fenômeno.

ANDERSON; TEN CATE³, em 1986, estudando decíduos de felinos em rizólise, observaram o desaparecimento gradativo do ligamento periodontal povoado por fibroblastos em apoptose, ressaltando a participação da morte celular programada na reabsorção fisiológica. Em 1989, DARD; KEREBEL; KEREBEL¹², por meio de microscopia eletrônica de transmissão, localizaram alterações morfológicas nos fibroblastos de polpa de caninos em rizólise, descritas como regressões celulares.

Muitos eventos fisiológicos são mediados pela morte celular programada ou apoptose, como a formação das cavidades de órgãos ocos, na fusão dos processos palatinos laterais e o desaparecimento do ducto tireoglosso após formação e localização da glândula tireóide^{6,10,50,99}. A participação da apoptose também tem sido estudada na formação dos dentes, sendo responsável pela fragmentação da lâmina dentária e da bainha epitelial de Hertwig e em outros sítios como no desaparecimento do epitélio reduzido do órgão do esmalte^{32,34,39,40,79,93} e do nó do esmalte³¹. A morte celular programada além de participar na morfogênese de tecidos embrionários atua também na homeostasia de tecidos e órgãos adultos, mantendo a massa celular e eliminando o excesso ou células sem função^{30,55,88}. A apoptose tem papel fundamental na fisiologia de células e tecidos tanto quanto a divisão e a diferenciação celular^{26,30}.

A regressão de estruturas em fetos e larvas foi observada desde 1828, porém o conceito de morte celular natural surgiu em 1842 com Carl Vogt, estudando a metamorfose de anfíbios. A participação desta morte celular na organogênese de diversos animais foi descrito em outros trabalhos, entretanto sem despertar muito interesse entre os pesquisadores do século XIX⁹.

Em 1972, KERR; WILLIE; CURRIE³⁶, da Universidade de Aberdeen, na Escócia, estudando células morrendo em diversas condições fisiológicas e patológicas, verificaram uma morfologia estereotipada no fenômeno. Um professor de grego clássico, James Cormack, foi consultado e sugeriu o termo apoptose; significando “folhas ou flores cadentes” numa analogia às suas características morfológicas observadas. Os termos morte celular programada e suicídio celular são também utilizados como sinônimos de apoptose.

A apoptose apresenta evidentes e orquestradas alterações morfológicas na célula, incluindo o enrugamento celular e compactação do citoplasma e organelas, a condensação da cromatina e subsequente fragmentação do DNA^{8,10,15,19,23,83,91,99}. Primeiramente, em estágio reversível observa-se a perda das microvilosidades e formam-se invaginações na membrana celular, controladas pelas caspases iniciadoras. As caspases executoras alteram o citoesqueleto, fragmentam o núcleo, ativam as endonucleases caracterizando um estágio irreversível para a célula³⁰. A célula fragmenta-se originando corpos apoptóticos circundados por membrana celular, contendo no seu interior algumas organelas e, às vezes, fragmentos de núcleo. Estes corpos apoptóticos são imediatamente reconhecidos e fagocitados por macrófagos ou células fagocitárias adjacentes. O rápido reconhecimento pelas células fagocitárias aliada à integridade das organelas não induz o desenvolvimento de uma resposta inflamatória local^{8,9,10,19,23,55,60,83,91}. Estes aspectos morfológicos são resultantes de uma cascata sequencial de eventos bioquímicos. A morte celular programada envolve agentes ativadores, efetores e inibidores, ainda não completamente identificados em sua estrutura e função. De acordo como o tipo de célula e o microambiente onde as células são induzidas à apoptose, estas características morfológicas e bioquímicas podem sofrer alterações³⁰.

O termo programado enfatiza o envolvimento de vários genes no fenômeno da apoptose. Genes indutores, reguladores e inibidores, como a família das caspases e do bcl-2, o p53 e o c-myc participam ativamente do processo. Estes genes são induzidos por estímulos extrínsecos ou intrínsecos ativando enzimas responsáveis pelas mudanças morfológicas ocorridas nas células em apoptose. As alterações morfológicas repetidas e o controle genético sempre presente neste tipo de morte celular a diferencia da necrose^{8,23,99}.

GAVRIELI; SHERMAN; BEN SASSON²², em 1992, desenvolveram um método para marcação *in situ* do DNA fragmentado no núcleo, em tecidos cortados e processados na histotécnica de rotina. O método baseia-se na ligação específica de um terminal deoxinucleotídeo transferase (TdT) a uma cadeia terminal 3'-OH do DNA, resultando na síntese de um polímero polideoxinucleotídeo. Inicialmente, os cortes microscópicos recebem um tratamento proteolítico para expor o DNA nuclear, em seguida, a enzima TdT foi usada para incorporar biotinylated deoxyuridine em sítios de DNA quebrado. O sinal foi amplificado por uma peroxidase conjugada com avidina, que permite a identificação em microscopia de luz e estipula ainda, um padrão distinto de coloração no núcleo (Figura 1). Este método foi denominado de técnica TUNEL que significa: método mediado pelo TdT dUTP-biotin Nick End Labeling. O método TUNEL baseia-se na marcação direta e específica do DNA fragmentado no núcleo.

Inicialmente o método TUNEL foi aplicado em tecidos com altas taxas de morte celular como o epitélio, o intestino, tecidos linfóides e o ovário. O método de eletroforese gel de agarose do DNA foi comparado com a técnica TUNEL, observando que o primeiro fornece uma resposta mais qualitativa, enquanto o segundo detecta as células no início e no fim do processo, aumentando a visualização do fenômeno em células isoladas e permitindo sua quantificação. O método TUNEL foi muito utilizado no período de 1972 a 1977, com o uso da autorradiografia, mas em seguida foi abandonado. Em 1988, Dawson e Lough utilizaram similares reagentes para identificar DNA fragmentados. A técnica descrita sofreu algumas modificações com relação à original quanto à reprodutibilidade, à resolução e à simplicidade e pôde ser largamente aplicada²².

FIGURA 1 – Esquema do mecanismo da técnica TUNEL modificada

A apoptose pode ser induzida pela presença ou pela ausência de mediadores bioquímicos como descrito por VAAHTOKARI; ÄBERG; THESLEFF⁹³, em 1996, que verificaram o envolvimento do EGF e do FGF-4 na regulação da apoptose de células dentárias de camundongos.

As proteínas BMP-2, BMP-7 e principalmente a BMP-4, são consideradas as principais moléculas indutoras da morte celular programada em eventos fisiológicos^{16,41,102,103}.

As Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMP) pertencem à família do Fator de Crescimento Transformador-beta (TGF β) apresentando seqüências de aminoácidos

homólogas^{1,25,72}. A identificação e purificação da BMP iniciou-se em 1965 com URIST⁹², quando implantando fragmentos de osso desmineralizado em tecido subcutâneo e intramuscular, obteve neoformação óssea em ambos os sítios ectópicos. A denominação dada para esta família de proteínas, deve-se a sua capacidade osteoindutiva. Até o momento, 12 BMPs diferentes foram localizadas em mamíferos, incluindo a família relacionada de fatores de crescimento e diferenciação ou GDFs e apresentam funções específicas¹. As BMPs são classificadas em três grupos distintos de acordo com a sequência homóloga de bases: BMP-2 e BMP-4 são homólogas a proteína Decapentaplégica da *Drosophila* (Dpp); BMP-5, BMP-6; BMP-7 e BMP-8 pertencem ao outro subgrupo relacionado à *Drosophila* 60A. A BMP-3 pertence ao terceiro subgrupo com GDF10 e a BMP-12 e BMP-13 fazem parte do mesmo grupo com a GDF-5. As BMP-9 e BMP-10 ainda não foram identificadas com nenhum dos subgrupos e mais recentemente o GDF-8 foi descrito¹. As BMPs ligam-se a dois tipos diferentes de receptores transmembranas serina/treonina kinase, tipo I e II e a outros membros da família TGF- β . BMPRI apresenta dois subtipos de receptores, BMPRI-A e IB, ligando mais especificamente este último à BMP-2, BMP-4 e BMP-7^{1,102,103}.

Esta família de proteínas, além de estar presente em humanos, foi também localizada em outros animais vertebrados e invertebrados. A conservação da estrutura e função das BMPs durante a evolução das espécies, tem sido comprovada com estimativa de pelo menos 600 milhões de anos^{54,72}. SAMPATH et al.⁷², em 1993, induziram a formação de cartilagem e osso em ratos a partir de proteínas purificadas de *Drosophila*. Ainda, em 1993, PADGETT; WOZNEY; GELBERT⁵⁴ substituíram a proteína DPP em embriões de *Drosophilas* pela homóloga humana BMP-4 e observaram um desenvolvimento normal destes invertebrados com manutenção das funções executadas pela proteína DPP.

As BMPs participam na formação de osso e cartilagem e possuem papel essencial no desenvolvimento de estruturas e órgãos. Camundongos com os genes *Bmps* modificados apresentam inúmeras alterações na embriogênese e há evidências das proteínas BMPs funcionarem como moléculas sinalizadoras entre células e tecidos^{1,54,59,94}. As proteínas BMP-2, BMP-4 e BMP-7 têm mostrado

semelhantes funções em diversos estádios da organogênese, como mediando a interação entre epitélio e mesênquima observado na formação dos dentes e apêndices epiteliais, além de estarem associadas na diferenciação de odontoblastos e ameloblastos^{1,16,94}. Muitos trabalhos também revelaram a atuação das BMPs inibindo a diferenciação celular e induzindo a apoptose.

Em 1994, GRAHAM et al.²⁵ localizaram a proteína BMP-4 como responsável pela ativação da apoptose nas células da crista neural em rombômeros, com aumento da expressão do gene *Msx-2* nestas células. Apoptose mediada por BMP-4 também foi observada em embriões de galinhas na região interdigital^{21,102,103}, na regressão de glândulas mamárias como sugerido por PHIPPARD et al.⁵⁹, bem como na odontogênese, durante o desaparecimento do nó de esmalte³¹. Provavelmente, a proteína BMP-4 inicia e mantém a apoptose nas células, por mecanismos autócrinos ou parácrinos, envolvendo a expressão dos fatores de transcrição *Msx-1* e *Msx-2*^{16,21,25,31,43,102,103}. As moléculas FGF e NGF apresentaram atividade antagonista as BMPs, mantendo a diferenciação e proliferação de células em estádios avançados do desenvolvimento de estruturas^{21,41,43,102}.

As reabsorções dentárias apresentam-se como um problema freqüente na clínica odontológica em consequência a processos inflamatórios e/ou degenerativos nas estruturas periodontais. O controle e a interrupção deste processo nem sempre podem ser conseguidos na clínica, pois não são conhecidos detalhadamente os mecanismos e moléculas que regem a rizólise.

A reabsorção dentária fisiológica presente na troca natural da dentição temporária pela permanente, também não pode ser controlada. Estudos ao longo do tempo caracterizaram a rizólise decídua morfológica e cronologicamente, permanecendo ainda questionamentos sobre sua origem e os agentes desencadeadores deste fenômeno.

O desenvolvimento da biologia molecular e a introdução de técnicas de hibridização *in situ* e imuno-histoquímicas têm levado à evolução na busca dos aspectos moleculares dos fenômenos relacionados a reabsorção dentária fisiológica.

A compreensão dos mecanismos e mediadores indutores da reabsorção fisiológica dos dentes decíduos, poderá contribuir diretamente no estudo das reabsorções dentárias inflamatórias e possibilitará o controle da rizólise quando desejável. As contribuições clínicas e científicas advindas do estudo molecular da reabsorção dentária fisiológica, justificam a necessidade de se desenvolver trabalhos que apresentem estes propósitos.

2 - PROPOSIÇÃO

2 - PROPOSIÇÃO

Diante dos questionamentos e lacunas existentes no conhecimento da patogenia das reabsorções dentárias, inclusive sobre os mecanismos indutores e reguladores da **reabsorção dentária fisiológica**, propôs-se o desenvolvimento do presente trabalho com os seguintes propósitos:

1. estudar a ocorrência da apoptose no início da rizólise de incisivos e caninos decíduos de gatos, utilizando-se a técnica TUNEL modificada como método de detecção;
2. avaliar a expressão da proteína morfogenética óssea 4 (Bmp-4) como molécula indutora da apoptose, por meio de hibridização in situ com radioisótopos e sonda RNAm;
3. correlacionar os resultados encontrados com TUNEL e Bmp-4, em lâminas com cortes idênticos, com objetivo de estabelecer uma possível relação do fenômeno apoptose e agente indutor Bmp-4;
4. relacionar os dados obtidos com o desencadeamento da reabsorção dentária fisiológica;
5. analisar a distribuição de clastos na reabsorção dentária fisiológica, usando-se como marcador a sonda RNAm gelatinase B detectada com radioisótopos em hibridização in situ.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Amostragem

O modelo de estudo utilizado neste experimento foi a reabsorção fisiológica de incisivos e caninos decíduos, superiores e inferiores, de gatos em diferentes estádios de rizólise. Quatro gatos domésticos, *Felis catus*, com idade aproximada de dois meses de vida foram selecionados e sacrificados. No sacrifício dos animais, utilizou-se uma overdose endovenosa de thionembutal (100mg ou 4ml diluído) e flaxedil (40mg) e em seguida realizou-se perfusão intracardíaca com paraformaldeído (PFA) a 4% diluído em PBS e heparina com remoção prévia aproximadamente do mesmo volume de sangue. Todos os procedimentos descritos foram executados por médicos veterinários. As maxilas e mandíbulas removidas foram imediatamente colocadas em paraformaldeído (PFA) a 4% em PBS, pH 7,2 por 24 horas a +4°C. O fixador PFA preserva tanto a morfologia dos tecidos quanto a integridade das moléculas de RNAm nas células. O DNA apresenta-se relativamente estável, mas o RNAm não mostra muita estabilidade, tendo meia-vida curta e facilmente degradado enzimaticamente. Estes cuidados na fixação são fundamentais para o uso com sucesso da técnica de hibridização in situ.

3.2 – Tomada radiográfica convencional

Com objetivo de analisar o estágio de rizólise dos incisivos e caninos decíduos e a inter-relação da dentição primária com a secundária na arcada, efetuou-se o registro radiográfico dos espécimes. Este procedimento foi realizado na Disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Ao término da fixação, as maxilas foram divididas em quadrantes e radiografadas usando filmes periapicais (Agfa M2 "Comfort"). As peças separadas em lado direito e esquerdo foram posicionadas horizontal e paralelamente sobre o longo eixo do filme radiográfico, apoiado em mesa plana.

O aparelho de raio X (Dabi-Atlante 70x) estava regulado para 70kVp e 8mA e o cilindro localizador incidindo perpendicularmente ao plano do filme, com distância foco/filme de 40cm e tempo de exposição de 0,52 segundos. Os filmes foram processados automaticamente na máquina Perio-ProII (Air Techniques Inc., New York, USA) durante seis minutos (seca/seca), abastecidos com soluções processadoras GBX (Kodak Brasileira Comércio e Indústria Ltda). Em seguida, as radiografias foram emolduradas, identificadas e arquivadas adequadamente (Figuras 2, 3, 4 e 5).

FIGURAS 2 e 3 - As imagens radiográficas revelam maxilares de gatos apresentando os dentes decíduos em íntima relação com os permanentes em fase de troca da dentição.

FIGURAS 4 e 5 - As imagens radiográficas revelam maxilares de gatos apresentando os dentes decíduos em íntima relação com os permanentes em fase de troca da dentição.

3.3 – Preparo laboratorial dos espécimes

Após as tomadas radiográficas, os espécimes foram desmineralizados em 12,5% etilenodiaminotetraceticodissódico (EDTA)/2,5% com PFA, pH 7,5, em temperatura de +4°C, por quatro meses com duas trocas semanais. Para acelerar o processo de desmineralização as peças eram colocadas diariamente em agitador por uma hora e o material era processado ao atingirem a consistência borrachóide.

As maxilas previamente cortadas em quadrantes foram novamente seccionadas com gilete, ficando os dentes posteriores separados dos anteriores e nas mandíbulas os caninos dos incisivos, possibilitado pela presença de extenso diastema entre estes dentes. Posteriormente, os espécimes foram lavados em água corrente por 24 horas, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos distalmente em parafina. De cada animal foram confeccionados dez blocos de parafina.

Os blocos contendo caninos e incisivos foram cortados longitudinalmente em micrótomo, com espessura de 6µm e uma lâmina de cada bloco foi corada pela técnica da hematoxilina e eosina (HE) para análise morfológica dos espécimes. Todas estas etapas foram desenvolvidas no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Este experimento foi finalizado no Laboratório de Pesquisa do grupo Desenvolvimento Dentário Biológico, coordenado pela Prof^ª. Dr^ª. Irma Thesleff, no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Helsinki, Finlândia, como parte do projeto de pesquisa de Doutorado "Sanduíche". Cortes idênticos com 6µm de espessura foram realizados de todos os blocos, onde cada cinco lâminas apresentavam cinco secções idênticas. As lâminas utilizadas foram tratadas previamente com a solução de poly-D-lysine, para propiciar melhor adesão dos cortes nas lâminas, medida necessária para os procedimentos seguintes. Os cortes secaram durante toda noite na estufa com temperatura de +37°C e em seguida as lâminas foram devidamente armazenadas em caixas a +4 °C até o momento de uso.

3.4 – Técnica TUNEL modificada

Uma lâmina de cada grupo de cortes idênticos foi tratada pela técnica TUNEL modificada introduzida por GAVRIELE et al.²², em 1992, específica para detectar células em apoptose. O método baseia-se na marcação *in situ* do DNA fragmentado, característica de células em apoptose, pela ligação específica de um terminal deoxinucleotídeo transferase (TdT) a cadeia terminal 3'-OH do DNA, resultando na síntese de um polímero polideoxinucleotídeo. O protocolo seguido neste experimento encontra-se descrito detalhadamente no trabalho de VAAHTOKARI et al.⁹³, em 1996.

Inicialmente os cortes microscópicos foram aquecidos a 60°C por 30 minutos e em seguida desparafinizados no xilol em dois tempos de dez minutos. Na sequência, as lâminas permaneceram em etanol a 100% por 20 minutos, foram transferidas para a solução de ácido acético/etanol (2:3) por mais vinte minutos e encubadas por trinta minutos em 0,5% de H₂O₂ e metanol. Os cortes foram hidratados em metanol a 94%, 70%, 50% e 30%, diluídos em PBS, por cinco minutos cada. Caso deseje-se interromper a reação para continuar no dia seguinte, as lâminas devem permanecer imersas no metanol a 70% durante toda noite em +4°C. Após lavagem dos cortes, por dois tempos de cinco minutos cada, em PBS contendo 0,1% Triton X-100 (PBT), as lâminas foram incubadas durante dez minutos em 50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, pH 8,0, contendo 7µg/ml de proteinase K (Sigma P-4914) e lavadas duas vezes em PBT por cinco minutos cada.

Após fixação em PFA a 4% diluído em PBS, por 20 minutos, os cortes foram duas vezes lavados em PBT no total de 20 minutos. Em seguida, 27U/100µl da enzima transferase deoxinucleotídeo terminal (TdT) (Promega) contendo 1 nM dig-11-dUTP (Boehringer Mannheim, 1093088), 1nM dATP e 0,5% de CHAPS (Sigma C-3023) foram aplicadas nas lâminas e estas incubadas em câmara de umidificação a +37 °C por uma hora. Nas lâminas usadas para controle negativo não foi aplicada a enzima TdT. A reação foi interrompida com a colocação das lâminas em solução de 300mM NaCl, 30mM de citrato de sódio e 0,1% CHAPS durante 15 minutos em um

agitador. Os cortes foram novamente lavados em TBT e 0,1% CHAPS em agitador, duas vezes de dez minutos cada.

Aproximadamente 700µl de soro de cabra ou de ovelha com 2% de BSA em TBT foram aplicados em cada lâmina e incubadas por três horas dentro de câmara de umidificação, em temperatura ambiente. O anticorpo antidigoxigenina conjugado com alcalina fosfatase (anti-dig-AP) foi pipetado (80µl) sobre os cortes e estes incubados em câmara de umidificação a +4°C durante toda a noite.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes em TBT (50mM Tris-HCl, pH 7,5; 150mM NaCl; 0,1% Triton X-100) por cinco minutos cada e depois mais três tempos de 30 minutos cada. Os cortes também foram imersos na solução NTM (100mM NaCl; 100mM Tris-HCl; pH 9,5; 50mM MgCl₂) por cinco minutos e depois mais duas vezes em NTM com 2mM de levamisole no total de dez minutos. NTM contendo 338µg/ml 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT, Boehringer Mannheim 1087479, solubilizado em 70% de dimetilformamide) e 175µg/ml 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-fosfatase (BCIP, Boehringer Mannheim 760994, solubilizada em 100% de dimetilformamide) foi pipetado sobre os cortes e as lâminas colocadas em local protegido da entrada de luz. A reação de coloração foi monitorada cautelosamente em microscópio óptico de luz. A reação era interrompida com lavagens em PBT, quatro vezes por cinco minutos cada, por fim as lâminas ficaram imersas em PBT durante toda noite.

No último dia, as lâminas foram lavadas em H₂O deionizada por cinco minutos e montadas com meio de montagem Aquamount (BDH) sem contracoloração.

Lâminas de controle positivo foram utilizadas, contendo tecidos de embriões de camundongos com 14,5 dias e dentes em fase de capuz, onde inúmeras células em apoptose foram localizadas no nó de esmalte nesta etapa, como descrito por VAAHTOKARI et al.⁹³, em 1996.

3.5 – Técnica hibridização in situ com radioisótopos e sondas RNAm

A sonda RNAm Bmp-4 utilizada, gentilmente fornecida pela Drs. V. Rosen e E. Wang (Instituto de Genética, Cambridge, Massachusetts), foi obtida a partir do fragmento 285bp do cDNA de Bmp-4 de murinos inserido dentro do vetor pGEM3 (Promega) e digerido com EcoRI para síntese da sonda sense (controle negativo) e PstI para antisense (controle positivo).

A sonda gelatinase B de camundongos usada neste experimento foi gentilmente fornecida pelo Dr. K. Tryggvason (Universidade de Oulu, Finlândia). A síntese das sondas sense e antisense RNAm da gelatinase B foi feita a partir do clone M92KD-2 cDNA de camundongos cortado pelas enzimas de restrição SmaI e EcoRI e o fragmento resultante 323bp foi clonado dentro de plasmídios vetores pSP64 (sense) e pSP65 (antisense) (Promega). Os plasmídios sense e antisense foram linearizados com as enzimas EcoRI e BamHI, respectivamente.

Uma lâmina de cada grupo de secções idênticas de caninos e incisivos decíduos foi utilizada para reação de hibridização in situ com a sonda RNAm Bmp-4 e outra para gelatinase B, marcadas com o radioisótopo [³⁵S]O₄-UTP. Para ambas as sondas o protocolo adotado foi o mesmo descrito no trabalho desenvolvido por VAINIO et al.⁹⁵, em 1991.

As sondas marcadas com radioisótopos e linearizadas foram precipitadas em álcool absoluto, dissolvidas em solução de hibridização tampão e usadas com radioatividade entre 100.000 e 120.000 cpm/2µl.

As lâminas foram pré-tratadas antes de se iniciar propriamente a técnica de hibridização, fez-se a desparafinização dos cortes seguido por lavagens em PBS, digestão com proteinase K, lavagem com anidrido acético para inativar a proteinase e evitar background, finalizando com a hidratação em álcool. A digestão protéica altera a membrana citoplasmática e a torna mais permeável para a sonda. Este pré-tratamento apresenta importância no resultado final da técnica, por aumentar o

acesso da sonda na molécula de DNA ou RNAm alvo, enquanto mantém a morfologia do tecido e reduz ligações não específicas. Dando prosseguimento à técnica, aproximadamente 100µl de sonda foi especificamente pipetada sobre cada lâmina, sendo incubadas durante toda a noite em estufa com temperatura de 52°C dentro de câmaras umidificadas bem lacradas.

No dia seguinte, na etapa pós-tratamento de hibridização, as lâminas foram lavadas em diferentes soluções aquecidas para interrompimento da reação de hibridização in situ e remoção de sondas não ligadas, culminando com a desidratação dos cortes. Após as lâminas estarem secas foram colocadas em bandejas cobertas durante toda a noite em temperatura ambiente.

Em prosseguimento, no dia seguinte, foi feita a autorradiografia dos cortes para detecção dos sinais emitidos pelos híbridos marcados com radioisótopos. Nesta etapa, as lâminas foram imersas por dois segundos em emulsão para filme autorradiográfico em câmara escura, onde permaneceram em bandejas por algumas horas até a emulsão secar. Posteriormente, todas as lâminas foram armazenadas em caixas pretas bem lacradas, impedindo a entrada de luz e colocadas em refrigerador com temperatura +4 °C por 14 dias. Durante esta fase as moléculas radioativas presentes nos cortes sensibilizam a emulsão, possibilitando a visualização final da expressão do RNAm.

Após duas semanas, as lâminas foram reveladas no interior de câmara escura utilizando-se revelador, água e fixador, como uma fotografia. Depois das lâminas lavadas em água destilada, foram coradas em hematoxilina por 40 segundos e desidratadas em diferentes gradações de álcool e xilol. As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e meio de montagem DePex.

Na técnica de hibridização in situ o uso da sonda sense, específica para cada proteína, funciona como controle negativo e para ambas as sondas utilizaram-se duas lâminas em cada reação, onde não se observou expressão de proteínas. Como controles positivos foram usados tecidos embrionários de camundongos, os quais em trabalhos anteriores já haviam sido avaliados quanto à expressão positiva das sondas

em questão. Estes tecidos responderam positiva e especificamente às reações realizadas neste estudo.

No apêndice, encontra-se cópia dos protocolos da técnica TUNEL modificada e da hibridização in situ com radioisótopos seguidos neste trabalho e adotados atualmente no Laboratório coordenado pela Dr^a. Irma Thesleff, no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Helsinki, Finlândia.

3.6 – Análise microscópica e registro dos resultados

A análise microscópica dos espécimes foi realizada de acordo com a técnica laboratorial empregada, segundo as peculiaridades de cada uma. Os resultados obtidos serão apresentados de forma descritiva obedecendo aos critérios estabelecidos a seguir.

3.6.1 - Coloração de hematoxilina e eosina (HE)

Os cortes corados em HE contendo incisivos e caninos decíduos superiores e inferiores e os respectivos germes dos permanentes foram analisados em microscopia óptica baseando-se nos seguintes aspectos morfológicos:

- ⇒ grau da rizólise;
- ⇒ localização das áreas de reabsorção dentária fisiológica;
- ⇒ integridade dos tecidos dentários;
- ⇒ distribuição dos clastos nas áreas de rizólise;
- ⇒ posicionamento do folículo do dente permanente;

- ▢ presença ou ausência de osso entre o dente decíduo e seu respectivo permanente.

As imagens dos cortes microscópicos corados em HE contendo incisivos e caninos decíduos em diferentes etapas de rizólise foram digitalizadas do esteriomicroscópio Nikon SMZ-U usando a câmera Kodak DC120 e transferidas para o Programa Adobe Photoshop 4.0.

3.6.2 - Técnica TUNEL modificada

A técnica TUNEL modificada tem como princípio a marcação de células em apoptose com uma coloração específica, neste experimento estas células mostravam-se arroxeadas sem contracoloração, quando observadas em microscópio óptico de luz. Alguns critérios nesta etapa foram considerados na análise dos resultados obtidos com este método, são eles:

- ▢ considerar para este trabalho somente células marcadas envolvidas diretamente com o dente decíduo e/ou com o processo de rizólise;
- ▢ definir o tipo de célula detectada positivamente pelo método e sua localização;
- ▢ associar a marcação positiva com as características morfológicas próprias da célula em apoptose;
- ▢ relacionar a fase da rizólise com as células apoptóticas evidenciadas.

Estes resultados foram avaliados em microscopia óptica e as imagens digitalizadas usando câmera CCD Cohu 4912 (Cohu, Inc.) e placa Scion LG-3 Frame Grabber (Scion Corporation) com software NIH Image 1.61.

3.6.3 - Técnica hibridização in situ

Neste método, os resultados foram analisados em microscopia óptica de luz e de campo escuro, caracterizando positividade na expressão do RNAm em questão, quando em campo escuro observavam-se aglomerados de pontos brancos, emitidos pela sensibilização dos radioisótopos no filme. Esta expressão era avaliada quanto à sua localização tecidual, em microscopia de luz e os resultados do campo escuro confirmados. Independente do tipo de sonda, uma expressão positiva nesta metodologia apresenta-se da mesma forma. Nesta técnica, os seguintes tópicos foram considerados na análise dos resultados, obtidos tanto com a sonda Bmp-4 quanto com a gelatinase B.

Em campo escuro:

- ▢ localizar a expressão do RNAm;
- ▢ relacionar a expressão positiva com o processo de rizólise decídua;

Em microscopia de luz:

- ▢ localizar a expressão positiva do RNAm no tecido, buscando caracterizar o tipo de célula que apresentava esta marcação;
- ▢ correlacionar sempre com as imagens observadas no campo escuro.

Cada corte microscópico foi digitalizado em microscopia óptica de luz e de campo escuro no mesmo aumento e enquadramento, usando câmera CCD Cohu 4912 (Cohu, Inc.) e placa Scion LG-3 Frame Grabber (Scion Corporation) com programa NIH Image 1.61, obtendo no final duas imagens diferentes do mesmo corte.

4 - RESULTADOS

4 - RESULTADOS

Os dados obtidos em cada método empregado serão descritos detalhadamente, com base nos critérios definidos no tópico anterior e correlacionados com as imagens microscópicas. Após descrição isolada dos resultados será feita uma inter-relação das marcações encontradas na técnica TUNEL e na hibridização in situ com Bmp-4, dando ênfase a reabsorção dentária fisiológica.

4.1 – Coloração de hematoxilina e eosina (HE)

Os cortes microscópicos corados em HE permitiram uma análise morfológica detalhada dos tecidos e dos estádios da rizólise. As imagens panorâmicas em HE apresentadas neste trabalho, oferecem uma visão global dos espécimes utilizados e estarão correlacionadas com as imagens em aumento maior exibidas nas outras metodologias. Na visão panorâmica, vê-se o dente decíduo e sua relação com os tecidos circunvizinhos, inclusive com o respectivo folículo do dente permanente. Os incisivos e caninos decíduos encontravam-se em diferentes estádios de reabsorção fisiológica e serão descritos separadamente.

O gato possui seis incisivos superiores e inferiores em ambas as dentições e com dois meses de vida pós-natal, estes dentes decíduos apresentam áreas evidentes de reabsorção, principalmente no terço apical dos dentes. Quanto ao grau de reabsorção, observaram-se algumas variações entre os diferentes incisivos, entretanto a maioria apresentava o cemento e a dentina reabsorvidos apicalmente. Nestes dentes, foram identificadas reabsorções externas e, às vezes, também interna. Nas áreas de reabsorção dentária, evidenciaram-se lacunas de Howship preenchidas por inúmeros clastos multinucleados. Geralmente, as reabsorções dentárias revelavam-se em fase ativa e localizadas no mesmo lado do folículo do permanente. A proximidade do folículo dentário do permanente com seu respectivo

decíduo era diretamente proporcional ao grau de rizólise. Entre estes dentes, já não se observava tecido ósseo interpondo-os e o desaparecimento focal do ligamento periodontal, sem a formação de anquiloses alvéolo-dentárias (Figura 6).

Os gatos possuem quatro caninos em cada dentição e com dois meses pós-natal os decíduos apresentam-se em fase final de formação e inicia-se a reabsorção fisiológica. Em alguns caninos não se observavam áreas de reabsorção fisiológica, apenas discreta desorganização nos cementoblastos, geralmente localizados na porção apical e no mesmo lado do folículo dentário. Nesta fase, encontrava-se osso alveolar separando as duas dentições, evidenciando-se ativa reabsorção óssea no terço apical e sobre o germe do permanente, com inúmeros clastos multinucleares. Outros caninos decíduos apresentavam discretas áreas de reabsorção ativa associadas a clastos, com envolvimento somente do tecido cementário e/ou dentinário. Estas reabsorções localizavam-se na porção apical na mesma direção dos respectivos permanentes e se observava tecido ósseo entres eles (Figura 7).

Ocasionalmente, áreas focais de reabsorção radicular no terço apical e médio, dos caninos decíduos eram observadas, contraposto ao folículo dentário. Reabsorções dentárias reparadas com tecido cementóide não foram visualizadas nos espécimes examinados. Não foi observado nenhum tipo de infiltrado inflamatório no tecido pulpar e periodontal e áreas de anquiloses alvéolo-dentárias.

FIGURA 6 - **A e B:** Cortes microscópicos de incisivos decíduos de gatos, em visão panorâmica, corados em HE, revelando estádios diferentes de reabsorção dentária fisiológica. Topograficamente, a rizólise associa-se ao folículo dentário do dente permanente. [P= permanente, D= decíduo]. (aumento original: A e B $\cong$ 16x).

4.2 – Técnica TUNEL modificada

Esta metodologia possibilitou a localização precisa e específica de células apoptóticas e as imagens digitalizadas, após tratamento no Adobe Photoshop 4.0 encontram-se na coloração azulada, estando as células positivamente marcadas em azul escuro.

Nos incisivos decíduos com rizólise avançada comprometendo externa e internamente a estrutura do dente, o número de células positivas não era muito expressivo. Na face oposta da reabsorção, encontravam-se eventuais cementoblastos e fibroblastos, localizados na polpa e no ligamento periodontal, em apoptose.

Tanto em incisivos quanto em caninos com discretas áreas de reabsorção fisiológica, observavam-se cementoblastos apoptóticos aleatoriamente marcados, geralmente próximos às áreas de reabsorção dentária e do folículo dentário. No tecido pulpar, evidenciavam-se inúmeros fibroblastos em apoptose e ao longo do ligamento periodontal adjacente ao germe do permanente. Grupos de células arranjadas em ilhotas ou cordões no ligamento periodontal foram também marcadas positivamente, com características morfológicas sugestivas dos restos epiteliais de Malassez.

Nos dentes com raízes íntegras muitos cementoblastos encontravam-se marcados positivamente pela técnica TUNEL, com características morfológicas bem definidas da morte programada, como a compactação celular e formação de corpúsculos apoptóticos. Estas células foram observadas nos terços apical e médio da raiz sem obedecer a algum padrão de distribuição. No ligamento periodontal, células estreladas e fusiformes, isoladas, encontravam-se fortemente marcadas com coloração azul escuro, caracterizando fibroblastos. Ainda, células arredondadas grandes eram evidenciadas sugerindo macrófagos com corpúsculos apoptóticos fagocitados e células agrupadas caracterizando os restos de Malassez. Na polpa, eventuais odontoblastos foram observados positivamente, além de fibroblastos dispersos (Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 13).

Em áreas de reabsorção dentária externa bem estabelecidas, os cementoblastos encontravam-se ausentes e não se detectaram células apoptóticas. Todas as células marcadas positivamente eram também analisadas quanto à sua morfologia, buscando-se avaliar as alterações morfológicas clássicas sofridas pelas células desde a ativação da apoptose até a formação dos corpúsculos apoptóticos.

FIGURA 8 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A**, observa-se o terço médio radicular, íntegro, de canino decíduo de gato. Em **B**, maior aumento dos cementoblastos pavimentando o tecido cementário e eventuais fibroblastos na polpa e no ligamento periodontal marcados pelo TUNEL (setas). Em **C**, notam-se os cementoblastos em apoptose (setas) evidenciados pela marcação intensa e homogênea das células. [D= decíduo; c= cimento; d= dentina; p= polpa; l= ligamento periodontal; od= odontoblastos]. (aumento original: A $\cong$ 40x, B $\cong$ 100x, C $\cong$ 160x).

FIGURA 9 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A**, nota-se a porção lateral do incisivo decíduo de gato, contraposto ao folículo dentário, evidenciando-se células apoptóticas. Em **B** observa-se em destaque os cementoblastos em apoptose (setas) ao longo do cimento. [D= decíduo; c= cimento; d= dentina; p= polpa; l= ligamento periodontal; o= osso alveolar]. (aumento original: A $\cong$ 40x, B $\cong$ 100x).

FIGURA 10 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A**, observa-se canino decíduo de gato apresentando áreas iniciais de reabsorção dentária fisiológica e tecido cementário íntegro. Em **B**, detalhe morfológico da interface cimento/ligamento periodontal, revelando a ausência gradativa dos cementoblastos induzida pela apoptose (setas) ao longo do cimento. [D= decíduo; c= cimento; d= dentina; p= polpa; l= ligamento periodontal; rd= reabsorção dentária]. (aumento original: A $\cong$ 40x, B $\cong$ 100x).

FIGURA 11 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A**, observa-se visão parcial do ligamento periodontal do canino decíduo de gato. Em **B**, maior aumento da região, destaca-se exuberante marcação de células no tecido periodontal, com características morfológicas sugestivas de restos epiteliais de Malassez e fibroblastos (setas). [D= decíduo; c= cimento; d= dentina; l= ligamento periodontal]. (aumento original: A $\cong$ 100x, B $\cong$ 160x).

FIGURA 12 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A** e **B** nota-se tecido pulpar de canino decíduo de gato com numerosos fibroblastos dispersos, em apoptose (setas). [D= decíduo; d= dentina, od= odontoblastos; p= polpa]. (aumento original: A e B $\cong$ 100x).

FIGURA 13 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A**, observa-se face contralateral ao folículo dentário, exibindo o ligamento periodontal do terço médio do canino decíduo de gato. Em **B e C**, distingue-se a nítida positividade de fibroblastos (setas) e restos epiteliais de Malassez (setas) em apoptose, respectivamente. [D= decíduo; c= cimento; d= dentina; p= polpa; l= ligamento periodontal]. (aumento original: A $\cong$ 40x, B $\cong$ 100x, C $\cong$ 160x).

4.3 – Técnica hibridização in situ com sonda RNAm Bmp-4

A aplicação da técnica de hibridização in situ com radioisótopos, usando a sonda Bmp-4 ligante nos espécimes em análise, possibilitou visualizar a expressão desta molécula durante o processo de reabsorção dentária fisiológica. Sua expressão era caracterizada pela localização de pontos brancos em microscopia de campo escuro, agrupados ou espalhados pelos tecidos. A descrição destes resultados será contextualizada de forma global sem considerar a classificação dos dentes, pois não havia diferença na expressão entre incisivos e caninos. Esta molécula tem como característica própria, expressar-se de forma mais dispersa e fraca.

Nos dentes decíduos, a Bmp-4 ligante encontrava-se eventualmente expressa em odontoblastos contíguos e com frequência nos cementoblastos localizados na terço apical e médio da raiz, sem necessariamente com inter-relação com o folículo dentário. A expressão de Bmp-4 nestas células era descontínua e não obedecia a um padrão de distribuição estereotipado. Na região de ligamento periodontal, observou-se ocasionalmente expressão desta molécula, visualizadas como pontos focais encontrados na região cervical e/ou média do tecido periodontal. A Bmp-4 também estava expressa nos germes dos permanentes, especificamente localizada nos ameloblastos, apresentando uma distribuição contínua e intensa. Esta expressão apesar de envolver a dentição permanente foi considerada na avaliação destes resultados, por estar provavelmente relacionada com o desencadeamento da rizólise.

4.4 – Inter-relação entre Bmp-4 ligante e apoptose

Os resultados encontrados em cortes idênticos, com a técnica TUNEL modificada e com a hibridização in situ da sonda Bmp-4, após terem sido analisados individualmente foram inter-relacionados. Em vários grupos de secções idênticas verificou-se nas mesmas células marcação positiva para apoptose e Bmp-4. Esta

inter-relação de marcações foi vista principalmente nos cementoblastos revestindo o cimento do dente decíduo e em células constituintes do ligamento periodontal, como fibroblastos e restos epiteliais de Malassez. As marcações positivas encontravam-se no mesmo local do tecido e obedecendo a um padrão semelhante de distribuição (Figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25).

A correlação destes resultados busca responder um dos principais propósitos originais deste trabalho: localizar o “gatilho biológico” da reabsorção dentária fisiológica.

FIGURA 14 – Em **A e B** observa-se a expressão de Bmp-4 nos cementoblastos (setas) com distribuição descontínua ao longo do terço apical de canino decíduo de gato. A mesma marcação pode ser visualizada nos ameloblastos (setas) do germe do canino permanente, com padrão uniforme. [P= permanente; D= decíduo; a= ameloblastos; c= cimento; d= dentina; p= polpa]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

FIGURA 15 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A**, observa-se visão panorâmica do ápice de canino decíduo de gato sem reabsorção fisiológica. Em **B**, maior aumento, nota-se o terço apical do dente decíduo com cementoblastos em apoptose (setas). [P= permanente; D= decíduo; c= cimento; d= dentina; p= polpa]. (**A e B**= microscopia de luz; aumento original: A $\cong$ 40x, B $\cong$ 100x).

FIGURA 16 – Em **A e B** observa-se no terço médio do canino decíduo do gato, marcação linear de Bmp-4 localizada nos cementoblastos (setas) paralela à expressão dos odontoblastos na polpa. Na porção superior do canino permanente, evidencia-se intensa positividade para Bmp-4 nos ameloblastos (seta). [P= permanente; D= decíduo; a= ameloblastos; c= cimento; d= dentina; p= polpa]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

FIGURA 17 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A** evidencia-se o terço médio da raiz de canino decíduo de gato. Em **B** observa-se maior aumento da raiz em fase inicial de reabsorção, destacando-se a discreta irregularidade do cimento e coloração acentuada dos cementoblastos em apoptose (setas). [P= permanente; D= decíduo; c= cimento; D= dentina; p= polpa]. (**A e B**= microscopia de luz; aumento original: A $\cong$ 40x, B $\cong$ 100x).

FIGURA 18 – Em **A e B** observa-se o terço médio de canino decíduo de gato, na face oposta ao germe do permanente, apresentando discreta expressão de Bmp-4 nos odontoblastos e cementoblastos (setas). [D= decíduo; od= odontoblastos; c= cemento; d= dentina; l= ligamento periodontal; p= polpa]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

FIGURA 19 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A** observam-se os cementoblastos, em apoptose (setas), no terço médio da raiz do canino decíduo de gato. Em **B**, visão ampliada de outra área da raiz, evidenciam-se alguns cementoblastos e fibroblastos no ligamento periodontal marcados positivamente pelo TUNEL (setas). [D= decíduo; c= cemento; d= dentina; p= polpa, o= osso; l= ligamento periodontal]. (**A e B**= microscopia de luz; aumento original: A $\cong$ 40x, B $\cong$ 100x).

FIGURA 20 – Em **A e B** observa-se a face lateral íntegra da raiz de canino decíduo de gato, na qual os cementoblastos expressam forte positividade para Bmp-4 (setas). [P= permanente; D= decíduo; c= cemento; d= dentina; l= ligamento periodontal; p= polpa]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

FIGURA 21 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A**, observa-se o mesmo enquadramento da imagem anterior. Em **B**, nota-se detalhe da desorganização topográfica dos cementoblastos, com eventuais fibroblastos e cementoblastos em apoptose (setas) no ligamento periodontal. [P= permanente; D= decíduo; c= cemento; d= dentina]. (**A e B**= microscopia de luz; aumento original: A $\cong$ 40x, B $\cong$ 100x).

FIGURA 22 – Em **A e B**, nota-se exuberante e difusa expressão de Bmp-4 nos cementoblastos e nas células constituintes do ligamento periodontal, fibroblastos e restos epiteliais de Malassez (setas), no terço médio da raiz de canino decíduo de gato. [P= permanente; D= decíduo; a= ameloblastos; c= cimento; d= dentina; l= ligamento periodontal; p= polpa]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

FIGURA 23 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A**, nota-se em visão panorâmica o terço médio da raiz de canino decíduo de gato, com destaque do ligamento periodontal. Em **B** observam-se fibroblastos em apoptose e prováveis corpúsculos apoptóticos (setas) no tecido periodontal. [P= permanente; D= decíduo; c= cimento; d= dentina; l= ligamento; p= polpa]. (**A e B**= microscopia de luz; aumento original: A $\cong$ 40x, B $\cong$ 100x).

FIGURA 24 – Em **A** e **B** observa-se intensa expressão de Bmp-4 (setas) nos fibroblastos do ligamento periodontal e nos restos epiteliais de Malassez. [D= decíduo; c= cimento; d= dentina; l= ligamento periodontal; p= polpa]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

FIGURA 25 – Marcação de células apoptóticas pela técnica TUNEL modificada. Em **A**, nota-se em menor aumento a região lateral do canino decíduo de gato, evidenciando inúmeras células marcadas pela técnica TUNEL no ligamento periodontal. Em **B**, visão aproximada, dos cementoblastos, fibroblastos e prováveis restos de Malassez, em apoptose (setas). [D= decíduo; c= cimento; d= dentina; p= polpa; l= ligamento]. (**A** e **B**= microscopia de luz; aumento original: A $\cong$ 40x, B $\cong$ 100x).

4.5 – Técnica hibridização in situ com sonda RNAm gelatinase B

A metaloproteinase gelatinase B, sintetizada por clastos, encontra-se expressa nestas células durante a atividade de reabsorção dentária. Esta proteína tem um padrão de expressão bem localizado e forte, evidenciado neste caso por radioisótopos. Neste trabalho, a gelatinase B foi amplamente encontrada, apresentando resultados específicos e evidentes. Relacionada aos dentes decíduos, a gelatinase B só foi evidenciada quando o dente mostrava-se em franca reabsorção externa e ou interna, estando a expressão situada nos clastos localizados nas lacunas de Howship. No tecido ósseo envolvendo o germe do permanente, a gelatinase B também encontrava-se fortemente expressa, especialmente em áreas adjacentes ao folículo dentário e ao osso alveolar do ligamento periodontal na dentição decídua. A forma de expressão da gelatinase B observada nos clastos relacionados à reabsorção dentária e óssea não apresentou diferenças. A marcação desta proteína era tão intensa e focal, podendo ser observada como pontos brancos em microscopia de campo escuro e como pontos pretos em microscopia óptica (Figuras 26, 27, 28, 29, 30, 31 e 32).

FIGURA 26 – Em **A** e **B**, observa-se rizogênese no germe do canino permanente de gato, com destaque para os numerosos clastos marcados pela expressão da gelatinase B (setas), pavimentando as áreas de reabsorção óssea apical ativa. [P= permanente; o= osso; pd = papila dentária]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

FIGURA 27 – Em **A** e **B**, nota-se tecido ósseo circunjacente ao folículo dentário exibindo exuberante marcação de clastos (setas) em estreita relação com as extensas áreas de reabsorção óssea alveolar. [P= permanente; o= osso; f= folículo dentário]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

FIGURA 28 – Observa-se em **A e B** a expressão de gelatinase B nos clastos (setas), revestindo predominantemente os espaços medulares do tecido ósseo sobrejacente ao germe dentário em erupção. [P= permanente; o= osso]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

FIGURA 29 – Em **A e B**, nota-se a ampla distribuição de clastos expressando gelatinase B (setas), em áreas de reabsorção óssea ativa, sobrejacente ao folículo dentário. [o= osso]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

FIGURA 30 – Observa-se em **A** e **B** área de franca reabsorção dentária em incisivo decíduo de gato, com clastos (setas) representando nítida expressão da gelatinase B. [P= permanente; D= decíduo: d= dentina; p= polpa; o= osso; rd= reabsorção dentária]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

FIGURA 31 – Em **A** e **B**, notam-se áreas concomitantes de reabsorção dentária e óssea, revestidas por clastos expressando gelatinase B (setas), exibindo ao centro o germe do dente permanente de gato. [P= permanente; D= decíduo; o= osso; rd= reabsorção dentária]. (**A**= associação das imagens de microscopia de luz e marcação com radioisótopos; **B**= marcação com radioisótopos em campo escuro; aumento original: A e B $\cong$ 40x).

5 - DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Concepção do trabalho

Este trabalho teve início real com um questionamento elaborado em 1986: o que induz a reabsorção dentária nos dentes permanentes? A busca na literatura revelou evidências a partir do trabalho de LINDSKOG; BLOMLÖF; HAMMARSTRÖM³⁸, em 1987, no qual compararam a resposta de osteoblastos e cementoblastos frente ao paratormônio (PTH), um potente estimulador da reabsorção óssea. Esta constatação ajuda a explicar porque os dentes não reabsorvem fisiologicamente como o osso e participam do turnover ósseo. Diante da resposta negativa dos cementoblastos em contato com PTH, atribuiu-se um papel fundamental dos cementoblastos na proteção da superfície radicular às reabsorções, provavelmente por não apresentarem receptores para este hormônio. Porém, TENORIO; HUGES⁸⁵ em 1996, ao estudarem a expressão de receptores do PTH em dentes de ratos, observaram a expressão desta proteína nos cementoblastos do cimento celular e não localizaram positividade nas células presentes no cimento acelular. O PTH, quando localizado nos cementoblastos mostrou-se fracamente expresso, já nos osteoblastos esta expressão apresentava-se mais intensa.

Estas diferenças na expressão de receptores celulares para específicos mediadores, como o PTH, devem ser analisadas sob a ótica da evolução filogenética entre as espécies. Por exemplo, o cimento celular do terço apical de molares de ratos, apresenta contínua formação e reabsorção, como observou-se nos trabalhos de PEREIRA⁵⁶ e VASCONCELOS⁹⁶.

A ausência e/ou escassa presença de receptores de paratormônio nos cementoblastos apresenta-se como uma explicação lógica e coerente para a responder à questão da não ocorrência de reabsorção fisiológica nos dentes permanentes. Esta teoria pode ser enriquecida por outras explicações, como liberação de mediadores químicos autócrinos ou parácrinos, capazes de aumentar a

resistência e até prolongar a vida de cementoblastos, pela inibição da apoptose, mesmo em alguns ambientes bioquimicamente hostis.

Apesar de existir teorias tentando explicar o questionamento primariamente levantado, o assunto permanece sem esclarecimentos comprobatórios; nesta mesma cadeia de raciocínio surgiu uma outra pergunta: como explica-se a reabsorção fisiológica na dentição decídua?

A partir deste novo questionamento elaboramos uma hipótese: após a finalização da odontogênese na dentição decídua, gradativamente os cementoblastos e os odontoblastos entrariam em apoptose, expondo a estrutura dentária mineralizada. O efeito quimiotático dos cristais de hidroxiapatita e afinidade das proteínas dentinárias (osteopontinas) com integrinas da membrana citoplasmática de clastos^{71,80}, levaria à constituição da unidade óssea osteorremodeladora (BMU) na superfície dentária decídua iniciando assim a rizólise fisiológica. Neste processo, a morte programada dos cementoblastos e odontoblastos funcionaria como o “gatilho biológico” da reabsorção fisiológica e mediadores parácrinos e/ou autócrinos induziriam a apoptose.

Ainda complementando esta hipótese, o folículo dentário ou pericoronário ou mesmo este em conjunto com o germe do permanente funcionariam como principal fonte de mediadores capazes de manter e acelerar a reabsorção dentária fisiológica até a exfoliação, da mesma forma como estimularia a reabsorção periférica do osso alveolar durante a erupção. Este raciocínio pode explicar o lento processo de rizólise observado em dentes decíduos associados à anodontia do sucessor.

Com base nos raciocínios desenvolvidos, surgiu-nos o interesse em estudar o “gatilho biológico” da reabsorção dentária fisiológica, culminando na elaboração deste trabalho.

5.2 – Apoptose e reabsorção dentária fisiológica

Desde os primeiros estudos sobre reabsorção dentária fisiológica, descritos elegantemente por RUDOLPH KRONFELD³⁷ em 1932, já se discutia sobre os fatores biológicos indutores deste fenômeno. A rizólise decídua era caracterizada como um mecanismo intrínseco, programado pelo próprio organismo e atribuía-se um papel temporal secundário ao folículo dentário do germe do permanente, pela reabsorção se desenvolver lentamente, mesmo com sua ausência. Estas mesmas especulações foram feitas por outros autores, mas ainda hoje encontram-se sem comprovação⁴².

A reabsorção dentária fisiológica caracteriza-se como um processo silencioso, sem danos para o organismo, encontrando-se na literatura inúmeras descrições microscópicas de desaparecimento (degeneração ou regressão) de cementoblastos, fibroblastos e odontoblastos no dente decíduo em rizólise, sem estabelecimento da relação causa e efeito. ANDERSON; TEN CATE³, em 1986, estudando a reabsorção fisiológica em dentes decíduos de felinos, especialmente as alterações sofridas no ligamento periodontal, detectaram morfológicamente apoptose nos fibroblastos deste tecido, justificando a regressão do ligamento periodontal durante a reabsorção fisiológica.

Em 1989, DARD; KEREBEL; KEREBEL¹² evidenciaram por meio de microscopia eletrônica de transmissão, alterações morfológicas nos fibroblastos de polpas de caninos decíduos em rizólise. Os fibroblastos pulparem sofriam regressão, com modificações no citoplasma, citoesqueleto e dissociação das células e de fibrilas.

A apoptose está envolvida em diferentes processos de desenvolvimento, tendo como exemplos, a formação do palato secundário, a gênese do lúmen de órgãos ocos, o desaparecimento do tecido interdigital, ducto tireoglosso e na etiopatogenia de inúmeras doenças^{6,10,50,98,99}.

Em 1997, LOURENÇO; CONSOLARO³⁹ estudaram a participação da apoptose na odontogênese durante a fragmentação da lâmina dentária, bainha epitelial de

Hertwig e no desaparecimento dos ameloblastos e inferiram sobre um provável envolvimento com a etiologia de anomalias dentárias.

Todas essas evidências deram suporte à hipótese do envolvimento da apoptose no desencadeamento da reabsorção dentária fisiológica. Uma vez definido o foco central deste estudo buscou-se estabelecer o modelo animal ideal e metodologia capazes de permitir uma avaliação precisa e confiável.

5.3 – Modelo de estudo

No estudo das reabsorções dentárias fisiológicas os modelos mais utilizados são os dentes decíduos de humanos, cães e gatos. Nestes dois últimos, o processo de troca da dentição primária pela secundária apresenta-se semelhante ao observado na dentição humana, iniciando com a rizólise e exfoliação do decíduo e culminando com erupção do permanente.

Primeiramente, desenvolvemos um projeto piloto avaliando a presença da apoptose, com a técnica TUNEL modificada, em dentes decíduos humanos extraídos, com raízes parcialmente preservadas. Nesta avaliação, detectaram-se cementoblastos e odontoblastos em apoptose distribuídos aleatoriamente, confirmando-se a hipótese estabelecida. Diante destes achados, outra questão surgiu: qual(is) o(s) mediador(es) indutor(es) desta apoptose e de onde vem este(s) estímulo(s)?

Com este novo questionamento, evidenciou-se a necessidade de um modelo animal onde houvesse tanto a dentição decídua quanto a permanente e todos os tecidos circunjacentes, para uma avaliação mais completa e detalhada dos prováveis mediadores indutores da apoptose na rizólise decídua.

Nos experimentos sobre reabsorção fisiológica, a dentição decídua de gatos encontra-se amplamente utilizada como modelo de estudo, destacando-se os trabalhos de ANDERSON; TEN CATE³, em 1986; SHIGEYAMA et al.⁸⁰, em 1996;

SASAKI et al.^{74,75}, em 1989 e 1990, entre outros. Em comparação com cães, os gatos são menores e de fácil manuseio, justificando sua escolha como modelo experimental.

O processo de reabsorção radicular inicia-se gradativamente após a completa formação do dente, provocando a redução do comprimento das raízes e conseqüentemente ocorre perda das estruturas de suporte. Para o estudo do desencadeamento deste evento fisiológico deve-se utilizar principalmente dentes decíduos íntegros em finalização da odontogênese, sem extensas áreas de reabsorção dentária.

Num mesmo animal, encontram-se dentes em diferentes etapas de rizólise. Nos gatos com dois meses pós-natal, os incisivos encontravam-se em franca reabsorção enquanto os caninos apresentavam somente discreta alteração na sua morfologia sem evidentes áreas de reabsorção. Esta etapa e estes dentes foram selecionados para análise neste experimento.

Os resultados encontrados no trabalho piloto foram confirmados na dentição decídua de gatos, evidenciando-se cementoblastos especificamente marcados para a apoptose pela técnica TUNEL modificada, o mesmo ocorrendo com os fibroblastos na polpa e no ligamento periodontal, além dos restos epiteliais de Malassez.

5.4 – Estímulo da apoptose na rizólise

O rápido progresso na área de biologia molecular, com a introdução de técnicas laboratoriais sofisticadas e precisas tem permitido além da detecção da apoptose, estudar e localizar os mediadores indutores desta morte celular em eventos fisiológicos e patológicos. A apoptose pode ser induzida pela presença ou ausência de um sinal externo, levando à ativação do programa interno da morte celular programada.

VAAHTOKARI; ÄBERG; THESLEFF⁹³, em 1996, estudando a participação da apoptose na odontogênese, analisaram em cultura o envolvimento das moléculas EGF e FGF-4 na indução deste fenômeno. Os autores observaram a inibição da apoptose frente à aplicação destes mediadores nas células de tecido dentário.

Ao lado da capacidade de indução das BMPs na formação de osso e cartilagem, atualmente estuda-se seu papel como moléculas sinalizadoras, numa variedade de eventos durante a morfogênese e diferenciação celular. Dentre as diversas funções de sinalização, GRAHAM et al.²⁵, em 1993, descreveram a indução da morte programada de células da crista neural mediada pela proteína BMP-4. Desde então, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos correlacionando apoptose com a indução da BMP-4. As moléculas homólogas BMP-2 e BMP-7 apresentam também esta mesma capacidade de ativar a morte celular programada⁴¹.

Nesta mesma linha de investigação JERNVALL et al.³¹, em 1997, estudando a formação e o desaparecimento do nó de esmalte na odontogênese, identificou a apoptose como responsável pela regressão desta estrutura e ainda relacionou a expressão de Bmp-4 na indução desta morte programada. Outros trabalhos identificaram Bmp-4 ativando a apoptose nas células da crista neural rombocefálica²⁵, na região interdigital^{21,43,102} e na regressão de glândulas mamárias⁵⁹. Nestas circunstâncias, a molécula Bmp-4 normalmente mostra-se ativada por um mecanismo autócrino, induzindo a expressão do gene homeobox Msx-2^{43,59,94}. Na regressão de glândulas mamárias observou-se a expressão de Msx-2 regulada pelo hormônio estrógeno. As funções das moléculas Msx e Bmp pós-natal têm-se mostrado diferentes das observadas no período embrionário⁵⁹.

Para adentrarmos nos experimentos envolvendo a biologia molecular como as técnicas imuno-histoquímicas e hibridização in situ propusemos uma parceria científica neste projeto com o Instituto de Biotecnologia da Universidade de Helsinki, no grupo de pesquisa coordenado pela Dr^a. Irma Thesleff, visto que o tema está entre suas principais linhas de pesquisa.

Com embasamento na literatura, buscamos a expressão de Bmp-4 ligante pela técnica de hibridização in situ, para correlação futura com os dados obtidos com o

método TUNEL. A expressão de Bmp-4 foi especificamente localizada nos tecidos de gatos, em especial em células também marcadas pelo TUNEL. Cementoblastos focais revestindo o cemento do dente decíduo, bem como fibroblastos e restos epiteliais de Malassez presentes no ligamento periodontal, expressaram Bmp-4. Os ameloblastos do germe do permanente também expressaram intensamente esta molécula. A inter-relação dos resultados observados nas secções idênticas, permite-nos especular o envolvimento de Bmp-4 na indução da apoptose presente na reabsorção dentária fisiológica. O mecanismo de ação da BMP-4 ainda permanece em discussão havendo algumas hipóteses:

1. produzida pelos próprios cementoblastos e células do ligamento periodontal, com efeito autócrino ou intrácrino;
2. esta molécula sinalizadora pode advir de células presentes no ligamento periodontal do dente decíduo, caracterizando um efeito parácrino;
3. ou ainda, originar-se de células do osso alveolar, também pelo mecanismo parácrino;
4. efeito parácrino sintetizada pelas células do folículo dentário do germe do permanente;
5. produzida pelas células epiteliais do órgão do esmalte do germe do permanente, por um efeito parácrino.

Evidências já foram descritas na literatura mostrando o mecanismo autócrino de atuação da Bmp-4 na indução da morte celular programada em diferentes tecidos. Esta hipótese encaixa-se perfeitamente com os resultados encontrados neste trabalho e com observações clínicas.

Em pacientes com anodontia de dentes permanentes, os respectivos decíduos apresentam áreas focais de reabsorção radicular fisiológica, independente da

presença do germe do permanente. Estas áreas de reabsorção dentária fisiológica progridem de forma lenta e são reparadas parcialmente e na maioria das vezes a exfoliação destes dentes demora décadas para ocorrer. Neste caso, os próprios cementoblastos e células do ligamento periodontal sintetizam Bmp-4 e por efeito autócrino ou intrácrino induz a apoptose destas células, convergindo com a primeira hipótese descrita.

No processo de rizólise normal, quando se tem o folículo dentário do germe do permanente, esta reabsorção radicular fisiológica acontece de forma progressiva culminando normalmente com a exfoliação do decíduo. A expressão contínua e evidente da molécula Bmp-4 nos ameloblastos do germe do permanente pode explicar a possível influência destes dentes no processo da reabsorção dentária fisiológica. Os ameloblastos sintetizando Bmp-4, atuam como uma segunda fonte desta proteína, que por mecanismo parácrino pode induzir a apoptose nos cementoblastos e células do ligamento periodontal. Esta hipótese, explica a ocorrência de um processo de rizólise mais rápido e progressivo quando na presença do germe do permanente.

A evidência de Bmp-4 nos ameloblastos dos dentes permanentes pode confluir com uma das evidências do trabalho de LOURENÇO; CONSOLARO³⁹, em 1997, no qual detectou-se durante a erupção dentária o desaparecimento de ameloblastos reduzidos por apoptose; a expressão de Bmp-4 pode representar o mediador autócrino ou intrácrino para este fenômeno.

A cascata de mediadores sintetizados pelo folículo dentário, a IL-1, CSF-1, TGF- β e EGF¹⁰¹, além do PTHrP localmente encontrado⁵⁷, regulam a reabsorção do osso circunjacente, possibilitando a erupção do dente permanente. Estas moléculas ativadoras da reabsorção óssea provavelmente aceleram também o processo de reabsorção dentária, atuando como coadjuvantes na rizólise. Com ausência do folículo do permanente a rizólise acontece porém em velocidade e proporções menores.

Dentro o raciocínio desenvolvido, a origem de Bmp-4 na indução da apoptose na rizólise decídua, terá duas fontes diferentes: por mecanismo autócrino ou

intácrino dos próprios cementoblastos e células do ligamento periodontal e efeito parácrino oriundo dos ameloblastos do germe do permanente.

5.5 – Metodologia

Desde 1960, inúmeras técnicas foram aplicadas para estudar e detectar a morte celular programada, como o uso de sulfato de nilo azul ou o vermelho neutro, corantes vitais e supravitais aplicados em tecidos vivos. O azul de toluidina também foi indicado para estudar a apoptose em cortes microscópicos semifinos, onde células mortas ou seus fragmentos podem ser distinguidos de células saudáveis por apresentarem uma coloração mais intensa ou picnótica⁴⁶. A associação de azul de toluidina e safranina para observar células mortas em tecido embrionário, foi introduzido por MARTIN - PARTIDO et al.⁴⁶, em 1986. Em áreas embrionárias de morte celular, esta técnica corou células mortas com núcleo picnótico de azul diferindo das células vivas coradas de vermelho pálido. A afinidade do azul de toluidina por diferentes componentes químicos no núcleo picnótico, permite formar ligações fortes capazes de impedir a ligação da safranina. Em células vivas formam-se ligações fracas facilmente rompidas, havendo facilmente a substituição do azul de toluidina por safranina nestas células⁴⁶.

As características morfológicas clássicas e específicas, evidenciadas nas células em apoptose, permitem a avaliação deste fenômeno em microscopia óptica com cortes corados em HE. Esta metodologia de avaliação mostra-se subjetiva, podendo perder uma população de células apoptóticas pequena e transiente²². Nos cortes microscópicos corados em HE, neste experimento, não foi possível localizar morfológicamente, com precisão, células em apoptose relacionadas com o mecanismo da rizólise. Entretanto, na dissertação de mestrado, onde se estudou a morte celular programada na odontogênese, células apoptóticas em coloração de HE foram identificadas facilmente. A divergência dos resultados encontrados nesta

metodologia, mostra a falta de especificidade e sensibilidade do método, obtendo variações de acordo com o tipo de tecido e células estudadas.

A microscopia eletrônica também tem sido amplamente utilizada na avaliação morfológica da apoptose, caracterizando-se como um método sensível, embora apresente dificuldades na quantificação das células e quanto à disponibilidade do aparelho⁵⁸.

O método de eletroforese gel de agarose fornece uma resposta qualitativa na detecção da apoptose, porém são necessárias muitas células positivas para identificar o fenômeno caracterizado pela forma de “escada”. Ainda, esta metodologia, não distingue os tipos celulares acometidos pelo processo^{22,58}. Neste experimento, a técnica de eletroforese gel não era indicada, pois necessitava-se identificar o tipo e a localização das células em apoptose.

Em estudos, onde se necessite obter o número de células marcadas, esta contagem poderá ser feita manualmente ou utilizando o FACS, um software próprio para efetuar a contagem de forma precisa⁵⁸. A citometria de fluxo também propicia de forma simples e rápida meios de analisar grande números de células e quantificar populações específicas. A coloração com propidium iodide (PI) tem sido largamente usada para detectar e quantificar células apoptóticas. Para SCHWARTZ; BENNETT⁷⁸, o importante não é quantificar a apoptose, mas detectar sua ocorrência, por não se conhecer o período da morte celular capaz de reagir positivamente por cada técnica. A identificação de pequenas porcentagens de células apoptóticas marcadas *in situ* produz dados biologicamente significantes. Um tecido com taxa média de regressão de 25% por dia, pode resultar na visualização de somente 2-3% de células apoptóticas em determinado período de tempo⁷⁸.

Métodos recentes foram introduzidos para detecção da apoptose, como a fotografia por espaço de tempo, capaz de identificar e quantificar células apoptóticas. Esta técnica requer equipamento de alto custo e conhecimento específico, tornando-se um método de restrita aplicabilidade, mas elevada eficiência⁵⁸.

Técnicas imuno-histoquímicas marcando os principais sistemas de ligantes e receptores da apoptose, anticorpos detectando as caspases iniciadoras e executoras ou genes inibidores e promotores, têm tido aplicação laboratorial no estudo da morte celular programada. Estes marcadores imuno-histoquímicos apresentam indicações muito específicas, quanto ao tipo de material e a fase de enfoque da apoptose a ser analisada³⁰.

Neste experimento, optou-se pela aplicação da técnica TUNEL modificada, introduzida por GAVRIELI, SHERMAN, BEN SASSON²², em 1992. Esta reação engloba sistemas biológicos e histoquímicos, permitindo marcações sensíveis e específicas de DNA com cadeias terminais de 3'-OH, localizadas em células apoptóticas e passíveis de serem visualizadas em microscopia de luz. Esta técnica recebeu algumas modificações, como a substituição do sistema avidina - biotina pela digoxigenina - antidigoxigenina, mantendo-se o princípio original do método. A digoxigenina origina-se da planta medicinal *Digitalis*, não possuindo ligantes similares em tecidos animais e conseqüentemente, reduzindo reações cruzadas. Esta modificação aumentou a especificidade e reatividade do método²².

Em contraste, núcleos normais ou em proliferação, com um número relativamente insignificante de DNA com cadeias terminais de 3'-OH, não coram com este método. A técnica TUNEL pode corar estádios finais da apoptose, em sistemas celulares onde a condensação da cromatina está iniciando e os fragmentos são poucos, precedendo algumas alterações morfológicas. Células com morfologia de necrose podem, em alguns casos, conter concentrações de cadeias terminais de DNA coráveis, mas estas se encontram num contexto tecidual diferente do encontrado na morte programada. Geralmente na necrose, muitas células contíguas são afetadas, a características morfológicas não são estereotipadas e encontra-se infiltrado inflamatório na região²².

A seleção do método TUNEL modificado para estudar o fenômeno da apoptose na reabsorção dentária fisiológica baseou-se primordialmente na possibilidade de aplicação em cortes microscópicos. Neste experimento, a identificação e localização das células em apoptose eram essenciais para responder aos propósitos desta

investigação. Esta técnica marca células tanto no início quanto no final da apoptose, oferecendo maior abrangência na detecção do fenômeno e possibilitando a quantificação das células marcadas, se necessário. Corpúsculos apoptóticos dentro de macrófagos também podem ser detectados por este método, desde que os corpúsculos contenham fragmentos de DNA. A técnica TUNEL modificada, além de ser um método simples permitindo fácil reprodutibilidade, fornece resultados rápidos e precisos. Neste estudo, não havia importância o número de células em apoptose observadas e sim a detecção temporal do fenômeno nos tecidos.

Atualmente, observou-se a ocorrência da apoptose sem participação efetiva do núcleo, questionando-se as técnicas que utilizam como marcador específico o DNA fragmentado, como o método TUNEL²⁹. Neste experimento, não existiram dificuldades na marcação das células em estudo; se tivessem ocorrido, outra técnica que não envolvesse a marcação do DNA poderia ter sido utilizada. Por isso, torna-se necessário avaliar o método empregado para cada sistema de células²⁹.

Para localização da expressão de Bmp-4 e gelatinase B neste experimento, utilizou-se a técnica de hibridização in situ com sondas RNAm marcadas com radioisótopos.

HEIKINHEIMO; HAPPONEN²⁸, em 1991 descreveram detalhadamente os princípios, as vantagens e desvantagens da hibridização in situ, comparando-a com a imuno-histoquímica. A técnica de hibridização in situ capaz de localizar a expressão de um gene específico em células, foi introduzido por J.G. Gall e M.L. Pardue em 1969. Este método cada vez mais aplicado no campo da biologia celular, abriu uma nova era nas pesquisas e diagnósticos em patologia e os dados obtidos com este método complementam os conhecimentos já obtidos na imuno-histoquímica. Na hibridização in situ, localiza-se a transcrição de um gene responsável pela produção de um determinado componente de interesse específico. A imuno-histoquímica geralmente detecta o produto de um gene. O progresso na clonagem de seqüências de nucleotídeos de genes humanos e a introdução de métodos na preparação de sondas antisense, sensíveis e específicas, de filamentos únicos de RNA tem propiciado o uso da hibridização in situ no estudo das funções dos genes²⁸.

O princípio básico da técnica de hibridização *in situ* consiste na ligação de duas seqüências de nucleotídeos complementares mediada pela molécula de hidrogênio. Este mecanismo ocorre fisiologicamente *in vivo* entre filamentos complementares de DNA-DNA, DNA-RNA e RNA-RNA sob condições ideais de temperatura, pH e força iônica. No método de hibridização *in situ*, a ligação ocorre entre sondas, filamentos únicos complementares de DNA ou RNA (cDNA ou cRNA) de um gene específico, com DNA ou RNAm em células isoladas ou cortes microscópicos de tecidos. A formação do híbrido pode ser visível pelo acoplamento de um sinalizador na sonda, no caso deste experimento usou-se o radioisótopo [³⁵S], permitindo a visualização da reação em técnicas microscópicas de rotina²⁸.

O uso de marcadores radioativos oferece excelente resolução e sensibilidade e o tempo de exposição na autorradiografia apresenta-se relativamente menor. No lugar de radioisótopos pode-se usar marcadores não radioativos como biotina, fotobiotina e fluorocromos. As vantagens do uso destes marcadores está na facilidade de aquisição no comércio, baixo custo, rápida hibridização e sinais de detecção e riscos mínimos para a saúde. Entretanto, eles também possuem desvantagens como baixa sensibilidade e eficácia na hibridização e apresentam sinais com alto background.

A opção pelo uso de radioisótopos nesta investigação foi norteadada por diferentes fatores: seguir o mesmo protocolo adotado e de domínio nas pesquisas realizadas no Grupo de Desenvolvimento Biológico da Universidade de Helsinki, laboratórios preparados e adaptados para trabalhar com este marcador, incluindo todas as medidas de bioproteção, além dos radioisótopos oferecerem resultados mais qualificados.

Na técnica de hibridização *in situ*, localiza-se a expressão de um gene em células e na imuno-histoquímica, marca-se o produto da expressão, a proteína. Em situações que um polipeptídeo sintetizado encontra-se rapidamente degradado, a imuno-histoquímica não conseguirá detectá-lo. Neste caso, a hibridização *in situ* pode localizar o RNAm ativado na mesma célula. Por outro lado, se o RNA foi destruído nos tecidos, a imuno-histoquímica pode localizar a proteína sintetizada.

Outra situação interessante observa-se no estudo das proteínas da matriz extracelular, por exemplo a fibronectina e a tenascina, quando se objetiva a detecção de células responsáveis pela síntese faz-se o uso da hibridização. Caso o interesse seja a marcação destas proteínas e sua localização, a técnica mais indicada é a imuno-histoquímica. Este exemplo mostrou perfeitamente que a escolha da técnica a ser adotada em uma determinada investigação, deve guiar-se primeiramente pelo objetivo central do trabalho. Em segundo plano, deve-se avaliar as vantagens e desvantagens de cada técnica e principalmente seus princípios e indicações.

Um dos propósitos desta investigação era localizar a origem e o mediador indutor da apoptose na rizólise decídua, para isso selecionou-se o método de hibridização *in situ* por ter condições técnicas capazes de responder aos objetivos traçados. A imuno-histoquímica poderia ser uma outra opção técnica, porém marcaria somente a proteína, não informando precisamente o local de sua síntese.

Sondas de RNAm de camundongos e murinos foram usadas nos tecidos de gatos, para assegurar um resultado preciso e verídico, incluíram-se lâminas controle positivo contendo tecidos de camundongos com positividade para as moléculas em estudo. A expressão específica de sondas de camundongos em tecidos de gatos, pode ser explicada pela existência de genes homólogos entre as espécies, os quais não foram modificados na evolução, como bem estabelecido na família das BMPs.

O uso de secções idênticas para as diferentes metodologias empregadas foi fundamental para a correlação dos resultados e elaboração final de hipóteses dentro da mesma cadeia de eventos.

5.6 – Síntese do mecanismo de reabsorção dentária fisiológica

Com base na literatura e nos resultados encontrados neste estudo, diluidamente descritos e discutidos em tópicos anteriores, será descrita a hipótese da cascata de eventos responsáveis pela indução da reabsorção dentária fisiológica.

A cadeia inicia-se com a expressão da molécula Bmp-4 localizada nos cementoblastos e nas células do ligamento periodontal, como fibroblastos e restos epiteliais de Malassez, presentes no dente decíduo. Esta expressão ocorre após a finalização da odontogênese e por mecanismo autócrino ativa a morte programada destas células de forma lenta e gradativa. Pela incapacidade dos cementoblastos vizinhos, esgotados geneticamente ou com baixo índice mitótico, de repovoarem as áreas desnudas de cimento expostas com a morte destas células, desencadeia-se a reabsorção dentária.

As propriedades apresentadas pelo cimento, são as mesmas observadas na dentina, esmalte e osso capazes de atrair a unidade osteorremodeladora. As proteínas destes tecidos funcionam como antígenos seqüestrados; quando expostos, atraem células apresentadoras de antígenos (MHC) e a partir daí, inicia-se o processo de reabsorção fisiológica radicular.

A mesma cadeia de eventos, em fase mais tardia, ocorre com os odontoblastos. Estas células expressaram Bmp-4 e marcaram discretamente na técnica TUNEL. A manifestação destes eventos nos odontoblastos não foi muito explorada neste estudo, por terem apresentado marcações fracas e eventuais e os dentes decíduos encontrarem-se em fase inicial de rizólise. A degeneração ou desaparecimento dos odontoblastos durante a rizólise foi descrita em outros trabalhos, confirmando este fenômeno. A reabsorção fisiológica interna e externa evidenciada freqüentemente e normalmente nos dentes decíduos, confirma a linha de pensamento descrita.

A observação da apoptose nos fibroblastos e especialmente nos restos epiteliais de Malassez do ligamento periodontal corroboram com achados clínicos sobre a freqüência da anquilose alvéolo-dentária na dentição decídua⁴². Os restos epiteliais de Malassez são as estruturas periodontais aparentemente responsáveis pela manutenção do espaço periodontal, por liberarem mediadores e efetores parácrinos sob as BMU, induzindo a reabsorção óssea e assim evitando a instalação da anquilose.

Concomitantemente a estes eventos, o respectivo germe do permanente encontra-se em desenvolvimento e uma cascata de moléculas liberadas pelo folículo dentário induz a reabsorção do tecido ósseo sobrejacente ao permanente. Outras moléculas, como o PTH, também medeiam a reabsorção óssea, permitindo a erupção do dente. Nos ameloblastos do germe do permanente, observou-se intensa expressão de Bmp-4, possivelmente atuando como segunda fonte do mediador da apoptose na rizólise. Esta ativação ocorre por mecanismo parácrino e deve atuar de forma mais precisa quando o osso interposto entre os dentes estiver ausente. A Bmp-4 pode atuar também, de forma autócrina ou intrácrina, nos ameloblastos reduzidos do órgão do esmalte durante seu desaparecimento parcial por apoptose, como evidenciado por LOURENÇO; CONSOLARO³⁹, em 1997. Os mediadores liberados pelo folículo dentário capazes de induzir a reabsorção óssea podem também acelerar e manter a reabsorção dentária, pois ambas as reabsorções mostram mecanismos semelhantes. A participação dos ameloblastos e do folículo dentário do dente permanente, na síntese de moléculas atuantes no processo de rizólise, explica o possível papel do dente permanente como um elemento acelerador na reabsorção fisiológica.

Como “gatilho biológico” da rizólise tem-se a molécula Bmp-4 que de forma autócrina ou intrácrina induz a apoptose dos cementoblastos. Toda esta hipótese encaixa-se perfeitamente com situações encontradas clinicamente. Em pacientes com anodontia do permanente instalar-se-á a reabsorção no dente decíduo, mas o processo não progride rapidamente como em situações normais. Da mesma forma, aumenta a probabilidade clínica de instalação de anquiloses alvéolo-dentárias, pois os restos epiteliais de Malassez estão em franca apoptose.

Os ativadores da transcrição de Bmp-4 ainda permanecem obscuros, mas na regressão de glândulas mamárias identificou-se a participação de hormônios nesta indução. Um hormônio relacionado diretamente com a reabsorção óssea e erupção dentária e teoricamente relacionado na literatura com a rizólise decídua, trata-se do PTH. Pela reabsorção decídua ser definida como um processo fisiológico e sua ocorrência estar diretamente concatenada com uma faixa etária específica, permite especular o possível envolvimento de hormônios na indução da reabsorção

fisiológica, como o PTH. Estas inferências sobre o PTH ainda estão sob investigação sem dados precisos.

A localização de clastos na reabsorção dentária fisiológica pela marcação com a gelatinase B, possibilitou analisar a distribuição destas células na rizólise. Nos espécimes examinados, encontraram-se predominantemente mais áreas de reabsorção ativa com presença de inúmeros clastos do que áreas de repouso com aposição de tecido cementóide. Os aspectos descritos não coincidem com as características da rizólise observada em dentes decíduos humanos. Esta forma de rizólise mais rápida sem períodos de reparação, pode ser peculiar nos gatos, como também descrito por SASAKI et al.⁷⁶, em 1990. Em gatos e cães, do início da reabsorção fisiológica até a exfoliação ocorre em média de 3-4 meses, enquanto em humanos de 3-6 anos, justificando as diferenças de velocidade e características morfológicas na rizólise decídua entre as espécies. Há muito tempo estuda-se morfológica e histoquimicamente os clastos presentes na reabsorção óssea e dentária na tentativa de identificá-los como células iguais ou diferentes. Até o momento, este tópico permanece em discussão na literatura sem conclusões bem estabelecidas. Neste trabalho, os clastos localizados na reabsorção dentária apresentavam a mesma expressão de gelatinase B que os clastos encontrados no tecido ósseo em reabsorção, especialmente próximo ao folículo dentário. Estes resultados não finalizam as controvérsias existentes sobre o assunto, no entanto colaboraram informando que ambos os clastos expressam semelhantemente gelatinase B durante a reabsorção, independente do tipo de tecido. A maioria dos trabalhos desenvolvidos buscando a diferenciação destas células defende a idéia dos odontoclastos e osteoclastos serem as mesmas células. O termo odontoclasto foi introduzido por FURSETH²⁰ em 1968, mas optamos por usar o termo clasto, por acreditarmos se tratar do mesmo tipo celular presente tanto na reabsorção dentária quanto na óssea. A marcação de gelatinase B em clastos na reabsorção dentária, ainda não tinha sido relatada na literatura.

5.7 – Perspectivas e aplicação clínico-terapêuticas

Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa com propósito de estudar os eventos e sinais moleculares reguladores da reabsorção dentária fisiológica associada ao fenômeno da erupção dentária, especialmente a reabsorção óssea. Esta linha está sendo desenvolvido pela Disciplina de Patologia da FOB-USP em colaboração com o Grupo de Desenvolvimento Biológico, Universidade de Helsinki, Finlândia. A participação da apoptose e da molécula Bmp-4 no desencadeamento da reabsorção dentária fisiológica foi identificada neste trabalho, mas outras moléculas indutoras da morte celular programada como a Bmp-2 e Bmp-7 encontram-se sob investigação. A expressão de PTHrP ligante e seu respectivo receptor também está sendo avaliada por hibridização in situ, além de uma molécula marcadora de osteoblastos, Cbfa 1. A obtenção de todos estes dados contribui para a compreensão detalhada dos mecanismos reguladores da rizólise e da erupção dentária, mas isto não significa que outras moléculas não avaliadas, até por ainda não terem sido identificadas ou clonadas, também não atuem nestes eventos.

O desenvolvimento e a introdução da biologia molecular nos experimentos, têm contribuído para a compreensão cada vez mais completa e específica do desenvolvimento biológico, bem como de processos biopatológicos. No caso dos conhecimentos obtidos neste trabalho sobre o desencadeamento molecular da reabsorção dentária fisiológica, além de colaborar no entendimento do processo trará também benefícios clínico-terapêuticos. Quando na clínica encontramos pacientes com anodontia dos dentes permanentes, cabe-nos tentar manter os respectivos dentes decíduos na arcada, executando suas funções normais. Atualmente, não temos como interromper o processo de rizólise nestas situações, mas moléculas capazes de inibir a morte programada dos cementoblastos poderão estar ao alcance clínico. Ou ainda em situações inversas, onde clinicamente deseja-se acelerar a reabsorção dentária fisiológica ou a erupção dentária, possivelmente a proteína BMP-4 ou outras, poderão ser utilizadas em terapêuticas locais.

A compreensão da reabsorção dentária fisiológica abre perspectivas para controle das reabsorções dentárias patológicas, permitindo a realização de transplantes e reimplantes dentários intencionais com sucesso clínico. As moléculas mediadoras destes fenômenos farão parte da rotina terapêutica dos cirurgiões-dentistas.

6 - CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

Após análise cautelosa dos resultados obtidos e considerando as limitações inerentes aos métodos empregados, pôde-se verificar...

1. A presença de apoptose nos cementoblastos, fibroblastos do tecido pulpar e ligamento periodontal e nos restos epiteliais de Malassez no início da reabsorção fisiológica do dente decíduo;
2. A expressão de Bmp-4 ligante pelos cementoblastos e células do ligamento periodontal do dente decíduo, além dos ameloblastos do germe do dente permanente;
3. A expressão da metaloproteinase da matriz, gelatinase B, nos clastos presentes na reabsorção dentária fisiológica.

Com a inter-relação dos resultados e literatura pertinente pôde-se concluir que:

1. A morte celular programada de cementoblastos e odontoblastos funciona provavelmente como o "gatilho biológico" da reabsorção dentária fisiológica;
2. A apoptose nos fibroblastos e nos restos epiteliais de Malassez no ligamento periodontal dos dentes decíduos explica a formação de áreas de anquiloses alvéolo-dentárias observadas freqüentemente nestes dentes;
3. A expressão de Bmp-4 ligante nos mesmos cementoblastos e células do ligamento periodontal marcados pela técnica TUNEL indicam o provável papel desta molécula na indução por mecanismo autócrino ou intrácrino da apoptose na reabsorção fisiológica;

4. A expressão uniforme e intensa de Bmp-4 nos ameloblastos do germe do permanente, pode estar relacionada à ativação da apoptose nas células do dente decíduo por mecanismo parácrino e também por mecanismo autócrino parece regular o desaparecimento parcial do epitélio reduzido do órgão do esmalte;

5. A expressão da matriz metaloproteinase, gelatinase B, pelos clastos localizados em áreas de rizólise ativa, apresentou-se da mesma forma que nos clastos evidenciados na reabsorção óssea, indicando mais uma semelhança entre estas células reabsortivas;

6. O conhecimento da cadeia de eventos e mediadores bioquímicos iniciadores da reabsorção dentária fisiológica, possibilitará brevemente a intervenção molecular no fenômeno, acelerando ou paralisando, de acordo com a necessidade clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 ÄBERG, T.; WOZNEY, J.; THESLEFF, I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. **Dev. Dyn.**, v.210, n.4, p.383-96, Dec. 1997.
- 2 ALEXANDER, S. A.; SWERDLOFF, M.; CAPUTO, L. The end stages of primary root resorption: tissue replacement. **J. Pedod.**, v.5, n.1, p.22-8, 1980.
- 3 ANDERSON, R.D.; TEN CATE, A.R. An ultrastructural study of tooth resorption in the kitten. **J. dent. Res.**, v.65, n.8, p.1087-93, Aug. 1986.
- 4 ANDIA-MERLIN, R. Y.; ARANA-CHAVES, V.E. Exame das superfícies em reabsorção de raízes de molares decíduos com pulpite crônica e lesão inter-radiculares através de M.E.V. **Anais da SBPqO**, v.10, p.160-7, 1994.
- 5 ARANA-CHAVES, V. E.; ANDIA-MERLIN, R. Y. Scanning electron microscopy examination of resorbing enamel surfaces in unexfoliated primary molar teeth. **J. Dent. Child.**, v.65, n.3, p.182-5, May/June 1998.
- 6 BARINAGA, M. Cell suicide: by ICE not by fire. **Science**, v.263, n.5148, p.754-6, Feb. 1994.
- 7 CAHILL, D. R.; MARKS JR., S. C. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. **J. oral Path.**, v.9, n.4, p.189-90, July 1980.
- 8 CARSON, D.A.; RIBEIRO, J.M. Apoptosis and disease. **Lancet**, v.341, n.8855, p.1251-4, May 1993.
- 9 CLARKE, P.G.H.; CLARKE, S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. **Anat. Embryol.**, v.193, n.2, p.81-99, Feb. 1996.

*Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento "Referências Bibliográficas: exemplos", emanado pelo Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

- 10 COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. Lesão celular e morte celular. In:_____. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. p. 1-31.
- 11 CUOGHI, O. M. **Avaliação das alterações teciduais periodontais durante a movimentação dentária induzida nas primeiras 24 horas, com força ativa, interrompida e retomada , em dentes de macacos**. Araçatuba. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Orientador: Dr. Alberto Consolaro.
- 12 DARD, M.; KEREBEL, L. M.; KEREBEL, B. A transmission electron microscope study of fibroblast changes in human deciduous tooth pulp. **Arch. oral Biol.**, v.34, n.4, p.223-8, 1989.
- 13 DOMON, T. et al. Electron microscopic and histochemical studies of the mononuclear odontoclast of the human. **Anat. Rec.**, v.240, n.1, p.42-51, Sept. 1994.
- 14 DOMON, T. et al. Mononuclear odontoclast participation in tooth resorption: the distribution of nuclei in human odontoclasts. **Anat. Rec.**, v.249, n.4, p.449-57, Dec. 1997.
- 15 DUKE, R.C.; OJCIUS, D.M.; YOUNG, J.D. Cell suicide in health and disease. **Sci. Amer.**, v.275, n.6, p.48-55, Dec. 1996.
- 16 EKANAYAKE, S.; HALL, B. K. The in vivo and in vitro effects of bone morphogenetic protein-2 on the development of the chick mandible. **Int. J. Dev. Biol.**, v.41, n.1, 67-81, Feb. 1997.
- 17 FANNING, E. A. The relationship of dental caries and root resorption of deciduous molars. **Arch. oral Biol.**, v.7, p.595-601, 1962.
- 18 FRANCINI, E. et al. Microscopical aspects of root resorption of human deciduous teeth. **Arch. Ital. Anat. Embriol.**, v.97, n.3, 189-97, July/Sept. 1992.
- 19 FRASER, A.; EVAN, G. A license to kill. **Cell**, v.85, n.6, p.781-4, June 1996.

- 20 FURSETH, R. The resorption processes of human deciduous teeth studied by light microscopy, microradiography and electron microscopy. **Arch. oral Biol.**, v.13, n.4, p.417-31, Apr. 1968.
- 21 GAÑAN, Y. et al. Role of TGF- β s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. **Development**, v.122, n.8, p.2349-57, Aug. 1996.
- 22 GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell Biol.**, v.119, n.3, p.493-502, Nov. 1992.
- 23 GERSCHENSON, L.E.; ROTELLO, R.J. Apoptosis: a different type of cell death. **Faseb J.**, v.6, n.7, p.2450-5, Apr. 1992.
- 24 GODOY, V. L. **Reabsorção radicular em molares decíduos – análises morfológicas, macro e microscópicas**. Bauru, 1995. 116p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Orientador: Dr. Aymar Pavarini. Co-orientador: Dr. Alberto Consolaro.
- 25 GRAHAM, A. et al. The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. **Nature**, v.372, p.684-6, Dec. 1994.
- 26 GRANVILLE, D. J. et al. Biology of disease. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. **Lab. Invest.**, v.78, n.8, p.893-912, Aug. 1998.
- 27 GUEDES-PINTO, A. C. **Odontopediatria**. 5. ed. São Paulo, Editora Santos, 1995.
- 28 HEIKINHEIMO, K., HAPPONEN, R. In situ hybridization using single-strand antisense RNA probes in oral pathology research. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, v.87, n.2, p.245-57, 1991.
- 29 HOCKENBERRY, D. Defining apoptosis. **Amer. J. Path.**, v.146, n.1, p.16-9, Jan. 1995.

- 30 HUPPERTZ, B.; FRANK, H-G.; KAUFMANN, P. The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualization. **Anat. Embryol.**, v.200, n.1, p.1-18, July 1999.
- 31 JERNVALL, J. et al. The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. **Development**, v.125, n.2, p.161-9, Jan. 1998.
- 32 JOSEPH, B.K. Expression and localization of sulphated glycoprotein-2 mRNA in the rat incisor tooth ameloblasts: relationships with apoptosis. **Int. J. Exp. Path.**, v.75, n.5, p.313-20, Oct. 1994.
- 33 KANNARI, N. et al. Class II MHC antigen-expressing cells in the pulp tissue of human deciduous teeth prior to shedding. **Arch. Histol. Cytol.**, v.61, n.1, p.1-15, Mar. 1998.
- 34 KARAVANOVA, I.; VAINIO, S.; THESLEFF, I. Transient and recurrent expression of the Egr-1 gene in epithelial and mesenchymal cells during tooth morphogenesis suggests involvement in tissue interactions and in determination of cell fate. **Mech. Develop.**, v.39, n.1-2, p.41-50, Nov. 1992.
- 35 KAWATA, T. et al. Lack of the bone remodeling in osteopetrotic (op/op) mice associated with microdontia. **J. Craniofac. Genet.**, v.19, p.113-7, 1999.
- 36 KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Brit. J. Cancer**, v.26, n.4, p.239-57, Aug. 1972.
- 37 KRONFELD, R. The resorption of the roots of deciduous teeth. **Dent. Cosmos**, v.524, n.2, p.103-20, Feb. 1932.
- 38 LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L.; HAMMASTRÖN, L. Evidence for a role of odontogenic epithelium in maintaining the periodontal space. **J. clin. Periodont.**, v.15, n.6, p.371-3, July 1988.

-
- 39 LOURENÇO, S.Q.C. **Apoptose na odontogênese: durante a fragmentação da lâmina dentária e da bainha epitelial de Hertwig e no epitélio reduzido do órgão do esmalte. Estudo pela técnica TUNEL modificada em camundongos.** Bauru, 1997. 133p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Orientador: Dr. Alberto Consolaro.
- 40 LOURENÇO, S.Q.C.; CONSOLARO, A. Apoptosis in odontogenesis: dental lamina, Hertwig's epithelial sheath and reduced ameloblasts. **J. dent. Res.** v.76, p.120. 1997. Special issue.
- 41 MACIAS, D. et al. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. **Development**, v.124, n.6, p.1109-17, Mar. 1997.
- 42 MANCINI, G. et al. Primary tooth ankylosis: report of case with histological analysis. **J. Dent. Child.**, v.62, n.3, p.215-8, May/June 1995.
- 43 MARAZZI, G.; WANG, Y.; SASSOON, D. Msx2 is a transcriptional regulator in the BMP-4 mediated programmed cell death pathway. **Dev. Biol.**, v.186, n.2, p.127-38, June 1997.
- 44 MARKS JR., S. C; SCHROEDER, H. Tooth eruption. Theories and facts. **Anat. Rec.**, v.245, p.374-93, 1996.
- 45 MARQUES, K. P **Avaliação microscópica das estruturas periodontais e morfologia óssea alveolar em ratas ovariectomizadas.** Bauru, 1998. 120p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Orientador: Dr. Luís Antônio de Assis Taveira.
- 46 MARTIN-PARTIDO, G. et al. Differential staining of dead and dying embryonic cells with a simple new technique. **J. Microsc.**, v.142, n.1, p.101-6, Apr. 1986.

-
- 47 MATSUDA, E. Ultrastructural and cytochemical study of the odontoclasts in physiologic root resorption of human deciduous teeth. **J. Electron Microsc.** (Tokyo), v.41, n.3, p.131-40, June 1992.
- 48 MAZZIERO, E. T. **Influência do ácido diclometilenofosfônico (CI2MDP) na movimentação dentária induzida em ratos. Avaliação histológica.** Bauru, 1999. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Orientador: Dr. Alberto Consolaro.
- 49 Mc DONALD, R. E.; AVERY, D. R. Erupção dentária: fatores locais, sistêmicos e congênitos que influenciam o processo. In:_____. **Odontopediatria.** 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995, p.124-43.
- 50 MORI, C. et al. Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labelling of DNA fragmentation. **Anat. Embryol.**, v.190, n.1, p.21-8, July 1994.
- 51 MOSCA, O.A. Resorption surface of deciduous teeth under the scanning electron microscope. **J. Int. Ass. Dent. Child.**, v.14, n.1, p.3-8, June 1983.
- 52 OBERSZTYN, A. Experimental investigation of factors causing resorption of deciduous teeth. **J. dent. Res.**, v.42, n.2, p.660-74, Mar./Apr. 1963.
- 53 OKADA, Y. et al. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenases/gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. **Lab. Invest.**, v.72, n.3, p.311-22, Mar. 1995.
- 54 PADGETT, R. W.; WOZNEY, J. M.; GELBART, W. M. Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p.2905-9, Apr. 1993.
- 55 PATEL, T.; GORES, G.J.; KAUFMANN, S.H. The role of proteases during apoptosis. **Faseb J.**, v.10, n.5, p.587-97, Apr. 1996.

-
- 56 PEREIRA, A. A .C. **Influência da gravidez e dos anticoncepcionais na reabsorção radicular na remodelação óssea, conseqüente à movimentação dentária induzida.** Bauru, 1995. 114p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Orientador: Dr. Luís Antônio de Assis Taveira.
- 57 PHILBRICK, W.M. et al. Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.11846-51, Sep. 1998.
- 58 PHILPOTT, N.J. et al. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. **Blood**, v.87, n.6, p.2244-51, Mar. 1996.
- 59 PHIPPARD, D.J. et al. Regulation of Msx-1, Msx-2, Bmp-2 and Bmp-4 during foetal and postnatal mammary gland development. **Development**, v.122, n.9, p.2729-37, Sept. 1996.
- 60 POTTEN, C.S. **Perspectives on mammalian cell death.** Oxford, Oxford University Press, 1987.
- 61 PROVE, S.A.; SYMONS, A. L. ; MEYERS, I. A. Physiological root resorption of primary molars. **J. Clin. Ped. Dent.**, v.16, n.3, p.202-6, 1992.
- 62 REPONEN, P. et al. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. **J. Cell Biol.** v. 124, n.6, p.1091-102, March, 1994.
- 63 RICE, D. P. C.; KIM, H-J.; THESLEFF, I. Detection of gelatinase B expression reveals osteoclastic bone resorption as a feature of early calvarial bone development. **Bone**, v.21, n.6, p.479-86, Dec. 1997.
- 64 RIMONDINI, L.; BARONI, C. Morphologic criteria for root canal treatment of primary molars undergoing resorption. **Endod. dent. Traumat.**, v.11, n.3, p.136-41, June 1995.
- 65 RÖLLING, I. Histomorphometric analysis of primary teeth during the process of resorption and shedding. **J. dent. Res.**, v.89, n.2, p.132-42, Apr. 1981.

-
- 66 SAHARA, N. et al. Odontoclastic resorption at the pulpal surface of coronal dentin prior to shedding of human deciduous teeth. **Arch. Histol. Cytol.**, v.55, n.3, p.273-85, July 1992.
- 67 SAHARA, N. et al. A histological study of the exfoliation of human deciduous teeth. **J. dent. Res.**, v.72, n.3, p.634-40, Mar. 1993.
- 68 SAHARA, N. et al. Cementum – like tissue deposition on the resorbed pulp chamber wall of human deciduous teeth prior to shedding. **Acta anat.**, v.147, n.1, p.24-34, May 1993.
- 69 SAHARA, N. et al. Odontoclastic resorption of the superficial nonmineralized layer of predentine in the shedding of human deciduous teeth. **Cell Tiss. Res.**, v.277, p.19-26, 1994.
- 70 SAHARA, N. et al. Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth: an ultrastructural and cytochemical study. **Anat. Rec.**, v.244, n.1, p.33-49, Jan. 1996.
- 71 SAHARA, N. et al. Ultrastructural features of odontoclasts that resorb enamel in human deciduous teeth prior to shedding. **Anat. Rec.**, v.252, n.2, p.215-28, Oct. 1998.
- 72 SAMPATH, T. K. et al. Drosophila transforming growth factor α superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, n.13, p.6004-8, July 1993.
- 73 SASAKI, T. et al. Dentin resorption mediated by odontoclasts in physiological root resorption of human deciduous teeth. **Amer. J. Anat.**, v.183, n.4, p.303-15, Dec. 1988.
- 74 SASAKI, T. et al. Cytodifferentiation and degeneration of odontoclasts in physiologic root resorption of kitten deciduous teeth. **Acta Anat.**, v.135, n.4, p.330-40, 1989.
- 75 SASAKI, T. et al. Cellular roles in physiological root resorption of deciduous teeth in the cat. **J. dent. Res.**, v.69, n.1, p.67-74, Jan. 1990.

-
- 76 SASAKI, T. et al. Possible role of cementoblasts in the resorbant organ of human deciduous teeth during root resorption. **J. Periodont. Res.**, v.25, n.3, p.143-51, May 1990.
- 77 SASAKI, T.; UENO-MATSUDA, E. Immunocytochemical localization of cathepsins B and G in odontoclasts of human deciduous teeth. **J. dent. Res.**, v.71, n.12, p.1881-4, Dec. 1992.
- 78 SCHWARTZ, S.M.; BENNET, M.R. Death by another name. **Amer. J. Path.**, v.147, n.2, p.229-34, Aug. 1995.
- 79 SHIBATA, F. et al. A histochemical study of apoptosis in the reduced ameloblasts of erupting mouse molars. **Arch. oral Biol.**, v.40, n.7, p.677-80, July 1995.
- 80 SHIGEYAMA, Y. et al. Expression of adhesion molecules during tooth resorption in feline teeth: a model system for aggressive osteoclastic activity. **J. dent. Res.**, v.75, n.9, 1650-57, Sept. 1996.
- 81 SHORFF, B. et al. Epidermal growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. **Arch. oral Biol.**, v.41, n.6, p.613-7, June 1996.
- 82 SHORFF, B.; NORRIS, K.; PILEGGI, R. Protease activity in the mouse dental follicle during tooth eruption. **Arch. oral Biol.**, v.40, n.4, p.331-5, Apr. 1995.
- 83 STELLER, H. Mechanisms and genes of celular suicide. **Science**, v.267, n.5203, p.1446-9, Mar. 1995.
- 84 TEN CATE, A. R. Physiologic tooth movement: eruption and shedding. In:_____. **Oral Histology. Development, structure and function.** 5 ed., Mosby, 1998. Cap 14, p.289-314,.
- 85 TENORIO, D.; HUGHES, F.J. An immunohistochemical investigation of the expression of parathyroid hormone receptors in rat cementoblasts. **Arch. oral Biol.**, v.41, n.3, p.299-305, Mar. 1996.

-
- 86 THESLEFF, I. Does epidermal growth factor control tooth eruption? **J. Dent. Child.**, v.54, n.3, p.321-29, Sept./Oct. 1987.
- 87 THESLEFF, I.; PARTANEN, A-M.; RIHTNIEMI, L. Localization of epidermal growth factor receptors in mouse incisors and human premolars during eruption. **Europ. J. Orthodont.**, v. 9, n.1, p.24-32, Feb. 1987.
- 88 THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and the treatment of disease. **Science**, v.267, n.5203, p.1456-62, Mar. 1995.
- 89 TIFFEE, J. C. et al. Dental abnormalities associated with failure of tooth eruption in src knockout and op/op mice. **Calcif. Tiss. Int.**, v.65, n.1, p.53-8, July 1999.
- 90 TOLEDO, O.A. **Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica**, São Paulo, Panamericana, 1996.
- 91 UCHIYAMA, Y. Apoptosis: the history and trends of its studies. **Arch. Histol. Cytol.**, v.58, n.2, p.127-37, June 1995.
- 92 URIST, M. R. Bone formation by autoinduction. **Science**, v.150, n.3693, p.893-9, Nov. 1965.
- 93 VAAHTOKARI, A.; ÄBERG, T.,; THESLEFF, I. Apoptosis in the developing tooth: association with na embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. **Development**, v.122, n.1, p.121-9, Jan. 1996.
- 94 VAINIO, S. et al. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. **Cell**, v.75, n.1, p.45-8, Oct. 1993.
- 95 VAINIO, S. et al. Expression of sindscan gene is induced early, is transient, and correlates with changes in mesenchymal cell proliferation during tooth organogenesis. **Dev. Biol.**, v.147, n.2, p.322-33, Oct. 1991.
- 96 VASCONCELOS, M. H. F. **Análise morfológica comparativa do periodonto de sustentação submetido à forças biologicamente excessivas, em**

ratos adultos sem e sob o uso de anticoncepcionais e ratas prenhas.

Bauru, 1996. 148p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Orientador: Dr. Alberto Consolaro.

- 97 VU, T. H. et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of chondrocytes. **Cell**, v.93, n.3, p.411-22, May 1998.
- 98 WILLIAMS, G. T.; SMITH, C. A. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. **Cell**, v.74, n.5, p.777-81, Sept. 1993.
- 99 WILLIE, A.H.; DUVALL, E. Cell injury and death. In: MCCGEE, J. O'D; ISAACSON, P.G.; WRIGHT, A. **Oxford textbook of pathology**. Oxford. Oxford University Press, 1992. Cap.1, p.141-93.
- 100 WISE, G.E. Discovery! Tooth eruption. **J. dent. Res.**, v.77, n.8, p.1576-9, Aug. 1998.
- 101 WISE, G.E.; LIN, F. The molecular biology of initiation of tooth eruption. **J. dent. Res.**, v.74, n.1, p.303-6, Jan. 1995.
- 102 YOKOUCHI, Y. et al. BMP-2/4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. **Development**, v.122, n.12, p.3275-34, Dec. 1996.
- 103 ZOU, H.; NISWANDER, L. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. **Science**, v.272, n.3, p.738-41, May 1996.

ABSTRACT

ABSTRACT

The physiologic tooth resorption occurs as a natural and programmed phenomenon and results in the shedding of deciduous teeth. The resorptive process is not continuous, but alternates with periods of repair. To study the activators and effectors that trigger the physiologic tooth resorption, we used cat deciduous incisors and canines. These animals were two months old and showed different stages of tooth resorption. We analysed the participation of apoptosis by TUNEL staining in physiologic tooth resorption because of its programmed pattern. Some cementoblasts showed positive TUNEL staining along the primary roots at the same and at the opposite side of dental follicle. Many apoptotic positive cells were found in periodontal ligament that probably were fibroblasts, and some groups of cells suggesting epithelium rests of Malassez. Some apoptotic pulp cells were also identified. In situ hybridization was used to detect Bmp-4 mRNA on tissue sections using [³⁵S] – UTP-labeled riboprobes as described by VAINIO et al. in 1991. We detected in primary tooth, the expression of Bmp-4 mRNA in cementoblasts and in some cells in the periodontal ligament. Indeed we found this molecule in ameloblasts of permanent germ. We found strong correlation between the results obtained by TUNEL and the expression of Bmp-4. Some apoptotic cells in primary tooth were also expressing Bmp-4. To analyse the distribution of clasts in physiological resorption we used gelatinase B, matrix metalloproteinase, in situ hybridization in identical sections. We observed abundant clasts expressing gelatinase B mRNA in radicular surface and the same expression inside of the clasts in bone resorption. These results imply that programmed cell death could trigger the physiological tooth resorption and the expression of molecule Bmp-4 mediates apoptosis by autocrine and paracrine control. The same expression of gelatinase B by clasts associated with bone and tooth resorption indicates similarity between these cells. These results were analysed in microscope with bright and dark field and the images were digitalized.

These findings contribute to further understand tooth resorption mechanism, to develop specific therapies to control inflammatory tooth resorption and to accelerate or paralyse the physiological tooth resorption in special clinical situations.

APÊNDICE

APÊNDICE

TUNEL staining for sections 10.10.1994

Anne Vaahtokari

Institute of Dentistry

P. O. Box 41

00014 University of Helsinki

Finland

This protocol is modified from Tunel staining described by Gravieli et al. (J. Cell Biology, 119, 493-501, 1992) and in situ hybridization described by David Wilkinson (a modification of that described in: Wilkinson. In situ hybridization: a practical approach, pp. 75-83, IRL Press, Oxford, 1992).

Use sterile solutions. Fix tissues in 4% PFA, embed in paraffin, make sections.

1. Day

1. Warm sections at 60% °C for 30 min (this may not be necessary), then:

Xylene 2 x 10 min

100 % ethanol 5 min

100% ethanol + acetic acid (2+1) (160 ml + 80 ml) 20 min

250 ml methanol+ 4 ml 30% H₂O₂ 30 min

94% methanol 2 x 5 min

70% methanol 2 x 5 min

Keep overnight in 70% methanol at 4°C, use parafilm to prevent evaporation.

2. day

50 % methanol 5 min

30 % methanol 5 min

2. PTB 2 x 5 min.**3.** Incubate in 50 mM Tris-HCl, 5mM EDTA, pH 8.0, containing 7 µg/ml proteinase K, for 10 min at RT.**4.** Wash with PBT 2 x 5 min.

(5.1 and 5.2 only for positive controls:

5.1 Pipet on sections 0.2 U (100 ng)/ml DNase in TdT buffer + 4 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, incubate for 15 min at 37°C in a humid box.**5.2** Wash with PBT, 2 x10 min.)**6.** Fix in fresh (made on day of use) 4% PFA for min.**7.** Wash wwith PBT 2 x 5 min.**8.** Label for 1h at 36°C in a humid box, pipet on sections:

The negative control without an enzyme: mM = nmol/µl

Dig-11-dUTP 1 pmol/µl

DATP 1 pmol/µl

1 x TdT buffer

0,5 % CHAPS

water

2 ml labelling mix:

2 µl 1 mM Dig - 11-dUTP

2 µl 1 mM dATP

200 µL 10x TdT buffer (400 µl 5x)

100 µL 10 % CHAPS

1663 µl water (1463 of 5x buffer)

- 9.** Stop the reaction in 300 mM NaCl, 30 mM Na citrate, 0,1 % CHAPS for 15 min at RT, with rocking.
- 10.** Wash in TBT, 0.1 % CHAPS, 2 x 10 min, with rocking.
- 11.** During preblocking (or earlier) weight 3 mg embryo powder, add 0,5 ml 10 % sheep or goat serum (centrifuged), 2 % BSA in TBT and add 1 µl anti-dig-AP antibody. Rock gently for 2-3 hours (or overnight) at 4°C and spin for 10 min. Dilute the supernatant to 2 ml with 10 % sheep or goat serum, 2 % BSA in TBT. Store at 4°C until use, is stable for several weeks.
- 12.** Preblock with 10 % sheep or goat serum (spin for 2 min 13 500 g, 4°C), 2 % BSA in TBT, 2-3 h or longer at RT in a humid box.
- 13.** Pipet onto the slides the preabsorbed anti-dig-AP antibody (see **11.**), incubate overnight in a humid box at 4°C.

3.day

- 14.** Wash with TBT 3 x 5 min, then 3 x 30 min.
- 15.** Wash with NTM, 1 x 5 min, then with NTM, 2 mM levamisole 2 x 5 min. (NTM = 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl₂. Make from stock solutions on the same day.
- 16.** Pipet on sections NTM + 4.5 µl NBT, 3.5 µl BCIP per ml NTM.
- 17.** Stop the colour reaction by washing with PBT, 4 x 5 min, then overnight (optional).
- 18.** Wash with deionized water for 5 min.
- 19.** Mount with Aquamount.

Solutions:

PBT: PBT= PBS + 0.1 % Triton X-100 (or Tween 20) 1l:

10 ml 10 % Triton X-100
100 ml 10 x PBS
ad 1000 ml water

Proteinase K solution: 230 ml:

11.5 ml 1 M Tris-Hcl, pH 8.0
2.3 ml 0.5 M EDTA
92 µl proteinase K 1.75 mg/100µl water
ad 230 ml water

DNase solution: 1500 µl

1120 µl water (or 1270 of 10x)
6 µl 1 M MgCl₂
75 µl 0.2 M DTT diluted to 1:100 with water
300 µl 5 x TdT buffer (or 150 µl 10x)
3 µl 1:10 diluted DNaseI (in water)

300 mM NaCl, 30 mM Na citrate, 0.1 % CHAPS 100ml:

6 ml 5 M NaCl
3 ml 1 M Na citrate
1 ml 10 % CHAPS
ad 100 ml water

TBT (50 Mm Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Triton X – 100), (**0.1 % CHAPS**): 100 ml:

5 ml 1 M Tris, pH 7.5
3 ml 5 M NaCl
1 ml 10 % Triton X-100
(1 ml 10 % CHAPS)
ad 100 water

Tween 20 can be used instead of Triton X-100.

If CHAPS is needed, add:

NTM: 100 ml:

10 ml 1 M Tris, pH 9.5
2 ml 5 M NaCl
5 ml 1 M MgCl₂
50 mg levamisole
at 100 ml water

Notes

Circle the sections with a grease pen before pipetting on them.

TdT is terminal deoxynucleotidyl transferase, you can buy it at least from Amersham, Pharmacia and Promega. We use Promega's because it is the cheapest. When you buy the enzyme you will get the TdT buffer with it.

NBT is 4-nitroblue tetrazolium chloride (BM 1087479), 75 mg/ml in dimethylformamide (store at -20°C).

BCIP is 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BM 760994), 50 mg/ml in 10 % dimethylformamide (store at -20°C).

Embryo powder: homogenize mouse embryos (about 13d) in minimum volume of PBS. Add 4 volumes of ice-cold acetone, mix and incubate on ice for 30 min. Spin at 10K x g for 10 mins and remove supernatant. Wash pellet with ice-cold acetone and spin again. Spread the pellet out and grind it into a fine powder on a sheet of filter paper and allow it to air-dry. Store in an air-tight tube at 4°C.

IN SITU HYBRIDIZATION PROTOCOL FOR RADIOLABELLED PROBES ON SLIDES

Protocol used in **Irma Thesleff's** laboratory, **University of Helsinki, Finland**

From an original protocol by **David Wilkinson**, modified by **Anne Vaahtokari** and **Carin Sahlberg**

GENERAL RULES

Wear gloves during all procedures. Use diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated distilled water and stock solutions during the labelling, pretreatment and hybridization steps and sterile distilled water during the post-treatment steps. Use DEPC-treated glass ware. Use the hood when working with xylene, PFA, acetic anhydride and formamide and when stripping the parafilm from the slides after ^{35}S -labelled hybridization.

LABELLING OF ^{35}S -UTP-mRNA PROBES

Wilkinson's 10 x transcription buffer:

400 mM	Tris-HCl, pH 8,0	4,000 ml
60 mM	MgCl ₂	0,600 ml
20 mM	spermidine	0,275 ml
		ad 10 ml

10 ml

1 M Tris-HCl
1 M MgCl ₂
1,377 M spermidine
DEPC-H ₂ O

Make the nucleotide mixture:

ATP	:	GTP	:	CTP	:	DEPC-
1	:	1	:	1	:	H ₂ O
						1

Add the following labelling reagents:

DEPC-H ₂ O	ad 10 µl
Wilkinson's 10 x transcription buffer	1 µl
0,2 M DTT	0,5 µl
nucleotide mixture	1 µl
linearized plasmid DNA (0,5–1 µg)	x µl
RNase inhibitor (25 U/10 µl)	0,6 µl
^{35}S -UTP	3 µl
RNA polymerase (20 U)	1 µl

Label at +37°C for 1 h.

Add 1 µl RNase-free DNase and leave for 15 min. at +37°C to degrade the plasmid DNA.

Option 1: Precipitate probe directly. Add 40 µl H₂O, 5 µl 3 M Na-acetate (pH 5,2) and 150 µl abs. ethanol to labelling mixture and precipitate the probe for 2 h at –70°C or overnight at –20°C.

Spin the probe at 13 000 g for 20 min in the cold room. Discard the supernatant and wash the pellet with chilled 70% ethanol, spin again, remove the supernatant and leave to air dry for 10–30 min.

Dissolve the probe in 20 µl 1M DTT, add 180 µl hybridization buffer and mix well. Leave for 10 min. at +60°C in the heath block and mix again.

Take 2 µl probe and mesure the CPM in the scintillation counter. If necessary, add more hybridization buffer mix to get counts between 100 000–120 000 CPM / 2 µl (50 000–60 000 / µl). Use immediately or store at –70°C.

Hybridization buffer:

10 ml

60 %	deionized formamide	6 ml	formamide
300 mM	NaCl	0,6 ml	5,0 M NaCl
20 mM	Tris-HCl, pH 8,0	0,2 ml	1,0 M Tris-HCl
5 mM	EDTA, pH 8,0	0,1 ml	0,5 M EDTA
10 %	dextranulphate (MW: 500 000)	1,0 g	dextranulphate
0,5 mg/ml	yeast tRNA	5,0 mg	yeast tRNA
1 x	Denhardt's solution:	0,2 ml	50 x Denhardt's solution
	0,02 % BSA		
	0,02 % Ficoll		
	0,02 % PVP		

ad 10 ml DEPC-H₂O

Option 2: Reduce the length of the probe by alkaline hydrolysis.

Add an equal volume (=10,5 µl) of hydrolysis buffer, mix and incubate at +60°C for x min. Continue as in option 1 or option 3.

Hydrolysis buffer:

10 ml

80 mM	NaHCO ₃	67,2 mg
120 mM	Na ₂ CO ₃	127,2 mg
	DEPC-H ₂ O	ad 10 ml

$x = (l_0 - l_1) / 0,11 \times l_0 \times l_1$, where: l_0 = the original probe length in kb

l_1 = the desired probe length in kb

Option 3: Purify the probe on a Sephadex G-50 column to remove unincorporated nucleotides: Make the column buffer, rinse the prepacked nick column with it and run 3 ml (one fill) through the column to wash it. Add the probe, let it sink in and then collect 400 µl fractions. Most of the probe (about 95%) will be in the 2nd fraction. Add 40 µl 3 M Na-acetate and 1100 µl abs. ethanol and precipitate the labelled probe for 2 h at -70 °C or overnight at -20 °C. Continue as in option 1.

Column buffer:	50 mM Tris-HCl	1,25 ml	1 M Tris-HCl, pH 8
	1 mM EDTA	50 µl	0,5 M EDTA
	0,1% SDS	250 µl	10% SDS
		ad 25 ml	DEPC-H ₂ O

PRETREATMENT FOR IN SITU HYBRIDIZATION WITH ³⁵S-UTP-LABELLED PROBES

Always wear gloves. Do not put slides directly from the cold room into xylene. All solutions should be filtered and, if possible, diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated. Make up the ethanol dilutions with DEPC treated water. Use DEPC treated glassware. The washes take ca. 2,5 hours.

1. Deparaffination:

xylene	2 x 10 min
abs. ethanol	2 x 5 min
94% ethanol	1 x 3 min
70% ethanol	1 x 3 min
50% ethanol	1 x 3 min
2. 1 x PBS 5 min
3. TE 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 15 min
 + 5 mM EDTA
 proteinase 7 µg/ml proteinase K
4. 1 x PBS 5 min
5. 4% PFA in PBS 20 min
6. Rinse in water.
7. 2.5 ml acetic anhydride/l 0,1 M triethanolamin-HCl 10 min
 – Add the acetic anhydride while spinning on a magnetic spinner
8. 1 x PBS 5 min
9. Dehydration:

50% ethanol	3 min
70% ethanol	5 min
94% ethanol	3 min
100% ethanol	2 x 3 min
10. Put the slides to dry on foil-covered trays and cover with a lid to keep them from getting dusty. Heat diluted probe at 80 °C for 2 min and cool on ice. Add the probe to the sections (20–70 ml/slide) and cover with a piece of parafilm. Put slides horizontally in tight boxes in a humidified atmosphere and hybridize at 50-52 °C overnight.

Humidifying solution:	60% formamide
	5 x SSC

1.	Remove the parafilm covering the slides with clean pincers. Use the hood.		
2.	I wash	5 x SSC
10 mM DTT	30 min 50°C
	Put the used solution in the radioactive waste canister.		
3.	II wash	50 % formamide	
	(high stringency)	2 x SSC
20 mM DTT	30 min 65°C
	Keep the solution for step [7.]. Washing time can be up to 60 min. To increase stringency SSC can be reduced to 1–0,5.		
4.	NTE:	500 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
5 mM EDTA	3 x 10 min 37°C
5.	Ribonuclease A	20 µg/ml NTE	30 min 37°C
6.	NTE		15 min 37°C
7.	II wash (from step [3.])		30 min 65°C
8.	2 x SSC		15 min RT
9.	0,1 x SSC		15 min RT
10.	Dehydration:	30% ethanol	3 min
		60% ethanol	3 min
		80% ethanol	3 min
		95% ethanol	3 min
		abs. ethanol	2 x 3 min
11.	Put the slides to dry on foil-covered trays overnight. Cover the slides with a lid.		

DIPPING OF SLIDES IN AUTORADIOGRAPHIC FILM EMULSION

We use Kodak autoradiography emulsion type NTB-2. The emulsion is heated to +45°C, diluted 1:1 with sterile distilled water and divided into aliquots of 10 ml in small plastic vials. The vials are wrapped in aluminium foil and stored at +4°C.

The slides which are to be dipped have been dried overnight on foil-covered trays. The diluted emulsion is melted at +45°C and poured into the prewarmed dipping container standing in a water bath. The slides are dipped twice for 2 seconds and put upright on a slid tray so that excess emulsion runs off. The slides are left to dry in the dark for 2 hours in the presence of silica gel and they are then packed in dark boxes with a tube of silica gel. The boxes are wrapped in foil and stored at +4°C. The slides are exposed for 8–30 days depending on the amount of expression in the sample.

DEVELOPING OF SLIDES

Take out the foil-covered boxes and let them warm to room temperature. The slides are developed in glass dishes. Pour 200 ml of developer into dish no 1, dist. water into dishes no 2 and 3 and fixer into dish no 4.

Developer: Kodak D-19

Working solution as in instructions: 800 g in 5 l tap water, pH 9–12.
Keep in dark bottles in the dark room.

Fixer: Kodak sodium fixative

Develop for 2½ min, rinse in water 15 + 15 sec and fix for 5 min. Rinse in running tap water for 10 min.

STAINING OF SLIDES

Delafield's haematoxylin: diluted 1:5, store in dark bottle at 4 °C. Filter the solution before use.

Rinse the slides in distilled water for 10 min. Stain them in haematoxylin for 1 min. Rinse in distilled water to check the staining, if the sections need more colour stain

them accordingly. Rinse slides in running tap water for 10 min. Dehydrate the slides and mount them in e.g. DePex. Use clean, dustfree coverslips.

DEPC – TREATED WATER

1. Add 1 ml of DEPC (diethyl pyrocarbonate) to 1 liter distilled water in a bottle. Be careful – DEPC is carcinogenic ! Shake bottle thoroughly and leave overnight at room temperature.
2. Autoclave the water and allow to cool.

SILANIZING SLIDES FOR IN SITU HYBRIDIZATION

1. Wash slides in hot soap water
2. Rinse in hot water for 2 hours
3. Dip slides in 10% HCl/70% ethanol.
4. Rinse in distilled water.
5. Dip slides in 94% ethanol.
6. Dry slides in oven at 150°C for 5 min. and allow to cool.
7. Dip slides in 2% TESPA in acetone for 10 sec. (TESPA = 3-amino-propyl-triethoxy-silane, Sigma number A3648). Exact time is important !
8. Wash slides twice in acetone, 10 seconds each.
9. Wash slides in DEPC-treated distilled water, 10 seconds.
10. Dry slides at 37°C or 42°C.
11. Store the silanized slides in clean boxes at room temperature.
12. Cut 7 mm (preferably 5–10 mm) thick sections for in situ hybridization. Keep the slides in +37 °C overnight to make the sections stick tightly on to the slides.