

SILVANA PASETTO

**DISTRIBUIÇÃO DO EGF, EGFr, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$  E CSF-1 NO  
PERIODONTO DE INCISIVOS INFERIORES DE RATOS, EM  
CONDIÇÕES FUNCIONAIS NORMAL E ALTERADA. ESTUDO  
IMUNOHISTOQUÍMICO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Biologia Buco-Dental.

PIRACICABA

2005

SILVANA PASETTO

**DISTRIBUIÇÃO DO EGF, EGFr, TGF- $\beta$ 1, CSF- 1 E IL-1 $\alpha$  NO  
PERIODONTO DE INCISIVOS INFERIORES DE RATOS, EM  
CONDIÇÕES FUNCIONAIS NORMAL E ALTERADA. ESTUDO  
IMUNOHISTOQUÍMICO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de Doutor  
em Biologia Buco-Dental.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes

Banca examinadora:

Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello

Profa. Dra. Miralva Ap. de Jesus Silva

Prof. Dr José Merzel

Prof. Dr. Vitor Elias Arana-Chavez

PIRACICABA

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159**

P263d

Pasetto, Silvana.

Distribuição do EGF, EGFr, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$  e CSF-1 no periodonto de incisivos inferiores de ratos, em condições funcionais normal e alterada. Estudo imunohistoquímico. / Silvana Pasetto. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Pedro Duarte Novaes.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Dentes – erupção. 2. Interleucina-1. 3. Imunohistoquímica. I. Novaes, Pedro Duarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Distribution of EGF, EGFr, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$  and CSF-1 in the periodontum of rat lower incisors, in normal and altered functional conditions. Immunohistochemical study

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Tooth – eruption; Interleukin-1; Immunohistochemistry

Área de concentração: Histologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora: Darcy de Oliveira Tosello; Miralva Ap. de Jesus Silva; José Merzel; Vitor Elias Arana-Chavez; Pedro Duarte Novaes

Data da defesa: 25/02/2005

# Dedicatória

Aos meus amados pais, **Lurdes** e **Alcindo**, que em todos os momentos me incentivaram e ampararam com braços fortes, cheios de amor, alegria, honestidade e dedicação. Sem vocês eu não viveria estas vitórias. *Obrigada!!*

Aos meus irmãos tão queridos, **Geraldo**, **Sergio**, **Valdir**, **Ivone** e **Edilene**, o amor que nos une é indestrutível e nos torna Família!!. Obrigada pelo carinho e incentivo.

Aos meus sobrinhos, presentes de Deus: **Eduardo**, **Fernando**, **Rafael**, **Carolina**, **Sabrina**, **Gabriela**, **Juliana**, **Felipe** e **Diego**.

A Família é o bem mais precioso de  
um homem!!

# Agradecimentos

A *Deus*, luz do meu caminho, refúgio e conforto nos momentos de aflição, fonte de alegrias, bênçãos e amor.

Ao meu orientador **Pedro Duarte Novaes**, pelos conhecimentos e questionamentos, pela confiança em mim depositada, pelo auxílio, incentivo, apoio, amizade e por me permitir fazer parte desta equipe.

Ao Prof. Dr. **José Merzel**, pela paciência e dedicação e pelos exemplos de competência. Seus ensinamentos foram imprescindíveis para a minha formação. *Minha gratidão, respeito e carinho!!*

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP - UNICAMP, na pessoa do Prof. Dr. **Thales da Rocha Mattos Filho**.

Ao Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, coordenador dos cursos de pós-graduação da Faculdade de odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

À Profa. **Altair Antoninha Del Cury**, pela luta constante em defender os interesses do curso de pós-graduação da FOP, e por sempre encaminhar os pós-graduandos em um futuro profissional.

À Profa. Dra. **Darcy de Oliveira Tosello**, impossível não admirá-la, por sua disposição e dedicação. Obrigada por me ensinar a fazer e ministrar uma aula com competência. Seu carinho e amizade me ajudaram a chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. **Sergio Roberto Peres Line**, por seu apreço.

Ao Prof. Dr. **Paulo H.F. Caria** pelo desvelo ao curso de pós-graduação.

À **FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela concessão da bolsa e auxílio à pesquisa, que permitiu o bom andamento da mesma.

Aos Profs. Drs. **Solange de Almeida e Frab Boscolo**, pela ajuda carinhosa ao nosso departamento.

Às meninas da secretaria de pós-graduação **Érica e Raquel**, pela inestimável ajuda e competência demonstradas.

Às secretárias do Depto de Morfologia, Anatomia e Biologia Bucodental, **Suzete, Joelma e Eli**, pela amizade e ajuda.

À **Maria Aparecida Varella**, amiga e técnica do laboratório de Histologia, pelo constante auxílio no preparo de minhas amostras, pelas risadas, carinho.

À Bióloga **Eliene Ap. N. Romani**, por sua valiosa ajuda em todos os momentos, por sua determinação em ensinar, e também pela sua tão preciosa amizade.

À amiga **Dra. Miralva Ap. de Jesus Silva**, por seu exemplo de dedicação e competência, pelo imenso carinho e ajuda.

À **Ivani Odas**, pelo carinho, auxílio e amizade.

À amiga **Simone Barbosa**, companheira de tantos anos na FOP, por sua alegria contagiante, pelas conversas, congressos!

À amiga **Luciana Barros Sant'Anna**, companheira de imunohistoquímica, pelo auxílio e convivência tão agradável.

À **Valéria A. Pinheiro**, por sua amizade e ajuda.

À amiga **Cristiane Salmon**, pelos momento alegres.

À “Minha Turma” **Raquel Scarel, Paula Trevilatto, Ana Paula e Rui**, que sempre torceram por mim. Vocês não passaram simplesmente pela minha vida, fizeram morada em meu coração.

Às minhas amigas *Mitsue Fujimaki* - Mi, *Mariliani Chicarelli* – Mari, *Estela Kaminagakura* – Estelinha e *Cíntia Carvalhal* – Cincin, vocês são especiais. Nossa amizade é abençoada e a distância só fará fortalecer os laços que criamos.

À *Maria Luiza, Andréa Domingos e Flávio R. Manzi*, entusiastas e vencedores.

A todos os amigos do depto. de Morfologia, *Regina Peres, Marcelo, Isabela, Alexandre, Maria Cristina, Cris Borges, Isabel, Daniel, Adriana, Liza, Marco* pela convivência agradável.

Ao *Sr. Agenor e Anete de Góes*, pela linda poesia e por todo o carinho.

À *Sandra, Dora e Fátima*, pelas orações, ao *André*, pela torcida. Minhas *tias e tios, primas e primos* pelo apoio e aos meus *Avós* pelo imenso amor.

Ao **Alexandre Henrique de Góes**, sempre presente. Obrigada por me incentivar a crescer. Seu sorriso, seus olhos, você..... Amor!!!

*“Grande parte da vitalidade de uma amizade reside no respeito pelas*



*diferenças, não apenas em desfrutar  
semelhanças” James Frederick*

## **Quando eu descer**

Deus, grande Deus, se um dia  
ao sopro de uma rija ventania  
eu vacilar, sem fé e sem razão,  
Então mostra-me os céus, os céus estelares  
onde semeaste os luminares  
ao quarto dia da criação.

Mostra-me o mar de mistérios profundos  
onde dormem gemidos moribundos  
nas soturnidade abissal.  
Mostra-me o mar tão calmo, verde e extenso  
que vem bater de leve , como um lenço,  
às brancas praias de cristal.

Mostra-me a natureza vaporosa, a grande  
tecelã misteriosa...  
faz a planta crescer, a ave cantar,  
que cobre de relvas o chão desnudo,  
junta as folhas, flores, liquens tudo  
num emaranhado belo singular.

Mostra-me as madrugadas tão cheirosas  
quando desabotoam tantas rosas  
e mil pássaros cantam chamando o sol,  
mostra-me o sol nascente, multiforme,  
ao ressurgir da terra bruta, enorme,  
às clarinadas do arrebol.

Deus, grande Deus, se um dia  
ao sopro de uma rija ventania  
eu duvidar também da humanidade .  
Eu quero ver Pasteur, multiplicando vida  
Santos Dumont gênio asas de condor  
este diminuindo as distâncias e as alturas,  
aquele diminuindo as lágrimas e a dor

Eu quero ver Curie, a polonesa augusta,  
imolando à ciência as suas santas mãos  
e Gandi, o sonhador, solitário, pensando:  
-“O mundo é um só e todos são irmãos !”  
Lincoln, como um cedro gigante,  
sonhar da liberdade o dia triunfal.  
Levingston, nas selvas moribundo, da África  
fazendo o seu trono imortal.  
São Francisco de Assis, amando a  
humanidade  
Lutero, quebra a peia do jugo clerical  
Pela fé Jorge Miller ampara a orfandade  
e surge Pestalozzi, educador sem igual.  
O sapateiro Carey na Índia pregando,  
Adhoniram, Ana de Ava, suas vidas dando a  
Birmânia pagã pelos pagãos cruéis  
Noemi, a heroína do índio brasileiro,  
Nelson na Amazônia, num labor pioneiro,  
queimando na tarefa os corações fiéis

Mostra-me grande Deus,  
que nunca foi inútil o teu  
plano imortal de paz e salvação,  
pois são tantas as almas, e também a  
minh'alma refloriu deslumbrada  
ao sol do teu perdão,  
mostra-me a cruz, o evangelho  
a esperança, e tantas bênçãos mais que  
provam o teu amor

**Mostra-me na cruz as tuas mãos sangrentas  
para que eu creia  
Sempre em teu nome Senhor!!!**

Gláucia Vaz de Andrade

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE SIGLAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMO</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>4</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>9</b>
2.1 O Dente	9
2.2 Fatores de crescimento	11
2.3 Fator de crescimento epidermal – EGF e seu receptor – EGFr	12
2.4 Fator transformador do crescimento- $\beta$ 1 - TGF- $\beta$ 1	19
2.5 Interleucina-1 $\alpha$ - IL-1 $\alpha$	27
2.6 Fator estimulante de colônias - CSF-1	30
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	<b>34</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1 Animais	35
4.2 Grupos experimentais	35
4.3 Grupo de 8 horas e de 8 dias	36
4.4 Coleta do material	37

4.5 Preparo das lâminas para imunohistoquímica	38
4.6 Microtomia	39
4.7 Reação imunohistoquímica	39
4.8 Análise dos resultados	41
<b>5 Resultados</b>	<b>42</b>
5.1 Imunolocalização do EGF	42
5.2 Imunolocalização do EGFr	43
5.3 Imunolocalização do TGF- $\beta$ 1	44
5.4 Imunolocalização da IL-1 $\alpha$	45
5.5 Imunolocalização do CSF-1	46
<b>6 Discussão</b>	<b>57</b>
<b>7 Conclusões</b>	<b>67</b>
<b>Referências</b>	<b>68</b>
<b>Anexo</b>	<b>87</b>

# Lista de Siglas

EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EGFr	Receptor para o Fator de Crescimento Epidermal
TGF- $\beta$ 1	Fator Transformador do Crescimento tipo I
IL-1 $\alpha$	Interleucina tipo 1 $\alpha$
CSF-1	Fator estimulante de colônias
FD	Folículo Dental
LP	Ligamento Periodontal
RE	Retículo Estrelado
CP	Camada Papilar
EI	Estrato Intermédio
AO	Osso alveolar
PBS	Tampão Fosfato Salino
BSA	Albumina de Soro Bovino
DMSO	Dimetilsulfoxide
DAB	Diaminobenzidina
HCl	Ácido Clorídrico
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
GF	Fator de crescimento

# Resumo

O objetivo deste estudo, foi analisar, por meio da técnica de imunohistoquímica, a distribuição do EGF, EGFr, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$  e CSF-1, em 3 diferentes regiões dos incisivos inferiores de ratos, em condições funcionais normais e alteradas. Cinquenta animais, tiveram seus incisivos inferiores esquerdos, seccionados na altura da papila interdental, permanecendo fora de oclusão, sendo considerados hipofuncionais (Ho), seus contralaterais, em sobrecarga de função foram chamados hiperfuncionais (Hr). Vinte e cinco destes animais, sofreram a intervenção apenas uma única vez, sendo sacrificados 8 horas após, os outros vinte e cinco animais, sofreram a intervenção a cada 2 dias, sendo sacrificados no 8<sup>o</sup> dia de desocclusão. Dez animais pertencentes ao grupo controle (c), tiveram seus incisivos mantidos em condições funcionais normais de erupção. As hemimandíbulas de todos os animais foram fixadas em Karnovsky (com 0,1% de glutaraldeído), descalcificadas em EDTA 4,13%, subdivididas transversalmente em 5 regiões e incluídas em paraplást. Cortes transversais, com 4  $\mu$ m de espessura de cada peça foram coletados em lâminas silanizadas e submetidos à técnica de imunohistoquímica. O folículo dental e o ligamento periodontal, mostraram variações nas intensidades de marcação, com todos os anticorpos, entre as diferentes regiões e entre os grupos analisados. Aparentemente, no entanto, os tecidos periodontais dos incisivos, após 8 dias de hipofunção, mostraram imunoreatividade mais forte, particularmente com o CSF-1, quando comparados com os incisivos, em condições funcionais normal e alterada. Os resultados parecem sugerir, que a “cascata” formada por essas moléculas, pode estar relacionada com a ampliação da via eruptiva do incisivo, que cresce por um período prolongado da vida do animal.

# Abstract

The aim of this study, was to analyzed, using immunohistochemical technique, the distribution of EGF, EGFr, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$  e CSF-1, in periodontal tissues of three regions of rat lower incisors, in normal and altered functional conditions. Fifty animals, had their left lower incisors, cut at the level of the interdental papilla. Becoming out occlusion, they are considered hipofunctional teeth. The contralateral incisors, attrited with both upper incisors are considered hiperfunctional teeth. Twenty-five of these animals were killed 8 hours after. In the order twenty-five animals, the shortening was repeated every second day, and killed 8 days after. Ten animals were kept in normal functional conditions. The hemimandibules of all animals were fixed in Karnovsky (with 0,1% of glutaraldehyde), demineralized with EDTA, subdivided in five transversal regions and embedded in paraplast. Cross sections, 4  $\mu$ m-thick were collected in glass slides coated with silane. The antibodies were developed with DAB plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The dental follicle and the periodontal ligament showed variation in the staining intensities, for all antibodies used, among the different regions and groups analyzed. Apparently, however, the periodontal tissues of the incisors, after eight days of hipofunction, showed stronger immunoreactivity, particularly with CSF-1, as compared with incisors under normal and hiperfunctional conditions. The results suggest that this molecular "cascade", may be related with the enlargement of the rodent incisor eruptive pathway, since these teeth grow for a long period of animal's life.

# 1 Introdução

A erupção dental é o movimento fisiológico do dente em direção axial, no qual o órgão migra do local onde é formado, para a cavidade bucal. O mecanismo do processo eruptivo ainda é desconhecido, mas admite-se que seja multifatorial, envolvendo a geração de força, a translação desta força em movimento, a resistência dos tecidos de sustentação e a remodelação dos tecidos periodontais para a manutenção da integridade do sistema (Moxham & Berkovitz, 1995).

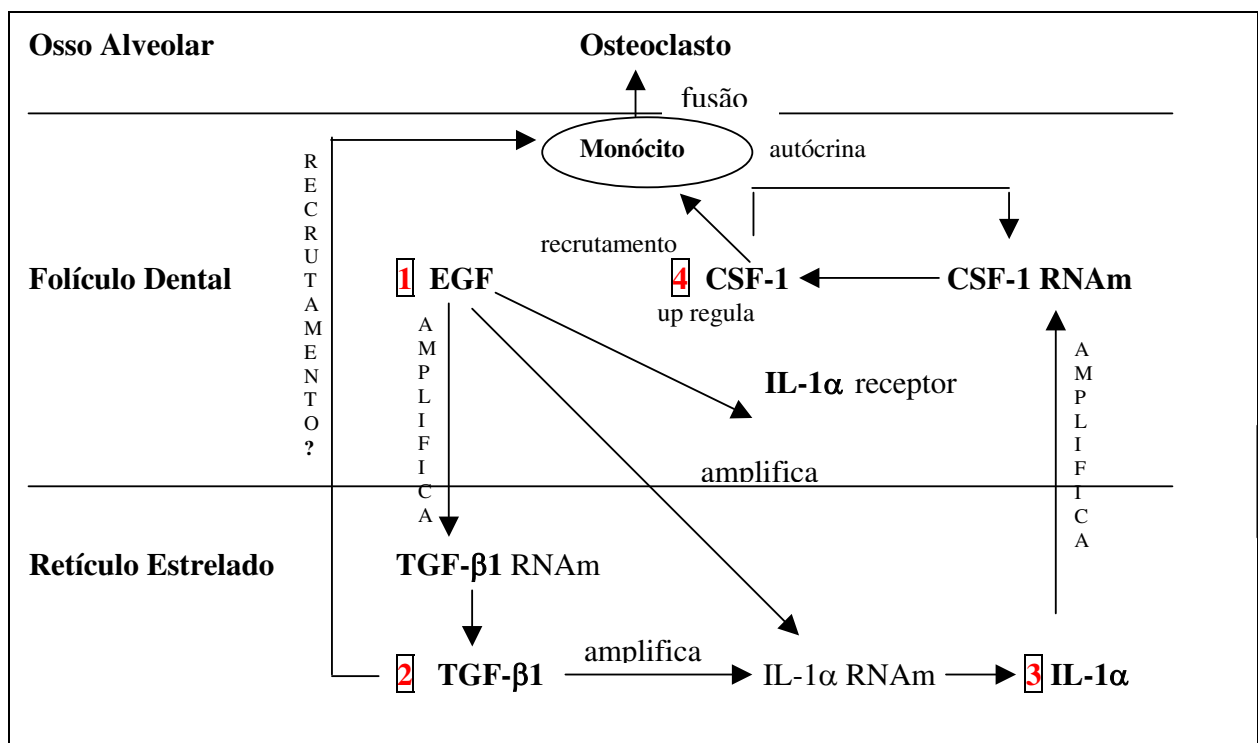
A maior parte dos estudos sobre erupção dental está voltada para elucidar o mecanismo gerador da força eruptiva e também na identificação dos tecidos ou estruturas destes tecidos envolvidos no processo. Os modelos experimentais mais usados têm sido dentes que apresentam crescimento e erupção contínua, como os incisivos de roedores e logomorfos (Moxham & Berkovitz, 1995), e dentes de crescimento e erupção limitada, como molares de cães e roedores (Cahil & Marks, 1980, 1982; Wise *et al.*, 1992).

Experimentos de ressecção da porção odontogênica de incisivos de ratos de crescimento contínuo, ou de sua transecção em duas porções incisal e apical, mostraram que dentes amputados erupcionavam normalmente sugerindo que os tecidos periodontais seriam os responsáveis pela erupção, pois eram os únicos a permanecer viáveis após a cirurgia (Berkovitz & Thomas, 1969; Berkovitz, 1971; Moxham & Berkovitz, 1974).



Pesquisas utilizando pré-molares de cachorro, dentes de crescimento e erupção limitados mostraram o papel do folículo dental no processo eruptivo em sua fase intra-óssea. Removendo-se a coroa recém formada do dente sem prejuízo do folículo, formou-se um caminho eruptivo. A coroa reimplantada sem o folículo, não erupcionou. Mantendo-se o folículo e substituindo-se a coroa por uma réplica de metal ou silicone, a réplica erupcionou. Concluíram, assim que o folículo dental seria o responsável pela erupção coordenando a atividade polarizada de reabsorção e neoformação óssea ao redor do dente em erupção (Cahil & Marks, 1980, 1982; Marks & Cahil, 1984). Posteriormente verificaram que além do folículo havia a participação de todo ou parte do órgão do esmalte (Gorkl & Marks, 1992).

Em estudos para identificar os fatores relacionados ao processo, Wise & Lin (1995) postulam que uma cascata de sinais moleculares seja a responsável pela iniciação da erupção dos dentes na fase intra-óssea, criando a via eruptiva.



Um dos primeiros fatores desta cascata é o EGF, descoberto por Cohen em 1962. Ele observou que a injeção deste fator no animal promove a erupção precoce dos incisivos.

Além de discutir o eventual papel do EGF na erupção dental (Thesleff, 1987; Partanen & Thesleff, 1987) parecem ter sido as primeiras a evidenciar a abundância do EGF no folículo dental de incisivos e molares de camundongo. Em molares de ratos, num período de 0 a 10 dias, pesquisadores observaram que o EGF e seu receptor sofrem uma modulação no folículo, diminuindo sensivelmente aos 10 dias. Mostram ainda a presença destes fatores no retículo estrelado, polpa dental, ameloblastos e osso alveolar (Wise *et al.*, 1992).

Nos incisivos inferiores de ratos, a presença do receptor do EGF foi evidenciada por meio de radioautografia, em várias células do órgão dental, mas com maior predominância nas células da camada papilar e ameloblastos de borda pregueada da zona de maturação do esmalte (Martineau-Doizé *et al.*, 1987); por sua vez foi demonstrada ainda em fibroblastos do ligamento periodontal e pré-osteoblastos de molares (Cho *et al.*, 1988 a e b) e incisivos (Thopan *et al.*, 1988). O EGFr foi evidenciado na papila adjacente ao sítio de produção de dentina e células da papila externa em dentes desimpedidos (hipofuncionais) (Shore *et al.*, 1992).

O receptor do CSF-1 parece estar presente em todas linhagens de células de macrófagos/monócitos (Nicola, 1987); no folículo dental sua expressão máxima se dá aos 3 dias de vida, seguido por um declínio do nível de seu RNAm (Wise *et al.*, 1997). Ratos osteopetróticos possuem dentes formados, mas que não erupcionam. Estes ratos mutantes são deficientes em CSF-1, e se este fator for administrado ao animal, haverá um aumento no número dos osteoclastos promovendo a reabsorção óssea e conseqüentemente a erupção (Marks *et al.*, 1992).

O TGF- $\beta$ 1 é relatado em embriões de ratos recém-nascidos e amplamente expresso em diferentes compartimentos teciduais das coroas dos dentes molares em desenvolvimento (D'souza *et al.*, 1990; Symons *et al.*, 1996), seu RNAm é localizado em odontoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal (Thesleff *et al.*, 1991; Gao *et al.*, 1996). Na fase pré-eruptiva é acumulado no folículo dentário, e também encontrado no retículo estrelado nos dois primeiros dias de vida (Wise & Fan, 1991).

A IL-1 $\alpha$  promove a reabsorção óssea estimulando a diferenciação dos osteoclastos (Pflschifter *et al.*, 1989). Os receptores da IL-1 são detectados nos osteoclastos presentes no osso alveolar (Xu *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1998). A presença da IL-1 $\alpha$  também foi detectada nos osteoclastos e odontoclastos em reabsorção ativa, nos osteoblastos em sítios de formação óssea, fibroblastos da região apical do desenvolvimento dos dentes, fibroblastos periodontais e células mononucleares nos espaços medulares do osso alveolar em dentes de gatos com 3,5 a 5,5 meses (Davidovitch *et al.*, 1988), e no retículo estrelado dos molares de ratos nos dez primeiros dias de vida, sendo mais intensa nos dois primeiros dias (Wise *et al.*, 1995).

Os incisivos de roedores apresentam a superfície labial e parte da distal recobertas por esmalte e sobre este temos o periodonto relacionado ao esmalte,, formado por tecido conjuntivo muito vascularizado, derivado do folículo dental e o órgão do esmalte ou dental em sucessivos estágios de seu ciclo vital. As superfícies lingual, mesial e parte da distal do dente são recobertas por cimento e somente nelas aparece o ligamento periodontal com suas fibras colágenas inseridas no osso alveolar e cimento. Como uma das teorias atribui à concentração dos fibroblastos ou sua ação sobre as fibras colágenas, o ligamento periodontal é considerado por muitos autores como o tecido responsável pelo processo eruptivo (Moxham & Berkovitz, 1995).

O tecido periodontal relacionado ao esmalte ou que corresponde à parte coronal do folículo dental de dentes de crescimento limitado, parece também ter um papel no estágio supra-ósseo da erupção, que é contínuo em dentes como incisivos de roedores, uma vez que lesões parciais provocadas nestes tecidos levam a um retardo e, às vezes, até a paralisação temporária da erupção (Merzel *et al*, 2000b). Por outro lado, lesões análogas no ligamento periodontal não alteram a taxa de erupção do incisivo de rato e em experimentos de transecção e ressecção, a erupção cessa quando a base do dente ultrapassa a crista alveolar do lado labial (quando desaparece o periodonto relacionado ao esmalte) e ainda resta o ligamento periodontal das faces lingual e mesial do dente (Merzel *et al*, 2000b). Outros fatores que se contrapõem ao papel atribuído por muitos autores ao ligamento periodontal no processo eruptivo, são erupção de dentes após a amputação da(s) raiz(es) (Gowgiel, 1961; Cahil & Marks, 1980) ou a erupção de réplicas de coroa onde nem raiz e nem ligamento periodontal são formados (Marks & Cahil, 1984).

Nos dentes de crescimento limitado, o folículo dental na parte coronária desaparece após a erupção e o da parte radicular, dá origem ao ligamento periodontal. Nos dentes de crescimento contínuo, a parte coronária do folículo é permanente. Por outro lado, uma das vantagens destes dentes é que a erupção pode ser experimentalmente alterada. Como não encontramos nenhum estudo sistemático sobre a distribuição do EGF, EGFr, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$  e CSF-1, nos tecidos periodontais de incisivos de ratos, o objetivo deste estudo é analisar, por meio da técnica de imunohistoquímica, a distribuição destas moléculas em incisivos de ratos, em condições normal e alterada de erupção.

## 2 Revisão da Literatura

### 2.1 O DENTE

Segundo Shour & Massler (1971), o dente é mais que um órgão mastigatório. Suas propriedades peculiares são um valioso indicador biológico que reflete e registra, durante o seu desenvolvimento, as condições metabólicas do animal. Estes registros, diferentes daqueles em ossos, não são transitórios, mas são permanentemente gravados no esmalte e dentina, nos quais não ocorre reabsorção. Os ratos são monofiodontes (G. monos: único, phyto: crescer, odous – odont: dente), portanto apresentam uma única dentição. O arco dental consiste de um incisivo e três molares em cada hemimandíbula e nos maxilares, compatibilizando dois tipos de dentes. Nos maxilares o incisivo está localizado anteriormente aos molares, estendendo-se na mandíbula, abaixo e além dos molares.

Os incisivos crescem, mineralizam-se e erupcionam continuamente por toda a vida do animal, demonstrando com isso, o completo ciclo vital do dente em desenvolvimento (a cada 40 ou 50 dias), desde o estágio mais incipiente até a maturação. Estes dentes são também continuamente desgastados na borda incisal pela atrição a que foram submetidos.

O incisivo consiste de uma coroa poderosa que pode ser dividida em duas partes: uma anterior (labial) ou convexa, e um remanescente posterior (lingual) ou côncavo e porções laterais. As superfícies labial e parte da distal são recobertas por esmalte e sobre este, o periodonto relacionado ao esmalte formado por tecido conjuntivo muito vascularizado derivado do folículo dental e o órgão do esmalte ou dental em sucessivos estágios de seu ciclo vital. As superfícies lingual, mesial e parte da distal do dente são recobertas por cimento e somente nelas é que aparece o ligamento periodontal com suas fibras colágenas inseridas no osso alveolar e cimento. A borda incisal do dente aparece na cavidade bucal aproximadamente no oitavo dia de vida do animal, e este se desenvolve a partir de uma bainha elíptica denominada epitélio odontogênico, localizado na base (região intra-óssea), e inclui o tecido conjuntivo da polpa primitiva. Este epitélio determina, em cortes transversais, o tamanho e contorno do futuro dente, proliferando durante toda a vida do animal.

Muitas teorias têm implicado vários tecidos adjacentes ao dente, como mediadores do processo de erupção. Teorias tentam explicar a erupção por meio do crescimento da raiz, proliferação de células da polpa e a pressão do fluido tecidual, pressão vascular ou hidrostática nos tecidos periodontais e remodelação do osso alveolar.

Como uma das teorias da erupção atribui a concentração dos fibroblastos ou sua ação sobre as fibras colágenas, apesar de controverso, o ligamento periodontal é considerado por muitos autores como o tecido responsável pelo processo eruptivo (Moxham & Berkovitz, 1974).

Experimentos de ressecção da porção odontogênica de incisivos de ratos de crescimento contínuo, ou de sua transecção em duas porções incisal e apical, mostraram que dentes amputados erupcionavam normalmente sugerindo que os tecidos periodontais seriam os responsáveis pela erupção, pois eram os únicos a permanecerem viáveis após a cirurgia (Berkovitz & Thomas, 1969; Berkovitz, 1971; Moxham & Berkovitz, 1974), estes resultados excluem as teorias dos

mecanismos como o crescimento da raiz, a proliferação de células da polpa e a pressão do fluido tecidual.

Dentes de crescimento e erupção limitados, erupcionam até mesmo na ausência da raiz, ou seja, também do ligamento periodontal, como nos caso de Displasia Dentinária tipo I (Gorski & Marks, 1992; Marks & Schoroeder, 1996). Lesões localizadas no ligamento periodontal relacionado ao esmalte podem causar um variável período de retardo da erupção, e em alguns casos cessar temporariamente o movimento eruptivo (Merzel *et al.*, 2002). Essas observações levam a conclusão de que o folículo dental tem um papel essencial no processo eruptivo, não somente na fase intra-óssea, mas também na fase supra óssea, a qual é contínua em incisivo de roedores, devido a presença de seu órgão odontogênico (Marks *et al.*, 1987; Merzel *et al.*, 2000).

A importância do folículo dental foi demonstrada por Cahil e Marks (1980) e Marks e Cahil (1984), num estudo com cães, onde mostraram que, a remoção do folículo dental preveniu a erupção, mas a substituição do dente por um objeto inerte, com o folículo dental preservado, resultou na erupção do objeto.

Outra hipótese relaciona a força eruptiva à remodelação do osso alveolar. Reabsorção e formação óssea concentram-se ao redor dos tecidos do dente em erupção, e dependem da atividade metabólica do folículo dental (Marks *et al.*, 1994). A necessidade de reabsorção do osso para a erupção acontecer, foi observada em animais osteopetróticos (com deficiência em osteoclastos e CSF-1, possuem os dentes formados, mas que não erupcionam)

## **2.2 FATORES DE CRESCIMENTO - GFs**

Peptídeos de fatores de crescimento foram inicialmente descobertos por suas habilidades em estimular mitose contínua de células quiescentes num meio

nutricional completo que necessita de soro; isto distingue GFs de elementos essenciais, cofatores e nutrientes que são utilizados num processo metabólico, mas que não são suficientes para iniciar mitose destas células quiescentes. Estes fatores de crescimento são sintetizados e secretados por muitos tipos de células envolvidas em tecidos de reparo, incluindo plaquetas, células inflamatórias, fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais vasculares, podem agir sobre a célula produtora: estimulação autócrina, células adjacentes: parácrina, ou células distantes: estimulação endócrina (Bennett & Schultz, 1993).

Todos os peptídeos de GFs iniciam seus efeitos pela ligação e atividade específica a proteínas receptoras de alta afinidade, localizadas na membrana plasmática de células alvo (Adamsom, 1990).

Vários são os fatores de crescimento, como: PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas); TGF- $\beta$ 1 (fator transformador do crescimento), EGF (fator de crescimento epidermal), FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e outros.

### **2.3 FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL – EGF e RECEPTOR PARA FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL - EGFr**

EGF é um polipeptídeo de massa molecular de 6045 KDa e 53 aminoácidos. Foi descoberto inicialmente pela habilidade de induzir a abertura precoce das pálpebras e erupção do dente incisivo de rato; isolado de extratos de glândula submandibular de ratos machos (Cohen, 1962; Cohen & Savage, 1974).

É também encontrado em diferentes tecidos (rim, pulmão, dente), e fluidos corpóreos (saliva, urina, leite, etc.). Este fator de crescimento estimula a proliferação de células epiteliais e mesenquimais, e a diferenciação de ambas, promove a síntese de várias macromoléculas e reabsorção do osso (Carpenter & Cohen, 1979).

Segundo Benett & Shultz (1993), a família do EGF inclui: EGF (fator de crescimento epidermal), TGF- $\beta$ 1 (fator transformador do crescimento), AR



(anfíregulina) e HBEGF-EGF (fator de crescimento epidermal ligado a heparina). Estes peptídeos são similares na estrutura, ligam-se à mesma célula receptora de membrana, mas têm efeitos biológicos diferentes. O EGF é sintetizado como uma grande molécula precursora, uma proteína transmembrana de 1207 aa, que é proteoliticamente clivada para liberar este fator de crescimento, ou seja, um pequeno fragmento de 54 aa biologicamente ativo.

O EGF é dobrado sobre si em 3 voltas, ligados por pontes de dissulfeto. Esta estrutura de tripla volta é exigida para a atividade biológica e distingue todos os membros da família do EGF de outras famílias de fatores de crescimento.

Resultado de numerosos estudos com cultura de células estabeleceram que o EGF é um potente mitógeno para muitos tipos de células de origem ectodérmica, mesodérmica e endodérmica (Carpenter & Cohen, 1979; Shour & Massler, 1971). Também estimula a proliferação de células embrionárias em cultura e durante os eventos morfogenéticos (Partanen & Thesleff, 1987; Shour & Massler, 1971).

O modo pelo qual o EGF interage com as células alvo é se ligando ao seu receptor (EGFr), localizado na membrana celular. O receptor do EGF é uma glicoproteína transmembrana de 170 KDa e 1186 aa. (Benett & Schultz, 1993).

O EGFr é composto por 3 regiões: domínio extracelular com 621 aa, que apresentam os sítios de ligação para o fator de crescimento; domínio transmembrana, com 23 aa, que consiste de aminoácidos hidrofóbicos; e domínio citoplasmático, com 542 aa, que contém uma proteína tirosinoquinase específica, ativada pela ligação do EGF no domínio extracelular. Células normais possuem aproximadamente 20.000 receptores cada (Partanen, 1990).

Quando o EGF se liga no sítio do domínio extracelular, induz a alteração na conformação do receptor, que promove sua dimerização e ativa a tirosinoquinase no domínio citoplasmático, resultando na ligação de uma molécula de ATP e finalmente na autofosforilação do receptor (transferência de um grupo fosfato do ATP para as cadeias laterais selecionadas de tirosina no próprio receptor). Após a

ligação do EGF ao seu receptor, o complexo EGF/EGFr é internalizado na célula, isto é, este complexo é transportado por uma rede de túbulos e vesículas chamadas endossomos, em seguida o EGF e seu receptor são degradados nos lisossomos; isto desencadeia uma cascata de fosforilação de outras proteínas intracelulares, resultando assim, em determinada resposta celular que eventualmente induz as células a migrarem ou se dividirem (Benett & Schultz, 1993; Thesleff, 1987; Bruce *et al.*, 1991; Raymond *et al.*, 2000). O EGF, assim como outros fatores de crescimento, exercem seus efeitos biológicos, principalmente por mecanismo parácrino (age sobre células vizinhas) e autócrino (age sobre a célula produtora) (Thesleff, 1987).

*O desenvolvimento do dente é um bom exemplo para a morfogênese e diferenciação de um órgão epitélio-mesênquima.*

*Vários estudos relataram a presença do EGF e de seu receptor – EGFr nas células do órgão dentário.*

Segundo Thesleff (1987), o índice da erupção dentária é anormal em diversas condições patológicas e síndromes, e estas anormalidades podem ser alteradas experimentalmente em animais. A erupção é acelerada em pacientes com hiperfunção de várias glândulas endócrinas, e o atraso na erupção está associado ao hipofuncionamento das glândulas tireóide, hipófise e adrenal. Estudos confirmaram que o EGF está envolvido na mediação dos efeitos dos hormônios tireoidiano, hormônio do crescimento, insulina e corticosteróides. O hormônio tireoidiano aumenta a concentração deste fator de crescimento na urina e em vários tecidos do rato, incluindo a glândula submandibular, olho, pele e dente. O mecanismo pelo qual este hormônio aumenta a capacidade do EGF nos tecidos não é conhecido, mas há ao menos três possibilidades:

- 1-) O número de EGFr pode ser aumentado.
- 2-) A síntese do EGF pode ser estimulada, local ou sistematicamente.

3-) A degradação pode ser lenta, é evidente, pois o hormônio tireoidiano afeta os níveis do EGFr nas glândulas mamárias e fígado.

Como o hormônio tireoidiano afeta o dente, ainda não está esclarecido.

Martineau-Doizé *et al.*, (1987) mostraram por meio de radioautografia, que no órgão do esmalte de incisivos inferiores de ratos, os sítios específicos de ligação do EGF estão presentes no tecido conjuntivo adjacente ao osso alveolar (tecido conjuntivo derivado do folículo dental), retículo estrelado e estrato intermédio das zonas pré e secretórias; também nas células da camada papilar da zona de maturação e nos ameloblastos com borda em escova (ruffle-ended).

Rihtniemi & Thesleff (1987), fizeram estudos com ratos recém-nascidos, para saber a ação do EGF. Observaram que nos animais tratados, os incisivos inferiores irromperam 3 dias antes que os do grupo controle. Isto mostra que este fator induziu a erupção precoce do incisivo, pela estimulação da proliferação celular. Os pré-ameloblastos e pré-odontoblastos associados com o aumento de mitoses foram os responsáveis pelo crescimento do dente. Este estudo sugere que o ligamento periodontal ou o folículo dental pode ter papel central no controle da erupção, talvez pelo controle da reabsorção e formação óssea.

Ainda em 1987, Partanen & Thesleff estudaram a localização do  $^{125}$ I-EGF no germe dentário do molar de camundongos, em diferentes estágios do desenvolvimento, e também durante o desenvolvimento embrionário de outros órgãos, tais como, rim, pulmão, pele e glândula submandibular, que são formados de componentes epiteliais e mesenquimais, Em todos os tecidos examinados, ocorreu alta intensidade de marcação nos estágios de maior atividade proliferativa de cada órgão. Por outro lado, a distribuição dos sítios de ligação do EGF foi alterada dramaticamente durante o desenvolvimento. Isso sugere que o EGF atua na organogênese desses órgãos, como estimuladores da proliferação epitelial durante os estágios iniciais e também na progressão da morfogênese. Os autores

concluíram, que a distribuição dos receptores nos diferentes tecidos e a resposta ao EGF estão sob controle local, sendo específicas do estágio do desenvolvimento de cada órgão, não estando relacionada à idade do embrião.

Snead *et al.*, (1989), observaram quais grupos de células produzem o precursor do EGF durante o desenvolvimento de órgãos dependentes de interações epitélio-mesênquima, tais como o órgão dentário de camundongos. A análise realizada detectou a presença do RNAm do precursor do EGF no epitélio dentário interno, estrato intermédio, retículo estrelado e nas células ectomesenquimais da papila dentária do germe dentário de molares no 17º dia pós-nascimento. O RNAm do precursor do EGF, também se mostrou presente na cartilagem de Meckel e na periferia dos centros osteogênicos da mandíbula; estas últimas estruturas também mostraram a presença de receptores para o EGF. Sendo assim, durante o desenvolvimento mandibular, os locais de produção do EGF coincidiram com células ricas em EGFr, sugerindo que estas regiões contribuem para o desenvolvimento mandibular.

Cam *et al.*, (1990) descreveram o padrão de distribuição do EGFr, utilizando a técnica de imunofluorescência durante os eventos que levam à amelogênese do 1º molar inferior de camundongos. Durante a histomorfogênese (13º ao 17º dias pré-natal) o EGFr estava localizado nos epitélios dentários, primeiramente no epitélio dentário interno e mais tardiamente no epitélio dentário externo. Após este período, a expressão do EGFr nestas estruturas diminuía, enquanto no retículo estrelado se mantinha com alta intensidade até o 20º dia pré-natal. Adicionalmente, no 0 dia pós-natal foi encontrada alta intensidade de marcação para o EGFr nas células do mesênquima apical. Esses resultados sugeriram que o EGF participa na cito e histodiferenciação durante o início da odontogênese, e que macromoléculas da matriz extracelular podem estar envolvidas nesse processo.

Martineau-Doizé *et al.*, (1991) estudaram a localização do  $^{125}\text{I}$ -EGF no órgão dentário de incisivos de ratos, durante a amelogênese. Na zona pré-secretória foram observados sítios de ligação do  $^{125}\text{I}$ -EGF nas células do epitélio dentário externo e zona secretória; a expressão ocorreu nas células da camada papilar e extrato intermédio. Em ambas as zonas, pré-secretória e secretória, foi encontrada fraca, porém específica marcação sobre os ameloblastos. Na zona de maturação foi encontrada uma alta afinidade do EGF marcado nas células da camada papilar e nos ameloblastos de superfície estriada. Os ameloblastos de borda lisa mostraram poucos receptores para o EGF. Os ameloblastos modulam sua morfologia de borda estriada para lisa e vice-versa, em aproximadamente 2 horas, indicando que a modulação dos ameloblastos é mais rápida que a meia vida dos receptores. Isto sugere a apreensão dos receptores nos ameloblastos de borda lisa e sua exteriorização nos ameloblastos de borda estriada, demonstrando, que os receptores se reciclam durante a modulação entre os dois grupos de ameloblastos. Entretanto, são necessários estudos adicionais, para avaliar as relações moleculares funcionais entre o EGF, modulação dos ameloblastos e a mineralização do esmalte.

Cobo *et al.*, (1992) estudando a imunomarcagem para o EGF em embriões de ratos com idade entre 16 e 21 dias pré-natal, encontraram um padrão similar na distribuição do EGF e de seu receptor. Observaram fraca marcação nas células do germe dentário nas fases de botão, capuz e campânula. Durante a formação dos tecidos dentários (20 e 21 dias pré-natal), moderada marcação nos odontoblastos, ameloblastos e epitélio dental interno, porém forte marcação na dentina. Adicionalmente, a presença do EGF e do EGFr foi observada nas células do tecido ósseo que circunda o germe dental. Os resultados sugeriram que o EGF tem moderada participação durante os períodos iniciais da diferenciação do dente, e, provavelmente, está mais envolvido com a produção da dentina. Além disso, o EGF e seu receptor participam da diferenciação e maturação de outros tecidos, tais como, o SNC e o osso.

Shore *et al.*, (1992), verificaram que o EGFr estava presente no órgão dentário do esmalte e papila dentária, na região odontogênica de incisivos de ratos jovens. As células da papila dentária, pré-ameloblastos e pré-odontoblastos apresentaram fraca marcação para o EGFr, enquanto durante o estágio secretório, os ameloblastos mostraram forte intensidade na marcação, sugerindo que estas células utilizam o EGF durante a secreção da matriz do esmalte.

Wise *et al.*, (1992), mostraram em molares de ratos de 0 a 10 dias pós-nascimento, que a imunolocalização do EGF e de seu receptor, apresentaram um padrão similar na marcação, observados nas células do órgão do esmalte e do folículo dentário, sendo que o EGF foi mais intenso no folículo dentário, ameloblastos e osso alveolar até o 4º dia, diminuindo a intensidade nos dias subseqüentes; no retículo estrelado, a marcação foi fraca do 2º ao 10º dia; já odontoblastos e polpa dental tiveram moderada intensidade de marcação em todos os períodos estudados. Para o EGFr, o folículo dentário também mostrou forte marcação do 0 ao 8º dia, diminuindo no 9º dia; pré-osteoblastos e osteoblastos do osso alveolar mostraram marcação menos intensa, enquanto que ameloblastos e odontoblastos marcação mais fraca. A imunolocalização do EGF nos ameloblastos foi mais intensa que para o EGFr. Assim, concluiu-se que a localização do EGF nas células do órgão do esmalte e do folículo dentário durante o período crítico da erupção dentária, pode exercer um papel importante nos eventos iniciais desta erupção, por meio de um efeito autócrino e/ou parácrino sobre o folículo dentário, estando assim envolvido na regulação do desenvolvimento dos dentes.

Em 1995 Davideau *et al.*, investigaram, em molares de ratos, o envolvimento do EGF na formação dos tecidos mineralizados por meio de hibridização *in situ* e imunohistoquímica. O EGFr foi detectado no diafragma epitelial, bainha epitelial de Hertwig e células formadoras do osso alveolar com

forte intensidade de marcação, sugerindo a participação do EGF na proliferação e diferenciação celular dos tecidos mineralizados do dente

Tanikawa e Bawden (1999) estudaram , em molares de ratos no 5º dia pós-natal, a localização e possíveis efeitos biológicos do EGF em células do órgão dentário durante os eventos que levam diretamente à formação do esmalte Por meio da imunohistoquímica, localizaram sítios de ligação para o EGF nos ameloblastos pré-secretórios, nas regiões distal e proximal dos ameloblastos secretórios, nos odontoblastos e no estrato intermédio, sugerindo que o EGF exerce papel importante na diferenciação e secreção dos ameloblastos.

Adicionalmente, outras células expressam o EGF. Araújo *et al.*, (2003) avaliaram a expressão do EGF e de seu receptor nas células epiteliais da gengiva normal e de pacientes com fibromatose gengival hereditária. O estudo revelou o mesmo padrão de distribuição para o EGF e EGFr. Estes foram localizados na camada basal, com maior intensidade de marcação, diminuindo progressivamente nas camadas espinhosa e granulosa. Esses dados indicaram que a síntese do EGF ocorre nas células basais do epitélio oral. O EGF e EGFr, também foram encontrados com forte marcação, na região basal das papilas epiteliais hiperplásicas dos pacientes com fibromatose gengival hereditária, sugerindo o envolvimento do EGF na proliferação celular. Outro estudo, também mostrou forte expressão do EGF no epitélio oral próximo ao dente em desenvolvimento e na epiderme de camundongos (Gresik *et al.*, 1998).

## **2.4- FATOR TRANSFORMADOR DO CRESCIMENTO - TGF- $\beta$ 1**

A superfamília do TGF- $\beta$  inclui fatores transformadores do crescimento (TGF- $\beta$ s), activina e proteína óssea morfogenética (BMPs); é uma grande família de moléculas sinalizadoras, que regulam muitos aspectos da função celular e conseqüentemente têm diversos efeitos sobre uma variedade de tipos celulares e

tecidos (Kingslei, 1994; Yingling *et al*, 95). Os membros da superfamília do EGF- $\beta$  exercem seus efeitos pela ligação aos receptores de superfície celular. Receptores tipo I e II para TGF- $\beta$ s, activinas e BMPs são quinases serina/treonina transmembrana (Wrana *et al.*, 1992; Attisano *et al.*, 1996).

Uma característica distinta da família de proteínas do TGF- $\beta$  é sua habilidade de reversibilidade para inibir o crescimento de vários tipos celulares, particularmente células derivadas do ectoderma, como queratinócitos e leucócitos (Olashaw *et al.*, 1986). TGF- $\beta$ s são sintetizados por uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo plaquetas, macrófagos, linfócitos, fibroblastos, células ósseas e queratinócitos. Quase todas as células possuem receptores para TGF- $\beta$ . Assim, os fatores transformadores do crescimento são, provavelmente, os mais amplamente atuantes de todas as famílias de fatores de crescimento (Bennett NT & Schultz GS, 1993)

Nos mamíferos, a família de TGF- $\beta$  consiste de 3 proteínas relacionadas, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. Estas 3 isoformas compartilham de 70 a 80% de homologia na seqüência dos aa, quase 100% conservado entre as espécies, e mostram funções similares *in vitro* (Massague *et al.*, 1992; Kingsley, D. 1994). Há um grau notável de identidade entre as seqüências maduras do TGF- $\beta$  de diferentes espécies. Por exemplo, as seqüências do TGF- $\beta$ 1 maduro de origem humana, suína, símia e bovina são idênticas.

TGF- $\beta$ 1 foi inicialmente isolado e seqüenciado a partir de plaquetas. É uma proteína homodimérica, de peso molecular de 25Kda. Cada subunidade do TGF $\beta$ 1 é inicialmente sintetizada como uma molécula precursora inativa com 390 aa, proteoliticamente processada para gerar um fragmento da porção C-terminal do seu precursor com 112 aa. Contudo, em muitas células, a porção N-terminal da molécula precursora permanece associada à proteína TGF- $\beta$ 1, formando um complexo latente ou inativo. Nas plaquetas, uma terceira proteína, chamada proteína latente de ligação ao TGF- $\beta$ , se liga e estabiliza o complexo (Miyazono, *et.al.*,1991).



No contexto da reparação tecidual, duas das mais importantes ações dos TGF- $\beta$ s são suas habilidades para estimular a quimiotaxia de células inflamatórias e para estimular a síntese de matriz extracelular (Bennett & Schultz, 1993).

Fatores transformadores do crescimento, são reguladores multifuncionais de ação autócrina e parácrina do crescimento e diferenciação celular, morfogênese, angiogênese, adesão, quimiotaxia, resposta imune e formação da matriz extracelular. Anormalidades em muitas destas funções podem estar relacionadas com o desenvolvimento de câncer. (Contudo, as isoformas são diferencialmente expressas espacialmente e temporalmente *in vivo*, durante a embriogênese (Pelton *et al.*, 1991), reparação tecidual e carcinogênese (Levine *et al.*, 1993; Gold *et al.*, 1994)).

*O Fator transformador do crescimento tipo  $\beta$ 1 tem despertado interesse, devido a sua forte localização em tecidos mineralizados (Syedin *et al.*, 1985). Em embriões e logo após o nascimento, este tem sido reportado como sendo amplamente expresso em vários compartimentos da coroa de molares de ratos em desenvolvimento (D`Souza *et al.*, 1990; Symons *et al.*, 1996).*

Cam *et.al.*, (1990), estudaram a imunolocalização do TGF- $\beta$ 1 em incisivos inferiores e 1º molar de embriões e recém-nascidos de ratos. O TGF- $\beta$ 1 foi detectado no retículo estrelado dos incisivos de 13 e 16 dias e no retículo estrelado nos 1ºs molares do 17º ao 20º dia. O mesênquima dental de incisivos e molares com 14 dias e mesênquima peridental dos molares em estágio de botão e capuz, também apresentaram marcação. A expressão mais precoce no retículo estrelado dos incisivos que nos molares, não reflete o conhecido atraso de 1,5 dia entre a polarização dos odontoblastos nos incisivos e 1ºs molares inferiores de ratos. Os resultados obtidos sugerem que as células do epitélio dental interno e externo sintetizam e secretam TGF- $\beta$ 1, portanto os receptores do TGF- $\beta$ 1 poderiam estar localizados nas células do mesênquima dental e retículo estrelado,

e participariam na regulação da proliferação celular nos estágios iniciais da odontogênese ( $\leq 16^{\circ}$  dia) e diferenciação num estágio posterior ( $\leq 17^{\circ}$  dia).

Vahtokari *et al.*, (1991), estudaram a expressão do RNA do TGF- $\beta$ 1 durante o desenvolvimento do dente. Análises mostraram o aspecto da expressão local do RNA do TGF- $\beta$ 1 no epitélio dental no estágio de botão (embriões de 13 dias). Pouco antes da transição para o estágio de capuz, a expressão aumentou no botão epitelial e no mesênquima dental condensado. No estágio de capuz (14 – 15 dias pré-natal), houve intensa expressão na alça cervical morfologicamente ativa do epitélio dental. No início do estágio de sino (embriões de 16 – 17 dias pré-natal), houve expressão no epitélio dental interno, que desapareceu no 18<sup>o</sup> dia. Após o nascimento, os transcritos do TGF- $\beta$ 1 apareceram transitoriamente nestas células, quando estavam se diferenciando em ameloblastos, e desapareceram quando estes se tornaram secretores (4 dias pós natal), mas a expressão continuou nos ameloblastos das cúspides, nas áreas livres de esmalte. Expressão transitória do RNA do TGF- $\beta$ 1, também foi detectada nas células do estrato intermediário, e odontoblastos expressaram altos níveis de TGF- $\beta$ 1 em todos os estágios, incluindo odontoblastos da raiz dos incisivos.

Os autores sugeriram que o TGF- $\beta$ 1 pode regular a diferenciação terminal e, ou as funções secretoras dos ameloblastos; que nos odontoblastos, o TGF- $\beta$ 1 pode agir como um fator autócrino que regula sua própria síntese, e a formação da matriz da dentina. As mudanças em estágios específicos na distribuição do RNA do TGF- $\beta$ 1 no desenvolvimento dental, sugerem que o TGF- $\beta$ 1 possui múltiplos papéis na odontogênese. Ao que parece, o fator transformador do crescimento tipo  $\beta$ 1 age como um fator parácrino e autoindutor, e também participa de interações epitélio-mesênquima.

Wise & Fan (1991), estudaram a localização do TGF- $\beta$ 1 em molares de ratos de 1 a 7 dias pós-natal. Os resultados indicaram que o TGF- $\beta$ 1 exibe uma

localização espacial e temporal. Nos ratos de 1 e 2 dias de vida, o retículo estrelado marcou fortemente, mas folículo dental, ameloblastos e estrato intermediário não apresentaram marcação. Nos dias subseqüentes (até o 7º dia), a marcação desapareceu do retículo estrelado e se manteve ausente nos outros tecidos.

Os pesquisadores concluíram, que por ser um evento crítico no molar de rato, o influxo de monócitos no folículo dental antes da erupção (3º dia), e como a marcação do TGF- $\beta$ 1 no retículo estrelado precedeu este evento do desenvolvimento (1º e 2º dia), este influxo de monócitos se junta ao fato de que capilares fenestrados são abundantes no folículo dental adjacente ao retículo estrelado, sugerindo que o TGF- $\beta$ 1 poderia ter um papel na atração de monócitos do sangue periférico para o folículo dental e este influxo também poderia contribuir para um aumento paralelo dos osteoclastos, necessários à formação de uma via eruptiva (reabsorção óssea), para que o dente chegue à cavidade bucal.

Lin & Wise (1993), estudaram a imunolocalização do TGF- $\beta$ 1 e EGFR e a ação do EGF sobre o TGF- $\beta$ 1 nas células do retículo estrelado do 1º e 2º molares de ratos com 6 e 8 dias pós-natal.

Os resultados mostraram que as células do retículo estrelado respondem à incubação com EGF, pois houve um aumento no nível de expressão do RNAm do TGF- $\beta$ 1. Ao que parece, o efeito do EGF sobre as células do retículo estrelado, é estimular a expressão do RNAm do TGF- $\beta$ 1. A imunohistoquímica mostrou que a maioria das células contém as proteínas TGF- $\beta$ 1 e EGFr.

Os autores concluíram que, como o EGF estimula a erupção prematura dos dentes, seu efeito sobre a região do retículo estrelado, poderia ser para estimular a síntese de RNAm do TGF- $\beta$ 1, que ao contrário, conduziria ao aumento da síntese do TGF- $\beta$ 1 por estas células; então o TGF- $\beta$ 1 sintetizado exerceria seu efeito sobre o folículo dental adjacente, sendo que um ou outro iniciaria os eventos celulares da erupção dental.

Izeki *et. al.*, (1995), investigaram o padrão de localização dos receptores para TGF- $\beta$  tipo I e tipo II (T $\beta$ R-I e T $\beta$ R-II), durante a organogênese, em embriões de ratos de 12 a 16 dias.

Os resultados mostraram marcação para os receptores tipo I e II em vários órgãos em desenvolvimento como, osso, dentes, cartilagem de Meckel e tecidos neurais, onde a expressão de seus ligantes já tinha sido reportada. Durante os estágios estudados, a expressão do T $\beta$ R-I foi mais evidente que o T $\beta$ R-II. O T $\beta$ R-II foi localizado preferencialmente nas células mesenquimais indiferenciadas, que subsequentemente se diferenciaram em osso. No sistema nervoso central houve intensa marcação somente para o receptor tipo I. Na região da mandíbula de embriões com 13 a 15 dias, observou-se marcação para ambos os receptores na cartilagem de Meckel. Marcação dispersa foi detectada no epitélio oral, mostrando-se mais intensa nos sítios de invaginação do broto dental e glândula submandibular. No 13º dia, a lâmina dental estava se invaginando no mesênquima condensado, T $\beta$ R-I e II se localizaram no epitélio em invaginação. Esta co-localização dos receptores no broto dental foi observada até o 16º dia, mas subsequentemente se tornaram limitadas ao retículo estrelado.

Na conclusão, os autores sugeriram que os receptores tipo I e II são os principais mediadores dos efeitos dos TGF- $\beta$ s, e que estes TGF- $\beta$ s possuem múltiplos papéis importantes durante o desenvolvimento do vertebrado. A co-localização dos receptores no broto dental levou os autores a especular que, ambos os receptores T $\beta$ R-I e T $\beta$ R-II poderiam ser necessários para a dinâmica epitelial da morfogênese.

Gao *et. al.*, (1998) observaram a expressão e imunolocalização do TGF- $\beta$ 1 no periodonto de ratos (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar) com idade de 3, 6 e 12 semanas (raízes de molares em erupção e raízes completamente formadas de molares erupcionados). Os resultados revelaram que o TGF- $\beta$ 1 foi expresso no osso alveolar em desenvolvimento, ligamento periodontal e cimento,

em todos os estágios estudados. Durante o desenvolvimento da raiz, marcação positiva para o TGF- $\beta$ 1 foi observada nos tecidos do ligamento periodontal, osso e cimento em todos os estágios. A distribuição do TGF- $\beta$ 1 nos fibroblastos do ligamento periodontal foi mais fraca que o observado nos osteoblastos e cementoblastos; o endotélio dos vasos sanguíneos também foi imunopositivo para o TGF- $\beta$ 1. A intensidade da expressão do TGF- $\beta$ 1 nos osteócitos, localizados no osso alveolar que envolve a raiz, variou com a idade dos animais; as células no osso alveolar maduro demonstraram uma diminuição na intensidade de marcação. Osteoclastos, na superfície óssea em reabsorção, adjacente à porção cervical da raiz nos ratos de 6 semanas, também expressaram positiva marcação.

Os resultados da hibridização *in situ*, mostraram a expressão do RNAm do TGF- $\beta$ 1 nos osteócitos, cementoblastos e fibroblastos, tanto na porção cervical como na porção apical do periodonto em desenvolvimento em todas as idades estudadas. Os transcritos para o TGF- $\beta$ 1 foram localizados no citoplasma e ocasionalmente no núcleo destas células. Fibroblastos do ligamento periodontal expressaram RNAm do TGF- $\beta$ 1 nas porções apical e cervical da raiz. Na maior parte dos osteócitos e células endoteliais dos vasos sanguíneos, não foram detectados sinais de RNAm do TGF- $\beta$ 1. Na medula óssea adjacente ao ápice da raiz, muitas células mononucleares expressaram RNAm para o TGF- $\beta$ 1.

Ao que parece, o TGF- $\beta$ 1 está associado ao desenvolvimento do ligamento periodontal, cimento e osso alveolar, em todos os estágios do desenvolvimento da raiz, após o nascimento. Cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal, podem ser a principal fonte de produção do TGF- $\beta$ 1. O TGF- $\beta$ 1, na matriz extracelular, pode ser benéfico para a própria reparação tecidual, podendo ser liberado dos sítios locais de armazenamento, seguindo para os tecidos danificados. Portanto, os autores concluíram que o TGF- $\beta$ 1 tem um importante papel na modulação da formação tecidual e desenvolvimento do periodonto.

Sloan & Smith (1999), estudaram os efeitos das isoformas do TGF- $\beta$ s (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3) sobre a resposta do complexo dentina-polpa de incisivos de ratos com 28 dias de vida. Para o TGF- $\beta$ 1, os resultados mostraram, que após a aplicação do mesmo, a maior parte das culturas foi afetada. Eles foram fortemente associados aos sítios de aplicação inicial das gotas de agarose; odontoblastos e células da camada sub-odontoblástica subjacente foram afetadas. O localizado aumento no espessamento da pré-dentina, foi observado nos sítios de aplicação das gotas de agarose, quando comparado às áreas da mesma cultura longe da gota e com as culturas controles. Observou-se ainda um aumento no número das células da camada sub-odontoblástica, nos sítios de aplicação do TGF- $\beta$ 1, quando comparado a áreas e culturas controles. Em geral, todos os efeitos biológicos mostraram gradientes de intensidade, como distância do sítio de aplicação aumentado. O TGF- $\beta$ 3 estimulou ainda um aumento local na secreção da pré-dentina, nos sítios de aplicação quando comparados a culturas controles. O TGF- $\beta$ 2 teve um efeito mínimo sobre as culturas; nenhuma mudança significativa no espessamento da pré-dentina ou densidade das células sub-odontoblásticas ocorreram nas áreas associadas com as gotas de agarose, quando comparados às áreas controles. Os resultados demonstraram que TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 podem, localmente estimular efeitos dentinogênicos nos odontoblastos, quando aplicados sobre gotas de agarose. Estas isoformas têm efeitos mitogênicos sobre a população de células sub-odontoblásticas. Assim, os pesquisadores concluíram que os resultados fornecem suportes evidentes para o envolvimento do TGF- $\beta$  nos eventos da dentinogênese, permitindo comparações de tais eventos nos tecidos em desenvolvimento e maduros, com os processos de reparação no complexo dentina-polpa após injúria tecidual.

## **2.5- INTERLEUCINA-1 $\alpha$ - IL-1 $\alpha$**

A IL-1 $\alpha$ , assim como outras citocinas, é um potente fator, que demonstra atividade mesmo em baixas concentrações (Oppenheim *et al.*, 1986). No osso, estimula os osteoclastos aumentando a reabsorção óssea (Thomson *et al.*, 1986). A produção da IL-1 tem sido freqüentemente associada a condições patológicas e sua atividade é modulada por outras substâncias (Shirakawa *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1987).

*Em animais osteopetróticos, a reabsorção óssea é defeituosa e o dente não erupciona. Ao que parece, o metabolismo ósseo local envolve a produção de citocinas como a IL-1 $\alpha$ ; a produção desta citocina pelos tecidos dentais durante a erupção pode ser fundamental para o movimento do dente (Symons *et al.*, 1995).*

Davidovitch *et al.*, (1988) estudaram a imunolocalização de interleucinas em células dentais e paradentais, durante a erupção e reabsorção da raiz, em mandíbulas de gatos com 3,5, 4,5 e 5,5 meses. Os resultados mostraram imunoreatividade positiva para a IL-1 $\alpha$  em osteoclastos e odontoclastos em ativa reabsorção, osteoblastos em sítios de ativa formação óssea, fibroblastos da polpa da região apical dos dentes em desenvolvimento, fibroblastos do ligamento periodontal e células mononucleadas dos espaços medulares do osso alveolar. Com os resultados os autores concluíram, que interleucinas, principalmente IL-1 $\alpha$ , está presente nas células de dentes em erupção e em reabsorção. Portanto essa citocina pode ser reguladora das atividades fisiológicas destas células. Como muitos tipos celulares foram implicados no processo de erupção dental e reabsorção da raiz, pode ser concebível postular, que a IL-1 $\alpha$  é um importante regulador endógeno da erupção e reabsorção.

Symons *et al.*, (1995), estudaram a bioatividade da IL-1 $\alpha$ , por meio de cultura dos primeiros molares inferiores de ratos com falha na erupção dental (defeito na reabsorção óssea) e ratos normais, com 3 a 13 dias de vida pós-nascimento. Os resultados mostraram que dentes molares de ratos normais secretam mais IL-1 $\alpha$  que dentes de animais em estado patológico, refletindo a diferença no tamanho dos animais; ratos normais apresentaram maior peso e dentes molares maiores; os níveis detectados da IL-1 secretada pelos dentes aumentaram progressivamente com a idade dos animais.

Os pesquisadores concluíram que a quantidade da IL-1 $\alpha$  secretada pelos dentes em desenvolvimento pode resultar de tecidos normais em desenvolvimento e diferenciação e/ou ocorrer em resposta ao metabolismo ósseo local.

Wise *et al.*, (1995), estudaram a imunolocalização da IL-1 $\alpha$  no 1º molar de ratos de 0-12 dias pós-nascimento, mostrando a localização desta proteína no retículo estrelado, adjacente ao folículo dental. A marcação no retículo estrelado foi mais proeminente logo após o nascimento, tornando-se ausente no 11º dia. Injeções de EGF em ratos com 0 dia, aumentou grandemente a intensidade de marcação da IL-1 $\alpha$  no retículo estrelado, e a expressão do gene para a IL-1 $\alpha$  em células do mesmo tecido (*in vitro*). Os resultados deste estudo sugerem uma tradução aumentada do RNAm da IL-1 $\alpha$  no retículo estrelado, após injeções de EGF. A IL-1 $\alpha$  pode exercer seu efeito sobre as células do folículo dental, adjacente ao retículo estrelado, porque o EGF também aumenta a expressão do RNAm do receptor tipo I da IL-1 $\alpha$  em cultura de células do folículo dental, como também aumentando sua expressão *in vivo*. Pelo fato de que, injeção de EGF estimula a erupção precoce dos dentes, seu estímulo sobre a síntese da IL-1 $\alpha$  no retículo estrelado, pode ser o mecanismo pelo qual o EGF inicia os eventos da cascata molecular, sinalizando o início da erupção dental.



Wise & Zhao (1997), estudaram por meio de imunohistoquímica, a presença do receptor tipo I (IL-1RI) para IL-1 $\alpha$ , em fibroblastos do folículo dental de molares de ratos.

Os resultados mostraram que o receptor tipo I da IL-1 $\alpha$  é primariamente localizado no folículo dental, com uma marcação muito intensa logo após o nascimento e marcação muito reduzida ao 10 dias de vida do animal. Em conjunção com este resultado, moléculas que aumentam a expressão do gene da IL-1 $\alpha$ , o EGF e o TGF- $\beta$ 1 também mostraram que amplificam a expressão do IL-1RI, mas a IL-1 $\alpha$  não aumenta a expressão de seu receptor. Após injeções do EGF, em diferentes tempos após o nascimento, observou-se um aumento do RNAm do receptor da IL-1 $\alpha$  se comparado com o controle. Entre o 2º e o 5º dia houve uma diminuição do RNAm do receptor da IL-1 $\alpha$  no folículo dental.

Segundo os autores, a combinação dos resultados, sugere que, como a expressão da IL-1 $\alpha$  é aumentada no retículo estrelado pelo EGF ou TGF- $\beta$ 1, estas duas moléculas também poderiam aumentar a expressão do receptor tipo I da IL-1 $\alpha$  no folículo dental, já que mais receptores estariam disponíveis para responder ao aumento da IL-1 $\alpha$  secretada. A presença máxima dos receptores (IL-1RI) no folículo dental logo após o nascimento, seguido de seu declínio, é paralelo ao aumento e queda do CSF-1 no folículo. Assim, a regulação do IL-1RI e do gene do IL-1RI, poderia ser o meio de regular as mudanças no folículo dental.

Wise (1998) estudou o efeito da IL- $\alpha$  sobre a expressão do gene do CSF-1 nas células do folículo dental de molares de ratos com diferentes idades (após o nascimento).

Os resultados demonstraram que injeções de IL-1 $\alpha$  aumentaram a expressão do gene do CSF-1 *in vivo* no folículo dental aos 3, 7 e 10 dias pós-nascimento, sugerindo, que a IL-1 $\alpha$  pode ter um papel na cascata de sinalização molecular que inicia a erupção, pelos seus efeitos sobre o gene do CSF-1.

## **2.6- FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIAS - CSF-1**

Fatores estimulantes de colônias (CSFs), são fatores de crescimento hematopoiéticos, que estimulam o crescimento e diferenciação de células de linhagens granulócitos e macrófagos. Há pelo menos 4 subclasses conhecidas, cada uma exibindo diferentes propriedades físicas (Stanley, 1979; Stanley, 1981).

Fator estimulante de colônias tipo 1 (CSF-1) é uma glicoproteína, que estimula especificamente a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células da linhagem mononuclear fagocítica (Das & Stanley, 1982; Heyworth *et al.*, 1990). Seus efeitos biológicos são mediados por receptores específicos de superfície celular, e ocorrem exclusivamente em células mononucleares fagocíticas. (Das & Stanley, 1982).

*O fator estimulante de colônias tipo 1 – CSF-1, tem sido amplamente estudado, pois, ao que parece também participa do processo de erupção dental, atraindo monócitos, que se transformarão em osteoclastos e que, por sua vez promoverão a reabsorção do osso alveolar, formando uma via eruptiva para que o dente chegue à cavidade bucal.*

Wise e Lin (1994), estudaram a regulação e imunolocalização do RNAm do CSF-1 em culturas de células do folículo dental (fibroblastos) do 1º e 2º molares de ratos, 6 e 7 dias pós-nascimento, tratados com IL-1 $\alpha$  e o próprio CSF-1.

Os resultados mostraram que as células do folículo dental expressam RNAm para o CSF-1 e células tratadas com o próprio CSF-1, resultaram no aumento do produto do PCR- CSF-1. A imunoperoxidase para a proteína do CSF-1 mostrou que o seu RNAm parece ter sido traduzido, isto porque o citoplasma destas células marcou para o CSF-1. Células tratadas com IL-1 $\alpha$  também mostraram amplificação na expressão do CSF-1.

Os resultados sugeriram, que a expressão do RNAm do CSF-1 na cultura de células do folículo dental e o aumento de sua transcrição pela IL-1 $\alpha$ , pode ser

fator causal na iniciação e ou regulação de alguns dos eventos celulares observados no folículo no tempo certo da erupção; também, que o próprio CSF-1 pode ser produzido *in vivo*, pelas células do folículo dental para recrutar os monócitos para a formação de osteoclastos, levando à formação de uma via eruptiva no osso alveolar.

Cielinski *et al.*, (1994), utilizando ratos normais e mutantes osteopetróticos, estudaram a ação do CSF-1 sobre a erupção dental do 1º molar. Parte dos animais foi tratada com injeções de CSF-1 a partir do nascimento até o 18º dia. Os resultados mostraram, que nos animais normais sem tratamento a erupção do 1º molar aconteceu entre o 17º e 18º dia; animais normais tratados com CSF-1 tiveram seus molares erupcionados entre o 13º e 14º dia; nos animais mutantes sem tratamento, os dentes não erupcionaram e nos animais mutantes tratados com CSF-1, os molares erupcionaram entre o 20º e 22º dia. Animais normais não tratados, apresentaram um pico de população de células mononucleares no folículo dental e de osteoclastos no osso alveolar no 3º dia após o nascimento, e o mesmo foi observado nos animais normais tratados, mas a quantidade destas células foi muito maior. Nos animais mutantes osteopetróticos tratados, observou-se um dramático influxo de células mononucleares no folículo dental, com um pico máximo no 7º dia; também o número de osteoclastos aumentou, alcançando o pico máximo no 5º dia; animais mutantes não tratados apresentaram poucas células mononucleares e osteoclastos; assim, o CSF-1 acelera a erupção, pelo aumento no número de osteoclastos e de seus precursores e promove a erupção, mesmo atrasada, em animais mutantes. Portanto, o CSF-1 parece ter um papel importante nos eventos reguladores da erupção dental, e a administração local do CSF-1, pode ser clinicamente útil no movimento e erupção dos dentes.

Wise *et al.*, (1995), examinaram a localização do CSF-1 e de seu RNAm, nos tecidos dentais de molares de ratos, num período cronológico de 0 a 10 dias pós-nascimento. Os resultados mostraram que o RNAm para o CSF-1 está

presente *in vivo* no folículo dental do 1º molar do rato; a expressão máxima do RNAm ocorreu no 3º dia. A imunomarcação revelou que o RNAm do CSF-1 é traduzido, mostrando forte marcação no folículo dental nos primeiros dias e estando ausente no 9º dia. Fraca marcação foi observada no osso alveolar, ameloblastos e porção apical dos odontoblastos. Pelas observações de que há um influxo de monócitos no folículo dental no 3º dia após o nascimento, influxo este, que aumenta o número de osteoclastos necessários para a erupção, os autores sugerem que a expressão máxima do RNAm do CSF-1 no 3º dia, contribui para este influxo de monócitos e estabelecem, que a relação entre a molécula CSF-1, os monócitos e o folículo dental, possam ter um papel principal na erupção dental.

Cielinsky *et al.*, (1995), sabendo que o EGF e o CSF-1 aceleram a erupção de dentes de roedores, examinaram e compararam os efeitos de injeções de CSF-1 e EGF, sozinhos ou em combinação, sobre os dentes: incisivo e 1º molar de ratos recém-nascidos.

Os resultados mostraram que o EGF acelerou a erupção dos incisivos, mas não teve efeito significativo sobre os 1º molares. CSF-1; ao contrário, acelerou a erupção mais do molar que do incisivo; CSF-1 também aumentou o número de células mononucleares (monócitos) no folículo dental e osteoclastos na superfície do osso alveolar adjacente ao redor do 1º molar, que levou a um aumento da reabsorção do osso alveolar. Os resultados demonstraram efeitos potentes do CSF-1 exógeno sobre o recrutamento e função dos osteoclastos e apóiam o conceito de que, a reabsorção óssea é o principal componente do processo eruptivo. As observações de que o EGF acelerou a erupção dos incisivos, mas não dos molares, enquanto que o CSF-1 teve efeito oposto, sugere que a erupção de incisivos e molares em roedores pode preferencialmente responder a reguladores moleculares diferentes.

Wise *et al.*, (1997), estudaram a imunolocalização e expressão do CSF-1 receptor, nas células do folículo dental dos 1º e 2º molares de ratos, logo após o

nascimento. Intensa marcação para o CSF-1 receptor foi observada no folículo dental do 1º molar até o 5º dia, diminuindo drasticamente do 6º ao 10º dia. O osso alveolar mostrou variável marcação neste período; já os ameloblastos e odontoblastos marcaram suavemente. A análise para se determinar se o efeito autócrino do CSF-1, inibido pelo CSF-1 receptor, revelou que altas concentrações desta citocina reduziram a expressão do seu receptor. A molécula que amplifica a expressão do gene para CSF-1 (IL-1 $\alpha$ ), não teve efeito sobre os níveis do RNAm do CSF-1 receptor. Os resultados sugerem que a inibição do feedback, do efeito autócrino do CSF-1 sobre sua própria expressão, é devido ao efeito do CSF-1 que inibe a tradução e transcrição do seu receptor. Em troca, estas interações moleculares, possivelmente regulam os eventos celulares que ocorrem no folículo dental, antes e durante a erupção dental.

Ainda em 1997, Que & Wise, utilizando células do folículo dental de molares de ratos recém-nascidos, determinaram que a MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos tipo 1) e o CSF-1 sozinhos ou em meio condicionado, são quimiotáticos para monócitos, demonstrando, que tanto o CSF-1 quanto a MCP-1, produzidos pelo folículo dental, podem ser os responsáveis pelo influxo de monócitos no folículo dental, necessários para iniciar a erupção.

Wise *et al.*, (1999), estudaram a expressão do RNAm do CSF-1 no folículo dental do 1º molar de camundongos, com 1 a 12 dias pós-nascimento, mostrando que o CSF-1 (quimiotático para células mononucleares), foi expresso em todas as idades, mas que o pico máximo de expressão ocorreu no 5º dia, concluindo, que o resultado obtido corrobora com outras pesquisas, mostrando que neste mesmo tempo há um influxo de células mononucleares também no folículo dental (Rolins *et al.*, 1988), células estas importantes para a formação de osteoclastos, necessários à formação de um caminho eruptivo (Grier & Wise, 1998).

# 3 Proposição

Este estudo teve como objetivo, analisar a distribuição do EGF, EGFr, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$  e CSF-1 no periodonto de incisivos inferiores de ratos (dentes modelo de crescimento e erupção contínuos), em condições funcionais normal e alterada, empregando a técnica de imunohistoquímica.

# 4 Materiais e Métodos

## 4.1 Animais:

Para o desenvolvimento deste trabalho, o projeto de pesquisa foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas. Para o estudo foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar) machos, com peso médio de 250 gramas, sendo os mesmos procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Todos os animais foram mantidos, desde as fases de pré-tratamento até o sacrifício, em gaiolas de policarbonato, em local com temperatura e umidade controladas, com um ciclo alternado de 12 horas claro-escuro. A alimentação dos animais constou de ração balanceada padrão e água “*ad libitum*”, diariamente.

## 4.2 Grupos experimentais:

A amostra foi dividida, de forma aleatória, em três grupos experimentais: grupo controle, grupo de 8 horas de desimpedimento e grupo de 8 dias de desimpedimento. O grupo controle foi composto por 10 animais enquanto os demais grupos foram compostos por 25.

#### **4.3 Grupo tratado ( 8 horas e 8 dias) e grupo controle:**

Cinquenta animais, pertencentes ao grupo tratado, tiveram, sob anestesia, seus incisivos inferiores esquerdos seccionados na altura da papila interdental, com uma broca diamantada montada em alta rotação. Estes dentes permaneceram fora de oclusão, sendo considerados em condições hipofuncionais, enquanto os incisivos direitos (contralaterais) permaneceram em oclusão, e estando em sobrecarga, foram considerados em condições hiperfuncionais. Vinte e cinco destes animais sofreram esta intervenção apenas uma única vez, sendo sacrificadas oito horas após, enquanto os outros vinte e cinco animais tiveram seus dentes seccionados a cada dois dias e permaneceram fora de oclusão por oito dias. Dez animais, pertencentes ao grupo controle, tiveram seus incisivos mantidos em condições normais de erupção (Fig. 1 e 2)

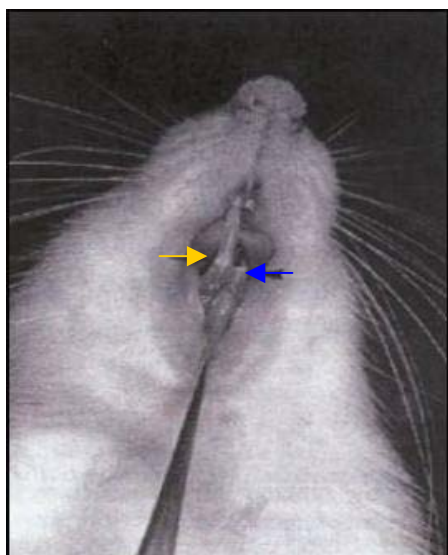


Fig. 1: grupo tratado (8 dias e 8 horas)  
Dente hipofuncional (Ho) – seta azul  
Dente hiperfuncional (Hr) – seta amarela

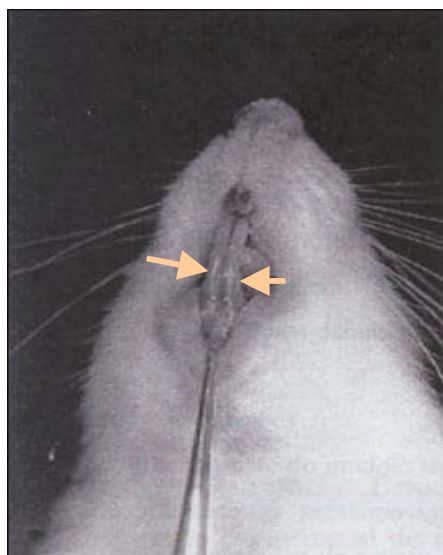
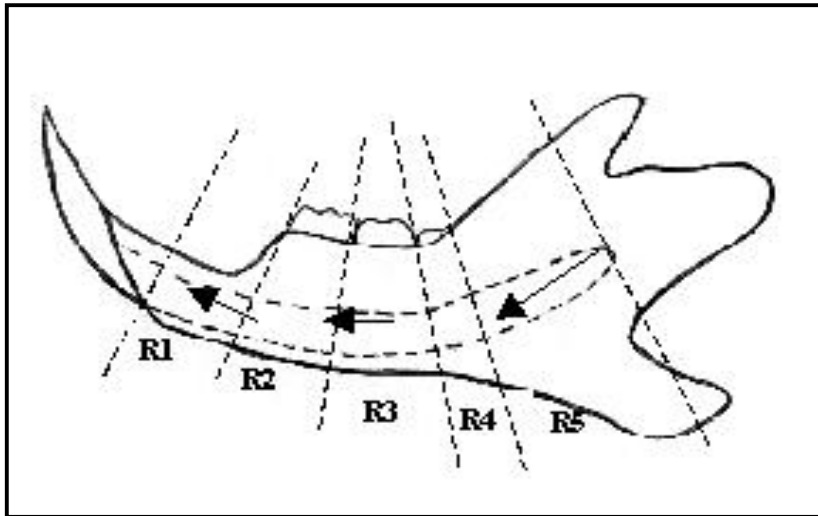


Fig. 2: grupo controle  
dentes normofuncionais (C) -  
setas laranja



#### **4.4 Coleta do Material:**

Para a retirada dos incisivos, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular contendo Ketamina (Francotar) 1 ml/kg de peso do animal, associado ao relaxante muscular Cloridrato de Xylazina (Virbraxyl), 0,1 ml/kg de peso corporal do animal e sacrificados por perfusão intracárdica com uma solução fixadora segundo KARNOVSKY (1965) contendo 0,1% de glutaraldeído. O tempo de perfusão para cada animal foi de 10 min. As mandíbulas foram dissecadas, separadas em hemimandíbulas e após a remoção de todo o tecido mole externo, foram imersas durante 6 horas na mesma solução fixadora, em seguida lavadas em tampão PBS (3x por 10 min), e descalcificadas com EDTA a 4,13 %, à temperatura ambiente por cerca de 40 dias, com trocas diárias do descalcificador. Após a descalcificação, as hemimandíbulas foram divididas em 5 regiões no sentido transversal ao corpo da mandíbula, correspondendo respectivamente: R1 da crista alveolar à face mesial do 1º molar, R2 região do 1º molar, R3 região do 2º molar, R4 região do 3º molar e R5 região odontogênica (Esq. 1). Para este estudo foi estipulada a utilização das regiões R1, R3 e R5. Em cada região da hemimandíbula fez-se uma referência para que as peças fossem incluídas de modo que os cortes fossem sempre obtidos no sentido ápico-incisal do incisivo. As peças foram então lavadas em tampão PBS (3x por 10 min), desidratadas em uma série crescente de álcool (50%, 70%, 90% e absoluto), diafanizadas com xilol, infiltradas com paraplast a 59 °C e incluídas no mesmo material.



Esq. 1. Representação das 5 regiões do incisivo

#### **4.5 Preparo das Lâminas para Imunohistoquímica**

- 1- As lâminas (Knitel Glasser, fosca) foram mergulhadas em uma solução de HCl (Merck) 1N durante 20 minutos,
- 2- Enxaguadas em água destilada e secas na estufa a 60 °C.
- 3- imersas em uma solução 3:1 de etanol absoluto (Merck) e ácido acético (Merck) por 20 minutos, sem enxágüe as lâminas foram secas na estufa à 60 °C.

Após este pré-tratamento, as lâminas foram silanizadas seguindo o protocolo:

- 1- 04 banhos rápidos em uma solução de 3 Aminopropyltriethoxy-silano a 6% - organosilano (Sigma Chemical Co St. Louis, USA);

- 2- 04 banhos rápidos em acetona pura (Merck) e 2 banhos rápidos em água destilada e em seguida foram secas na estufa a 60 °C.

#### **4.6 Microtomia:**

Cortes com 4  $\mu$ m de espessura obtidos em um micrótomo automático (RM 2155 Leica) foram coletados em lâminas silanizadas (02 cortes por lâmina) e levados à estufa por 48 horas, para perfeita adesão dos mesmos.

#### **4.7 Reação Imunohistoquímica:**

Para a imunohistoquímica, utilizamos o método indireto com sistema de amplificação (peroxidase, streptavidina e biotina), que é extremamente sensível, podendo ser utilizadas concentrações mais baixas do anticorpo primário.

Em uma cubeta de vidro com capacidade para 8 lâminas, os cortes foram desparafinizados com xilol 2x por 5 minutos à temperatura ambiente, hidratados com uma série decrescente de álcool (absoluto, 80 %, 70%, 50 %) e água por 2 min cada. Em seguida mergulhados em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20V (2x por 5 min) para inativar a atividade de peroxidase endógena existente no tecido. Após enxágüe com água destilada por 2 minutos, todos os cortes foram tratados com uma solução de tampão PBS contendo leite Mólico (Nestlé) a 10% e BSA 2% (Sigma Chemical Co St. Louis, USA) para o bloqueio de outras proteínas presentes no tecido,, diminuindo a reação de fundo (marcação inespecífica) durante as reações de imunohistoquímica.

Para a IL-1 $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1, antes do bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram submetidos à digestão enzimática com pepsina 0,4% em solução de glicina num pH 2,2 por 10 e 15 minutos a 37 °C, para a melhor exposição dos sítios antigênicos do tecido.

Para a imunolocalização, os anticorpos primários utilizados, todos policlonais produzidos em coelho foram os seguintes:

Anti-EGF (Sigma) na diluição 1:250  $\mu$ L em PBS/BSA a 1%

Anti-EGFr (DAKO) na diluição 1:280  $\mu$ l em PBS/BSA a 1%

Anti-TGF- $\beta$ 1 (DAKO) na diluição 1:2800  $\mu$ l em PBS/BSA a 1%

Anti-CSF-1 (Sigma) na diluição 1:150  $\mu$ l em PBS/BSA a 1%

Anti-IL-1 $\alpha$  (Sigma) na diluição 1:160  $\mu$ l em PBS/BSA a 1%

Os cortes foram incubados com os anticorpos primários por 16 horas à 4 °C; em seguida lavados em PBS (3x por 5 min) e submetidos ao “Kit” LSAB - HRP (DAKO system) de amplificação, composto pelo anticorpo secundário biotilado (reagente amarelo) por 30 minutos à temperatura ambiente e streptavidina e antiglobulina de coelho ligada à peroxidase (reagente vermelho) também por 30 minutos a temperatura ambiente. Após cada reagente os cortes foram lavados em PBS 3x por 5 minutos. As reações foram reveladas durante 5 min. a 37 °C com DAB (3,3 diaminobenzidina – Sigma Chemical) 60 mg/80mL de PBS adicionado de 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% e 1 mL de DMSO (dimetilsulfoxide), (a revelação se dá pela reação química entre o DAB, a peroxidase do anticorpo secundário e o peróxido de Hidrogênio adicionado na solução de revelação, formando um precipitado marrom, insolúvel e permanente), seguido de exaustiva lavagem em água destilada e contra-coloração com Hematoxilina de Meyer por 30 seg. Após desidratação, as lâminas foram montadas com permount.

Para confirmação dos resultados, alguns cortes foram submetidos ao mesmo tratamento omitindo-se somente os anticorpos primários: estes cortes serviram como controle negativo das reações.

#### **4.8 Análise dos resultados:**

Foram analisadas as seguintes estruturas:

Periodonto: **ligamento periodontal e folículo dental.**

Dois observadores examinaram separadamente as lâminas (com identificação disfarçada), avaliando a intensidade de marcação (precipitado marrom) de cada reação, adotando o mesmo critério utilizado por WISE *et al.*, (1992):

- \* Ausência de marcação ( - )
- \* Fraca intensidade de marcação ( + )
- \* Moderada intensidade de marcação ( ++ )
- \* Forte intensidade de marcação ( +++ )

# 5 Resultados

A localização dos marcadores foi evidenciada pela coloração marrom, resultado da reação química entre a peroxidase conjugada ao anticorpo, o peróxido de hidrogênio e o DAB (diaminobenzidina).

Nos tecidos analisados, entre estruturas, regiões e grupos, houve variação não uniforme na intensidade de marcação com os vários anticorpos, o que dificultou uma análise quantitativa mesmo subjetiva. Exemplos de variação: folículo dental (FD) na região R3 (Fig. 1 – g, i, j); ameloblastos (A) das regiões R3, R5 (Fig 3 – g e h; k e o).

A descrição que segue focalizou os aspectos mais nítidos, demonstrada nas Figs. de 1 a 10.

## ***5.1 Imunolocalização do EGF- Fator de Crescimento Epidermal***

### **Folículo Dental:**

Forte intensidade de marcação foi observada nos grupos: C – nas regiões R1, R3, R5 (Fig 1- a, f, h); Ho 8h – nas regiões R1, R3 (Fig 1- b, g) e Ho 8d – nas regiões R1, R3 (Fig 1- c, h).

Ainda no folículo dental, moderada imunoreatividade foi observada nos grupos Ho 8h e 8d – na região R5 (Fig 1- l, m); Hr 8h – nas regiões R1, R3, R5 (Fig 1-d, i, n), Hr 8d – nas regiões R1, R3, R5 (Fig 1- e, j, o).

Forte intensidade na marcação também foi encontrada no folículo dental da região do forame apical – região R5 do grupo: C (Fig 2- k) e moderada nos grupos: Ho 8h e 8d e Hr 8h e 8d (Fig 2- l, m, n, o), sendo que ao redor dos vasos sanguíneos a intensidade sempre se mostrou mais forte.

## **Ligamento Periodontal**

De modo geral todos os grupos apresentaram imunoreatividade moderada, porém, ao redor dos vasos sanguíneos a marcação se mostrou mais intensa (forte): C – nas regiões R1, R3 (Fig 2- a, f), Ho 8h e 8d – nas regiões R1, R3 (Fig 2- b, c, g, h) e Hr 8h e 8d – nas regiões R1, R3 (Fig 2- d, e, i, j).

## **5.2 Imunolocalização do EGFr – Receptor do Fator de Crescimento Epidermal**

### **Folículo Dental**

Forte marcação foi observada nos grupos: C – nas regiões R1, R5 (Fig 3- a, k), Ho 8h – na região R5 (Fig 3- l), Ho 8d – nas regiões R1, R3, R5 (Fig 2- c, h, m) e Hr 8d – nas regiões R1, R3, R5 (Fig 3- e, j, o). Ainda analisando o folículo dental a marcação diminuiu para moderada nos grupos: C – na região R3 (Fig 3- f), Ho 8h – na região R1 (Fig 3- b), Hr 8h – na região R3 (i), e para fraca intensidade nos grupos: Ho 8h – R3 (Fig 3- g) e Hr 8h – R1 (Fig 3- d).

No folículo dental da região de forame apical (região R5), forte intensidade também foi observada nos grupos: C – (Fig 4- k), Ho 8h – (Fig 4- l), Ho 8d (fig 4- m), Hr 8h (Fig 4- n) e Hr 8d (Fig 4- o).

## **Ligamento Periodontal**

Variações de intensidade entre fraca e moderada foram observadas nos grupos controle (C) e tratados (Ho e Hr – 8h e 8d).

Moderada intensidade de marcação foi encontrada nos grupos: Ho 8d – nas regiões R1, R3 (Fig 4- c, h), Hr – nas regiões R3 8h e 8d (Fig 4- i, j) enquanto que nos grupos: C – nas regiões R1, R3 (Fig 4- a, f), Ho 8h – nas regiões R1, R3 (Fig 4- b, g), Hr 8h – na região R1 (Fig 4- d) e Hr 8d – na região R1 (Fig 4- e) foi observada fraca intensidade.

## **5.3 Imunolocalização do TGF- $\beta$ 1 – Fator Transformador do Crescimento $\beta$ 1**

### **Folículo dental**

Forte marcação foi observada nos grupos: C – na região R3 (Fig 5- f), Ho e Hr 8d – na região R1 (Fig 5 – h, j), Ho 8h – na região R5 (Fig 5 – l) e Ho 8d – na região R5 (Fig 5 – m). A imunoreatividade diminuiu para moderada na região R1, nos grupos: C (Fig 5 – a), Ho e Hr 8h (Fig 5 – b, d), Ho e Hr 8d (Fig 5 – c, e), também na região R3, nos grupos: Ho e Hr 8h (Fig 5 - g, i) e região R5, nos grupos: C (Fig 5 – k), Hr 8h (Fig 5 – n), Hr 8d (Fig 6 – o).

O folículo dental na região do forame apical – R5 apresentou forte imunoreatividade nos grupos: C (Fig 6 – k), ho 8d (Fig 6 – m), moderada nos grupos: Ho 8h e 8d (Fig 6 – l, o) e Hr 8d (Fig 6 – n).



## **Ligamento periodontal**

Forte intensidade foi observada no grupo Ho 8d – na região R3 (Fig 8- h), moderada intensidade nos grupos: C, na região R1 e R3 (Fig 8 – a, f) Ho e Hr 8h na região R1 (Fig 8 - b, d), Hr 8h e 8d na região R1 (Fig 8 - c, e) e na região R3, nos grupos: Ho e Hr 8h (Fig 8 – g, i), Hr 8d (Fig 8 -j)..

### **5.4 Imunolocalização da IL-1 $\alpha$ - Interleucina 1 $\alpha$**

#### **Folículo dental**

Marcação forte foi observada na região R3, nos grupos: C – R3 (Fig 7 – f), Ho e Hr 8d (Fig. 7 – h, j).

Moderada intensidade foi observada nos grupos: Ho 8h e Hr 8h – nas regiões R1, R3, R5 (Fig 7 - b, g, l, d, i, n), Hr 8d – na região R1 (Fig 7 – e) e na região de forame apical do grupo Ho 8h (Fig 8 – l). Nos grupos: C – na região R5 (Fig 7 – k) e Hr 8d na região R1 (Fig 7 – e) a marcação diminuiu para fraca intensidade.

No folículo dental da região de forame apical (região R5), forte intensidade também foi observada nos grupos: C – (Fig 8 – k) e Ho 8d (Fig 8 – m); moderada intensidade nos grupos: Ho e Hr 8h (Fig 8 – l, n) e Hr 8d (Fig 8 – o).

#### **Ligamento Periodontal**

Todos os grupos controle e tratados apresentaram moderada intensidade de marcação.

Grupos: C – regiões R1, R3, R5 (Fig 8 – a, f, k), Ho 8h e Hr 8h – nas regiões R1, R3, R5 (Fig 8 b, g, l, d, i, n), Ho 8d e Hr 8d (Fig. 8 – c, h, m, e, j, o).

## **5.5 Imunolocalização do CSF-1 – Fator Estimulante de colônias**

### **Folículo Dental**

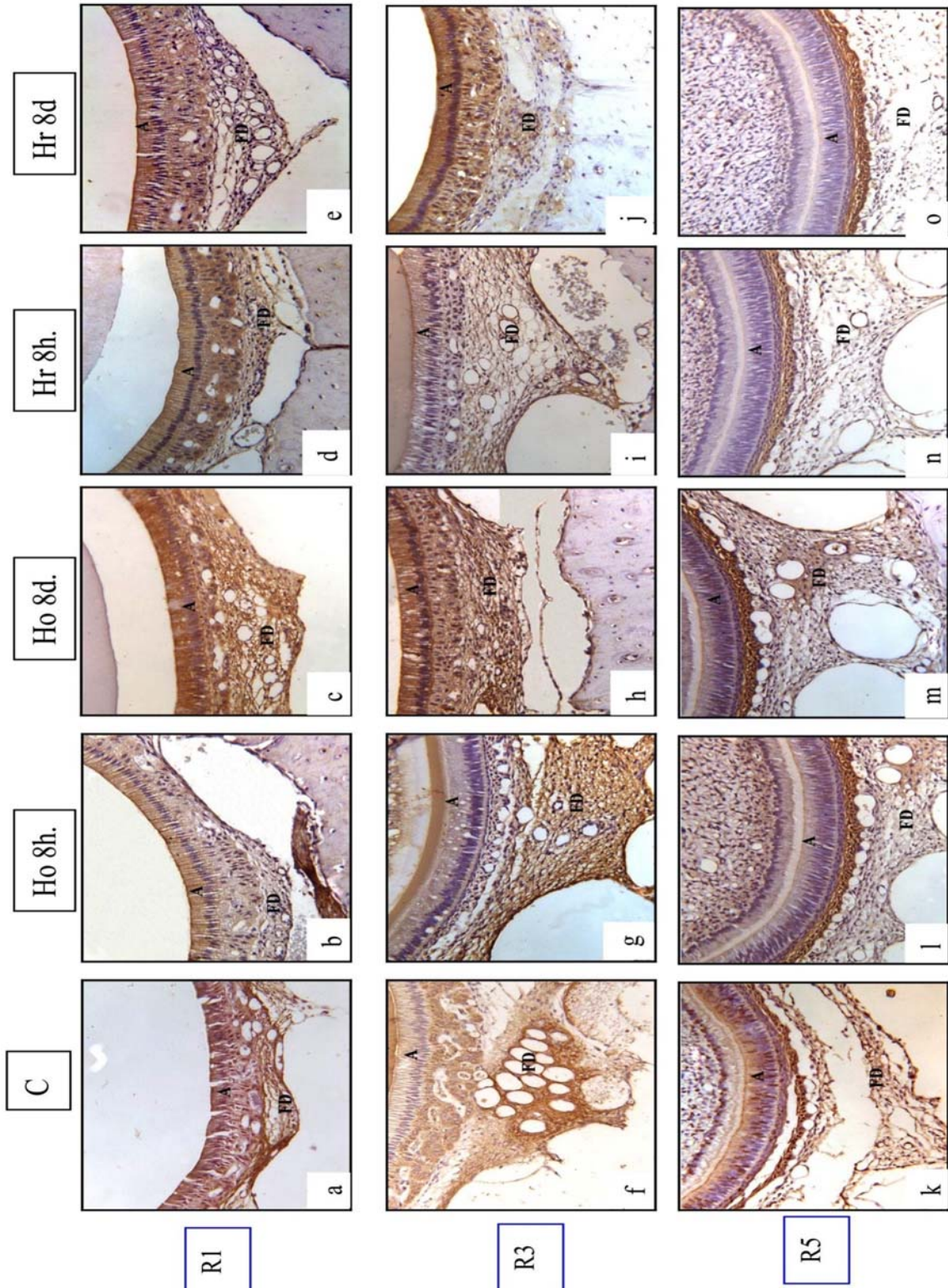
Forte imunoreatividade foi observada nos grupos: C nas regiões R1, R3 (Fig 9 – a, f), Ho 8d – nas regiões R1, R3, R5 (Fig 9 – c, h, m), Hr 8d na região R5 (Fig 9 - o), a mesma intensidade foi encontrada na região de forame apical R5 nos grupos: Ho 8d e Hr 8d (Fig 10 – n, o), já os grupos: C – na região R5 (Fig. 9 e 10 – k), Ho 8h – na região R5 (Fig 10 – l) e Hr 8d – nas regiões R1, R3 (Fig 9 – e, j) apresentaram moderada intensidade na marcação.

### **Ligamento Periodontal**

Tanto o grupo controle quanto os tratados 8h e 8d, apresentaram moderada intensidade de marcação.

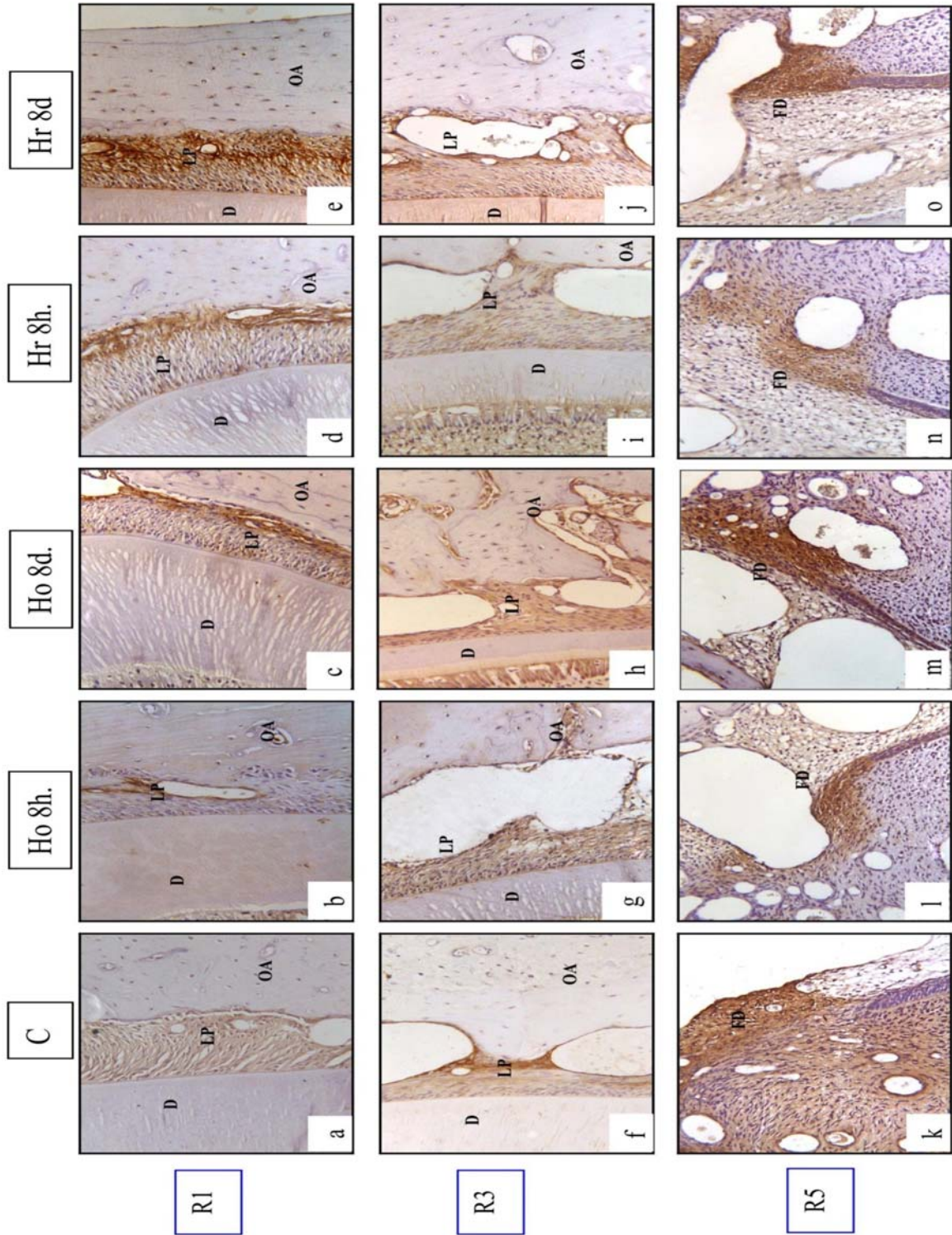
Grupos: C – regiões R1, R3, R5 (Fig 8 – a, f, k), Ho 8h e Hr 8h – nas regiões R1, R3, R5 (Fig 8 b, g, l, d, i, n), Ho 8d e Hr 8d (Fig. 8 – c, h, m e e, j, o).

Embora não tenham sido o foco deste estudo, as mesmas variações de intensidade das imunomarcações, entre regiões e grupos, foram observadas e documentadas em várias imagens das Figs. 1 a 10, em relação às estruturas do órgão do esmalte: ameloblastos, estrato intermédio, retículo estrelado e camada papilar. Um poucas imagens retratam odontoblastos e polpa, e igualmente o exame das lâminas mostrou variações semelhantes. Como os dados da literatura, em relação à detecção imunohistoquímica dos fatores de crescimento e citocinas aqui analisados são abundantes, eles servirão para eventuais comparações com os resultados aqui descritos.



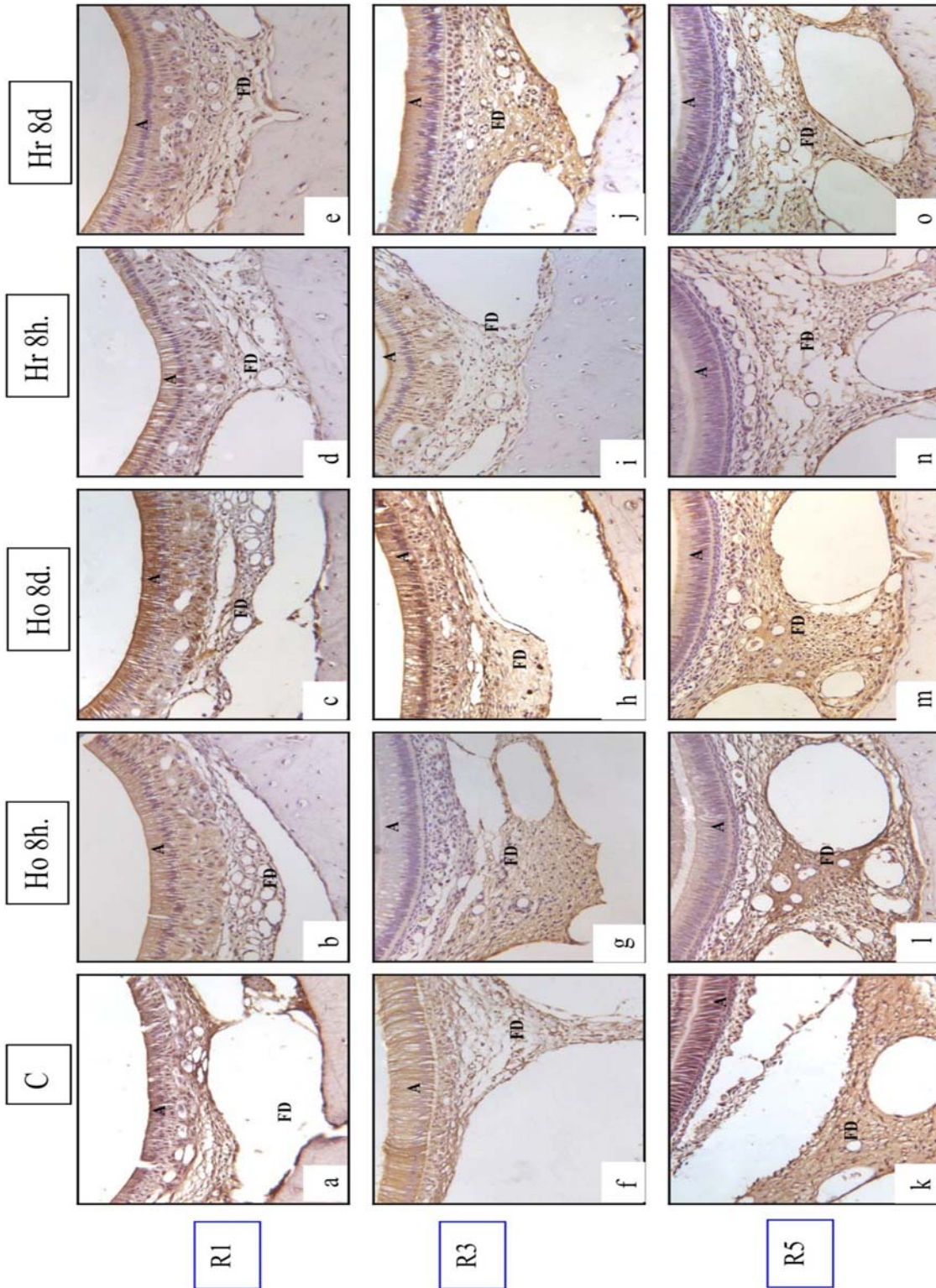
**Fig. 1:** Imunolocalização do EGF no folículo dental e órgão do esmalte de incisivos de ratos controle (C), hipofuncionais de 8 horas (Ho 8h) e de 8 dias (Ho 8d) e hiperfuncionais de 8 horas (Hr 8h) e 8 dias (Hr 8d) nas regiões – R1, R3 e R5. FD- folículo dental, A- ameloblastos. Aumento original 250x.





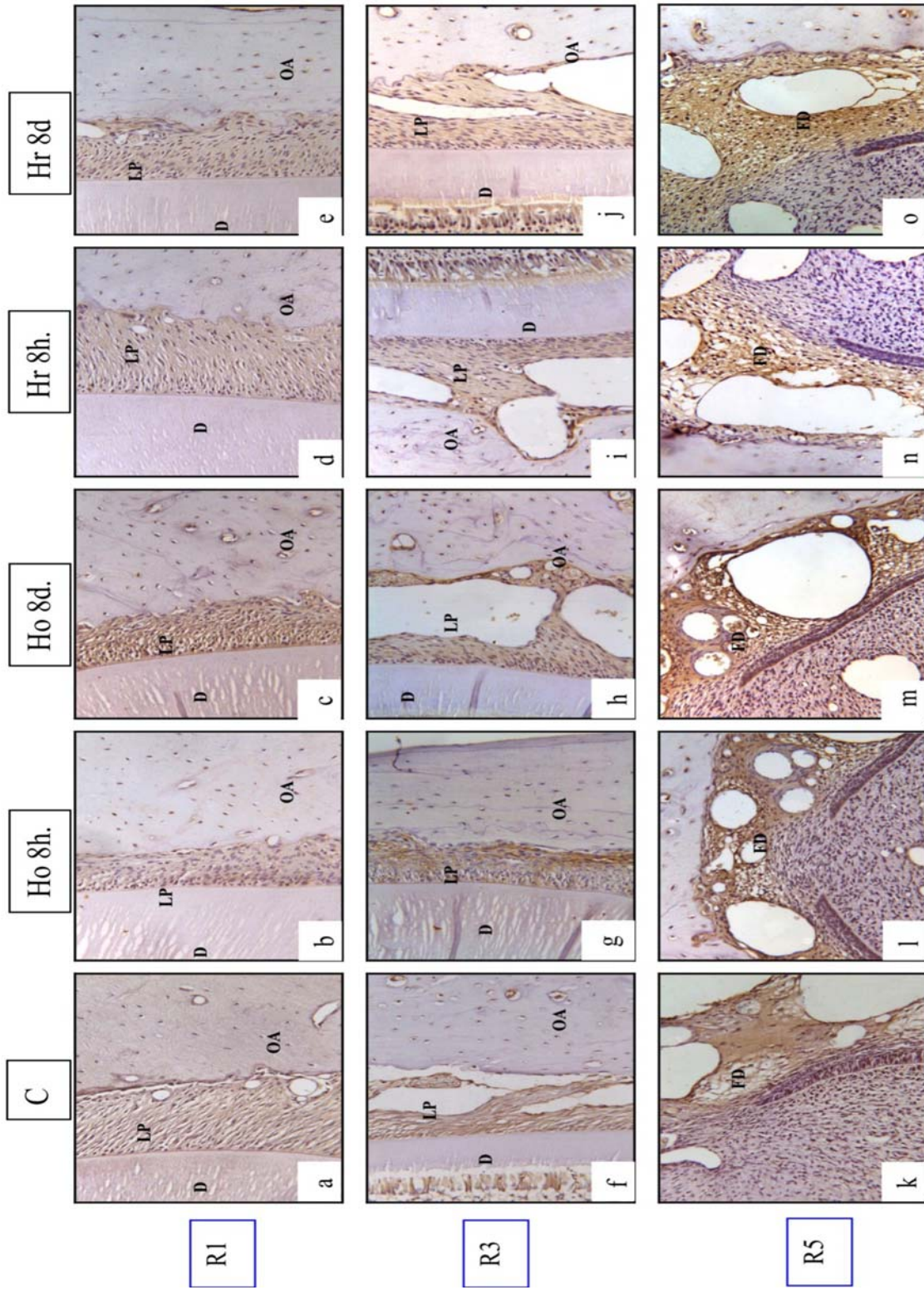
**Fig. 2:** Imunolocalização do EGF no ligamento periodontal (R1 e R3) e folículo dental da região de forame apical (R5) de incisivos de ratos controle (c), hipofuncionais de 8 horas (Ho 8h) e de 8 dias (Ho 8d) e hiperfuncionais de 8 horas (Hr 8h) e 8 dias (Hr 8d) nas regiões – R1, R3 e R5. LP- ligamento periodontal, FD- folículo dental, D- dentina, AO- osso alveolar. Aumento original – 250x





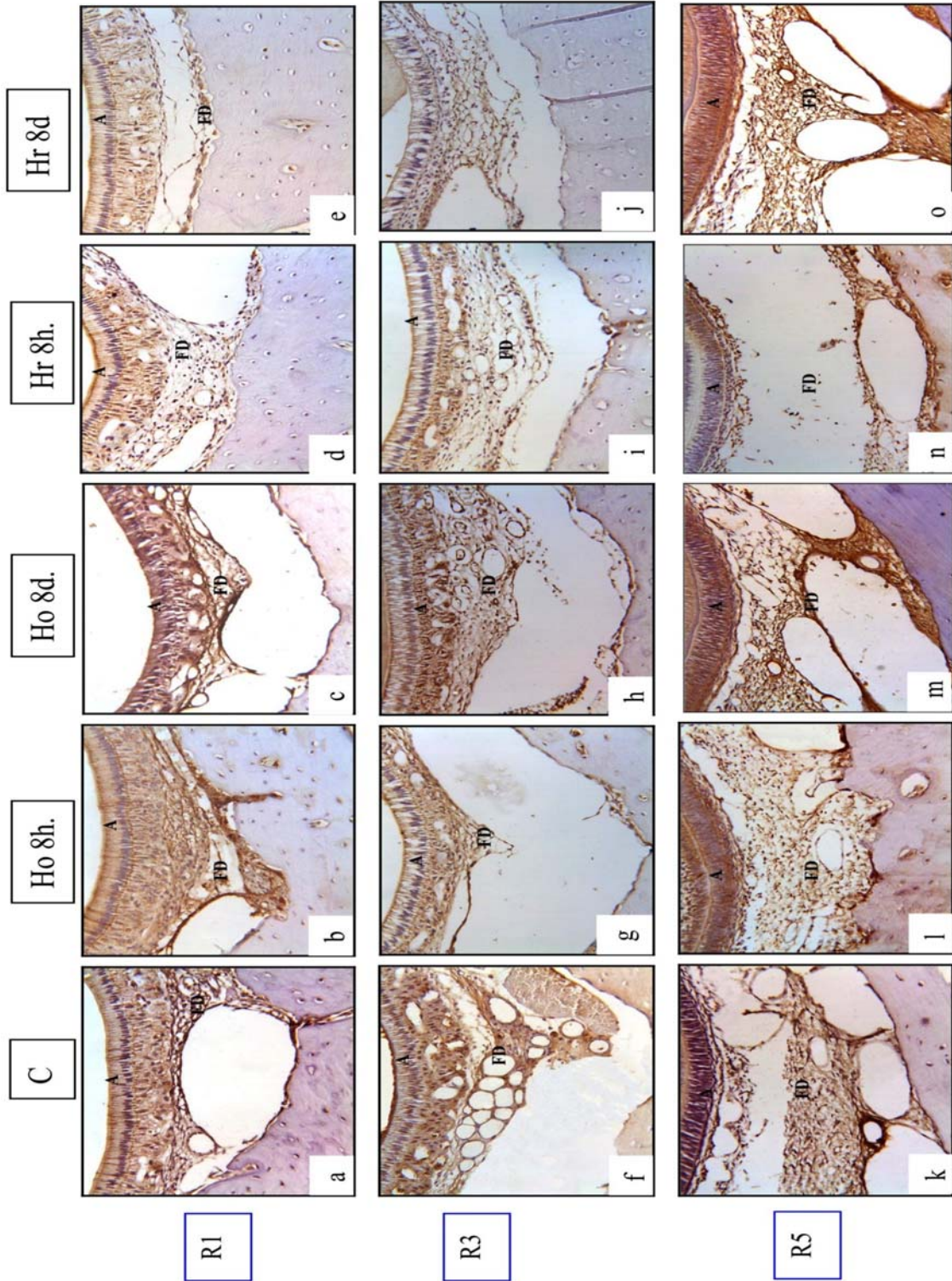
**Fig. 3:** Imunolocalização do **EGFr** no folículo dental e órgão do esmalte de incisivos de ratos controle (c), hipofuncionais de 8 horas (Ho 8h) e de 8 dias (Ho 8d) e hiperfuncionais de 8 horas (Hr 8h) e 8 dias (Hr 8d) nas regiões – R1, R3 e R5.  
FD- folículo dental, A- ameloblastos. Aumento original 250x.





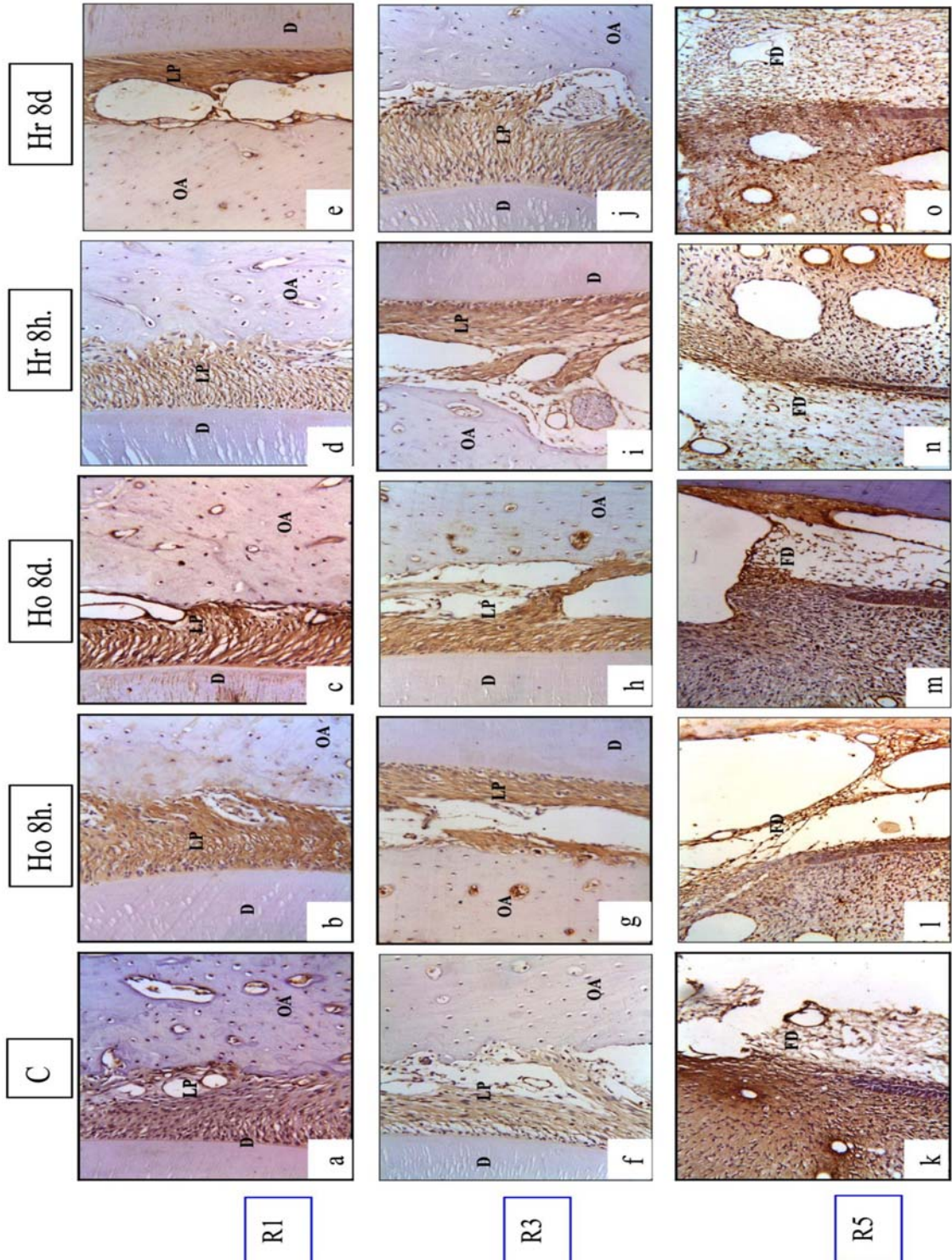
**Fig.4:** Imunolocalização do **EGFr** no ligamento priodontal (R1 e R3) e folículo dental da região de forame apical (R5) de incisivos de atos controle (c), hipofuncionais de 8 horas (ho 8h) e de 8 dias (ho 8d) e hiperfuncionais de 8 horas (Hr 8h) e 8 dias (Hr 8d) nas regiões R1, R3 e R5. LP- ligamento periodontal, FD - folículo dental, D- dentina, OA - osso alveolar. Aumento original - 250X





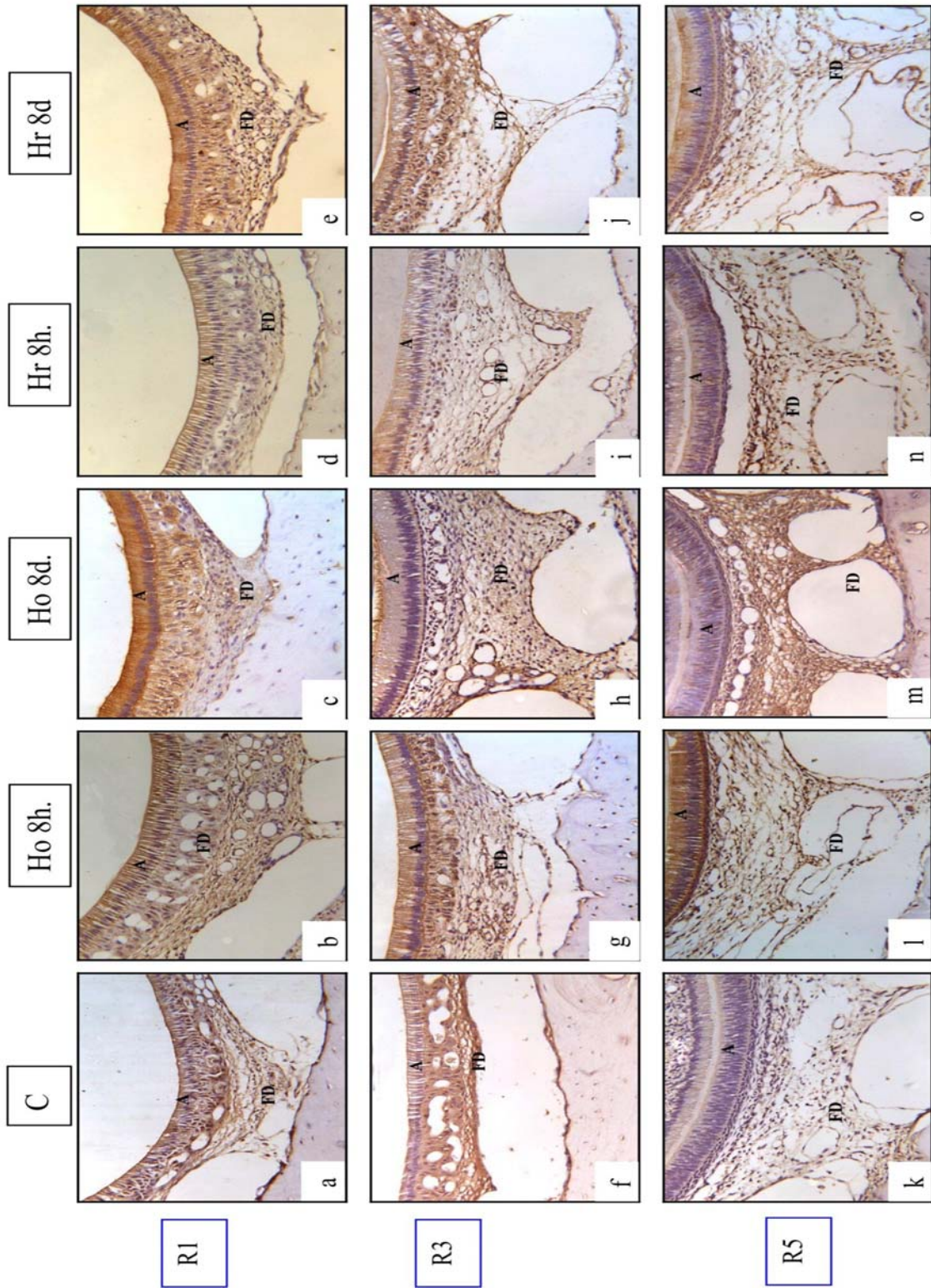
**Fig. 5:** Imunolocalização do **TGF- $\beta$ 1** no folículo dental e órgão do esmalte de incisivos de ratos controle (c), hipofuncionais de 8 horas (Ho 8h) e de 8 dias (Ho 8d) e hiperfuncionais de 8 horas (Hr 8h) e 8 dias (Hr 8d) nas regiões – R1, R3 e R5. FD- folículo dental, A- ameloblastos. Aumento original 250x.





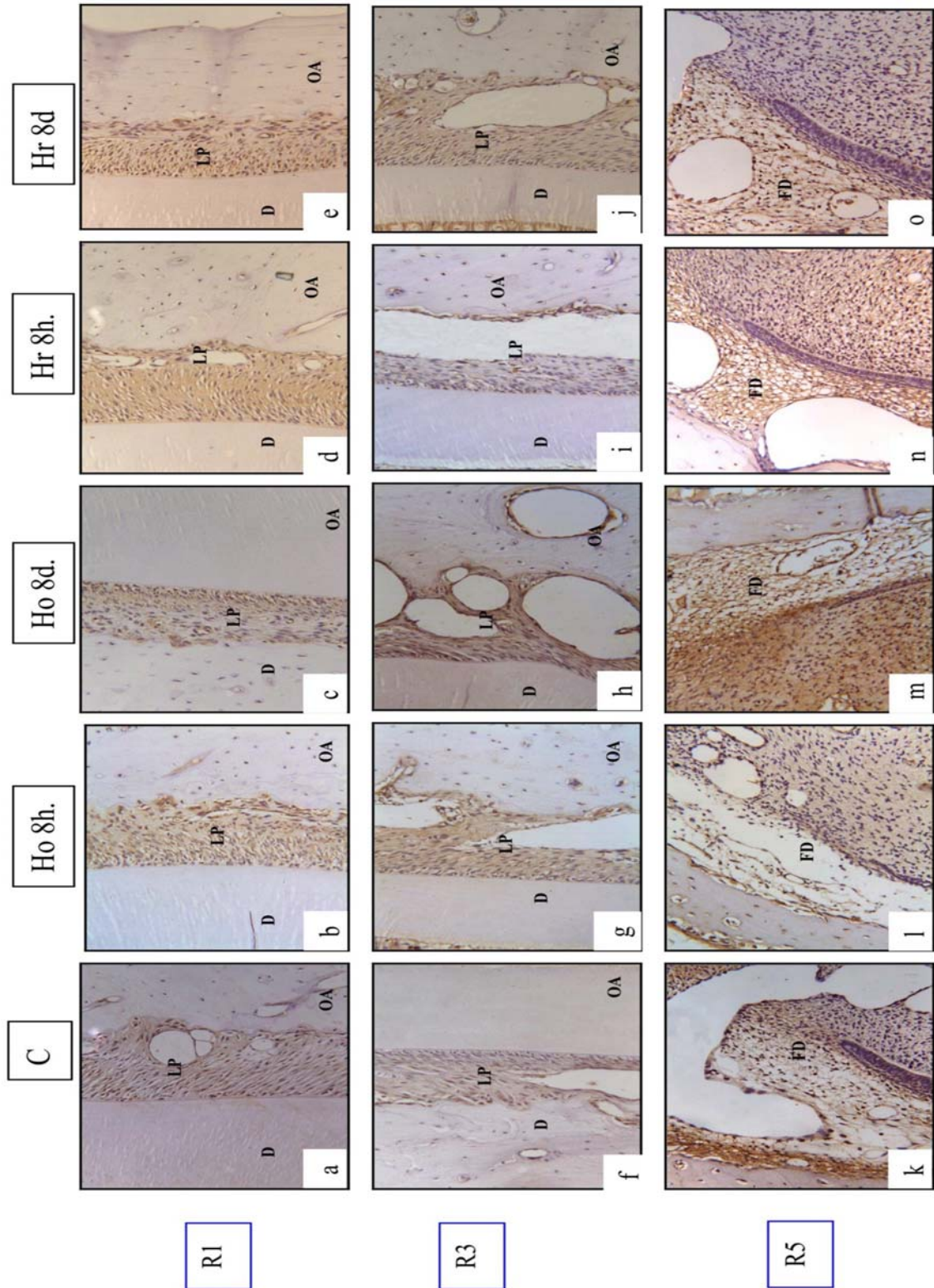
**Fig. 6:** Imunolocalização do TGF- $\beta$ 1 no ligamento periodontal (R1 e R3) e folículo dental da região de forame apical (R5) de incisivos de ratos controle (c), hipofuncionais de 8 horas (Ho 8h) e de 8 dias (Ho 8d) e hiperfuncionais de 8 horas (Hr 8h) e 8 dias (Hr 8d) nas regiões - R1, R3 e R5. LP- ligamento periodontal, FD- folículo dental, D- dentina, OA- osso alveolar. Aumento original - 250x





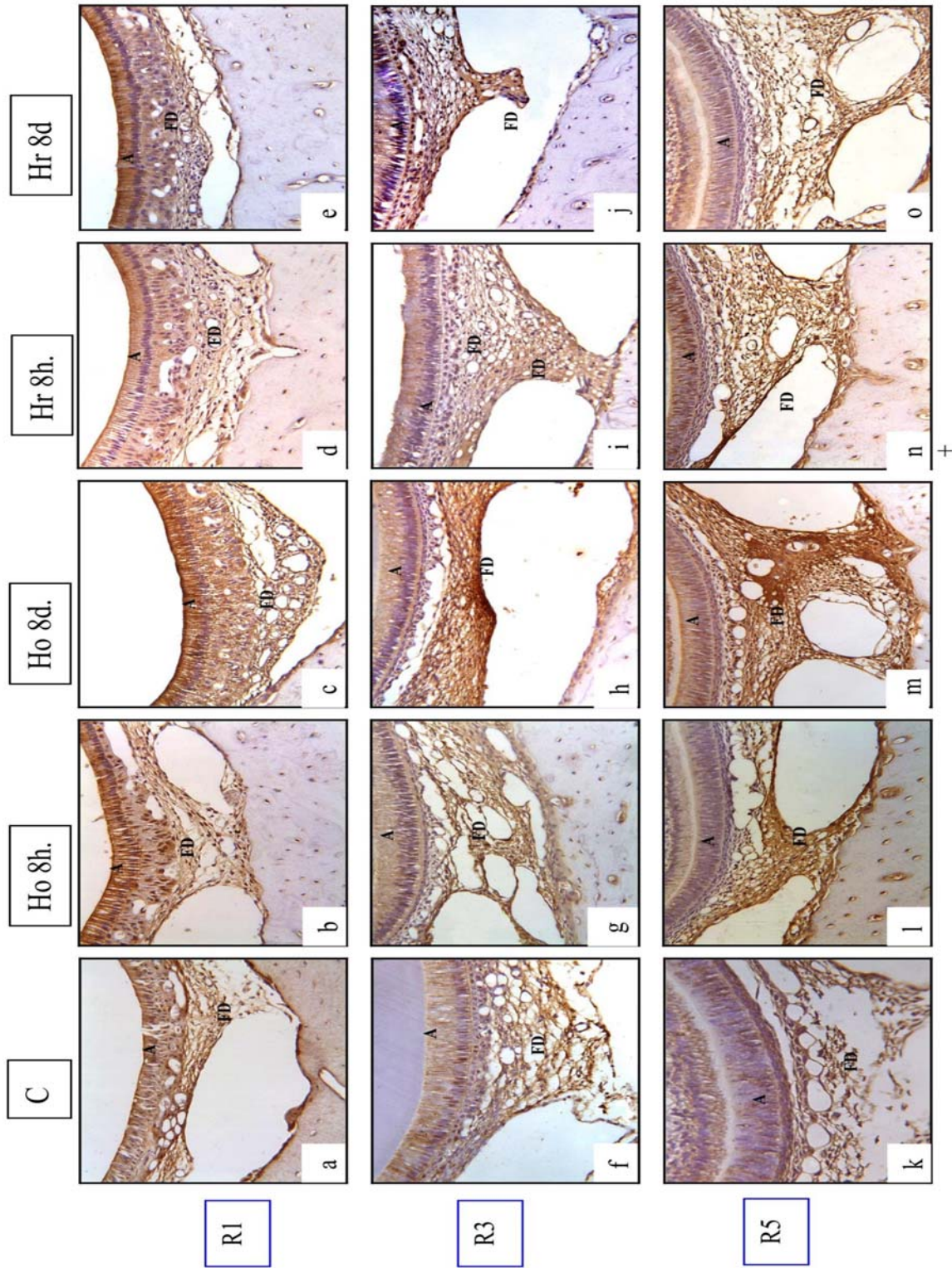
**Fig. 7:** Imunolocalização da **IL-1 $\alpha$**  no folículo dental e órgão do esmalte de incisivos de ratos controle (c), hipofuncionais de 8 horas (Ho 8h) e de 8 dias (Ho 8d) e hiperfuncionais de 8 horas (Hr 8h) e 8 dias (Hr 8d) nas regiões – R.1, R.3 e R.5. FD- folículo dental, A- ameloblastos. Aumento original 250x.





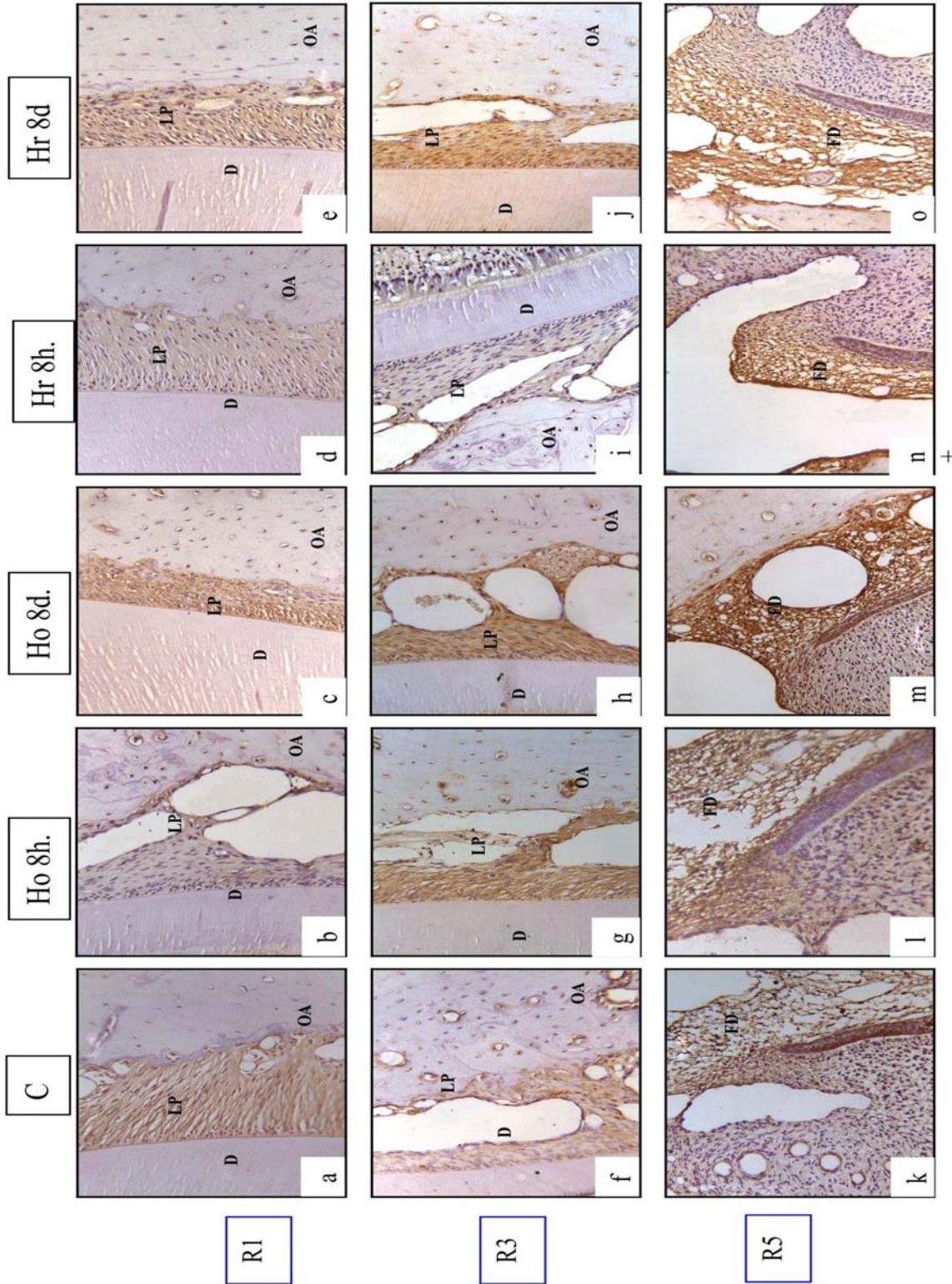
**Fig. 8:** Imunolocalização da IL-1 $\alpha$  no ligamento periodontal (R1 e R3) e folículo dental da região de forame apical (R5) de incisivos de ratos controle (c), hipofuncionais de 8 horas (Ho 8h) e de 8 dias (Hr 8d) e hiperfuncionais de 8 horas (Hr 8h) e 8 dias (Hr 8d) nas regiões – R1, R3 e R5. LP- ligamento periodontal, FD- folículo dental, D- dentina, OA- osso alveolar. Aumento original – 250x





**Fig. 9:** Imunolocalização do **CSF-1** no folículo dental e órgão do esmalte de incisivos de ratos controle (c), hipofuncionais de 8 horas (Ho 8h) e de 8 dias (Hr 8d) e hiperfuncionais de 8 horas (Hr 8h) e hiperfuncionais de 8 dias (Hr 8d) nas regiões – R1, R3 e R5. FD- folículo dental, A- ameloblastos. Aumento original 250x.





**Fig. 10:** Imunolocalização do **CSF-1** no ligamento periodontal (R1 e R3) e folículo dental da região de forame apical (R5) de incisivos e ratos controle (c), hipofuncionais de 8 horas (Ho 8h) e de 8 dias (Ho 8d) e hiperfuncionais de 8 horas (Hr 8h) e 8 dias (Hr 8d) nas regiões – R1, R3 e R5. LP- ligamento periodontal, FD- dentina, D- dentina, OA- osso alveolar. Aumento original – 250x

## 6 Discussão

Os efeitos do **EGF** sobre a erupção dental têm sido estudados, desde que Cohen (1962) constatou que a injeção deste fator em ratos recém-nascidos causava a erupção precoce dos dentes incisivos e a abertura das pálpebras. O EGF estimula a proliferação e a diferenciação de células epiteliais e mesenquimais (Carpenter & Cohen, 1979; Carpenter, 1985), também afeta a reabsorção óssea (Hata *et al.*, 1984), exerce sua ação, pela ligação a um específico receptor transmembrana, o EGFr, assim somente células que expressam estes receptores, respondem ao EGF (Rihtniemi & Thesleff, 1987).

Vários estudos comprovaram a importância do folículo dental sobre a erupção (a remoção do FD previne a erupção, deixando o FD intacto e substituindo o dente por um objeto inerte, este erupciona) (Marks *et al.*, 1980; Marks *et al.*, 1984), outros estudos demonstraram a presença do EGF e de seu receptor neste tecido, no início do desenvolvimento do dente, indicando que o mesmo seja importante para o processo eruptivo (Thesleff *et al.*, 1987; Marks *et al.*, 1988; Partanen & Thesleff, 1987). Ao que parece os níveis fisiológicos do EGF, estimulam ou sinalizam a erupção dental, e como o folículo dental é necessário para a erupção, sugerindo que o EGF exerce seu efeito sobre o folículo, aumentando a síntese ou expressão de outras moléculas importantes para o processo eruptivo, como o TGF- $\beta$ 1 e IL-1 $\alpha$  (Wise *et al.*, 1992).

O **TGF- $\beta$ 1**, no molar de ratos em desenvolvimento, está presente no retículo estrelado (Wise & Fan, 1991), possui ação quimiotática sobre os monócitos do sangue circulante (Wiseman *et al.*, 1990), atraindo-os pelos capilares fenestrados do folículo dental, aonde vão se fundir para formar osteoclastos, abrindo um caminho para o dente erupcionar (Lin & Wise, 1993), o recrutamento dos monócitos, provavelmente não é a única função do TGF-1 nos dentes em erupção, também promove a proliferação de osteoblastos e conseqüentemente a formação óssea, característica de dentes em erupção (Wise & Fan, 1991); estimula os fibroblastos (em cultura) a secretarem mais proteínas da matriz extracelular, contribuindo para a formação do tecido conjuntivo denso do ligamento periodontal, também amplifica no retículo estrelado, a expressão do RNAm da IL-1 $\alpha$ , molécula também importante para o processo de erupção dental (Wise *et al.*, 1992).

A citocina **IL-1 $\alpha$**  é importante para a erupção dental, pois possui a capacidade de estimular os osteoclastos e aumentar a reabsorção óssea (Thomson *et al.*, 1986), tem efeito mitogênico sobre os fibroblastos da região apical do ligamento periodontal, sugerindo, ao menos em parte, que esta região é regulada pela IL-1 $\alpha$  (Shimidt *et al.*, 1982), é localizada no retículo estrelado (Wise *et al.*, 1995a), ela pode desencadear o processo de erupção, pela sua difusão para o folículo dental, aumentando a síntese do RNAm do CSF-1 pelas células do folículo dental (Wise & Lin, 1994).

O **CSF-1** tem ação quimioatrativa para monócitos, é produzido e secretado pelas células do folículo dental (Wise *et al.*, 1995; Que & Wise, 1997), parece ser indispensável para erupção dental, estudos realizados com ratos osteopetróticos (animais deficientes em CSF-1, possuem os dentes formados, mas que não erupcionam), mostraram que após administração do CSF-1, os animais osteopetróticos, tiveram seus dentes erupcionados (Iizuka *et al.*, 1992), e animais normais tiveram a erupção acelerada (Cielinski *et al.*, 1994). Injeções do CSF-1

aumenta os eventos celulares da erupção, isto é, aumenta o influxo de monócitos no folículo dental, conseqüentemente, aumenta o número de osteoclastos necessários para a reabsorção óssea, e formação da via eruptiva para o dente.

Os resultados observados neste estudo mostram que tanto o folículo dental quanto o ligamento periodontal apresentaram marcação em maior ou menor intensidade para todos os anticorpos analisados. Aparentemente há uma diferença quando se compara dentes controle e hipofuncionais (principalmente de 8 dias), (ex: Fig. 9 – f, g; Fig. 10 – k, m), mas devido às diferenças de intensidades, tornou-se difícil a comprovação dos dados. Também não conseguimos determinar se houve diferenças na distribuição das moléculas analisadas, nas diferentes regiões do dente que correspondem aos estágios de seu desenvolvimento.

No presente estudo, a presença do EGF foi detectada no folículo dental e ligamento periodontal, em todos os grupos e regiões. A localização não só do EGF como de seu gene, também foi relatada em vários outros estudos em dentes de ratos e camundongos, só que num período de tempo curto (logo após o nascimento dos animais), como por exemplo, os estudos de Thopan *et al.*, (1987), que observaram por meio da radioautografia, específica ligação do EGF no folículo dental de incisivos de camundongos recém nascidos, Martineau-Doizé (1987) também por radioautografia, mostraram ligação do EGF no folículo dental de incisivos inferiores de ratos; Partanen & Thesleff (1987); Thesleff (1987) e Thesleff *et al.*, (1987), reportaram forte ligação do <sup>125</sup>I – EGF no mesênquima do folículo dental de dentes molares em desenvolvimento e Wise *et al.* (1992) observaram no folículo dental de molares de ratos, forte marcação para os EGF (até o 4º dia), diminuindo nos dias subseqüentes, e Shoroff *et al.*, (1996), observaram que o EGF é expresso na porção coronal do folículo dental, em estágios específicos do desenvolvimento do dente e da erupção. Também foi relatado sua presença no folículo dental de pré-molares de cachorros com 16 semanas (Marks *et al.*, 1988) e em pré-molares humanos aos 11 anos (Thesleff *et al.*, 1987).

A descrição da presença do EGF no ligamento periodontal está de acordo com os achados de Cho *et al.*, (1988), Thopan *et al.*, (1988) e Cho & Garant (1996), que reportaram a ligação do EGF nos fibroblastos do ligamento periodontal de incisivos e molares.

Tanto no folículo dental, como no ligamento periodontal e também polpa, foi observado aumento significativo na intensidade de marcação no tecido conjuntivo perivascular, este resultado corrobora com os achados de Thesleff (1987), que reportou em seu estudo, que as células do músculo liso dos vasos e artérias do folículo, ligamento e polpa, apresentam grande quantidade de EGF ao seu redor.

Outras estruturas como, camada papilar, retículo estrelado, estrato intermédio e ameloblastos, também se apresentaram imunoreativos para o EGF, corroborando com os achados de Martineau-Doizé *et al.*, (1987; 1991); Thesleff (1987); Partanen & Thesleff (1987); Cobo *et al.*, (1992); Wise *et al.*, (1992) e Tanikawa e Bawden (1999) que também reportaram a presença do EGF em molares e incisivos de ratos

O receptor para o EGF – EGFr, também foi localizado no folículo dental e ligamento periodontal em todos os grupos e em todas as regiões.

Wise *et al.*, (1992) observaram no folículo dental de molares de ratos, forte marcação para o EGFr até o 8º dia de vida; Shoroff *et al.* (1996), mostraram a expressão do EGFr na porção coronal do folículo dental do 1º molar de rato, em estágios específicos do desenvolvimento do dente; Cho *et al.*, (1991), demonstraram que fibroblastos do ligamento periodontal e folículo dental de molares de ratos, expressam grande número de EGFr; Cho *et al.*, (1988) observaram a presença do EGFr nos fibroblastos do ligamento periodontal e Cho & Garant (1996), mostraram numerosa quantidade de receptores para o EGF, não somente nas células mesenquimais perifoliculares em diferenciação, como também nos fibroblastos maduros do ligamento periodontal, em ativa função sintética, e que desaparecem quando estas se diferenciam em osteoblastos e



cementoblastos. Assim como o EGF, a imunolocalização do EGFr, também se mostrou mais intensa na região perivascular do folículo dental, ligamento periodontal e polpa concordando com os resultados de Thesleff (1987).

Era esperado encontrar marcação do EGF e de seu receptor nas mesmas estruturas, pois como o EGF exerce suas ações pela ligação a um receptor específico de superfície de membrana, somente células que expressam estes receptores (EGFr), respondem ao EGF (Rihtniemi & Thesleff, 1987; Shroff *et al.*, 1996).

Os resultados para o TGF- $\beta$ 1, também mostraram que as células do folículo dental e ligamento periodontal, não marcaram uniformemente. O padrão de marcação tendeu a se localizar no citoplasma das células e ocasionalmente nos núcleos, isto se deve ao fato de ter sido utilizado anticorpo policlonal.

Não foi encontrada na literatura, descrição da presença do TGF- $\beta$ 1 no folículo dental, mas sua presença em outros tecidos, foi relatada em molares de ratos, em períodos muito curtos de tempo (em embriões, ou animais recém-nascidos), talvez esta disparidade seja explicada pela diferença de dentição utilizada. Já no ligamento periodontal, a literatura descreve a presença desta proteína pela imunohistoquímica e também a expressão do RNAm do TGF- $\beta$ 1 (Gao *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1998)

Marcação em outros tecidos como, na camada papilar, retículo estrelado e estrato intermédio, foi observada no presente trabalho, e está de acordo com a literatura, que também demonstrou a presença do TGF- $\beta$ 1 nestes tecidos, mas principalmente no retículo estrelado (Cam *et al.*, 1990; Wise & Fan, 1991; Vaahtokari *et al.*, 1991, Lin & Wise, 1993; Gao *et al.*, 1998;).

Mesmo o TGF- $\beta$ 1 não sendo produzido pelo folículo dental (é sintetizado pelas células do retículo estrelado), parece exercer seu efeito, no folículo dental que se situa adjacente ao retículo, para iniciar os eventos celulares da erupção, ou

para aumentar a secreção de proteínas da matriz extracelular pelo folículo, para a formação do ligamento periodontal (Lin & Wise, 1993). Ao que parece, também a morfologia do folículo, permitiria a entrada do TGF- $\beta$ 1 no sangue circulante para atrair monócitos, para posterior formação de osteoclastos. Os capilares fenestrados do folículo, adjacente ao retículo, é separado deste, somente por uma lâmina basal. Como os capilares fenestrados são sempre encontrados onde é necessário, para facilitar o transporte de moléculas do sangue (ex: glândulas endócrinas), sua presença na interface do retículo estrelado e folículo dental, pode promover a entrada de moléculas na circulação (Wise & Fan, 1991).

Para a IL-1 $\alpha$ , os resultados da imunohistoquímica, também demonstraram no folículo dental, variação de intensidade, já o ligamento periodontal apresentou a mesma intensidade em todos os grupos e regiões.

A literatura não apresenta relatos da presença da proteína da IL-1 $\alpha$  no folículo dental, mas seu receptor IL-1RI, foi descrito no folículo dental de molares de ratos, logo após o nascimento (Wise & Zhao, 1995), no entanto a IL-1 $\alpha$  é localizada no retículo estrelado, adjacente ao folículo dental do 1<sup>o</sup> molar de rato, logo após o nascimento (Wise *et al.*, 1995). A expressão da IL-1 $\alpha$  e de seu receptor pode ser aumentada pela administração do EGF e do TGF- $\beta$ 1, então é provável que quanto mais IL-1 $\alpha$  é produzida pelo estímulo destas duas proteínas, mais receptores estejam disponíveis para se ligarem à maior quantidade de IL-1 $\alpha$  produzida.

Segundo Wise (1998) a IL-1 $\alpha$  encontrada no retículo estrelado, também pode amplificar a expressão do CSF-1 nas células do folículo dental. Os autores comprovaram esta possibilidade, por meio da administração da IL-1 $\alpha$  para ratos de diferentes idades. E observaram os resultados positivos nos 1<sup>os</sup> molares dos animais, segundo os autores, a IL- $\alpha$  pode participar da cascata de sinais moleculares que iniciam a erupção, pelos seus efeitos sobre o gene do CSF-1.

A presença da IL-1 $\alpha$  no ligamento periodontal, também é relatada por outros autores, como Davidovitch *et al.*, (1988), que descreveram a imunolocalização da IL-1 $\alpha$  nos fibroblastos do ligamento periodontal de dentes de gatos com 3,5, 2,4, e 5,5 meses de vida. Lossdörfeer *et al.*, (2002), mostraram a localização do RNAm da IL-1 $\alpha$  nos fibroblastos do ligamento periodontal de molares de ratos. A IL-1 $\alpha$  possui ação mitogênica (Shimidt *et al.*, 1982), possivelmente está envolvida na regulação da proliferação dos fibroblastos do ligamento periodontal, provavelmente em sinergismo com outros fatores sistêmicos locais (Dewhirst *et al.*, 1987)

Semelhante aos outros marcadores, os resultados para o CSF-1 mostram imunoreatividade variável no folículo dental ao longo de todo o dente e entre os grupos analisados e moderada intensidade de marcação nas células do ligamento periodontal.

Vários autores relataram logo após o nascimento, a presença do CSF-1, de seu receptor e de seu RNAm, nas células do folículo dental de molares de ratos, sendo que a localização ou expressão do CSF-1 atinge um pico no 3<sup>o</sup> dia após o nascimento em molares de ratos e no 5<sup>o</sup> em molares de camundongos, diminuindo nos dias subsequentes (Wise *et al.*, 1995; Wise & Lin, 1995; Que & Wise, 1997; Wise *et al.*, 1997; Wise *et al.*, 1999). No incisivo de rato a marcação foi observada em todas as regiões, esta diferença provavelmente se deve ao tipo de dentição utilizada, no incisivo de rato, talvez o CSF-1 não desapareça porque deve manter sua função de atrair monócitos, não para abrir uma via eruptiva, mas sim para manter ou aumentar o espaço para o dente, uma vez que este aumenta em diâmetro com o decorrer da idade.

O CSF-1 parece ser necessário para o processo eruptivo, porque ratos osteopetróticos, deficientes em CSF-1, apresentam dentes que não erupcionam, mas que podem ser induzidos a erupcionarem com administração exógena deste fator (Iizuka *et al.*, 1992). O fato de que as células do folículo dental possam

secretar moléculas (CSF-1) quimiotáticas para monócitos do sangue circulante, reforça sua importância na erupção, pois os monócitos se fundem para formar osteoclastos que reabsorvem o osso alveolar criando uma via eruptiva para o dente (Wise *et al.*, 1985; Marks *et al.*, 1994).

Cielinski *t al.*, (1995), demonstraram a ação exógena do EGF e do CSF-1 no 1º molar e em incisivo de ratos normais e osteopetróticos, e observaram que os incisivos de animais tratados com EGF erupcionaram mais rapidamente que os molares, e o inverso aconteceu a animais tratados com CSF-1, dentes molares erupcionaram mais rapidamente que os incisivos. A diferença na ação do CSF-1 e EGF sobre o molar e incisivo, sugere que uma cascata molecular distinta pode ser requerida para dentes de erupção contínua (incisivos) e dentes de erupção limitada (molares).

O EGF que também acelera a erupção, não aumenta a expressão do RNAm do CSF-1, pode indiretamente estimular a expressão do gene do CSF-1. Em particular, o EGF aumenta *in vitro* a expressão do RNAm da IL-1 $\cdot$  nas células do retículo estrelado (Wise *et al.*, 1994a), aumenta também no mesmo tecido, a imunomarcagem para a IL-1 $\alpha$  *in vivo* (Wise & Lin, 1994). Assim, a IL-1 $\alpha$  pode se difundir do retículo estrelado para o folículo dental e estimular a expressão do gene para o CSF-1, iniciando os eventos celulares da erupção (Wise, 1998).

Não foi encontrada na literatura citação a respeito da presença do CSF-1, de seu receptor ou de seu RNAm, no ligamento periodontal, camada papilar e estrato intermédio, no entanto alguns autores relatam a presença (Wise *et al.*, 1997; Otsuji *et al.*, 1999) ou total ausência do CSF-1 e ou de seu receptor nas células retículo do estrelado (Wise *et al.*, 1997), e nos ameloblastos sua presença é sutil (Wise *et al.*, 1997; Otsuji *et al.*, 1999).

Os resultados aqui apresentados, mostram que os fatores de crescimento (EGF, EGFr, TGF- $\beta$ 1 e CSF-1) e citocina (IL-1 $\alpha$ ) estudados, foram evidenciados em toda a extensão dos tecidos periodontais de incisivos de ratos. Sua localização preferencial foi no tecido conjuntivo perivascular, e de um modo geral, com maior intensidade no folículo dental.

Não foi possível fazer uma quantificação confiável da intensidade da imunomarcção, de modo a detectar diferenças entre as várias regiões do dente estudadas. Contudo, aparentemente, houve um aumento na imunomarcção de todas as moléculas analisadas no folículo dental, particularmente do CSF-1, em incisivos após 8 dias de hipofunção.

Na cascata de moléculas proposta por Wise & Lin (1995), o CSF-1 é o ponto terminal para estimular a migração de monócitos do sangue para o tecido conjuntivo. Estas moléculas dariam a origem aos osteoclastos que promoveriam a reabsorção óssea necessária para a formação da via eruptiva. Nos incisivos de ratos, a face do alvéolo relacionada ao esmalte (faces labial e parte da distal) apresenta-se forrada com osteoclastos (células positivas ao TRAP (fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico) (Irie & Ozawa, 1990). Esta face é continuamente reabsorvida no lado interno e neoformada no lado externo e esta remodelação se acentua nos alvéolos de incisivos hipofuncionais (Gerlach *et al.*, 2002). É como se a via eruptiva dos incisivos de crescimento contínuo necessitasse de uma ampliação contínua. Com efeito, os incisivos de ratos crescem tanto em comprimento, como em diâmetro durante a vida do animal (ratos machos, entre 100 e 400g de peso corporal, os incisivos inferiores aumentam em aproximadamente 90% seu comprimento e diâmetro; de 400 a 500g tal crescimento praticamente cessa e há uma significativa redução do número de células TRAP-positivas na parede labial interna do alvéolo – Merzel, 2005 informação pessoal). Em incisivos, cujo crescimento e erupção em direção) incisal foram interrompidos por 18 dias por meio de contenção, a reabsorção óssea na face labial interna, foi substituída por neo-formação óssea e osteoclastos deram lugar a osteoblastos (Salmon, 2004).

Em incisivos desimpedidos, além da duplicação da velocidade de erupção, o volume do espaço alveolar aumenta em 29% após 3 meses de hipofunção, aumento que não foi significativo com 3 semanas de hipofunção (Steigman *et al.*, 1989).

No ligamento periodontal, onde as moléculas analisadas têm presença constante (também no ligamento periodontal dos molares – observações não descritas), é possível que a referida cascata desempenhe as mesmas funções em relação a remodelação óssea que ocorre nas faces do alvéolo relacionadas (Gerlach *et al.*, 2002).

Em relação ao EGFr, que é uma glicoproteína fucolisada, Duarte (2003) mostrou que houve um aumento da incorporação de  $^3\text{H}$ -fucose no tecido conjuntivo perivascular de incisivos de camundongos após 8 dias de hipofunção, aumento que não ocorreu após 8 horas e nem na condição de hiperfunção. Além da participação desse receptor na cascata relacionada a reabsorção óssea, Cho & Garant, 1996 lhe atribuem a função de manutenção do fenótipo de fibroblastos perivasculares, possíveis células tronco do ligamento periodontal. O aumento dessa proteína na condição hipofuncional poderia estar relacionado com o aumento na proliferação de fibroblastos que ocorre nessa condição (Michaeli *et al.*, 1988).

Será, pois, importante analisarmos em futuros experimentos, o comportamento das moléculas em estudo em condições extras, como tempos mais longos de hipofunção, de contenção do crescimento do incisivo e em incisivos de animais idosos. Por outro lado, deveremos implementar a metodologia usada que permita uma quantificação segura, como o uso de imunomarcagem em microscopia eletrônica e de “Real time PCR”.

## 7 Conclusões

Um provável aumento das moléculas, principalmente do CSF-1, ocorreu no grupo de 8 dias de hipofunção (Ho 8d).

O papel dessa “cascata” pode estar relacionado com a ampliação da via eruptiva do incisivo, que cresce por um período prolongado da vida do animal.

# Referências

# Bibliográficas

Adamson ED. Developmental of epidermal growth factor receptor. *In: Hamilton MN. **Growth factors and development.*** New York. 1990; 1: 1-30.

Araújo CSA, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ, Coletta RD. Histomorphometric characteristics and expression of epidermal growth factor and its receptor by epithelial cells of normal gingival and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontal Res.* 2003; 38(3): 237-241.

Attisano L, Wrana JL, Montalvo E, Massagué J. Activation of signalling by activin receptor complex. *Mol Cell Biol.* 1996; 16: 1066-1073. *Apud: Toyono T; Nakashima M; Kuhara S; Akamine A.* Expression of TGF- $\beta$  superfamily receptors in dental pulp. *J Dent. Res.* 1997; 76 (9): 1555-1560.

Bennett NT & Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surgery* 1993; 165: 728-736.



---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Berkovitz BKB, Thomas NR. Unimpeded eruption in the root-resected lower incisor of the rat with a preliminary note on root transection. ***Archs. Oral Biol.*** 1969; 14: 771-780. *Apud:* Irie K; Ozawa H. Relationships tooth eruption, occlusion and alveolar bone resorption: histochemical and cytological studies of bone remodeling on rat incisor alveolar bone facing the enamel after root resection. ***Archs Histol Cytol.*** 1990; 53 (5): 511-522.

Berkovitz BKB. The healing process in the incisor tooth socket of the rat following root resection and exfoliation. ***Archs oral Biol.*** 1971; 16: 1045-1054. *Apud:* Irie K; Ozawa H. Relationships tooth eruption, occlusion and alveolar bone resorption: histochemical and cytological studies of bone remodeling on rat incisor alveolar bone facing the enamel after root resection. ***Archs Histol Cytol.*** 1990; 53 (5): 511-522.

Bruce A *et al.*, ***Biología Molecular das Células*** 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1991: 892-898.

Cahil Dr & Marks SCJr. Chronology and histology of exfoliation and eruption of mandibular premolars in dogs. ***J Morphology.*** 1982; 171: 213-218. *apud:* Cielinski MJ, Jolie M, Wise GE, Ando DG, Marks Jr SC. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) is a potent stimulator of tooth eruption in the rat. *IN:* Davidovitch Z. ***Biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants.*** 1994: 429-436.

Cahil Dr & Marks SCJr. Tooth eruption: Evidence for the central role of the dental follicle. ***J Oral Pathol.*** 1980; 9: 189-200.

Cam Y, Neumann MR, Ruch JV. Immunolocalization of transforming growth factor  $\beta$ 1 and epidermal growth factor receptor epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of *in vitro* production of transforming activity. **Archs Oral Biol.** 1990; 10: 813-822.

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. **Annual Rev Biochem.** 1979; 265 (14): 193-216.

Carpenter G. Epidermal growth factor; biology and receptor metabolism. **J Cell Sci.** 1985; 3: 1-9. *Apud:* Shoroff B, Kashner JE, Keyser JD, Hebert C, Norris K. Epidermal growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. **Archs Oral Biol.** 1996; 41: 613-617.

Cho MI, Garant PR, Lee YL. Expression and role of epidermal growth factor receptors during differentiation of cementoblasts, osteoblasts, and periodontal ligament fibroblasts in the rat. **Anat Rec.** 1996; 245: 343-360.

Cho MI, Garant PR, Lee YL. Periodontal ligament fibroblasts, preosteoblasts, and prechondrocytes express receptor for epidermal growth factor *in vivo*: a comparative radioautographic study. **J Periodont Res.** 1988b; 23: 287-294.

Cho MI, Garant PR. Role of microtubules in the organization of the Golgi complex and the secretion of collagen secretory granules by periodontal ligament fibroblasts. **Anat Rec.** 1981; 459-471. *Apud:* Matsuda N, Kumar NM, Ramkrishnan PR, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Evidence for up-regulation of epidermal growth factor receptors on rat periodontal ligament fibroblastic cells

associated with stabilization of phenotype *in vitro*. **Archs Oral Biol.** 1993; 38 (7): 559-569.

Cho MI, Lee YL, Garant PR. radioautographic demonstration of receptor for epidermal growth factor in various cells of the oral cavity. **Anat Rec.** 1988a; 222: 191-200.

Cho MI, Lin WL, Garant PR. Occurrence of epidermal growth factor-binding sites during differentiation of cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts fo the young rat: a light and electron microscopic radioautographic study. **Anat Res.** 1991; 231: 14-24. *Apud:* Matsuda N, Kumar NM, Ramkrishnan PR, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Evidence for up-regulation of epidermal growth factor receptors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype *in vitro*. **Archs Oral Biol.** 1993; 38 (7): 559-569.

Cielinski MJ, Jolie M, Wise GE, Ando DG, Marks Jr SC. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) is a potent stimulator of tooth eruption in the rat. *IN:* Davidovitch Z. **Biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants.** 1994: 429-436.

Cielinski MJ, Jolie M, Wise GE, Marks Jr SC. The contrasting effects of colony-stimulating factor-1 and epidermal growth factor on tooth eruption in rat. **Con Tissue Res.** 1995; 1(4): 165-169.

Cobo J, Immunohistochemical localization of epidermal growth factor and its receptor during odontogenesis in the rat. **Eur J Orthod.** 1992; 14(5): 333-338.

Cohen S, Savage CR. Recent studies on the chemistry and biology of EGF. ***Recent Prog Horm Res.*** 1974; 30: 554-574.

Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. ***J Biol Chem.*** 1962; 237: 1555-1562.

D'Souza RN, Happonen RP, Flanders KC, Butler WT. Histochemical localization of transforming growth factor- $\beta$ 1 in developing rat molars using antibodies to different epitopes. ***J Biol Buccale*** 1990; 18: 299-306. *Apud:* Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of transforming growth factors-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) in the developing periodontum of rats. ***J Det Res.*** 1998; 77(9): 1708-1716.

Das S, Stanley ER. Structure-function studies of a colony stimulating factor (CSF-1). ***J Biol Chem.*** 1982; 257(22): 13679-13684.

Davideau JL, Sahlberg C, Thesleff I, Berdal A. EGF receptor expression in mineralized tissues: An in situ hybridization and immunohistochemical investigation in rat and human mandibles. ***Connect Tissue Res.*** 1995; 32(1-4): 47-53.

Davidovitch Z, Lynch P, Shanfield JL. Immunohistochemical localization of interleukins in dental and paradental cells during tooth eruption and root resorption in kittens. ***The Biological Mechanisms of tooth Eruption and Root Resorption.*** EBSCO Media, Birmingham. 1988; 355-364.

Dewhirst FE, Ago JM, Peros WJ, Stanshenko P. Synergism between parathyroid hormone and interleukin 1 in stimulating bone resorption in organ culture. ***J bone Min.*** 1987; 2: 127-143.

Davidovitch Z, Lynch P, Shanfield JL. Immunohistochemical localization of interleukins in dental and paradental cells during tooth eruption and root resorption in kittens. *Apud: The Biological Mechanisms of tooth Eruption and Root Resorption*. EBSCO Media, Birmingham. 1988; 355-364.

Duarte MM. Distribuição de glicoproteínas no ligamento periodontal e no periodonto relacionado ao esmalte do incisivo de camundongo, em diferentes condições funcionais. Estudo radioautográfico através da incorporação de [ $^3$ H]-fucose. *Faculdade de odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP*. Tese de mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental. 2003.

Gao J, Jordan TW, Cutress TW. Basic fibroblast growth factor (bEGF) in human periodontal ligament tissue. *J Period Res*. 1996; 31: 260-264. *Apud: Gao J, Symons AL, Bartold PM*. Cytokines in the developing periodontal tissues of rats. *New Zealand Dental J*. 1998; 94: 115-116.

Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) in the developing periodontum of rats. *J Dent Res*. 1998; 77(9): 1708-1716.

Gerlach RF, Toledo DB, Fonseca RB, Novaes PD, Lien SR, Merzel J. Alveolar bone remodeling pattern of the rat incisor under different functional conditions as shown by minocycline administration. *Arch Oral Biol*. 2002.

Gold L, Saxena B, Mittal K, *et al*. Increased expression of transforming growth factor- $\beta$  isoformas and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium: evidence for paracrine and autocrine action. *Cancer Res*. 1994; 54: 2347-2358.

Gorsk JP &, Marks SCJr. Current concepts of the biology of tooth eruption. **Crit Rev Oral Med.** 1992; 3: 185-206. *Apud:* Marks SCJr & Schroeder H. tooth eruption: theories and facts. **Anat Rec.** 1996; 245: 374-393.

Gowgiel JM. Eruption of irradiation-produced rootless teeth i monkeys. **J Dent Res.**1961; 40: 538-547. *Apud:* Marks SCJr & Schroeder H. tooth eruption: theories and facts. **Anat Rec.** 1996; 245: 374-393.

Gresik EW, Kashimata M, Kadoya Y, Yamshina S. The EGF syastem in fetal development. **Eur J Morphol.** 1998; 36: 92-97.

Grier RL IV, Wise GE. Inhibition of tooth eruption in the rat by biphosphonate. **J Dent Res.** 1998; 77: 8-15. *Apud:* Wise GE, Huang H, Que BG. Gene expression of potential tooth eruption molecules in the dental follicle of the mouse. **Eur J Oral Sci.** 1999; 107: 482-486.

Hata RI, Hori H, Nagai Y, Tanaka S, Kondo M, Miramatsu M *et al.* Selective inhibition of type I collagen synthesis in osteoblastic cells by epidermal growth factor. **Endocrinology.** 1984; 115: 867-876. *Apud:* Rihtniemi L, Thesleff I. An autoradiographic study on the effect of epidermal growth factor on cell proliferation in erupting mouse incisors. **Archs Oral Biol.** 1987; 32(12): 959-863.

Heyworth CM, Vallance SJ, Whetton AD, Dexter TM. Myeloid haematopoietic cell growth factors. Growth factors in cell and developmental biology. **J Cell Sci.**1990; supl. 13: 67.

Iizuka T; Cielinski MJ; Aukerman SL; Marcks SCJr. The effects of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) on tooth eruption in the toothless (osteopetrotic) rat in relation to the critical periods for bone resorption during tooth eruption. **Archs Oral Biol.** 1992; 37: 629-636.

Irie K; Ozawa H. Relationships tooth eruption, occlusion and alveolar bone resorption: histochemical and cytological studies of bone remodeling on rat incisor alveolar bone facing the enamel after root resection. ***Archs Histol Cytol.*** 1990; 53 (5): 511-522.

Iseki S, Osumi-Yamashita N, Miyazono K, Franzén P, Ichijo H, *et al.* Localization of transforming growth factor- $\beta$  type I and type II receptors in mouse development. ***Exp Cell Res.*** 1995; 219: 339-347.

Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electronmicroscopy. ***J Cell Biol.*** 1965; 27 (2): 137-138.

Kingsley DM. The TGF- $\beta$  superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. ***Genes Dev.*** 1994; 8: 133-146.  
*Apud:* : Gold LI, Jussila T, Fusenig NE, Stenback F. TGF- $\beta$  isoformas are differentially expressed in increasing malignant grades of HACAT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis. ***J Pathol.*** 2000; 190: 579-588.

Levine JH, Moses HL, Gold LI, Nanney LB. Spatial and temporal patterns of immunoreactive TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 during excisional wound repair. ***Am J Pathol.*** 1993; 143: 368-380. *Apud:* : Gold LI, Jussila T, Fusenig NE, Stenback F. TGF- $\beta$  isoformas are differentially expressed in increasing malignant grades of HACAT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis. ***J Pathol.*** 2000; 190: 579-588.

Lin F & Wise GE. Effect of epidermal growth factor expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 mRNA in stellate reticulum cells of rat mandibular molars. ***Dev Dynamics*** 1993; 198: 22-27.

Lossdöfer S, Götz W, Jäger A. Localization of IL-1 $\alpha$ , IL-1 R1, TNF, TNF-RI, and TNF-RII during physiological drift of rat molar teeth – an immunohistochemical and in situ hybridization study. ***Citok.*** 2002; 20 (1): 7-16.

Marks SCJr & Cahil DR. Experimental study in the dog of the non-active role of the root in the eruptive process. ***Archs Oral Biol.*** 1984; 29: 311-322.

Marks SCJr & Cahil DR. Regional control by the dental follicle of alterations in alveolar bone metabolism during tooth eruption. ***J Oral Pathol.*** 1987; 16: 164-169. *Apud:* Marks SC, Schroeder HE. Tooth eruption: Theories and facts. ***Anat Rec.*** 1996; 245: 374-393.

Marks SCJr & Schroeder H. tooth eruption: theories and facts. ***Anat Rec.*** 1996; 245: 374-393.

Marks SCJr, Wojtowicz A, Szperl M, Urbanowska E, Mackay CA, Wiktor-Jedrzejczak W, *et al.* administration of colony-stimulating factor-1 corrects some macrophage, dental and skeletal defects in an osteopetrotic mutation (toothless, tl) in the rat. ***Bone;*** 1992; 13: 89-93. *apud:* Cielinski MJ, Jolie M,

Wise GE, Ando DG, Marks Jr SC. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) is a potent stimulator of tooth eruption in the rat. *IN:* Davidovitch Z. ***Biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants.*** 1994: 429-436.



Marks SCJr; Gorski JP; Cahil DR; Wise GE. Tooth eruption – a synthesis of experimental observations. *In: The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption.* Davidovitch, Z. Birmingham: EBSCO Media. 1988: 161-169.

Martineau-Doizé B, Lai WH, Warshwsky H, Bergeron JJM. Specific binding sites for epidermal growth factor in bone and incisor enamel organ of the rat. ***Dev Dis Cart Bone Matrix.***1987; 389-399.

Martineau-Doizé B, Warshawsky H, Dickson K, Lai WH, Bergeron JM. Localization of epidermal growth factor receptors in cells of the enamel organ of the rat incisor. ***Dev Biol.*** 1991; 148: 590-601.

Massague J. Receptors for the TGF- $\beta$  family. ***Cell.*** 1992; 69: 1067-1070. *Apud:* Gold LI, Jussila T, Fusenig NE, Stenback F. TGF- $\beta$  isoformas are differentially expressed in increasing malignant grades of HACAT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis. ***J Pathology.*** 2000; 190: 579-588.

Merzel J, Novaes PD, Furlan S. A histological study of root-resected and root-transected rat incisors when eruption ceases, shortly before they are exfoliated from the socket. ***Archs Oral Biol.*** 2000a; 45: 315-322.

Merzel J, Novaes PD, Furlan S. The effects of local trauma to the enamel-related periodontal tissues in the eruption of rat incisor. ***Archs Oral Biol.*** 2000b; 45:323-333.

Michaeli Y; Steigman M; Yitschaky M; Weinreb Jr. The response of the fibroblast population in the periodontal ligament of rat incisors to altered eruption rates. ***J Period Res.*** 1988; 21: 86-94.

Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, heldin AH. A role of latent TGF- $\beta$ 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-1. **EMBO J.** 1991; 10: 1091-1101. *Apud:* Bennett NT & Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. **Am J Surgery** 1993; 165: 728-736.

Moxham, B.J., Berkovitz, B.K.B. Interactions between thyroxine, hydrocortisone and cyclophosphamide in their effects on the tooth eruption of the rat mandibular. **Arch Oral Biol.** 1983; 28(12): 1083-1087.

Moxham, B.J., Berkovitz, B.K.B. The effects of root transection on the unimpeded eruption rate of the rabbit mandibular incisor. **Archs Oral Biol.** 1974; 19: 903-909.

Moxham, B.J., Berkovitz, B.K.B. The periodontal ligament and physiological tooth movements. *In:* Berkovitz, B.K.B., Moxham, B.J., Newman HN. Eds. The periodontal ligament in health and disease. Oxford. 1995: 183-214.

Nicola NA. Why hemopoietic growth factor receptors interact with each other? **Immunol Today.** 1987; 8: 134-140. *Apud:* Wise GE, Zhao L, Grier IV RL. Localization and expression of CSF-1 receptor in rat dental follicle cells. **J Dent Res.** 1997; 76(6): 1244-1249.

Olashaw NE, O'Keefe EJ, Pledger WJ. Platelet-derived growth factor modulates epidermal growth factor receptors by a mechanism distinct from that of phorbol esters. **Proc natl Acad Sci USA.** 1986; 83: 3834-3838. *Apud:*

Bennett NT & Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. **Am J Surgery** 1993; 165: 728-736.

Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK. There is more than one interleukin 1. **Immunology Today**. 1986; 7: 45-56. *Apud*: Symons AL, Polak B, Powell RN, Seymour GJ. Interleukin-1 (IL-1) bioactivity and inhibition of IL-1 bioactivity in supernatant fluid from cultured microphthalmic (mi) mice teeth of different ages. **J Oral Pathol**. 1995; 24: 365-373.

Otsuji W, Tanase S, Yoshida S, Bawden JW. The immunohistochemical localization of the interferon- $\gamma$  and granulocyte colony-stimulating factor receptors during early amelogenesis in rat molars. **Archs Oral Biol**. 1999; 44: 173-181.

Partanen AM, Thesleff I. Localization of  $^{125}\text{I}$  epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. **Dev Biol**. 1987; 120(1): 186-197.

Partanen AM. Epidermal growth factor and transforming growth factor in the development of epithelial-mesenchymal organ of the mouse. *In*: Hamilton MN. **Growth factors and development**. New York. 1990; 2: 31-53.

Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI. Immunohistochemical localization of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. **J Cell Biol**. 1991; 115: 1091-1105.

Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mund GR, Roodman GD. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells in vitro. **J Bone Miner Res**. 1989; 4: 113-118. *Apud*: Xu LX, Kukita T, Yu H, Nakano Y, Koga T. Expression of the mRNA for types I and II interleukin-1 receptors in dental tissues of mice during tooth development. **Calcif Tissue Int**. 1998; 63: 351-356.

Que BG, Wise GE. Colony-stimulating factor-1 and monocyte chemotactic protein-1 chemotaxis for monocytes in the rat dental follicle. ***Archs Oral Biol.*** 1997; 42(2): 855-860.

Raymond E, Fraive S, Armand JP. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. ***Drugs.*** 2000; 60(1): 15-23.

Rihtniemi L, Thesleff I. An autoradiographic study on the effect of epidermal growth factor on cell proliferation in erupting mouse incisors. ***Archs Oral Biol.*** 1987; 32(12): 959-863.

Rollins BJ, Morrison ED, Stiles CD. Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. ***Proc Natl Acad Sci USA.*** 1988; 85: 3738-3742. *Apud:* Wise GE, Huang H, Que BG. Gene expression of potential tooth eruption molecules in the dental follicle of the mouse. ***Eur J Oral Sci.*** 1999; 107: 482-486.

Salmon CR. Remodelação óssea do periodonto de incisivo de rato em erupção normal e alterada. Estudo com marcadores fluorescentes. . ***Faculdade de odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP.*** Tese de mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental. 2004.

Seyedin SM, Thompson AY, Bentz H, *et al.* Purification and characterization of two cartilage-inducing factors in bovine demineralized bone. ***Proc Natl Acad Sci.*** 1985; 82: 680-685. *Apud:* Wise GE & Fan L. Immunolocalization of transforming growth factor beta in rat molars. ***J Oral Pathol Med.*** 1991; 20: 74-80.

Shimidt JA; Mizel SB; Cohen D; Green I. Interleukin-1, a potential regulator of fibroblast proliferation. **J Immunolo.** 1982; 128: 2177-2182. *Apud:* Davidovitch Z, Lynch P, Shanfield JL. Immunohistochemical localization of interleukins in dental and paradental cells during tooth eruption and root resorption in kittens. **The Biological Mechanisms of tooth Eruption and Root Resorption.** EBSCO Media, Birmingham. 1988; 355-364.

Shirakawa F, Yamashita U, Tanaka Y *et al.* Production of resorbing activity corresponding to interleukin-1 $\alpha$  by adult T-cell leukemia cells in humans. **Cancer Res.** 1988; 48: 4284-4287. *Apud:* Symons AL, Polak B, Powell RN, Seymour GJ. Interleukin-1 (IL-1) bioactivity and inhibition of IL-1 bioactivity in supernatant fluid from cultured microphthalmic (mi) mice teeth of different ages. **J Oral Pathol.** 1995; 24: 365-373.

Shore RC, Kolokuris I, Robinson C, Kirkham J. Immunohistochemical investigation of epidermal growth factor receptor expression during periods of accelerated rat incisor eruption. **Archs Oral Biol.** 1992; 37(5): 389-393.

Shoroff B, Kashner JE, Keyser JD, Hebert C, Norris K. Epidermal growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. **Archs Oral Biol.** 1996; 41: 613-617.

Shour I, Massler M. The Teeth. *In:* Farris EJ & Griffith JQJR. **Rat in laboratory investigation.** 2 ed. New York: Hafner Publishing. 1971; 6: 105-135.

Sloan AJ & Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- $\beta$  isoforms 1-3 in vitro. **Archs Oral Biol.** 1999; 44: 149-156.

Smith DD, Gowen M, Mundy GR. Effects of interferon- $\gamma$  and other cytokines on collagen synthesis in fetal rat bone cultures. **Endocrinology** 1987; 120: 2494-

2499. *Apud*: Symons AL, Polak B, Powell RN, Seymour GJ. Interleukin-1 (IL-1) bioactivity and inhibition of IL-1 bioactivity in supernatant fluid from cultured microphthalmic (mi) mice teeth of different ages. **J Oral Pathol.** 1995; 24: 365-373.

Snead ML, Luo W, Oliver P, Nakamura M, Don-Wheeler G, Bessem C, *et al.* Localization of epidermal growth factor precursor in tooth and lung during embryonic mouse development. **Dev Biol.** 1989; 134(2): 420-429.

Stanely ER. The lymphokines **Human Press.**1981; 103-132. *Apud*: Das S, Stanley ER. Structure-function studies of a colony stimulating factor (CSF-1). **J Biol Chem.** 1982; 257(22): 13679-13684.

Stanley ER. Colony-stimulating factor (CSF) radioimmunoassay: detection of a CSF subclass stimulating macrophage production. **Proc Natl Acad Sci.** 1979; 76: 2969-2973. *Apud*: Das S, Stanley ER. Structure-function studies of a colony stimulating factor (CSF-1). **J Biol Chem.** 1982; 257(22): 13679-13684.

Steigman S; Micaheli Y; Yitzhaki M; Weinreb M. A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor. **J Dent Res.**1989; 68 (8): 1269-1274.

Symons AL, Leong K, Waters MJ, Seymour GJ. The effect of growth hormone on root development in the rat mandibular molar. *IN*: Davidovitch Z, Norton LA. **Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation.** The Harvard Society for the Advancement of Orthodontics. Beirmingham, Al: EBSCO Media, 1996: 449-457.

Symons AI, Polak B, Powell RN, Seymour GJ. Interleukin-1 (IL-1) bioactivity and inhibition of IL-1 bioactivity in supernatant fluid from cultured microphthalmic (mi) mice teeth of different ages. **J Oral Pathol Med.** 1995; 24: 365-373.

Tanikawa Y, Bawden JW. The immunohistochemical localization of phospholipase C $\gamma$  and the epidermal growth factor, platelet-derived growth-factor and fibroblast growth-factor receptors in the cells of the rat molar enamel organ during early amelogenesis. **Archs Oral Biol.** 1999; 44: 771-780.

Thesleff I, Ekblom P, Deski-Oja J. Inhibition of morphogenesis and stimulation of vascular proliferation in embryonic tooth cultures by sarcoma growth factor preparation. **Cancer Res.** 1983; 43: 5902-5909. *Apud:* Rihtniemi L, Thesleff I. An autoradiographic study on the effect of epidermal growth factor on cell proliferation in erupting mouse incisors. **Archs Oral Biol.** 1987; 32(12): 959-863.

Thesleff I, Partanen AM, Rihtniemi L. Localization of epidermal growth factor receptors in mouse incisor and human premolars during eruption. **Eur J Orthod.** 1987; 9(1): 24-32.

Thesleff I. Does the epidermal growth factor control tooth eruption? **ASDC J Dent Child** 1987; 54(5): 321-329.

Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ. Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. **J Exp Med.** 1986; 164: 104-112. *Apud:* Symons AL, Polak B, Powell RN, Seymour GJ. Interleukin-1 (IL-1) bioactivity and inhibition of IL-1 bioactivity in supernatant fluid from cultured microphthalmic (mi) mice teeth of different ages. **J Oral Pathol.** 1995; 24: 365-373.

Thopan RT, Chiego DJ Jr, Gattone VH 2nd, Hilton DA, Klein Rm. The effect of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. ***Dev Biol.*** 1987; 124 (2): 532-543.

Thopan RT, Chiego DJ Jr, Smith AJ, Hilton DA, Gattone VH 2nd, Klein Rm.. Effects of epidermal growth factor on tooth differentiation and eruption. *In:* Davidovitch A, editor. ***The Biological mechanisms of tooth eruption and root resorption.*** Birmingham: EBSCO Media, 1988; 117-131.

Wise GE & Fan L. Immunolocalization of transforming growth factor beta in rat molars. ***J Oral Pathol Med.*** 1991; 20: 74-80.

Wise GE & Lin F. Regulation and localization of colony-stimulating factor-1 mRNA in cultured rat dental follicle cells. ***Archs Oral Biol.*** 1994; 39: 621-627.

Wise GE, Fan L. Regulation and localization of colony-stimulating factor-1 mRNA in cultured rat dental follicle cells. ***Archs Oral Biol.*** 1994; 7: 621-627.

Wise GE, Lin F, Fan W. Localization of epidermal growth factor and its receptor in mandibular molars of the rat prior to and during prefunctional tooth eruption. ***Dev Dyn.*** 1992; 195: 121-126.

Wise GE, Lin F, Zhao L. Immunolocalization of interleukin-1 $\alpha$  in rat mandibular molars and its enhancement after in vivo injection of epidermal growth factor. ***Cell Tissue Res.*** 1995a; 280: 21-26.

Wise GE, Lin F, Zhao L. Transcription and translation of CSF-1 in the dental follicle. ***J Dent Res.*** 1995; 74(9): 1551-1557.



Wise GE, Lin F. The molecular biology of initiation of tooth eruption. **J Dent Res.** 1995; 74: 303-306.

Wise GE, Marks SCJr, Cahill Dr. Ultrastructural features of the dental follicle associated with formation of the tooth eruption pathway in the dog. **J Oral Pathol.** 1985; 14: 15-26.

Wise GE, Zhao L, Grier IV RL. Localization and expression of CSF-1 receptor in rat dental follicle cells. **J Dent Res.** 1997; 76(6): 1244-1249.

Wise GE, Zhao L. Immunostaining and transcriptional enhancement of interleukin-1 receptor type I in the rat dental follicle. **Archs Oral Biol.** 1997; 5: 339-344.

Wise GE. *In vivo* effect of interleukin-1 $\alpha$  on colony-stimulating factor-1 gene expression in the dental follicle of the rat molar. **Archs Oral Biol.** 1998; 43: 163-165.

Wise GE; Huang H; Que B. Gene expression of potential tooth eruption molecules in the dental follicle of the mouse. **Eur J Oral Sci.** 1999; 107: 482-486.

Wiseman DM, Polverine PJ, Kamp DW, Leibovich SJ. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) is chemotatic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity. **Biochem Biophys Res Com.** 1988; 157: 793-800. *Apud:* Wise GE & Fan L. Immunolocalization of transforming growth factor beta in rat molars. **J Oral Pathol Med.** 1991; 20: 74-80.

Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, *et al.* TGF $\beta$  signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. **Cell.** 1992; 71:

1003-1014. *Apud* : Toyono T; Nakashima M; Kuhara S; Akamine A. Expression of TGF- $\beta$  superfamily receptors in dental pulp. ***J Dent. Res.*** 1997; 76 (9): 1555-1560.

Xu LX, Kukita T, Nakano Y, Yu H, Hotokebuchi T, Kuratani T, *et al.* osteoclasts in normal and adjuvant arthritis bone tissues express the mRNA for both type I and II interleukin-1 receptors. ***Lab Invest.*** 1996; 75: 677-687. *Apud*: Xu LX, Kukita T, Yu H, Nakano Y, Koga T. Expression of the mRNA for types I and II interleukin-1 receptors in dental tissues of mice during tooth development. ***Calcif Tissue Int.*** 1998; 63: 351-356.

Xu LX, Kukita T, Yu H, Nakano Y, Koga T. Expression of the mRNA for types I and II interleukin-1 receptors in dental tissues of mice during tooth development. ***Calcif Tissue Int.*** 1998; 63: 351-356.

Yingling JM, Wang XF, Bassing CH. Signaling by the transforming growth factor- $\beta$  receptors. ***Biochim Biophys Acta.*** 1995; 1242: 115-136. *Apud* : Toyono T; Nakashima M; Kuhara S; Akamine A. Expression of TGF- $\beta$  superfamily receptors in dental pulp. ***J Dent. Res.*** 1997; 76 (9): 1555-1560.



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

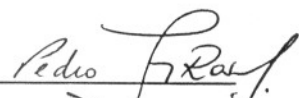
CERTIFICADO

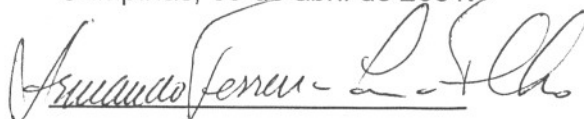
Certificamos que o Protocolo nº 244-1, sobre "Distribuição de EGF, EGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, IL12 e CSF1 no periodonto de incisivos inferiores de ratos em condições normais e alteradas" sob a responsabilidade de Silvana Parotto e Pedro Duarte Moraes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 05/04/2001. Este certificado expira em 04/04/2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 244-1, entitled "Distribution of EGF, EGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, IL12 and CSF1 in the periodontal tissues of the rat incisors under different postural conditions", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 05/04/2001. This certificate expires on 04/04/2002.

Campinas, 05 de abril de 2001.

  
Prof. Dra. Alba R. M. Souza Brito  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

  
Prof. Dr. Armando Ferreira Lima  
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP