

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

SIMONE CAIXETA DE ANDRADE

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA HOMEOPROTEÍNA BARX1 NA
MORFOGÊNESE DO DENTE MOLAR EM CAMUNDONGOS.**

Tese de Doutorado apresentada a
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da UNICAMP para
obtenção do Título de Doutor em
Biologia Buco-Dental, Área de
Histologia e Embriologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio
Roberto Peres Line
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo
Rocha Marques

Este exemplar corresponde à versão
final da Tese defendida pelo aluno, e
orientada pelo Prof. Dr. Sérgio
Roberto Peres Line

Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

An24i

Andrade, Simone Caixeta de, 1977-

Investigação do papel da homeoproteína BARX1 na morfogênese do dente molar em camundongos / Simone Caixeta de Andrade. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Sergio Roberto Peres Line.

Coorientador: Marcelo Rocha Marques.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Genes Homeobox. 2. Fatores de transcrição. 3. Histologia. 4. Embriologia. I. Line, Sergio Roberto Peres, 1963- II. Marques, Marcelo Rocha. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Investigation of the role of BARX1 homeoprotein in molar tooth morphogenesis in mice

Palavras-chave em Inglês:

Genes, Homeobox

Transcription factor

Histology

Embryology

Área de concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Sergio Roberto Peres Line [Orientador]

Jose Rosa Gomes

Naila Francis Paulo de Oliveira

Cristiane Ribeiro Salmon

Denise Carleto Andia

Data da defesa: 29-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 29 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata SIMONE CAIXETA DE ANDRADE aprovada.

Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

Prof. Dr. JOSE ROSA GOMES

Profa. Dra. NAILA FRANCIS PAULO DE OLIVEIRA

Profa. Dra. CRISTIANE RIBEIRO SALMON

Profa. Dra. DENISE CARLETO ANDIA

**Dedico essa tese aos meus anjos
da guarda brasileiros e londrinos.**

AGRADECIMENTOS

A Unicamp, Faculdade de Odontologia de Piracicaba e ao Departamento de Biologia Buco Dental pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas recebidas.

Ao Prof. Dr. Sérgio Line pela oportunidade.

Aos colegas do Laboratório de Histologia por todos os bons momentos, em especial as quintas-feiras.

Ao Prof. Dr. Paul Sharpe e a Prof^a Dra. Isabelle Miletich pelo aprendizado.

A Tencey e família pelo apoio emocional e amizade.

A Silvia Fontes por toda a ajuda nos momentos difíceis.

A Gláucia pelas aventuras de carro.

Ao Sr. Rocco Ansante e Sr^a Solange por todo o apoio.

Aos amigos do CIPED-Unicamp.

A Rose e Lana por tudo, tudo.

Aos meus pais, sem os quais eu nada seria.

Aos meus irmãos pelo amor e companheirismo.

A Clarinha e Altivo pela torcida.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para conclusão desse trabalho.

*“O que sabemos, saber
que o sabemos. Aquilo
que não sabemos, saber
que não o sabemos: eis o
verdadeiro saber.”*

Confúcio

RESUMO

A dentição não é somente o maior componente do complexo crânio facial dos mamíferos, mas um modelo útil de desenvolvimento, combinado em um sistema de um único órgão, onde ocorrem fenômenos de organização espacial, simetria, aquisição de formas complexas e citodiferenciação órgão-específica. Durante os primeiros estágios do desenvolvimento do dente ocorre uma série de interações entre o epitélio oral e mesênquima, por meio de diferentes moléculas sinalizadoras ao longo do futuro processo alveolar. *Bmp4* atua ativando *Msx1* na região de incisivos e molares e restringe a ação de *Barx1* apenas na região dos molares. A interação entre o sinal mesenquimal *Bmp4* e o sinal epitelial *Shh* faz parte dos primeiros eventos da formação do germe dentário no estágio botão. As fases seguintes são os estágios capuz e sino. Mutações nos genes *Msx1* e *Barx1* impedem o desenvolvimento do germe dentário além do estágio botão. Para o gene *Msx1* essa condição é permanente, enquanto para *Barx1* é temporal e o crescimento do germe dentário é retomado após o estágio E14.5 em camundongos. O objetivo desse trabalho é investigar a interação genética entre *Msx1* e *Barx1* no desenvolvimento do primeiro molar inferior na fase sino (E16.5) e qual a influência da ausência do gene *Msx1* na dimensão das estruturas vestigiais MS, R2 e do primeiro molar inferior nas fases botão (E13.5) e sino (E16.5). Esse estudo também se propôs a avaliar se genes *Barx2*, *Barhl1* e *Barhl2* estariam expressos em botões de molares inferiores (E13.5). Os resultados indicaram que na ausência completa de *Barx1*, um único alelo de *Msx1* não é suficiente para promover a evolução do botão dentário a capuz em camundongos E16.5 *Barx1*;*Msx1* e não houve expressão de *Bmp4* nesses camundongos. A expressão nula dos genes *Barx2*, *Barhl1* e *Barhl2* em botões de molares inferiores em camundongos *wild-type* E13.5 indica que genes da família Bar não possuem nenhum papel no desenvolvimento de molares inferiores. Ainda, dados alométricos de *Msx1*^{-/-} (E13.5 e E16.5) indicam que a mutação no gene *Msx1* e consequente ausência de expressão de *Smad1-5-8* e *Shh* não impede o crescimento no sentido proximal-distal. Conclui-se que existe interação entre *Barx1* e *Msx1*. *Barx1* é necessário para controlar os níveis de expressão de *Bmp4*. *Barx2* possivelmente desempenha um papel importante na morfogênese de pré-molares e incisivos inferiores. O atraso no desenvolvimento dos molares inferiores de camundongos *Msx1*^{-/-} é permanente ao estágio botão, contudo, os botões dentários destes camundongos continuam a exibir um crescimento no sentido proximal-distal no estágio E16.5.

Palavras chave: Genes Homeobox, Fatores de transcrição, Histologia, Embriologia.

ABSTRACT

The dentition is not only the largest component of the craniofacial complex of mammals, but a useful model of development, combined in a single organ system, where phenomena of spatial organization, symmetry, complex shape acquisition and organ-specific cytodifferentiation occur. During the early stages of tooth development, series interactions take place between oral epithelial and mesenchyme by different signalling molecules along the future alveolar process. *Bmp4* acts by activating *Msx1* in the region of incisors and molars and it restricts the action of *Barx1* only to the molars' region. The interaction between mesenchymal *Bmp4* signal and *Shh* epithelial signal is part of the first events of tooth germ formation at the bud stage. The next stages are cap and bell. Mutations in *Msx1* and *Barx1* genes inhibit the development of the tooth germ beyond the bud stage. For the *Msx1* gene, this condition is permanent, while for *Barx1* is temporal and the growth of tooth germ is retaken after stage E14.5 in mice. This study investigates the genetic interaction between *Msx1* and *Barx1* in the first lower molar development at the bell stage (E16.5), the effect of the absence of *Msx1* gene in the size of the vestigial structures MS, R2 and first lower molar bud (E13.5) and bell (E16.5). This study also aimed to assess whether *Barx2*, *Barhl1* and *Barhl2* genes were expressed in lower molars buds (E13.5). The results indicated that in the complete absence of *Barx1*, a single allele of *Msx1* is not sufficient to promote the development of tooth bud to cap in E16.5 *Barx1*;*Msx1* mice, and there was no expression of *Bmp4* in these mice. The null expression of *Barx2*, *Barhl1* and *Barhl2* genes in lower molar buds in E13.5 *wild-type* mice indicates that genes of the Bar family do not exert any role in the development of lower molars. Still, allometric data on *Msx1*^{-/-} (E13.5 and E16.5) indicates that *Msx1* gene mutation and consequently the absence of *Shh* and SMAD1-5-8 expression do not prevent growth towards proximal-distal. It is concluded that there is interaction between *Barx1* and *Msx1*. *Barx1* is necessary to control the expression levels of *Bmp4*. *Barx2* might play a role in the lower premolars and incisors morphogenesis. The delayed development of *Msx1*^{-/-} lower molars is permanent at the bud stage, however, the tooth buds of these mice continue to exhibit growth towards proximal-distal at E16.5 stage.

Keywords: Genes, Homeobox, Transcription factor, Histology, Embryology

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-/-	—	Homozigoto
+/-	—	Heterozigoto
+/+	—	<i>Wild-type</i>
°C	—	Grau Celsius
µm	—	Micrômetros
APC	—	Adenomatosis polyposis coli
Axin2	—	Axis inhibition protein 2
Barhl1	—	Barh-like 1 homeobox
Barhl2	—	Barh-like 2 homeobox
Barx1	—	Bar homeobox 1
Barx2	—	Bar homeobox 2
BCiP	—	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
<i>Bgl</i> II	—	<i>Bacillus globigii</i>
Bmp	—	Bone morphogenetic protein
BSA		Bovine Serum Albumin
C	—	Canino
cDNA	—	DNA complementar
Cre	—	Cre recombinase
Dlx	—	Distal-less homeobox
DNA	—	Ácido desoxirribonucleico
E		Dia Embrionário
<i>EcoRI</i>	—	<i>E. coli</i> RY13
Eda	—	Ectodysplasin-A
Fgf	—	Fibroblast growth factor
G418	—	Geneticin

Het	—	Heterozigoto
Homo	—	Homozigoto
Hox	—	Homeobox gene
HSV-tk	—	Herpes simplex virus thymidine kinase
I	—	Incisivo
I.S.H.	—	<i>In situ</i> hybridization
Kb	—	Kilobases
kDa	—	Kilodaltons
lacZ	—	Lac operon Z
Lef1	—	Lymphoid enhancer binding factor 1
Lhx6/7	—	LIM homeobox protein 6/7
loxP	—	Locus of Crossover
M	—	Molar (molaridade)
M	—	Mili
M1	—	Primeiro molar
M2	—	Segundo molar
M3	—	Terceiro molar
mg	—	Miligramas
mL	—	Mililitros
mm	—	Milímetros
MS	—	Mesial segment
Msx	—	Msh homeobox
Msx1	—	Msx1 homeobox, msh-like 1
NBT	—	Nitro blue tetrazolium
O-A	—	Oral-aboral
OTX	—	Orthodenticle homolog
P	—	Pré-molar
Pax	—	Paired box
Pax9	—	Paired box gene 9
pb	—	Pares de base

PCR	—	Polymerase chain reaction
P-D	—	Proximal-distal
PFA	—	Paraformaldeído
R2	—	Second rudiment
RGB	—	Red-green-blue
RNA	—	Ácido ribonucleico
RNA _t	—	RNA transportador
Runx2	—	Runt related transcription factor 2
<i>SalI</i>	—	<i>Streptomyces albus</i> G
Shh	—	Sonic hedgehog
Smad	—	MAD homolog
V-L	—	Vestíbulo-lingual
Wnt	—	Wingless-related
WT	—	<i>Wild-type</i>
<i>XhoI</i>	—	<i>Xanthomonas holcicola</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	EMBRIOLOGIA DA FACE	3
2.2	ODONTOGÊNESE	4
2.3	MODELOS ANIMAIS UTILIZADOS PARA O ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DENTAL	7
2.3.1	Produção de camundongos <i>knockout</i>	8
3	PROPOSIÇÃO	11
4	MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1	ANIMAIS	13
4.1.1	Msx1	13
4.1.2	Barx1	14
4.2	OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES	15
4.3	GENOTIPAGEM	15
4.4	PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO	18
4.5	COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA	20
4.6	PESAGEM DE EMBRIÕES	21
4.7	AVALIAÇÃO ALOMÉTRICA DE MS, R2 E M1.	22
4.8	IMUNOFLOURESCÊNCIA PARA AVALIAR A EXPRESSÃO DE PHOSPHO-SMAD 1-5-8	25
4.9	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> NÃO RADIOATIVA PARA AVALIAR A EXPRESSÃO DE <i>BMP4</i> , <i>BARX2</i> , <i>BARHL1</i> , <i>BARHL2</i> E <i>SHH</i> .	28
4.9.1	Sondas de RNA.	31
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS	35
5.1	GENOTIPAGEM	35

5.2	ALOMETRIA	37
5.2.1	Proximal – Distal (P-D)	40
5.2.2	Oral-Aboral (O-A)	42
5.2.3	Vestíbulo-Lingual (V-L)	44
5.2.4	Alometria dos embriões E16.5	46
5.3	IMUNOFLOURESCÊNCIA NA FASE BOTÃO	48
5.3.1	Expressão de p-Smad	48
5.3.2	Expressão de <i>Shh</i>	50
5.4	INTERAÇÃO ENTRE BARX1 E MSX1 NA FASE SINO	51
5.5	EXPRESSÃO DE OUTROS GENES DA FAMÍLIA BAR NA FASE BOTÃO	54
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE 1	71
	APÊNDICE 2	80

1 INTRODUÇÃO

A dentição não é somente o maior componente do complexo crânio facial dos mamíferos, mas um modelo útil de desenvolvimento, combinado em um sistema de um único órgão, onde ocorrem fenômenos de organização espacial, simetria, aquisição de formas complexas e citodiferenciação órgão-específica (Lumsden, 1988).

Durante os primeiros estágios do desenvolvimento do dente ocorre uma série de interações epitélio-mesênquima, entre as células que migraram da crista neural e epitélio oral, mediadas por diferentes moléculas sinalizadoras ao longo do futuro processo alveolar (Chai *et al*, 2000, Lumsden, 1988). A iniciação da formação do dente envolve a síntese e secreção, pelo epitélio oral, de fatores de crescimento difusíveis (Cobourne & Sharpe, 2003, Thesleff & Sharpe, 1997, Tucker & Sharpe, 2004), concomitantemente, com a expressão de fatores de transcrição no mesênquima subjacente (Bei, 2009, Tummers & Thesleff, 2009).

Nesse estágio ainda ocorrem interações recíprocas entre os dois tecidos, orquestrando o desenvolvimento do órgão dentário, que mesmo antes do início da mineralização já passa a apresentar os primeiros indícios de formação da coroa dental. O desenvolvimento do dente prossegue através das fases iniciação, botão, capuz, e sino (Cate & Nanci, 2003). Formam-se importantes centros de sinalização denominados nós do esmalte primários (fase capuz) (Thesleff & Jernvall, 1997) e secundários, os quais estão associados ao epitélio dental interno, durante o desenvolvimento das pontas das cúspides (fase sino) (Matalova *et al*, 2005, Thesleff *et al*, 2001).

Delinear os mecanismos pelos quais as células do epitélio oral adotam e mantém as relações moleculares que originam os dentes é crítico para entender o desenvolvimento de síndromes dentais e para desenhar estratégias para a regeneração ou reparo dos tecidos dentais (Liu *et al*, 2008).

Alterações genéticas que afetam os estágios iniciais do desenvolvimento dentário envolvem fatores de transcrição, moléculas de sinalização e seus receptores e têm como consequência a agenesia dental (*Msx1*, *Pax9*, *Axin2*, *Eda*) ou dentes supernumerários

(*Runx2*, *APC*) (Bayés *et al*, 1998, Kere *et al*, 1996, Lammi *et al*, 2004, Nieminen, 2009, Stockton *et al*, 2000, Vastardis *et al*, 1996, Wang *et al*, 2009).

Em humanos, o gene *Msx1* está localizado no cromossomo 4 (Gonzalez *et al*, 1998), e em camundongos (*Mus musculus*) no cromossomo 5 (Robert *et al*, 1994). Além do papel no desenvolvimento craniofacial, particularmente na odontogênese, *Msx1* tem sua expressão relacionada com a formação dos membros inferiores e superiores, além de atuar na inibição do crescimento tumoral (Bei & Maas, 1998, Jezewski *et al*, 2003).

Gould e Walter (2000) mapearam o gene *Barx1* no cromossomo 9 em humanos, e nos camundongos no cromossomo 13 (Tissier-Seta *et al*, 1995). *Barx1* possui uma forte expressão em áreas restritas do mesênquima da cabeça, pescoço e na parede do estômago em desenvolvimento. Também foi observada uma fraca expressão na região proximal de membros inferiores e superiores.

A ausência da expressão de genes relacionados à morfogênese do molar, como *Msx1* e *Barx1*, revela que não há evolução do germe dentário além da fase botão. Este foi o primeiro trabalho a investigar a existência de uma interação entre *Msx1* e *Barx1* na formação do molar inferior.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EMBRIOLOGIA DA FACE

A cabeça é a parte anatomicamente mais sofisticada do corpo e sua evolução foi fundamental para a origem dos vertebrados. Dentro dos modelos de organismos usados para o estudo do desenvolvimento humano, os roedores são os que mais precisamente refletem o desenvolvimento, especialmente da região craniofacial (Wilkie & Morriss-Kay, 2001).

Alterações evolutivas craniofaciais (Corbo *et al*, 1997) fazem paralelo à origem do crânio dos vertebrados (Wilkie & Morriss-Kay, 2001). Apesar de não existir uma homologia estrutural óbvia entre o cérebro dos cordados e invertebrados, evidências indicam que a mesma família de genes está envolvida em processos chave de organismos como *Drosophila melanogaster* e vertebrados (Hirth & Reichert, 1999). Wilkie e Morris-Kay (2001) questionam como um plano genético pré-existente foi modificado para atingir uma elaboração tão espetacular, como a encontrada no cérebro. Alguns autores observaram que genes chave são sujeitos a um único ou a vários ciclos de duplicação. O exemplo mais conhecido é o cluster codificador do homeobox (*Hox*), que está presente como uma única cópia no anfioxo, e em várias cópias nos vertebrados. Outras famílias de genes codificadores de homeodomínios, também estão presentes em várias cópias: paired (*Pax*), orthodenticle (*Otx*) e distal-less (*Dlx*) (Shimeld & Holland, 2000).

A maioria das estruturas faciais é formada a partir de células originadas da crista neural, um tecido que permanece independente e se dissemina após o fechamento do tubo neural, colonizando os arcos branquiais (Koentges & Matsuoka, 2002). Os arcos branquiais são proeminências visíveis na porção superior e frontal do embrião e são os predecessores de todos os elementos faciais. Dentro do primeiro arco branquial desenvolvem-se três proeminências que serão a futura maxila, mandíbula e processo frontonasal. Essas estruturas primitivas são preenchidas por células da crista neural de duas diferentes origens: romboencéfalo e mesencéfalo (Kontges & Lumsden, 1996). A mistura generalizada dessas células suporta a hipótese de que, a exposição a sinais instrutivos

ambientais orientam o estabelecimento de um eixo proximal-distal para a maxila e mandíbula formada a partir do primeiro arco branquial (Kontges & Lumsden, 1996).

2.2 ODONTOGÊNESE

O desenvolvimento da dentição dos mamíferos pode ser dividido em uma sequência de eventos, que começa com a determinação regional da dentição. A este evento segue-se a determinação de sub-regiões, como as regiões dos incisivos e molares. Finalmente a morfologia individual de cada dente é formada (Jernvall & Thesleff, 2000, Tucker & Sharpe, 2004).

A origem ou iniciação dos elementos dentários está fortemente vinculada a células da crista neural e epitélio. Lumsden (1988) utilizou células da crista neural de embriões de camundongos CD1 no oitavo dia embrionário (E8) e epitélio dos arcos mandibulares de embriões E9 e E10 implantados *in oculo* em camundongos adultos machos, e observou que, apenas a combinação dos dois: células da crista neural e epitélio originaram molares, que foram observados em desenvolvimento até a fase capuz. Os implantes de tecido epitelial ou células da crista neural originaram tecidos semelhantes ao epitelial queratinizado e cartilagem, respectivamente.

Esses experimentos demonstraram uma relação de dependência entre epitélio e mesênquima, cujas interações recíprocas são coordenadas por fatores de transcrição e moléculas de sinalização conservadas nas famílias: *Wnt*, *Fgf* (fibroblast growth factor), *Bmp* (bone morphogenetic protein) e Hedgehog, regulando a iniciação dos germes dentários (Jarvinen *et al*, 2006, Jernvall & Thesleff, 2000).

Os fatores de transcrição são por definição moléculas que interagem com o DNA modulando a expressão de um gene. Os genes homeobox, codificam fatores de transcrição e atuam como genes controladores do desenvolvimento e da evolução. Fatores de transcrição, como *Msx1*, *Lef1*, *Pax9*, *Barx1*, *Lhx6/7* e membros da família *Dlx* atuam *downstream* dos sinais epiteliais para regular a iniciação do dente e sua morfogênese (Cobourne & Sharpe, 2003, Thesleff & Sharpe, 1997).

Durante a fase de iniciação vários brotos epiteliais se formam na região do diastema entre incisivos e molares. A atrofia destes brotos epiteliais parece estar associada com a expressão diminuída do gene *Pax9* (Keranen *et al*, 1999). É interessante notar que, mutações nos genes *Pax9*, *Msx1* e *Activin beta A* em camundongos *knockout* também causam o bloqueio do crescimento do germe dental na fase de botão (Ferguson *et al*, 1998, Satokata & Maas, 1994). Da mesma forma que, mutações inativadoras do inibidor da sinalização do *Wnt*, o *Axin2*, causa uma diminuição no número de dentes, devido à falta de reposição dos mesmos (Jarvinen *et al*, 2006).

Em uma série de experimentos de expressão em camundongos, Tucker e colaboradores (1998b) demonstraram que *Bmp4* ativa a expressão de *Msx1*, levando ao desenvolvimento de incisivos e molares. Ainda segundo esses autores, *Bmp4* inibe a expressão de *Barx1*, limitando sua expressão proximalmente, na região de molares em E10. *Fgf8* estimula a expressão de *Barx1*. Quando a sinalização de *Bmp4* foi inibida durante os estágios iniciais de desenvolvimento através da aplicação exógena da proteína Noggin, a expressão ectópica de *Barx1* resultou na transformação de incisivos em molares (Tucker *et al*, 1998b).

Altos níveis de *Fgf8* ativam a expressão dos genes homeobox *Lhx6* e *7* na região oral. É interessante notar que nessa região a expressão de *Fgf8* e *Bmp4* é mutuamente antagônica (Stottmann *et al*, 2001). Uma vez que, o mesênquima com potencial odontogênico inativo entre em contato com o epitélio oral e seja ativado pelo *Fgf8*, seguirá uma cascata de eventos que irá resultar na formação final de um dente específico. Essa cascata de eventos inicia-se com a liberação, pelo mesênquima, do *Bmp4*, que induz a proliferação das células epiteliais. A proliferação do epitélio prossegue com a formação do botão epitelial, que, juntamente com o mesênquima condensado subjacente, formam o primeiro estágio do germe dental (Kettunen & Thesleff, 1998, Tucker & Sharpe, 2004).

Os fatores de crescimento são importantes moléculas sinalizadoras que podem afetar o desenvolvimento de outra célula na vizinhança, de forma parácrina, ou exercer um efeito autócrino (Scarel *et al*, 2003). O epitélio oral em desenvolvimento pode ser dividido

em dois domínios onde são expressos lateralmente os fatores de crescimento: *Fgf8* e *Fgf9*, sobrepondo o campo dos futuros molares, e *Bmp4* que é expresso distalmente, sobrepondo o campo dos futuros incisivos. O *Fgf8* (e *Fgf9* de uma forma menos atuante) regula positivamente a expressão de *Barx1* (Bar homeobox 1) e *Dlx2* (distal-less homeobox2), enquanto *Bmp4* regula positivamente a expressão de *Msx1* e *Msx2* (homeobox, msh-like 1 e 2), ao mesmo tempo, que regula negativamente *Barx1* (Bei *et al*, 2004, Ferguson *et al*, 2001, Haworth *et al*, 2007, Tucker *et al*, 1998b). Esses eventos resultam na restrição da expressão dos genes *Barx1* e *Dlx2* na região dos futuros molares e *Msx1* e *Msx2* na região dos futuros incisivos (Tucker *et al*, 1998a).

A importância desses genes homeobox pôde ser identificada em estudos com camundongos *knockout*. *Dlx1* e *2* são coexpressos proximalmente na região dos futuros molares e acredita-se que possuam uma função no desenvolvimento dos molares. O tipo do dente é determinado precocemente no desenvolvimento, pela expressão espacialmente restrita do gene homeobox no mesênquima. Camundongos com ausência funcional dos genes *Dlx1* e *Dlx2* possuem um padrão fenotípico de dentes, no qual há inibição do desenvolvimento dos molares na maxila, enquanto o desenvolvimento de todos os outros dentes é normal (Thomas *et al*, 1997). O fato de que o gene *Dlx* é expresso de formas diferentes na mandíbula e maxila indica que há uma diferença genética básica entre os molares na arcada superior e inferior (Zhao *et al*, 2000b).

Em humanos, agenesias dentárias envolvendo os genes *Msx1* e *Pax9* estão restritas a porção posterior da dentição. Apesar de mutações em *Msx1* envolverem pré-molares e raramente molares, as mutações em *Pax9* apresentam agenesias em padrão oposto a *Msx1* (Ogawa *et al*, 2006). Estudos em camundongos demonstraram que em animais mutantes homozigotos para *Msx1* e *Pax9* o desenvolvimento do dente fica restrito ao estágio botão (Peters *et al*, 1998, Satokata & Maas, 1994).

2.3 MODELOS ANIMAIS UTILIZADOS PARA O ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DENTAL

Os camundongos (*Mus musculus*) são os animais mais comumente utilizados em estudos de alterações genéticas. A dentição dos camundongos é composta em cada quadrante por um único incisivo, um diastema e três molares. Em cada quadrante, o incisivo é separado dos três molares por um diastema, onde incisivo, canino e pré-molar estariam presentes em outras espécies. Nos camundongos a morfogênese é iniciada no estágio E11, quando ocorre o espessamento dentário na área dos incisivos e molares (Viriot *et al*, 2000).

Apesar da ausência de pré-molares nos camundongos adultos, existe evidência morfológica para o desenvolvimento de estruturas em formato de botão, que se desenvolvem antes do desenvolvimento do primeiro molar (M1) superior e inferior, e anterior a ele (Prochazka *et al*, 2010). Essas estruturas têm sido interpretadas como botões de pré-molares rudimentares ou vestigiais (Peterkova *et al*, 2002, Viriot *et al*, 2002). Na mandíbula, esses botões chamados MS (*mesial segment*) e R2 (*second rudiment*) desenvolvem-se transitoriamente entre os dias embrionários (E) 12 e 13, respectivamente, e começam a regredir. Entre os estágios E13.5 e 14.5 ocorre apoptose em algumas porções de R2, que passa a integrar M1, que se torna uma estrutura diferenciada em E14.5 (fase capuz) (Peterkova *et al*, 2002, Viriot *et al*, 2000). Exceto por M2 (segundo molar) e M3 (terceiro molar), que são formados a partir da porção posterior final dos molares anteriores a eles, os outros botões e estruturas rudimentares são formados pela invaginação do epitélio que forma um botão a partir da lâmina dental. O mesênquima condensa-se ao redor dos botões de molares e mais tarde forma a papila dental. Cada molar exerce um efeito inibitório sobre o sucessor, e cada estrutura posicionada anteriormente a nova estrutura formada terá porções distais integradas morfológicamente ao seu sucessor, como ocorre entre M1 e M2 e possivelmente em estruturas como MS e R2 (Prochazka *et al*, 2010)

2.3.1 Produção de camundongos *knockout*

A tecnologia denominada *gene knockout* ou *gene targeting* é o resultado da combinação de duas técnicas: cultura de células-tronco embrionárias (ES) e introdução de mutações nas células, através de recombinação homóloga. O processo de recombinação homóloga foi demonstrado pela primeira vez em bactérias (LEDERBERG, 1955). Alguns pesquisadores (Smithies *et al*, 1985, Thomas & Capecchi, 1986) passaram a utilizar a recombinação homóloga, com auxílio de vetores (Evans & Kaufman, 1981), para introduzir sequências exógenas de DNA em células-tronco de camundongos (Evans & Kaufman, 1981, Robertson *et al*, 1986).

Sequências de DNA podem sofrer alterações, permitindo alguns rearranjos provocados por recombinação homóloga. Este processo é extremamente importante para a evolução das espécies, favorece a troca de material genético entre cromossomos recentemente duplicados durante a meiose e ainda assegura que cada gameta possua informação genética materna e paterna. A recombinação de DNA envolve a troca de material genético, tanto entre múltiplos cromossomos, como entre diferentes regiões do mesmo cromossomo. Durante esse processo, duas moléculas de DNA dupla-fita, que possuem regiões com sequências muito semelhantes (homólogas), alinham-se através da complementaridade das bases nitrogenadas. As moléculas de DNA podem, então, realizar o *crossover*: as duas fitas de cada hélice são clivadas, e as extremidades são religadas às extremidades da molécula de DNA oposta, restaurando duas duplas hélices intactas, cada uma formada por partes de duas moléculas de DNA diferentes (Alberts *et al*, 2006, Clancy, 2008)

A recombinação homóloga entre sequências de DNA nativas e clonadas permite a transferência de qualquer modificação no gene clonado para o genoma da célula hospedeira. Um vetor contendo a mutação desejada é introduzido em células-tronco embrionárias por eletroporação ou microinjeção. Na maioria das células o vetor é incorporado aleatoriamente ao genoma das ES, contudo em algumas células o vetor transfere a mutação para o genoma por recombinação homóloga. A confirmação da

incorporação da mutação ao genoma da célula pode ser realizada por PCR. As células são então injetadas na cavidade do blastocisto (blastocelo) de um embrião pré-implantado e o blastocisto é transferido cirurgicamente para o útero de outro camundongo (Capecchi, 1989).

Em experimentos convencionais, o vetor contém a sequência de DNA homóloga ao gene alvo, um gene para seleção por antibióticos (como neomicina - neo) e um gene timidina quinase do vírus herpes simples (HSV-tk), adjacente à região de homologia. O vetor é desenhado de tal forma que a recombinação homóloga não resulte na transferência do gene HSV-tk, o qual é perdido durante o *crossover*. Somente as células onde a recombinação é aleatória mantêm esse marcador. Usando G418 para selecionar células com o gene neo e aciclovir contra células com o gene HSV-tk, é possível selecionar células com eventos positivos de recombinação homóloga (Capecchi, 1989).

Para algumas mutações, há uma enorme letalidade após o nascimento. Faz-se necessária uma técnica que possa ser ativada em outros períodos de desenvolvimento. A técnica utilizada nesses casos é o sistema Cre/loxP para geração de *knockouts* condicionados. A proteína recombinase Cre (*Causes recombination*) do bacteriófago P1 é uma recombinase com 38 kDa, capaz de catalisar sem o auxílio de proteínas adicionais ou cofatores, a recombinação entre dois sítios loxP (*locus of crossover of P1*), cada um destes possui 34pb, consistindo de duas sequências palindrômicas com 13pb, separadas por um separador direcional de 8pb (Liu *et al*, 2000, Missirlis *et al*, 2006, Sauer & Henderson, 1988) (Figura 1).

<i>loxP</i> site	Left inverted repeat sequence	Spacer (5'→3')	Right inverted repeat sequence
<i>Wild-type</i>	ATAACTTCGTATA	ATGTATGC	TATACGAAGTTAT

Figura 1. Sequência dos sítios *loxP* e separador direcional. Fonte: Adaptado de Missirlis *et al*, 2006.

Sítios Cre-*loxP* favorecem trocas intra ou intermoleculares. Dependendo da localização e da orientação desses sítios, eles podem inverter, inserir, remover ou trocar os fragmentos de DNA em eucariotos e procariotos. A orientação do inserto do DNA pós-recombinação é dependente da orientação dos sítios antes da reação. Sítios que estão na mesma orientação do DNA e entre as sequências *loxP* serão removidos. Se a orientação for contrária, o DNA será invertido (Missirlis *et al*, 2006, Sauer & Henderson, 1989, Sauer & Henderson, 1988).

O sistema pode ainda utilizar linhagens Cre indutíveis: através da fusão do Cre com o domínio de ligação do receptor de estrogênio mutato (Feil *et al*, 1996), ativação do Cre por tamoxifen (Weber *et al*, 2003) e ativação da transcrição condicionada à tetraciclina (Belteki *et al*, 2005). Durante o cruzamento de linhagens Cre com Rosa26R, a expressão do *lacZ* é ativada pela remoção de um códon de parada (*stop codon*) e do gene neomicina (Soriano, 1999).

Há vários modelos animais para o estudo de agenesias, em particular, animais homozigotos para mutações nos genes *Msx1* e *Barx1* apresentam alterações no desenvolvimento dos germes dos molares.

3 PROPOSIÇÃO

Investigar a interação genética entre *Msx1* e *Barx1* na formação do primeiro molar inferior na fase sino (E16.5) e qual a influência da ausência do gene *Msx1* na dimensão das estruturas vestigiais MS, R2 e do primeiro molar inferior nas fases botão (E13.5) e sino. Propôs-se também avaliar se os genes *Barx2*, *Barhl1* e *Barhl2* estariam expressos em botões de molares inferiores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos *knockout Barx1* e *Msx1* provenientes de cruzamentos seletivos e segregantes F₂ foram gerados e mantidos no *Biological Services Unit* da *King's College London*, de acordo com regulamentações estabelecidas pela *UK Home Office*, sob o número de referência 70/6870.

4.1.1 Msx1

O camundongo mutante *Msx1* (Houzelstein *et al*, 1997a) foi produzido por recombinação homóloga. O plasmídeo *nlacZ* foi introduzido no sítio *Bgl*II, do segundo exon do gene *Msx1* de camundongo, de tal forma que interrompesse a terceira hélice do homeodomínio deste gene. O gene da neomicina (*neo*), sob o controle do promotor timidina quinase, foi introduzido logo após o gene *nlacZ* para que fosse obtida uma seleção positiva das células-tronco embrionárias (Figura 2).

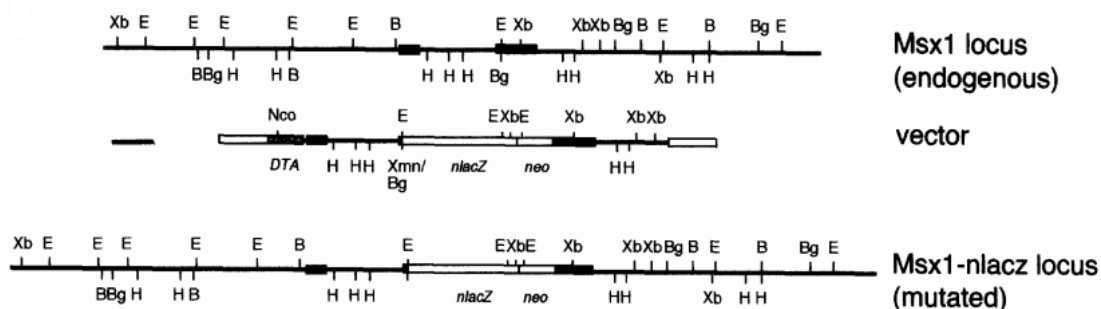


Figura 2. Construção do locus *Msx1-nlacZ*. *Xba*I (Xb), *Hind*III (H), *Bgl*II (Bg), *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), neomicina (*neo*) e Diphtheria toxin A gene (DTA). Fonte: Adaptado de Houzelstein *et al*, 1997.

4.1.2 Barx1

A linhagem de camundongos *knockout Barx1* foi desenvolvida pelo departamento *Craniofacial Development & Orthodontics*, na instituição *King's College London* (Miletich *et al*, 2011). Foi utilizado o sistema *CreloxP* para possibilitar a remoção do exon 3. As células positivas para a recombinação homóloga foram selecionadas por neomicina (Figura 3).

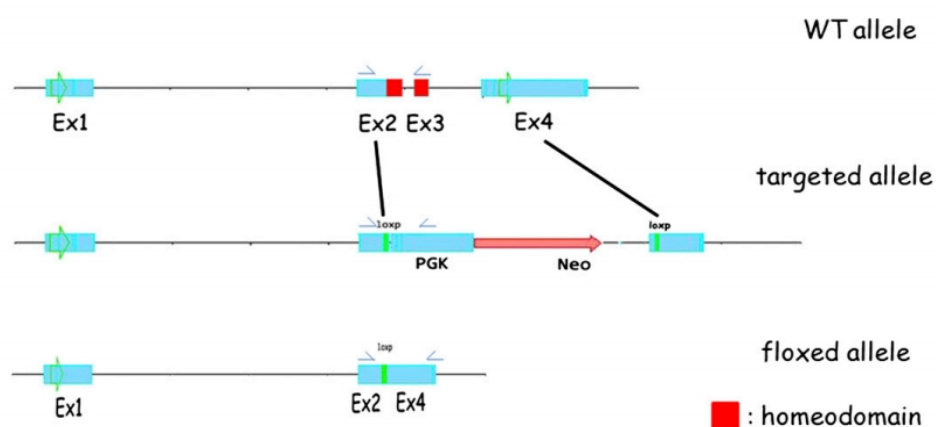


Figura 3. Geração de camundongo mutante *Barx1* através do sistema *CreloxP*. Fonte: Adaptado de Miletich *et al*, 2011.

Os cruzamentos foram realizados entre animais *knockout* heterozigotos *Barx1*, *Msx1* e *Barx1;Msx1*. Ao meio-dia do dia em que os tampões vaginais foram detectados tanto nos animais *knockout*, quanto em *wild-type* (WT) foi considerado dia embrionário (E) 0.5.

4.2 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES

Camundongos com prenhez de 13.5 e 16.5 dias foram sacrificados por deslocamento cervical. As placentas contendo os embriões foram coletadas em tubos de polipropileno (50mL), contendo PBS1X resfriado e colocados no gelo. Os embriões foram removidos da placenta e decapitados. A cauda de todos os embriões foi coletada em microtubos para reação de genotipagem, com o objetivo de confirmar a presença de mutações nos genes *Barx1* e *Msx1* assim como, a ausência de alterações nesses mesmos genes para o embrião WT. Durante esse trabalho, foram coletados 37 embriões E13.5 (7 ninhadas) e 3 embriões E16.5 (uma ninhada).

4.3 GENOTIPAGEM

Às caudas coletadas foi adicionado 200µL de DirectPCR[®] Lysis Reagent Tail (Peqlab-31-101-T), contendo 0.9mg/mL Proteinase K (Sigma). A reação de lise foi incubada a 55°C por 16 horas e após esse período, inativada a 85°C por 45 minutos.

Para reação de PCR do gene *Barx1* (Tabela 1 e 2) foram utilizados, 1µL da reação de lise, com 0.5µM de primer senso, 0.25µM primer antisenso, 0.25µM primer Neo (Tabela 1), 0.2mM de dNTPs (Promega), 5X GoTaq Flexi (Promega), 2.5mM de MgCl₂ (Promega), 0.5µL DMSO (Sigma), 0.3125u Go Taq Polymerase (5u/µL - Promega). O primer Neo foi utilizado para confirmar a presença do gene neomicina, uma vez que sua presença indicaria sucesso no processo de geração do camundongo *knockout* para o gene *Barx1*.

Tabela 1. Sequência dos primers e tamanhos dos produtos de PCR para o gene *Barx1*.

Primer 1- Senso 5'-3'	CGCAGTGTTC AAGTTCCCACT
Primer 1- Antisenso 5'-3'	CTATTCTGGAAAGAGTAACGCACA
Primer Neo	GAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCC
<i>Wild-type</i>	358pb
Homozigoto	445pb
Heterozigoto	358pb e 445pb

A reação de PCR foi realizada no termociclador MJ Research PTC-200, segundo condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições de termocilcagem para reação de PCR para genotipagem do camundongo *knockout Barx1*.

95°C	5 minutos	
95°C	1 minuto	} 9 vezes
62°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
95°C	1 minuto	} 29 vezes
60°C	45 segundos	
72°C	45 segundos	
72°C	10 minutos	
4°C	∞	

Para a reação de PCR (Tabela 3 e 4) do gene *Msx1* foram utilizados, 1µL da reação de lise, 0.5µM primer senso, 0.5µM antisenso, 0.5µM primer *LacZ* (Tabela 3) e 2X KAPA HiFi Hot Start ReadyMix (Kapabiosystems).

Tabela 3. Sequência dos primers e tamanhos dos produtos para o gene *Msx1*.

Primer 1- Senso 5'-3'	TTCTCCAGCTCGCTCAGCCTCACC
Primer 2- Antisenso 5'-3'	TGCAGGACCGCCAAGAGGAAAAGAGAG GCC
Primer <i>LacZ</i>	GGCAAAGCGCCATTCGCCATTCAGGC
<i>Wild-type</i>	171pb
Homozigoto	244pb
Heterozigoto	171pb e 244pb

A reação de PCR foi realizada no termociclador MJ Research PTC-200 (Tabela 4).

Tabela 4. Condições de termocilcagem para reação de PCR do gene *Msx1*.

94°C	3 minutos	
80°C	5 minutos	} 40 vezes
94°C	1 minuto	
60°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minutos	
4°C	∞	

A eletroforese de todas as reações de PCR foi realizada em gel de agarose 2% (Sigma), contendo 0.5µg/mL de brometo de etídeo (Sigma).

4.4 PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO

Após a decapitação dos embriões E13.5 e E16.5, as cabeças foram imediatamente fixadas em solução de paraformaldeído 4% (Sigma), em PBS1X, durante 30 minutos. As cabeças dos embriões E16.5 foram posteriormente descalcificados em solução de 4.13% EDTA (Sigma), em temperatura ambiente e sob agitação constante durante 2 dias e lavadas em PBS1X. Após esse procedimento foram fixadas por 45 minutos em solução de paraformaldeído 4% (Sigma). As cabeças dos embriões E13.5 e E16.5 foram desidratados em banhos crescentes de álcool: 30% (1 hora), 50% (1 hora) e 70% (16 horas a -20°C). O restante do processamento até a fase de inclusão foi realizado de forma automatizada utilizando-se o equipamento Leica ASP300 Tissue Processing (Tabela 5).

Tabela 5. Processamento histotécnico.

Solução	Tempo
Álcool 90%	1 hora
Álcool 100%	4X - 1 hora
Xilol (Solmedia)	2X - 1 hora
Parafina (Solmedia)	3X - 1 hora
Xilol (Solmedia)	2X - 1 hora
Parafina (Solmedia)	3X - 1 hora

As cabeças foram posicionadas frontalmente e emblocadas em parafina. Deste material foram obtidos cortes histológicos seriados com 8µm de espessura, em micrótomo da marca Leica (modelo RM2245) e com navalhas próprias para cortes histológicos (Leica 819). Os cortes foram dispostos sobre gotas de água RNase *free*, sobre lâminas de vidro Super Frost Plus (75mm x 25mm – Thermo Scientific). Os cortes histológicos ímpares foram montados em lâminas “A” e os cortes pares em lâminas “B” (Figura 4). As lâminas “A” foram coradas por Hematoxilina-Eosina e as lâminas “B” utilizadas para experimentos de expressão gênica.

Genótipo Estágio embrionário Data da coleta 1A 8µm	1	3	5	7	9	11
	13	15	17	19	21	23
	25	27	29	31	33	35

Genótipo Estágio embrionário Data da coleta 1B 8µm	2	4	6	8	10	12
	14	16	18	20	22	24
	26	28	30	32	34	36

Figura 4. Esquema de montagem dos cortes histológicos. Cortes ímpares foram montados nas lâminas A (painel superior) e cortes pares nas lâminas B (painel inferior).

4.5 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

As lâminas histológicas da série “A” dos embriões genotipados foram coradas por Hematoxilina-Eosina e montadas com DPX (Solmedia), segundo protocolo apresentado na Tabela 6

Tabela 6. Coloração por Hematoxilina-Eosina.

Solução	Tempo
Histoclear (Solmedia)	2X - 10 minutos
Álcool 100%	2 minutos
Álcool 90%	2 minutos
Álcool 70%	2 minutos
Álcool 50%	2 minutos
Água destilada	2 minutos
Hematoxilina de Ehrlich (Solmedia)	10 minutos
Água corrente	10 minutos
Água destilada	10 segundos
Álcool acidificado (1% HCl em 95% Álcool)	15 segundos
Água corrente	10 minutos
Água destilada	10 segundos
0.5% Eosina (Thermo Scientific)	5 minutos
Água destilada	10 segundos
Água destilada	10 segundos
Álcool 70%	2 minutos
Álcool 90%	2 minutos

Álcool 100%	3X - 2 minutos
Secar a temperatura ambiente	20 minutos

4.6 PESAGEM DE EMBRIÕES

O processo de pesagem foi realizado antes da decapitação e coleta da cauda para genotipagem, apenas para os embriões dos camundongos *knockout Msx1* (E13.5 e E16.5), utilizados para o estudo alométrico. Os embriões foram posicionados em Parafilm® M (American National Can Company), secados com auxílio de seringa triplice e pesados em balança de precisão Mettler Toledo (PB153-S), sobre uma placa petri (Figura 5).

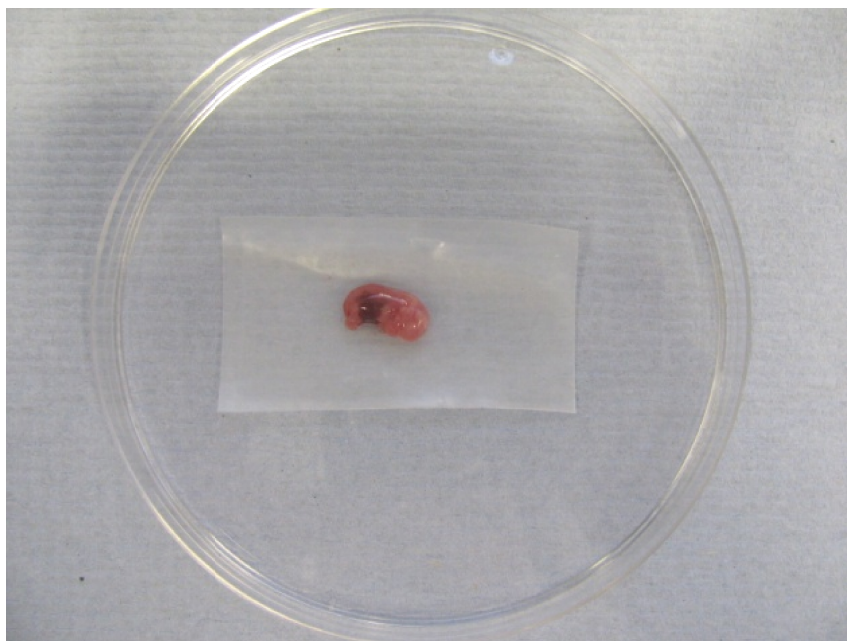


Figura 5. Embrião de camundongo (E13.5) posicionado sobre o Parafilm® e placa Petri, após secagem.

4.7 AVALIAÇÃO ALOMÉTRICA DE MS, R2 E M1.

Alometria, termo criado por Huxley e Teissier em 1936, designa as alterações de dimensões relativas das partes do corpo que estão correlacionadas com transformações das dimensões globais (Gayon, 2000).

Para o estudo alométrico foram utilizados cortes histológicos das lâminas “A” dos embriões E13.5 e E16.5 (Tabela 7) coradas com Hematoxilina-Eosina. Os cortes histológicos foram fotografados no microscópio Zeiss Axioskop II Plus, objetiva de 20x e as imagens capturadas com software Axiovision versão 4.1 (Zeiss). A escala do software ImageJ foi calibrada utilizando-se a imagem de uma lâmina micrométrica de 1mm (Figura 6), fotografada sob as mesmas condições do restante das imagens.

Tabela 7. Embriões utilizados para o estudo alométrico.

Dia embrionário (E)	Genótipo	Número de cabeças (n)
13.5	<i>Wild-type</i>	13
	Heterozigoto	14
	Homozigoto	9
16.5	<i>Wild-type</i>	1
	Heterozigoto	1
	Homozigoto	1

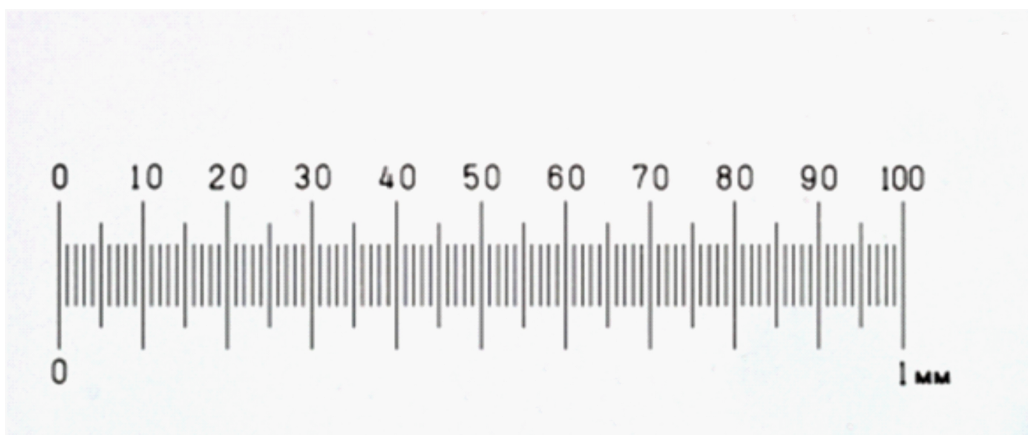


Figura 6. Lâmina micrométrica, 1mm. Objetiva de 10X.

De acordo com a calibragem realizada no ImageJ, 500 μ m equivalem a 960 pixels (1.92pixels/ μ m) (Figura 7).

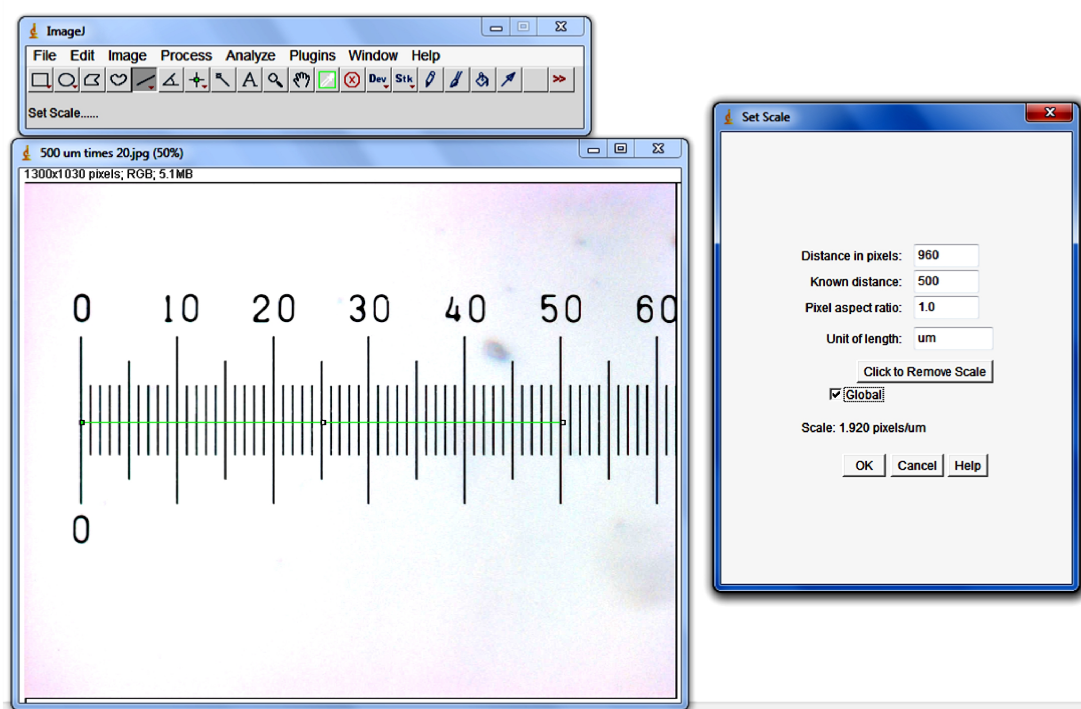


Figura 7. Calibragem da escala no ImageJ utilizando-se lâmina micrométrica (Objetiva de 20x). De acordo com o software, 500 μ m (linha verde) equivalem a 960 pixels.

Após a mensuração da região do espessamento epitelial (região de MS para E13.5 ou apenas início de M1 para E16.5) de vários cortes histológicos dos embriões, chegou-se a conclusão de que correspondia a valores maiores ou iguais a 45µm no sentido oral-aboral (O-A) (linha verde - Figura 8). Este valor foi utilizado para identificar o primeiro corte histológico a ser contabilizado para o cálculo de P-D. Da mesma forma, foram mensurados vários cortes histológicos até o desaparecimento por completo do espessamento epitelial para a definição do último corte contado correspondente a M1 (E13.5 e E16.5). Padronizou-se como medida O-A para o último corte histológico contado, valor maior ou igual a 40µm. Os cortes histológicos iniciais e finais que seguiram essa regra foram utilizados para definir a medida proximal-distal (P-D) dos embriões E13.5, dos quais foram contados o número de cortes histológicos onde foram identificadas as estruturas MS, R2 e M1. A esse número multiplicou-se a espessura dos cortes (8µm) e a quantidade total de lâminas (n=2). Para o cálculo P-D dos embriões E16.5 foram utilizados somente cortes histológicos de M1.

A escolha dos maiores germes dentários (E13.5 e E16.5) foi feita através da mensuração das imagens de R2 (E13.5) e M1 (E16.5), no sentido vestibulo-lingual (V-L) (linha amarela - Figura 8). Os germes dentários que apresentaram maior medida vestibulo-lingual foram ainda medidos no sentido oral-aboral (O-A). Os resultados foram categorizados de acordo com o peso dos embriões.

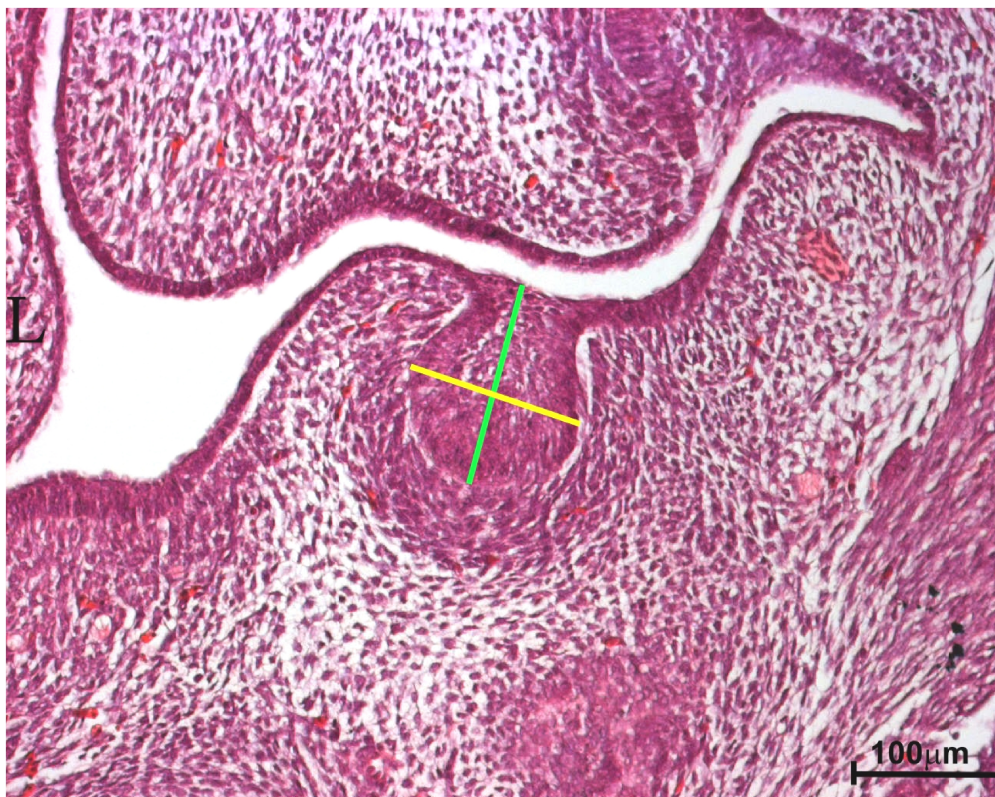


Figura 8. Mensurações do maior botão dentário. Linha verde - sentido oral-aboral. Linha amarela – sentido vestibulo-lingual. L – língua. Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva de 20x.

4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA AVALIAR A EXPRESSÃO DE PHOSPHO-SMAD 1-5-8

Lâminas histológicas dos embriões *Msx1* E13.5, série “B”, contendo germes dentários foram selecionadas para reações de imunohistoquímica. Os cortes foram diafanizados em dois banhos de HistoClear (Solmedia), com duração de 15 minutos cada. A seguir foram reidratados, em cadeia decrescente de concentração de álcool: 100% (5 minutos), 95% (2 minutos), 90%, 80%, 60% (5 minutos cada) e por fim e 30% (5 minutos). Para bloquear a presença de peroxidase endógena foi utilizada solução de 3% Peróxido de Hidrogênio (BDH) e 10% Metanol (BDH). Os cortes foram lavados por 5 minutos em 0.2%

TritonX-100 (BDH). Após a lavagem, as lâminas receberam tratamento para recuperação antigênica. Para tal finalidade, foram imersas em solução de 10mM Tris Base (Sigma) - pH 9.0, 1mM EDTA (Sigma), 0.05% Tween®-20. (Sigma). O recipiente foi colocado no forno microondas em potência máxima durante 5 minutos, por cinco vezes e deixado por um período de 20 minutos a temperatura ambiente, para o resfriamento da solução. Locais não específicos de ligação foram bloqueados com a utilização de 10% BSA (Sigma) e 10% Soro Fetal Bovino (Life Technologies).

Os cortes foram incubados em anticorpo primário policlonal phospho-Smad 1-5-8 (1:100 – Cell Signalling), em câmara umidificada durante 16 horas, seguido de lavagens em 0.2% TritonX-100 (BDH) e incubação em anticorpo secundário biotilado anti-rabbit (1:100 – Vector Laboratories) durante uma hora, à temperatura ambiente.

Sequencialmente foram realizadas novas lavagens em 0.2% TritonX-100 (BDH). Utilizou-se TSA™ Fluorescence Systems (Perkin Elmer), conjugado a HRP (Peroxidase do rábano silvestre), que permitiu amplificar o sinal da fluorescência.

As lâminas foram montadas com Vectashield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories) e as imagens obtidas em microscópio Zeiss Axioskop II Plus, com objetiva de 20X, com auxílio do software Axio Vision 4.1, mantendo-se o mesmo tempo de exposição para as imagens. A análise da fluorescência foi realizada com o programa Image J.

Assim sendo, para o cálculo da intensidade de fluorescência, as imagens foram separadas em padrão RGB (R-vermelho, G-verde e B-azul), com auxílio do software ImageJ. Utilizou-se a imagem do canal verde, convertida em escala de tons de cinza de 8 bits, a qual foi delimitada e mensurada (Figura 9).

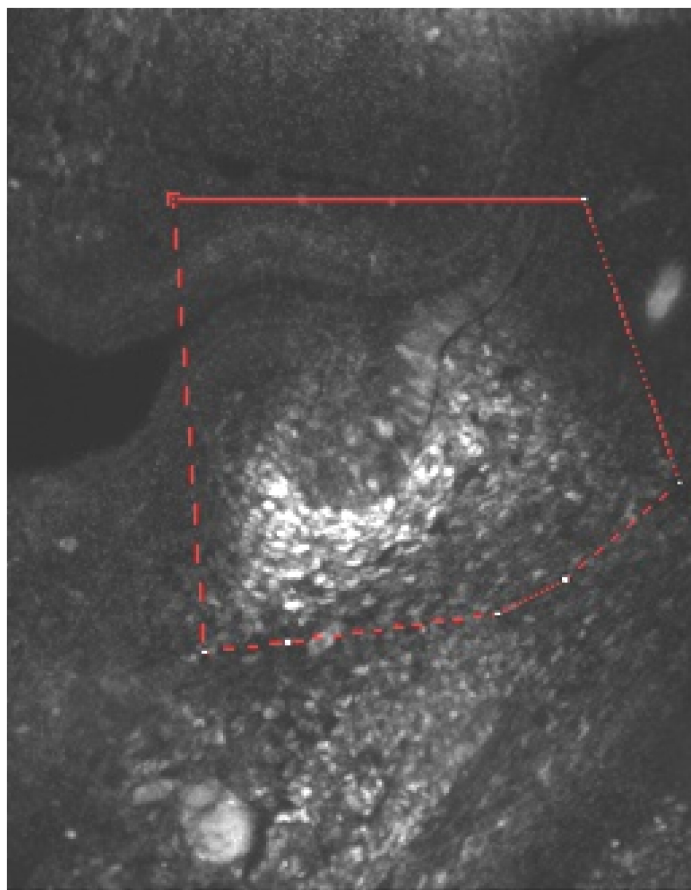


Figura 9. Botão dentário *Msx1* heterozigoto E13.5. Imagem do canal verde RGB, convertida em escala de cinza 8 bits. A área delimitada foi mensurada. Imagem obtida da tela do canal verde (cinza 8 bits) do software ImageJ.

Da mesma forma, também foram mensuradas regiões com a cor preta, correspondentes ao background das imagens. A intensidade total de fluorescência foi obtida segundo a equação:

Intensidade Total de Fluorescência = Intensidade de fluorescência – (Área x Média do Background)

Para o cálculo da Intensidade Total Corrigida de Fluorescência, ao valor obtido para *wild-type* e heterozigoto foi subtraído o valor igualmente corrigido da fluorescência de homozigoto.

4.9 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* NÃO RADIOATIVA PARA AVALIAR A EXPRESSÃO DE *BMP4*, *BARX2*, *BARHL1*, *BARHL2* E *SHH*.

Selecionou-se lâminas da série “B” de embriões E13.5, para avaliar a expressão de genes da família Bar e *Shh*, e E16.5, para avaliar a expressão de *Bmp4*, as quais foram reidratadas (Tabela 8), refixadas em 4%PFA (Sigma) e lavadas por 5 minutos em PBS1X.

Tabela 8. Reidratação dos cortes histológicos.

Solução	Tempo
Xilol (Solmedia)	3X - 3 minutos
Álcool 100%	2X - 2 minutos
Álcool 95%	2X - 2 minutos
Álcool 70%	2X - 2 minutos
Água RNase Free	2X - 10 segundos

A recuperação antigênica foi realizada com 4µg/mL Proteinase K (Sigma) durante 8 minutos a temperatura ambiente. Após esse período foram lavadas em PBS1X, durante 5 minutos e fixadas novamente em 4% PFA por 5 minutos. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas em solução de acetilação (1.25% Trietanolamina - Sigma, 0.26% HCl - Sigma e 0.25% Ácido Acético Anidro - BDH), por 10 minutos a temperatura ambiente.

As lâminas foram pré-hibridizadas em solução (Tabela 9) a 65°C, durante 1 hora. Seguiu-se hibridização com sonda de RNA, desnaturada a 80°C, por 10 minutos, em Solução de Hibridização (1µg RNA:150µL), na mesma temperatura, por 16 horas.

Tabela 9. Solução de Hibridização

Reagente	Quantidade
Formamida (Merck)	50%
50% Dextran Sulfato (Millipore)	10%
50X Denhardts (Sigma)	2%
RNA _t de levedura (Life Technologies)	250µg/mL
5M NaCl (BDH)	0.3M
1M TrisHCl (pH 8)	20mM
0.5M EDTA (Sigma)	5mM
20% Sarcosil (Sigma)	5mM
1M NaPO ₄ (Sigma)	10mM

A Tabela 10 sumariza as lavagens realizadas no segundo dia da reação de hibridização.

Tabela 10. Segundo dia da reação de Hibridização *in situ*.

Solução	Tempo	Temperatura
5x SSC*	10 minutos	Ambiente
Solução I (0.5M NaCl, 10mM TrisHCl, pH 7.5 e 5mM EDTA)	3 X 10 minutos	37°C
0.02mg/mL RNaseA (Thermo Scientific) em Solução I	30 minutos	Ambiente
Solução I	15 minutos	37°C
Solução II (50% Formamida e 50% 5xSSC)	2 X 20 minutos	65°C
2xSSC	30 minutos	37°C
0.1xSSC	15 minutos	37°C
PBT (PBS1X, 0.1%Tween-20)	15 minutos	Ambiente

***20xSSC, pH 7 - (3M NaCl e 0.3M Citrato de Sódio)**

Os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados em solução contendo 10% Soro de Cabra (Life Technologies) em PBT, durante 1 hora em câmara umidificada. A

seguir foram incubadas em Anti-DIG (1:5000 - Roche) em solução de 1% soro de cabra em PBT, a 4°C durante 16 horas.

As lâminas foram lavadas a temperatura ambiente em PBT e NTMT (10mM NaCl, 100mM TrisHCl - pH 9.5, 50mM MgCl₂, 0.1%Tween-20).

Para o desenvolvimento da coloração, 10% Álcool polivinílico (Sigma) e 10mM NaCl foram aquecidos no forno microondas até completa dissolução. Após resfriamento dessa solução foi adicionado 100mM Tris HCl, pH 9.5, 5mM MgCl₂, 2.6µL/mL NBT (Roche) e 2µL/mL BCiP (Roche). As lâminas foram incubadas a 37°C até o desenvolvimento da cor. Subsequentemente, foram lavadas em PBS1X, fixadas em 4%PFA durante 1 minuto, lavadas novamente em PBS1X e montadas em Aquatex® (Merck).

4.9.1 Sondas de RNA.

Em camundongos *Msx1*^{-/-} não há expressão de *Bmp4* e por consequência não há ativação e manutenção dos níveis de expressão do gene *Shh*, resultando na falha da transição de botão para capuz do germe dentário e da formação dos nós do esmalte. A sonda de RNA para *Bmp4* foi utilizada para avaliar como a expressão desse gene foi afetada em embriões *Barx1*;*Msx1*. Para eliminar a hipótese de que algum gene da família Bar (*Barx2*, *Barhl1* e *Barhl2*) pudesse interagir com *Msx1*, verificou-se se haveria expressão desses genes na região dos botões dos molares inferiores no estágio E13.5 em embriões *wild-type*. O estágio botão foi escolhido, uma vez que *Msx1* é um gene fundamental para a transição botão-capuz e sua ausência faz com que os germes dentários permaneçam definitivamente no estágio botão. Portanto, se existisse algum tipo de interação entre *Msx1* e algum membro da família Bar sua primeira evidência seria em E13.5

A expressão do gene *Shh* foi avaliada em lâminas “B” dos embriões *Msx1 knockout* E13.5 utilizados para alometria, com o objetivo de correlacionar dados de expressão gênica aos achados alométricos.

Assim sendo, para a preparação das sondas antisense de RNA foram utilizados cDNAs clonados em vetores variados (Tabela 11).

Tabela 11. Sondas de RNA

Inserto	Vetor	Tamanho do inserto (Ref. Seq.)	Referência	Enzimas de restrição	RNA Polimerase
Bmp4	pSP72	1Kb (NM_007554.2)	(Jones <i>et al</i> , 1991)	<i>EcoRI</i>	SP6
Barhl1	pYX- Asc	2123pb (BC055731)	Image Clone	<i>SalI</i>	T3
Barhl2	pYX- Asc	2047pb (BC078444)	Image Clone	<i>SalI</i>	T3
Barx2	pBS- SK+	1274pb (L77900.1)	Depew	<i>XhoI</i>	T3
Shh	pBS- SK+	2.6Kb (NM009170.3)	(Echelard <i>et al</i> , 1993, Wallace & Raff, 1999)	<i>EcoRI</i>	T7

O plasmídeo contendo o inserto de DNA de interesse foi linearizado com enzimas de restrição. A reação foi purificada com o kit Qiaquick gel extraction (Qiagen) e ressuspensa em 30µL de Buffer EB (Qiagen). A sonda de RNA antisense foi obtida por transcrição *in vitro* de 1µg DNA linearizado, em reação com 2.5% RNA polimerase (Promega), 1u/µL RNAsin (Promega), 10mM DTT (Promega), 5X Transcription buffer

(Promega) e 5% de nucleotídeos ATP, CTP, GTP e UTP, marcada com digoxigenina (DIG RNA Labeling Mix 10X - Roche), para um volume final de 40µL. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora. A integridade da sonda de RNA foi observada por meio eletroforese em gel de agarose 0.8%, contendo 0.5µg/mL de brometo de etídeo (Sigma).

A sonda de RNA foi tratada com 2µL de RQ1 DNase I (Promega) durante 15 minutos a 37°C. A reação final purificada com SigmaSpin™ Post-Reaction Clean-Up Columns (Sigma). O RNA foi quantificado no fotômetro Eppendorf BioPhotometer.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar se houve diferença entre os as medidas P-D, V-L e O-A, entre os embriões *Msx1 knockout* E13.5, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. O teste de Dunn foi utilizado para comparações múltiplas entre os grupos (2 a 2). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 5.01 (San Diego Califórnia USA). Os asteriscos apresentados nos gráficos obedecem ao padrão apresentado pelo software (Tabela 12).

Tabela 12. Significado dos asteriscos apresentados pelo software GraphPad Prim™

p	Significado	Símbolo
< 0.001	Extremamente significativa	***
0.001 to 0.01	Muito significativa	**
0.01 to 0.05	Significante	*

5 RESULTADOS

5.1 GENOTIPAGEM

A genotipagem foi realizada para identificar os camundongos *wild-type*, heterozigotos e homozigotos para os genes *Barx1* e *Msx1* (E13.5 e E16.5).

A Figura 10 indica que a presença da mutação foi confirmada no camundongo *knockout Msx1^{-/-}* pela presença da banda de 244pb, a qual é 73pb maior que a banda do animal *wild-type*, devido à incorporação do fragmento *lacZ*, que indica que o gene *Msx1* foi mutado com sucesso.

A presença da mutação no gene *Barx1* foi confirmada pela presença da banda 445bp (Figura 11), indicando que o fragmento neo foi incorporado ao genoma do camundongo.

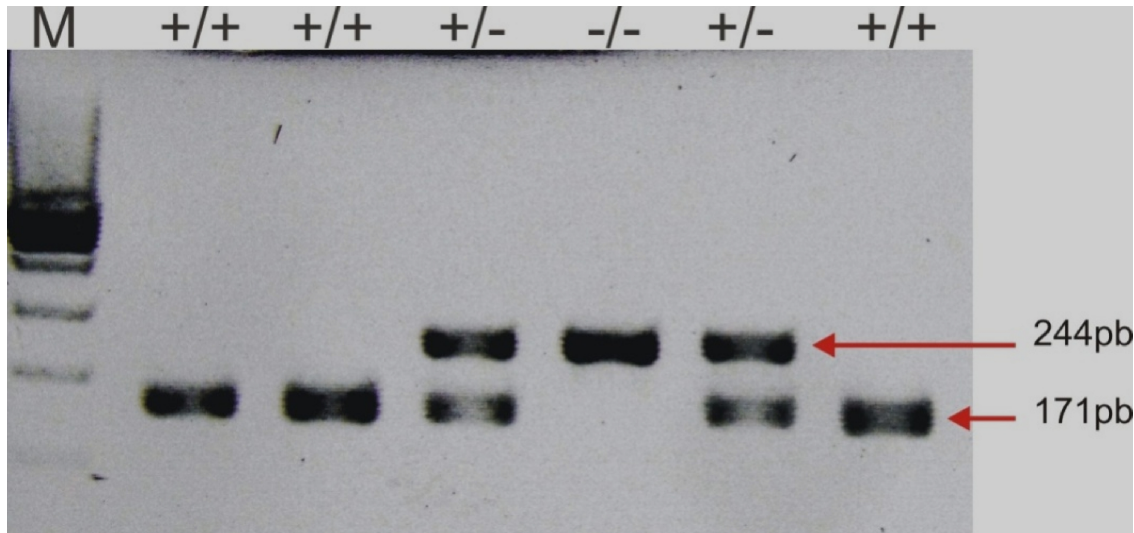


Figura 10. Produtos de PCR do gene *Msx1*. O animal *wild-type* apresenta uma banda de 171pb e Homozigoto uma banda de 244pb. M – marcador 100pb (Promega). *Wild-type* (+/+), Heterozigoto (+/-) e Homozigoto (-/-). Gel de agarose 2%, 0.5mg/mL brometo de etídeo.

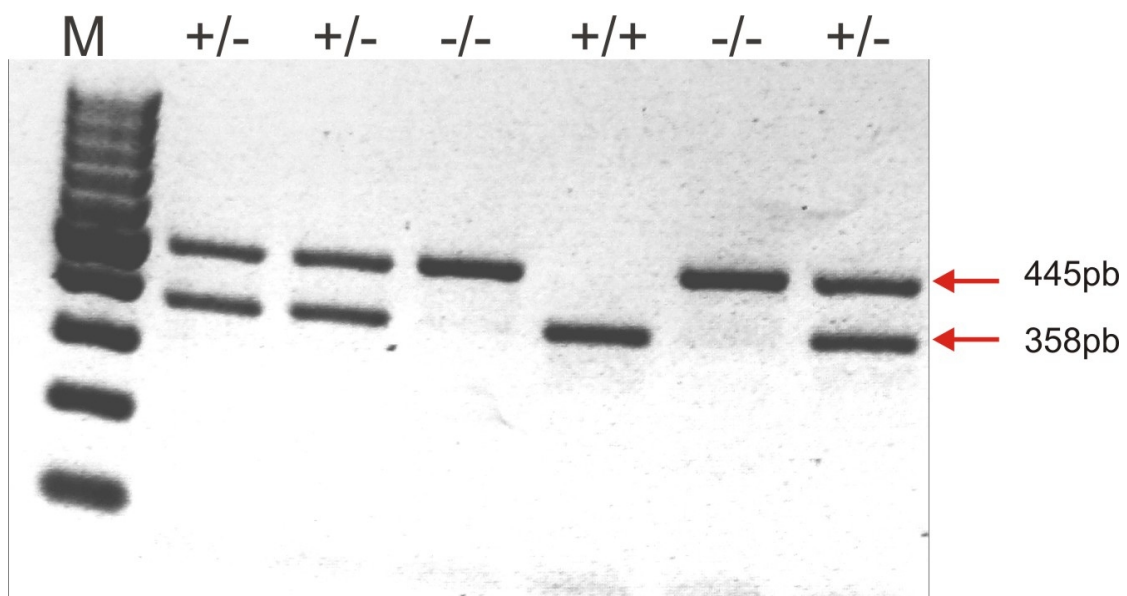


Figura 11. Produtos de PCR do gene *Barx1*. O animal *wild-type* apresenta uma banda de 358pb e Homozigoto uma banda de 445pb. M – marcador 100pb (Promega). *Wild-type* (+/+), Heterozigoto (+/-) e Homozigoto (-/-). Gel de agarose 2%, 0.5mg/mL brometo de etídeo

5.2 ALOMETRIA

Segundo referências pré-estabelecidas numericamente e visualmente ¹ para o início e fim do placódio vestibular, foram estabelecidos os pontos de referência para a medida proximal-distal (P-D): botão lingual de MS e botão lingual de R2.

Histologicamente, o início de MS (E13.5) é caracterizado pelo surgimento de um botão lingual (Figura 12-L). R2 inicia-se com o surgimento de um segundo botão lingual (Figura 13-A) e sua característica mais marcante é o surgimento de uma condensação epitelial na porção mais aboral do botão, visível em cortes corados por Hematoxilina-Eosina (Figura 13-D), na posição dos futuros centros sinalizadores, os quais também podem ser evidenciados por hibridização *in situ* para avaliar a expressão do gene *Shh*. Em cortes histológicos de embriões E16.5 não há a presença de MS e R2.

A Figura 12 e Figura 13 apresentam a evolução do botão dentário no sentido proximal-distal, através de cortes histológicos frontais, corados por Hematoxilina e Eosina (objetiva 20X) de camundongo *Msx1 wild-type* E13.5.

¹ Comunicação pessoal com Prof. Dra. Renata Peterkova. Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague, Czech Republic.

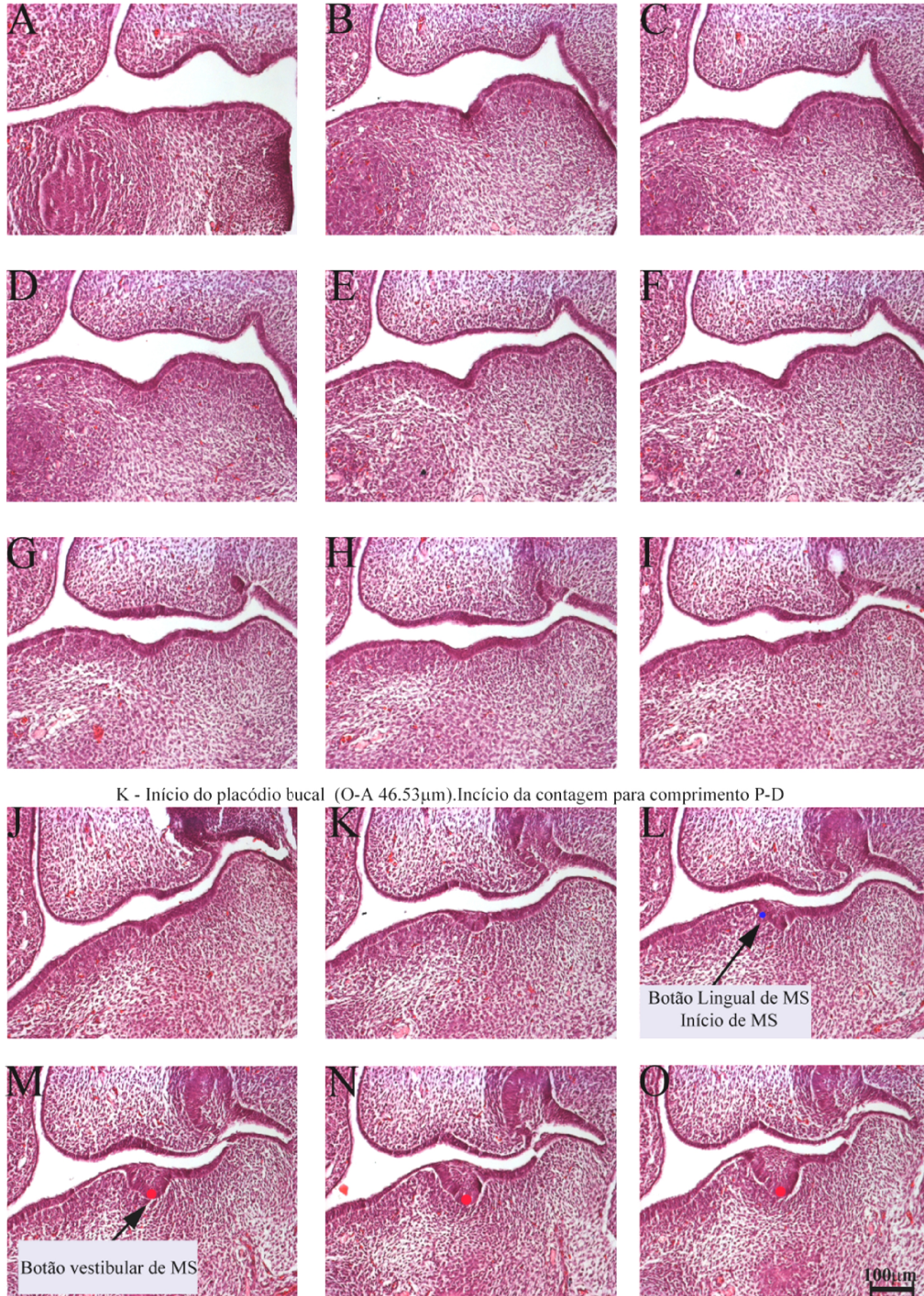


Figura 12. Cortes histológicos do botão dentário do embrião *knockout Msx1 wild-type* E13.5. A-J – cortes histológicos anteriores ao início da contagem. K – início da contagem para comprimento P-D (O-A 46.53µm). L-círculo azul indicando botão lingual em MS. M-O-círculo vermelho indicando botão vestibular em MS. Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva 20X.

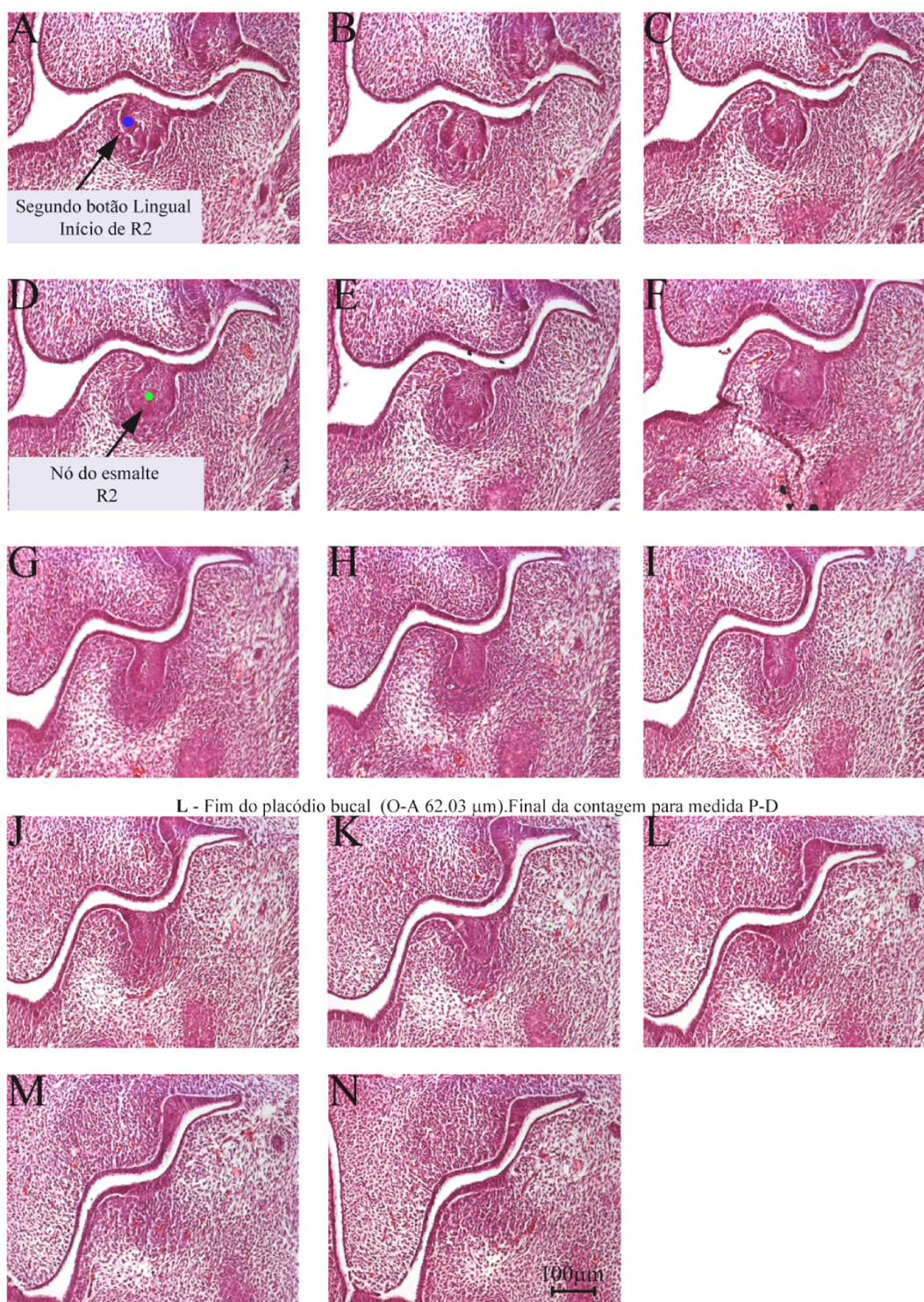


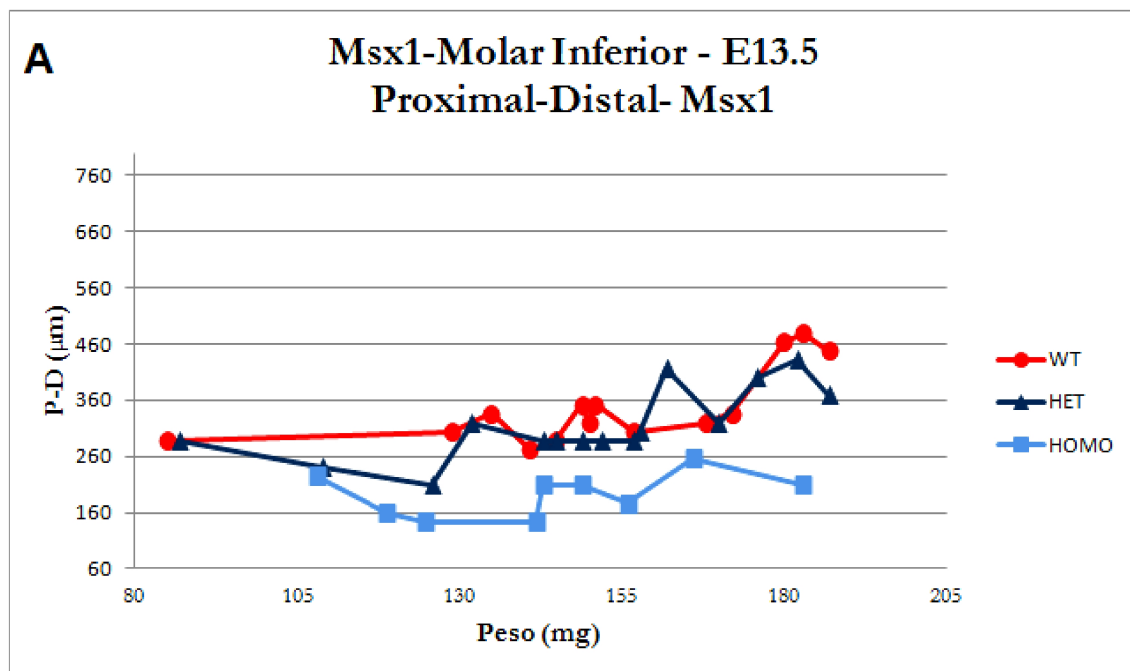
Figura 13. Continuação da série completa de cortes histológicos do botão dentário de animal E13.5. A—círculo azul indica segundo botão lingual e início de R2. D-botão verde indica nó do esmalte. L – fim da contagem para comprimento P-D (O-A 62.03μm). Coloração por Hematoxilina-Eosina. Objetiva 20X.

5.2.1 Proximal – Distal (P-D)

A distância P-D foi significativamente menor no embrião *knockout Msx1* homozigoto E13.5, quando comparada ao *wild-type* e heterozigoto, em embriões com peso semelhante (Tabela 13 e Figura 14A). Houve diferença estatisticamente significativa entre embriões *wild-type* e homozigoto e heterozigoto e homozigoto para P-D (Figura 14B), indicando que a ausência do gene *Msx1* altera o desenvolvimento craniofacial no sentido proximal-distal.

Tabela 13. Valores Proximais-Distais para camundongos *knockout Msx1* E13.5

Genótipo	Distância P-D e Peso	Média P-D	Desvio-Padrão
<i>Wild-type</i>	480µm-183mg	347.70µm	67.72µm
Heterozigoto	432µm-182mg	315.70µm	62.98µm
Homozigoto	208µm-183mg	192µm	38.37µm



B

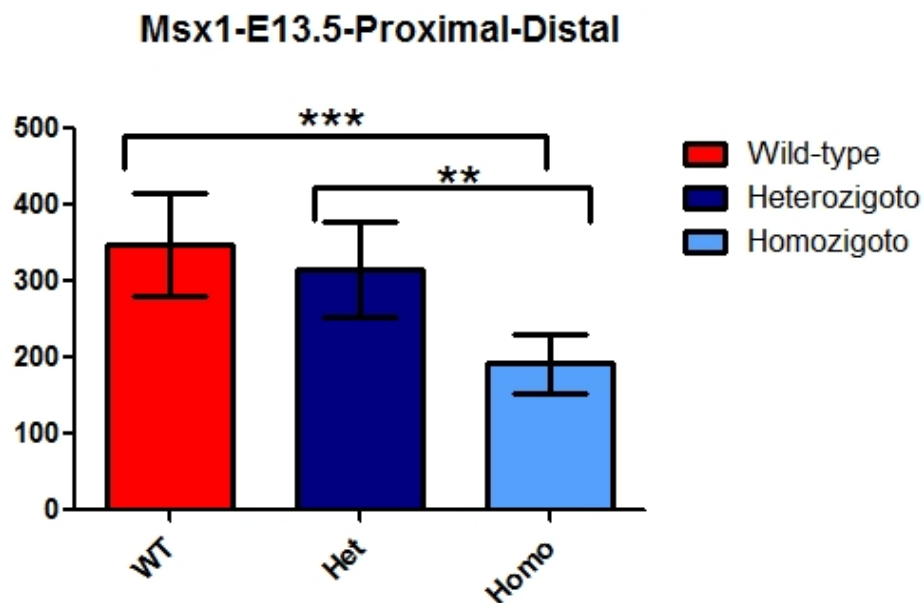


Figura 14. A. Peso x Dimensão P-D do botão dentário de camundongos *knockout Msx1* E13.5. B. Gráfico de Média e Desvio Padrão P-D de *Msx1* E13.5, *wild-type*, heterozigoto e homozigoto. Houve diferença estatisticamente significativa para *Wild-type* – Homozigoto (***) e Heterozigoto – Homozigoto (**). $p < 0.0001$.

5.2.2 Oral-Aboral (O-A)

Resultados da medida O-A demonstraram que não há variação entre embriões *wild-type* e heterozigotos. O botão dentário do embrião *knockout Msx1* homozigoto E13.5, apresentou menor medida O-A, tanto na média quanto comparado a embriões *wild-type* e heterozigotos peso semelhante (Tabela 14). Houve diferença estatisticamente significativa entre medidas O-A dos embriões homozigotos em comparação ao *wild-type* e heterozigoto, indicando que a mutação no gene *Msx1* afeta o crescimento do botão dentário no sentido oral-aboral (Figura 15).

Tabela 14. Valores Oral-Aboral para camundongos *knockout Msx1* E13.5

Genótipo	Medida O-A e Peso	Média P-D	Desvio-Padrão
<i>Wild-type</i>	169.79µm-183mg	183.3µm	68.15µm
Heterozigoto	169.28µm-182mg	176.3µm	52.93µm
Homozigoto	123.81µm-183mg	127.9µm	28.65µm

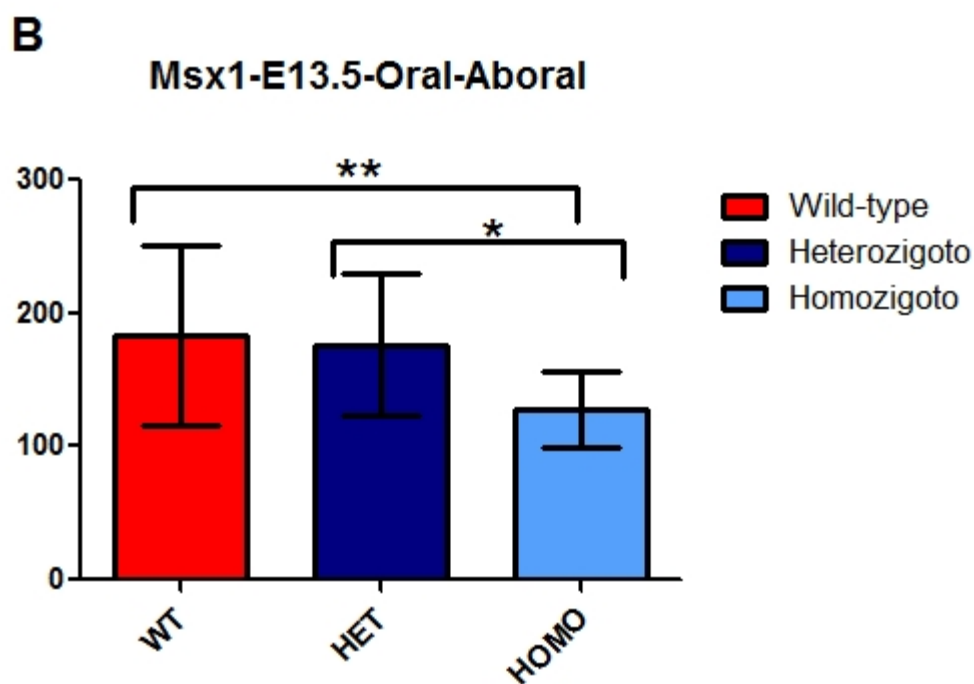
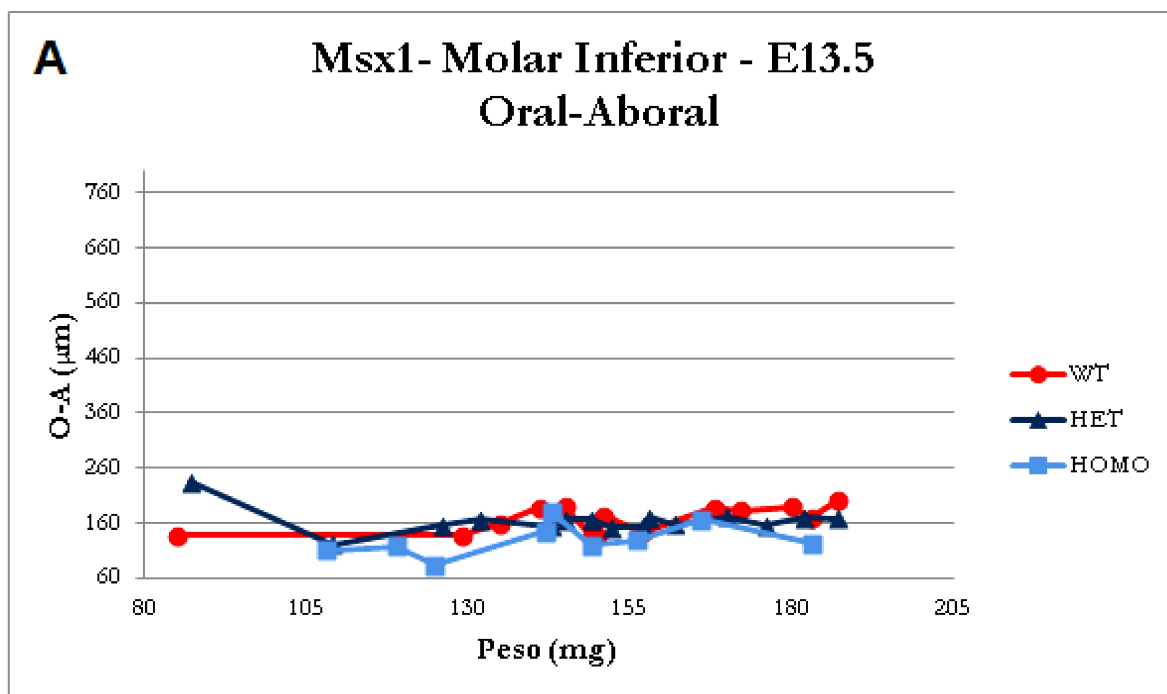


Figura 15. A. Peso x Medida O-A do botão dentário de camundongos *knockout Msx1* E13.5. B. Gráfico de Média e Desvio Padrão O-A de *Msx1* E13.5, *wild-type*, heterozigoto e homozigoto. Houve diferença estatisticamente significativa para *Wild-type* – Homozigoto (**) e Heterozigoto – Homozigoto (*). $p < 0.005$

5.2.3 Vestíbulo-Lingual (V-L)

Resultados da medida V-L do botão dentário de embriões *knockout Msx1* E13.5 demonstraram que houve uma pequena variação entre embriões homozigotos e heterozigotos, entre embriões de peso semelhante (Tabela 15). Assim como para a distância P-D e a medida O-A, o botão dentário do embrião *knockout Msx1* homozigoto E13.5 apresentou menor medida, tanto na média, quanto dos botões dentários, em comparação a embriões *wild-type* de peso semelhante (Figura 16Tabela 16).

Tabela 15. Valores Vestíbulo-Lingual para camundongos *knockout Msx1* E13.5

Genótipo	Medida V-L e Peso	Média V-L	Desvio-Padrão
<i>Wild-type</i>	120.48µm-183mg	115.80µm	8.67µm
Heterozigoto	102.91µm-182mg	113.50µm	12.67µm
Homozigoto	92.45µm-183mg	82.65µm	12.14µm

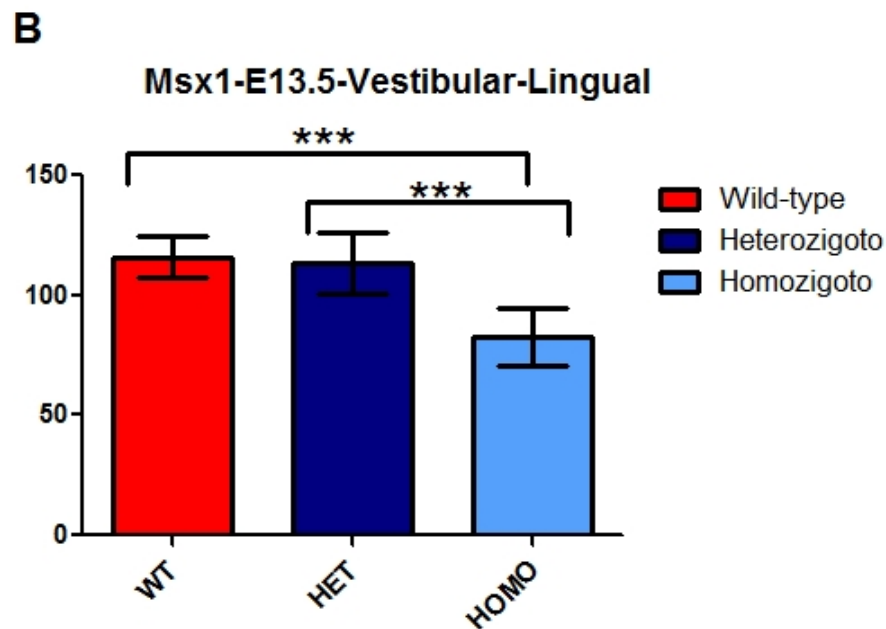
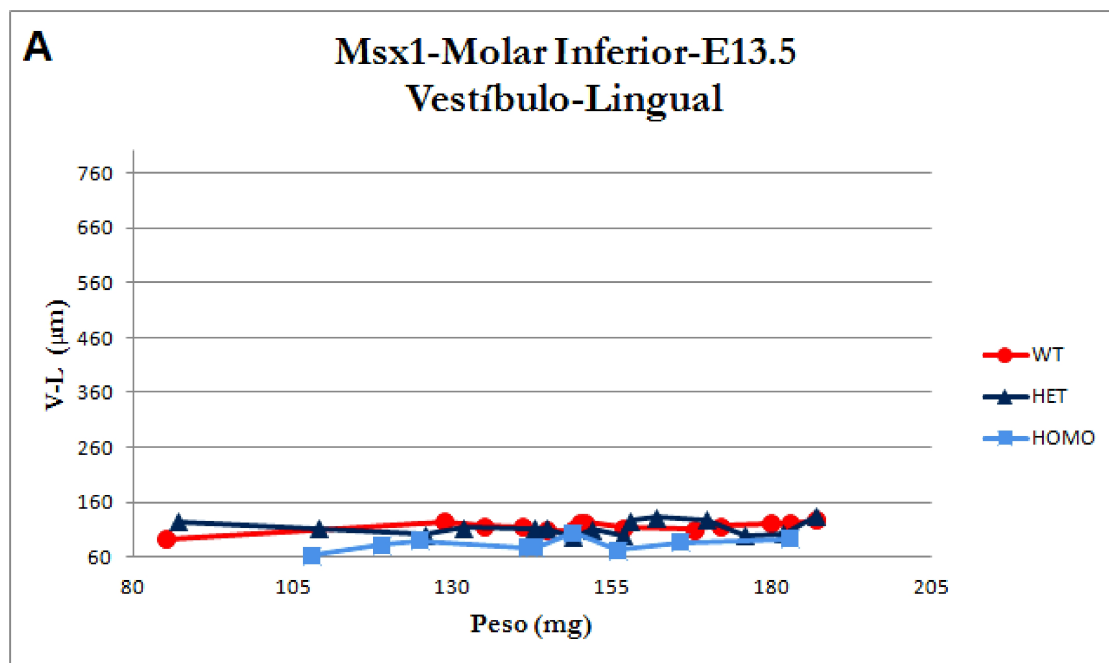


Figura 16. A. Peso x Medida V-L do botão dentário de camundongos *knockout Msx1* E13.5. B. Gráfico de Média e Desvio Padrão P-D de *Msx1* E13.5, *wild-type*, heterozigoto e homozigoto. Houve diferença estatisticamente significativa para *Wild-type* – Homozigoto (***) e Heterozigoto – Homozigoto (**). $p < 0.0001$.

5.2.4 Alometria dos embriões E16.5

Em comparação com os valores alométricos obtidos para *wild-type*, o embrião *knockout Msx1* homozigoto E16.5 apresenta menores valores para O-A e V-L (Tabela 16). Em E16.5 os germes dentários *wild-type* encontram-se no estágio sino sendo, portanto, esperado valores maiores para embriões *wild-type* e heterozigotos. Surpreendentemente, os embriões homozigotos apresentaram um incremento na distância P-D em comparação com as medidas de embriões E13.5 (Figura 17). A medida P-D do embrião homozigoto possui 51.16% do tamanho de *wild-type*, sendo que, nas outras medidas essa porcentagem é de 25.13% (O-A) e 16.42% (V-L).

Tabela 16. Valores alométricos dos camundongos *knockouts Msx1* E16.5

Genótipo	Peso	Proximal-Distal	Oral-Aboral	Vestíbulo-Lingual
<i>Wild-type</i>	862mg	688µm	415.06µm	468.95µm
Heterozigoto	839mg	528µm	355.93µm	410.16µm
Homozigoto	851mg	352µm	104.30µm	76.98µm

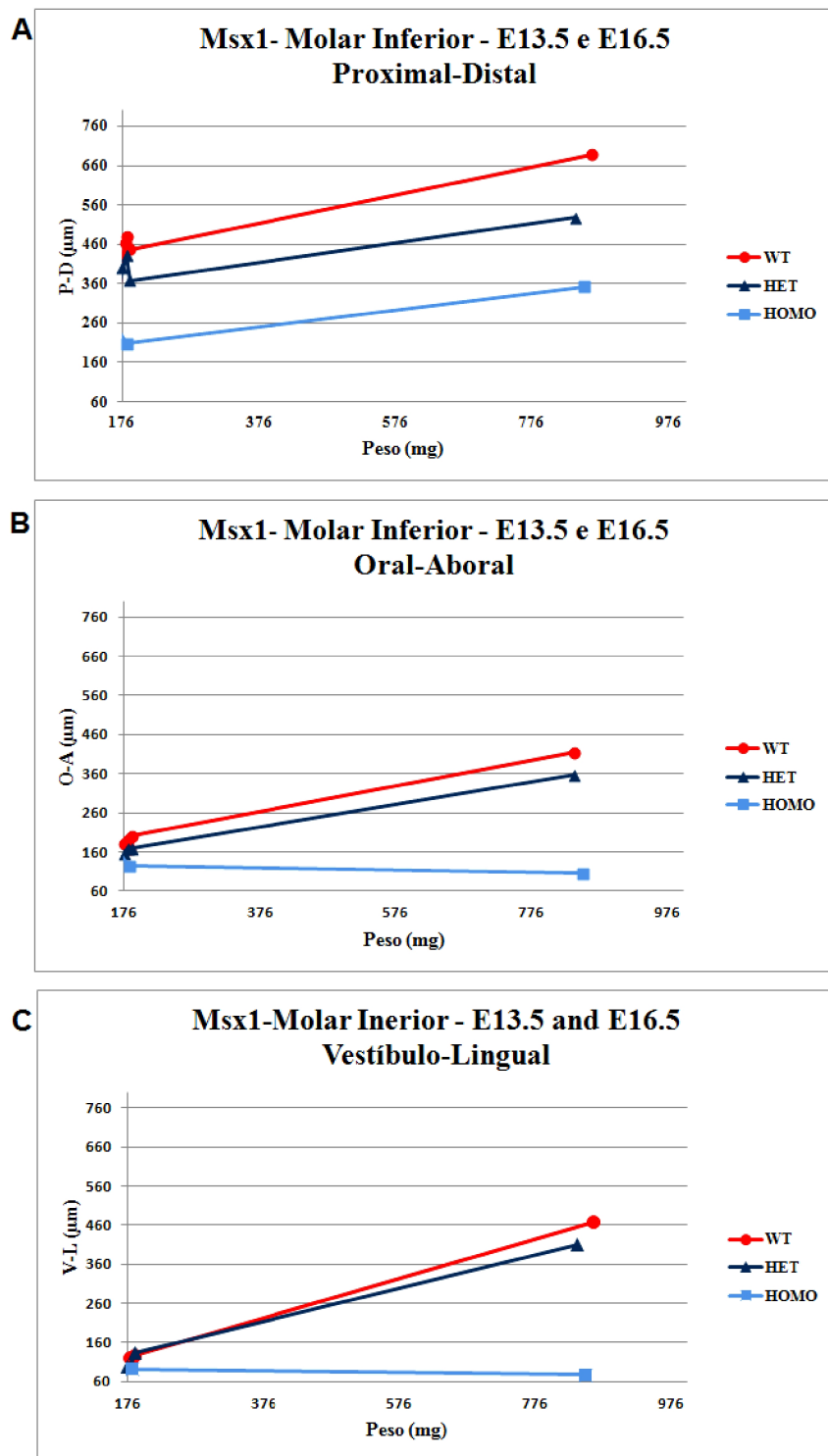


Figura 17. Dados alométricos do germe dentário de camundongos *knockout Msx1* E16.5. A. Peso x Distância P-D. B. Peso x Medida O-A. C. Peso x Medida V-L. *Wild-type* (WT), heterozigoto (Het) e homozigoto (Homo).

5.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA NA FASE BOTÃO

5.3.1 Expressão de p-Smad

A presença de *Msx1* é necessária para expressão de BMP4 que interage com Smads 1-5-8 fosforilando-as, propiciando a transição botão-capuz. Em E13.5 a imunorreatividade de phospho-Smad1-5-8 apresentou-se bastante reduzida em *Msx1* heterozigoto, se comparado com *wild-type* (Figura 18 E e D, respectivamente). A expressão que pôde ser observada em *Msx1* homozigoto (Figura 18 F), não caracteriza o padrão de expressão para o mesênquima condensado de botões dentários. Se houvesse expressão de Smads 1-5-8 o botão dentário desenvolver-se-ia normalmente, portanto a expressão observada em *Msx1*^{-/-} foi considerada *background*.

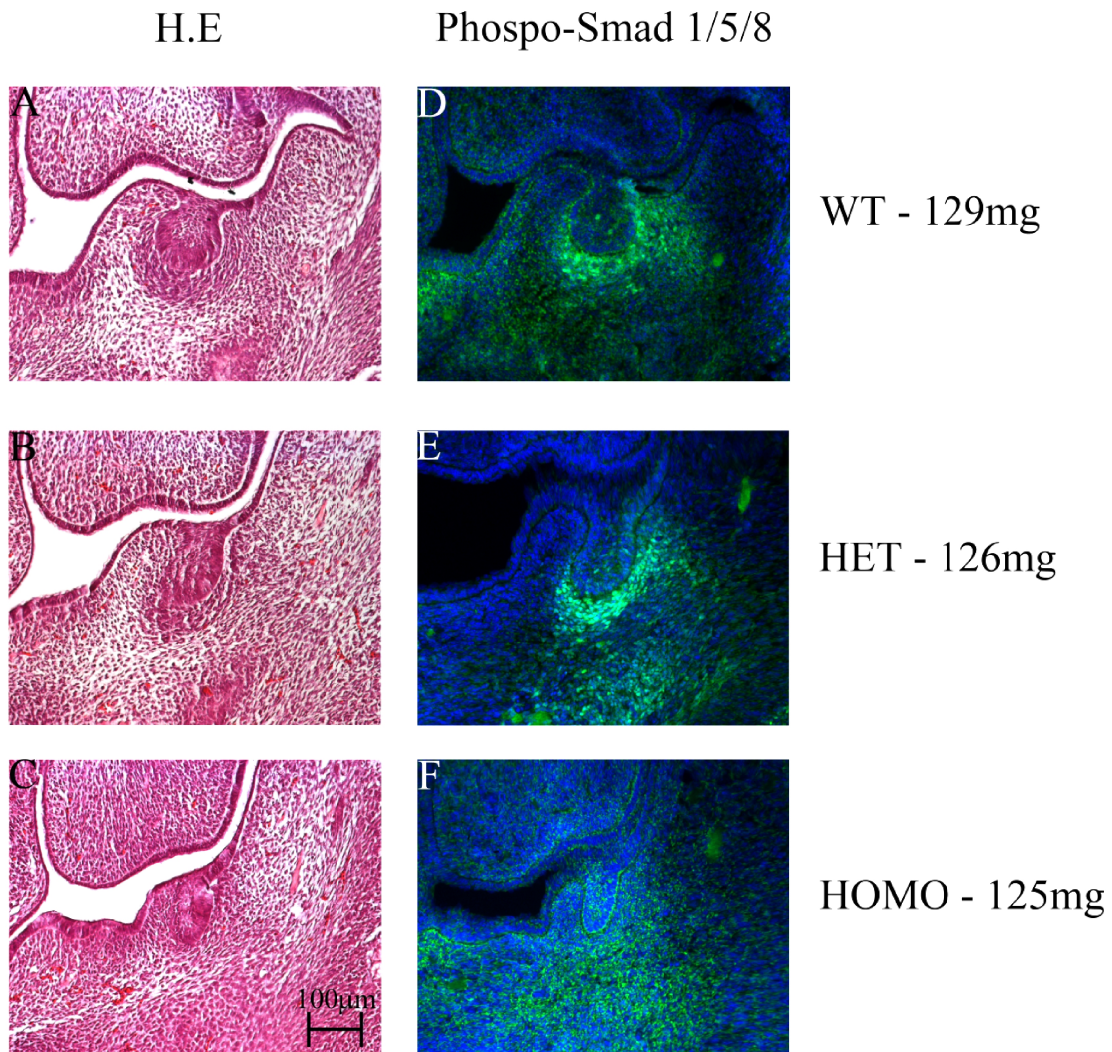


Figura 18. Imunofluorescência de cortes histológicos *Msx1* E13.5 para *wild-type* (A-D), Heterozigoto (B-E) e Homozigoto (C-F). Paineis esquerdo, cortes corados em Hematoxilina-Eosina. Paineis direito, Imunofluorescência com phospho Smad 1-5-8. Dapi – fluorescência azul. Phospo-Smad 1-5-8 – fluorescência verde. Objetiva 20X.

Observa-se que a intensidade total de fluorescência do heterozigoto representa menos de 50% da fluorescência obtida para *wild-type* (Figura 19).

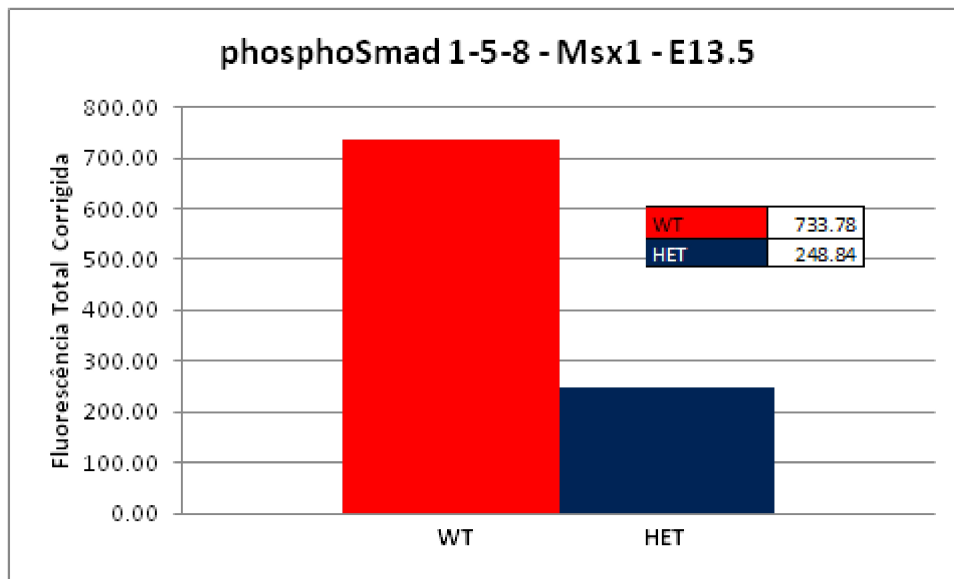


Figura 19. Gráfico da fluorescência total corrigida para *Msx1* E13.5 *wild-type* (WT) e heterozigoto (HET).

5.3.2 Expressão de *Shh*

Outro gene importante para a transição botão-capuz, o *Shh* é normalmente expresso, sob estimulação direta de *Bmp4* em camundongos *wild-type* (Figura 20 D) e tem expressão bastante reduzida em *Msx1* heterozigoto (Figura 20 E) e nula em homozigotos (Figura 20 F),

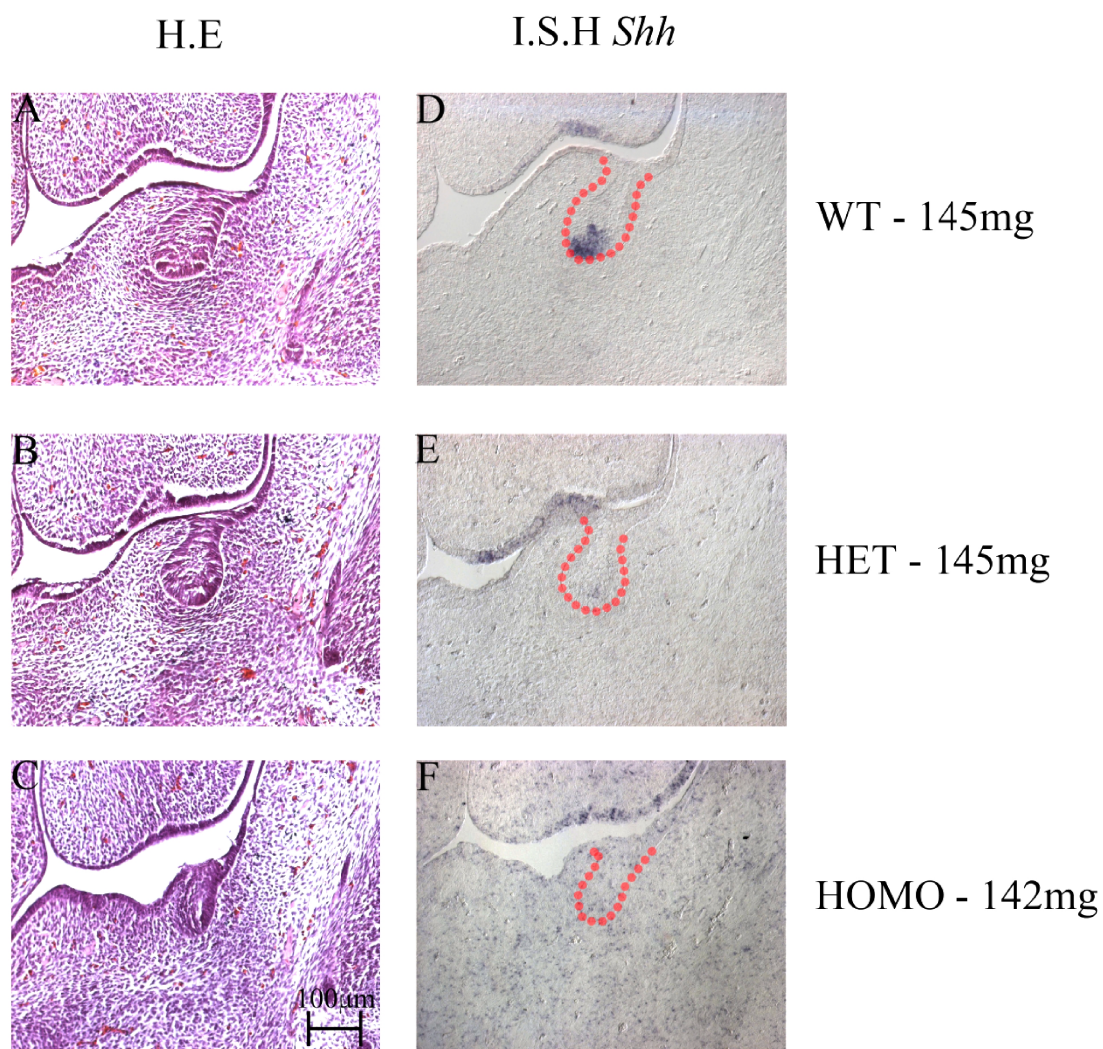


Figura 20. Hibridização *in situ* para avaliar a expressão de *Shh* em cortes histológicos de *Msx1* E13.5. Painel esquerdo, coloração Hematoxilina-Eosina. Painel direito hibridização *in situ*. Botões dentários delineados em vermelho. Objetiva 20X.

5.4 INTERAÇÃO ENTRE BARX1 E MSX1 NA FASE SINO

Camundongos *knockout* homozigotos *Barx1* e *Msx1* têm um atraso no desenvolvimento ao estágio botão. A diferença entre esses dois genes é que enquanto para o

primeiro, essa restrição de desenvolvimento é temporária (Miletich *et al*, 2011), para o segundo é uma condição permanente (Figura 21).

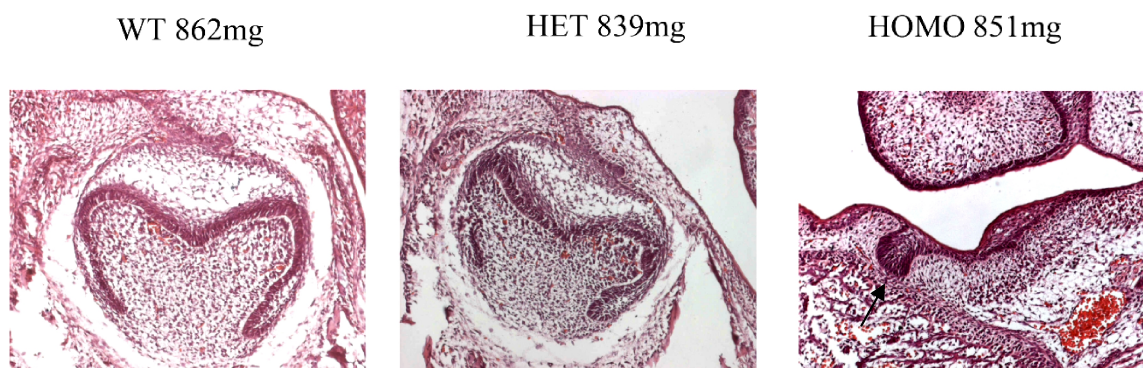


Figura 21. Germe dentário *Msx1* E16.5. Seta indica botão dentário em camundongo *knockout* homozigoto *Msx1*. Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva 20X.

A perda de um único alelo em um dos genes, como observado em *Barx1*^{+/+};*Msx1*^{+/-}, *Barx1*^{+/-};*Msx1*^{+/+} ou um alelo em cada gene, *Barx*^{+/-};*Msx1*^{+/-} não afeta o desenvolvimento do germe dentário (Figura 22 A, D e E), ou a expressão de *Bmp4* (Figura 22 F, I e J). Contudo, se a perda de dois alelos acontecer em *Barx1* ou *Msx1* (*Barx1*^{-/-};*Msx1*^{+/+} e *Barx1*^{+/+};*Msx1*^{-/-}), o atraso temporal de desenvolvimento de *Barx1* torna-se permanente (Figura 22 B e C) e não há expressão de *Bmp4* (Figura 22 G e H).

Por conseguinte, os dados de hibridização *in situ* sugerem que *Barx1* e *Msx1* interagem geneticamente e regulam a expressão de *Bmp4* durante o desenvolvimento de molares.

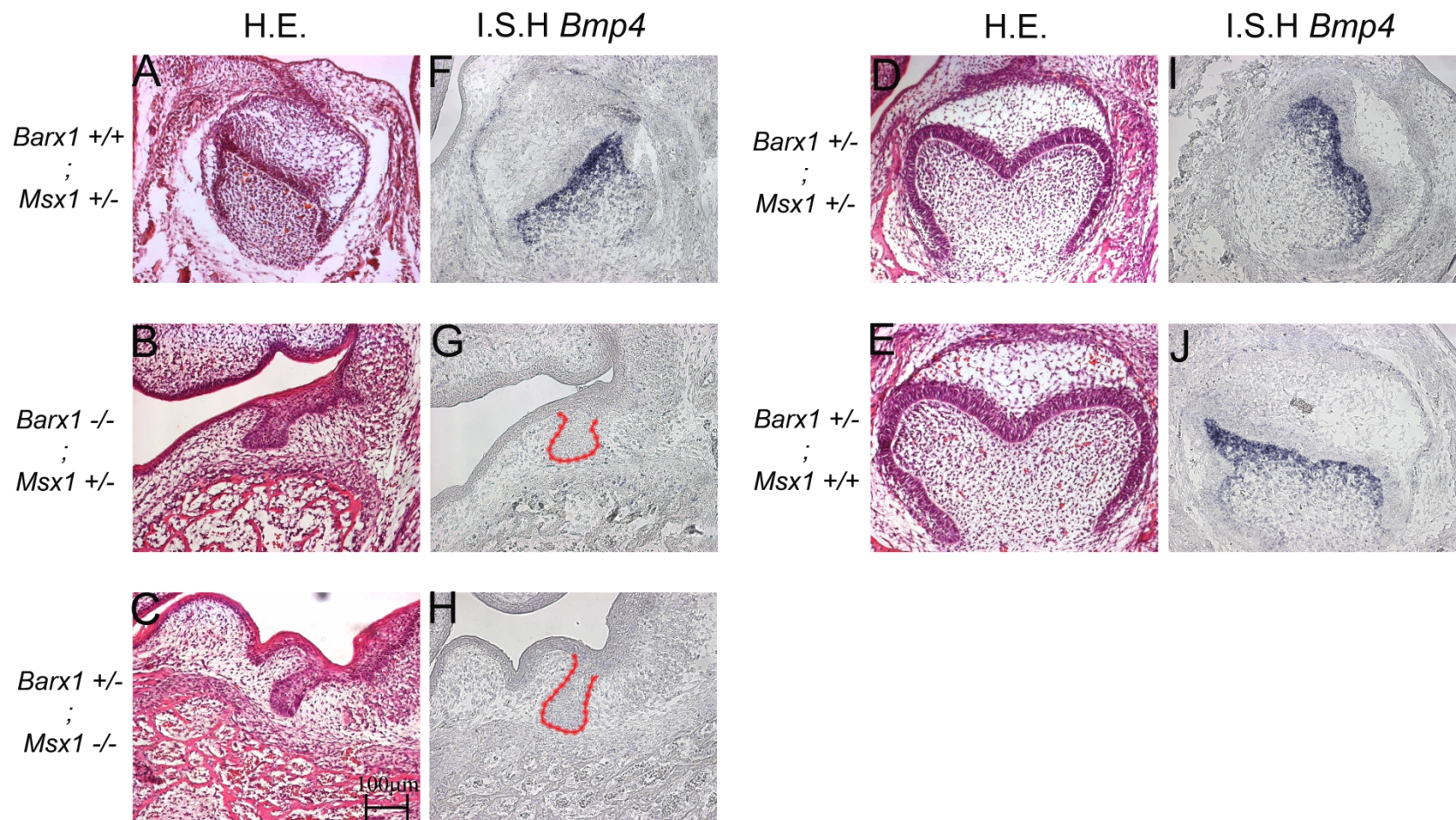
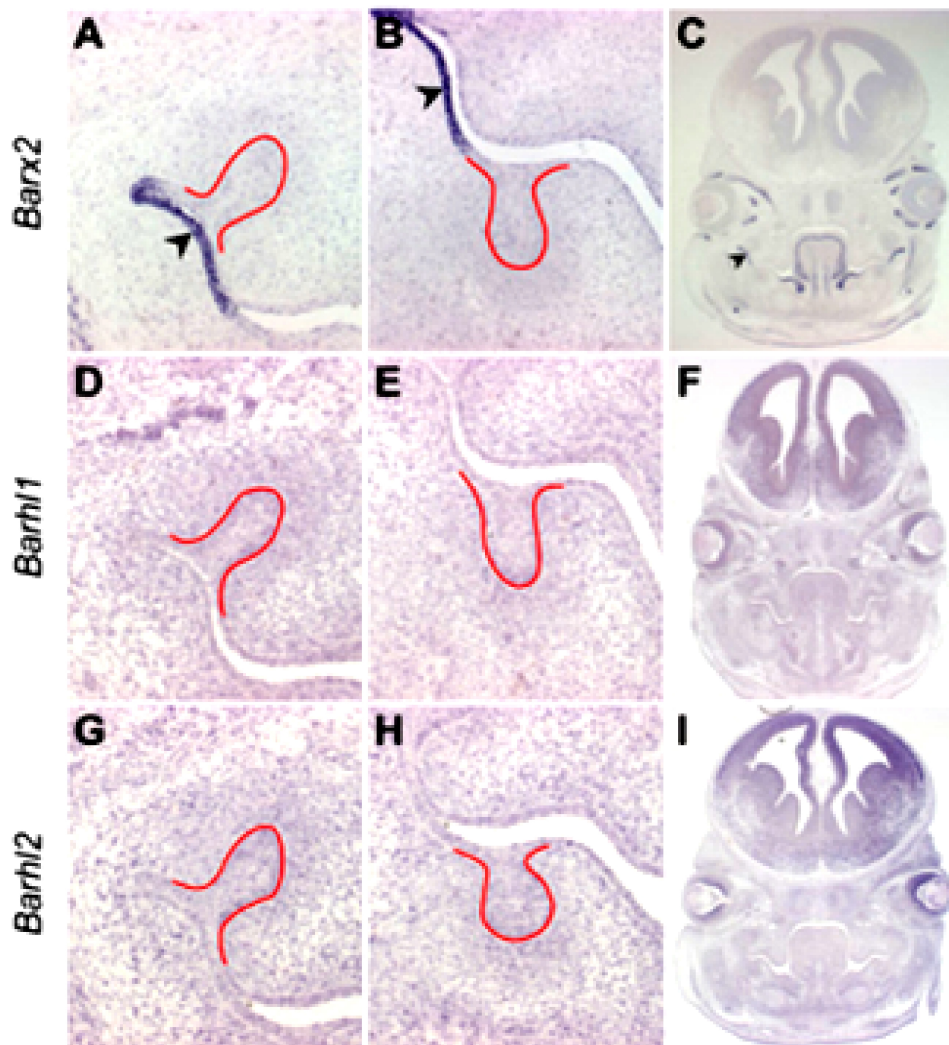


Figura 22. Cortes histológicos frontais dos molares inferiores E16.5 *Barx1*;*Msx1*, corados por Hematoxilina-Eosina (A-E) e hibridização *in situ* para avaliar expressão de *Bmp4* (F-J). Não há expressão de *Bmp4* nos botões G e H (delineados em vermelho). Objetiva 20X.

5.5 EXPRESSÃO DE OUTROS GENES DA FAMÍLIA BAR NA FASE BOTÃO

Os genes *Barx2*, *Barhl1* e *Barhl2*, fazem parte da família Bar *homeogene* e sua expressão foi avaliada em camundongos E13.5 *wild-type*. Observou-se que não há expressão desses genes em estruturas dentais, somente em outras estruturas, como o cérebro



(Figura 23).

Figura 23. Expressão de *Barx2* (A-C), *Barhl1* (D-E) e *Barhl2* (G-I) em botões de molares E13.5 *wild-type* e outras estruturas craniofaciais (C, F e I). Não há expressão desses genes em molares superiores e inferiores (A, B, D, E, G e H). Botões de molares delineados em vermelho. Setas apontam expressão no epitélio oral. Objetiva 20X.

Experimentos de hibridização *in situ* para avaliar a expressão de *Barx2* revelaram ausência de expressão para R2 e M1. Observou-se expressão deste gene na região de MS (Figura 24), assim como há expressão nos botões dos incisivos inferiores, em camundongos E13.5 *wild-type* (Figura 25).

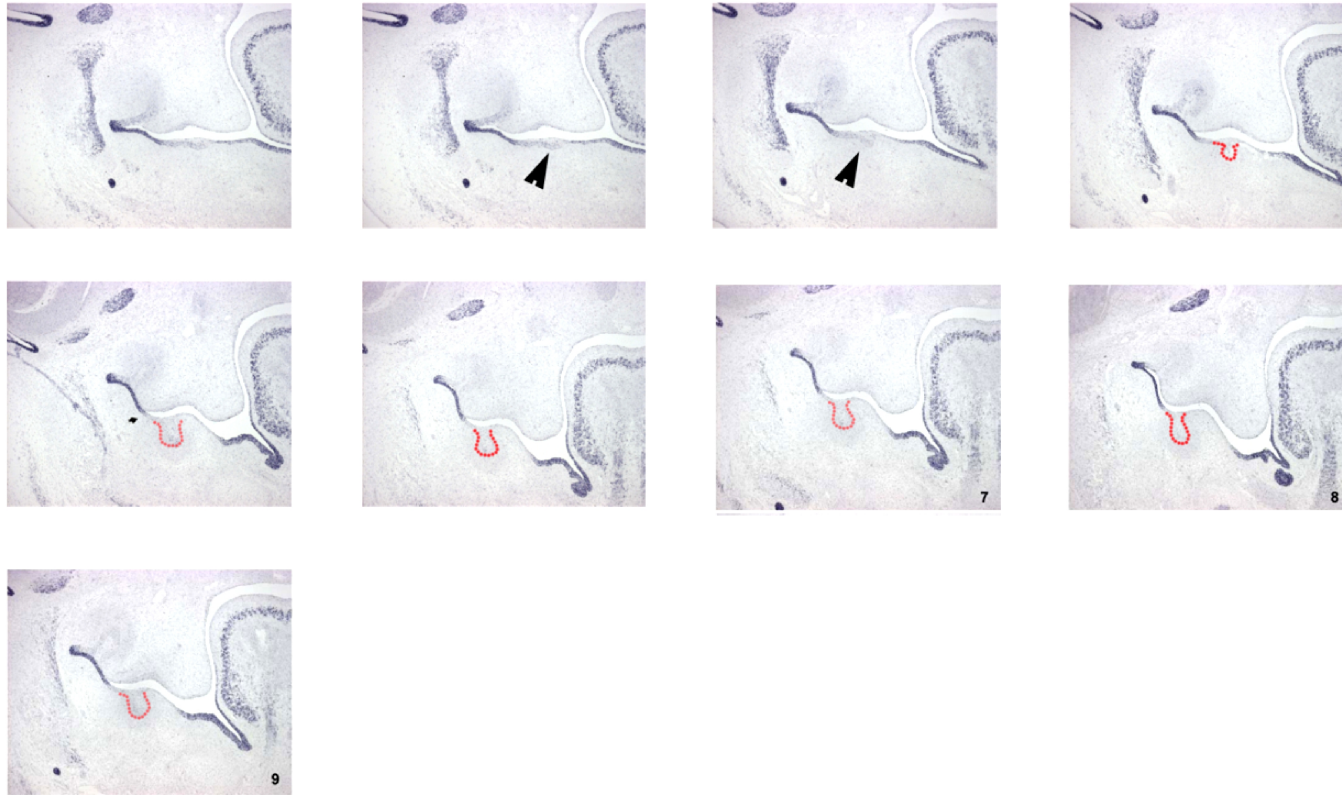


Figura 24. Hibridização *in situ* para avaliar a expressão de *Barx2* em molares inferiores de camundongos E13.5 *wild-type*. Imagens no sentido proximal-distal. As setas indicam expressão em MS. Botões dentários delineados em vermelho.

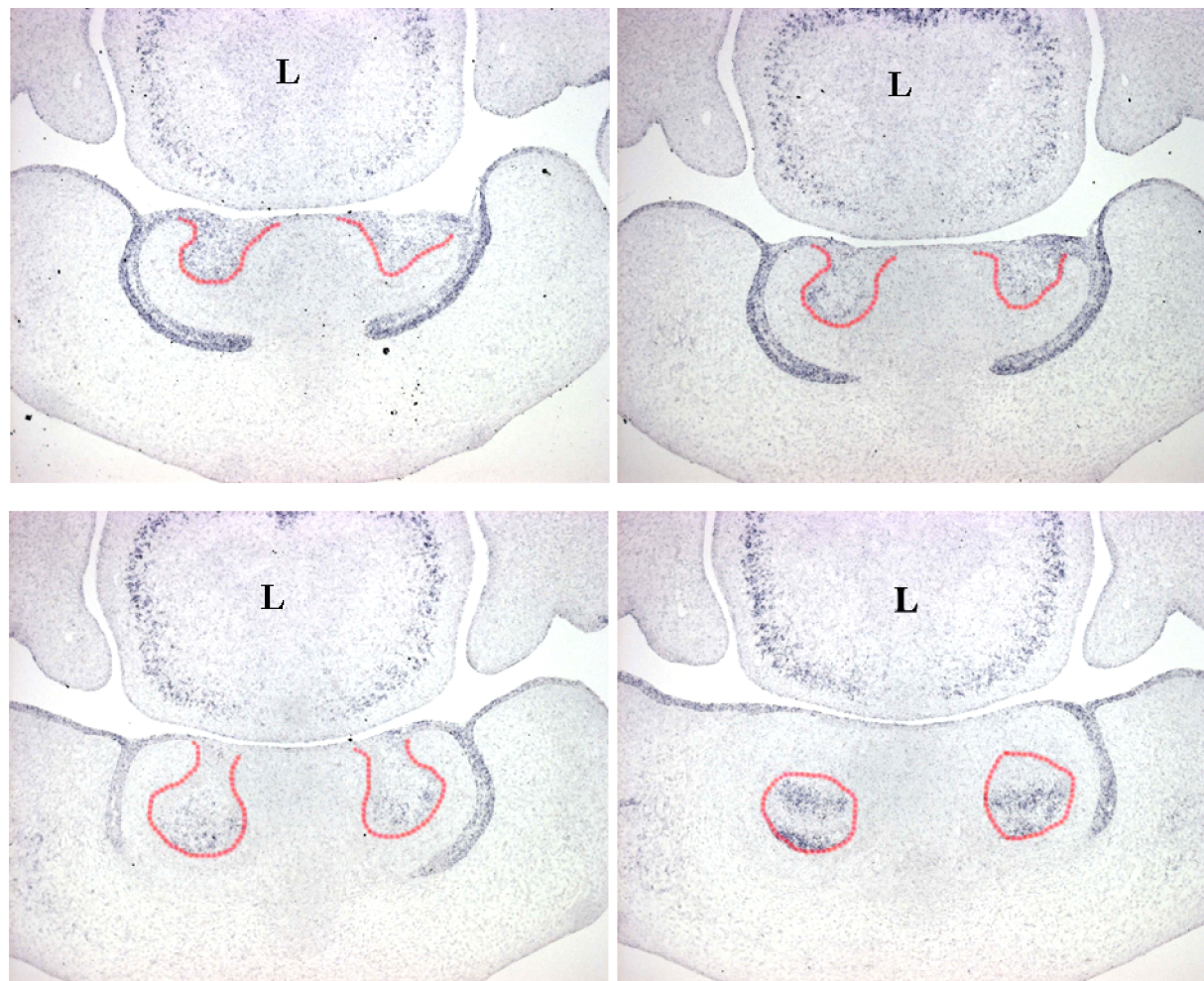


Figura 25. Hibridização *in situ* para avaliar a expressão de *Barx2* em botões de incisivos inferiores em camundongos E13.5 wild – type. L – língua. Botões dentários delineados em vermelho. Objetiva 20X.

6 DISCUSSÃO

A partir de E11.5 registra-se o primeiro sinal de desenvolvimento do molar, o espessamento do epitélio oral que passa a expressar genes como *Bmp4*, que induz a expressão de genes do mesênquima dentário como *Msx1*. Entre o estágio 12.5 e 13.5 a expressão de *Bmp4* migra do epitélio dental para o mesênquima. Essa alteração está associada a mudança do potencial de desenvolvimento do dente, do epitélio para o mesênquima. A partir de E14.5, no estágio capuz, o componente epitelial passa por dobramentos específicos, os quais são acompanhados pela formação do nó do esmalte, uma estrutura transitória envolvida na formação das cúspides. Esta estrutura expressa moléculas sinalizadoras como o próprio *Bmp* e *Shh*. O primeiro sinal da organização do esmalte já pode ser detectada em E13.5 (Hogan, 1996, Tucker *et al*, 1998a, Zhang *et al*, 2000, Zhao *et al*, 2000a).

A interação espacial receptor BMP4-ligante induz a multimerização, autofosforilação e ativação desses receptores. Como consequência há fosforilação de Smad 1, 5 e 8. As Smads fosforiladas dimerizarão com a Smad4 que possui papel de coativador e translocam para o núcleo (Whitman, 1998).

Inicialmente acreditava-se que havia necessidade de interação física entre os genes *Pax9* e *Msx1*, aumentando a habilidade de *Pax9* transativar *Msx1* e *Bmp4*, evento essencial para transição botão-capuz (Ogawa *et al*, 2006). Contudo, agenesias causadas por mutações em *Pax9* demonstraram que mutações não afetam o sinergismo com *Msx1*, entendendo-se que outro mecanismo alternativo ou adicional fosse necessário para ativar *Bmp4* (Wang *et al*, 2011).

Barx1 pode ser responsável por esse mecanismo adicional. *Barx1* também é um gene expresso somente em dentes multicuspidéos. Esse trabalho demonstrou que a presença de um único alelo de *Barx1* e um único alelo de *Msx1* são necessários para regular a atividade normal de BMP, assegurando a formação de molares. Contudo, na ausência completa de *Barx1*, um único alelo de *Msx1* não é suficiente para promover a evolução do botão dentário a capuz.

Outros estudos já demonstraram que proteínas BARX1 e PAX9 interagem com MSX1 para regular a atividade de BMP (Ogawa *et al*, 2006, Ogawa *et al*, 2005). Enquanto tanto *Msx1*, quanto *Pax9* são essenciais para o desenvolvimento de molares e incisivos, e para a transição botão-capuz, a interação *Barx1*-*Msx1* faz uma regulação fina da atividade de BMP, durante o desenvolvimento do molar.

Molares podem ainda ser formados na ausência total de *Barx1* (*Barx1*^{-/-}) e parcial de *Msx1* (*Msx1*^{-/+}), como observado em camundongos E13.5 e E16.5 (Miletich *et al*, 2011). Assim há um efeito dominante de *Msx1* sobre a regulação de *Bmp4* que mascara o papel mais sutil de *Barx1*.

Para garantir que nenhum outro gene da família Bar *homeogene* estivesse interagindo com *Msx1*, foi realizada uma hibridização *in situ* para *Barx2*, *Barhl1* e *Barhl2*, em camundongos *wild-type* E13.5. Não houve uma expressão de nenhum desses genes nos botões R2 e M1, contudo há uma proeminente expressão de *Barx2* na região de incisivos, indicando que *Barx2* poderia efetuar uma interação semelhante a *Barx1*-*Msx1*, para possibilitar o desenvolvimento de incisivos. Contudo, podem ser necessários estudos de imunoprecipitação para avaliar a natureza dessa interação.

Dessa perspectiva, a expressão de *Msx1* é iniciada por BMPs derivadas do epitélio dental e subsequentemente mantida por *Bmp4* mesênquimalmente expressa. Em camundongos *Msx1*^{-/-} o confinamento do desenvolvimento do dente ao estágio botão está associado a uma inibição especialmente de *Bmp4*. Esse gene é necessário para manutenção de *Shh*. Assim sendo, a ausência de expressão de *Shh* e SMAD fosforilada, indicam ausência de interação de *Bmp4* com *Msx1*.

A fórmula dental dos camundongos I1M3 em cada quadrante é extremamente reduzida se comparada aos humanos: I2C1P2M3. Entre incisivos e molares existe uma região denominada diastema que se caracteriza pela presença de dois rudimentos ou vestígios de botões dentários na mandíbula, MS e R2 situados mesialmente a M1. MS em E12.5 é a parte mais proeminente do epitélio dental invaginado e desaparece por apoptose, sendo incorporado a cumes epiteliais, enquanto R2, que surge em E13.5 é afetado

transitoriamente pela apoptose sendo incorporado a parte anterior de M1 (Viriot *et al*, 2000).

Em estudos com camundongos transgênicos Shh-EGFP, observou-se que *Shh* é expresso em MS (E12.7), R2 (E13.3) e M1(14.3) em centros de sinalização topograficamente distintos, sendo que o centro de sinalização de M1 inicia-se na região posterior de R2, em seguida estende-se pelo domínio anterior de R2. R2 é incorporado a M1 durante a transição botão-capuz. A expressão de *Shh* em R2 precede a transição botão-capuz (Prochazka *et al*, 2010)

As medidas proximal-distal de estruturas vestigiais e botões de molares inferiores (E13.5), de embriões *Msx1 knockout* homozigotos, sugerem que o crescimento nos sentidos Oral-Aboral e Vestíbulo-Lingual, permanecem praticamente inalteradas nos estágios E13.5 e E16.5.

Apesar do protocolo de pesagem ser uma fonte de erros, esse método pode ser validado uma vez que foram observados em embriões com o mesmo genótipo e peso semelhante.

A constatação de que esses rudimentos podem formar estruturas funcionais em camundongos mutantes, pode transformá-los em modelos de regeneração controlada de dentes (Peterkova *et al*, 2006)

Apesar de M1 em embriões *Msx1 knockout* homozigotos não passar pela transição botão para capuz, o placódio continua a aumentar de tamanho, no sentido Proximal-Distal (P-D), a uma taxa de crescimento similar a observada em embriões heterozigotos e *wild-type*. Este aumento de tamanho não foi observado nas dimensões vestíbulo-lingual e oral-aboral e não houve expressão de *Shh* ou phospho-SMAD para embriões *Msx1^{-/-}* E13.5, indicando que possivelmente *Shh* não exerce sua função no crescimento craniofacial no sentido P-D.

A variação de medidas em P-D pode refletir variações em R2 e M1, uma vez que ao contrário de outras medidas, não reflete apenas o tamanho do maior botão. Sugere-

se avaliar em outras fases, como E15.5, quando o segundo molar começa a se desenvolver, para verificar se as diferenças dessa dimensão progridem.

A expressão de *Barx2* em MS e incisivos inferiores poderia indicar que esse gene esteja relacionado também à morfogênese de pré-molares.

Camundongos *knockout* homozigotos *Pax9* e *Barx1* também apresentam molares cujo desenvolvimento não ultrapassa o estágio botão. Seriam uma ferramenta valiosa para entender, se em algum desses genes há crescimento proximal-distal em animais mutantes e como os rudimentos dentários se desenvolvem nesses genótipos.

Essa é a primeira vez que um estudo do gênero é realizado e mostra-se promissor ao estabelecer que, ao contrário do que se acreditava anteriormente, os botões de molares inferiores de embriões *Msx1* homozigotos apresentam uma taxa de crescimento proximal-distal, que acompanha o desenvolvimento de outras estruturas orais, e possivelmente irá delinear futuros estudos de interações moleculares entre rudimentos dentários e desenvolvimento de molares.

7 CONCLUSÃO

Existe interação entre *Barx1* e *Msx1* e *Barx1* é necessário para controlar os níveis de expressão de *Bmp4*. *Barx2* possivelmente apresenta um papel importante na morfogênese de pré-molares e incisivos inferiores.

O atraso de desenvolvimento dos molares inferiores de *Msx1*, em camundongos *knockout* homozigotos é permanente ao estágio botão. Contudo, os botões dentários destes camundongos continuam a exibir um crescimento no sentido proximal-distal no estágio E16.5.

REFERÊNCIAS²

Alberts B, Bray D, Hopkin J, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Replicação, Reparo e Recombinação do DNA. In: Alberts B, editor. Fundamentos da Biologia Celular. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2006. p. 195-227.

Bayés M, Hartung AJ, Ezer S, Pispas J, Thesleff I, Srivastava AK, et al. The Anhidrotic Ectodermal Dysplasia Gene (EDA) Undergoes Alternative Splicing and Encodes Ectodysplasin-A with Deletion Mutations in Collagenous Repeats. Human Molecular Genetics. 1998 October 1, 1998;7(11):1661-9.

Bei M. Molecular genetics of tooth development. Curr Opin Genet Dev. 2009 Oct;19(5):504-10.

Bei M, Maas R. FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. Development. 1998 Nov;125(21):4325-33.

Bei M, Stowell S, Maas R. Msx2 controls ameloblast terminal differentiation. Dev Dyn. 2004 Dec;231(4):758-65.

Belteki G, Haigh J, Kabacs N, Haigh K, Sison K, Costantini F, et al. Conditional and inducible transgene expression in mice through the combinatorial use of Cre-mediated recombination and tetracycline induction. Nucleic Acids Research. 2005 January 1, 2005;33(5):e51.

Capecchi M. Altering the genome by homologous recombination. Science. 1989 June 16, 1989;244(4910):1288-92.

Cate AR, Nanci A. Embryology of the Head, Face, and Oral Cavity. In: Nanci A, editor. Ten Cate's Oral Histology Development, Structure, and Function. 6th ed. U.S.A.: Mosby; 2003. p. 30-53.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Jr., Han J, Rowitch DH, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. Development. 2000 Apr;127(8):1671-9.

Clancy S. Genetic recombination. Nature Education [serial on the Internet]. 2008 20 Jun 2012]; 1(1): Available from: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/genetic-recombination-514>.

Cobourne M, Sharpe P. Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. Arch Oral Biol. 2003;48(1):1 - 14.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Corbo JC, Erives A, Di Gregorio A, Chang A, Levine M. Dorsoventral patterning of the vertebrate neural tube is conserved in a protochordate. *Development*. 1997 June 15, 1997;124(12):2335-44.

Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 1993 Dec 31;75(7):1417-30.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. [10.1038/292154a0]. 1981;292(5819):154-6.

Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996 October 1, 1996;93(20):10887-90.

Ferguson CA, Tucker AS, Christensen L, Lau AL, Matzuk MM, Sharpe PT. Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. *Genes Dev*. 1998 Aug 15;12(16):2636-49.

Ferguson CA, Tucker AS, Heikinheimo K, Nomura M, Oh P, Li E, et al. The role of effectors of the activin signalling pathway, activin receptors IIA and IIB, and Smad2, in patterning of tooth development. *Development*. 2001 Nov;128(22):4605-13.

Gayon J. History of the Concept of Allometry. *American Zoologist*. 2000 October 1, 2000;40(5):748-58.

Gonzalez SMC, Ferland LH, Robert B, Abdelhay E. Structural and Functional Analysis of Mouse *Msx1* Gene Promoter: Sequence Conservation with Human *MSX1* Promoter Points at Potential Regulatory Elements. *DNA Cell Biol*. 1998;17(6):561-72.

Gould DB, Walter MA. Cloning, Characterization, Localization, and Mutational Screening of the Human *BARX1* Gene. *Genomics*. 2000;68(3):336-42.

Haworth K, Smith F, Zoupa M, Seppala M, Sharpe PT, Cobourne MT. Expression of the *Scube3* epidermal growth factor-related gene during early embryonic development in the mouse. *Gene Expr Patterns*. 2007 Apr;7(5):630-4.

Hirth F, Reichert H. Conserved genetic programs in insect and mammalian brain development. *Bioessays*. 1999;21(8):677-84.

Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development*. 1996 July 1, 1996;10(13):1580-94.

Houzelstein D, Cohen A, Buckingham ME, Robert B. Insertional mutation of the mouse *Msx1* homeobox gene by an *nlacZ* reporter gene. *Mech Dev*. 1997a Jul;65(1-2):123-33.

Houzelstein D, Cohen A, Buckingham ME, Robert B. Insertional mutation of the mouse *Msx1* homeobox gene by an *nlacZ* reporter gene. *Mechanisms of Development*. 1997b;65(1-2):123-33.

Jarvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, Taketo MM, Jernvall J, Thesleff I. Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 5;103(49):18627-32.

Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*. 2000 Mar 15;92(1):19-29.

Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, et al. Complete sequencing shows a role for *MSX1* in non-syndromic cleft lip and palate. *Journal of Medical Genetics*. 2003 June 1, 2003;40(6):399-407.

Jones CM, Lyons KM, Hogan BL. Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and *Vgr-1* in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development*. 1991 February 1, 1991;111(2):531-42.

Keranen SV, Kettunen P, Aberg T, Thesleff I, Jernvall J. Gene expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Dev Genes Evol*. 1999 Aug;209(8):495-506.

Kere J, Srivastava AK, Outi M, Zonana J, Thomas N, Ferguson B, et al. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nature Genetics*. 1996;13:409-16.

Kettunen P, Thesleff I. Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn*. 1998 Mar;211(3):256-68.

Koentges G, Matsuoka T. Jaws of the Fates. *Science*. 2002 October 11, 2002;298(5592):371-3.

Koentges G, Lumsden A. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development*. 1996 October 1, 1996;122(10):3229-42.

Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, et al. Mutations in *AXIN2* cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet*. 2004 May;74(5):1043-50.

Lederberg J. Genetic Recombination in Bacteria. *Science*. 1955 November 11, 1955;122(3176):920.

Liu F, Kohlmeier S, Wang CY. Wnt signaling and skeletal development. *Cell Signal*. 2008 Jun;20(6):999-1009.

- Liu J-L, Yakar S, LeRoith D. Conditional Knockout of Mouse Insulin-Like Growth Factor-1 Gene Using the Cre/loxP System. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* (New York, NY). 2000 April 1, 2000;223(4):344-51.
- Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development*. 1988;103 Suppl:155-69.
- Matalova E, Antonarakis GS, Sharpe PT, Tucker AS. Cell lineage of primary and secondary enamel knots. *Dev Dyn*. 2005 Jul;233(3):754-9.
- Miletich I, Yu WY, Zhang R, Yang K, Caixeta de Andrade S, Pereira SF, et al. Developmental stalling and organ-autonomous regulation of morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 29;108(48):19270-5.
- Missirlis P, Smailus D, Holt R. A high-throughput screen identifying sequence and promiscuity characteristics of the loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *BMC Genomics*. 2006;7(1):73.
- Nieminen P. Genetic basis of tooth agenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009 Jun 15;312B(4):320-42.
- Ogawa T, Kapadia H, Feng JQ, Raghow R, Peters H, D'Souza RN. Functional consequences of interactions between Pax9 and Msx1 genes in normal and abnormal tooth development. *J Biol Chem*. 2006 Jul 7;281(27):18363-9.
- Ogawa T, Kapadia H, Wang B, D'Souza RN. Studies on Pax9-Msx1 protein interactions. *Arch Oral Biol*. 2005 Feb;50(2):141-5.
- Peterkova R, Lesot H, Peterka M. Phylogenetic memory of developing mammalian dentition. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2006 May 15;306(3):234-50.
- Peterkova R, Peterka M, Viriot L, Lesot H. Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):120-8.
- Peters H, Neubuser A, Balling R. Pax genes and organogenesis: Pax9 meets tooth development. *Eur J Oral Sci*. 1998 Jan;106 Suppl 1:38-43.
- Prochazka J, Pantalacci S, Churava S, Rothova M, Lambert A, Lesot H, et al. Patterning by heritage in mouse molar row development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 31;107(35):15497-502.
- Robert B, Montagutelli X, Houzelstein D, Ferland L, Cohen A, Buckingham M, et al. Msx1 is close but not allelic to either Hm or Hx on mouse chromosome 5. *Mamm Genome*. 1994 Jul;5(7):446-9.

Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*. [10.1038/323445a0]. 1986;323(6087):445-8.

Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*. 1994 Apr;6(4):348-56.

Sauer B, Henderson N. Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Research*. 1989 January 11, 1989;17(1):147-61.

Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988 July 1, 1988;85(14):5166-70.

Scarel RM, Pasetto S, Silva ER, Peres RC. Genes and tooth development: structure and function of some key players. *Braz J Oral Sciences*. 2003;Out/Dez:339-45.

Shimeld SM, Holland PWH. Vertebrate innovations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 April 25, 2000;97(9):4449-52.

Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 1985 Sep 19-25;317(6034):230-4.

Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*. [10.1038/5007]. 1999;21(1):70-1.

Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nature Genetics*. 2000;24(January):18-9.

Stottmann RW, Anderson RM, Klingensmith J. The BMP Antagonists Chordin and Noggin Have Essential but Redundant Roles in Mouse Mandibular Outgrowth. *Developmental Biology*. 2001;240(2):457-73.

Thesleff I, Jernvall J. The enamel knot: a putative signaling center regulating tooth development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1997;62:257-67.

Thesleff I, Keranen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv Dent Res*. 2001 Aug;15:14-8.

Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev*. 1997 Oct;67(2):111-23.

Thomas BL, Tucker AS, Qui M, Ferguson CA, Hardcastle Z, Rubenstein JL, et al. Role of Dlx-1 and Dlx-2 genes in patterning of the murine dentition. *Development*. 1997 Dec;124(23):4811-8.

Thomas KR, Capecchi MR. Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene. *Nature*. 1986;324(6092):34-8.

Tissier-Seta J-P, Mucchielli M-L, Mark M, Mattei M-G, Goridis C, Brunet J-F. Barx1, a new mouse homeodomain transcription factor expressed in cranio-facial ectomesenchyme and the stomach. *Mechanisms of Development*. 1995;51(1):3-15.

Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;5(7):499-508.

Tucker AS, Al Khamis A, Sharpe PT. Interactions between Bmp-4 and Msx-1 act to restrict gene expression to odontogenic mesenchyme. *Dev Dyn*. 1998a Aug;212(4):533-9.

Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science*. 1998b Nov 6;282(5391):1136-8.

Tummers M, Thesleff I. The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009 Jun 15;312B(4):309-19.

Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet*. 1996 Aug;13(4):417-21.

Viriot L, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV, Peterka M, Peterkova R. The presence of rudimentary odontogenic structures in the mouse embryonic mandible requires reinterpretation of developmental control of first lower molar histomorphogenesis. *Int J Dev Biol*. 2000 Feb;44(2):233-40.

Viriot L, Peterkova R, Peterka M, Lesot H. Evolutionary implications of the occurrence of two vestigial tooth germs during early odontogenesis in the mouse lower jaw. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):129-33.

Wallace VA, Raff MC. A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic

nerve. *Development*. 1999;128:2901-9.

Wang XP, O'Connell DJ, Lund JJ, Saadi I, Kuraguchi M, Turbe-Doan A, et al. Apc inhibition of Wnt signaling regulates supernumerary tooth formation during embryogenesis and throughout adulthood. *Development*. 2009 Jun;136(11):1939-49.

Wang Y, Kong H, Mues G, D'Souza R. Msx1 mutations: how do they cause tooth agenesis? J Dent Res. 2011 Mar;90(3):311-6.

Weber P, Schuler M, Gérard C, Mark M, Metzger D, Chambon P. Temporally Controlled Site-Specific Mutagenesis in the Germ Cell Lineage of the Mouse Testis. Biology of Reproduction. 2003 February 1, 2003;68(2):553-9.

Whitman M. Smads and early developmental signaling by the TGF β superfamily. Genes & Development. 1998 August 15, 1998;12(16):2445-62.

Wilkie AOM, Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation. Nature Reviews Genetics. 2001;2(6):458-68.

Zhang Y, Zhang Z, Zhao X, Yu X, Hu Y, Geronimo B, et al. A new function of BMP4: dual role for BMP4 in regulation of Sonic hedgehog expression in the mouse tooth germ. Development. 2000 Apr;127(7):1431-43.

Zhao X, Zhang Z, Song Y, Zhang X, Zhang Y, Hu Y, et al. Transgenically ectopic expression of Bmp4 to the Msx1 mutant dental mesenchyme restores downstream gene expression but represses Shh and Bmp2 in the enamel knot of wild type tooth germ. Mech Dev. 2000a Dec;99(1-2):29-38.

Zhao Z, Stock D, Buchanan A, Weiss K. Expression of Dlx genes during the development of the murine dentition. Dev Genes Evol. 2000b May;210(5):270-5.

Developmental stalling and organ-autonomous regulation of morphogenesis

Isabelle Miletich^a, Wei-Yuan Yu^{a,1}, Ruofang Zhang^{a,2}, Kai Yang^{a,2}, Simone Caixeta de Andrade^{a,b},
Silvia Fontes do A. Pereira^a, Atsushi Ohazama^a, Orin B. Mock^c, Georg Buchner^a, Jane Sealby^d, Zoe Webster^d,
Minglian Zhao^e, Marianna Bei^{e,f}, and Paul T. Sharpe^{a,3}

^aDepartment of Craniofacial Development, Dental Institute, Kings College London, Guys Hospital, London SE1 6RT, United Kingdom; ^bDepartment of Morphology, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, SP Campinas, Brazil; ^cCollege of Osteopathic Medicine, A. T. Still University, Kirksville, MO 63501; ^dEmbryonic Stem Cell Facility, Medical Research Council Clinical Sciences Centre, Imperial College London, London W12 0NN, United Kingdom; ^eCenter of Regenerative Developmental Biology, The Forsyth Institute, Boston MA 02115; and ^fCenter for Engineering in Medicine, Department of Surgery, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston MA 02129

Edited by Clifford J. Tabin, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved October 19, 2011 (received for review August 15, 2011)

Timing of organ development during embryogenesis is coordinated such that at birth, organ and fetal size and maturity are appropriately proportioned. The extent to which local developmental timers are integrated with each other and with the signaling interactions that regulate morphogenesis to achieve this end is not understood. Using the absolute requirement for a signaling pathway activity (bone morphogenetic protein, BMP) during a critical stage of tooth development, we show that suboptimal levels of BMP signaling do not lead to abnormal morphogenesis, as suggested by mutants affecting BMP signaling, but to a 24-h stalling of the intrinsic developmental clock of the tooth. During this time, BMP levels accumulate to reach critical levels whereupon tooth development restarts, accelerates to catch up with development of the rest of the embryo and completes normal morphogenesis. This suggests that individual organs can autonomously control their developmental timing to adjust their stage of development to that of other organs. We also find that although BMP signaling is critical for the bud-to-cap transition in all teeth, levels of BMP signaling are regulated differently in multicusped teeth. We identify an interaction between two homeodomain transcription factors, *Barx1* and *Msx1*, which is responsible for setting critical levels of BMP activity in multicusped teeth and provides evidence that correlates the levels of *Barx1* transcriptional activity with cuspal complexity. This study highlights the importance of absolute levels of signaling activity for development and illustrates remarkable self-regulation in organogenesis that ensures coordination of developmental processes such that timing is subordinate to developmental structure.

heterochrony | odontogenesis | molar | shrew

Tooths are ectodermal organs that develop by an increasingly well-characterized series of reciprocal epithelial–mesenchymal interactions. Unlike most other organs that undergo a single program of morphogenesis to generate the shape of the organ, mammalian teeth have different crown shapes according to their positions in the jaw. Tooth morphogenesis programs are thus spatially regulated to generate the different crown shapes that make up the different tooth types: molar, incisor, etc.

Early tooth development proceeds through a series of events that are common to all tooth types. The oral epithelium thickens, forms a bud that invaginates into the underlying neural crest-derived mesenchyme, and eventually grows into a cap by inward curving of the tip of the bud. The subsequent stage of tooth development, in which is set up the number of cusps of the tooth crown, and therefore the tooth type, is different for multicusped (e.g., molar) and unicuspid (e.g., incisor) teeth. Morphogenesis to form the cusps of the tooth crown involves folding of the epithelium, regulated by signals from organizing centers, the enamel knots (1, 2). To form enamel knots and begin crown morphogenesis, tooth primordia (buds), have an absolute requirement for a mesenchymal to epithelial bone morphogenetic protein (BMP) signal. Mice lacking this BMP signal, such as mice mutant for type 1a BMP receptor in the epithelium (3) or the homeobox

transcription factor *Msx1* in the mesenchyme (4), exhibit a permanent arrest of tooth development at the bud stage.

Msx1 is expressed in the condensing mesenchyme cells of all tooth buds (5) and regulates the expression of *BMP4* (6, 7). This BMP signal regulates the expression of epithelial genes such as *Shh* (8), in cells that form a transient signaling center, the primary enamel knot, required to coordinate cuspal morphogenesis. The importance of BMP activity in the formation of the correct cusp pattern is suggested from mathematical modeling of signaling changes in cusp abnormalities observed in mutants affecting BMP signaling (9).

Barx1 is a Bar-family homeobox gene, which has a unique expression pattern during tooth development that is different to all of the other genes expressed in the early jaw primordia mesenchyme (10, 11). In the early ectomesenchyme, *Barx1* expression is highly restricted to a small patch of cells that corresponds to the position where molar teeth develop. At the bud stage of tooth development, in common with other homeobox genes such as *Msx1*, *Barx1* is expressed in condensing mesenchyme cells around the epithelial tooth buds, but unlike the other genes, *Barx1* is only expressed in molar tooth primordia and is not expressed in incisors at any time during their development.

We investigated the function of *Barx1* during molar tooth development and found that *Barx1* genetically and physically interacts with *Msx1* to up-regulate the levels of BMP activity that are critical for the bud-to-cap transition. Interestingly, a lack of *Barx1* results neither in an arrest of tooth development, as would be expected from the phenotype of *Msx1* mutants, nor in the formation of abnormal teeth, as suggested by previous results (12). In the *Barx1* mutants, *BMP4* transcription and BMP4 activity drop, impairing the bud-to-cap transition. However, we show that this decrease in BMP signaling arrests molar development for only 24 h and that molar tooth development restarts after BMP levels have accumulated and reached a threshold allowing bud-to-cap transition. Strikingly, following this stalling, molar tooth development accelerates and catches up with other structures of the developing embryo, to eventually produce perfectly formed molars. Our findings therefore represent a unique example of an organ that self-regulates its

Author contributions: P.T.S. designed research; I.M., W.-Y.Y., R.Z., K.Y., S.C.d.A., S.F.d.A.P., A.O., G.B., M.Z., and M.B. performed research; O.B.M., J.S., and Z.W. contributed new reagents/analytic tools; I.M. and P.T.S. analyzed data; and I.M. and P.T.S. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

¹Present address: Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, South Parks Rd., Oxford OX1 3RE, UK.

²Present address: Department of Orthodontics, School of Stomatology, Capital Medical University, Beijing 100050, China.

³To whom correspondence should be addressed. E-mail: paul.sharpe@kcl.ac.uk.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1112801108/-DCSupplemental.

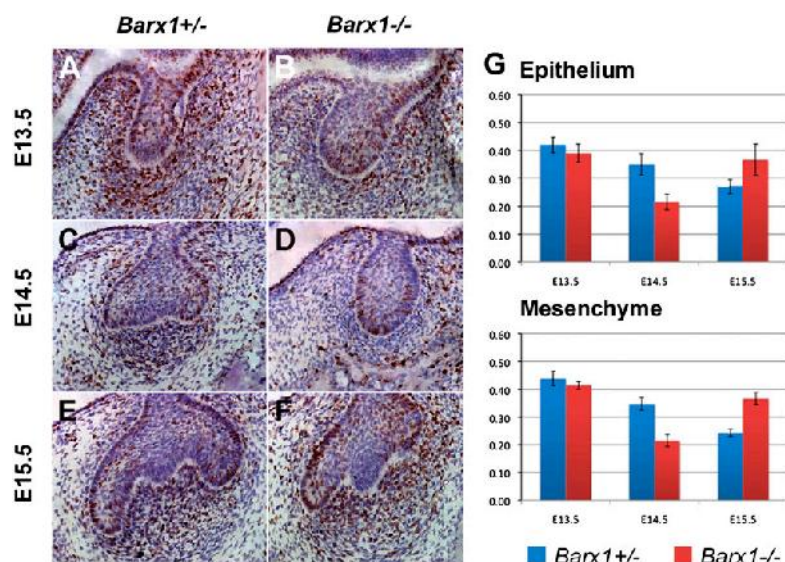


Fig. 2. *Barx1* mutant molar teeth exhibit changes in cell proliferation. (A–F) BrdU staining of frontal sections of developing first molar tooth germs at E13.5 (A and B), E14.5 (C and D), and E15.5 (E and F) in a *Barx1*^{+/+} (A, C, and E) and *Barx1*^{-/-} (B, D, and F) lower jaw. (G) Graphs comparing the numbers of BrdU-labeled cells in the epithelium and the condensed mesenchyme of developing lower first molars at E13.5, E14.5, and E15.5. Error bars show SD.

a FLAG-tagged fusion protein. Barx1 protein was detected in the anti-FLAG immunoprecipitate from cells cotransfected with FLAG–Msx1, but not from cells cotransfected with empty vector (Fig. 5A). As control, an equal protein level of Barx1 was present in both input samples (20% input).

To determine whether these protein interactions occur endogenously, we performed protein colocalization analysis using confocal microscopy. C3H10T1/2 cells were used for the immunofluorescence staining to confirm the endogenous localization of Msx1 and its interacting protein Barx1. Using anti-Barx1 and anti-Msx1 antibodies, we show that C3H10T1/2 cells express Msx1 and Barx1 proteins sufficiently to detect their intracellular expression by immunofluorescence (Fig. 5B and C). Merged pictures show endogenous Barx1 to be colocalized with Msx1 (Fig. 5D). The pattern of Msx1 immunofluorescence was identical with that of previous reports, whereas this is a unique report of Barx1 endogenous intracellular expression pattern. In addition, the transiently transfected cells with constructs expressing Barx1 and Msx1 as EGFP and FLAG-tagged fusion proteins used for our coimmunoprecipitation assays, were stained with anti-Msx1 antibodies, further confirming the intracellular colocalization of Barx1 with Msx1, using confocal microscopy (Fig. 5F–I).

Barx1 Expression in Premolar Tooth Development. In mouse tooth development, *Barx1* expression is restricted to presumptive molar mesenchyme and throughout tooth development to molar mesenchyme cells (10). The role of the Barx1–Msx1 interaction in fine-tuning BMP activity supported the suggested importance of the

level of BMP activity in regulating cusp formation (9). We argued that if the levels of BMP activity control cusp formation then the expression of *Barx1* should correlate with tooth cusp pattern rather than being molar specific. To test this hypothesis we analyzed *Barx1* expression in embryos of a mouse mutant that develops premolar teeth (*Orpk*) (14) and in a species that has natural premolars, the lesser shrew *Cryptotis parva*.

In *Orpk* embryos, *Barx1* expression could be observed during development of the supernumerary teeth that develop mesial to the first molars and have a cusp pattern consistent with a premolar identity (Fig. 6A and B). The lesser shrew has a more complete dentition than the mouse with premolar and unicuspid (canine-like) teeth (Fig. 6D and H). *Barx1* expression was observed in maxillary and mandibular molars (Fig. 6F), as well as in maxillary premolar tooth development but was barely detectable during mandibular premolar development (Fig. 6E) and absent during both unicuspid and incisor development. Grain counting of serial sections of premolar tooth primordia hybridized with *Barx1* confirmed the impression from the in situ hybridization sections, namely that *Barx1* expression was reduced in the *Orpk* premolar-like supernumerary tooth compared with *Orpk* first and second molars (Fig. 6C). Similarly, in shrew tooth primordia *Barx1* expression was less in the upper premolar than the molars and less in the lower premolar than in the upper premolar (Fig. 6G). Comparison of the crown shape of adult shrew maxillary and mandibular premolars revealed that mandibular premolars only had two cusps, whereas maxillary premolars had a clear, molar-like pattern (Fig. 6I). Therefore, *Barx1* expression is found

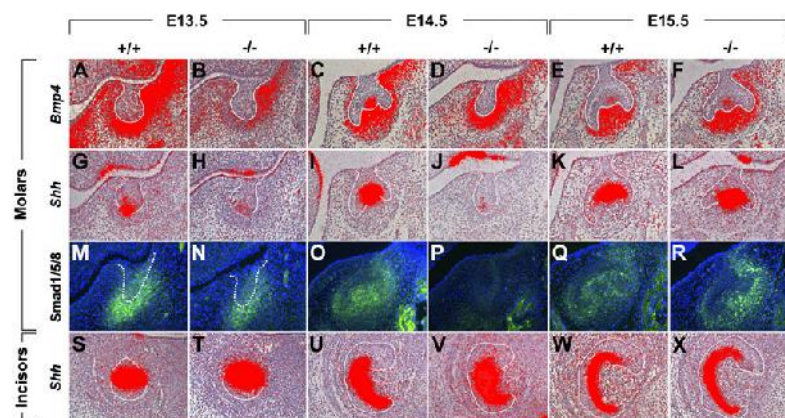


Fig. 3. *BMP4* expression and BMP activity changes in *Barx1* mutant tooth development. (A–R) Expression of *Bmp4* (A–F), *Shh* (G–L), and distribution of phospho-Smad1/5/8 (M–R) in lower first molar tooth germs at E13.5 (A, B, G, H, M, and N), E14.5 (C, D, I, J, O, and P), and E15.5 (E, F, K, L, Q, and R) in a WT (A, C, E, G, I, K, M, O, and Q) and *Barx1* homozygous mutant (B, D, F, H, J, L, N, P, and R) littermates. (S–X) Expression of *Shh* in lower incisor tooth germs at E13.5 (S and T), E14.5 (U and V), and E16.5 (W and X). In situ hybridization was carried out on four separate samples for each genotype at each time point and immunostaining on two separate samples for each genotype at each time point. The epithelium of molar and incisor tooth germs is outlined in white.

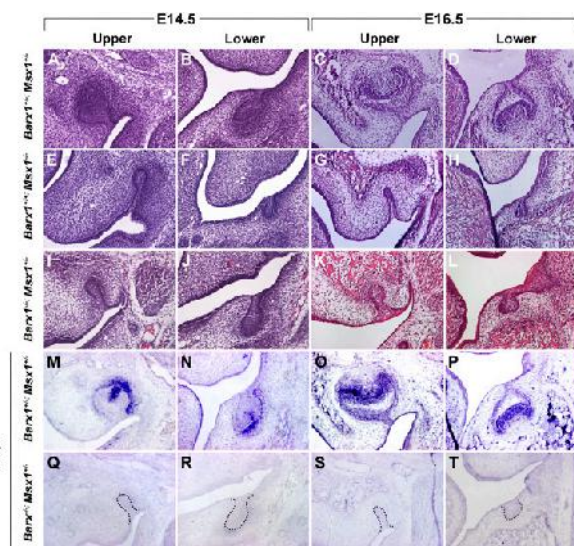


Fig. 4. Arrest of molar tooth development associated with a lack of *Bmp4* transcription in *Barx1/Msx1* compound mutants. Frontal sections through upper (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, and S) and lower (B, D, F, H, J, L, N, P, R, and T) developing first molars at E14.5 (A, B, E, F, I, J, M, N, Q, and R) and E16.5 (C, D, G, H, K, L, O, P, S, and T). Hematoxylin and eosin stained sections of *Barx1*^{+/+}; *Msx1*^{+/+} (A–D), *Barx1*^{+/+}; *Msx1*^{−/−} (E–H), and *Barx1*^{−/−}; *Msx1*^{+/+} (I–L). (M–T) Expression of *BMP4* in the condensed mesenchyme of first molar tooth germs of *Barx1*^{+/+}; *Msx1*^{+/+} (M–P) and *Barx1*^{−/−}; *Msx1*^{+/+} (Q–T). Permanent arrest of molar tooth development was observed in three separate *Barx1*^{−/−}; *Msx1*^{+/+} animals and was highly penetrant. At E16.5, one molar tooth germ ($n = 1/12$) was occasionally observed at the cap stage (corresponding to E14.5).

only during development of multicuspid teeth and levels of expression correlate with cusp numbers, supporting a role in regulating signaling activity that controls cusp number.

Discussion

The regulation of crown morphology is a critical process in mammalian tooth development because it determines tooth shape (type) that begins with the transition from a tooth bud to a tooth cap. The formation of the primary enamel knot signaling center is regulated by BMP activity, with *BMP4* protein being secreted by mesenchymal cells at the bud stage. This *BMP4* expression is regulated by the transcription factor *Msx1* in partnership with *Pax9* and possibly other factors. *Pax9* and *Msx1* are coexpressed in the condensing dental mesenchyme and are critical for development of all tooth types, as in *Msx1* and *Pax9* homozygous null mutants tooth development is arrested at the bud stage (4, 15).

We identify here a developmental tooth type control of BMP signaling at the bud-to-cap transition whereby the optimal level of BMP activity required for developmental progression is fine-tuned by transcriptional activity of two interacting homeodomain transcription proteins, *Barx1* and *Msx1*. *Msx1* functions to regulate *BMP4* expression in the development of all tooth types (incisors and molars), whereas *Barx1* is only expressed in development of teeth with multicuspid crowns (molariform teeth). In the complete absence of any *Barx1*–*Msx1* interaction, (*Barx1*^{−/−}; *Msx1*^{+/+}), the resulting suboptimal level of BMP activity is insufficient to induce appropriate levels of primary knot signaling that controls cusp formation. Under these conditions, rather than the expected outcomes of abnormal morphogenesis or complete arrest, tooth development stalls until the optimal level is reached to form the correct cusp pattern. This identifies a developmental phenomenon where level of BMP activity is sensed by cells as a critical threshold (optimal) level for continued normal development. During this temporal arrest in molar development, development of other organs, including incisors, continues normally. Thus, molar teeth stall their development when BMP activity is below the threshold (suboptimal) and then restart when levels raise above the

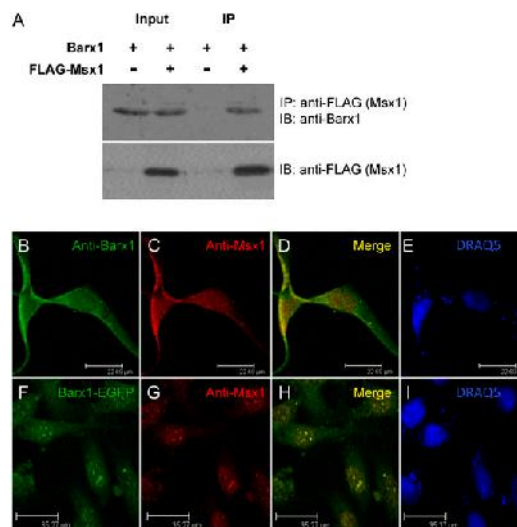


Fig. 5. *Msx1* interacts with molar tooth-specific transcription factor *Barx1*. (A) *Msx1* interacts with *Barx1* in living cells. C3H10T1/2 cells were cotransfected with pRES2–*Barx1*–EGFP and either pCMV–FLAG–*Msx1* or pCMV–FLAG–Tag2B empty control vector. Cell lysates were subjected to coimmunoprecipitations followed by Western blotting. *Barx1* was detected only in the presence of FLAG–*Msx1* in the IP sample. IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting. (B–I) Intracellular colocalization of *Barx1* and *Msx1* in C3H10T1/2 cells. (B–E) Intracellular colocalization of endogenously expressed *Barx1* and *Msx1*. (B) Intracellular localization of *Barx1* using anti-*Barx1* (green); (C) intracellular localization of *Msx1*, using anti-*Msx1* (red); (D) merged pictures showing intracellular colocalization of *Barx1* and *Msx1* (yellow); and (E) DNA staining using the fluorescence dye DAPI (blue). (F–I) Intracellular colocalization of exogenously overexpressed *Barx1* and *Msx1* as EGFP and FLAG-tagged fusion proteins. (F) Intracellular localization of *Barx1*–EGFP (green); (G) intracellular localization of *Msx1* using anti-*Msx1* (red); (H) merged pictures show intracellular colocalization of *Barx1*–EGFP and FLAG–*Msx1* (yellow); and (I) DNA staining using the fluorescence dye DAPI (blue).

threshold, 24 h later. This autonomous self-regulation is thus a way for the embryo to cope with small inaccuracies in signaling that might otherwise lead to major abnormalities. The fact that following stalling of the intrinsic developmental clock, development then accelerates to be back in synchrony with the general timing of embryonic development, illustrates the importance of temporal coupling of developmental processes. Surprisingly, in vitro knockdown of *Barx1* using lentiviruses expressing *Barx1* siRNA led to a complete arrest of tooth development at the bud stage (16), suggesting that the ability to restart development is lost in this system. The subrenal culture of tooth rudiments is unlikely to be the cause of this definitive arrest of development, because *Barx1*^{−/−} molar tooth rudiments grafted under a kidney capsule do form normal mineralized molars. Furthermore, in the *Barx1* knockout, a transcriptional compensation through up-regulation of another *Bar* homeogene family member can be excluded, as *Barx2*, *Barhl1*, and *Barhl2* are not expressed in E13.5 WT molar tooth buds (Fig. S2). Our data also suggest a role for different levels of BMP activity in the regulation of the cusp patterns that constitute different tooth types. This is consistent with theoretical modeling of cusp formation, on the basis of experimental data that indicate a key role for the level of BMP activity in cusp formation (9). Thus, development of different crown cusp patterns would be predicted to require particular individual thresholds of BMP activity for correct morphogenesis to be initiated.

Barx1 is specifically expressed only in teeth that develop multiple cusps (molars and premolars) and thus its role may be linked to cuspal morphogenesis. In the presence of *Barx1*, a single *Msx1* allele is able to regulate normal BMP activity to ensure normal molar formation. However, in the absence of *Barx1*, a single allele of *Msx1* is not sufficient and molar tooth development arrests at the bud stage. *Barx1* and *Pax9* are proteins that physically interact

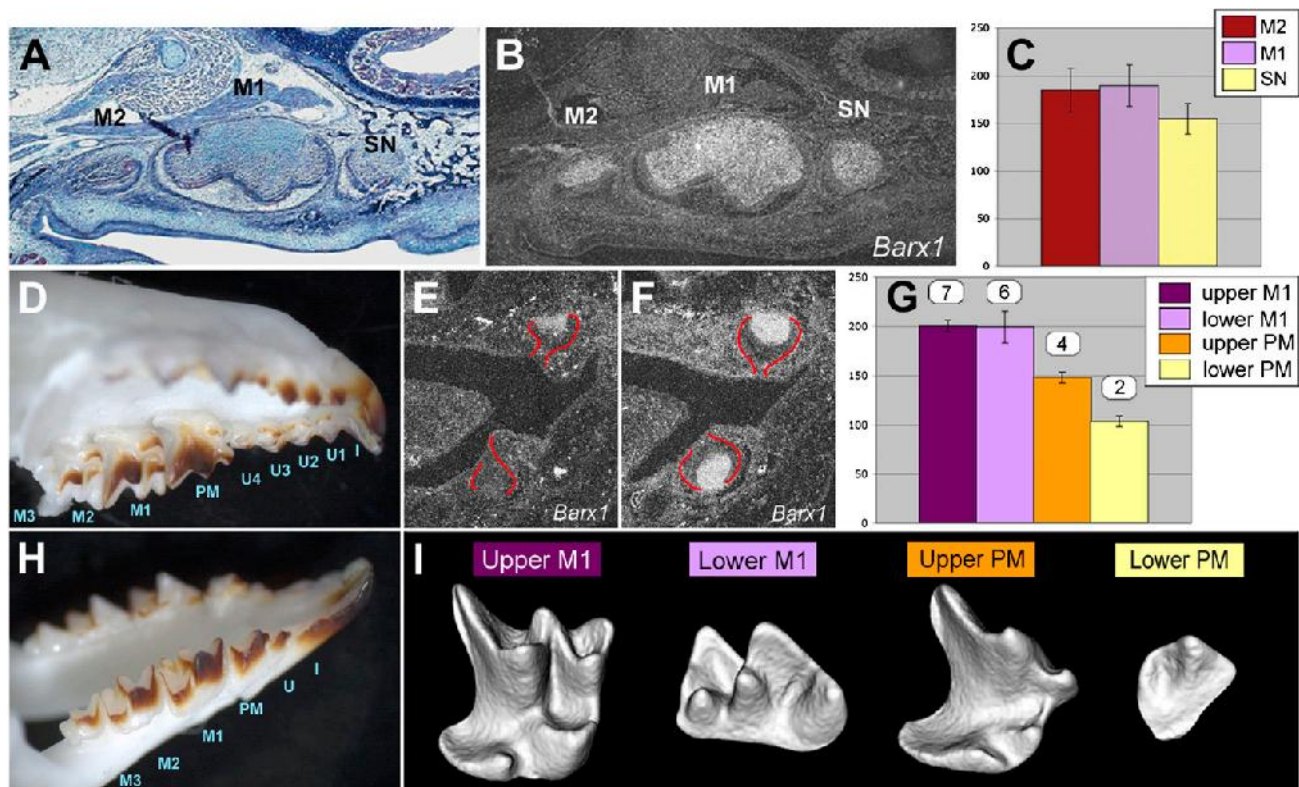


Fig. 6. *Barx1* is expressed in all multicusped teeth with expression levels correlating with cusp numbers. (A–C) Supernumerary teeth forming in the diastema of mice homozygous for *Tg737^{orp/k}* display *Barx1* expression levels lower than first and second molars. (A and B) Consecutive sagittal sections through the upper jaw of an E18.5 mouse homozygous for *Tg737^{orp/k}* showing from Left to Right a second molar (M2), first molar (M1), and supernumerary tooth (SN), the latter developing mesial to M1 in the normally toothless diastema. (A) Trichrome staining showing the premolar-like shape of the ectopic diastema tooth. (B) Radioactive in situ hybridization for *Barx1*. (C) Quantification of *Barx1* expression level in the dental mesenchyme of *Tg737^{orp/k}/Tg737^{orp/k}* second molar (M2), first molar (M1), and supernumerary tooth (SN). (D–I) Level of *cpBarx1* expression correlates with cusp number in shrew multicusped teeth. (D and H) Dentition of an adult shrew upper (D) and lower (H) jaw composed of molars (M), premolars (PM), unicusps (U), and incisors (I). (E and F) Radioactive in situ hybridization for *cpBarx1* in shrew premolars (E) and molars (F). Developing molars and premolars (outlined in red) have reached a cap stage. (G) Quantification of *Barx1* expression levels in the dental mesenchyme of shrew premolar and molar tooth primordia. Gene expression was quantified by analyzing consecutive sections spanning the whole dental papilla of each tooth using ImageJ 1.34s. The number of cusps and crests displayed by each tooth is indicated above their respective *Barx1* expression level. (I) 3D reconstructions of micro-CT scans of the upper and lower first molars (M1) and premolars (PM) of a 24-d-old shrew. Teeth are viewed from a lingual side; distal is Right and proximal Left. The number of cusps of each tooth (indicated in G) was carefully assessed by rotating the 3D models.

with *Msx1* to regulate BMP activity (17, 18). Whereas both *Msx1* and *Pax9* are required for development of both molars and incisors to proceed through the bud-to-cap transition (4, 15), the *Barx1*–*Msx1* interaction regulates or “fine-tunes” BMP activity only during molar development, and incisor development continues normally in the absence of *Barx1* and one allele of *Msx1*. This may indicate that either another protein carries out a *Barx1*-like function in incisors or that the *Msx1*–*Barx1* interaction is a molar-specific phenomenon. The latter would be consistent with the role of *Barx1* in fine-tuning BMP levels to ensure correct cusp formation, a process that is not necessary in cuspless incisors. This was confirmed by the observation of *Barx1* expression during development of premolars both in mutant mice and in the lesser shrew and lack of expression in canines (unicusps). However, the reduced *Barx1* expression in the development of the mandibular premolar of the shrew, whose crown has a reduced cusp number, shows that *Barx1* expression correlates with cusp development rather than tooth type (position).

The transformation of incisor crown shape into a molariform shape following ectopic expression of *Barx1* suggested that *Barx1* would have an essential role in molar crown morphogenesis (10, 12). Clearly, molar teeth are formed in the absence of *Barx1*, albeit via an abnormal developmental route. This may be explained by the fact that the absolute requirement for *Barx1* in molar tooth development is only fully manifested in the absence of an allele of *Msx1* (*Barx1*^{−/−}; *Msx*^{+/−}). Thus, the dominant role

of *Msx1* in regulating BMP4 masks the more subtle, but nevertheless essential role of *Barx1*. This phenomenon has parallels with what has been observed in kidney development where the essential role of *Gdnf*/Ret signaling is masked by loss of *Spry1* such that in *Gdnf*^{−/−}; *Spry1*^{−/−} and *Ret*^{−/−}; *Spry1*^{−/−} mice, kidney development shows only subtle alterations in branching (19). Thus, in kidney development, the balance of signaling pathway activities (*Gdnf*/Ret and FGF) is more important than the specific role of *Gdnf*.

Materials and Methods

Animals and Genotypes. *Barx1* mutant mice were made by homologous recombination targeting the *Barx1* gene region from part of exon 2 to before the 3′-UTR of exon 4, including the DNA binding homeodomain (Fig. S1 and ref. 13). *Barx1* mutant mice were bred into C57BL/6, 129SvEv, and CD1 breeding backgrounds for at least nine generations before analysis. A floxed-out allele of the *Barx1* mutant was made by crossing the ubiquitous Cre line β-actin–Cre with the targeted allele to remove the NeoR cassette (Fig. S1). PCR primer 1: 5′-CGCAGTGTCAAGTCCCACT, primer 2: 5′-CTATTCTGGAAA-GAGTAACGCACA, and primer 3: 5′-GAGACTAGTGAGACGTGCTACTCC were used for genotyping the *Barx1* mutants with the NeoR, which amplify a 358-bp fragment for the wild type and 445-bp for the mutant, at an annealing temperature of 62 °C. Primer 4: 5′-CTTGGGCCAGTAGGTAACCA was used instead of primer 3 to amplify a 565-bp fragment for the NeoR floxed-out allele.

Tg737^{orp/k} and *Msx1*^{−/−} mutant mice were produced as described previously (20, 21).

Time matings were set up such that noon of the day on which vaginal plugs were detected was considered as E0.5. All animal experiments were carried out in accordance with UK Home Office regulations.

In Situ Hybridization and Gene Expression Quantification. In situ hybridization was carried out with riboprobes labeled with radioactive ^{35}S -UTP or digoxigenin on 8- μm paraffin sections of paraformaldehyde-fixed tissue as previously described (22). Slides were counterstained with hematoxylin (Fluka) and examined in dark-field microscopy. Gene expression was quantified by using ImageJ 1.34s (23). For each multicusp tooth primordium, gene expression was analyzed in consecutive sections spanning the whole dental papilla. On each section, condensed mesenchyme of the dental papilla was outlined and white grains counted. A set of data were obtained for each multicusp tooth primordium. Mean of these values was plotted on a graph.

Generation of *C. parva* Shrew *Barx1* Probe. Total RNA was extracted from E16 *C. parva* shrew heads with TRIzol reagent (Invitrogen) and treated with DNA-free DNA removal kit (Ambion). *C. parva* shrew *Barx1* probe was generated by RT-PCR with degenerate primers 5'-GCNGCNGTNTTYAARTTYCC-3' and 5'-ACDATYTTYTTCAYTTCAT-3' using Access RT-PCR system (Promega). This was followed by one round of PCR with primers 5'-GCNGCNGTNTTYAARTTYCC-3' and 5'-TTYTGRTACCANGTYTTNACYTG-3'. Degenerate primers were designed from conserved amino acid alignments generated using ClustalW (24).

Microcomputed Tomography (micro-CT) Analysis. Specimens for micro-CT were scanned using a GE Locus SP micro-CT scanner. The specimens were immobilized using cotton gauze and scanned to produce 14- μm voxel size volumes. The specimens were characterized further by making 3D isosurfaces, generated and measured using Microview software (GE).

Immunostaining. Immunofluorescence assays were performed in C3H10T1/2 cells to detect endogenous expression of *Mx1* and *Barx1*. Cells were fixed using 4% PFA in PBS buffer for 5 min at room temperature, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 8 min at room temperature, then blocked with 10% normal goat serum for 45 min, and incubated with appropriate primary and FITC- or TRITC-conjugated secondary antibodies for 1 h or overnight. C3H10T1/2 cells were sequentially immunostained with anti-*Barx1* (H-55, rabbit polyclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology) and anti-*Mx1* antibody (rabbit polyclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology). For exogenous expressions of *Barx1*-EGFP (green fluorescence) and FLAG-*Mx1*, cotransfected cells were singly immunostained with anti-*Mx1* antibody for immunofluorescence. DRAG5 (1:1,000 dilution in PBS) was used to stain nuclear DNA (blue). Immunofluorescence was visualized and images were collected in sequential

scanning mode with a Leica TCS SP2 confocal microscope using different excitation wavelengths for green, red, and blue fluorescence.

Phospho-Smad1/5/8 (Cell Signaling Technology) and BrdU (Abcam) antibodies were used, respectively, with Tris buffer and citric acid antigen retrieval methods. Secondary antibodies conjugated with biotin or HRP (Vector) were used. Fluorescent signal was amplified with TSA Fluorescein system (PerkinElmer) and color reaction developed with ABC kit (Vector) using DAB.

BrdU Incorporation. A total of 20 mg/kg BrdU (BD) was i.p. injected and mice were killed after 1 h. Tissues were fixed in modified Carnoy's (60% ethanol, 30% of 37% formaldehyde, and 10% of glacial acetic acid) and processed and embedded in paraffin wax for immunostaining. In molars, BrdU⁺ cells were counted in the whole epithelium and three mesenchymal areas randomly picked, all four quadrants were counted. BrdU⁺ cells were counted in two mice for each genotype, at each time point. Student's *t* test statistical analyses were used for regional estimation of proliferating cells and apoptotic cells.

Transfections and Coimmunoprecipitation Assays. Murine mesenchymal cell line C3H10T1/2 (American Type Culture Collection; CCL-226) was cultured in high-glucose DMEM supplemented with 10% (vol/vol) FBS (Invitrogen). The cells in 60-mm dishes were cotransfected with plasmids of pRES2-*Barx1*-EGFP and pCMV-FLAG-*Mx1* or pRES2-*Barx1*-EGFP and pCMV-Tag2B (Stratagene) using FuGENE 6 reagent (Roche) according to manufacturer protocol. Each transfection was repeated three times independently. The plasmid construct pCMV-FLAG-*Mx1* expressed wild-type full-length *Mx1* tagged with FLAG epitope at the N terminus. The plasmid construct pRES2-*Barx1*-EGFP expressed a fusion protein *Barx1*-EGFP. After 36 h, C3H10T1/2 cells were lysed in RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate] with protease inhibitors (Roche), and proteins were immunoprecipitated by using EZview Red anti-FLAG M2 Affinity Gel beads (Sigma). The affinity gels were washed with the lysis buffer five times and eluted with 2 $\times$ SDS sample buffer. For Western blotting of eluted protein, primary antibodies were used with 1:500 dilution of rabbit anti-*Barx1* polyclonal antibody (Santa Cruz) or 1:1,000 dilution mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma). The immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblotting, using ECL Western blotting detection reagent (Fisher).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Benoit Robert for generously providing the *Mx1* mutant mice and Jeremy Green for helpful discussion and comments. Work in the United Kingdom was supported by the Wellcome Trust (P.T.S.) and Research Councils UK (I.M.). S.C.A. had a scholarship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) Foundation BEX 5408/10-5.

- Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I (1994) Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: Non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol* 38:463-469.
- Vaahokari A, Aberg T, Jernvall J, Keränen S, Thesleff I (1996) The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech Dev* 54:39-43.
- Andl T, et al. (2004) Epithelial Bmp1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. *Development* 131:2257-2268.
- Satokata I, Maas R (1994) *Mx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 6:348-356.
- MacKenzie A, Ferguson MW, Sharpe PT (1991) Hox-7 expression during murine craniofacial development. *Development* 113:601-611.
- Bei M, Kratochwil K, Maas RL (2000) BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of *Mx1* in tooth development. *Development* 127:4711-4718.
- Chen Y, Bei M, Woo I, Satokata I, Maas R (1996) *Mx1* controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development* 122:3035-3044.
- Zhang Y, et al. (2000) A new function of BMP4: Dual role for BMP4 in regulation of Sonic hedgehog expression in the mouse tooth germ. *Development* 127:1431-1443.
- Salazar-Ciudad I, Jernvall J (2010) A computational model of teeth and the developmental origins of morphological variation. *Nature* 464:583-586.
- Miletich I, Buchner G, Sharpe PT (2005) *Barx1* and evolutionary changes in feeding. *J Anat* 207:619-622.
- Tissier-Seta JP, et al. (1995) *Barx1*, a new mouse homeodomain transcription factor expressed in cranio-facial ectomesenchyme and the stomach. *Mech Dev* 51:3-15.
- Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT (1998) Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* 282:1136-1138.
- Kim BM, Buchner G, Miletich I, Sharpe PT, Shivdasani RA (2005) The stomach mesenchymal transcription factor *Barx1* specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling. *Dev Cell* 8:611-622.
- Ohazama A, et al. (2009) Primary cilia regulate Shh activity in the control of molar tooth number. *Development* 136:897-903.
- Peters H, Neubüser A, Kratochwil K, Balling R (1998) Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 12:2735-2747.
- Song Y, et al. (2006) Application of lentivirus-mediated RNAi in studying gene function in mammalian tooth development. *Dev Dyn* 235:1334-1344.
- Ogawa T, Kapadia H, Wang B, D'Souza RN (2005) Studies on Pax9-*Mx1* protein interactions. *Arch Oral Biol* 50:141-145.
- Ogawa T, et al. (2006) Functional consequences of interactions between Pax9 and *Mx1* genes in normal and abnormal tooth development. *J Biol Chem* 281:18363-18369.
- Michos O, et al. (2010) Kidney development in the absence of Gdnf and Spry1 requires Fgf10. *PLoS Genet* 6:e1000809.
- Moyer JH, et al. (1994) Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. *Science* 264:1329-1333.
- Houzelstein D, Cohen A, Buckingham ME, Robert B (1997) Insertional mutation of the mouse *Mx1* homeobox gene by an nlacZ reporter gene. *Mech Dev* 65:123-133.
- Wilkinson DG (1992) *In Situ Hybridization: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford).
- Rasband W (1997-2006) ImageJ (Nat'l Inst Health, Bethesda).
- Chenna R, et al. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497-3500.

Supporting Information

Miletich et al. 10.1073/pnas.1112801108

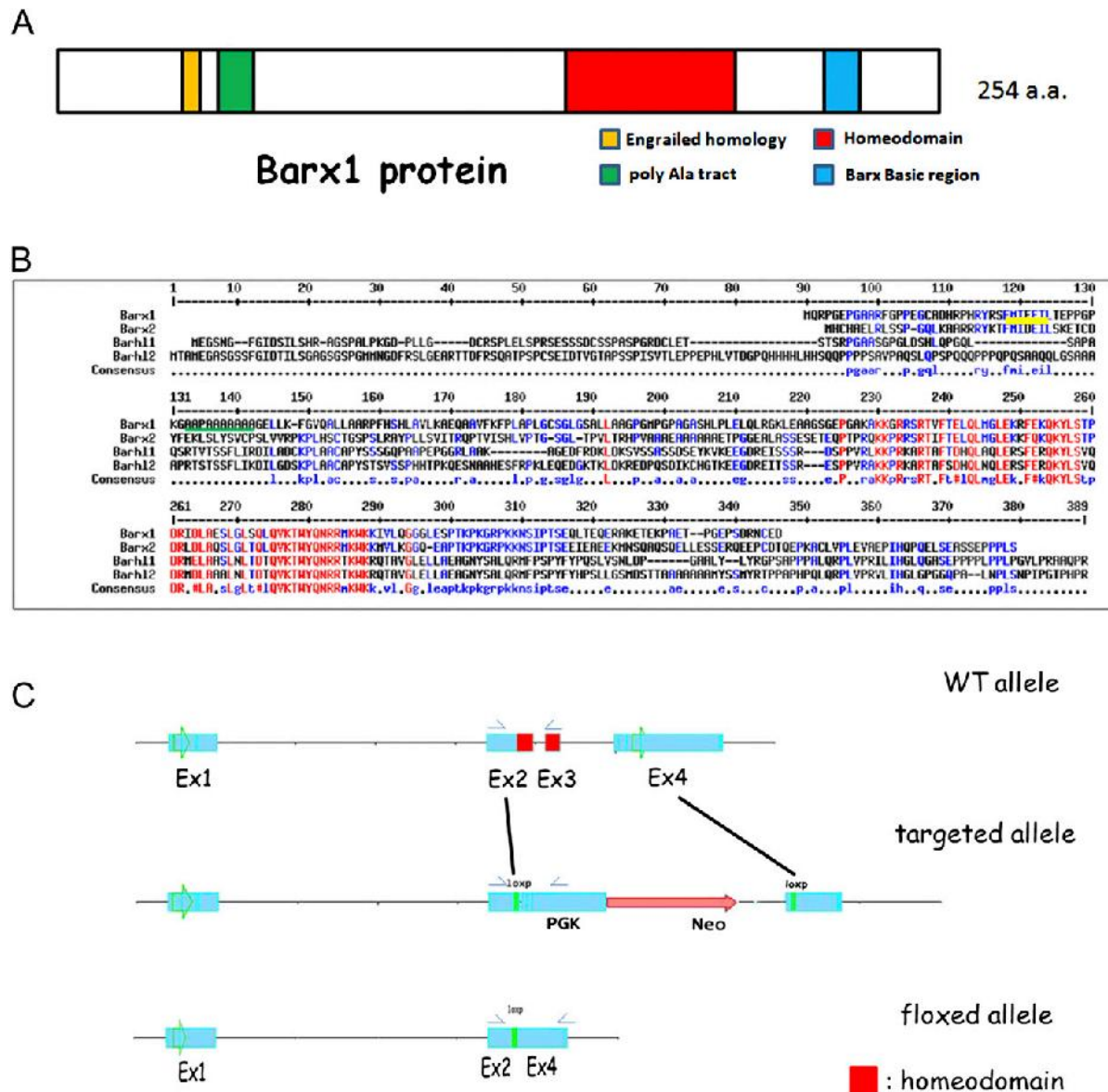


Fig. S1. Generation of *Barx1* knockout mice. (A) Schematic representation of *Barx1* protein showing localization of conserved domains. (B) Homeodomain of *Barx1* is 95.2% identical to *Barx2* and 72.6% to *Barh1* and *Barh2*. There are other homologous regions between *Barx1* and *Barx2* such as the Engrailed homology domain and the Barx basic region (BBR). (C) *Barx1* locus was targeted with a PGK-Neo cassette to replace exon 2–exon 4 of the gene in a 129Sv BAC clone, leading to the deletion of the whole homeodomain and the BBR. To verify that the targeted mutation resulted in a null allele, we used a riboprobe that recognized the 3' end of the nontargeted *Barx1*-encoding region to detect any mRNA expression during embryo development. mRNA-encoding *Barx1* homeodomain and BBR was no longer expressed in the *Barx1* mutant mice at E10.5. *Barx1* mutants were recovered from the intercross matings at the expected Mendelian ratio until birth and all *Barx1* KO pups died shortly after birth due to a fully penetrant cleft palate phenotype. To eliminate the possibility that the neo cassette in the targeted allele might interfere with *Barx1* function, we crossed the mice with β -actin-Cre mice. The resulting *Barx1*^{-/-}/*Neo*^{-/-} animals were indistinguishable from *Barx1*^{-/-}/*Neo*^{+/+}.

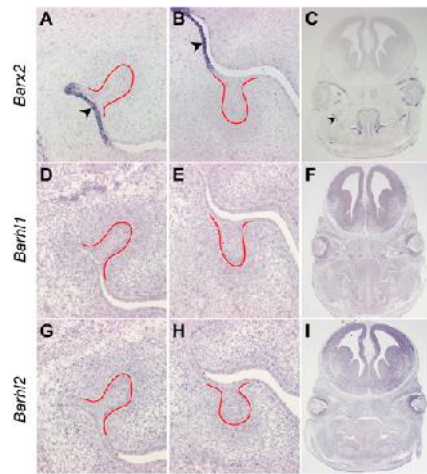


Fig. S2. Expression of *Barx2*, *Barhl1*, and *Barhl2* at E13.5 in molar tooth buds and other craniofacial structures at the level of the first molars. In situ hybridization for *Barx2* (A–C), *Barhl1* (D–F), and *Barhl2* (G–I) on frontal sections of E13.5 WT heads. (A) *Barx2* is not expressed in upper (A) and lower (B) molar tooth buds, although it is expressed in the oral epithelium flanking the lower first molar on the buccal side (A–C, arrowhead). Only background staining can be observed at the level of the first molars with *Barhl1* (D and E) and *Barhl2* (G and H) riboprobes. However, expression of *Barhl1* and *Barhl2* can be detected in the brain (F and I) as previously reported (1, 2). Upper and lower first molar tooth buds are outlined in red.

1. Bulfone A, et al. (2000) *Barhl1*, a gene belonging to a new subfamily of mammalian homeobox genes, is expressed in migrating neurons of the CNS. *Hum Mol Genet* 9:1443–1452.
2. Mo Z, Li S, Yang X, Xiang M (2004) Role of the *Barhl2* homeobox gene in the specification of glycinergic amacrine cells. *Development* 131:1607–1618.



PNAS Permissions <PNASPermissions@nas.edu>
Para: simone caixeta <simonecaixeta@gmail.com>

24 de janeiro de 2012 13:17

Dear Simone Caixeta de Andrade,

Authors need not obtain permission for the following uses of material they have published in PNAS: (1) to use their original figures or tables in their future works; (2) to make copies of their papers for their classroom teaching; or (3) to include their papers as part of their dissertations.

Of course, citation to the original source should be included and copies should include the copyright notice of the original report (full journal references).

Please feel free to contact us with any additional questions you might have.

Thank you!

Best regards,

Kelly Gerrity for

Diane Sullenberger

Executive Editor

PNAS

APÊNDICE 2



The Anatomical Record

The role of modularity in the evolution of primate postcanine dental formula: integrating jaw space with patterns of dentition.

Journal:	<i>Anatomical Record</i>
Manuscript ID:	AR-11-0158.R1
Wiley - Manuscript type:	Full Length Article
Date Submitted by the Author:	31-Jan-2012
Complete List of Authors:	Ribeiro, Mariana; Faculty of Odontology of Piracicaba / UNICAMP, Department of Morphology de Andrade, Simone; Faculty of Odontology of Piracicaba / UNICAMP, Morphology de Souza, Ana Paula; Faculty of Odontology of Piracicaba / UNICAMP, Morphology Line, SRP; Faculty of Odontology of Piracicaba / UNICAMP, Morphology
Keywords:	Primates, evolution, dentition, developmental field

SCHOLARONE™
Manuscripts

Title: The role of modularity in the evolution of primate postcanine dental formula: integrating jaw space with patterns of dentition.

Running head: Variations in primate postcanine dentition.

Authors: Mariana M. Ribeiro, Simone C. de Andrade, Ana Paula de Souza, Sergio R. P. Line*

Address: Department of Morphology, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, 13414-900. Piracicaba SP, Brazil.

*Corresponding author: +551921065333; (fax) +551934210144

Correspondence (e-mail sergioline@fop.unicamp.br)

Financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES and FAPESP Grant number: 2004/10994-4.

Abstract

The assembly of a phenotype into modules or developmental fields, which are semi-autonomous units in development and function, seems to be one of the strategies to increase the capacity to produce phenotypic variation. In mammals the upper dentition is formed on two distinct developmental units, wherein incisors are formed on the primary palate, which is derived from the embryonic frontonasal process, and the other teeth (canine, premolar and molar) are formed on the alveolar bone, which is derived from the maxillary process (termed herein as PALATE2). The aim of the present work was to analyse the variations in size and number of premolar and molar teeth in primate dentition and to correlate these morphometrical parameters with the relative size of these tooth classes with respect to PALATE2. Furthermore, we seek to understand to what extent the changes in the relative size of premolar and molar fields can influence the size of each tooth within its respective field, and how these parameters connect with the variations in the dental formula that occurred during primate evolution. The data presented here not only indicate that premolar and molar fields can be seen as submodules of a larger and hierarchically superior module (i.e. PALATE2), but also present quantitative parameters that allow us to understand how variations in the relative size of premolar and molar fields can influence the size of each tooth within its field, and how these parameters connect with the variations in the dental formula that occurred during primate evolution.

Key words: Primates, evolution, dentition, developmental field.

Introduction

One of the major goals of evolutionary biology is to identify the mechanisms and forces responsible for phenotypic variation. The assembly of a phenotype into modules or developmental fields, which are semi-autonomous units in development and function, seems to be one of the strategies to increase species' capacity to produce phenotypic variation. The concept of modular evolution has been largely used in evolutionary developmental biology (evo-devo) studies, and has helped to increase our understanding of how the evolution of morphological traits can be influenced by developmental process (Klingenberg et al., 2003; Klingenberg, 2009; Laffont et al., 2009). The concept of module has been defined in several ways, but generally it may be defined as a self-organizing morphologic trait (e.g. eye field, limb field, dental field), which differentiates in response to several inductive genetic factors. A developmental field is composed by a group of cells able to respond as a coordinated unit to discrete, localized biochemical signals leading to the development of specific morphological structures or organs. Although a module is highly integrated internally and relatively independent from other modules, as a part of a higher order hierarchical organization, they must connect and interact with other parts of the system. The fact that a module may sometimes split into submodules, as seen in the development of many serially homologous structures such as vertebrate limbs (Chiu and Hamrick, 2002), teeth (Stock, 2001) and vertebrae (Buchholtz et al., 2007) shows that these structures are not totally independent units (Klingenberg, 2010).

Teeth are an important model in the field of evolutionary developmental biology (Jernvall et al., 2000). Mammalian dentition fits within the concept of modularity. Based on discontinuous shape patterns within the dentition and independent shape changes in evolution mammalian dentition has been divided into incisor, canine, premolar and molar fields (Butler, 1939; Dahlberg, 1945; Townsend et al., 2009). The morphological evidence for the existence of the dental field has been supported by gene expression analysis of dental development in mice (McCollum and Sharp, 2001). The modularity of mammalian dentition has been demonstrated by analyzing families with mutations in genes that affect the pattern

of dentition in humans (Line, 2001, 2003), and more recently by studies showing that the relative size and number of molar teeth can be predicted by interactions that occur exclusively among developing teeth within this field (Kavanagh et al., 2007; Renvoisé et al., 2008).

Most experimental studies that use mammalian dentition as a model to connect development and evolution have focused on the size and shape variations of molar teeth, considering this region as an isolated and independent module (Kavanagh et al., 2007; Renvoisé et al., 2008; Koh et al., 2010). It is worth mentioning that the upper dentition is formed on two distinct developmental processes (Lumsden and Buchanan, 1986). Upper incisors are formed on the primary palate (premaxilla), derived from the embryonic frontonasal process, whereas canine, premolar and molar classes are formed on the maxillary process derived from the first pharyngeal arch (Nanci, 2007). Therefore, premolar and molar modules can be seen as part of a larger and hierarchically superior module (i.e. the alveolar process derived from the maxillary process, termed herein as PALATE2). Although the relative sizes of molar teeth are dependent on the effect of local factors, it is plausible that the absolute size and number of posterior teeth will also be related to more general factors such as the size and shape of the jaws and the space required by other tooth classes. Furthermore, in the present work we seek to understand to what extent the changes in the relative size of premolar and molar fields can influence the size of each tooth within its respective field, and how these parameters connect with the variations in the dental formula that occurred during primate evolution.

Materials and methods

Scaled cranial photographs of 85 primates were obtained from a mammalian cranial photographic archive (<http://macro.dokkyomed.ac.jp/mammal/en/mammal.html>). The photographs with the anatomical inferior view, where the palatine plane was set horizontally, correspond to the occlusal plane formed by the maxillary molar and premolar tips. (Takahashi, H. et al., 2006).

In this study eleven families of primates were included, one specimen of each species. Species were classified according to Groves, 2001. Figure 1 in supplemental material describes the families and species included in this paper. In order to minimize sexual dimorphisms in dental variability only male's skulls were chosen. The specimens were classed into 3 groups that represents the three patterns of dentition found within the primates studied: (1) 3PM2M which corresponds to species with 3 premolars and 2 molars; (2) 3PM3M corresponding to species with 3 premolars and 3 molars; and (3) 2PM3M species which have 2 premolars and 3 molars (Supplemental figure 1).

The Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) was used for the measurements of upper jaw and teeth. Each premolar (PMnL) and molar (MnL) length was measured by the maximum mesiodistal diameter taken on the occlusal surface between the mesial and distal contact points using the straight line tool. Premolar tooth-row length (PML) and molar tooth-row lengths (ML) were obtained by measuring the distance from the mesial contact point of the first tooth (second, third premolar, PM2 or PM3 for premolar and first molar, M1 for molar teeth) to the distal contact point of the last tooth (fourth premolar or PM4 for premolar teeth and second, third molar or M2, M3 for molar teeth). The alveolar process derived from the embryonic maxillary process (PALATE2) was the distance from the mesial surface of the canine to the last premolar measured using the straight line tool in Image J, plus molar tooth-row length (ML). Dimensions were obtained by the average of the left and right sides in each specimen analyzed. More detailed information about the measurements can be seen in Figure 1.

The analysis performed in this study used the following parameters:

PMnL vs. PML

MnL vs. ML

PML/PALATE2 vs. PMnL/PML

ML/PALATE2 vs. MnL/ML

(PML = length of premolar tooth-row, ML = length of molar tooth-row, PALATE2 = length of alveolar process derived from the maxillary process, n = tooth of position (i.e. = 1, 2 or 3 for molars, or 2, 3, 4 for premolars). Therefore, PML/PALATE2 is the size of premolar teeth relative to PALATE2. PMnL/PML is the size of each premolar tooth relative to the premolar tooth row. Accordingly, ML/PALATE2 is the size of molar teeth relative to PALATE2. MnL/PML is the size of each molar tooth relative to the molar tooth row.

Student's t (parametrical) or Mann Whitney (non-parametrical) tests were used to compare values among the different groups. Pearson correlation analysis was used to estimate the association between body mass and relative molar size. Linear regression analysis was used to obtain the slope (β coefficient) of the regression line (least-squares method). All statistical calculations were performed using the BioEstat statistical package (<http://www.mamiraua.org.br>). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

a) The variation rate in the relative sizes for each post-canine tooth is dependent on the pattern of dentition.

In this analysis we seek to understand how the variations in the size of premolar and molar fields are related to the variation in each tooth size within its respective field, and if the pattern of variation is related to the dentition pattern.

When the MnL data were plotted against ML it was possible to observe that the three patterns of postcanine dentition (3PM2M, 3PM3M, and 2PM3M) had distinct patterns of molar variation (figure 2), as shown by the slope of regression line (β) (table 1). As expected, 3PM2M animals had the highest β coefficients (i.e. angle of the regression slope relative to x axis), since these animals have only 2 molars to fit in the molar field. In the 2PM3M animals the smallest β coefficient was that of M1 (0.30) were M2 and M3 had approximately similar

coefficients (0.34 and 0.35, respectively, table 1). In the 3PM3M group M1 and M2 had higher β values (0.38) than M3 (0.29).

Similar to molars, the analysis of premolar field, presented in figure 3, showed that 2PM3M animals had the highest β coefficients, since these animals have only 2 premolars to fit in the premolar field. In 3PM2M animals the highest β coefficient was of PM2 (0.38), while in 3PM3M animals this tooth presented the smallest β coefficient (0.31) (table 2).

b) Variations in the relative sizes of molar and premolar fields in relation to secondary palate size.

The aim of this analysis is to observe how the relative sizes of premolar and molar fields are associated with the pattern of dentition. When the MnL/ML vs. ML/PALATE2 data were plotted it was possible to observe that the three patterns of dentition (3PM2M, 3PM3M, and 2PM3M) could be distinguished from one another (Figure 4), the distinction was more evident when observing the M1L/ML vs. ML/PALATE2. Table 3 presents all the ML/PALATE2 ratios.

The MnL/ML ranges also differed among the three patterns of posterior dentition. The means of the M1L/ML ratios in 3PM2M, 3PM3M, and 2PM3M groups were 0.59, 0.38 and 0.32, respectively ($p < 0.05$, when compared in pairs by the Mann-Whitney test). Variations in the M2/ML ratios were smaller than M1/ML and M3/ML. The means for the M2/ML ratios of 3PM3M, 3PM2M and 2PM3M groups were 0.41, 0.36 and 0.36, respectively.

Loss of M3 in the family Callithrichidae (3PM2M) was accompanied by steep increase in the M1L/ML ratios compared with animals with M3. A smaller increase in the M2L/ML ratio was also noted (Figure 4). Despite some overlapping in the ML/PALATE2 ratio among the 3 groups of primates there was a clear association between the relative size of the molar region in relation to PALATE2 (ML/PALATE2) and the presence or absence of the M3 and PM2. Species lacking upper M3 have a ML/PALATE2 ratio smaller than 0.4, while species

with ML/PALATE2 ratio larger than 0.49 tend to lack PM2 ($p < 0.0001$, Mann-Whitney). Within species having M3 the animals with 3 premolars (3PM3M) tend to have M1 considerably larger than M3, whereas animals with 2 premolars (2PM3M) tend to have M1 of the same size or slightly smaller than M3 (Figure 4).

When the PMnL/PML vs. PML/PALATE2 data were plotted it was possible to observe that 3PM2M, 3PM3M, and 2PM3M animals presented clearly distinct PML/PALATE2 ranges ($p < 0.05$, when compared in pairs by the Mann-Whitney test) (Figure 3). Table 3 presents all the PML/PALATE2 ratios.

Different from molars the PMnL/ML ranges were similar for animals with 3PM2M and 3PM3M but were significantly smaller than 2PM3M ($p < 0.05$, when compared in pairs with the Mann-Whitney test). The means of the PM2L/PML ratios in 3PM2M and 3PM3M groups were 0.34, 0.34 respectively. Variations in the PM3L/PML and PM4/PML ratios were smaller than PM2/PML. The means for the PM3L/PML ratios of 3PM2M, 3PM3M, and 2PM3M groups were 0.33, 0.33 and 0.50, respectively; and for the PM4L/PML ratios of 3PM2M, 3PM3M, and 2PM3M groups were 0.33, 0.33 and 0.50, respectively.

Loss of PM2 in 2PM3M animals was accompanied by steep increase in the PM3L/ML and PM4L/ML ratios (Figure 5). There is a limit for the relative size of the premolar region in relation to the secondary palate (PML/PALATE2) that determines the presence of the PM2. Species lacking upper PM2 have a PML/PALATE2 ratio smaller than 0.32. Figure 6 shows representative drawings of the relative sizes of the teeth in the three types of postcanine dentition (3PM2M, 3PM3M, and 2PM3M) found in primates.

Discussion

Molar teeth have a major role in the masticatory process, as they are the major elements responsible for crushing and grinding. It has been shown that the relative sizes of molar teeth depend on the interactions between activators and inhibitors during tooth development, where inhibitors are diffusible molecules secreted by the predecessor tooth germ. Inhibitors will delay the initiation of tooth development, resulting in smaller teeth (Kavanagh et al., 2007). Accordingly, since the first molar is the first permanent tooth to develop in the primate postcanine dentition, this tooth will have a major role on the development of its successor teeth. A relatively large M1L/ML ratio would result in small M2 and very small or absent M3 (ex: Callithrichidae, Kavanagh et al., 2007), leading to small ML/PALATE2. Animals with small ML/PALATE2 ratio have relatively large PML/PALATE2 ratio and 3 premolars. On the other extreme are the animals with small M1/ML ratio (ex: Pongidae). These animals have relatively larger M2 and M3 with an increased ML/PALATE2 ratio resulting in reduced PML/PALATE2 ratio, explaining the presence of only 2 premolars. In this sense the premolar and molar fields can be seen as submodular structures that function as an integrated part within a larger module (i.e. PALATE2). Interestingly, the number of premolar teeth can be predicted with a high degree of certainty by simply measuring the animal's M1L/ML ratio. Thirty four out of the 37 animals (91.9%) with 3 premolars had a M1L/ML ratio greater than 0.36, and 45 out of the 47 species (95.7%) with 2 premolars had a M1L/ML ratio smaller than 0.36. It is likely that this association is related to the important functional and developmental roles played by this tooth. The quantitative analyses presented here not only fit within the model of molar proportions presented by Kavanagh et al., (2007), but also helped connect this model with previous studies suggesting that molar initiation and growth must occur in concert with jaw growth. (Osborn, 1978; Dean and Beynon, 1991; Tompkins 1996). As stated by Boughner and Dean (2004), the permanent molars are the only teeth for which no space is created or maintained in the jaws by deciduous precursors.

Although we have used only one specimen for each species our results clearly show that the specimens with similar pattern of dentition are clustered together. Additionally, it is important to mention that the present work analyses the ratio between dental and maxillary sizes in a same specimen. It has been shown that the ratios between postcanine parameters show small interspecies variation in primates (Pirie, 1978), and it is plausible to assume that ratios in postcanine region will present even smaller intraspecies variation.

The first primates are believed to have appeared during the beginning of the Eocene at approximately 55 m.y. ago (Franzen et al., 2009). The diversification of primate species seems to have been strongly influenced by the adaptation to new diet-based adaptive zones (Sussman, 1991; Fleagle, 1999). Diet has been strongly associated with absolute size differences in primates, as it will impose metabolic and foraging constraints (Marroig and Cheverud, 2005; Marroig, 2007). The shape and relative size of postcanine dentition in primates seems to be influenced by dietary constraints, such as food size, shape, abrasiveness and protein levels (Kay, 1975; Pirie, 1978; Lucas et al., 1986). Our results show that the variation in the pattern of primate dentition is directly correlated with the relative size of molar field. Accordingly, the posterior dentition of primitive primates was composed of 3 premolars and 3 molars (3PM3M). The loss of M3 in Callitrichids has been associated with emphasis on incisal biting and consequent decrease of selective pressure on postcanine dentition (Ford, 1980; Anapol and Lee 1994). Likewise, selective pressure for high crushing and grinding efficiency are likely to be associated with relative larger molar regions, and consequent loss of PM2. Within a certain range, the variations in the relative length of premolar or molar fields (PM/PALATE2 or ML/PALATE2) are accomplished by an increase or decrease in the lengths of the teeth within its field. The relative size of each tooth within its field (PMnL/ML or MnL/ML) showed a distinct rate of variation, and the variation rate for a tooth depends on the pattern of postcanine dentition. When the relative length of the field reaches a threshold limit, the accommodation of posterior teeth in the maxillary region is achieved by the loss of PM2 and an increase in the relative size of M3 (M3L/ML ratio, upper threshold limit), or by the loss of M3 and an increase in the relative size of M1 (M1L/ML ratio, lower threshold limit). It is worth mentioning that *Tarsius* is the major exception in this

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

rule, where the increase in ML/PALATE2 ratio to 0.56 did not cause the loss of M3. In fact, *Tarsius*' dentition was shown to be unusual among primates. *Tarsius* molar teeth fall well above the general tooth size versus body mass scaling axis of primates, and are more similar to the insectivore's scaling axis, a position consistent with their insectivorous habits (Gingerich, 1984). This indicates that the developmental programming that regulates the relative size of postcanine teeth may differ among mammalian orders, and the predictions made here by the analysis of primate dentition may not apply to all mammals. It is possible that other mammals that have similar dietary behaviors to other, less insectivorous primates will fit the predictions better than tarsiers.

In summary, the quantitative analysis presented here allow us to understand to what extent the changes in the relative size of premolar and molar fields can influence the size of each tooth within its respective field, and how these parameters are connected with the variations in the dental formula that occurred during primate evolution.

Acknowledgments

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES and FAPESP
Grant 2004/10994-4 for financial support.

For Peer Review

Literature cited

Anapol F, Lee S. 1994. Morphological adaptation to diet in platyrrhine primates. *Am J Phys Anthropol* 94(2):239-61.

Boughner JC, Dean MC. 2004. Does space in the jaw influence the timing of molar crown initiation? A model using baboons (*Papio anubis*) and great apes (*Pan troglodytes*, *Pan paniscus*). *J Hum Evol* 46:253-275.

Buchholtz EA, Booth AC, Webbink KE. 2007. Vertebral anatomy in the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*: a developmental and evolutionary analysis. *Anat Rec (Hoboken)* 290(6):624-637.

Butler PM. 1978. The ontogeny of mammalian heterodonty. *J Biol Buccale* 6:217-227.

Chiu CH, Hamrick MW. 2002. Evolution and Development of the Primate Limb Skeleton. *Evolutionary Anthropology* 11:94–107.

Dahlberg AA. 1945. The changing dentition of man. *J Am Dent Assoc* 32:676-90.

Dean, MC, Beynon AD. 1991. Tooth crown heights, tooth wear, sexual dimorphism and jaw growth in hominoids. *Z Morphol Anthropol* 78:425-440.

Fleagle JG. 1999. Primate adaptation and evolution. Academic Press, New York.

Ford SM. Callitrichids as phyletic dwarfs, and the place of the callitrichidae in platyrrhini. *Primates*. 21(1):31-43.

Franzen JL, Gingerich PD, Habersetzer J, Hurum JH, Von Koenigswald W, Smith BH. 2009. Complete primate skeleton from the Middle Eocene of Messel in Germany. Morphology and paleobiology. *PLoS One* 4: e5723.

1
2
3
4 Gingerich PD, Smith BH. 1984. Allometric scaling in the dentition of primates and
5 insectivores. *Size and Scaling in Primate Biology*: 257–272.
6
7

8
9
10 Groves C. 2001. *Primate taxonomy*. 1 st ed. Washington: Smithsonian Books.
11

12
13 Kavanagh KD, Evans AR, Jernvall J. 2007. Predicting evolutionary patterns of mammalian
14 teeth from development. *Nature* 449: 427-432.
15
16

17
18
19 Kay RF. 1975. The functional adaptations of primate molar teeth. *Am J Phys Anthropol* 43:
20 195-216.
21
22

23
24
25 Klingenberg CP, Mebus K, Auffray JC. 2003. Developmental integration in a complex
26 morphological structure: how distinct are the modules in the mouse mandible? *Evol Dev*
27 5(5):522-531.
28
29

30
31
32
33 Klingenberg CP. 2009. Morphometric integration and modularity in configurations of
34 landmarks: tools for evaluating a priori hypotheses. *Evol Dev* 11(4):405-421.
35
36

37
38
39 Klingenberg CP. 2010. Evolution and development of shape: integrating quantitative
40 approaches. *Nat Rev Genet* 11(9):623-635.
41
42

43
44
45 Koh C, Bates E, Broughton E, Do NT, Fletcher Z, Mahaney MC, Hlusko LJ. 2010. Genetic
46 integration of molar cusp size variation in baboons. *Am J Phys Anthropol* 142(2):246-260.
47
48

49
50
51 Laffont R, Renvoisé E, Navarro N, Alibert P, Montuire S. 2009. Morphological modularity and
52 assessment of developmental processes within the vole dental row (*Microtus arvalis*,
53 *Arvicolinae*, *Rodentia*). *Evol Dev* 11(3):302-311.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Line SRP. 2001. Molecular morphogenetic fields in the development of human dentition. *J Theor Biol* 211: 67-75.

Line SRP. 2003. Variation of tooth number in mammalian dentition: connecting genetics, development, and evolution. *Evol Dev* 5: 295-304.

Lucas PW, Corlett RT, Luke DA. 1986. Postcanine tooth size and diet in anthropoid primates. *Z Morphol Anthropol* 76: 253-276.

Lumsden AG, Buchanan JA. 1986. An experimental study of timing and topography of early tooth development in the mouse embryo with an analysis of the role of innervation. *Arch Oral Biol* 31(5):301-311.

Marroig G, Cheverud JM. 2005. Size as a line of least evolutionary resistance: diet and adaptive morphological radiation in New World monkeys. *Evolution* 59(5):1128-1142.

Marroig G. 2007. When size makes a difference: allometry, life-history and morphological evolution of capuchins (*Cebus*) and squirrels (*Saimiri*) monkeys (Cebinae, Platyrrhini). *BMC Evol Biol* 14;7:20.

McCollum M., Sharpe PT. 2001. Evolution and development of teeth. *Journal of Anatomy* 199:153-9.

Nanci A. 2007. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function. 7 th ed. Missouri: Elsevier.

Osborn JW. 1978. Morphogenic gradients: fields versus clones. In: Development, function and evolution of teeth. 1st ed. New York: Academic Press.

Pirie PL. 1978. Allometric scaling in the postcanine dentition with reference to primate diets. *Primates* 19: 583-591.

Renvoisé E, Evans AR, Jebrane A, Labruere C, Laffont R, Montuire S. 2008. Evolution of mammal tooth patterns: new insights from a developmental prediction model. *Evolution* 63: 1327-1340.

Stock DW. 2001. The genetic basis of modularity in the development and evolution of the vertebrate dentition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 1633-1653.

Sussman RW. 1991. Primate origins and the evolution of angiosperms. *Am J Primatol* 23(4):209-223.

Takahashi H, Yamashita M, Shigehara N. 2006. Cranial photographs of mammals on the web: the Mammalian Crania Photographic Archive (MCPA2) and a comparison of bone image databases. *Anthropological Science* 114: 217-222.

Tompkins RL. 1996. Human population variability in relative dental development. *Am J Phys Anthropol* 99:79-102.

Townsend G, Harris EF, Lesot H, Clauss F, Brook A. 2009. Morphogenetic fields within the human dentition: a new, clinically relevant synthesis of an old concept. *Arch Oral Biol* 54: Suppl 1:S34-44

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Tables

Table 1. Molars’ β coefficients.

Table 2. Premolars’ β coefficients.

Table 3. ML/PALATE2 and PML/PALATE2 ratios.

For Peer Review

Figure Legends

Figure 1. Scheme of the cranial measurements performed in this study. Where, PML = length of premolar tooth-row, ML = length of molar tooth-row, PALATE2 = length of alveolar process derived from the maxillary process, n=tooth of position (i.e. =1, 2 or 3 for molars, or 2, 3, 4 for premolars).

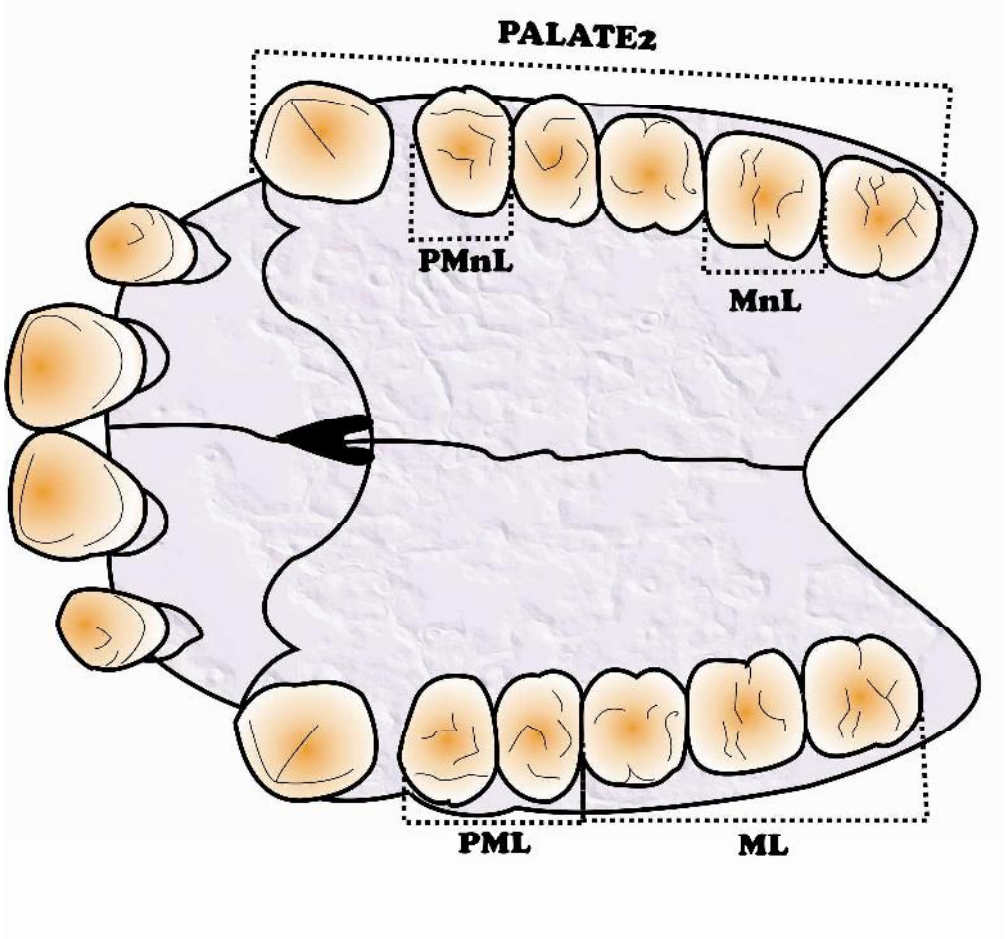
Figure 2. Bivariate plots and best fit regression lines of each molar versus molar length showing distinct patterns of molar variation.

Figure 3. Bivariate plots and best fit regression lines of each premolar versus premolar length showing distinct patterns of premolar variation.

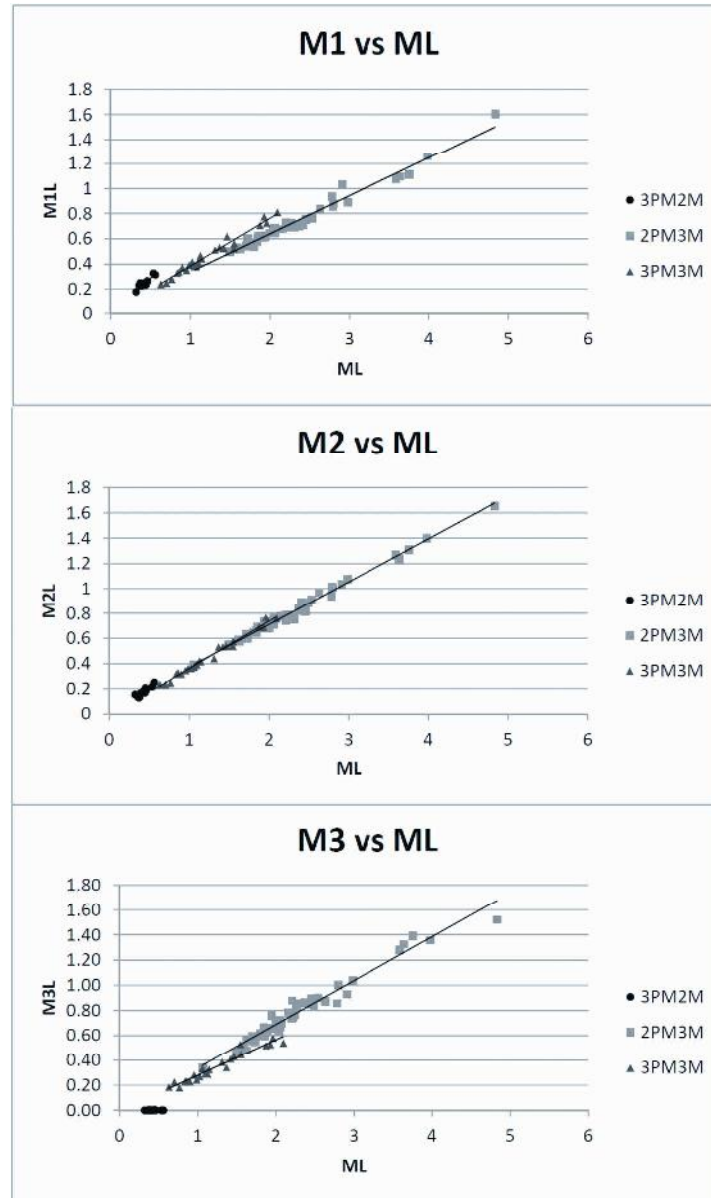
Figure 4. Dot plot analysis and best fit regression lines of molar length variation within the species with 3 premolars and 2 molars (3PM2M), 3 premolars and 3 molars (3PM3M), and 2 premolars and 3 molars (2PM3M).

Figure 5. Dot plot analysis and best fit regression lines of premolar length variation within the species with 3 premolars and 2 molars (3PM2M), 3 premolars and 3 molars (3PM3M), and 2 premolars and 3 molars (2PM3M).

Figure 6. Representative drawings of the three dentition patterns in the primates studied. A. maxilla of species with relatively large molar region ($ML/PALATE2 > 0.49$). B. maxilla of species with intermediate molar region size ($0.40 < ML/PALATE2 < 0.51$). C. maxilla of species with relatively small molar region ($ML/PALATE2 < 0.40$).

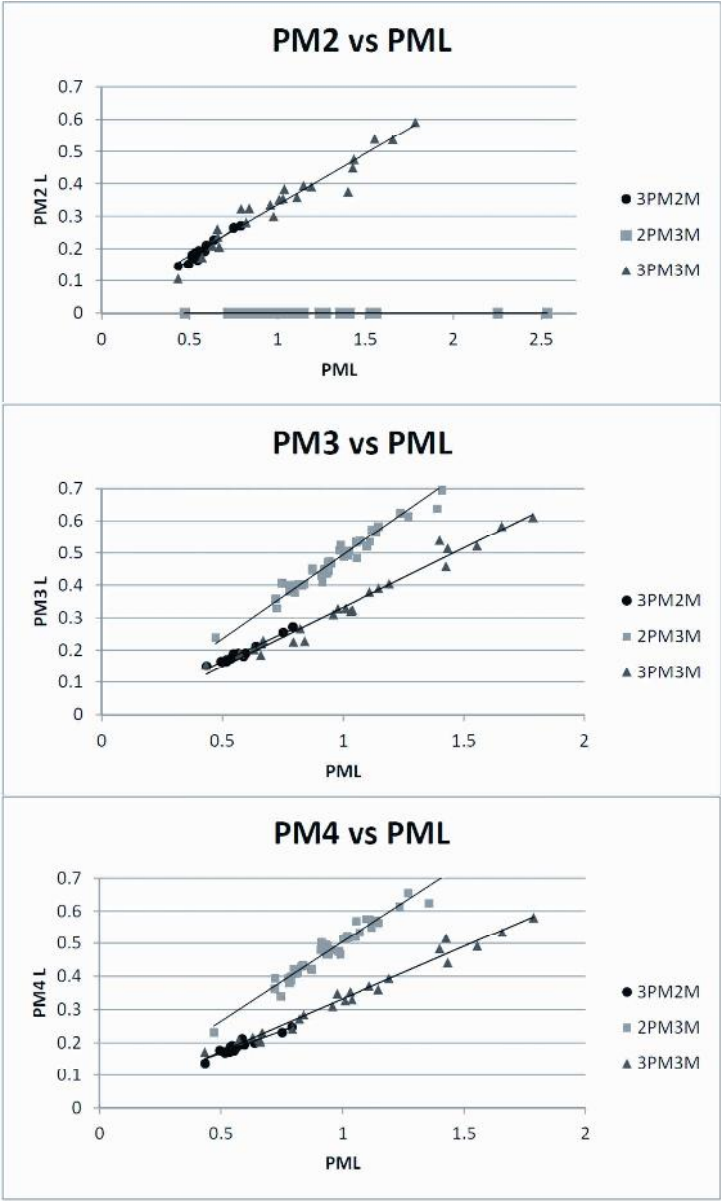


Scheme of the cranial measurements performed in this study. Where, PML = length of premolar tooth-row, ML = length of molar tooth-row, PALATE2 = length of alveolar process derived from the maxillary process, n=tooth of position (i.e. =1, 2 or 3 for molars, or 2, 3, 4 for premolars).
934x875mm (96 x 96 DPI)

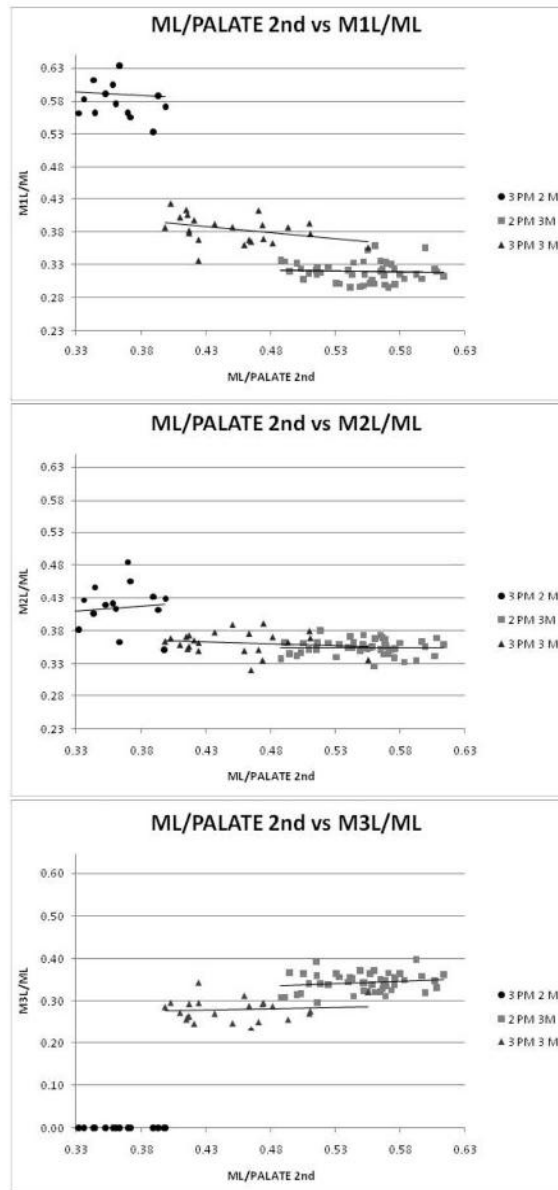


Bivariate plots and best fit regression lines of each molar versus molar length showing distinct patterns of molar variation.

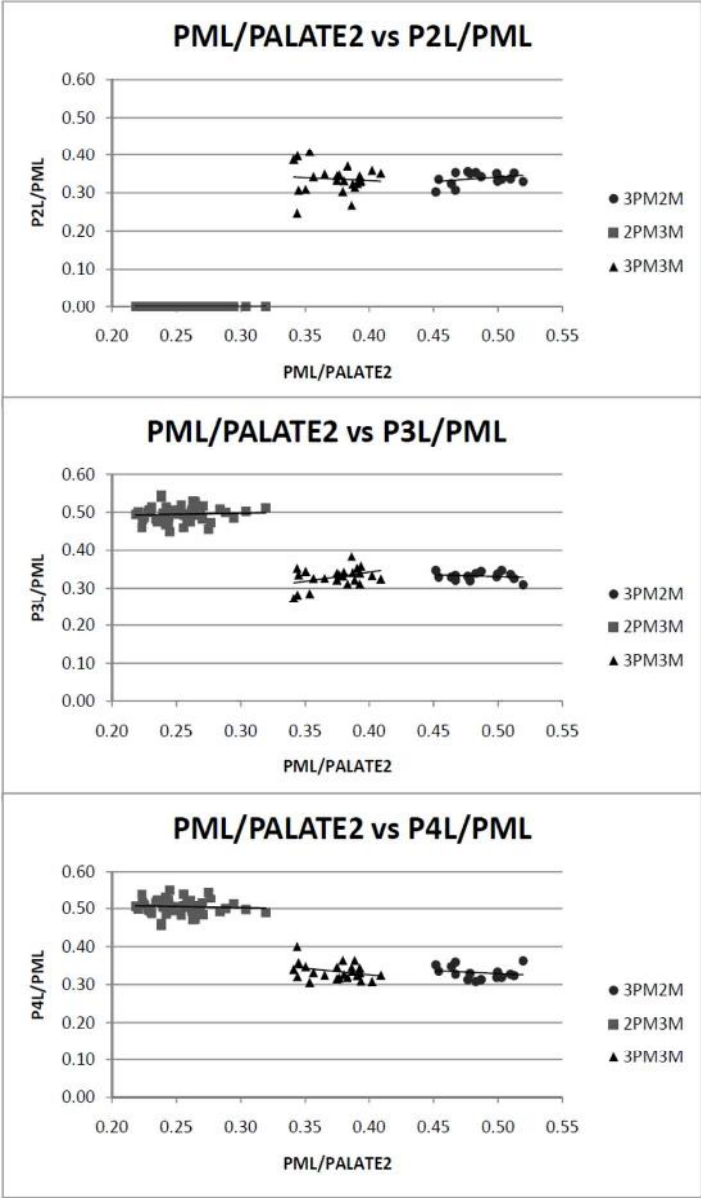
534x895mm (96 x 96 DPI)



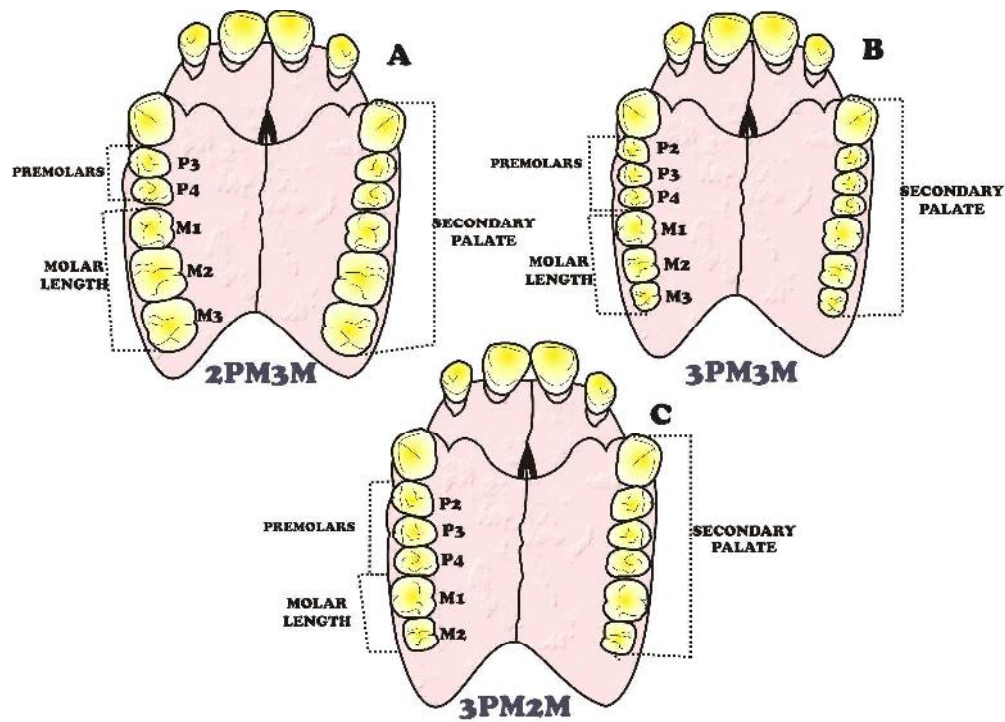
Bivariate plots and best fit regression lines of each premolar versus premolar length showing distinct patterns of premolar variation.
539x895mm (96 x 96 DPI)



Dot plot analysis and best fit regression lines of molar length variation within the species with 3 premolars and 2 molars (3PM2M), 3 premolars and 3 molars (3PM3M), and 2 premolars and 3 molars (2PM3M).
265x552mm (96 x 96 DPI)



Dot plot analysis and best fit regression lines of premolar length variation within the species with 3 premolars and 2 molars (3PM2M), 3 premolars and 3 molars (3PM3M), and 2 premolars and 3 molars (2PM3M).
262x447mm (96 x 96 DPI)



Representative drawings of the three dentition patterns in the primates studied. A. maxilla of species with relatively large molar region ($ML/PALATE2 > 0.49$). B. maxilla of species with intermediate molar region size ($0.40 < ML/PALATE2 < 0.51$). C. maxilla of species with relatively small molar region ($ML/PALATE2 < 0.40$).

857x633mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1

p<0.0001

	M1			M2			M3		
	β	IC β	R^2	β	IC β	R^2	β	IC β	R^2
3PM2M	0.5	± 0.12	0.85	0.46	± 0.13	0.81			
2PM3M	0.3	± 0.02	0.97	0.34	± 0.01	0.99	0.35	± 0.02	0.96
3PM3M	0.38	± 0.03	0.97	0.38	± 0.02	0.99	0.29	±0.03	0.93

Table 2

p<0.0001

	PM2			PM3			PM4		
	β	IC β	R^2	β	IC β	R^2	β	IC β	R^2
3PM2M	0.38	± 0.05	0.94	0.35	± 0.04	0.97	0.27	± 0.05	0.89
2PM3M				0.52	± 0.02	0.99	0.48	± 0.02	0.98
3PM3M	0.31	± 0.04	0.93	0.37	± 0.03	0.97	0.32	± 0.02	0.98

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 3

	MnL/ PALATE 2nd	PMnL/ PALATE 2nd
3 PM 2M	0.33 - 0.40	0.45 - 0.52
3 PM 3M	0.40 - 0.56	0.34 - 0.41
2 PM 3M	0.49 - 0.61	0.22 - 0.32

For Peer Review

Supplemental Material

Figure 1. Families included in the study.

2PM3M	
Cercopithecoidea	<i>Cercopithecus diana</i> <i>Cercopithecus mitis</i> <i>Cercopithecus mona</i> <i>Cercopithecus neglectus</i> <i>Cercopithecus nitidus</i> <i>Cercopithecus petaurista</i> <i>Chlorocebus aethiops</i> <i>Erythrocebus patas</i> <i>Lophocebus albigena</i> <i>Macaca arctoides</i> <i>Macaca assamensis</i> <i>Macaca cyclops</i> <i>Macaca fascicularis</i> <i>Macaca fuscata</i> <i>Macaca hecki</i> <i>Macaca maura</i> <i>Macaca mulatta</i> <i>Macaca nemestrina</i> <i>Macaca nigra</i> <i>Macaca ochreata</i> <i>Macaca radiata</i> <i>Macaca sinica</i> <i>Macaca thibetana</i> <i>Mandrillus leucophaeus</i> <i>Mandrillus sphinx</i> <i>Miopithecus talapoin</i> <i>Papio anubis</i> <i>Papio hamadryas</i> <i>Colobus guereza</i> <i>Colobus polykomos</i> <i>Presbytis melalophos</i> <i>Ptilocobus badius</i> <i>Procolobus verus</i> <i>Pygathrix sp.</i> <i>Theropithecus obscurus</i> <i>Trachypithecus cristatus</i> <i>Trachypithecus francoise</i>
Hominidae	<i>Gorilla gorilla</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Pan troglodytes</i> <i>Pongo pygmaeus</i>
Hylobatidae	<i>Hylobates agilis</i> <i>Hylobates lar</i> <i>Hylobates moloch</i> <i>Hylobates pileatus</i> <i>Hylobates syndactylus</i>
3PM2M	
Cebidae	<i>Callithrix argentata</i> <i>Callithrix geoffroyi</i> <i>Callithrix humeralifera</i> <i>Callithrix jacchus</i> <i>Callithrix penicillata</i> <i>Callithrix pygmaea</i> <i>Leontopithecus chrysomelas</i> <i>Leontopithecus rosalia</i> <i>Saguinus fuscicollis</i> <i>Saguinus imperator</i> <i>Saguinus labialis</i> <i>Saguinus midas</i> <i>Saguinus mystax</i> <i>Saguinus nigricollis</i> <i>Saguinus oedipus</i>
3PM2M	
Aotidae	<i>Cebus albifrons</i> <i>Cebus apella</i> <i>Cebus capucinus</i> <i>Saimiri sciureus</i> <i>Aotus trivirgatus</i>
Atelidae	<i>Alouatta caraya</i> <i>Alouatta palliata</i> <i>Alouatta seniculus</i> <i>Ateles geoffroyi</i> <i>Ateles paniscus</i> <i>Brachyteles arachnoides</i> <i>Lagothrix lagotricha</i>
Pitheciidae	<i>Callicebus moloch</i> <i>Pithecia monachus</i>
Lemuridae	<i>Lemur catta</i> <i>Eulemur fulvus</i> <i>Varecia variegata</i>
Lorisidae	<i>Loris tardigradus</i> <i>Nycticebus coucang</i> <i>Nycticebus pygmaeus</i>
Galagidae	<i>Galago senegalensis</i> <i>Otolemur crassicaudatus</i>
Tarsiidae	<i>Tarsius sp.</i>