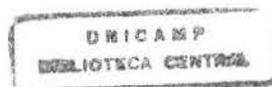


SILVANA PASETTO

**LOCALIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR
DE CRESCIMENTO EPIDERMAL EM INCISIVOS
INFERIORES DE RATO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do grau de Mestre em
Biologia e Patologia Buco-Dental.

Piracicaba
2000



SILVANA PASETTO

**LOCALIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR
DE CRESCIMENTO EPIDERMAL EM INCISIVOS
INFERIORES DE RATO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do grau de Mestre em
Biologia e Patologia Buco-Dental

Orientador: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
(UNICAMP)

Banca examinadora:

Prof^a Dra. Darcy de Oliveira Toselo
Prof^a Dra. Mirian Magalhães Oliveira Levada
Prof^a Dra. Silvana Pereira Barros

PIRACICABA
2000

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CPG-036/83
CPG, 28/04/2000
Assinatura do Orientador

BC
UNIVERSIDADE:
UNICAMP
22632
41374
78100
0 <input checked="" type="checkbox"/>
88.11.00
26-03-00

M-00142402-3

Ficha Catalográfica

P263L Pasetto, Silvana.
Localização imunohistoquímica do fator de crescimento epidermal em incisivos inferiores de rato. / Silvana Pasetto. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.
87p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Imunohistoquímica. 2. Incisivos (Dental). I. Novaes, Pedro Duarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2000, considerou a candidata SILVANA PASETTO aprovada.

1. Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES

2. Profa. Dra. MIRIAM MAGALHÃES OLIVEIRA LEVADA

3. Profa. Dra. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO



DEDICATÓRIA

*A **DEUS**, por ser a bússola da minha vida,
e a luz do meu caminho*

*Aos meus pais, **Lurdes e Alcindo**, pelo amor, exemplos,
paciência, garra em me guiar no meu crescimento, e por ter me
presenteado com a melhor família do mundo*

*Aos meus queridos irmãos, **Geraldo, Sergio, Valdir, Ivone e
Edilene**, pelo carinho e incentivo para que eu sempre seguisse em
frente*

*Aos meus cunhados, **André, Vagner, Dora, Sandra e Fátima**
por entenderem os momentos difíceis e ainda assim estarem ao meu
lado*

*Aos meus sobrinhos, **Eduardo, Fernando, Rafael, Carolina,
Sabrina, Gabriela, Juliana, Felipe e Diego**, por serem os mais
preciosos motivos de alegria e orgulho de nossas "Vidas"*

O MAR

*Eu vi, Senhor, o mar sombrio e furioso, investir contra os rochedos,
de longe, tomavam impulso, orgulhosas, de pé, saltavam, atropelavam-se
umas às outras, para tomarem a frente e serem as primeiras a bater.
Quando se desmanchava a espuma branca, deixando intacta a rocha,
tinham partido as vagas, correndo para de novo se lançar.*

Vi, outro dia, o mar calmo e sereno.

*Vinham de muito longe as ondas de bruços rastejando, para
não chamar a atenção.*

*Dando-se as mãos, ajuizadas, deslizavam sem ruído e se espraiavam à vontade
na areia, para tocar a orla, com a ponta de seus dedos bonitos de espuma.*

*Senhor, faze que calmamente eu preencha meus dias,
tal como o mar lentamente recobre toda a praia.*

*Faze-me humilde como o mar
quando silencioso e ameno avança sem se fazer notar.
Dá-me a graça de esperar meus irmãos, medir meu passo
pelo deles, para com eles subir.*

*Concede-me a perseverança triunfante das ondas.
Faze que cada um de meus recuos seja ocasião de subida.
Dá-me a meu rosto a claridade das águas lípidas,
à minha alma a brancura da espuma;
ilumina a minha vida, como os raios de teu Sol
fazem cantar o espelho das águas,
mas sobretudo, Senhor, faze que eu não guarde para mim
esta Luz e que todos os que de mim se aproximarem voltem à
casa ávidos de se banharem na tua Graça eterna.*

Michel Quoist

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP – UNICAMP por dispor tão gentilmente de “tudo” em favor de nossa aprendizagem.

Ao Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, meu orientador, pela paciência em me ensinar a trabalhar em conjunto e me fazer pensar de forma crítica, me incentivando a sempre tentar novamente, tornando possível meu crescimento profissional. A você, meu respeito e carinho.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Hope Fortinguerra, Chefe do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) – UNICAMP, pela disposição em ouvir, e por nos conceder livre acesso aos laboratórios durante as nossas pesquisas.

À Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP – UNICAMP, pela força e carinho com que conduz nosso curso e pela disponibilidade em nos atender.

À Profa. Dra. Altair Antoninha Del Cury, Coordenadora Geral da Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, por sua competência.

Ao Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP-UNICAMP, pelo incentivo que tem dado à pesquisa.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Pesquisa, pela bolsa a mim concedida, que permitiu o bom andamento desta pesquisa.

A todos os professores do Departamento de Morfologia, principalmente ao Dr. José Merzel pelas incontáveis vezes em que me ajudou e ensinou, e Dr. Sergio R.P. Line pelo apoio e senso crítico. Muito obrigada!

Às meninas da secretaria da Morfologia, Suzete, Ana Paulinha e Joelma, pela ajuda e simpatia.

Às técnicas do Laboratório de Histologia, Cidinha e Ivani, por sempre me ensinarem e ajudarem com carinho e disposição, contribuindo no desenvolver da minha pesquisa.

À Bióloga Eliene, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela amizade, carinho e incentivo, sempre presente, enriquecendo minha pesquisa com seus conhecimentos e experiência profissional.

Ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, do Departamento de Patologia, por gentilmente ter consentido na realização de testes para minha pesquisa em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Edgar Graner do Departamento de Patologia, pela solicitude em analisar meu trabalho, me dando oportunidade de aprender mais sobre imunohistoquímica.

À técnica, Aninha do Laboratório de Patologia, pela paciência com que me ajudou, fazendo “dar certo” minhas reações imunohistoquímicas. Muito obrigado.

À secretária da pós-graduação, Érica, pela simpatia e gentileza com que sempre me atendeu.

Aos Meninos do CRA, pela grande ajuda na preparação de meus slides.

Às meninas da Biblioteca, especialmente à Marilene e Heloísa, pela gentileza em me ajudar a resolver dúvidas sobre as normas da tese.

Ao meu avô Antonio, pelos valores de honra, dignidade e amor. Saudade!

À minha avó Maria pelo grande amor e sabedoria de vida e ao meu avô José pela força com que manteve a família sempre unida.

A toda minha família, uma lista enorme de pessoas importantes para minha vida e, sem as quais seria difícil continuar, pelo amor, alegria, respeito e união de “Família”.

Ao Alexandre H. de Góes, que ao longo dos anos, apesar das muitas ocupações, esteve ao meu lado em todos os momentos, me incentivando com seu carinho e felicidade contagiante. Obrigado pelo homem e pela criança que há em você.

Aos meus queridos amigos, Nelson, Vanilde e Edivane, e às minhas primas Néia e Danieli, por sempre me ouvirem, e mostrarem que há uma luz brilhante que dá paz e alegria às nossas vidas.

As minhas grandes amigas do laboratório de Biologia Molecular, Paula, Raquelzinha, Ana Paula e Raquel Gerlach, à Estelinha e Miralva da Microscopia Eletrônica, à Mitsue do laboratório de Bioquímica, e ao Messias do laboratório de Histologia, pela paciência, incentivo e amizade com que dividiram comigo as ansiedades, e vitórias conquistadas. Obrigada!!



SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTAS

Lista de abreviaturas, unidades e palavras em outro idioma -----1

Tabela -----2

Lista de figuras -----2

RESUMO -----5

ABSTRACT -----6

INTRODUÇÃO -----7

REVISÃO DE LITERATURA

Incisivo do rato -----11

Fatores de crescimento -----13

Fator de crescimento epidermal -----14

PROPOSIÇÃO -----23

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de Material -----25

Preparo das Lâminas -----26

Microtomia -----28

Imunohistoquímica	28
RESULTADOS	31
Tabela	34
Figuras	35
DISCUSSÃO	63
CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO	88



LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES, SIGLAS E PALAVRAS EM OUTRO IDIOMA

A: ameloblasto
aa: aminoácido
BSA: Albumina sérica bovina
Complex: complexo
CP: Camada Papilar
DAB: 3,3-Diaminobenzidina (revelador)
D: Dentina
DMSO: Dimetil sulfoxide
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
et al.: e outros (abreviatura de *et alii*)
EGF: Fator de crescimento epidermal
EGFr: Receptor do fator de crescimento epidermal
EI: Estrato intermédio
F: Folículo dental
HCl: Ácido clorídrico
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio
HRP: Peroxidase forte
GFs: Fatores de Crescimento
IgG: Imunoglobulina gama
kD: Kilo Dalton
ME: Matriz do esmalte
Mouse: camundongo
N: Normalidade da molécula
O: Odontoblasto
OA: Osso alveolar
PaD: Papila dental
PBS: saline buffered phosphate – salina tamponada com fosfato
PrD: Pré-dentina
PoD: Polpa dental
R: Região
Rabbit: coelho
RE: Retículo estrelado
Strept: Estreptavidina
VS: Vaso sanguíneo

TABELA

Tabela 1. Imunolocalização do EGF no incisivo inferior de rato	34
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da hemimandíbula do rato indicando as divisões das 5 regiões	35
Figura 2. Glândula submandibular tratada com EGF (controle positivo)	37
Figura 3. Glândula submandibular – controle negativo	39
Figura 4. Cortes transversais do incisivo das regiões 1 à 5 – visão panorâmica	41
Figura 5. Parte superior da papila – R 5, mostrando a intensa marcação para EGF	43
Figura 6. Folículo externo – R 5 marcação bastante intensa	45
Figura 7. Papila dental - R 5, com intensidade de marcação média	47

Figura 8. R 5: ameloblastos, estrato intermédio e odontoblastos sem marcação; retículo estrelado, fraca intensidade; polpa com média marcação
-----49

Figura 9. Polpa dental – R 2 e 1, média intensidade de marcação -----51

Figura 10. Camada papilar, R 2 com média intensidade de marcação
-----53

Figura 11. Camada papilar, R 4, marcação fraca -----55

Figura 12. R 4: marcação fraca para: osso alveolar, folículo adjacente à camada papilar e matriz do esmalte; ameloblastos sem marcação, o osso alveolar também sem marcação, exceto por uma marcação fraca em algumas células e vasos, odontoblastos e dentina não marcados, polpa com média marcação
-----57

Figura 13. R 4: Prolongamentos dos odontoblastos e pré dentina, apresentando fraca intensidade de marcação -----59

Figura 14. R 1 e 4: Ligamento periodontal com fraca marcação, ao redor de vasos sanguíneos e próximo ao osso alveolar a marcação se mostra mais intensa
-----61

RESUMO
ABSTRACT

Este estudo visou localizar o Fator de Crescimento Epidermal - EGF , que é um dos fatores que participa do processo de erupção dentária, em 5 diferentes regiões de dente com erupção contínua (incisivo), utilizando a técnica de imunohistoquímica. Para a realização deste trabalho foram utilizados os incisivos inferiores de 09 ratos Wistar adultos. Ficou evidente que este fator de crescimento se encontra disperso nas regiões destes dentes, distribuído em diferentes tecidos. A maior intensidade de marcação do EGF foi encontrada no Folículo dental externo; seguida pela polpa/papila, camada papilar, ameloblastos, folículo adjacente à camada papilar e ligamento periodontal. Osso alveolar e odontoblastos não apresentaram marcação. A maior concentração do EGF no folículo dental sugere que este tenha um papel fisiológico na erupção dentária.

O dente incisivo de rato, por ser um dente de crescimento contínuo, é o modelo ideal para um estudo da interação dos tecidos, diferente dos outros dentes, pois todos os estágios de desenvolvimento estão presentes simultaneamente.

The study aimed, basically, to identify, through the specific immunohistochemical technique, the epidermal growth factor, that is one of the features that effectively contributes on the tooth appearance process. Due to its continuous growing this experiment was performed using the lower incisors teeth of adults Wistar rats. It was clearly proved that this growth factor was spread in these teeth area in different tissues. The greatest intensity of EGF marking was found on the external dental follicle, followed by dental pulp, papillar layer, ameloblasts, follicle and periodontal ligament. Alveolar bone and odontoblasts did not register marking areas. The greatest EGF concentration on the tooth follicle external zone, suggested its physiological role in tooth eruption.

The incisor tooth of the rat, due to its continuously growing, is a good model for an interactive study of periodontal tissues, where developmental stages are simultaneously present.



INTRODUÇÃO

O fator de crescimento epidermal - EGF é um polipeptídeo de 53 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 6,045 kD, o qual foi primeiramente isolado de glândulas submandibulares de ratos machos, depois os achados mostraram que injetando-se o fator de crescimento epidermal, este antecipava a abertura das pálpebras e erupção prematura dos dentes incisivos de rato (COHEN, 1962; COHEN & SAVAGE, 1974).

A partir destes achados, tem sido feito muitos estudos usando o EGF para determinar onde no dente ele aparece. Este fator de crescimento é também encontrado em uma variedade de tecidos (rim, pulmão, pele etc.) e fluidos corpóreos (saliva, leite, urina). Originalmente estimula a proliferação de células epiteliais e mesenquimais e a diferenciação de ambas; promove a síntese de várias macromoléculas e reabsorção do osso (CARPENTER & COHEN, 1979), além de possuir inúmeros efeitos biológicos e ter um papel importante no desenvolvimento embrionário normal (COHEN, 1986).

Conhecer quais células e tecidos que são requeridos para que a erupção dentária aconteça é importante, pois pode ajudar a estimular

dentes que apresentam dificuldades para erupcionar, como em algumas síndromes que estão associadas a dentes impactados.

A presença do EGF e seu receptor nos dentes decíduos e permanentes são encontrados nas diferentes espécies de mamíferos, incluindo o homem (THESLEFF *et al.*, 1987).

Nos últimos anos estudos têm demonstrado que o EGF está envolvido na regulação do desenvolvimento dos dentes e sua erupção, baseados na presença do receptor do fator de crescimento epidermal, no desenvolvimento dos dentes e na sua capacidade para estimular ou inibir a proliferação de diferentes células dentais. (THOPAN *et al.*, 1988; COBO, 1992).

Em dentes de erupção contínua como incisivos de rato, o EGF está presente principalmente no folículo dental na parte mais adjacente ao osso alveolar, e a regulação por ele mediada na matriz extra celular do folículo pode ser a chave do evento da iniciação da erupção dos dentes (SHOROFF *et al.*, 1996). É encontrado também nos ameloblastos e camada papilar (MARTINEAU-DOIZÉ *et al.*, 1991). No 1º molar, até o 10º dia pós-natal está presente no folículo dental, retículo estrelado, polpa dental, ameloblastos, odontoblastos e osso

alveolar e sua presença diminui com o desenvolvimento do dente (WISE *et al.*, 1992).

O objetivo deste estudo é verificar a presença do EGF em diferentes regiões do incisivo, a partir da região odontogênica em direção à incisal.

***REVISÃO DE
LITERATURA***

INCISIVO DO RATO

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

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

a que são submetidos.

A forma do incisivo do rato é análoga a um segmento de uma espiral logarítmica tosquiada lateralmente. Consiste de uma coroa poderosa que pode ser dividida em duas partes: uma anterior (labial) ou convexa, revestida por esmalte e um remanescente posterior (lingual) ou côncavo e porções laterais recobertas por cimento.

A borda incisal do dente aparece na cavidade bucal aproximadamente no oitavo dia de vida do animal e o dente desenvolve-se a partir de uma bainha elíptica denominada epitélio odontogênico, localizado na base (região intra-óssea), e que inclui o tecido conjuntivo da polpa primitiva. Este epitélio determina, em cortes transversais, o tamanho e contorno do futuro dente, proliferando durante toda a vida do animal.

MOXHAN & BERKOVITZ em 1983, descreveram a erupção como sendo um processo multifatorial no qual a causa e o efeito não são facilmente separados, como a força geradora do movimento, a translação desta força em movimento, a sustentação do dente em cada nova posição e a remodelação dos tecidos periodontais relevantes no movimento eruptivo.

FATORES DE CRESCIMENTO – GFs

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

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

Vários são os fatores de crescimento, como: PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas, TGF- β (fator de crescimento

transformante tipo β); EGF (fator de crescimento epidermal; FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e outros.

FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL – EGF

EGF é um polipeptídeo de massa molecular de 6,045 kD e 53 aminoácidos. Foi primeiramente isolado de extratos da glândula submandibular de ratos machos e foi descoberto inicialmente pela sua habilidade de induzir a abertura precoce das pálpebras e erupção do dente incisivo de rato (COHEN, 1962; COHEN & SAVAGE, 1974).

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

Segundo BENETT & SCHULTZ, (1993). a família do EGF inclui: EGF, TGF-B – fator de crescimento transformante , AR - anfiregulina e HBEGF - EGF ligado à heparina. Estes peptídeos são similares na

estrutura, se ligam à mesma célula receptora de membrana, mas têm efeitos biológicos diferentes. O EGF é sintetizado como uma grande molécula precursora, uma proteína transmembrana de 1207 aminoácidos que é proteoliticamente clivada para liberar este GF, que é um pequeno fragmento de 53 aa biologicamente ativo.

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

Resultado de numerosos estudos com cultura de células estabeleceu que EGF é um potente mitógeno para muitos tipos de células de origem ectodermal, mesodermal, e endodermal (CARPENTER & COHEN, 1979; SHOUR & MASSLER, 1971). Também estimula a proliferação de células embrionárias em cultura e durante os eventos morfogenéticos (PARTANEN & THESLEFF, 1987; SHOUR & MASSLER, 1971).

Os efeitos biológicos das proteínas da família do EGF são mediados sobre células alvo por uma única glicoproteína transmembrana de 170 kD e 1186 aa com um grande segmento extra-

celular que fixa este GF, chamado EGFr (receptor do fator de crescimento epidermal) . (BENETT & SCHULTZ, 1993).

Segundo BRUCE *et al.* (1991) o primeiro receptor protéico reconhecido como sendo uma proteinoquinase específica de tirosina foi o receptor do EGF.

Este receptor tem 3 regiões principais: **domínio extracelular** (621aa), que têm os sítios de ligação do fator de crescimento; o **domínio transmembrana** (23aa) que consiste de aminoácidos hidrofóbicos; e o **domínio citoplasmático** (542aa), que contém uma proteína tirosinoquinase específica que é ativada pela ligação do EGF para o domínio extracelular. Células normais têm aproximadamente 20.000 cada (PARTANEM, 1990).

Quando o EGF se liga no sítio do domínio extracelular, induz a alteração na conformação do receptor que promove sua dimerização e, finalmente ativa a tirosinoquinase no domínio citoplasmático. A dimerização do receptor do EGF permite aos dois domínios citoplasmáticos fosforilarem um ao outro (proteínas celulares específicas) em múltiplos resíduos de tirosina, induzindo uma resposta celular, esta fosforilação cruzada é chamada de autofosforilação,

porque ocorre no dímero que constitui o receptor. Após a ligação do EGF ao seu receptor, o complexo receptor é internalizado na célula, e é finalmente degradado nos lisossomos, isto inicia uma cascata que eventualmente induz as células a migrarem ou dividirem. (BENETT & SCHULTZ, 1993; THESLEFF, 1987; BRUCE *et al.*, 1991).

Uma alta densidade de receptores para EGF é encontrada nas partes apical e coronal do folículo dental do incisivo de rato (THESLEFF, 1987).

O desenvolvimento do dente é um bom exemplo para morfogênese e diferenciação de um órgão epitelial-mesenquimal.

Segundo THESLEFF (1987) índice da erupção dentária é anormal em diversas condições patológicas e síndromes e estas anormalidades podem ser alteradas experimentalmente em animais. A erupção é acelerada em pacientes com hiperfunção de várias glândulas endócrinas, e o atraso na erupção está associado com hipofuncionamento das glândulas tireóide, pituitária e adrenal. Estudos confirmaram que o EGF está envolvido na mediação sobre os efeitos dos hormônios tireoidiano, hormônio do crescimento, insulina e corticosteróides. O hormônio tireoidiano aumenta a concentração de

deste fator de crescimento na urina e em vários tecidos do rato, incluindo glândula submandibular, olho, pele e dente. O mecanismo pelo qual o hormônio tireoidiano aumenta a capacidade deste fator nos tecidos não é conhecido mas há ao menos três possibilidades:

- 1-) O número de EGFr pode ser aumentado.
- 2-) A síntese do EGF pode ser estimulada local ou sistematicamente.
- 3-) A degradação pode ser lenta, é evidente que o hormônio tireoidiano afeta os níveis do EGFr nas glândulas mamárias e fígado. Como este hormônio afeta o dente ainda não está esclarecido.

Estudos realizados por MARTINEAU-DOIZÉ *et al.* em 1987 com utilização de radioautografia em ratos de 100gr., mostraram que no órgão do esmalte de incisivos inferiores, os sítios específicos de ligação do EGF estão presentes: no tecido conjuntivo adjacente ao osso alveolar que para estes pesquisadores é um tecido derivado do folículo dental, retículo estrelado e estrato intermediário das zonas pré e secretórias; também nas células da camada papilar da zona de maturação, grãos de prata foram encontrados nos ameloblastos com borda em escova "ruffle-ended".

RIHTNIEMI & THESLEFF (1987) fizeram estudos com ratos recém-nascidos utilizando a técnica de radioautografia, injetando o EGF marcado. Nos animais tratados os incisivos inferiores irromperam 3 dias antes que os do grupo controle. Isto mostra que este fator induziu a erupção precoce do incisivo, associado com a estimulação da proliferação das células. Os pré-ameloblastos e pré-odontoblastos associados com o aumento de mitoses foram responsáveis pelo crescimento do dente. Estes estudos sugerem que o ligamento periodontal ou o folículo dental tenham um papel central no controle da erupção, talvez pelo controle da reabsorção e formação óssea.

WISE *et al.* em 1992 mostraram através de estudo imunohistoquímico em molares de ratos de 0 a 10 dias pós-natal, que o EGF está presente no folículo dental, intensamente até o 4º dia; no 9º e 10º dia, fracamente; no retículo estrelado de 0 dia, ausente; e do 2º ao 10º dia, muito fraco; nos ameloblastos e osso alveolar, de 0 ao 4º dia, houve intensa marcação, seguida de uma diminuição, média; a polpa dental e odontoblastos também tiveram suas marcações semelhantes: média intensidade durante todo o experimento.

THESLEFF em 1987 diz que várias são as teorias para o mecanismo de erupção, mas sabendo-se que existem 4 tecidos principais no dente e ao seu redor: os mais importantes sítios de atividade durante a erupção são sugeridos em 4 teorias:

Folículo dental: a hipótese de que o EGF pode afetar o folículo é suportado por diferentes observações. Estimula a reabsorção do osso em cultura, e também afeta a diferenciação de osteoclastos, assim pode estar envolvido na remodelação óssea.

Raiz: o EGF pode controlar o crescimento da raiz. É um mitógeno para muitos tipos de células e estudos do desenvolvimento de incisivos, sugeriram que a proliferação de células foi estimulada na raiz, de animais tratados com este fator.

Vasos sangüíneos: os vasos são também um alvo potencial para EGF. Mudanças na pressão vascular (fluxo sangüíneo) e tecidos foi sugerido como geradores da força eruptiva.

Ligamento periodontal: o ligamento é freqüentemente sugerido como sendo um sítio gerador da força eruptiva, suas fibras colágenas, células e vasos sangüíneos podem gerar esta força.

Seus estudos mostraram que as células do músculo liso das arteríolas, folículo e polpa são particularmente enriquecidos por EGFr e EGF.



PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi verificar em que regiões dos incisivos de ratos, a presença ou não do fator de crescimento epidermal e a intensidade de marcação, se tornam mais evidentes a partir da região odontogênica em direção à incisal, pela reação da imunohistoquímica (imunolocalização), sabendo-se que nos molares este fator de crescimento praticamente desaparece durante o desenvolvimento do dente.



***MATERIAL E
MÉTODOS***

1- COLETA DE MATERIAL

Para obtenção dos incisivos, 09 ratos Wistar adultos com uma média de peso de 370g., foram anestesiados com Hidrato de Cloral, 400mg/kg de peso corporal do animal, sacrificados por perfusão intracardíaca com uma solução fixadora segundo KARNOVSKY (1965). Para nosso estudo modificamos a concentração do glutaraldeído da solução para 0,5% pois a concentração preconizada por KARNOVSKY (1965) poderia interferir na reação imunohistoquímica. O tempo de perfusão para cada animal foi de 10 min. As mandíbulas foram removidas, separadas em hemimandíbulas, e todo o tecido mole presente foi retirado, e estas ficaram imersas por mais 6 horas na mesma solução fixadora, em seguida foram lavadas com tampão PBS (3x por 10 min), colocadas no descalcificador EDTA 5% sob agitação à temperatura ambiente por 30 dias com trocas diárias. Após a descalcificação as hemimandíbulas foram divididas em 5 regiões no sentido transversal ao corpo da mandíbula, conforme o esquema da **Fig. 1**, correspondendo respectivamente: **R 1**: da crista alveolar à face mesial do 1º molar, **R2**: à região do 1º molar,

R 3: à do 2º molar, **R 4:** à do 3º molar, **R 5:** à região odontogênica. No término da descalcificação as peças foram lavadas em tampão PBS (3x por 10 min) e em seguida bloqueadas com cloreto de amônio por 30 min, novamente lavadas com tampão PBS (3x por 10 min). Para comparação e interpretação dos resultados foi retirada uma glândula submandibular de três animais que serviram como controle positivo da reação pela certeza da presença do EGF neste tecido. Estas glândulas sofreram os mesmos procedimentos, só não passando pelo descalcificador. Em cada região da hemimandíbula foi feita uma referência para que fossem incluídas de modo que os cortes sempre fossem feitos no sentido ápico-incisal. As peças foram desidratadas e incluídas em paraplast.

2- PREPARO DAS LÂMINAS

1- As lâminas (Knitel Glasser, fosca) foram mergulhadas em água contendo detergente por 1 h, em seguida enxaguadas exaustivamente com água corrente e secas na estufa a 60°C;

2- Depois de secas foram mergulhadas numa solução de HCl (Merck) 1N durante 20 min; enxaguadas com água deionizada rapidamente com 3 trocas e novamente secas na estufa;

3- Após a secagem, ficaram imersas numa solução 3:1 de etanol absoluto e ácido acético (Merck) por 20 min, e levadas à estufa para secar.

Solução de Organosilano:

Esta solução serviu como cola para aderir os cortes nas lâminas, impedindo que saíssem durante a reação imunohistoquímica e sem provocar reações de fundo.

1) Quatro mergulhos rápidos uma a uma em uma solução a 2% de Organosilano em acetona (3 Aminopropyltriethoxy-silano – Sigma Chemical CO. St. Louis, USA),

2) Quatro mergulhos rápidos em Acetona pura (Merck),

3) Água deionizada, 2 mergulhos rápidos, secas em estufa à 60°C

As lâminas foram envolvidas com papel toalha uma a uma até o momento do uso.

3- MICROTOMIA

As diferentes regiões das hemimandíbulas incluídas em paraplast, foram seccionadas num micrótomo automático (RM 2155 - Leica) para obtenção dos cortes com 3 μm de espessura que foram coletados em lâminas previamente preparadas com organossilano.

4- IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a imunohistoquímica, testamos vários protocolos e alterando alguns passos, criamos um protocolo adequado ao nosso experimento utilizando método indireto com sistema de amplificação ABC (Peroxidase, Biotina e Estreptavidina) que é extremamente sensível, podendo ser utilizadas concentrações muito baixas do anticorpo primário. Previamente os cortes foram desparafinizados com

xilol 30 min a 37°C e 20 min à temperatura ambiente, hidratados com álcool absoluto, 80%, 50%, e água, 2 min cada, mergulhados em H₂O₂ a 3% - 10v (peróxido de Hidrogênio), 5 trocas de 5 min cada para inativar a peroxidase endógena do tecido após o que, foram enxaguados com água corrente por 2 min, mergulhados numa solução de glicina/pepsina/HCl pH 2,2 a 37°C para que se processasse a digestão enzimática do tecido, digestão esta que expõem os sítios de ligação que podem ficar “mascarados” durante a fixação e inclusão das peças e nos quais o anticorpo primário se liga, em seguida enxaguados com água por 2 min. Posteriormente os cortes foram incubados com o anticorpo primário (anti-EGF desenvolvido em coelho) (Sigma Chemical CO, St. Louis, USA), 1:4500 em PBS/BSA1% “overnight”.

Após este período, as lâminas foram lavadas com PBS (pH 7,4) 3 trocas de 5 min. Como anticorpo secundário foi utilizado o Kit Strept ABC Complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit (Dako Corporation). Primeiramente foi empregado o reagente C (anticorpo produzido em cabra anti-coelho/rato IgG, associado à moléculas de Biotina): 1:500 em PBS/BSA 1% por 30min a 37°C, em seguida as lâminas foram la-

vadas com PBS 3 trocas de 5 min, e incubadas com a mistura dos reagentes A e B (estreptavidina e moléculas de peroxidase conjugadas com biotina) 1:500 em PBS/BSA 1% por 30 min a 37°C. Novamente as lâminas foram lavadas com PBS 3 trocas de 5 min, em seguida reveladas com uma solução de DAB (3,3' Diaminobenzidina – Sigma) com peróxido de hidrogênio e DMSO por 5 min à 37°C, foi feita uma coloração de fundo com Hematoxilina de Mayer por 28 s, e após desidratação com álcool, montadas com bálsamo do Canadá. Como controle positivo foram utilizados cortes de glândula submandibular dos mesmos animais.

◆ Ao microscópio de luz a avaliação foi feita observando-se as diferentes intensidades de marcação (coloração) de cada estrutura e cada região e a presença ou não do EGF.

Dois examinadores observaram as lâminas separadamente, avaliando cuidadosamente cada item, em diferentes aumentos, adotando os critérios utilizado por WISE *et al.* (1992) : na ausência de marcação (-); intensidade fraca (+); média intensidade (++) e marcação forte (+++).



RESULTADOS

Os resultados obtidos na localização imunohistoquímica do EGF no incisivo de rato, através do sistema de amplificação ABC foi excelente, tornando possível a utilização de baixa concentração do anticorpo primário (1:4500), proporcionando uma visão limpa, sem reações de fundo (background), mostrando claramente os pontos onde ocorreu a ligação do anticorpo com o antígeno neste caso representado pelo (EGF) presente no tecido. A marcação é representada pela coloração (precipitado insolúvel) marrom da associação entre a peroxidase que está conjugada ao anticorpo, o peróxido de hidrogênio e o revelador Diaminobenzidina – DAB, estes dados estão representados na **(tabela 1)**.

A glândula submandibular utilizada como controle positivo para comparação e interpretação dos resultados mostra intensa marcação e seu controle negativo (omissão do anticorpo primário), total ausência de marcação. **(Figs. 2 e 3)**. Na **Fig. 4** temos a visão panorâmica de todas as regiões do incisivo: da R 5: odontogênica à R 1: da crista alveolar à face mesial do 1º molar, onde observamos as diferentes intensidades de marcação em suas diversas estruturas.

Podemos notar que nas regiões 1 e 2, temos apenas a imagem negativa do esmalte, o qual foi perdido durante a descalcificação, vemos também que o volume da polpa diminuiu com o desenvolvimento, e a espessura da dentina aumentou.

A técnica nos forneceu portanto diferentes intensidades na marcação (isto significa maior ou menor concentração do EGF). Em todas as regiões o folículo externo (adjacente ao osso alveolar) apresentou a maior intensidade de marcação – forte (**Figs. 5 e 6**); seguido pela papila dental - R 5 (**Fig. 7**); nesta região 5, considerada região odontogênica, encontramos acima dos ameloblastos, o estrato intermédio e retículo estrelado que nas regiões mais desenvolvidas se unem e passam a receber o nome de camada papilar, os ameloblastos e estrato intermédio não mostraram marcação e o retículo estrelado marcou fracamente (**Fig. 8**). A polpa presente partir da R 4 (**Fig. 9**) mostrou uma média intensidade, este tecido é bastante vascularizado, e ao redor destes vasos encontramos uma marcação mais intensa. A camada papilar e ameloblastos, da região 1 à 3 também mostraram uma média marcação (**Fig. 10**). Na região 4 a intensidade de marcação da camada papilar diminuiu para fraca (**Fig. 11**). Ainda

nesta região 4 observamos que os ameloblastos não marcaram, o osso alveolar também não marcou, exceto em algumas células e vasos sanguíneos com fraca intensidade; o folículo mais externo apresentou-se fortemente marcado; o folículo interno, próximo à camada papilar apresentou fraca marcação; a polpa mostrou uma média marcação; observamos também a presença de esmalte jovem-matriz do esmalte, composta principalmente pelas proteínas amelogenina e enamelinina, e esta matriz de esmalte apresentou uma marcação fraca. O corpo dos odontoblastos e a dentina não marcaram (**Fig. 12**); já nos prolongamentos odontoblásticos e/ou na pré dentina uma suave marcação foi observada (**Fig. 13**).

O ligamento periodontal se encontra presente até a região 4, e de modo geral apresentou fraca intensidade de marcação, exceto ao redor de vasos sanguíneos adjacente ao osso, onde a marcação foi bastante forte (**Fig. 14**).

Tabela 1-

Imunolocalização do EGF em incisivos inferiores de rato Wistar

	Região 1	Região 2	Região 3	Região 4	Região 5
Polpa / Papila dental	++	++	++	++	++
Odontoblastos	-	-	-	-	-
Ameloblastos	+	+	+	-	-
Estrato intermédio					-
Reticulo estrelado					+
Camada papilar	++	++	++	+	
Folículo	+++	+++	+++	+++	+++
Ligamento periodontal	+	+	+	+	+
Osso alveolar	-	-	-	-	-

Intensidade de marcação:

(-) ausente / (+) fraco / (++) médio / (+++) forte



FIGURAS

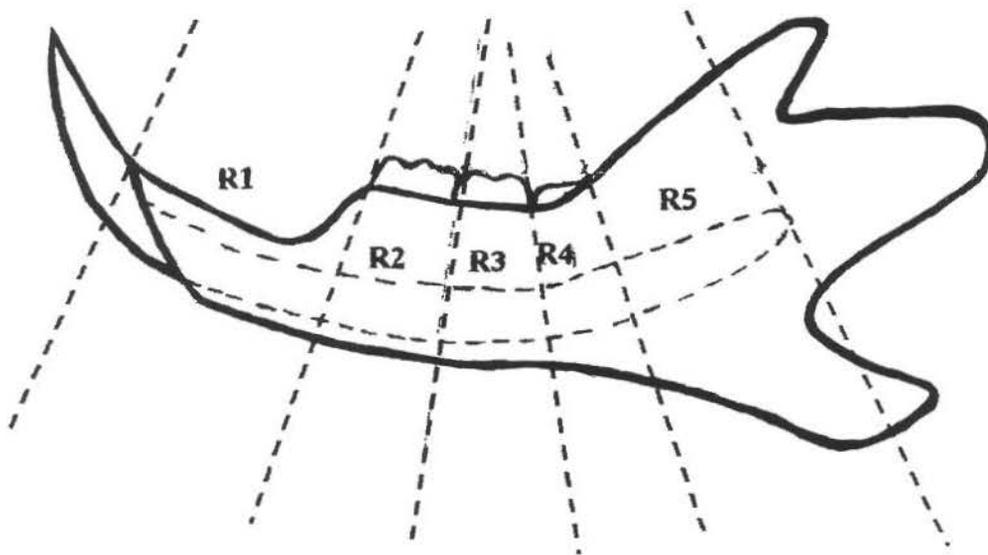


Fig. 1- Esquema mostrando a hemimandíbula do rato, indicando as divisões das 5 regiões no sentido transversal ao dente.

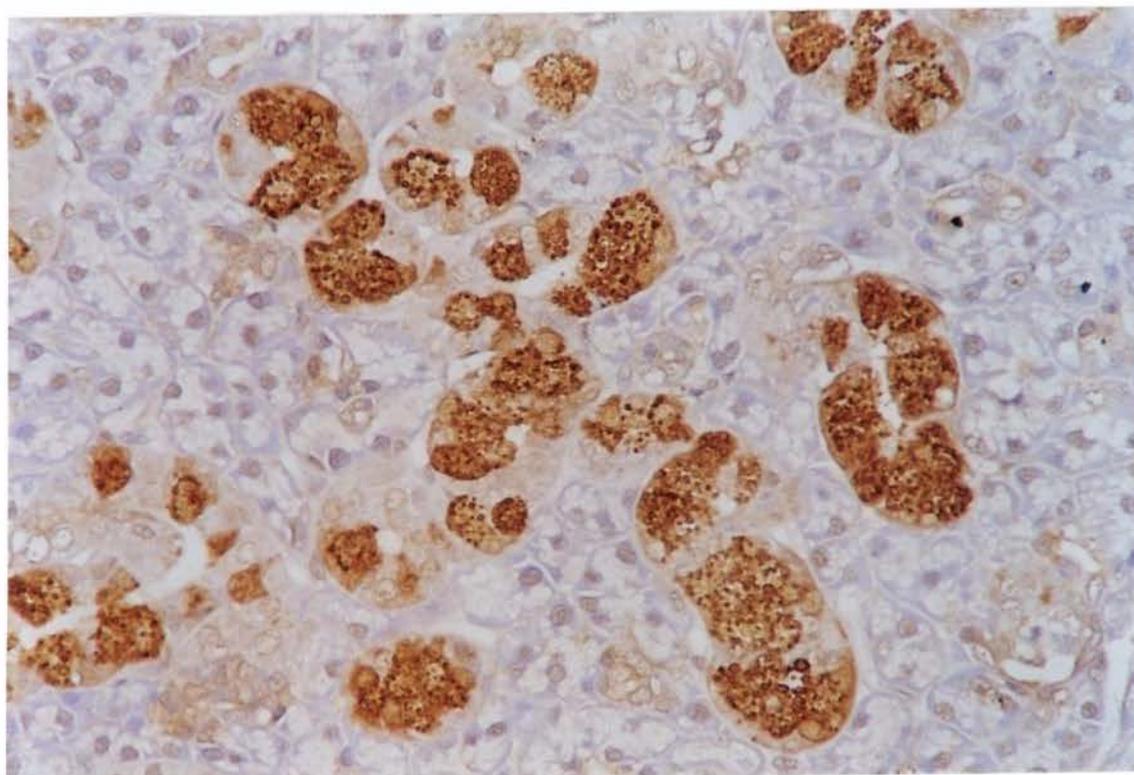


Fig. 2 – Glândula submandibular de rato (controle positivo) mostra a intensa marcação para EGF (416x).

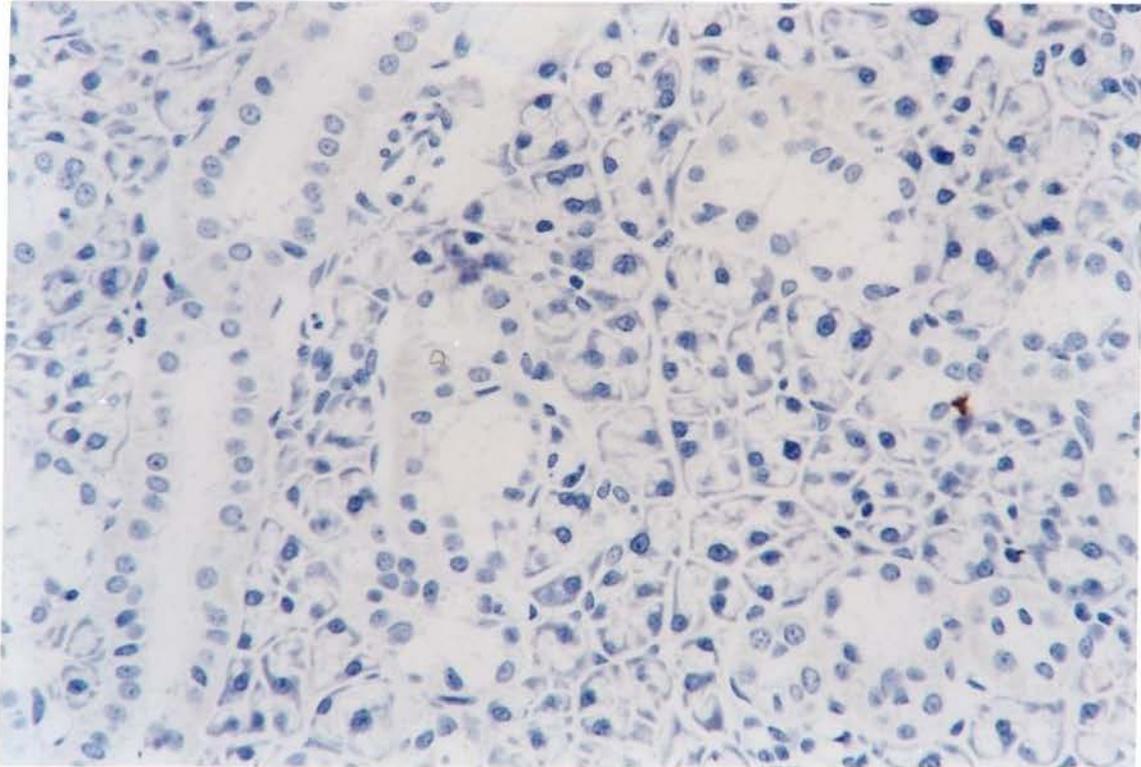


Fig. 3 – Glândula submandibular de rato (controle negativo) mostra a completa ausência de marcação para EGF (416x).

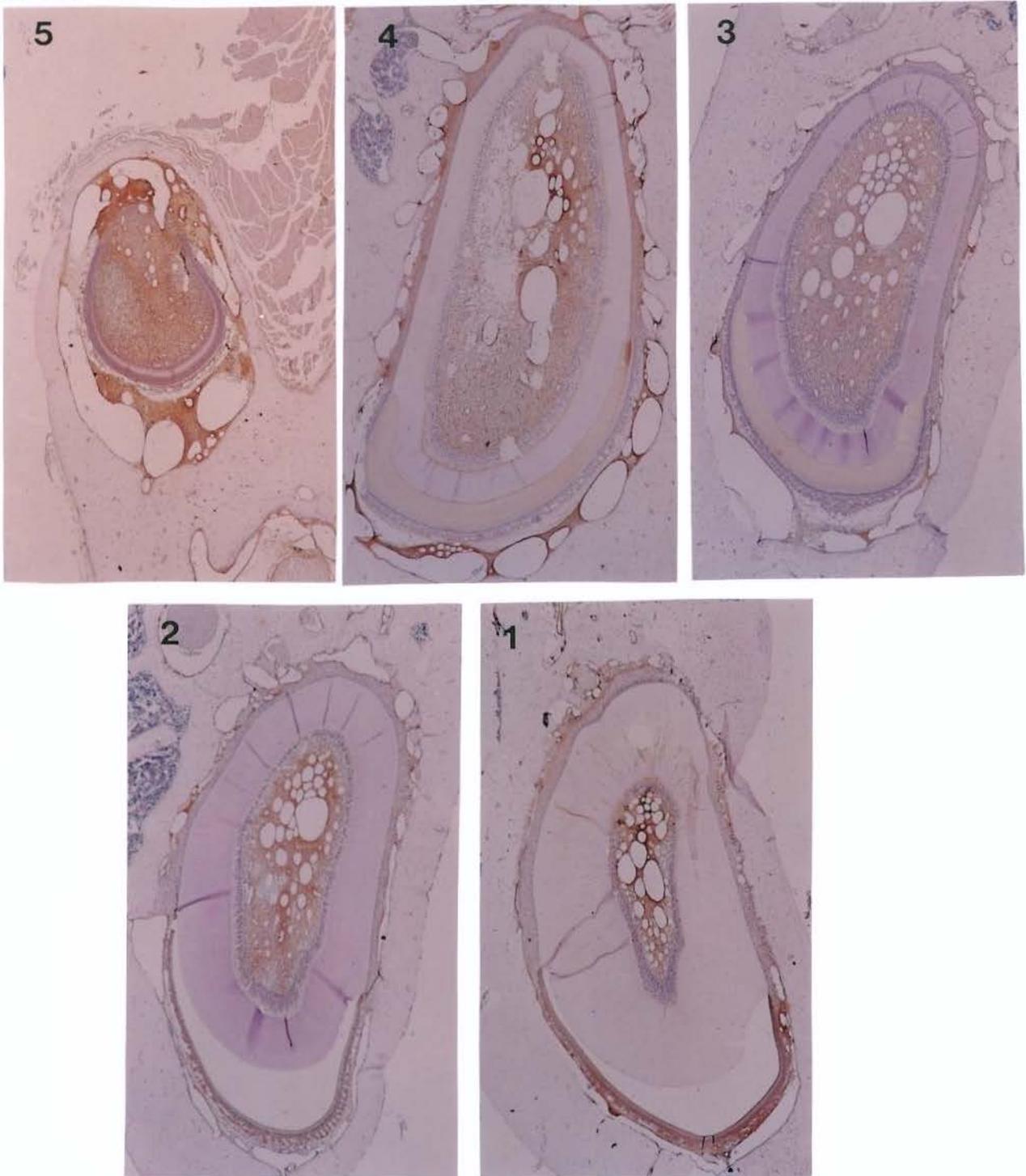


Fig. 4 – Imunomarcção do dente incisivo em suas fases de desenvolvimento, R5, R4, R3, R2, R1 mostra a presença do EGF em diferentes intensidades (26x)

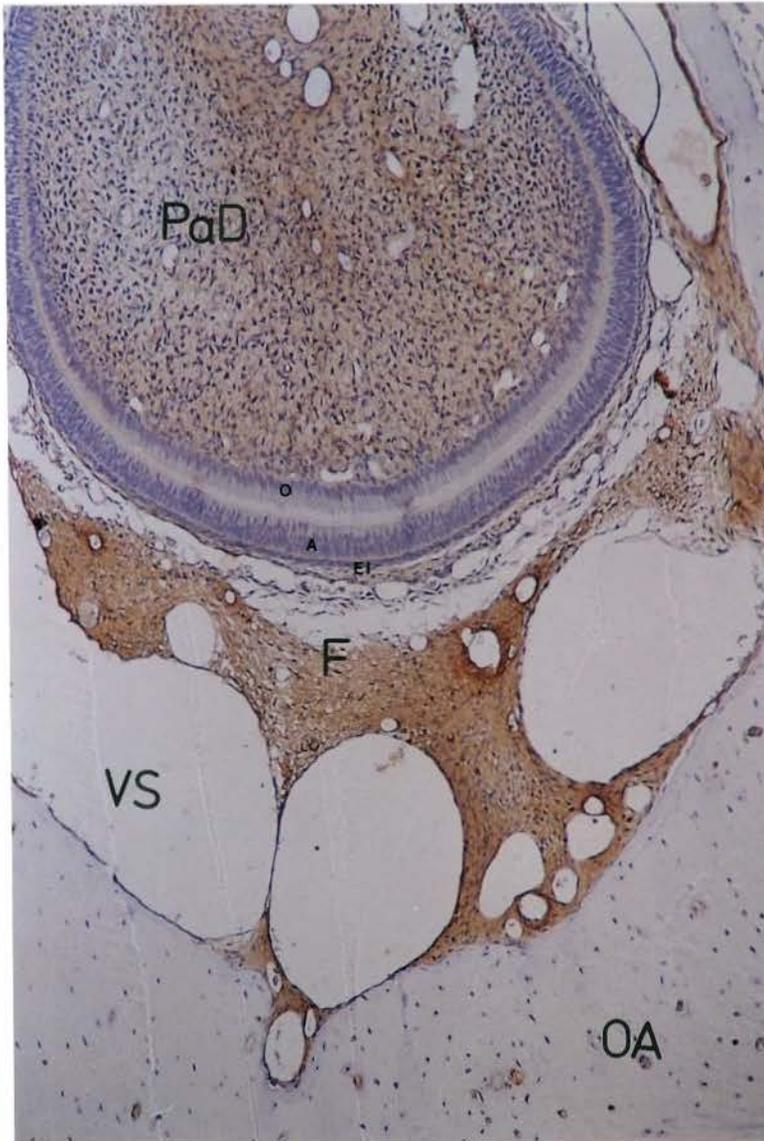


Fig. 5 – Parte superior da papila - R 5, Folículo (F) intensamente marcado, portanto maior concentração do EGF, presença de vasos sanguíneos (VS), papila dental (PaD) com intensidade média de marcação, variações ou ausência de marcação nas outras estruturas: osso alveolar (OA), retículo estrelado (RE), estrato intermédio (EI), ameloblastos (A), odontoblastos (O) (104x)

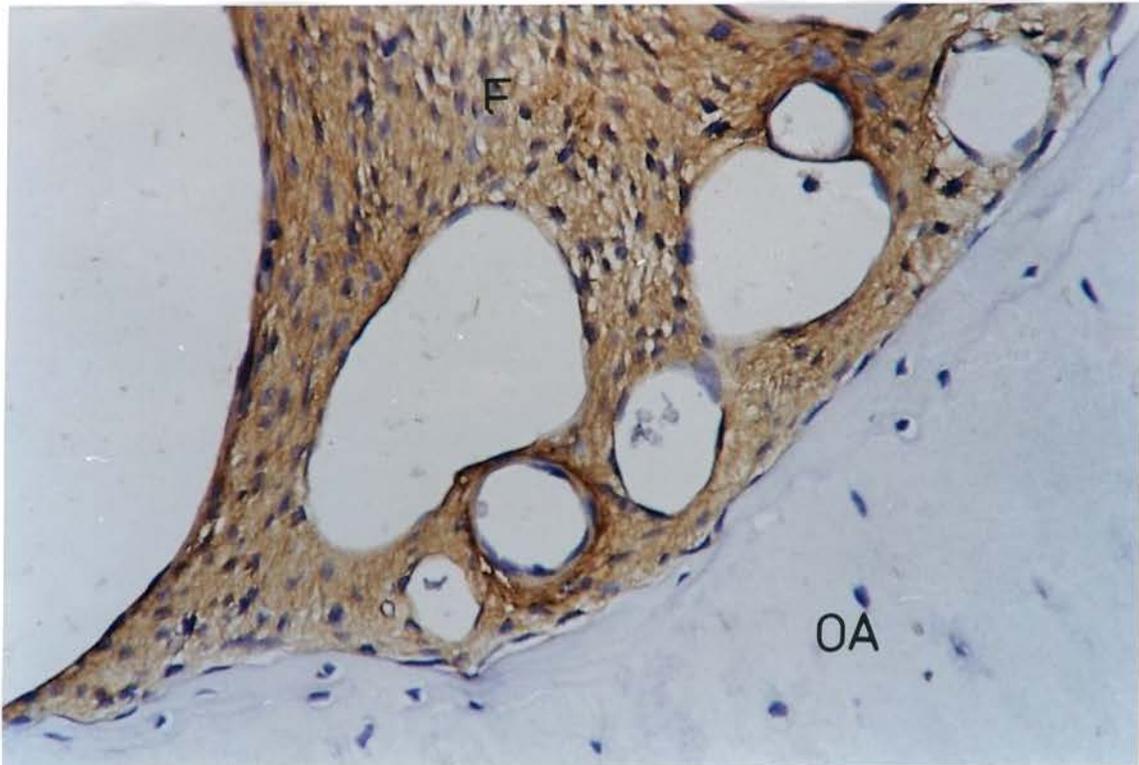


Fig. 6 – R 5: Folículo adjacente ao osso alveolar (F) – intensa ligação do anticorpo ao tecido demonstrado pelo precipitado marrom da marcação, observar a ausência de marcação no osso alveolar (OA) (416x)



Fig. 7 – Parte inferior da papila – R 5: a papila dental (PaD) apresenta-se pouco vascularizada, com média intensidade de marcação, observar o folículo (F) e uma fina camada de osso alveolar (OA) (104x).

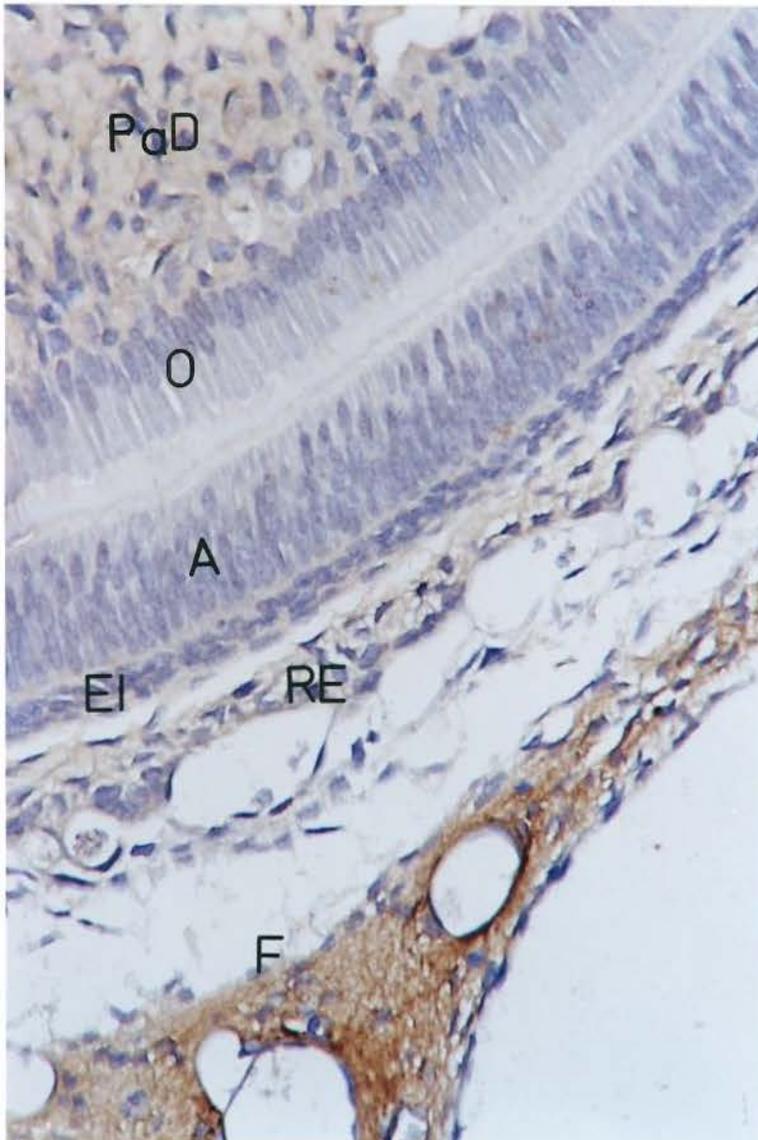


Fig. 8 – R 5: Ameloblastos (A) e estrato intermédio (EI) não marcam. Retículo estrelado (RE) marca fracamente, observar a forte marcação do folículo (F), odontoblastos (O) sem marcação e papila dental (PaD) com intensidade média de marcação (416x).

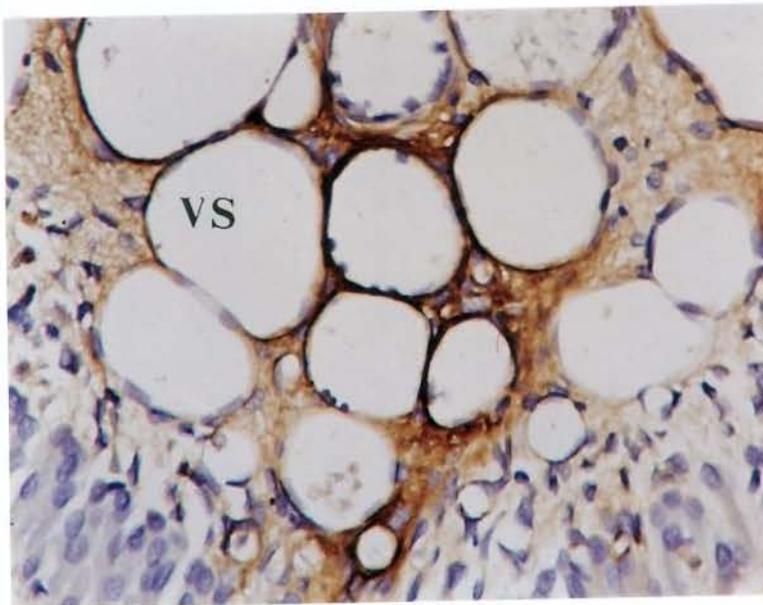
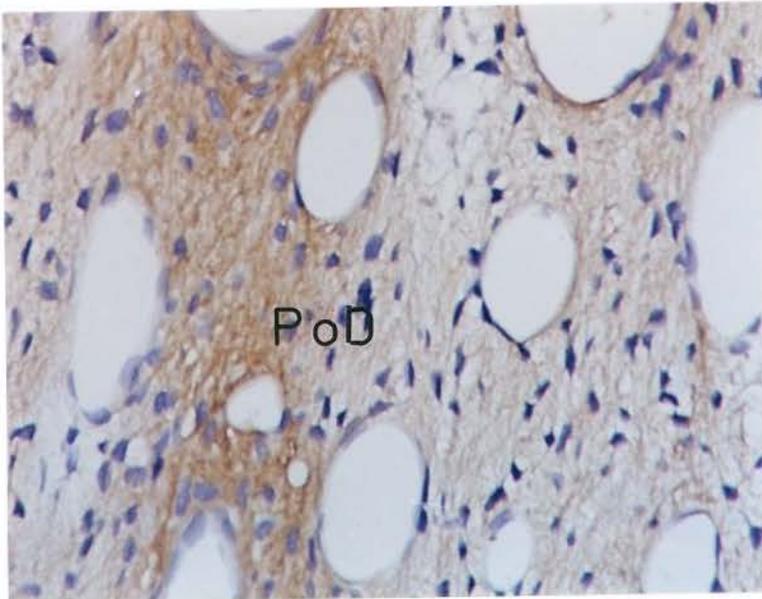


Fig. 9 – R 2 (sup.) e R 1 (inf.) Polpa dental (PoD) – mostra média intensidade, notar aumento na marcação ao redor dos vasos sanguíneos (VS) (416x)

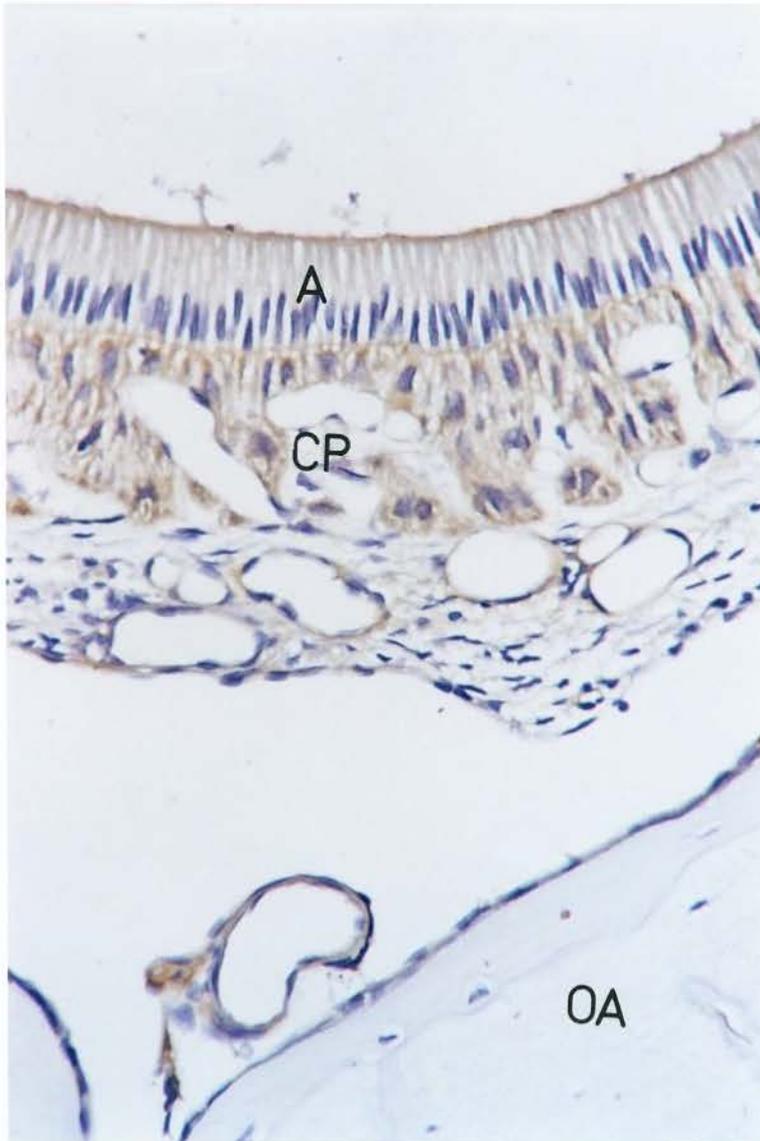


Fig. 10 – Camada papilar (CP) – R 2, mostra uma intensidade média de marcação, que diminui em direção à região odontogênica, observar também ameloblastos (A) e folículo (F) (416x).

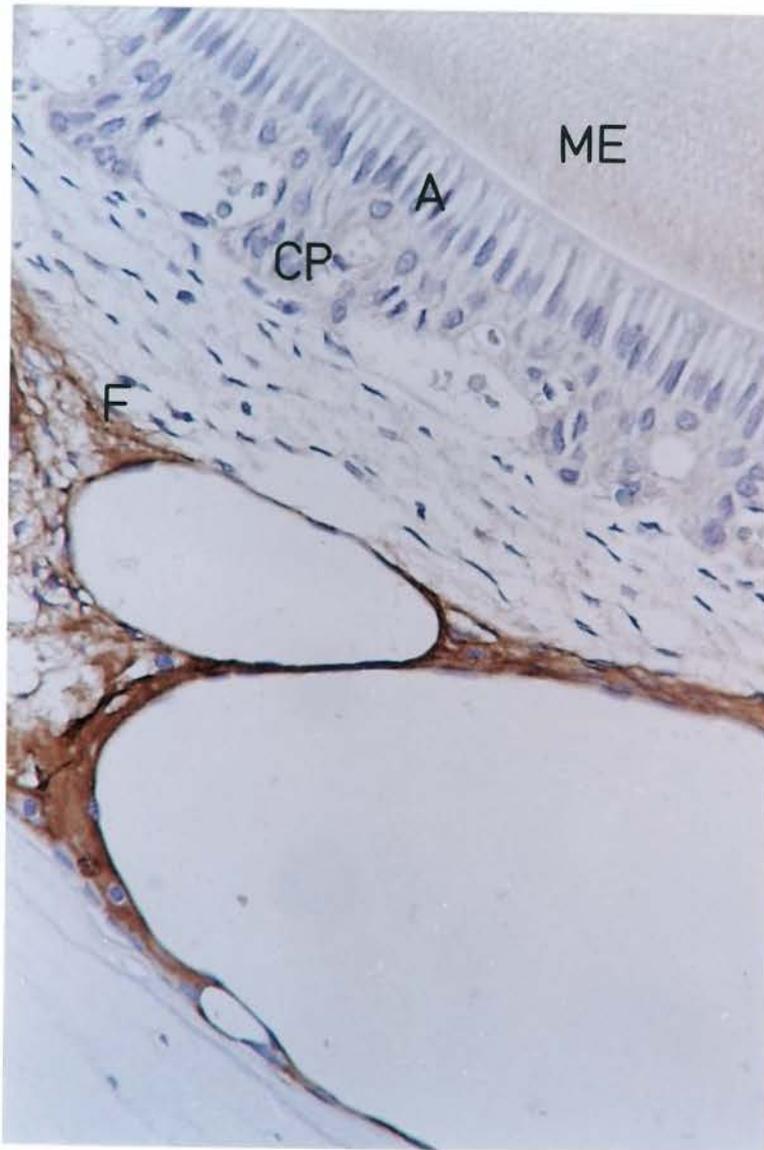


Fig. 11 – Camada papilar (CP) – R 4, a intensidade da marcação diminuiu para fraca, assim como no folículo (F) adjacente à camada papilar; ameloblastos (A) sem marcação, observamos também a matriz do esmalte (ME) com fraca marcação e o folículo (F) adjacente ao osso alveolar fortemente marcado (416x)

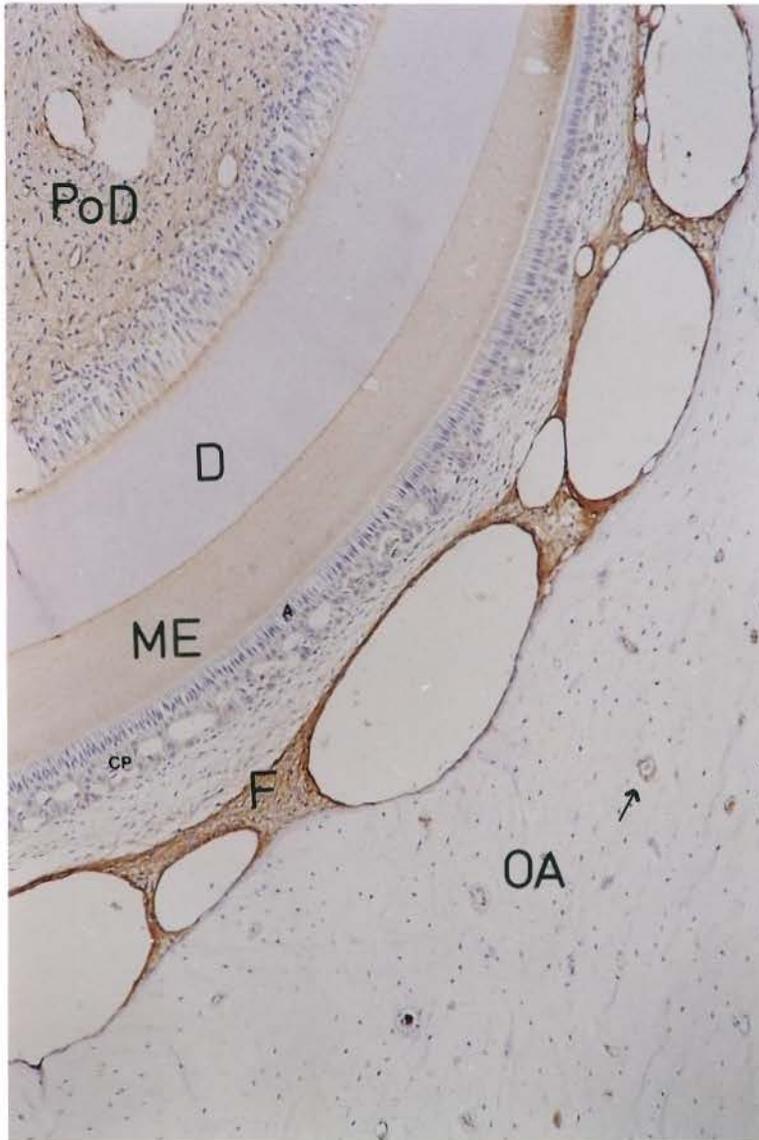


Fig. 12 – R 4: Osso alveolar (OA), não marca, exceto fraca marcação em algumas células isoladas e ao redor de vasos sanguíneos (VS) (seta); folículo mais externo (F) (forte); camada papilar (CP) mostra fraca marcação. Observar a presença da matriz do esmalte (ME) com marcação fraca; ameloblastos (A), odontoblastos (O) e dentina (D) sem marcação, polpa dental (PoD) média marcação (104x)

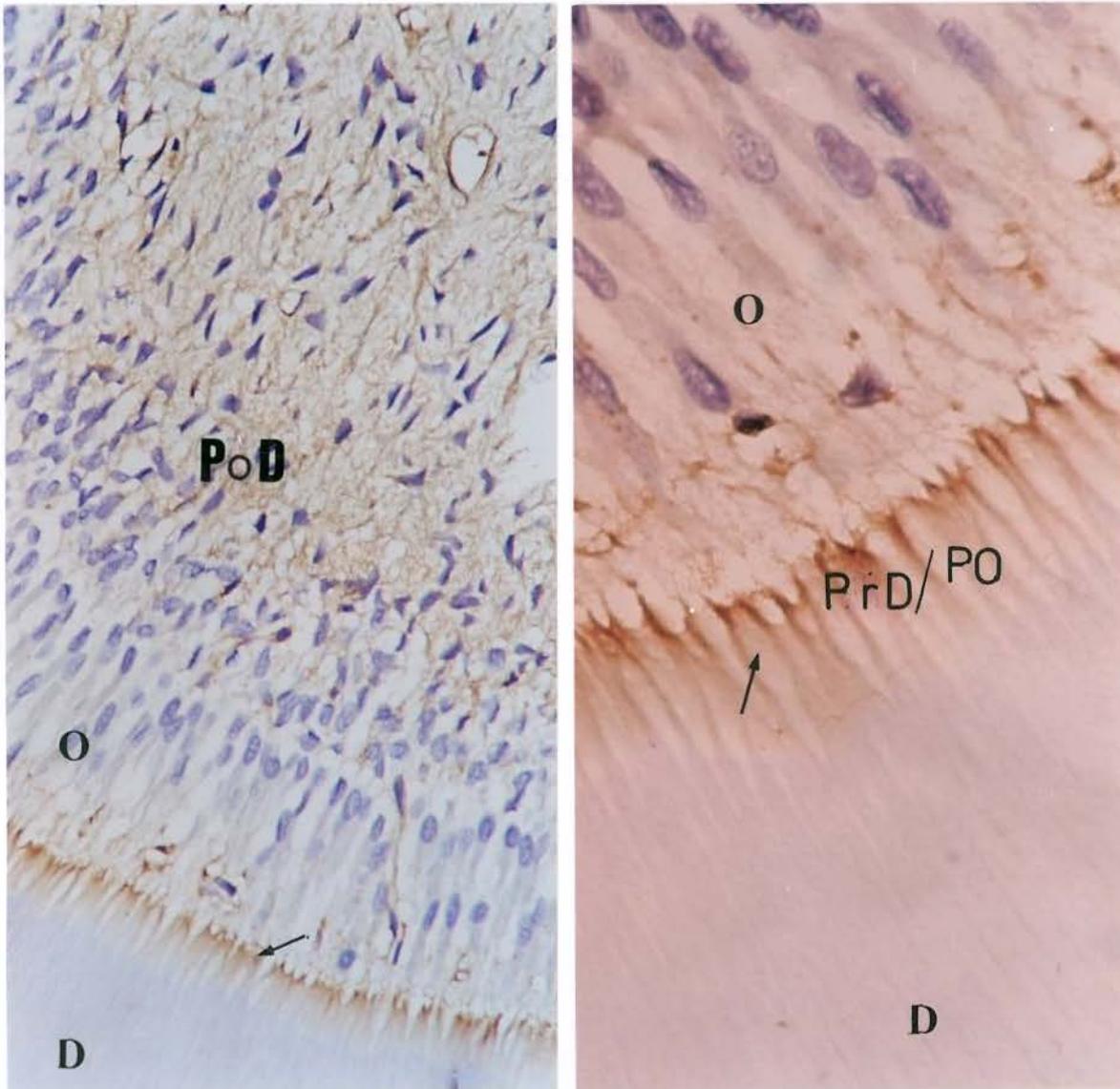


Fig. 13 – R 4: corpo dos odontoblastos (O) não marcam. Notar nos prolongamentos odontoblásticos (PO) e/ou na pré-dentina (PrD) (seta), a presença de fraca marcação para EGF; observar dentina (D) sem marcação e polpa (PoD) com média marcação (416x, 1040x)

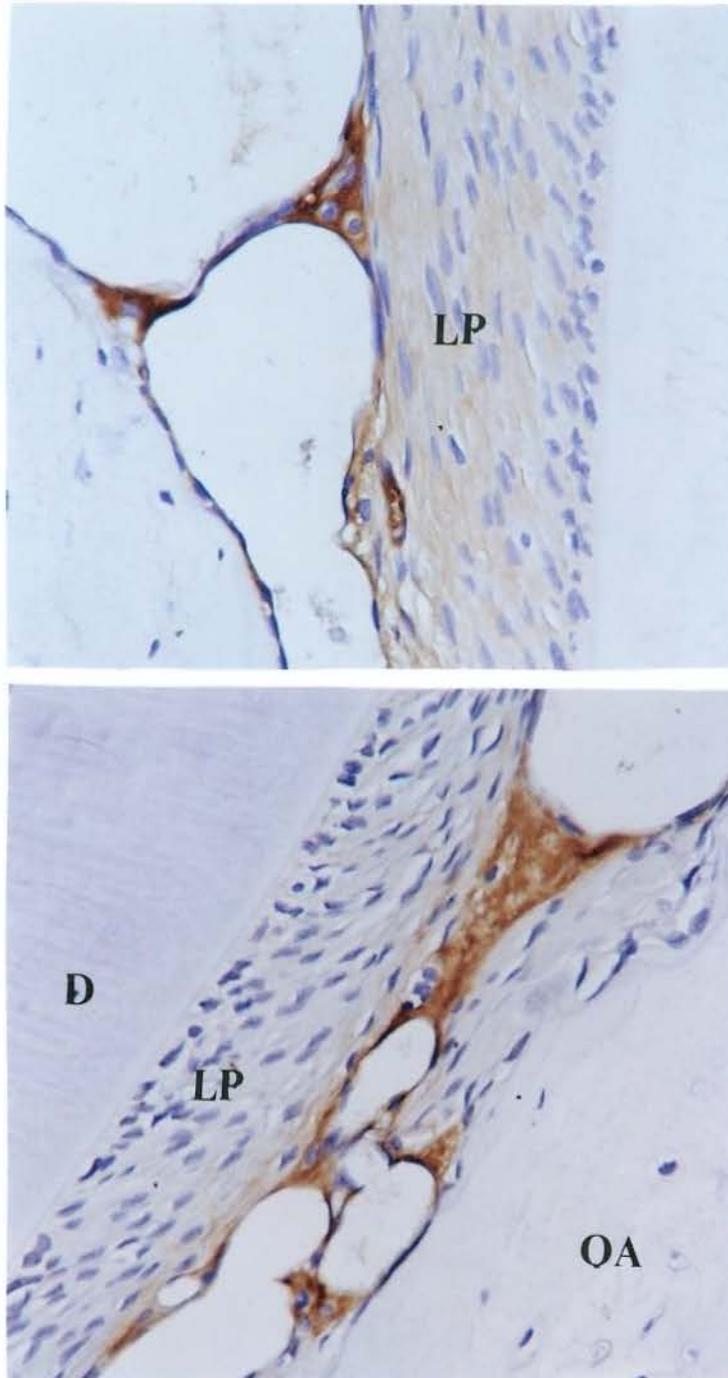


Fig. 14 – Ligamento periodontal (LP), R 1(sup.) e 4 (inf.), mostra fraca marcação, exceto adjacente ao osso alveolar (AO) e ao redor dos vasos sanguíneos (VS) onde a marcação aumenta para forte; dentina (D) sem marcação (416x).



DISCUSSÃO

Por ser a erupção dentária um processo complexo, muitos estudos têm sido feitos para se conhecer quais os fatores e tecidos envolvidos neste processo.

Um dos fatores mais recentemente estudado é o fator de crescimento epidermal, através de sua presença nos tecidos dentais, e sua modulação durante as fases de desenvolvimento do dente.

O EGF é um monômero (polipeptídeo de 53 aa), que induz a proliferação de muitos tecidos epiteliais, endoteliais e fibroblastos. É encontrado em diferentes tecidos, fluídos corpóreos e plaquetas (BENNETT & SCHULTZ, 1993)

Nos últimos anos o EGF tem sido associado com o processo da erupção dentária.

Este fator de crescimento, através de sua ligação com seu receptor – EGFr, que é uma glicoproteína transmembrana, promove uma cascata de sinais que induzem modificações celulares importantes. Somente as células que expressam este receptor são capazes de responder ao EGF (BRUCE *et al.*, 1991).

Depois de se ligar ao seu receptor, o EGF estimula a fosforilação de diferentes proteínas regulatórias importantes, incluindo a

fosfolipase cy1 , GAP – proteína trifosfato-ativante nucleosídeo guanina. A ativação destas proteínas serve como guia para a ativação de outras enzimas, como a caseinoquinase II, proteinoquinase C e outras. Estes eventos causam alterações na fisiologia da célula, como liberar cálcio intracelular do retículo endoplasmático, aumentar o transporte de glucose e aminoácidos, e a transcrição precoce dos genes requeridos na mitose como *c-jun* e *c-fos*. A tirosinoquinase localizada no domínio citoplasmático do EGFr ativada pela ligação com o EGF é essencial para a produção dos efeitos biológicos do EGF sobre a célula, pois os resíduos de tirosina formados pela fosforilação de proteínas específicas podem ser ativados ou inativados, iniciando assim uma cascata de sinais que vão induzir a migração ou divisão das células (CARPENTER & COHEN, 1990; BENNETT & SCHULTZ, 1993).

No dente incisivo de rato, são encontrados vários sítios de ligação do EGF no folículo dental, ameloblastos, camada papilar, ligamento periodontal, polpa, além de outras estruturas (THESLEFF *et al.*, 1987; WISE *et al.*, 1992; THOPAN *et al.*, 1988, MATINEAU-DOIZÉ *et al.*, 1987; LIN *et al.*, 1996).

Em nosso estudo como dividimos o dente incisivo em 5 regiões, desde a região 5: odontogênica – apical, até a região 1 incisal (intra-óssea), pudemos observar em quais fases do desenvolvimento encontraríamos o EGF; através da técnica imunohistoquímica com sistema de amplificação ABC, comprovamos a presença do EGF em diferentes tecidos e em todas as regiões em maior ou menor intensidade de marcação.

Nos cortes coletados do incisivo, na fase da região odontogênica, o dente se apresentou completamente envolvido pelo folículo, que é um tecido de origem ectomesenquimal. Nesta fase as células externas do folículo se diferenciaram em osteoblastos e formaram o osso alveolar que rodeia todo este folículo. Ameloblastos e odontoblastos já estão diferenciados nesta fase e uma camada de dentina foi formada. O folículo é rico em capilares e portanto nutri o dente em desenvolvimento, e é também responsável pela formação do ligamento periodontal presente a partir da região 4, aproximadamente.

Acima dos ameloblastos na região 5, encontramos o estrato intermédio formado por 2 ou 3 camadas de células e o retículo estrelado rico em água e proteoglicanas, e com o desenvolvimento no

sentido incisal, no caso do dente incisivo, estes dois tecidos se unem recebendo a denominação de camada papilar.

Segundo KATCHBURIAN & ARANA (1999) a papila dentária tem origem ectomesenquimal, e no estágio anterior (campânula) é a responsável pela formação dos odontoblastos. Suas células são indiferenciadas e fusiformes, com abundante matriz extracelular. Num estágio mais avançado a papila dentária se transforma em polpa (região 4), ocorre a diminuição das células ectomesenquimais, aparecem fibroblastos e mais fibras colágenas na matriz extracelular, que é bastante vascularizada, e durante o desenvolvimento a polpa dentária tem seu volume reduzido e a camada de dentina passa a ocupar o maior volume do dente. O folículo passa a se localizar na face labial do dente, enquanto que o ligamento periodontal produzido a partir de células do folículo dentário ocupa a face lingual e parte das mesial e distal.

O ligamento periodontal apresenta dois compartimentos, um relacionado ao dente, rico em células (fibroblastos e fibras colágenas), sem vasos, e outro relacionado ao osso alveolar com poucas fibras e bem vascularizado (KATCHBURIAN & ARANA 1999). Ao redor destes

vasos sangüíneos, há células indiferenciadas ectomesenquimais, com aspecto de fibroblastos inativos (BERKOVITZ & SHORE, 1978). O colágeno do ligamento periodontal tem características de tecido imaturo, exibindo elevado metabolismo de renovação (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). O ligamento conduz o dente à sua definitiva posição durante seu desenvolvimento e quando a erupção termina, o dente é mantido pelo ligamento numa apropriada afinidade com os tecidos adjacentes. No dente incisivo de rato o ligamento também permite seu movimento eruptivo contínuo embora o dente seja firmemente fixado à parede do osso alveolar (MATENA, 1973).

Em nosso estudo encontramos uma fraca intensidade de marcação no ligamento periodontal, porém a marcação aumentou na parte relacionada ao osso, ao redor de vasos, mostrando a existência de uma maior concentração de EGF.

THESLEFF em 1987, mostrou em seu estudo que as células do músculo liso dos vasos e artérias do ligamento, polpa e folículo, apresentam grande quantidade de EGF ao seu redor, concordando com nosso estudo, onde também encontramos um aumento de intensidade ao redor dos vasos do ligamento e da polpa.

Num estudo recente, MERZEL *et al.* (2000), utilizando procedimentos cirúrgicos provocaram injúrias no ligamento periodontal através da crista alveolar da superfície lingual de incisivos inferiores de rato e concluíram que o ligamento da região da crista do incisivo não participa do processo eruptivo.

THOPAN *et al.* (1988) através da radioautografia mostrou que ¹²⁵I – EGF se liga no ligamento periodontal de ratos recém-nascidos.

A literatura descreve o ligamento periodontal como um sítio importante de ligação para o EGF sugerindo que participe da erupção, mas os estudos têm mostrado que mesmo provocando danos ao ligamento, o dente erupciona independente de sua participação, (CAHILL & MARKS, 1980; MARKS & CAHIL, 1987; MERZEL *et al.*, 2000).

Segundo MARTINEAU-DOIZÉ *et al.* (1987; 1991), em seus estudos também realizados em incisivos de rato, através da radioautografia, encontraram sítios de ligação do EGF e seu receptor nos ameloblastos maduros; ameloblastos pré e secretórios; na camada papilar; odontoblastos; pré-dentina e retículo estrelado.

COBO *et al.* (1992), através da imunolocalização também mostraram em embriões de rato de 16 – 21 dias uma suave marcação nos ameloblastos; já WISE *et al.* (1992), utilizando molares de rato de 0 a 12 dias também pela imunolocalização comprovaram a presença do EGF com forte intensidade de 0 dia, diminuindo para média aos 10 dias. O EGFr também foi encontrado com média intensidade no início e diminuindo para fraca com 10 dias.

Em nosso trabalho, a presença do EGF nos ameloblastos se mostrou através de uma fraca intensidade de marcação das regiões 1 à 3, e ausência de marcação nas regiões 4 e 5. Talvez a diferença em relação à intensidade de marcação nos ameloblastos entre nosso estudo e o feito por WISE *et al.* (1992), se deva à profundidade dos cortes coletados, ou o tipo de dentição utilizada (molar e incisivo).

Nos corpos dos odontoblastos não encontramos marcação, mas na pré-dentina e/ou nos prolongamentos odontoblásticos nela presentes uma fraca marcação foi encontrada, concordando com o trabalho de MARTINEAU-DOIZÉ *et al.* (1991), que também encontraram sítios de ligação para EGF nesta região. Esta fraca

marcação na matriz do esmalte, assim suspeitamos que o EGF possa ser encontrado em maior concentração na matriz orgânica.

Nosso estudo, em relação aos odontoblastos, apresentou diferenças quando comparado com a literatura. WISE *et al.* (1992), encontraram uma média marcação para EGF e EGFr, mas seus estudos foram feitos em molares de 0 à 10 dias; e COBO *et al.* (1992) também encontraram a mesma intensidade que WISE *et al.* 1992), mas em embriões de 16 à 21 dias.

O resultado da imunohistoquímica na papila/polpa foi de média intensidade de marcação, exceto ao redor dos vasos, onde foi bastante intensa. Este aumento de intensidade foi explicado nas considerações feitas à respeito do ligamento periodontal. Esta marcação da polpa está de acordo com os resultados obtidos por WISE *et al.* (1992), sendo que em seus estudos também mostraram a presença de EGFr neste tecido e com o mesmo padrão de marcação.

Segundo MARTINEAU-DOIZÉ *et al.* (1987; 1991), nos incisivos de rato as células da camada papilar apresentaram sítios de ligação para EGF, comprovado através da injeção de ¹²⁵I – EGF; seu receptor também foi localizado neste tecido.

Nossos resultados também mostraram a ligação do anticorpo na camada papilar por uma intensidade de marcação média, mas esta intensidade diminuiu na região 4, próximo à região odontogênica. A razão desta diminuição pode ser devido a sua menor vascularização. O número de vasos sangüíneos aumenta em direção às regiões incisais.

No osso alveolar encontramos poucas células e pequenos vasos sangüíneos fracamente marcados, este resultado se mostrou diferente do encontrado por WISE *et al.* (1992), que no início do seu experimento encontraram muitas células marcadas, diminuindo com o desenvolvimento, mas ainda assim com maior intensidade quando comparado com nosso resultado, talvez, os cortes que coletamos de cada região para estudo não correspondam à fase do desenvolvimento por eles estudadas.

Nos últimos anos a pesquisa em torno da erupção se voltou para o folículo, associando a estes estudos a presença de EGF e do EGFr.

A maior intensidade de marcação que obtivemos foi no folículo dental, uma porção bem vascularizada na parte mais externa, adjacente ao osso alveolar, que apresentou o mesmo padrão em todas as regiões, comprovando uma alta concentração de EGF neste tecido.

Segundo KATCHBURIAN & ARANA (1999), o folículo está presente no desenvolvimento do dente, desde a fase de capuz, até os estágios mais avançados e, sua participação parece ser extremamente relevante nos eventos da erupção, tudo indicando que modificações químicas na sua composição, como a produção do EGF, estão relacionadas com a erupção. Este fator de crescimento que está presente no folículo induz o retículo estrelado a produzir TGF- β 1- fator de crescimento transformante β -1 e IL – interleucinas. Estes fatores iriam para o folículo que passaria a produzir CSF-1 – fator estimulante de colônia responsável por atrair monócitos que posteriormente se diferenciariam em osteoclastos e promoveriam a reabsorção do osso alveolar para finalmente formar um caminho para o dente erupcionar.

SHROFF *et al.* (1996), dizem que a erupção é acompanhada por um dramático remodelamento da matriz extracelular, mudanças bioquímicas na matriz, entre as quais um drástico decréscimo na distribuição de colágeno tipo I no folículo aos 9 dias de vida que culmina com a presença do EGF e seu receptor, mostrando que há uma dependência destes fatores para que aconteça estas mudanças.

MARKS & CAHIL em 1983, relataram em seus estudos que os osteoclastos envolvidos na reabsorção óssea estão concentrados no folículo adjacente ao osso.

Utilizando a técnica de RT – PCR, SHROFF *et al.* (1996), mostraram que os genes do EGF e o EGFr são expressados no folículo do 1º molar de rato em estágios específicos, 2, 5 e 9 dias pós-natal do desenvolvimento do dente.

MERZEL *et al.* (2000), utilizando incisivos de ratos provocaram injúrias nos tecidos periodontais relacionados ao esmalte, que compreendem: o tecido conjuntivo derivado do folículo dental e o órgão do esmalte com seus sucessivos estágios de desenvolvimento. Estas injúrias foram feitas cirurgicamente de três maneiras; introduzindo a ferramenta endodôntica no espaço periodontal labial

através de sua porção basal, na sua extremidade incisal, ou pela remoção parcial da borda mandibular inferior na região dos molares junto com a introdução da ferramenta endodôntica na parte incisal deste espaço, mostrando que as três diferentes maneiras usadas para provocar danos nos tecidos periodontais relacionados ao esmalte produziram efeitos sobre a taxa de erupção e concluíram que os resultados obtidos sugerem que os tecidos periodontais relacionados ao esmalte, como o tecido conjuntivo derivado do folículo dental e o órgão do esmalte após a secreção do esmalte estar completada, são responsáveis pelo controle e manutenção do processo eruptivo.

CAHIL & MARKS (1980) dizem que o papel do folículo é de controle local na formação e reabsorção óssea (provavelmente mediada pelo EGF). Estes autores em seus experimentos mostraram que a ausência da raiz ou do ligamento periodontal não afeta a erupção, mas removendo-se o folículo, o dente não erupciona, e deixando o folículo intacto e substituindo o dente por um objeto inerte, este erupciona.

MARKS & CAHIL, (1987), examinaram o efeito da erupção fazendo remoção cirúrgica seletiva de partes do folículo dental de pré molares permanentes de cachorros e concluíram que: 1- a remoção da parte coronal do folículo previne a erupção, não ocorre reabsorção óssea para desenvolver um caminho para a erupção; 2- removendo-se a parte basal do folículo o dente também não erupciona, não ocorre formação óssea, mas a reabsorção acontece; 3- removendo-se todo o folículo dental, não ocorre atividade de erupção dentária, neste caso a carência da erupção resulta da ausência da reabsorção e formação óssea, assim a presença do folículo é indispensável para que a erupção dentária aconteça. Estas observações sugerem que realmente a erupção do dente resulta da reabsorção óssea ao redor da superfície oclusal e formação óssea ao redor da porção radicular do dente, estes eventos são iniciados, coordenados e terminados por uma série de fatores locais, sendo os mais importantes, senão preponderantes, o EGF, o EGFr, e a vascularização do tecido, necessária para que ocorra migração de células mononucleares, os monócitos, que após se diferenciarem em osteoclastos promovem a reabsorção do osso alveolar formando assim uma via para que o den-

te chegue à cavidade oral; portanto o folículo tem participação principal na erupção dentária associado aos efeitos biológicos causados pelo EGF.

THESLEFF *et al.* (1987) observaram que células na parte apical do folículo dental e dentes em erupção seletivamente se ligam ao EGF e que a característica da erupção precoce de incisivos de roedores seguido da administração de EGF é acompanhado pela elevada atividade mitótica nas células basais. Estas observações sugerem que a formação do osso nos dentes em erupção pode ser relacionada à proliferação de células dependentes de EGF mediada ou moderada pela parte basal do folículo.

Apesar de não encontrarmos diferenças na intensidade de marcação em relação ao folículo dental, nas 5 regiões estudadas, a quantidade de tecido diminui em direção à região apical. WISE, *et al.*, (1992), mostraram que o EGF diminui no molar à medida que o dente se desenvolve e erupciona, porém nos incisivos essa diminuição da quantidade de tecido é mais fácil de ser observada, pois ela ocorre simultaneamente no mesmo dente.

Esta intensa marcação para o EGF encontrada no folículo dental do incisivo, sugere uma grande participação deste tecido na erupção dental, no entanto, não podemos afirmar se este EGF está sendo produzido ou recrutado pelas células do folículo. Assim, seria interessante novos estudos utilizando também o receptor para o EGF, o que nos garantiria que realmente a célula estaria utilizando-o. Além disso, poderíamos verificar alterações também na concentração deste fator de crescimento, se alterássemos a taxa de erupção do incisivo através da desocclusão e observar se realmente a quantidade de EGF diminui em direção à incisal.



CONCLUSÕES

Através da imunolocalização do EGF- fator de crescimento epidermal no incisivo do rato, podemos concluir que:

O EGF está presente em todas as regiões do dente incisivo em diferentes estruturas e intensidades.

* O folículo dental foi o tecido que apresentou-se mais fortemente marcado nas 5 regiões.

* Esta marcação demonstra uma intensa concentração do EGF, o que sugere um papel fisiológico importante do folículo na erupção e desenvolvimento do dente incisivo.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- 1) ADAMSON, E.D. Developmental of epidermal growth factor receptor. *In: HAMILTON, M.N. Growth Factors and development.* New York : John Wiley, 1990. Cap.1, p.1-30.
- 2) BENNETT, N.T., SCHULTZ, G.S. Growth factors and wound Healing. *Am J Surg*, Newton, v. 165, n. 6, p. 728-737, 1993.
- 3) BERKOVITZ, B.K., SHORE, R.C. The ultrastructure of the aspect of the rat incisor periodontium in normal and root resected teeth. *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 23, n. 8, p. 681-689, 1978.
- 4) BRUCE, A. *et al. Biologia molecular da célula.* 2. ed. Porto Alegre : Artes Médicas, 1991. p. 892-898.
- 5) CAHILL, D.R., MARKS, S.C.JR. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol*, Copenhagen, v. 9, n. 4, p. 189-200, 1980.

- 6) CARPENTER, G., COHEN, S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem*, Palo Alto, v. 48, p. 193-216, 1979.
- 7) CARPENTER, G., COHEN, S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 265, n. 14, p. 7709-7712, 1990.
- 8) COBO, J. *et al.* Immunohistochemical localization of epidermal growth factor and its receptor during odontogenesis in the rat. *Eur J Orthod*, Oxford, v. 14, n. 5, p. 333-338, 1992.
- 9) COHEN, S. Epidermal growth factor. *Biosci Rep*, New York, v. 6, n. 12, p. 1017-1028, 1986.
- 10) COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 237, p. 1555-1562, 1962.

- 11) COHEN, S., SAVAGE, C.R. Recent studies on the chemistry and biology of EGF. *Recent Prog Horm Res*, New York, v. 30, p. 551-574, 1974

- 12) JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 9. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1999. p. 245-248.

- 13) KARNOVSKY, M.J., A Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electronmicroscopy. *Journal of Cell Biol.*, v. 27 n. 2, 137-138, 1965.

- 14) KATCHBURIAN, E., ARANA, V. *Histologia e embriologia oral*. Bogotá : Panamericana, 1999. p. 151-180, 335-354.

- 15) LIN, F., ZHAO, L., WISE, G.E. *In vivo* and *in vitro* effects of epidermal growth factor on its receptor gene expression in rat dental follicle cells. *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 41, n. 5, p. 485-491, 1996.

- 16) MATENA, V. Periodontal Ligament of a rat incisor tooth. *J Periodontol*, Chicago, v. 44, n. 10, p. 629-635, 1973
- 17) MARKS , S.C.JR., CAHIL, D.R. The cytology of the dental follicle and adjacent alveolar bone during tooth eruption. *Am J Anat*, New York, v. 168, n. 3, p. 277-289, 1983.
- 18) MARKS, S.C.JR., CAHIL, D.R. Regional control by the dental follicle of alterations in alveolar bone metabolism during tooth eruption. *J Oral Pathol*, Copenhagen, v. 16, n. 4, p. 164-169, 1987.
- 19) MARTINEAU-DOIZÉ, B. *et al.* Localization of epidermal growth factor receptor in cell of the enamel organ of the rat incisor. *Dev Biol*, Orlando, v. 148, n. 2, p. 590-601, 1991.
- 20) MARTINEAU-DOIZÉ, B. *et al.* Specific binding sites for epidermal growth factor in bone and incisor enamel organ of the rat. *Dev Diseases of Cartilage and Bone Matrix*, p. 389-399, 1987.

- 21) MERZEL, J., NOVAES, P.D., FURLAN, S., The effects of trauma to the enamel – related periodontal tissues in the eruption of the rat incisor. *Arch Oral Biol*, Oxford, p. 1-11, 2000. [no prelo]
- 22) MOXHAM, B.J., BERKOVITZ, B.K.B. Interactions between thyroxine, hidrocortisone and cyclophosphamide in their effects on the tooth eruption of the rat mandibular. *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1083-1087, 1983.
- 23) PARTANEM, A.M. Epidermal growth factor and transforming growth factor in the development of epithelial – mesenchymal organ of the mouse. *In: HAMILTON, M.N. Growth factors and development*. New York : John Wiley, 1990. Cap. 2, p. 31-53.
- 24) PARTANEN, A.M., THESLEFF, I. Localization and quantitation of ¹²⁵I epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. *Dev Biol*, Orlando, v. 120, n. 1, p. 186-197, 1987.

- 25) RITHINIEMI, L., THESLEFF, I. An autoradiographic study on the effect of epidermal growth factor on cell proliferation in erupting mouse incisors. *Arch Oral Biol, Oxford*, v. 32, n. 4, p. 859-863, 1987.
- 26) SCHOUR, I., MASSLER, M. The teeth. *In: FARRIS, E.J., GRIFFITH, J.Q.JR. Rat in laboratory investigation. 2.ed. New York : Hafner Publishing, 1971. Cap. 6, p. 105-135.*
- 27) SHOROFF, B. *et al.* Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. *Arch Oral Biol, Oxford*, v. 41, n. 6, p. 613-617, 1996.
- 28) THESLEFF, I. Does the epidermal growth factor control tooth eruption? *ASDC J Dent Child, Chicago*, v. 54, n. 5, p. 321-329, 1987.

- 29) THESLEFF, I., PARTANEM, A.M., RITHNIEMI, L. Localization of epidermal growth factor receptors in mouse incisor and human premolars during eruption. *Eur J Orthod*, Oxford, v. 9, n. 1, p. 24-32, 1987.
- 30) THOPAN, R.T. *et al.* Effects of epidermal growth factor on tooth differentiation and eruption. *EBSCO Media*, Birmigham, p. 117-131, 1988.
- 31) WISE, G.E., LIN, F., FAN, W. Localization of EGF and its receptor in mandibular molar of the rat prior to and during prefunctional tooth eruption. *Dev Dyn*, New York, v. 195, n. 2, p. 121-126, 1992.



ANEXO



Comissão de Ética na Experimentação Animal
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 090-01, sobre "Localização Imuno-Histoquímica do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) em Incisivos Inferiores de Rato Wistar" sob a responsabilidade de Silvana Pasetto / Pedro Duarte do Depto. de Morfologia da FOP/UNICAMP está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 02/12/1999. Este certificado expira em 01/12/2000.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 090-01, about "Immunochemical localization of Epidermal Growth Factor (EGF) in Mandibular Incisor of the Wistar Rat", agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Biological Institute/UNICAMP Ethical Committee for Animal Research (CEEA) in 12/02/1999. Expiration date 12/01/2000.

Prof(a) Dr(a) Alba R. M. S. Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Campinas, 02 de 12 de 1999

Armando Ferraz Junior Filho
Prof(a) Dr(a)
Secretário(a) - CEEA/IB/UNICAMP