

LUCIANA ALVES HERDY DA SILVA

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DA MATRIZ DENTINÁRIA 1 (DMP1) EM
DIFERENTES ESTÁGIOS DA ODONTOGÊNESE**

CAMPINAS
2008

LUCIANA ALVES HERDY DA SILVA

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DA MATRIZ DENTINÁRIA 1 (DMP1) EM
DIFERENTES ESTÁGIOS DA ODONTOGÊNESE**

Tese apresentada ao Centro de Pós-Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, para obtenção do grau de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Ciências Odontológicas.

Orientadora: Profa Dra Vera Cavalcanti de Araújo

CAMPINAS
2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"

Si586e Silva, Luciana Alves Herdy da.
Expressão da proteína da matriz dentinária 1 (DMP1) em diferentes estágios da odontogênese / Luciana Alves Herdy da Silva. – Campinas: [s.n.], 2008.
54f.: il.

Orientador: Vera Cavalcanti de Araújo.
Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) – C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação.

1. Odontogênese. 2. Imunoistoquímica. 3. Odontoblastos.
I. Araújo, Vera Cavalcanti. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação. III. Título.

**C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS
SÃO LEOPOLDO MANDIC**

Folha de Aprovação

A tese intitulada: “**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DA MATRIZ DENTINÁRIA 1 (DMP1) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA ODONTOGÊNESE**” apresentada ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, área de concentração: Ciências Odontológicas em 16/04/2008, à comissão examinadora abaixo denominada, foi aprovada após liberação pelo orientador.

Prof. (a) Dr (a) Vera Cavalcanti de Araujo
Presidente

Prof. (a) Dr (a) Cristiane Furuse
1º Membro

Prof. (a) Dr (a) Marcelo Jose Strazzeri Bonecker
2º Membro

Prof. (a) Dr (a) Andresa Borges Soares
3º Membro

Prof. (a) Dr (a) Franco Arsati
4º Membro

DEDICATÓRIA

Ao senhor Deus
Que dirige toda a minha vida,
Concedendo-me forças em tudo.
Somente em Ti Senhor realizo todas as coisas.

Ao meu esposo Sérgio
Seu amor, carinho e dedicação
Incentivam-me a vencer as etapas
Da nossa vida e a ir além.

Aos meus pequeninos
Frederico e Manuela
Presente de Deus em dobro
Vocês se tornaram a razão da minha vida

À minha mãe Noredi,
Por acreditar sempre nas minhas vitórias.

AGRADECIMENTOS

À Deus sempre a minha gratidão, pois sem Ele nada sou.

À meu esposo, pela dedicação e amor, demonstrado em todo tempo.

Obrigada pelos seus cuidados, paciência e disponibilidade nos momentos em que pude acompanhá-lo apenas em meus pensamentos.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Vera Cavalcanti de Araújo, obrigada por conduzir a realização desse trabalho de forma tão amável e compreensível. Poder estar ao seu lado representa para mim uma grande lição, mais do que palavras podem descrever.

À co orientadora Prof^a Elizabeth Martinez, pela paciência, disponibilidade e carinho sempre a mim dispensados. Sem sua ajuda seria “quase” impossível.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bonecker, seu exemplo de dedicação na arte de orientar e ensinar, sem jamais temer o compartilhar do conhecimento, será sempre fonte de inspiração.

Aos Prof^s Dr^s Ney Araújo e Cristiane Furuse, pela colaboração nas etapas de elaboração.

A equipe de funcionárias do Laboratório de Patologia Bucal da SL Mandic, sempre dispostas a nos atender com carinho.

À Sara, mas do que funcionária, amiga, por cumprir de forma tão responsável e dedicada sua profissão me permitindo realizar outros projetos sem preocupação.

À minha amiga Andréa de Paula Fregonese e seus familiares, obrigada pelo carinho de sempre e o amor que faz diminuir as distâncias. Sua companhia durante o decorrer do curso com incentivos e conselhos me fez ir mais longe. O exemplo de sua dedicação aos estudos e a difícil tarefa de vencer obstáculos para ensinar me motivam a crescer a cada dia na carreira educacional.

Ao meu irmão José Luiz, que foi amigo e companheiro, além de colega de curso, partilhar esses momentos com você foi inesquecível. Sem seu incentivo certamente essa oportunidade teria passado em branco.

À São Leopoldo Mandic, instituição que acreditou na capacidade de muitos, abrindo suas portas para aqueles que além de serem capazes, acreditam e amam o magistério.

À todos os professores que compartilharam o saber de forma amigável. Equipe de Odontopediatria e Corpo docente do doutorado obrigada pela oportunidade de aprender com vocês.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

“Muitos são os planos do coração do homem; mas o desígnio do Senhor, esse prevalecerá.”

Provérbios 19:21

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a proteína da matriz dentinária 1 (DMP1). Uma fosfoproteína ácida, que em sua estrutura e composição observa-se um alto conteúdo de ácido aspártico, ácido glutâmico e resíduos de serina. A presença das serinas fosforiladas permite a interação da DMP1 com alguns cátions como o cálcio e o fosfato que permite relacioná-la com o processo de mineralização dos tecidos duros. Através de estudo qualitativo associado à técnica de imunistoquímica, foi avaliada a expressão da DMP1 em dentes derivados de sete fetos humanos em diferentes estágios gestacionais: 14, 16, 19, 20, 21, 23 e 24 semanas, e comparamos com três dentes com rizogênese completa. Os resultados mostraram que a DMP1 foi expressa na lâmina dentária no núcleo das células da periferia voltadas para o lado do germe dentário e em células centrais tanto no núcleo como no citoplasma. No germe dentário, em fase de campânula, no órgão do esmalte, no epitélio externo apresentou no núcleo e no citoplasma de algumas células marcação heterogênea para a DMP1. No retículo estrelado a marcação foi positiva em núcleo e em citoplasma. No estrato intermediário a expressão da DMP1 foi bastante positiva. No epitélio interno e na alça cervical, a marcação foi heterogênea no núcleo e no citoplasma. Na papila dentária em sua maior extensão, a DMP 1 mostrou positividade homogênea nas suas células. Entretanto, na região mais próxima aos pré-ameloblastos, a DMP1 apresentou uma marcação heterogênea, com expressão tanto em núcleo como em citoplasma. Na fase de coroa, no órgão do esmalte, no epitélio externo a DMP1 foi expressa apenas em núcleos celulares. No retículo estrelado apresentou marcação positiva tanto em núcleo como no citoplasma. No estrato intermediário houve forte marcação para a DMP1. Os ameloblastos apresentaram marcação positiva para a DMP1, mas nas fases com mineralização avançada a morfologia se apresentou de forma “aerada” sugerindo a não marcação das organelas citoplasmáticas. Nas células da alça cervical a marcação positiva se deu apenas nos núcleos. E nenhuma marcação foi observada na matriz mineralizada do esmalte. Na papila dentária os odontoblastos mostraram marcação positiva em núcleo e em citoplasma, as demais células da papila apresentaram heterogeneidade para a marcação da DMP1 e discreta marcação na matriz extracelular. Na dentina os túbulos dentinários próximos à região odontoblástica se mostraram positivos para a DMP1. Nos dentes com rizogênese completa a expressão positiva da DMP1, se deu apenas numa faixa estreita de dentina próxima a pré-dentina. Concluí - se que nas diferentes fases da odontogênese houve a expressão da DMP1, porém novos estudos se fazem necessários para melhor entendimento de sua função em cada fase da organogênese.

Palavras-chave: Odontogênese. Imunistoquímica. Odontoblastos.

ABSTRACT

The aim of these study was to available the dentinal matrix protein 1 (DMP1). Its a phosfoprotein acid, that in its structure and composition is observed a high content of aspartic acid, glutamic acid and serine residues. The presence of the phosforilad serine allows the interaction of DMP1 with some cations as the calcium and the phosphate that it allows to relate it with the process of mineralization of the hard tissue. Through study qualitative associate to the Immunocytochemistry technique, we evaluated the expression of DMP1 in derived teeth of seven human fetuses in different apprenticeships: 14, 16, 19, 20, 21, 23 and 24 weeks, and we compared with three teeth with completes root. The results showed that DMP1 was expressed in the dental sheet in the nucleus of the cells of the periphery returned to the side of the dental germ and in central cells in the nucleus and in the cytoplasm. In the dental germ, in campanula phase, the organ of the enamel, in the external epithelium presented in the nucleus and in the cytoplasm of some cells heterogeneous demarcation for DMP1. In the starred reticulum the demarcation was positive in nucleus and in cytoplasm. In the intermediate stratum the expression of DMP1 was quite positive. In the internal epithelium and in the cervical loop, the demarcation was heterogeneous in the nucleus and in the cytoplasm. In the dental papilla in largest extension, DMP 1 showed homogeneous assertiveness in their cells. However, in the closest area to the preameloblasts, DMP1 presented a heterogeneous demarcation, with expression in nucleus and in cytoplasm. In the crown phase, in the organ of the enamel, in the epithelium I express DMP1 was expressed just in cellular nuclei. In the starry reticulum it presented positive demarcation in nucleus and in the cytoplasm. In the intermediate stratum there was strong demarcation for DMP1. The ameloblasts presented positive demarcation for DMP1, but in the phases with advanced mineralization the morphology came of form "aerada" suggesting the non demarcation of the citoplasmatic organelles. In the cells of the cervical loop the positive demarcation just felt in the nuclei. And no demarcation was observed at the mineralized head office of the enamel. The dental papilla the odontoblast showed positive demarcation in nucleus and in cytoplasm, the other cells of the papilla presented heterogeneity for the demarcation of DMP1 and discreet demarcation in the head office extra cellular. In the dentine the dentinal tubules close to the odontoblast area were shown positive for DMP1. In the teeth with completes root the positive expression of DMP1 just in a narrow strip of close dentine the pre-dentine. The concluded of this work was that in the different phases of the odontogenesis there was the expression of DMP1, however new studies are made necessary for better understanding of function in each phase of the organogenesis.

Keywords: Odontogenesis. Immunohistochemistry. Odontoblast.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Fotomicrografia da lâmina dentária, técnica imunoistoquímica. Observa-se que as células periféricas da lâmina voltadas para o lado do germe dentário apresentaram na sua maioria, expressão positiva no núcleo para a proteína DMP1, enquanto que as células periféricas do lado oposto mostraram-se negativas (A). As células centrais da lâmina apresentaram expressão tanto em núcleo como em citoplasma (B) Aumentos originais: A- X200; B- X400. 32
- Quadro1 - Expressão da DMP1 na Lâmina Dentária do dente em desenvolvimento 33
- Quadro2 - Expressão da DMP1 no Germe Dentário fase de Campânula no Órgão do Esmalte 35
- Figura 2 - Fotomicrografias de germes dentários em fase de campânula, técnica imunoistoquímica. Em A, observa-se o órgão do esmalte. A marcação para a DMP1 mostra-se bastante heterogênea no epitélio externo do órgão do esmalte, com algumas células expressando a proteína em seu citoplasma e núcleo. As células do retículo estrelado mostram marcação positiva para a DMP1 (B). Pode-se notar forte marcação da DMP1 nas células do estrato intermediário (C). No epitélio interno a marcação da proteína mostra-se heterogênea com algumas células positivas para a DMP1 tanto em núcleo como no citoplasma (C). Na papila dentária, na região mais próxima aos pré-ameloblastos, somente algumas células expressam a DMP1 no núcleo e no citoplasma (D). Na alça cervical, há expressão da proteína DMP1 em algumas células, tanto em núcleo, como citoplasma (E). Aumentos originais: A- X200; B- X400; C e D- X1000; E- X400. 36
- Quadro 3 - Expressão da DMP1 na fase de coroa no órgão do esmalte..... 37
- Quadro 4 - Expressão da DMP1 na fase de Coroa na Papila Dentária 37
- Figura 3 - Fotomicrografia de germes dentários em fase de coroa, técnica imunoistoquímica. As células do retículo estrelado e estrato intermediário mostram marcação positiva para a DMP1 (A). Os ameloblastos apresentam-se positivos para a DMP1 tanto em núcleo, quanto em citoplasma (B). Nenhuma marcação é observada na matriz de esmalte (B). Os odontoblastos apresentam-se positivos para a DMP1 tanto em núcleo, quanto em citoplasma (B). Na dentina observamos marcação na região de túbulos dentinários próximos à camada de odontoblastos (B). Nas células da papila dentária, observa-se algumas células marcadas para a DMP1 e discreta marcação na matriz extracelular (C). 38
- Quadro 5- Expressão da DMP1 na fase de Coroa no dente com Rizogênese Completa..... 39

Figura 4 - Fotomicrografia de dente com rizogênese completa, técnica imunoistoquímica. Na dentina, uma faixa estreita próxima à pré-dentina mostra marcação dos túbulos dentinários (A). Esta marcação pode ser vista esporadicamente também em alguns túbulos mais distantes desta região, bem como nas linhas de estresse (B). Na polpa e pré-dentina não há expressão da DMP1 nem em células ou matriz extracelular (A)..... 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	- Grau Celsius
µm	- Micrômetro
DMP1	- Proteína da Matriz Dentinária 1
DMP2	- Proteína da Matriz Dentinária 2
DMP3	- Proteína da Matriz Dentinária 3
DPP	- Fosfoproteína Dentinária
DSP	- Sialoproteína Dentinária
DSPP	- Sialofosfoproteína Dentinária
OPN	- Osteopontina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.2 Proteína da matriz dentinária 1 - DMP1	22
3 PROPOSIÇÃO	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Dente em desenvolvimento	31
5.1.1 Lâmina Dentária	31
5.1.2 Germe dentário.....	33
5.1.2.1 Fase de câmpanula.....	33
5.1.2.1.1 Órgão do esmalte.....	33
5.1.2.1.2 Papila Dentária.....	34
5.1.2.2 Fase de coroa	35
5.1.2.2.1 Órgão do esmalte.....	35
5.1.2.2.2 Papila dentária	37
5.2 Dente com rizogênese completa.....	39
5.2.1 Dentina	39
5.2.2 Polpa.....	39
5.3 Outras estruturas	39
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO A - FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	53

1 INTRODUÇÃO

O processo de desenvolvimento das estruturas dentais são independentes devido à formação de cada estrutura representar um elemento dental morfológicamente diferente. Esse processo é contínuo e didaticamente é dividido em fases de acordo com a forma que se apresenta: botão, capuz, campânula, coroa e raiz.

A odontogênese tem seu verdadeiro início na fase de botão, com a proliferação uniforme da lâmina dentária ao longo dos futuros arcos originando em cada arco dez pequenas esférulas que invadem o ectomesênquima, iniciando o processo de formação dos germes dentários (Katchburian, Arana, 2004).

Estabelecida a fase de campânula vários componentes do germe dental poderão ser observados. A porção epitelial será denominada órgão do esmalte. A condensação resultante do aumento do ectomesênquima conduz a observação de uma massa celular, denominada papila dentária que mais adiante originará a dentina e o cemento, ainda nessa fase será atribuída a morfo e a histodiferenciação dos elementos dentais devido à diminuição da divisão celular do órgão do esmalte e do ectomesênquima (Katchburian, Arana, 2004).

Nos diferentes estágios da odontogênese a migração, condensação, diferenciação e proliferação celular são importantes eventos. A diferenciação das células da periferia da papila dentária em odontoblastos originará a dentina que posteriormente formarão a dentina coronária e a radicular. Tais estágios são altamente controlados, pois resultam na conversão de pré-dentina não mineralizada em dentina mineralizada (Hart, Hart, 2007). Os odontoblastos organizados em uma

matriz simples irão sintetizar e secretar os componentes da matriz extracelular da dentina primária e secundária controlando subsequentemente a mineralização (Smith et al., 1995; D'Souza et al., 1995; Magloire et al., 2001; Arana-Chavez, Massa, 2004). Na composição da matriz extracelular da dentina estão presentes componentes fibrilares, substância fundamental interfibrilar, que é composta de fibrilas colágenas, proteínas não colágenas como a sialofosfoproteína dentinária (DSPP), que se divide em sialoproteína dentinária (DSP) e fosfoproteína dentinária (DPP), proteínas da matriz dentinária 1,2 e 3 (DMP1, DMP2 e DMP3) e proteínas morfogenéticas dentinárias (Katchburian, Arana, 2004; Hart, Hart, 2007).

A DMP1 é uma fosfoproteína ácida que tem sido relacionada diretamente ao processo de mineralização dos tecidos em formação (Massa et al., 2005). E sua expressão nos odontoblastos é essencial para uma normal odontogênese (Lu et al., 2007). Em sua estrutura e composição, observa-se um alto conteúdo de: ácido aspártico, ácido glutâmico e resíduos de serina. As serinas permitem a interação da DMP1 com cátions, como cálcio e o fosfato. Tal interação permite relacionar a DMP1 com os processos de mineralização dos tecidos duros, com a iniciação dos processos de nucleação e regulação do crescimento dos cristais de hidroxiapatita, que se organizam na presença da mesma (Srinivasan et al., 1999; Narayanan et al., 2003).

Evidências relacionam a DMP1 aos processos de bio-mineralização, pois o bloqueio da mesma reduziu a expressão da fosfatase alcalina e da osteocalcina que são proteínas envolvidas na mineralização de muitos tecidos (Aguiar, 2007).

O presente estudo visa analisar a expressão da DMP1 nos diferentes estágios da odontogênese, através de estudo qualitativo associado a técnicas de

imunoistoquímica, visando esclarecer o papel da expressão da mesma nos mecanismos de mineralização do tecido dentário.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Odontogênese

Na embriogênese notamos que a formação dos primórdios da cavidade bucal aparece inicialmente na forma de uma discreta depressão no ectoderma superficial, chamada de estomódio, por volta do início da quarta semana de gestação humana. Posteriormente os dentes são formados a partir do ectoderma e do mesoderma. Nos elementos dentários o esmalte se forma a partir do ectoderma da cavidade bucal e os demais tecidos como: dentina, cimento e polpa são originários do mesênquima circundante que se deriva do mesoderma (Moore, Persuad, 1995).

Odontogênese é a denominação dada ao processo de desenvolvimento da estrutura dental, onde cada tecido é formado por um processo específico. Constituem formas de desenvolvimento independente devido à formação de cada estrutura representar um elemento dental morfológicamente diferente, divididos em grupos denominados, incisivos, caninos, pré-molares e molares. Tem seu início através da interação do epitélio oral e o ectomesênquima adjacente, que originará a banda epitelial primária e, a seguir, a lâmina dentária (Katchburian, Arana, 2004).

Normalmente dois conjuntos de dentes são formados: a dentadura decídua e a dentição permanente. A influência indutora do mesênquima, originário da cristal neural, sobre o ectoderma subjacente sugere o início de desenvolvimento dos elementos dentários. O processo de desenvolvimento dos dentes é contínuo, porém o entendimento de tal processo viabiliza-se com a divisão didática em fases, baseadas na forma que se apresentam: broto, capuz e sino. O

início de formação dos elementos dentários não se dá ao mesmo tempo para todos os dentes, ela se inicia na região anterior da mandíbula, mais tarde na região anterior da maxila e avança em sentido posterior em ambos os maxilares, e prossegue durante um ano após o nascimento (Moore, Persuad, 1995).

A partir da lâmina dentária os germes dentários seguem as fases de botão, capuz, campânula, coroa e raiz. A formação específica dos diversos tecidos que irão constituir o dente e suas estruturas de suporte terão início a partir da fase de campânula. Recebendo dessa forma denominações distintas como: dentinogênese - correspondente à formação da dentina, amelogênese - formação do esmalte, cementogênese - formação do cimento, e osteogênese- formação óssea. (Katchburian, Arana, 2004).

Nas fases da odontogênese a fase de botão representa o verdadeiro início da formação de cada dente. A lâmina dentária se prolifera uniformemente ao longo dos futuros arcos, e apresenta numerosas atividades mitóticas diferenciais em alguns locais, que darão origem a dez pequenas esférulas que invadem o ectomesênquima, iniciando o processo de formação dos germes dentários decíduos, fato que ocorre a partir da oitava semana de vida intra-uterina. Na fase de botão, que não é necessariamente a mesma para todos os dentes, o ectomesênquima subjacente apresenta uma discreta condensação de células onde irão estar presentes a tenascina e o sidecan-1, que são regulados por sinais das células em proliferação, que interagem também com outros elementos da matriz extracelular quanto com os fatores de crescimento (Katchburian, Arana, 2004).

O crescimento desigual proveniente da continuação da proliferação epitelial se dá em forma de boné e denomina esta fase da odontogênese como capuz. Apresenta no centro da parte mais profunda uma concavidade que contém

um número expressivo de células ectomesenquimais que pode estar relacionada à interação célula- matriz extracelular, a provável pressão criada pela condensação ectomesenquimal na parte central resulta na formação de sua borda (Katchburian, Arana, 2004).

Estabelecida a fase de capuz vários componentes do germe dentário podem ser observados. A porção epitelial será chamada de órgão do esmalte. A condensação resultante do aumento do ectomesênquima conduz a observação de uma massa celular, denominada de papila dentária que futuramente dará origem à dentina e ao cimento.

O crescimento do órgão do esmalte se caracteriza pela diminuição da proliferação das células epiteliais. Nesta fase a parte epitelial do germe dentário se apresenta em forma de sino com margens profundas devido a concavidade estar mais acentuada, assim sendo chamada de fase de campânula. A diferenciação celular do germe dentário ocorre quando a divisão celular do órgão do esmalte e do ectomesênquima diminuem. Sendo atribuída a essa fase a morfo e histodiferenciação (Katchburian, Arana, 2004).

A primeira camada da matriz de dentina aparece quando na papila dentária adjacente, as células ectomesenquimais da região periférica, sob influência dos pré ameloblastos param de se dividir e aumentam de tamanho e se diferenciam em odontoblastos (Katchburian, Arana, 2004).

Os túbulos dentinários que formam a dentina são abundantes e atravessam toda a sua espessura. São preenchidos por extensões citoplasmáticas dos odontoblastos, que se diferenciam a partir das células ectomensenquimais da papila dentária, por indução recíproca com as células do epitélio interno do órgão do esmalte (Ten Cate, 1998).

Na fase de coroa ocorre a deposição de dentina e esmalte, em regiões adjacentes os odontoblastos secretam os constituintes da matriz orgânica da primeira camada de dentina, que se dá de fora para dentro (Katchburian, Arana, 2004).

Os odontoblastos organizados em uma camada simples se diferenciam no estágio de sino tardio da odontogênese, sintetizam e secretam os componentes da matriz extracelular da dentina primária e secundária controlando subsequentemente a mineralização (Smith et al., 1995; D'Souza et al., 1995; Magloire et al., 2001; Arana- Chavez, Massa, 2004).

O esmalte reveste a coroa dentária e difere dos demais tecidos mineralizados por sua origem ectodérmica. As células responsáveis pela sua formação são os ameloblastos e estão envolvidos na síntese e secreção das proteínas da matriz e na mineralização do mesmo. É composto essencialmente por cristais de fosfato de cálcio sob a forma de hidroxiapatita (97%), por material orgânico (1%) e por água (2%) (Aguar; 2007).

No início da amelogênese as proteínas da matriz do esmalte se apresentam de forma abundante e parecem influenciar a organização estrutural e a mineralização do esmalte. As diversas proteínas que formam a matriz não mineralizada do esmalte incluem a amelogenina e as não amelogeninas e as proteinases (Smith, 1995; Hu et al., 2001).

Durante a dentinogênese as células da periferia da papila dentária se diferenciam em odontoblastos que darão origem a dentina que irá se diferenciar em duas etapas: a de formação da dentina coronária e outra da radicular. A dentinogênese é um processo altamente controlado que resulta na conversão da pré-dentina não mineralizada em dentina mineralizada (Katchburian, Arana, 2004).

A dentina se caracteriza por ser um tecido mineralizado de natureza conjuntiva e avascular, produzida pelos odontoblastos que se diferenciam das células mesenquimais da papila dentária, constitui a maior parte da estrutura do dente. É constituída de 70% de mineral, 18% de material orgânico e 12% de água. Seu componente inorgânico é constituído por cristais de hidroxiapatita, enquanto a porção orgânica contém principalmente colágeno do tipo I, frações de colágeno tipo III e V, glicoproteínas, proteoglicanos e proteínas não colágenas (Ten Cate, 1998; Katchburian, Arana, 2004; Hart, Hart, 2007).

A dentina se constitui de inúmeros túbulos dentinários que atravessam toda a sua espessura e são preenchidos por extensões citoplasmáticas dos odontoblastos, diferenciados a partir de células ectomesênquimais da papila dentária (Ten Cate, 1998). O odontoblasto sintetiza e secreta os componentes da matriz extracelular da dentina primária e secundária durante a dentinogênese, controlando subsequentemente sua mineralização. Apresenta também estrutura tubular que concede resiliência ao tecido desempenhado dessa forma a sustentação do esmalte dentário reduzindo o risco de fraturas (D'Souza et al., 1995; Smith et al., 1995; Magloire et al., 2001; Arana-Chavez, Massa, 2004).

A expressão de vários genes que codificam as proteínas colágenas e não colágenas por modificações morfológicas marcam a diferenciação dos odontoblastos. Alguns desses genes se expressam de forma específica e pode confirmar o fenótipo de odontoblasto completamente diferenciado (Ruch et al., 1995). Expressam a sialofosfoproteína dentinária (DSPP), produto de gene não transcrito por outras células como osteoblastos (Gaikwad et al., 2001). Em humanos podemos observar a presença de três tipos de dentina: primária, secundária e terciária. A dentina primária é o tecido secretado antes do término da formação

radicular. Já a secundária é produzida após a formação radicular de forma lenta durante toda a vida (Smith et al., 1995). A dentina terciária, a matriz dentinária se deposita em locais específicos da interface polpa-dentina em resposta a um estímulo, podendo ser classificada dependendo da severidade da agressão e das condições do tecido pulpar em reacional ou reparativa (Smith et al., 1995; Murray et al., 2003). Quando há um estímulo de baixa intensidade, há aumento da secreção da matriz pelos odontoblastos pré existentes expostos à injúria. Estímulos mais intensos podem destruir os odontoblastos primários levando a formação de uma nova geração de células secretoras de dentina denominadas de células “odontoblast - like”, caso as condições pulpares sejam favoráveis (Smith et al., 1995).

A matriz de dentina terciária secretada por um grupo de odontoblastos pós mitóticos sobreviventes à injúria pulpar é denominada de dentina reacional. Já a dentina reparativa é aquela secretada pelas células “odontoblast - like” da matriz de dentina, formadas após a destruição dos odontoblastos primários (Smith et al., 1995; Magloire et al., 2001; Smith et al., 2001; Murray et al., 2003). A dentina terciária pode variar de uma matriz mais organizada semelhante à dentina primária para uma matriz atubular, distrófica, com inclusões celulares e aspecto osteóide (Smith et al., 1995).

Segundo Tziafas (1994, 1995) existem evidências de que apenas as populações celulares da polpa têm potencial para se diferenciar em células “odontoblast- like”, competência adquirida nos eventos iniciais da formação dentária, durante interações entre o ectoderma oral e as células ectomesenquimais.

As proteínas não colágenas têm sido implicadas na regulação da deposição dos cristais inorgânicos sobre a matriz do osso, dentina e esmalte (George et al., 1993; Goldberg et al., 1995). Na dentina os odontoblastos secretam

um arcabouço não mineralizado, formado por fibrilas colágenas, chamado de pré-dentina, que, a certa distância do corpo celular do odontoblasto, é transformada em dentina. Essa célula ao se deslocar para o centro da polpa produz mais pré-dentina que gradualmente se mineraliza, mantendo sua conexão com o tecido através dos processos odontoblásticos. A transformação da pré-dentina em dentina envolve fenômenos que iniciam a deposição e crescimento de cristais de apatita entre e sobre as fibrilas colágenas. Os mecanismos envolvidos na mineralização da dentina sugerem a evidência da participação das proteínas não colágenas neste processo (Butler, Ritchie, 1995; Massa et al., 2005; Aguiar, 2007).

A diferenciação dos odontoblastos é marcada pela expressão de genes que codificam as proteínas colágenas e não colágenas através de modificações morfológicas, a expressão dos mesmos é específica e pode confirmar o fenótipo de odontoblastos distintos, estas diferenciações refletem na formação de processos citoplasmáticos apicais e polarização celular (Ruch et al., 1995).

A matriz não colágena da dentina é constituída por várias proteínas, muitas altamente fosforiladas, com propriedades de ligação ao cálcio e função variando entre promoção e inibição de deposição de minerais em experimentos *in vitro* (Hunter et al., 1996). Algumas são produtos derivados da clivagem de uma proteína de alto peso molecular chamada sialofosfoproteína dentinária (DSPP) como sialoproteína dentinária (DSP) e fosfoproteína dentinária (DPP), proteína da matriz dentinária 1, 2 e 3 (DMP1, DMP2 e DMP3, respectivamente), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea, osteonectina e osteocalcina (Butler, Ritchie, 1995; He et al., 2003). A DMP1 é uma fosfoproteína encontrada particularmente na dentina e no osso potencialmente relacionada com a odontogênese (George et al., 1993; MacDougall et al., 1998; Massa et al., 2005).

2.2 Proteína da matriz dentinária 1 - DMP1

Proteínas não colágenas têm sido relacionadas à regulação dos cristais inorgânicos sobre a matriz do osso, da dentina e do esmalte; no controle da nucleação, inibição, tamanho, forma e orientação dos cristais formados (George et al., 1993; Goldberg et al., 1995).

A proteína da matriz dentinária 1 (DMP1) é uma fosfoproteína ácida que tem sido relacionada diretamente ao processo de mineralização dos tecidos em formação (Massa et al., 2005). A expressão dessa proteína é notada tanto no tecido pulpar quanto nos odontoblastos, e atribui-se a ela a regulação da diferenciação dos odontoblastos, a formação do sistema tubular da dentina e sua mineralização. A expressão da DMP1 torna-se essencial tanto em odontoblastos precoces quanto nos tardios para uma normal odontogênese. Alterações nessa proteína podem trazer defeitos na odontogênese e na mineralização (Lu et al., 2007).

Nos primeiros estágios da odontogênese a DMP1 foi localizada mais precocemente no complexo de Golgi e nos núcleos dos odontoblastos em diferenciação, nas vesículas da matriz e na matriz dentinária completamente mineralizada. Quando a mineralização se expande das vesículas da matriz para a matriz circundante, a DMP1 expressa é extracelular, em volta dos glóbulos mineralizados. Nas regiões mineralizadas da manta dentinária está presente tanto nas regiões mineralizadas como em volta da dentina peritubular, mas também está presente na interface mineralizada da dentina com a pré-dentina. A DMP1 na dentina é encontrada em células e matriz relacionada com a mineralização (Massa et al., 2005). A presença da DMP1 também pode ser sinalizada em ameloblastos secretores, mas não no esmalte dentário (Kim et al., 2006).

Na estrutura e composição da DMP1 observa-se um alto conteúdo de ácido aspártico, ácido glutâmico e resíduos de serina (George et al., 1993; Srinivasan et al., 1999). A presença das serinas fosforiladas permite a interação da DMP1 com alguns cátions, especialmente o cálcio (Srinivasan et al., 1999; Narayanan et al., 2003).

A possível interação da DMP1 com o cálcio e fosfato permite relacioná-la com o processo de mineralização dos tecidos duros, onde a proteína iniciaria o processo de nucleação e regulação do crescimento dos cristais de hidroxiapatita que se organizam na presença da DMP1 (Srinivasan et al., 1999; He et al., 2003; Narayanan et al., 2003).

A DMP1 é expressa no início da mineralização indicando um possível papel regulador neste processo (He et al., 2003; Massa et al., 2005). Existe a hipótese que os odontoblastos e células precursoras poderiam sintetizar a DMP1 e transportá-la para o núcleo onde seria responsável pela transcrição dos genes da matriz envolvidos na formação do tecido mineralizado (Narayanan et al., 2003).

A DMP1 além de induzir a transcrição de genes específicos da dentina pode regular também a expressão de proteínas relacionadas à mineralização, pois o bloqueio da mesma reduziu a expressão da fosfatase alcalina e da osteocalcina que são duas proteínas envolvidas na mineralização de outros tecidos (Narayanan et al., 2003).

A mineralização da dentina requer mecanismos de transcrição que induzam a cascata de expressão dos genes para o progressivo processo de desenvolvimento dos fenótipos dos odontoblastos. Durante a citodiferenciação dos odontoblastos há uma constante mudança na atividade de transcrição dos genes. A matriz genética específica do tecido que estão silenciadas no início da diferenciação

são expressos durante o processo de diferenciação terminal. Há evidências de que a DMP1 funciona como uma molécula reguladora importante nos processos de biomineralização. A excessiva expressão da DMP1 no sistema de cultura celular aumenta o processo de mineralização tanto qualitativamente quanto quantitativamente. A primeira localização da DMP1 é no núcleo da célula, o cálcio é responsável pelo transporte da DMP1 para a matriz extracelular durante a diferenciação dos odontoblastos. Esse parâmetro bimodal de localização demonstra uma influência direta da DMP1 promovendo o desenvolvimento dos odontoblastos e dos fenótipos de osteoblastos e que atuam em outras funções associadas aos estados de diferenciação (Narayanan et al., 2006).

O gene da DMP1 é identificado durante a embriogênese e o desenvolvimento pós-natal. Nos dentes embriogênicos um sinal de DMP1 foi observada na linha odontoblástica e um pequeno nível foi observado nas células odontoblásticas precursoras da polpa, bem como nos pré-ameloblastos. No período pós-natal a DMP1 continua atuando no processo de mineralização. A superfície normal peritubular é substituída por uma superfície de dentina irregular através da DMP1 (Ye et al., 2004).

A proteína DMP1 foi localizada ao longo dos túbulos dentinários e seus prolongamentos na dentina radicular, e a distribuição da DMP1 trocou do final dos túbulos dentinários para a base dos mesmos conforme a formação da dentina progredia. Relacionando a DMP1 também a função de mineralização da dentina e do cimento na formação radicular (Toyosawa et al., 2003).

Tem sido demonstrado que a DMP1 reside no núcleo, no citoplasma e na matriz extracelular dos osteoblastos dependendo do seu estado de diferenciação e que exibem efeitos pleiotrópicos. Sugerindo uma bifunção da proteína durante a

maturação e a diferenciação dos osteoblastos. Na diferenciação precoce dos osteoblastos como sinalizador da transcrição e como iniciador da mineralização durante a diferenciação final dos osteoblastos (Narayanan et al., 2003). No núcleo, a DMP1 seria responsável pela transcrição dos genes da matriz envolvidos na formação dos tecidos mineralizados. Quando os osteoblastos tornam-se polarizados a DMP1 seria fosforilada sendo exportada para a matriz extracelular onde iniciaria a nucleação da hidroxiapatita e regularia a formação de tecido mineralizado (He, George, 2004).

Além da DMP1 regular a mineralização dos tecidos e dos dentes, tem sido sugerido que ela possa exercer outras funções, pois também foi expressa em tecidos não mineralizados como: músculos, pâncreas, cérebro, fígado e rim (Teresawa et al., 2004).

Os mecanismos através dos quais os tecidos humanos sofrem mineralização ainda não estão completamente esclarecidos. Porém a expressão de determinadas proteínas parece estar diretamente ligada a esse processo, como a expressão da DMP1. Através de estudo ultra estrutural associado a técnicas imunoistoquímica do elemento dentário nas diferentes fases da odontogênese pode-se esclarecer o papel da expressão da DMP1 nas fases da odontogênese.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão da proteína da matriz dentinária 1 (DMP1) pela técnica imunoistoquímica, nas diversas fases da odontogênese e no dente com rizogênese completa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados dentes em diferentes fases de formação, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, derivados de 07 fetos humanos em diferentes estágios gestacionais: 14, 16, 19, 20, 21, 23 e 24 semanas, comparando-se com três dentes com rizogênese completa.

Este material já emblocado em parafina é pertencente ao arquivo do Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e já foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade supracitada e utilizada em trabalhos anteriores (Parecer no 03/03 Protocolo 02/03) e também aprovado para utilização pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic em Dissertação de Mestrado em Patologia Bucal (Protocolo 06/263 em 15/09/2006), e para realização desse trabalho (em 04/04/2008).

Os blocos de parafina contendo os espécimes foram cortados a 5µm de espessura e corados em hematoxilina e eosina para checagem das estruturas dentárias presentes.

Para a realização da técnica imunoistoquímica foram utilizados cortes de 3 µm de espessura. As reações imunoistoquímica foram realizadas seguindo o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas Odontológicas e Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, descrito a seguir:

- a) desparafinação dos cortes de 3 µm de espessura em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos;

- b) reidratação em uma série de etanol em concentrações decrescente (100%, 95%, 85%) durante 5 minutos cada;
- c) remoção de pigmentos formólicos por imersão em solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol 85% durante 10 minutos;
- d) lavagem em água corrente e água destilada por 10 minutos cada;
- e) bloqueio da peroxidase endógena tecidual com imersão do material em solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol na proporção 1:1, em dois banhos de 15 minutos cada;
- f) lavagem em água corrente e água destilada por 10 minutos cada;
- g) dois banhos de solução tampão de TRIS 0,05M pH 7,4, por 5 minutos cada.

Após esse preparo realizado manualmente, as lâminas foram levadas à DAKO Autostainer Staining System (DAKO, Carpinteria, CA, USA), onde a reação foi concluída mecanicamente.

Nela foram efetuadas:

- a) incubação com anticorpo primário policlonal DMP1 (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japão) diluído em BSA 1% na concentração 1:75 por 18h a 4°C;
- b) incubação do reagente LSAB EnVision Peroxidase Mouse (Dako, cód. K4001), nos cortes previamente incubados com o anticorpo primário, conforme recomendações do fabricante;
- c) revelação da reação com DAKO Liquid DAB plus (Dako, cód. K3468) segundo recomendações do fabricante;

d) contra coloração com hematoxilina de Mayer.

Após esses procedimentos os cortes foram desidratados, diafinizados e montados em Permoun® para análise dos resultados em microscopia de luz.

Foi realizada análise qualitativa das marcações imunohistoquímicas para a DMP1, por três observadores, nas seguintes estruturas e fases da odontogênese:

- a) lamina dentária - em núcleo e citoplasma;
- b) germe dentário - em núcleo e citoplasma;
 - fase de campânula;
 - órgão do esmalte;
- c) epitélio externo do órgão do esmalte;
- d) retículo estrelado;
- e) estrato intermediário;
- f) epitélio interno do órgão do esmalte;
- g) alça cervical;
- h) papila dentária - em núcleo e citoplasma;
 - fase de coroa;
 - órgão do esmalte.
- j) epitélio externo do órgão do esmalte - apenas nos núcleos celulares;
- k) retículo estrelado;
- l) estrato intermediário;
- m) ameloblastos;

- n) alça cervical - apenas nos núcleos celulares;
- o) esmalte;
- p) papila dentária - em núcleo e citoplasma;
- q) odontoblastos;
- r) demais células - na matriz extracelular;
- s) dentina;
- t) dente com rizogênese completa - no núcleo e citoplasma dos túbulos dentinários.

5 RESULTADOS

Os resultados observados são referentes a dentes em formação derivados de sete fetos humanos em diferentes estágios gestacionais (4, 16, 19, 20, 21, 23 e 24 semanas) e 03 dentes com rizogênese completa que serviram para comparação do padrão de expressão da proteína da matriz dentinária 1 (DMP1).

Observaram-se nos cortes histológicos estudados germes dentários em diferentes estágios de desenvolvimento bem como os tecidos circundantes, incluindo epitélio da mucosa de revestimento, lâmina própria, tecido ósseo e muscular, e glândulas salivares.

A DMP1 foi visualizada além das estruturas dentárias, em diversos tecidos como: ósseo, muscular, epitelial e glândulas salivares.

Dividiremos didaticamente nossos resultados segundo as fases e regiões da odontogênese que foram observadas nos espécimes fetais e examinados e nas diferentes regiões dos dentes com rizogênese completa.

5.1 Dente em desenvolvimento

5.1.1 *Lâmina Dentária*

As células periféricas da lâmina dentária voltadas para o lado do germe dentário apresentaram na sua maioria, expressão positiva no núcleo para a proteína DMP1, enquanto que as células periféricas do lado oposto mostraram-se negativas (figura 1a), (quadro 1).

As células centrais da lâmina dentária apresentaram expressão tanto em núcleo como em citoplasma (figura 1b). Os remanescentes da lâmina dentária (lâmina fragmentada), após a formação do órgão do esmalte, não expressaram a DMP1 no citoplasma (quadro 1).

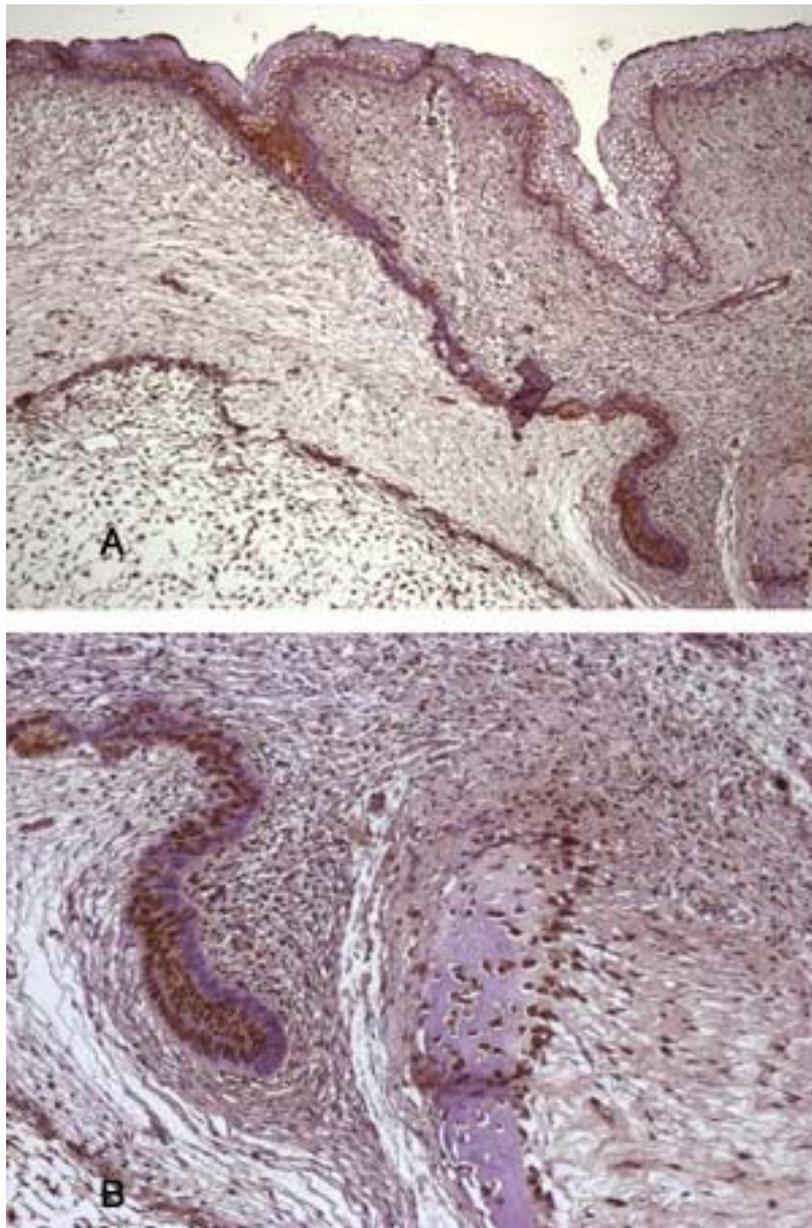


Figura 1 - Fotomicrografia da lâmina dentária, técnica imunoistoquímica. Observa-se que as células periféricas da lâmina voltadas para o lado do germe dentário apresentaram na sua maioria, expressão positiva no núcleo para a proteína DMP1, enquanto que as células periféricas do lado oposto mostraram-se negativas (A). As células centrais da lâmina apresentaram expressão tanto em núcleo como em citoplasma (B) Aumentos originais: A- X200; B- X400.

	Células Periféricas		Células Centrais	Remanescentes da Lâmina Dentária (Após a formação do Órgão do Esmalte)
	Voltadas para o Germe Dentário	Opostas ao Germe Dentário		
Nuclear	+	-	+	+
Citoplasmática	+	-	+	-

Quadro 1 - Expressão da DMP1 na Lâmina Dentária do dente em desenvolvimento.

5.1.2 Germe dentário

Os espécimes mostraram germes dentários em fase de campânula constituídos por órgão de esmalte e papila dentária sem mineralização visível em microscopia de luz (figura 2), e em fase de coroa com evidente deposição de matriz orgânica de esmalte e dentina (figura 3). A expressão da proteína DMP1 nestas estruturas está descrita a seguir:

5.1.2.1 Fase de campânula

5.1.2.1.1 Órgão do esmalte

a) epitélio externo do órgão do esmalte

No epitélio externo do órgão do esmalte pode-se visualizar uma marcação heterogênea para a DMP1, com algumas células expressando a presença da proteína em seu citoplasma e núcleo (figura 2a, b), (quadro 2).

b) retículo estrelado

As células do retículo mostraram marcação positiva para a DMP1.

Em algumas amostras as células apresentavam presença da proteína tanto no núcleo como no citoplasma (figura 2b), (quadro 2).

c) estrato intermediário

Em estágios em que o estrato intermediário podia ser identificado a marcação da DMP1 se deu de forma bastante positiva (figura 2c), (Quadro 2).

d) epitélio interno do órgão do esmalte

No epitélio interno do órgão do esmalte a marcação da proteína mostrou-se heterogênea com algumas células positivas para a DMP1 tanto em núcleo como no citoplasma (figura 2c), (quadro 2).

e) alça cervical

As células da alça cervical mostraram-se, da mesma forma que o epitélio interno, marcação heterogênea, isto é, células positivas tanto no núcleo como no citoplasma (figura 2e), (quadro 2).

5.1.2.1.2 Papila Dentária

Na maior extensão da papila dentária, a DMP 1 mostrou positividade homogênea nas suas células. Entretanto, na região mais próxima aos pré-ameloblastos, a DMP1 apresentou uma marcação heterogênea, com expressão tanto em núcleo como em citoplasma (figura 2d), (quadro 2).

	Epitélio Externo do Órgão do Esmalte	Retículo Estrelado	Estrato Intermediário	Epitélio Interno do Órgão do Esmalte	Alça Cervical	Papila Dentária
Nuclear	+	+	+	+	+	+
Citoplasmática	+	+	+	+	+	+

Quadro 2 - Expressão da DMP1 no Germe Dentário fase de Campânula no Órgão do Esmalte.

5.1.2.2 Fase de coroa

5.1.2.2.1 Órgão do esmalte

- a) epitélio externo do órgão do esmalte: no epitélio externo do órgão do esmalte, que se apresenta fragmentado, pode-se visualizar marcação para a DMP1 somente no núcleo das células (quadro 3);
- b) retículo estrelado: as células do retículo estrelado mostraram marcação positiva para a DMP1 tanto em citoplasma quanto em núcleo (quadro 3);
- c) estrato intermediário: as células dessa região apresentaram forte marcação para a DMP1 tanto em citoplasma quanto em núcleo (figura 3a), (quadro 3);

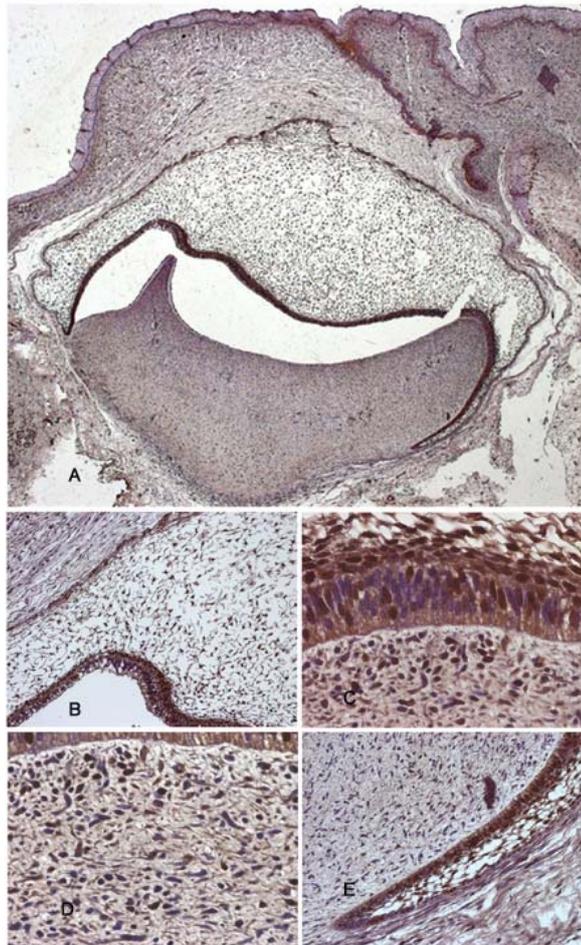


Figura 2 - Fotomicrografias de germes dentários em fase de campânula, técnica imunoistoquímica. Em A, observa-se o órgão do esmalte. A marcação para a DMP1 mostra-se bastante heterogênea no epitélio externo do órgão do esmalte, com algumas células expressando a proteína em seu citoplasma e núcleo. As células do retículo estrelado mostram marcação positiva para a DMP1 (B). Pode-se notar forte marcação da DMP1 nas células do estrato intermediário (C). No epitélio interno a marcação da proteína mostra-se heterogênea com algumas células positivas para a DMP1 tanto em núcleo como no citoplasma (C). Na papila dentária, na região mais próxima aos pré-ameloblastos, somente algumas células expressam a DMP1 no núcleo e no citoplasma (D). Na alça cervical, há expressão da proteína DMP1 em algumas células, tanto em núcleo, como citoplasma (E). Aumentos originais: A- X200; B- X400; C e D- X1000; E- X400.

d) ameloblastos: estas células apresentaram-se positivas para a DMP1 tanto em núcleo, quanto em citoplasma. Nas fases com mineralização avançada, os ameloblastos demonstraram uma morfologia “aerada” sugerindo que as organelas citoplasmáticas não foram marcadas pela DMP1 (figura 3b), (quadro 3);

- e) alça cervical: as células da alça cervical mostraram marcação para a DMP1 em núcleo, (quadro 3);
- f) esmalte: nenhuma marcação foi observada na matriz mineralizada do esmalte (figura 3b), (quadro 3).

	Epitélio Externo do Órgão do Esmalte	Retículo Estrelado	Estrato Intermediário	Ameloblastos	Alça Cervical	Esmalte Dentário
Nuclear	+	+	+	+	+	-
Citoplasmática	-	+	+	+	-	-

Quadro 3 - Expressão da DMP1 na fase de coroa no órgão do esmalte

5.1.2.2.2 Papila dentária

- a) odontoblastos: estas células apresentaram-se positivas para a DMP1 tanto em núcleo, quanto em citoplasma (figura 3b), (quadro 4);
- b) demais células: observou-se heterogeneidade da marcação da DMP1 nas demais células da papila dentária e discreta marcação na matriz extracelular (figura 3c);
- c) dentina: observou-se marcação na região de túbulos dentinários próximos à região odontoblástica (figura 3b), (quadro 4).

	Odontoblastos	Demais Células	Dentina
Nuclear	+	+	+
Citoplasmática	+	+	+

Quadro 4 - Expressão da DMP1 na fase de Coroa na Papila Dentária

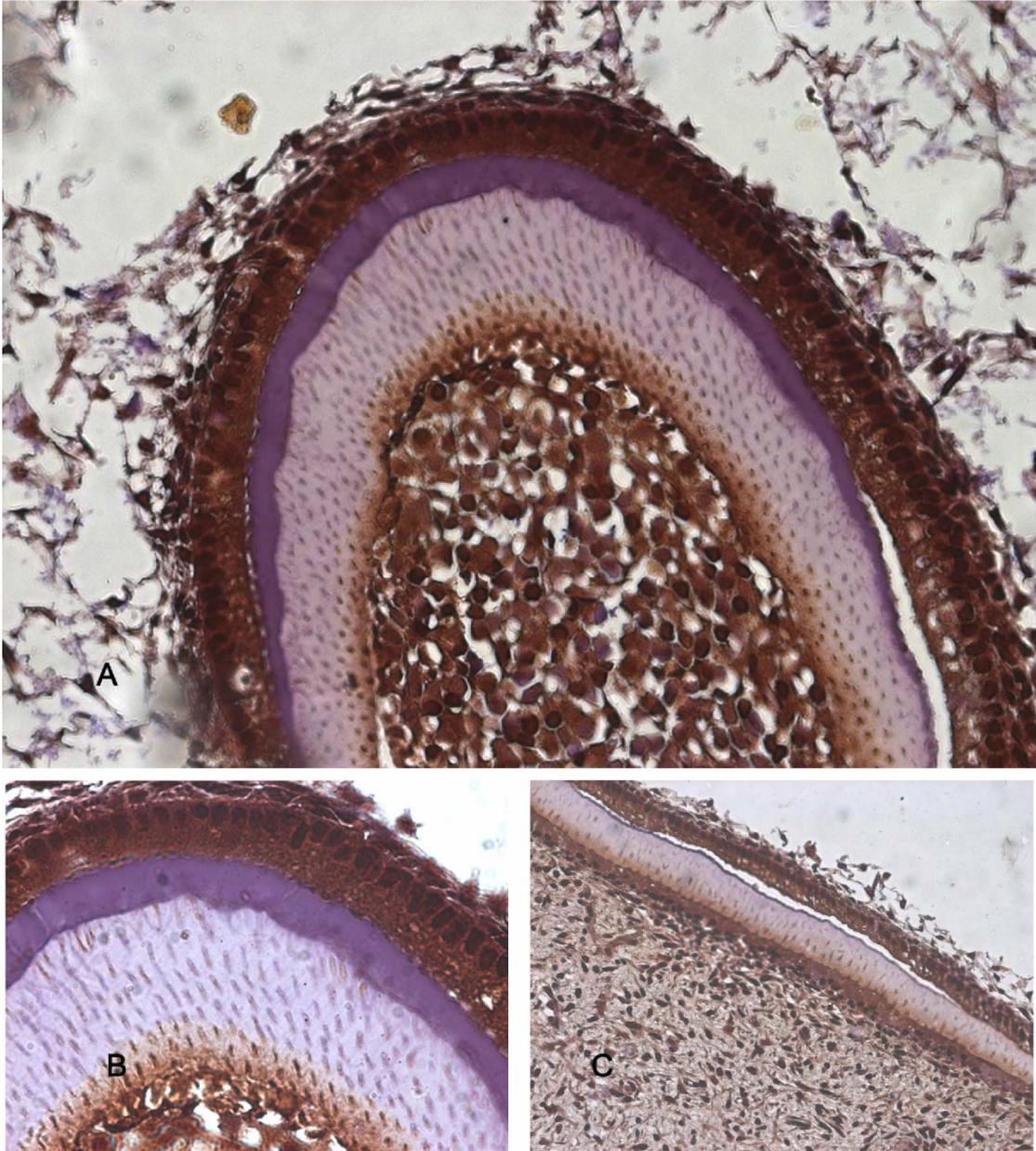


Figura 3 - Fotomicrografia de germes dentários em fase de coroa, técnica imunohistoquímica. As células do retículo estrelado e estrato intermediário mostram marcação positiva para a DMP1 (A). Os ameloblastos apresentam-se positivos para a DMP1 tanto em núcleo, quanto em citoplasma (B). Nenhuma marcação é observada na matriz de esmalte (B). Os odontoblastos apresentam-se positivos para a DMP1 tanto em núcleo, quanto em citoplasma (B). Na dentina observamos marcação na região de túbulos dentinários próximos à camada de odontoblastos (B). Nas células da papila dentária, observa-se algumas células marcadas para a DMP1 e discreta marcação na matriz extracelular (C).

Aumentos originais: A- X630; B- X1000; C- X400.

5.2 Dente com rizogênese completa

5.2.1 Dentina

Uma faixa estreita de dentina próxima à pré-dentina mostrou marcação dos túbulos dentinários (figura 4a), (quadro 5). Esta marcação pode ser vista esporadicamente também em alguns túbulos mais distantes desta região, bem como nas linhas de estresse (figura 4b).

Observou-se também que a pré-dentina é negativa para a expressão de DMP1 (figura 4a), (quadro 5).

5.2.2 Polpa

Não houve expressão da DMP1 nem em células ou matriz extracelular (figura 4a), (quadro 5).

	Dentina (Túbulos dentinários próximo à pré-dentina)	Pré- Dentina	Polpa
Nuclear	+	-	-
Citoplasmática	+	-	-

Quadro 5 - Expressão da DMP1 na fase de Coroa no dente com Rizogênese Completa

5.3 Outras estruturas

No epitélio de superfície, a DMP1 apresentava diferentes padrões de expressão dependendo da fase de maturação.

Foram positivas também as células musculares estriadas, vasos sanguíneos, glândulas salivares (células luminiais do ducto e células da semi-lua serosa das glândulas salivares mistas), nervos, e células das trabéculas ósseas, tanto osteoblastos, como osteócitos. Quando presentes, os osteoclastos foram positivos.

A cartilagem de Merckel quando visualizada, foi sempre negativa.

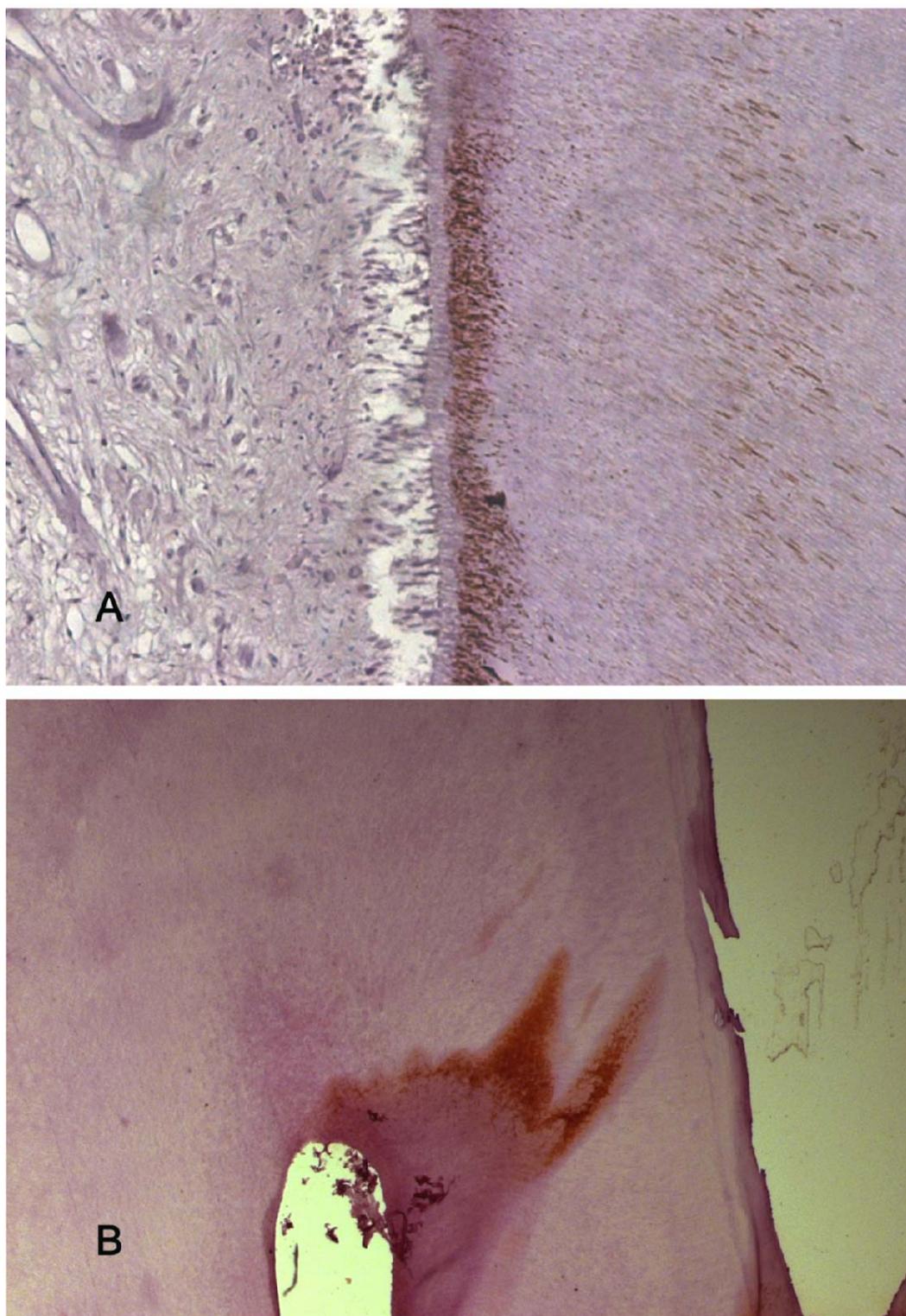


Figura 4 - Fotomicrografia de dente com rizogênese completa, técnica imunoistoquímica. Na dentina, uma faixa estreita próxima à pré-dentina mostra marcação dos túbulos dentinários (A). Esta marcação pode ser vista esporadicamente também em alguns túbulos mais distantes desta região, bem como nas linhas de estresse (B). Na polpa e pré-dentina não há expressão da DMP1 nem em células ou matriz extracelular (A).

Aumentos originais: A- X400; B- X400.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que nos diferentes estágios da odontogênese houve expressão da DMP1 com padrões específicos de marcação na lâmina dentária, nas fases de campânula e coroa e no dente com rizogênese completa.

A DMP1 é uma fosfoproteína ácida relacionada com o processo de mineralização dos tecidos em formação e quando alterada pode trazer defeitos tanto na odontogênese quanto na mineralização (Massa et al., 2005; Lu et al., 2007). É composta por um alto conteúdo de ácido aspártico, ácido glutâmico e resíduos de serina. Tais resíduos permitem a interação da DMP1 com alguns cátions (George et al., 1993; Srinivasan et al., 1999; Narayanan et al., 2003).

A possível interação da DMP1 com o cálcio e fosfato permite relacioná-la com o processo de mineralização dos tecidos duros, no qual a proteína iniciaria o processo de nucleação e regulação do crescimento dos cristais de hidroxiapatita que se organizam na presença da mesma (George et al., 1993).

Na lâmina dentária, as células da periferia voltadas para o lado do germe dentário apresentavam, em sua maioria, expressão positiva para DMP1, enquanto o lado oposto se mostrou sempre negativo, em nossos resultados.

A presença da DMP1 nas células da lâmina dentária voltada para o órgão do esmalte pode sugerir que estas já estão comprometidas com a diferenciação e formação do germe dentário. E estudo prévio já demonstrou que a DMP1 está presente no núcleo de células pré-osteoblásticas em proliferação (Narayanan et al., 2003).

Considerando-se todas as fases da odontogênese, a fase de botão representa o verdadeiro início da formação de cada dente. A lâmina dentária se prolifera uniformemente ao longo dos futuros arcos e apresenta numerosas atividades mitóticas diferenciais em alguns locais, que darão origem a dez pequenas esférulas celulares que invadem o ectomesênquima iniciando o processo de formação dos germes dentários decíduos, fato que ocorre a partir da oitava semana de vida intra-uterina. Na fase de botão, que não ocorre necessariamente no mesmo momento para todos os dentes, o ectomesênquima subjacente apresenta uma discreta condensação de células onde irão estar presentes a tenascina e o sindecan-1 regulada por sinais das células em proliferação, que interagem também com outros elementos da matriz extracelular e fatores de crescimento (Katchburian, Arana, 2004).

O crescimento desigual proveniente da continuação da proliferação epitelial da fase de câmpanula, apresenta no centro da parte mais profunda uma concavidade que contém um número expressivo de células ectomesenquimais que pode estar relacionada com a interação célula - matriz extracelular (Katchburian, Arana, 2004).

Em nosso estudo, na fase de campânula, observamos marcação positiva para a DMP1 tanto no núcleo como no citoplasma das células do epitélio externo do órgão do esmalte e do retículo estrelado. Entretanto, no epitélio interno, que representa fonte das futuras células ameloblásticas, a marcação, embora bem evidente, não se mostrou homogênea, estando algumas células negativas para esta proteína, tanto em núcleo como em citoplasma.

Na fase de coroa, o mesmo padrão de marcação foi observado, com ressalva para os ameloblastos e odontoblastos que apresentaram forte marcação

para a DMP1 em todas as células, tanto em núcleo como em citoplasma, embora os ameloblastos apresentem marcação “aerada” no seu citoplasma. Isto provavelmente ocorreu em decorrência da presença de organelas citoplasmáticas que ocupam os espaços intracelulares não corados pelo anticorpo, uma vez que estas células apresentam intensa atividade de síntese e secreção de proteínas.

Pudemos observar que nos diferentes estágios da odontogênese, houve a expressão da DMP1 tanto em núcleo como no citoplasma dos diferentes tipos celulares. Estes achados são semelhantes aos resultados de Narayanan et al. (2003) que demonstraram a presença desta proteína no núcleo de células osteoblásticas em cultura. Uma vez sintetizada no citoplasma, a proteína se liga a um transportador solúvel de importação nuclear, a importina, sendo importada para o núcleo assim que sintetizada. Uma vez dentro do núcleo, a DMP1 atua na ativação da transcrição de genes específicos do tecido ósseo, como a osteocalcina.

Esta dupla localização da proteína foi demonstrada por Massa et al. (2005) em células odontoblásticas, sugerindo os autores que a presença desta proteína no núcleo de odontoblastos em diferenciação desempenha o mesmo papel de ativação da transcrição de proteínas não-colágenas específicas para a dentinogênese.

Além de estar presente no núcleo, a DMP1 está presente no citoplasma e na matriz extracelular dos osteoblastos dependendo do seu estado de diferenciação e maturação, sugerindo uma bifunção da proteína como sinalizador da transcrição de genes do tecido ósseo, bem como, iniciador da mineralização durante a diferenciação final dos osteoblastos (Narayanan et al., 2003).

Além de estar expresso em odontoblastos, no presente estudo a DMP1 pôde ser observada em ameloblastos nas fases avançadas de mineralização,

estando caracterizados pela marcação aerada no citoplasma, achados estes semelhantes ao trabalho de Kim et al. (2006). Porém, a DMP1 se mostrou positiva tanto no núcleo quanto no citoplasma dos ameloblastos do órgão do esmalte na fase de coroa.

Embora a presença da DMP1 seja verificada já nos primórdios da formação do órgão do esmalte, como acontece com a lâmina dentária, em algumas células do epitélio interno do órgão do esmalte, ela não é encontrada. Já na fase de coroa, com a maturação dos ameloblastos e secreção de matriz, ela se encontra expressa em todas as células. Não encontramos na literatura, explicação para este fato.

A papila dentária, tanto na fase de campânula como coroa, apresentou marcação heterogênea de suas células, sendo algumas positivas para núcleo e/ou citoplasma. Estes achados sugerem que as células marcadas estão comprometidas com a diferenciação de células odontoblásticas, enquanto que as não marcadas, representam células mesenquimais indiferenciadas ou até mesmo, células-tronco (“stem cells”) presentes na papila dentária (Gronthos et al., 2000).

Nos dentes com rizogênese completa, a proteína DMP1 foi localizada ao longo dos túbulos dentinários e seus prolongamentos na dentina radicular, e a distribuição da DMP1 mudou do final dos túbulos dentinários para a base dos mesmos conforme a formação da dentina progredia relacionando a DMP1 também à função de mineralização da dentina e do cemento na formação radicular (Toyosawa et al., 2003). Em humanos podemos observar a presença de três tipos de dentina: primária, secundária e terciária. Em nossos resultados a DMP1 foi expressa nos túbulos dentinários próximos à região odontoblástica bem como numa faixa estreita de dentina próxima à pré-dentina, nos túbulos dentinários. Esporadicamente alguns

túbulos mais distantes da região de pré-dentina e em áreas de estresse a DMP1 apresentaram marcação positiva. Tal achado pode ter relação com a formação de tecido de reparação da dentina, pois há evidências de que a DMP1 funciona como uma molécula reguladora importante nos processos de bio-mineralização. A excessiva expressão da DMP1 no sistema de cultura celular aumenta o processo de mineralização tanto qualitativamente quanto quantitativamente.

Na polpa, nossos resultados mostram expressão positiva da DMP1 nos vasos e na matriz extracelular em sua região central. Algumas amostras estavam positivas apenas na matriz extracelular. Na região mais próxima a pré-dentina, o citoplasma de algumas células também apresentaram marcação positiva para a DMP1. Tais achados podem colaborar com a tese de formação de tecido reacional ou reparativo segundo Smith (1995) e Murray (2003) que afirmaram que a matriz dentinária se deposita em locais específicos da interface polpa-dentina em resposta a um estímulo, sugerindo que a resposta a uma agressão pode ser evidenciada no tecido da polpa através da formação de cálculos devido a presença da DMP1 nas áreas evidenciadas.

A ausência de expressão da DMP1 na pré-dentina que é um tecido não mineralizado pode confirmar a necessidade da expressão da mesma nos processos de mineralização (Feng et al., 2003). Ainda sugerem que a DMP1 quando expressa em tecidos não mineralizados pode exercer função na morfodiferenciação dos mesmos.

No presente estudo, observamos a presença da proteína DMP1 em estruturas não mineralizadas dos germes dentários, como já demonstrado por Terasawa et al. (2004) sugerindo que esta proteína não é específica de tecidos mineralizados como osso e dentina e, portanto, apresenta funções diversas além da

regulação da mineralização. Ainda, houve imunomarcação para a DMP1 em células musculares estriadas, vasos sanguíneos, glândulas salivares (células luminais do ducto e células da semi-lua serosa das glândulas salivares mistas) e nervos, bem como em células relacionadas com a osteogênese, como osteoblastos e osteócitos, achados estes já demonstrados por diversos autores (Furuse, 2003; Terasawa et al., 2004; Rios et al., 2005; Ye et al., 2005; Lu et al., 2007).

No epitélio de superfície e nas glândulas salivares, a DMP1 esteve expressa com diferentes padrões dependendo da fase de maturação, sugerindo a sua participação em epitélios com alta atividade metabólica (Ogbureke, Fisher, 2007).

Portanto, os resultados do presente estudo demonstraram a presença da proteína DMP1 em diferentes fases do desenvolvimento de germes dentários humanos e com padrões específicos de expressão. Porém, estudos se fazem necessários para o melhor entendimento desta proteína em cada fase da organogênese.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que nos diferentes estágios da odontogênese houve expressão da DMP1 com padrões específicos de marcação na:

- a) lâmina dentária: em núcleo e citoplasma das células centrais e da periferia;
- b) no germe dentário, em fase de campânula, o órgão do esmalte, no epitélio externo apresentou no núcleo e no citoplasma de algumas células marcação heterogênea para a DMP1;
- c) no retículo estrelado a marcação foi positiva em núcleo e em citoplasma. No estrato intermediário a expressão da DMP1 foi bastante positiva;
- d) no epitélio interno e na alça cervical, a marcação foi heterogênea tanto no núcleo como no citoplasma;
- e) na papila dentária em sua maior extensão, a DMP 1 mostrou positividade homogênea nas suas células;
- f) na fase de coroa, no órgão do esmalte, no epitélio externo a DMP1 foi expressa apenas em núcleos celulares;
- g) no retículo estrelado a marcação foi positiva também no citoplasma;
- h) no estrato intermediário houve forte marcação para a DMP1;
- i) os ameloblastos apresentaram marcação positiva para a DMP1, exceto nas fases com mineralização avançada;
- j) nas células da alça cervical a marcação positiva se deu apenas nos núcleos;

- k) e nenhuma marcação foi observada na matriz mineralizada do esmalte;
- l) na papila dentária os odontoblastos mostraram marcação positiva em núcleo e em citoplasma, as demais células da papila apresentaram heterogeneidade para a marcação da DMP1 e discreta marcação na matriz extracelular;
- m) na Dentina os túbulos dentinários próximos à região odontoblástica se mostraram positivos para a DMP1;
- n) nos dentes com rizogênese completa houve expressão positiva da DMP1 apenas numa faixa estreita de dentina próxima a pré-dentina;
- o) novos estudos se fazem necessários para o melhor entendimento da DMP1 em cada fase da organogênese.

REFERÊNCIAS¹

Aguiar MC. Estudo ultra-estrutural e imunocitoquímico da dentina reacional e da dentina reparativa formadas após luxação extrusiva em incisivos de ratos [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;(36):1367-73.

Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix protein. *Int J Dev Biol.* 1995 Feb;39(1):169-79.

D'Souza RN, Bachman T, Baumgardner KR, Butler WT, Litz M. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *J Dent Res.* 1995 Feb;74(2):702-9.

Feng JQ, Huang H, Lu Y, Ye L, Xie Y, Tsutsui TW et al. The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J Dent Res.* 2003 Oct;82(10):776-80.

Furuse C. Análise da expressão imunoistoquímica de proteínas miogênicas e da matriz extracelular em glândula salivar humana em desenvolvimento [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.

Gaikwad JS, Hoffmann M, Cavender A, Bronckers AL, D'Souza RN. Molecular insights into the lineage-specific determination of odontoblasts: the role of *cbfa1*. *Adv Dent Res.* 2001;(15):19-24.

George A, Sabsay B, Simonian PA, Veis A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *J Biol Chem.* 1993 June;268(17):12624-30.

Goldberg M, Septier D, Lécolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC et al. Dental mineralization. *Int J Dev Biol.* 1995 Feb;39(1):93-110.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13625-30.

Hart PS, Hart TC. Disorders of human dentin. *Cells Tissues Organs.* 2007;186(1):70-7.

He G, Dahl T, Veis A, George A. Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation *in vitro*. *Connect Tissue Res.* 2003a;44(Suppl.1):240-5.

He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals *in vitro* by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater.* 2003b;(2):552-8.

He G, George A. Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition *in vitro*. *J Bio Chem* 2004(279):11649-56

¹ De acordo com o manual de Normalização para Dissertações e Teses do Centro de Pós-Graduação CPO São Leopoldo Mandic, baseado no estilo Vancouver de 2007, e abreviatura dos estilos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

- Hu JC, Sun X, Zhang C, Simmer JP. A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci.* 2001 Apr;109(2):125-32.
- Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1996 July;317(Pt 1):59-64.
- Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral.* São Paulo: Panamericana; 2004.
- Kim J-W, Yamakoshi Y, Iwata T, Hu YY, Zhang H, Hu JC-C et al.. Porcine dentin matrix protein 1: gene structure, c DNA sequence, and expression in the teeth. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:31-41.
- Lu Y, Xie Y, Zhang S, Dusevich V, Bonewald LF, Feng JQ. DMP1-targeted Cre expression in odontoblasts and osteocytes. *J Dent Res.* 2007 Apr;86(4):320-5.
- Lu Y, Ye L, Yu S, Zhang S, Xie Y, McKee MD et al. Rescue of odontogenesis in Dmp1-deficient mice by targeted re-expression of DMP1 reveals roles for DMP1 in early odontogenesis and dentin apposition in vivo. *Rev Biol.* 2007 Mar;303(1):191-201.
- MacDougall M, Dong J, Acevedo AC. Molecular basis of human dentin diseases. *Am J Med Genet A.* 2006 Dec;140(23):2536-46.
- MacDougall M, Gu TT, Luan X, Simmons D, Chen J. Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein 1: spatial expression in mineralized tissues. *J Bone Miner Res.* 1998 Mar;13(3):422-31.
- Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Adv Dent Res.* 2001 Aug;15:46-50.
- Massa LF, Ramachandran A, George A, Arana-Chavez VE. Developmental appearance of dentin matrix protein 1 during the early dentinogenesis in rat molars as identified by high-resolution immunocytochemistry. *Histochem Cell Biol.* 2005 Sept;124(3-4):197-205.
- Moore D, Persuad M. *Embriologia.* São Paulo: Panamericana; 1995.
- Murray PE, About I, Lumley PJ, Franquin JC, Windsor LJ, Smith AJ. Odontoblast morphology and dental repair. *J Dent.* 2003 Jan;31(1):75-82.
- Narayanan K, Gajjerman S, Ramachandran A, Hao J, George A. Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2006 July;281(28):19064-71.
- Narayanan K, Ramachandran A, Hao J, He G, Park KW, Cho M et al. Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca²⁺ store. *J Biol Chem.* 2003 May;278(19):17500-8.
- Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 10;98(8):4516-21.

- Ogbureke KU, Fisher LW. SIBLING expression patterns in duct epithelia reflect the degree of metabolic activity. *J Histochem Cytochem.* 2007 Apr;55(4):403-9.
- Rios HF, Ye L, Dusevich V, Eick D, Bonewald LF, Feng JQ. DMP1 is essential for osteocyte formation and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005 Oct-Dec;5(4):325-7.
- Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995 Feb;39(1):51-68.
- Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995 Feb;39(1):273-80.
- Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res.* 2001 Aug;15:51-4.
- Srinivasan R, Chen B, Gorski JP, George A. Recombinant expression and characterization of dentin matrix protein 1. *Connect Tissue Res.* 1999;40(4):251-8.
- Ten Cate AR. Oral histology: development, structure and function. St Louis: Mosby-Year Book; 1998.
- Terasawa M, Shimokawa R, Terashima T, Ohya K, Takagi Y, Shimokawa H. Expression of dentin matrix protein 1 (DMP1) in nonmineralized tissues. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(5):430-8.
- Toyosawa S, Okabayashi K, Komori T, Ijuhin N. mRNA expression and protein localization of dentin matrix protein 1 during dental root formation. *Bone.* 2004 Jan;34(1):124-33.
- Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol.* 1995 Feb;39(1):281-90.
- Tziafas D. Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. *Int Endod J.* 1994 Mar;27(2):61-74.
- Ye L, MacDougall M, Zhang S, Xie Y, Zhang J, Li Z et al. Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):19141-8.
- Ye L, Mishina Y, Chen D, Huang H, Dallas SL, Dallas MR et al. Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype. *J Biol Chem.* 2005 Feb 18;280(7):6197-203.

ANEXO A - FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



São Leopoldo Mandic
Faculdade de Odontologia
Centro de Pesquisas Odontológicas
Certificado de Cumprimento de Princípios Éticos

CERTIFICO que, após analisar o projeto de pesquisa

Título: *EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DA MATRIZ DENTINÁRIA 1 (DMP 1) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA ODONTOGÊNESE.*

Pesquisador principal: Luciana Alves Herdy da Silva

Orientador: Vera Cavalcante Araújo

o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia e Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic considerou que o projeto está de acordo com as diretrizes para a proteção do sujeito de pesquisa, estabelecidas pela Resolução nº 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde.

Campinas, SP, Brazil, sexta-feira, 4 de abril de 2008

CERTIFICATION OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES

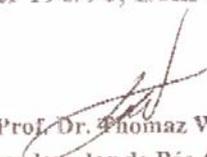
I hereby, certify that upon analysis of the Research Project,

Title: *Expression of Dentin matrix protein 1 (DMP 1) in different stages of odontogenesis.*

Main Researcher(Author): Luciana Alves Herdy da Silva

Advisor: Vera Cavalcante Araújo

the Committee of Ethics for Research of São Leopoldo Mandic School of Dentistry and Research Center, has considered the mentioned project to be in accordance to the guidelines of protection to the subject of the research, established by the Regulation number 196/96, from the National Health Council of the Brazilian Health Ministry.


 Prof. Dr. Thomaz Wassall
 Coordenador de Pós-Graduação