



Avaliação do tecido apical do incisivo de rato
como fonte de células
para a bioengenharia dental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas.

Orientador: Dr. Marcos Farina de Souza

Antonio Sérgio Netto Valladão

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Avaliação do tecido apical do incisivo do rato
como fonte de células para a bioengenharia dental.

Antonio Sérgio Netto Valladão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas.

Orientador:

Dr. Marcos Farina de Souza
Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, CCS, UFRJ

Banca Examinadora:

Dra. Ana Blanco Martinez
ICB, CCS, UFRJ

Dra. Carla Polycarpo
IBqM, CCS, UFRJ

Dr. José Garcia Abreu Jr.
ICB, CCS, UFRJ

Suplentes:

Dr. Lincoln Nojima
Faculdade de Odontologia, UFRJ

Dra. Márcia Cury(revisora)
ICB, CCS, UFRJ

Rio de Janeiro
2010

VALLADÃO, Antonio

Avaliação do tecido apical do incisivo de rato como fonte de células para a bioengenharia dental /

Antonio Sérgio Netto Valladão. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 2010.

Orientador: Marcos Farina de Souza

Dissertação de Mestrado em Ciências Morfológicas

Palavras-chave: 1.dente. 2.odontogênese. 3.arcabouço.

4.bioengenharia tecidual. 5.rato. Título

Da vida, pouco sei ...
Às vezes linda ...
Às vezes cruel ...
Uma grande contradição ...
Mas resolvi vivê-la com amor, ciência e diversão!

Antonio Valladão

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Dr. Marcos Farina de Souza, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no período de março de 2007 a fevereiro de 2010. Contamos com o apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPERJ. Esta dissertação foi desenvolvida nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biomineralização, ICB, UFRJ;
- Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, IBCCF, UFRJ;
- Laboratório de Patologia Celular, ICB, UFRJ;
- Laboratório de Pinça Óptica, ICB, UFRJ;

Aos Mestres
Marcos Farina de Souza,
José Garcia de Abreu Jr
e Vivaldo de Moura Neto.

AGRADECIMENTOS

Esta parte da dissertação é de grande valor pessoal! Sem a ajuda, o carinho, a compreensão, os ensinamentos e a amizade destas pessoas, nenhuma destas linhas poderiam estar sendo lidas. São muitos, novos e bons amigos. Todos vocês que cruzaram o meu caminho e me deram o prazer desta convivência, independente do tempo ou intensidade desta, fizeram-me sentir um privilegiado. Não existe momento melhor para registrar o quão bem recebido e tratado fui. A todos, que de alguma forma colaboraram para que eu exercesse uma das minhas grandes paixões, que é a ciência, todo o meu amor e amizade!

Aos melhores pais do mundo, o meu reconhecimento e agradecimento eterno.

Agradeço ao meu avô Antônio Netto (in memoriam) e à minha avó Áurea, pelo amor ilimitado e pelo incentivo constante. Fantásticos!

Peça fundamental, Monique, minha mulher, meu “porto seguro”, que, majestosamente, suportou e superou, com paciência e incondicionalidade, todas as adversidades que surgiram, à você, minha querida, todo o amor que houver nessa vida!

À Clara, minha filha, responsável por me mostrar que temos sempre um amor reservado para cada uma das pessoas que nos cercam, minha maior incentivadora, linda maravilhosa ... amor infinito!

Ao meu irmão Carlos Alberto, o meu agradecimento pelas dicas e apoio na informática.

Sou imensamente grato ao Dr. Marcos Farina por ter acreditado neste projeto. Cientista fundamental! Muito obrigado pela acolhida e pelos enormes ensinamentos. Tenho certeza que todo este trabalho é fruto do seu empenho, da confiança que depositou em mim e da sua hábil inteligência. Obrigadão!

Na minha primeira incursão ao PCM, ainda sem saber se conseguiria iniciar o meu projeto, fui amparado pelo Dr. Vivaldo de Moura Neto, que me dedicou preciosa atenção. Caro Professor, o meu reconhecimento e o meu sincero agradecimento.

Dr. José Garcia de Abreu Jr., responsável pelo primeiro laboratório que me recebeu, é uma satisfação poder agradecer o crédito que me dispensou, assim como a grandiosidade da sua paciência. Obrigado por tudo!

Dra. Cristina Maeda Takiya, sempre solícita em dirimir minhas muitas dúvidas. Quanta informação! Sou muito grato pela sua amizade e carinho.

Dr. Stevens Rehen, aceitou com grande gentileza a minha persistência. Juntamente com outros colegas e sob a sua orientação, tive, como um dos co-autores, a minha primeira publicação científica. Isto é histórico! Poder participar deste projeto foi uma grande honra. Com toda certeza, devo-lhe muito pelo meu crescimento. Obrigado!

Dra. Carla Polycarpo, aguentou educadamente as minhas dúvidas de Bioinformática. Agradeço a confiança, demonstrada no convite para o seminário à turma de Odontologia, a participação na banca do projeto e orientações, a atenção incessante, o carinho, a disponibilidade ... Muito obrigado!

Dr. Marcos Sorgine, grande pessoa, grande mestre! Sempre disposto a ajudar. Agradeço a paciência.

Usando o gancho da Biologia Molecular, disciplina realizada por mim durante o mestrado, aproveito para elogiar o grande profissionalismo e a dedicação dos professores que, juntamente com Carla Polycarpo e Marco Sorgine, muito colaboraram para o meu crescimento e me deram a honra da convivência. Ao Dr. Cláudio Masuda e Dra. Gabriela Oliveira o meu parabéns e a minha amizade.

É uma grande satisfação ter podido conviver com as professoras Lela e Tatiana. Colaboraram imensamente disponibilizando o laboratório, quando necessitei. Obrigado pela confiança. O carinho de vocês foi muito importante!

Um pouco antes da fase cirúrgica do experimento, procurei a equipe de Cirurgia Experimental, para tirar algumas dúvidas quanto à melhor técnica anestésica. Fiquei impressionado com a atenção que me dispensaram. Caros Professores, suas orientações foram fundamentais para o tranquilo transcorrer do experimento. Sou muito agradecido!

Quando chegou a fase de implantação dos arcabouços nos animais, contei com a cooperação da Dra. Cláudia Batista, que cedeu, com grande gentileza, o espaço do seu laboratório para que a etapa em questão pudesse ser realizada de maneira adequada. Dra. Cláudia, muito obrigado!

O veterinário Dr. Paulo Obaica, responsável pelo biotério do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, juntamente com os funcionários Adilson, Alan e Edilson, foram nota dez. Desde orientações iniciais, passando pela captação e o cuidado dos animais, eu somente tenho a agradecer. Obrigado!

Logo que cheguei ao PCM, lá no início, quando consegui a permissão do Dr. José Garcia de Abreu Jr para participar dos seminários do seu laboratório, fui amparado com grande amizade pela Karla e pelo Marcos. Estes dois foram de suma importância nos meus estudos que visavam o ingresso no Mestrado. Grandes Pessoas! Sucesso!

Ainda falando do pessoal do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, sou também muito grato às orientações do Diego. Sempre disposto a ajudar, contribuiu imensamente com o meu crescimento. Enfatizo ainda a paciência e o carinho dispensados pelo Fábio, pela Débora, pela Juliana, pelo João, pela Alice e outros.

Todo o meu conhecimento sobre cultura de células e o fato do sucesso desta etapa do experimento são graças ao grande mestre Dr. Euler Araújo. O Euler é uma daquelas pessoas que me doaram tanto conhecimento, ao ponto de ser praticamente impossível a minha retribuição. Caro amigo, obrigado, obrigado, obrigado ...

Seguindo a linha de pessoas especiais e indispensáveis, em todas as etapas deste experimento pude contar com o empenho e a “expertise” da Dra. Madalena . É, estou quase me convencendo que sou uma pessoa de sorte, além de tê-la como grande colaboradora, ainda ganhei dois grande amigos. A você e ao Nathan a minha amizade e o meu carinho. Valeu!

Aos amigos do Laboratório de Biomineralização, André Rossi e Raquel, o meu agradecimento pelo carinho e convivência.

Dr. Leonardo Tavares, grande pessoa, sempre atento, agradeço as importantes orientações.

Grande satisfação também foi poder aprender com o profissionalismo do Dr. Leonardo Andrade. Muito obrigado pela atenção e pelos ensinamentos!

Quando cheguei ao Lab. de Biomineralização, tive as primeiras lições de bancada e manejo laboratorial com a Mair. Posteriormente, colaborou em várias fases do meu experimento e cedendo valiosas informações. Mair, muito obrigado!

William Querido, grande figura! Dono de uma atenção “atenciosa”, colaborou imensamente em várias etapas do experimento. Boa Sorte no seu trabalho e obrigado pelo carinho!

Dra. Leida, agradeço as informações. A vida é Quântica!

À Doris e à Márcia, ambas da COPPE, a minha satisfação pelos momentos vividos e o meu agradecimento pela preocupação, pelas orientações e pela amizade. Valeu o carinho!

Geovanna, sempre disposta a ajudar, colaborou com o empréstimo da mesa cirúrgica, responsável pela tranquilidade do ato cirúrgico e conforto dos animais utilizados. Obrigado!

Com a sua grande disposição em ajudar-me, a Dra. Márcia Cury foi maravilhosa. Grande revisora, concedeu-me importantes orientações, além de me apresentar a Dra. Fátima(UFF), profissional igualmente exemplar e atenciosa, que ajudou-me numa primeira seleção dos animais a serem utilizados. Muito obrigado!

Sou grato à Dra. Kátia por ter me socorrido certa vez, cedendo-me, a colagenase, fundamental ao meu experimento.

Karla, passou me conhecimentos de grande importância para que a etapa cirúrgica tivesse uma elevada qualidade. Agradeço a oportunidade.

Ana Cristina Leão, foi uma grande colaboradora, auxiliando na realização das perfusões dos animais. Prezada Ana, sou muito grato pela sua atenção e orientações.

Bruno Pontes, obrigado pela presteza; sempre atento e colaborador. Grande força nas imunofluorescências e vídeo-microscopia. Obrigadão!

Agradeço à Sabrina Dick, a cessão dos PHBs, utilizados como controle no experimento.

Aos Técnicos e Colegas do laboratório da professora Cristina Takiya o meu agradecimento por toda a atenção dispensada.

À Rose, obrigado pelo carinho e presteza nas aquisições.

Antônio Ricardo, pessoa fantástica, teve enorme importância, foi responsável pela execução das tomografias computadorizadas nos animais do experimento. Muito obrigado pela doação e profissionalismo.

Ao meu amigo, Mário Groisman, o meu eterno agradecimento pela paciência e informações, transferidas desde a época da minha graduação em Odontologia. A cessão do tomógrafo foi fantástica! Obrigadão!

Paulo Henrique Jorge de Oliveira, meu amigo e parceiro, agradeço a disponibilização do motor para a realização da fase cirúrgica deste experimento, toda a confiança e incentivos. Muito obrigado!

Ao Mário Sérgio Marins, a minha gratidão pela atenção dispensada e amparo nas dúvidas relacionadas aos anestésicos.

Bem no início, perturbei a Gisele e o Wallace Carraro com as minhas dúvidas sobre o omento. Caros amigos, agradeço a paciência.

Agradeço aos amigos Antonio e Aline Monnerat, o crédito, o carinho e as orientações. Valeu!

Ivo Corrêa! Apresentado pelo Monnerat, o Ivo tornou-se muito querido e desde a época da USP me concede, com amizade e paciência, informações e atenção imprescindíveis à minha vida científica. Muito obrigado!

Dudu e Milene, agradeço a cessão do microscópio e o carinho.

Aos Josés Mauros da Silva e à Maria Dalva, o meu agradecimento pela atenção e apoio.

Aos amigos Nathan e Mada, Clauder Martins e Casê Borges o meu imenso obrigado pelas hospedagens, sempre com gentileza e prontidão.

Aos “Esquecidos”, minhas desculpas e o meu obrigado!

RESUMO

A engenharia de tecidos apresentou grandes avanços nos últimos anos, contribuindo significativamente para o desenvolvimento da medicina regenerativa. Os estudos nesta área de pesquisa visam criar condições ideais para o reparo e a substituição de tecidos lesados, por causas diversas. Visando contribuir para o avanço da bioengenharia dental, buscamos identificar regiões teciduais que pudessem fornecer células precursoras daquelas formadoras deste tecido. A região apical do dente incisivo de ratos Wistar foi selecionada para este fim, por ser caracterizada como uma fonte constante de células precursoras, dado que este dente apresenta crescimento contínuo. Mostramos neste trabalho que foi possível extrair células precursoras das formadoras de esmalte dentário, os ameloblastos, mantê-las em cultura e caracterizá-las morfológicamente por métodos de microscopia, incluindo métodos de contraste, vídeo-microscopia e imunomarcagem usando o microscópio de fluorescência. Dois tipos de arcabouço, um composto por colágeno tipo I e outro por poli-hidroxi-butilato, foram testados “in vitro”, quanto à resposta celular, visando o uso posterior como arcabouços para engenharia dental. Como um ensaio “in vivo”, utilizamos o arcabouço de colágeno tipo I celularizado com as células obtidas do tecido apical do dente incisivo inferior de ratos Wistar mantidas em cultura, o qual foi implantado na região de diastema maxilar de ratas Wistar isogênicas. Os resultados mostraram a necessidade de aperfeiçoamento deste procedimento e realização de novos testes, no que diz respeito à celularização dos arcabouços e à logística no aspecto da inserção, “in vivo”, dos arcabouços celularizados em regiões originalmente desprovidas de dentes. A partir da análise morfológica da região apical do dente incisivo, este trabalho também contribuiu para o melhor entendimento da estrutura do esmalte.

ABSTRACT

Tissue engineering has developed greatly in the last few years, contributing significantly to the advances of the regenerative medicine. Studies in this research area have the objective to create the optimum conditions to the repair and substitution of lesioned tissues, from different causes. Aiming in contributing to the advancement of dental engineering, we tried to find regions that could be a source of precursor cells committed to differentiate into tooth cells. The apical region from the incisor tooth of Wistar rats was selected for this goal, as this region is characterized as a constant source of precursors cells, due to the fact that this tooth presents a continuous growth along the life span of the rat. In this work we showed that it was possible to obtain precursors from the enamel forming cells, the ameloblasts, to maintain these cells *in vitro*, and to characterize these cells morphologically by using microscopy techniques, which included contrast methods, video-microscopy and immunostaining using fluorescence microscopy. Two types of scaffolds, one composed by type I collagen and another composed by poly-hydroxybutirate, were tested *in vitro*, in association with cells, considering their further use as scaffolds for dental engineering studies. As *in vivo* test, we have used the collagen type I scaffold containing cells isolated from the apical region of the lower incisor of Wistar rats, cultured *in vitro*. This scaffold was implanted in the diastema region of female isogenic rats maxilla. The results showed the necessity of perfecting the procedure, and performing new *in vivo* trials, mainly in respect to the cellularization of the scaffolds and the rational of the insertion of the cellularized scaffolds in regions where teeth originally are unprovided. From the morphological analysis of the apical region of the incisor tooth, this work also contributed to a better understanding of the 3D structure of the rat enamel.

3 Materiais e Métodos	51
3.1 Animais	51
3.2 Experimentos <i>in vitro</i>	51
3.2.1 Dissecções para análises anatômicas e histológicas da hemimandíbula, do esmalte e do dente incisivo inferior	51
3.2.2 Análises histológicas através de microscópio óptico	52
3.2.3 Análises da ultra-estrutura utilizando-se microscópio eletrônico de varredura	53
3.2.4 Reconstrução tridimensional	53
3.2.5 Análise do arcabouço de colágeno CollaPlug® e do arcabouço de poli-hidróxido-butirato (PHB)	55
3.2.5.1 Análise utilizando-se microscópio eletrônico de varredura	56
3.2.6 Protocolo cirúrgico para extração do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar	56
3.2.7 Análise do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar	58
3.2.7.1 Análise utilizando-se o microscópio óptico	58
3.2.7.2 Análise da presença de PCK-26 através de fluorescência utilizando se microscópio óptico confocal a laser	58
3.2.8 Protocolo para digestão e cultivo primário das células do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar	59
3.2.9 Caracterização da cultura das células do tecido apical do dente incisivo inferior e de molares de rato Wistar	60
3.2.9.1 Análise através de fluorescência utilizando-se microscópio óptico	60
3.2.9.2 Vídeo-microscopia	61

3.2.10	Análise do cultivo das células do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar sobre arcabouços Collaplug® e PHB	61
3.2.10.1	Análise utilizando-se microscópio eletrônico de varredura	62
3.3	Experimento <i>in vivo</i>	62
3.3.1	Extração do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar	62
3.3.2	Isolamento, cultura e semeadura das células do tecido apical do dente incisivo inferior	63
3.3.3	Implantação de arcabouço, celularizado com células do tecido apical do dente incisivo inferior, em região de diastema maxilar de ratas Wistar	63
3.3.4	Exame tomográfico computadorizado dos ratos Wistar que receberam os implantes	64
3.3.5	Eutanásia	65
3.3.6	Processamento das amostras	65
3.3.6.1	Desmineralização	65
3.3.6.2	Crioprocessamento e criomicrosecção	66
3.3.6.3	Análise utilizando-se microscópio óptico	66
4	Resultados	67
4.1	Esmalte e dente incisivo inferior de rato Wistar	67
4.1.1	Análise histológica utilizando-se microscópio óptico	67
4.1.2	Análise através de microscópio eletrônico de varredura	69
4.1.3	Reconstrução tridimensional da organização dos ameloblastos secretores	70
4.2	Caracterização das células do tecido apical do dente incisivo inferior	

e do dente molar	72
4.2.1 Vídeo-microscopia	72
4.2.2 Análise de fluorescência com microscópio óptico	73
4.2.3 Análise do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar, através da microscopia de fluorescência utilizando microscópio óptico confocal a laser	74
4.3 Arcabouço de colágeno CollaPlug® e arcabouço PHB	75
4.3.1 Análise da superfície dos arcabouços utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura	75
4.3.2 Análise das células do tecido apical do incisivo do rato semeadas nos arcabouços CollaPlug® e PHB, através da microscopia eletrônica de varredura	76
4.4 Células do tecido de dente molar inferior de rato Wistar com 4 dias pós-natal	77
4.4.1 Análise da fluorescência utilizando-se microscópio óptico	77
4.4.2 Análise de fluorescência utilizando microscópio óptico confocal a laser	78
4.5 Amostras com implantação de arcabouços Collaplug® com células do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar	79
4.5.1 Exame tomográfico computadorizado das ratas Wistar que receberam os implantes e da rata controle	79
4.5.2 Análise utilizando-se microscópio óptico	80
4.5.2.1 Amostras desmineralizadas	80
5 Discussão	83
5.1 Aspecto tridimensional dos ameloblastos e do esmalte do dente	

incisivo inferior de rato Wistar	83
5.2 Obtenção e cultivo das células do tecido apical do dente	
incisivo inferior de rato Wistar	84
5.3 Cultivo de células do tecido apical do dente incisivo inferior de rato	
Wistar em arcabouço de colágeno CollaPlug®	85
5.4 Formação de tecidos dentais a partir da implantação celular	86
6 Conclusões	88
6.1 Extração e manutenção das células do tecido apical do incisivo	
inferior de rato Wistar	88
6.2 Manutenção das células do tecido apical do incisivo inferior de rato	
Wistar no arcabouço de colágeno CollaPlug®	88
6.3 Implantação <i>in vivo</i> do arcabouço celularizado na região de	
diastema maxilar de rato Wistar	88
7 Referências bibliográficas	89
GLOSSÁRIO	118
ANEXO A - A NEW APPROACH ON THE STUDY OF THE STRUCTURE OF	
THE RODENT INCISORS DENTAL ENAMEL (artigo científico	
a ser submetido)	
ANEXO B - WORLDWIDE SURVEY OF PUBLISHED PROCEDURES TO	
CULTURE HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS (artigo científico	
aceito)	

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é um campo relativamente novo, mas que está crescendo rapidamente e possui um grande potencial em tratamentos de pacientes através de aplicações em terapêuticas médico-odontológicas, incluindo a regeneração de tecidos e órgãos, e um crescente número de utilizações médico-odontológicas não terapêuticas, tais como: utilizar um modelo animal para a descoberta de uma droga; seleção toxicológica e farmacogenômica. Desta forma, a engenharia e a ciência de tecidos é aqui definida como sendo o uso de processos físicos, químicos, biológicos e de engenharia que visam controlar e direcionar o comportamento global das células (JOHNSON et al., 2007).

A possibilidade de órgãos humanos serem produzidos *de novo*, em laboratório, e utilizados para transplantes é, obviamente, uma idéia muito atraente. Mas a grande revolução, aguardada por milhões de pessoas, é o conhecimento para a obtenção de órgãos a partir das células dos próprios pacientes (células autólogas). Entre outras vantagens, isto dispensaria a imunossupressão, quando do transplante, podendo tornar a reposição de órgãos um procedimento cirúrgico de rotina (SARTAJ e SHARPE, 2006).

Dentre estas milhões de pessoas que necessitam da reposição de um novo órgão, estão os pacientes odontológicos. No ocidente, cerca de 85% dos adultos já se submeteram a algum tratamento dental. Sete por cento teve um ou mais dentes perdidos aos dezessete anos. Após 50 anos, uma média de 12 dentes encontram-se indicados para extração (SHARPE e YOUNG, 2005).



Figura 1 - Implante dental de ferro (seta) em maxila de romano antigo, escavada em Londres (Fonte: modificado de SARTAJ e SHARPE, 2006).

Implantes endósseos, têm sido utilizados há milhares de anos. Egípcios, maias e romanos antigos, praticaram formas de implantação dental usando uma variedade de materiais incluindo conchas, ferro etc (Fig.1). Hoje, a reposição de dentes perdidos ou danificados, normalmente, envolve implantes dentais, próteses fixas ou removíveis, fabricados com materiais sofisticados, mas não biológicos (CRUBEZ et al.,1998; WESTBROEK e MARTIN, 1998).

1.1 Os dentes

Os dentes (Fig.2) são apêndices encontrados na entrada do trato digestivo em invertebrados e vertebrados. Estão associados, principalmente, com a apreensão e o processamento do alimento, defesa e dominância. Em humanos, os dentes ainda são utilizados na articulação fonética (KOUSSOULAKOU et al., 2009). Possuem uma complexa morfologia, consistindo em diferentes arranjos, formas, números de cúspides, tamanhos de coroas e o crescimento, evolutivamente, relacionados com o hábito alimentar (SALAZAR-CIUDAD et al., 2003). Estes órgãos desenvolvem-se no embrião através de interações entre o ectoderma e o mesênquima subjacente (SARTAJ e SHARPE, 2006).

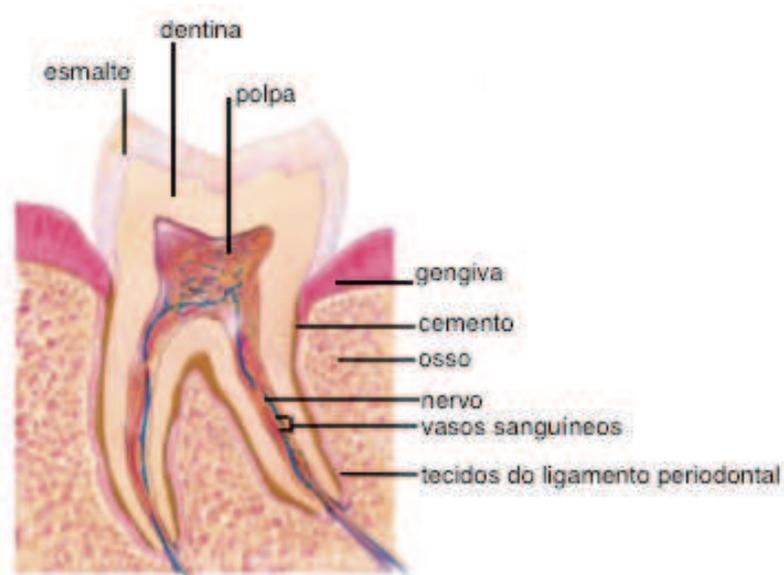


Figura 2 - O dente e seus diferentes tecidos (Fonte: modificado de SHARPE e YOUNG, 2005).

1.1.1 A odontogênese

1.1.1.1 Iniciação

Há muito tempo experimentos utilizando embriões de anfíbios mostraram que a crista neural cranial origina o mesênquima dental e que, uma vez removida, as estruturas do primeiro arco branquial não se desenvolvem (PLATT, 1893, 1897; LANDACRE, 1921; ADAMS, 1924; STONE, 1926; RAVEN, 1931; CHIBON, 1966, 1970). Mais recentemente, a resposta definitiva relacionando o papel da crista neural com o desenvolvimento de dentes de mamíferos foi estabelecida através de recombinações da crista neural de camundongos com o epitélio oral mandibular resultando na formação de dentes, quando cultivados no canal anterior do olho de camundongo (LUMSDEN, 1984 a, b, c, 1988). No período que ocorre a formação do tubo neural, o cruzamento dos tecidos embrionários do ectoderma dorsal e da placa neural ativa a multiplicação celular, tanto no ectoderma como no neuroderma. Esta multiplicação celular expressa o gene *FOXD3*, que por sua vez instrui tais células a formarem dois tubos dorsais longitudinais de ectomesênquima, nos dois lados do tubo neural, criando uma população de células transitórias e altamente “nômades” denominadas de células da crista neural cranial (CNC).

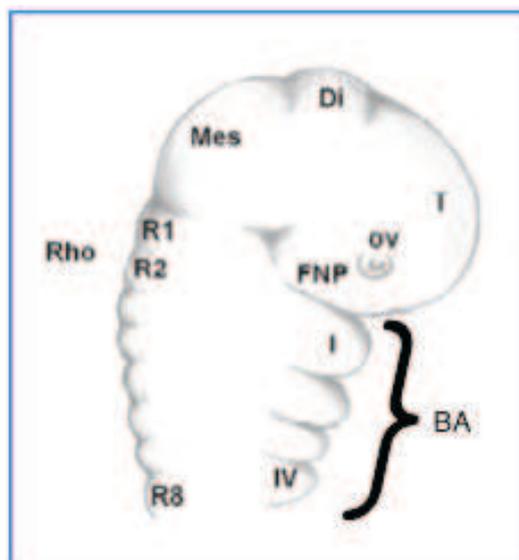


Figura 3 - Visão sagital simplificada da parte cefálica de um embrião de vertebrado. Telencéfalo (T) + diencéfalo (Di) = cérebro anterior. Mesencéfalo (Mes=cérebro médio). Vesícula ocular (o.v.). FNP= proeminência frontonasal. Rombencéfalo (Rho). Rombômeros (R1-R8). Os quatro primeiros arcos branquiais (BA)(I-IV). O arco branquial I é separado em superior e inferior (maxila e mandíbula , respectivamente) (Fonte: modificado de KOUSSOULAKOU et al., 2009).

O desenvolvimento do embrião leva à formação dos arcos faríngeos ou branquiais (BA) (Fig. 3) que contém vasos sanguíneos centrais rodeados por um mesoderma paraxial, envolto por uma folha de células da crista neural cranial. No primeiro arco faríngeo, onde serão formadas a maxila e a mandíbula, muitas camadas do epitélio orofaríngeo (estomódeo) migram sobre e ao redor do arco faríngeo. Neste momento, as células odontogênicas da CNC estão prontas para migrar e povoar a região (LUMSDEN, 1988; SOUKUP et al, 2008).

As células da crista neural cranial, de origem ectodérmica, sofrem um processo de “mesenquimalização”, justificando o fato de serem designadas como células ectomesenquimais (WADA e MAKABE, 2006). Algumas das CNC da região do cérebro anterior migram, ventralmente, entre a superfície ectodérmica e o mesoderma local, estabelecendo a proeminência frontonasal, onde se formam os incisivos superiores. As CNC do cérebro médio e os três primeiros rombômeros povoam o primeiro arco branquial, onde todos os outros dentes se desenvolvem, no restante da maxila e em toda a mandíbula (GRIGORIOU et al., 1998). Em camundongos, o mesênquima dental é atribuído pelas células da crista neural derivadas das regiões do cérebro médio e posterior, em torno de oito dias e meio da fase embrionária (ED8,5) (IMAI et al., 1996; KONTGES e LUMSDEN, 1996; CHAI et al., 2000; ZHANG et al., 2003).

A odontogênese progride via interações sequenciais e recíprocas entre as células mesenquimais do ectomesênquima e as células epiteliais do ectoderma oral (Fig. 4) (THESLEFF e SHARPE, 1997; THESLEFF et al., 1995). Tais interações, requeridas para as formações dos dentes são mediadas pela expressão espaço-temporal de genes relacionados com os dentes e a secreção de fatores de crescimento e de transcrição, que são, reiterativamente, usados nos ciclos regulatórios (JERNVALL e THESLEFF, 2000). A interação indutora consiste de dois componentes principais: um tecido capaz de produzir os estímulos indutores e um tecido capaz de receber e responder a estes estímulos. Em um nível molecular, estas interações envolvem redes de sinalizações complexas compostas de várias moléculas de sinalização, seus receptores e sistemas de controle de transcrição, mediadas por moléculas de sinalização difundidas por proteínas conhecidas como fatores de crescimento. Entre estes, predominantemente, encontram-se as famílias das Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMP), dos Fatores Fibroblásticos de

Crescimentos (FGF), Wnt e Hedgehog (Hh). Estes fatores de crescimento funcionam sinergisticamente e/ou antagonisticamente para organizar e padronizar tecidos e órgãos durante o desenvolvimento embrionário.

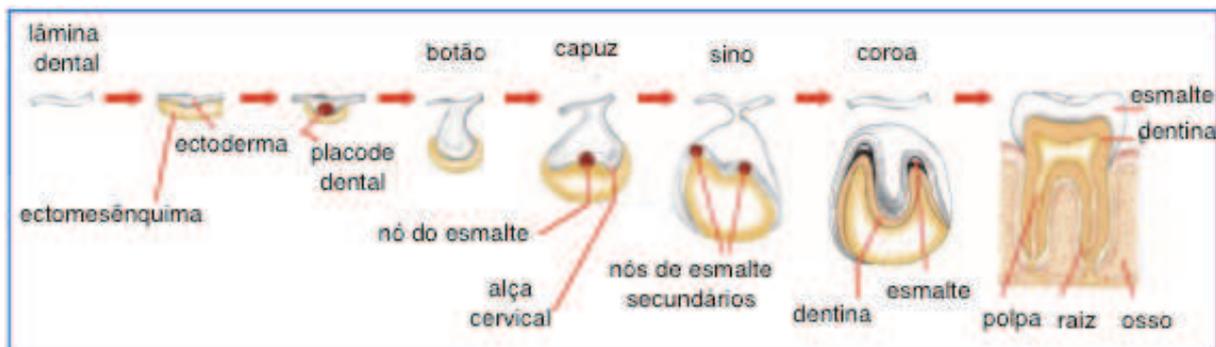


Figura 4 - Durante o início do desenvolvimento dental o ectoderma (branco) espessa-se e forma um placode que formará um botão em direção ao ectomesênquima subjacente (amarelo), derivado das células craniais da crista neural (Fonte: modificado de THESLEFF, 2003).

Os fatores de crescimento ligam-se a receptores específicos, localizados nas membranas celulares, disparando, conseqüentemente, vias de sinalizações intracelulares, levando a tradução dos sinais no interior do núcleo, onde fatores de transcrição latentes são ativados e, eventualmente, causam mudanças na expressão do gene. Pelo fato dos fatores de transcrição possuírem uma função comum no desenvolvimento dental, regulando a expressão de fatores de crescimento, foi sugerido que os fatores de transcrição participam da interação epitélio-mesênquimal através da ligação de laços de sinalização entre camadas de tecido, respondendo a sinais indutores e regulando a expressão de outras moléculas sinalizadoras. O padrão de sobreposição da expressão dos fatores de transcrição e fatores de crescimento, durante o desenvolvimento de órgãos, reforça o relacionamento entre estas duas classes de produtos de genes na interação indutiva. Assim os fatores de transcrição, em uma camada de tecido, ativam a expressão de fatores de crescimento em resposta à sinalização de fatores de crescimento produzida em tecidos adjacentes e formando, conseqüentemente, uma rede de sinalizações que regulam a organogênese (CHEN e MAAS, 1998).

Os sinais são, na maioria, pequenas proteínas secretadas por células de um dos tecidos envolvidos e recebidas por células de outro tecido que “interpretam” os sinais recebidos e determinam a resposta, o crescimento, a expressão de um gene ou a morte celular. Durante o desenvolvimento de diferentes

dentes existem súbitas diferenças nestes sinais. Esta grande complexidade de genes, fatores de transcrição, fatores de crescimento e proteínas, envolvidos na odontogênese, nos revela uma complicada rede de sinalização (www.bite-it.helsinki.fi).

Células epiteliais secretam jogos específicos de fatores de crescimento (por exemplo: BMP (BMP2, BMP4), FGF (FGF3, FGF4, FGF8, FGF10)) e moléculas de sinalização (SHH E WNT (WNT3, WNT7, WNT10)), algumas das quais regionalizam o ectoderma oral (FGF8: região de molares; BMP4: região de incisivos) antes da chegada das células da crista neural cranial. SHH é secretado, inicialmente, em todo o epitélio dental e especifica os sítios de proliferação do ectoderma oral, a invaginação no ectomesênquima e a iniciação do desenvolvimento do dente (HARDCASTLE et al., 1998). A expressão de *Shh* pode ser traçada bem cedo, por volta do ED9,5, no epitélio oral de camundongos transgênicos (JEONG et al., 2004). A atividade de BMP, tanto no epitélio como no mesênquima dental tem sido mostrado como necessária à manutenção da expressão de *Shh* (ZHANG et al., 2000).

Runx2 é expresso no mesênquima dental e regulado por sinais do FGF que partem do epitélio. Camundongos “knockout” para *Runx2* apresentaram a interrupção do desenvolvimento dental no estágio final da fase de botão (D’SOUZA et al, 1999). *Runx2* media as funções dos sinais do FGF epitelial, regulando a expressão de *Fgf3* no mesênquima dental e *Fgf3* pode ser um gene alvo direto do *Runx2* (ÅBERG et al., 2004). D’Souza e colaboradores, em 1999, mostraram que a expressão de *Runx2* ou *Cbfa1*, no mesênquima dental, é intimamente associada com as interações epitélio-mesenchimais durante o desenvolvimento dental e é afetada por sinais epiteliais que envolvem FGF (D’SOUZA et al., 1999). Descobertas recentes têm revelado que o fator de transcrição *Cbfa1* (ligado ao núcleo do fator A1) também referido como *Osf2* (fator 2 específico de osteoblastos), é um regulador crítico da diferenciação do osteoblasto (DUCY e KARSENTY, 1995).

Em camundongos, antes de qualquer manifestação morfológica relacionada ao desenvolvimento dental, um número de genes “homeobox”, tais como *Pax9*, *Msx1*, -2, *Dlx-3*, 5, 6, 7, *Barx1*, *Pitx2*, *Lhx-6*, - 7, são expressos com um padrão espacial específico, no primeiro arco branquial.

Baseando-se nestas observações códigos “homeobox” foram relacionados com a formação do padrão dental (SHARPE, 1995; THOMAS et al., 1997), sugerindo que domínios de sobreposição da expressão de genes “homeobox” podem subdividir os arcos dentários em diferentes regiões e especificar a posição de cada dente.

Pax9, um membro da família de genes de domínio emparelhado, é inicialmente expresso no mesênquima dental inicial dos futuros sítios de formação dental (NEUBÜSER et al., 1997) e continua a ser expresso no mesênquima dental nos estágios seguintes do desenvolvimento dental (PETERS et al., 1998). Esta expressão confinada de *Pax9*, via combinação dos efeitos das atividades de BMP e FGF, representam um marcador molecular para o mesênquima dental inicial (NEUBÜSER et al., 1997).

A expressão de *Msx1* e *Msx2* é detectada no germe do dente em desenvolvimento em padrões correlacionados com etapas morfogênicas durante o desenvolvimento dentário (MACKENZIE et al., 1991; MACKENZIE et al., 1992). *Msx1* é fortemente expresso no mesênquima dental, incluindo a papila e o folículo dental, nos estágios de lâmina dental, botão, capuz e sino (Fig. 4). *Msx2* é co-expresso com *Msx1* no mesênquima dental, mas um componente da expressão de *Msx2* também desloca-se para o epitélio dental e é restrito ao nó do esmalte (SATOKATA et al., 1994; SATOKATA et al., 2000). Evidências mostram que mutações no gene *MSX1*, em humanos, causam agenesia dental e fissura orofacial, além de demonstrarem um papel vital de *Msx1* na odontogênese (VASTARDIS et al., 1996; VAN DEN BOOGAARD et al., 2000; BLANCO et al., 2001; LIDRAL e REISING, 2002).

A expressão de *Barx1* é encontrada restritamente no mesênquima da região de molares antes e durante a formação destes dentes, relacionando-se com a determinação do tipo do dente molar. Os efeitos antagonistas de *BMP4* e *FGF8* do epitélio oral suprajacente são responsáveis pelo estabelecimento do domínio da expressão de *Barx1* no mesênquima do molar (TISSIER-SETA et al., 1995; TUCKER et al., 1998).

A expressão de *Pitx2*, um membro da família *Pitx/RIEG* dos genes “homeobox” relacionados com Bicoid (Bcd), é regulada positivamente pelo FGF8 e negativamente pela BMP4, no epitélio dental inicial (ST AMAND et al., 2000; SEMINA et al., 1996; MUCCHIELLI et al., 1997). Uma investigação adicional

revelou que o desenvolvimento dental é sensível à quantidade total destas isoformas de *Pitx2*. Enquanto a dose de *Pitx2* aumenta, fenótipos intermediários de dentes que são mantidos entre o estágio de botão e o desenvolvimento normal foram encontrados em camundongos mutantes com diferentes condições para *Pitx2*. Além disso, *Pitx2* pode também estar envolvido na regulação da orientação dental (LIU et al., 2003).

No desenvolvimento do germe dental, *Lef1*, um membro da família HMG “box” e um mediador nuclear da sinalização de Wnt, é inicialmente expresso no epitélio dental espessado, na décima primeira semana embrionária (ED11). Nos estágios subsequentes de botão, capuz e sino, os transcritores de *Lef1* são detectados imediatamente adjacentes ao mesênquima e ao epitélio dentais (KRATOCHWIL et al., 1996; DUCY, 2000). No mesênquima dental, BMP4 é responsável pela expressão de *Lef1* (CHEN et al., 1996; KRATOCHWIL et al., 1996). Já no epitélio dental a função de *Lef1* é necessária apenas transitoriamente para controlar a expressão de *Fgf4* no nó de esmalte. Assim pode-se relacionar a recepção de um sinal Wnt à uma atividade da cascata de sinalização de FGF (KRATOCHWIL et al., 1996; KRATOCHWIL et al., 2002).

No ED10, em camundongos, e por volta da quinta semana de gestação humana, a expressão de WNT7b é induzida no ectomesênquima do camundongo pelo FGF8 epitelial (NEUBÜSER et al., 1997). Durante esta fase, a cooperação dos genes PAX9 e SHH separa o epitélio oral (não-odontogênico) do epitélio dental (odontogênico) e desse modo restringe a expressão de SHH ao epitélio dental (SARKAR et al., 2000). Avançando um pouco mais, no ED10,5, quando são determinados os sítios de formação e os padrões dos dentes, *Wnt7b* é expresso no epitélio oral, mas não no epitélio dental inicial. A expressão ectópica de *Wnt7b* na região formadora dental reprime a expressão de *Shh* e subsequentemente inibe a formação do dente. *Wnt7b* parece interagir com a sinalização de *Shh* para marcar os limites ectodermais entre o ectoderma oral e dental, posicionando os sítios de formação dos dentes (SARKAR et al., 2000). Entre o décimo e décimo primeiro dia embrionário (ED10-11) em camundongos e após 37 dias de desenvolvimento do embrião humano, as células do epitélio dental iniciam a proliferação como uma pequena fita em forma de ferradura, conhecida como lâmina

dental ou lâmina dentária, que dará origem à maxila e à mandíbula. O epitélio oral forma a lâmina vestibular que dará origem ao vestíbulo (Fig. 5A-C) (BUTLER, 1995).

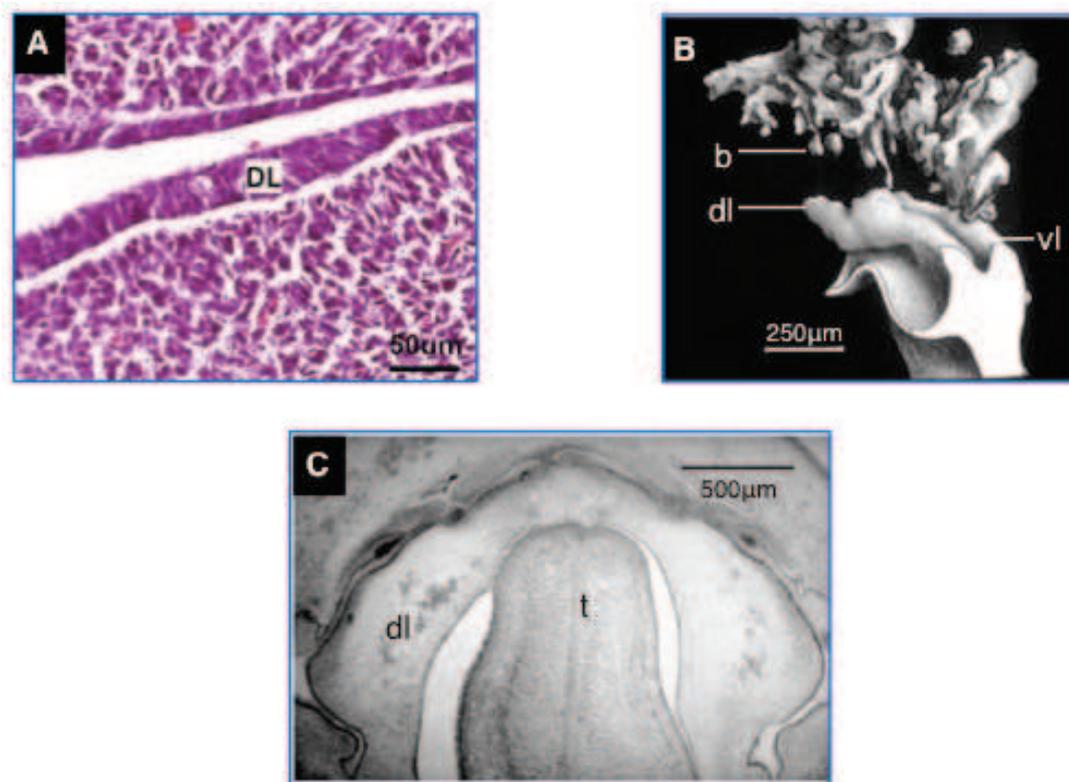


Figura 5 - (A) Formação de lâmina dental (DL). Embrião de camundongo. Corte sagital. (Fonte:modificado de YEN e SHARPE, 2008); (B)Embrião humano, reconstrução tridimensional do osso maxilar (b), lâmina dental(dl) e lâmina vestibular (vl); (C)Embrião humano, corte histológico, plano horizontal, mostrando a lâmina dental (dl) do arco dental superior e língua (t) (Fonte: modificado de RADLANSKI e RENZ, 2005).

Durante a morfogênese dental a BMP4 possui papel central (THESLEFF e MIKKOLA, 2002). Por volta de ED10, quando ocorre a determinação do sítio de formação dental e do tipo de dente, os efeitos antagonistas das expressões epiteliais de *Bmp4* e *Fgf8* restringem a expressão de *Pax9* no mesênquima dental inicial e a expressão de *Pitx2* no epitélio dental inicial, sendo o tipo do dente determinado neste meio tempo (NEUBÜSER et al., 1997; PETERS e BALLING, 1999; ST AMAND et al., 2000). BMP4, expressa na região distal da mandíbula, ainda restringe a expressão de *Barx1* e induz a expressão de *Islet1* no mesênquima do futuro incisivo (TUCKER et al., 1998; TISSIER-SETA et al., 1995; MITSIADIS et al., 2003).

A primeira indicação morfológica do desenvolvimento dos dentes na lâmina dental é a formação do placode ectodérmico ou placode dental (ED11.5) (Fig. 4 e 6), onde o epitélio embrionário torna-se mais espesso, precedendo a região onde aparecerá um órgão ectodérmico. Tem sido demonstrado que FGF e WNT funcionam como ativadores para a formação do placode, enquanto que as BMP funcionam como inibidoras (JUNG et al., 1998).

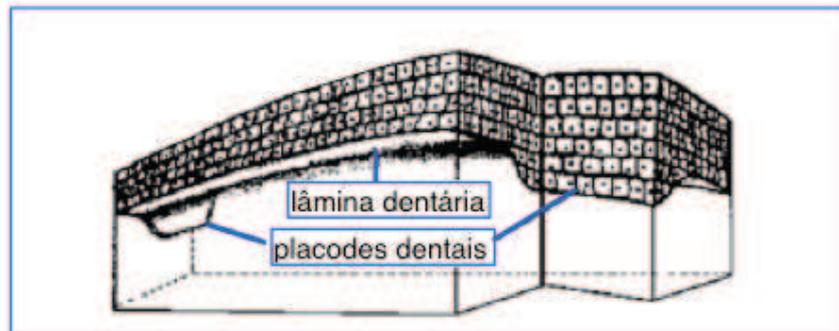


Figura 6 - Lâmina dentária e placode dental (Fonte: modificado de KOUSSOULAKOU et al., 2009).

Durante a expansão dos placodes dentais e para a manutenção destes, a sinalização EDA parece ser vital (Srivastava et al., 2001). Mustonen et al., em 2003, sugeriram que o sinal finamente balanceado de EDA/EDAR é requerido para expansão do placode dental inicial e para o desenvolvimento do terceiro molar. A superexpressão de *EdaA1* no epitélio oral resulta em dentes supranumerários na região de diastema, em camundongos transgênicos.

Dentre os múltiplos genes que codificam fatores de crescimento expressos no epitélio dental espessado ou placode dental, por volta de ED11,5, existem registros que incluem *Fgf8*, *Fgf9*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*, *Shh*, *Wnt10a* e *Wnt10b* (VAINIO et al., 1993; HEIKINHEIMO et al., 1994; BITGOOD e MCMAHON, 1995; DASSULE e MCMAHON, 1998; HARDCASTLE et al., 1998; KETTUNEN e THESLEFF, 1998; ZHANG et al., 1999). Estas moléculas epiteliais sinalizadoras são responsáveis pela indução da expressão do gene no mesênquima dental adjacente, incluindo *Msx1*, *Msx2*, *Lef1*, *Dlx1*, *Dlx2*, *Patched (Ptc)*, *Gli1* e *Syndecan-1* (VAINIO et al., 1993; DASSULE e MCMAHON, 1998; ZHANG et al., 1999; CHEN et al., 1996; KRATOCHWIL et al., 1996; BEI e MAAS, 1998). *Wnt10a* e *Wnt10b* são expressos tanto na região epitelial de incisivos como na de molares, por

volta de ED11,5, momento no qual ocorre o espessamento do epitélio dental, permanecendo desta maneira durante todo o estágio de botão (DASSULE e MCMAHON, 1998). A expressão de *Fgf9* também é detectada no início da formação do epitélio dental e persiste no local até o estágio inicial de botão. A sinalização de FGF participa de maneira restrita em sítios de formação do dente pela indução da expressão de *Pax9*, *Pitx1*, and *Pitx2* (NEUBÜSER et al., 1997; PETERS e BALLING, 1999; ST AMAND et al., 2000). No mesênquima odontogênico inicial, FGF8 é responsável pela indução de *Barx1* na região do molar e, adicionalmente, induz a expressão de *Lhx6* e *Lhx7* antes e durante a formação dental (TUCKER et al., 1998 ; GRIGORIOU et al., 1998).

Entre os três membros da família hedgehog (Hh) em vertebrados, *Shh* é o único ligante de Hh expresso nos dentes. No desenvolvimento dental, transcritores de *Shh* são primeiramente detectados no epitélio dental do placode dental, por volta do ED11,5, através da hibridização *in situ* (BITGOOD E MCMAHON, 1995; ZHANG et al., 1999; KERÄNEN ET AL., 1998; SARKAR et al., 2000), sugerindo um papel para *Shh* na iniciação do desenvolvimento dental (BITGOOD E MCMAHON, 1995; DASSULE e MCMAHON, 1998; HARDCASTLE et al., 1998). Na transcrição da sinalização de *Shh*, os seus efetores são codificados pelos genes *Gli*, importantes para o desenvolvimento dental antes do estágio de botão (HARDCASTLE et al., 1998).

No estágio de pré-botão do desenvolvimento (até o ED 11,5) o epitélio dental inicial é capaz de induzir a formação do dente quando confrontado com o mesênquima não dental. Entretanto, ressalta-se que apenas o mesênquima derivado da crista neural cranial possui competência odontogênica (LUMSDEN, 1988).

1.1.1.2 Broto ou botão

Nas regiões de placode dental, sob a influência de BMP4 e activin βA , as células epiteliais existentes iniciam suas proliferações (ED12,5 - estágio inicial de botão) e penetram no mesênquima. Por volta da ED13,5, a massa celular epitelial assemelha-se a um cilindro com um bulbo na ponta. O estágio de botão caracteriza-se pela aparência de um blastema dental, não apresentando um claro arranjo celular. As células mesenquimais também proliferam-se e acumulam-se

ao redor de cada botão epitelial (BLUTEAU et al., 2008). Nesta fase de broto ou botão (Fig. 4 e 7), onde a proliferação do epitélio dental (ectoderma) invagina-se no mesênquima, nas regiões de placodes dentais, famílias dos fatores de crescimento e de transcrição secretam moléculas(BMP, FGF, SHH e WNT), induzindo a expressão de vários genes (por exemplo: *PAX9*, *MSX1/2*, *RUNX2*, *BMP*, *FGF*, *Activin*, *LEF1*, *DLX1*, *BARX1*, *LHX6/7*, *GLI1/2/3*), no mesênquima. Especificamente, a BMP4 epitelial, via MSX1, induz a produção de BMP4 mesenquimal, enquanto o FGF8 epitelial induz o activin β A mesenquimal. BMP e FGF ativam o MSX1, considerando que FGF induz a expressão de PAX9 e RUNX2 (MOSTOWSKA et al., 2003; THESLEFF, 2003a; THESLEFF, 2003; ÅBERG et al.,2004).

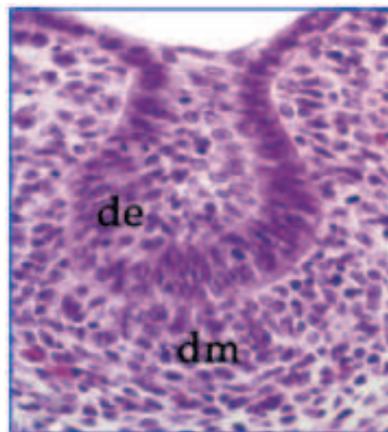


Figura 7 - Estágio de botão mostrando a proliferação do epitélio dental (de) para dentro do mesênquima dental (dm) subjacente. Dente humano. Corte sagital. (Fonte: modificado de KATCHIBURIAN e ARANA, 2004).

A expressão epitelial de *Shh* pode regular a espessura e invaginação do epitélio dental para formar a parte epitelial do botão dental através da estimulação da proliferação celular epitelial (HARDCASTLE et al., 1998; COURBONE et al., 2001). Embora *Shh* seja exclusivamente expresso no compartimento epitelial durante o início do desenvolvimento dental, o acúmulo da proteína Shh é encontrado no mesênquima da região de diastema dezoito horas após removida do epitélio oral. Esta observação sugere que a exclusão da atividade de *Shh* do mesênquima do diastema pode ser requerida para iniciação e posicionamento corretos, na cavidade oral (COBOURNE e MILETICH, 2004).

Com o decorrer do desenvolvimento, no estágio de botão, o potencial odontogênico é perdido pelo epitélio, sendo transferido ao mesênquima (ED11,5-12), tornando-se hábil para instruir o epitélio não dental a formar estruturas específicas do dente (MINA e KOLLAR, 1987; LUMSDEN, 1988; KOLLAR e BAIRD, 1970). Em camundongos, a expressão de mRNA *Cbfa1/Runx2*, estimulada por FGF, ocorre no mesênquima dental condensado no início do estágio de botão (ED12 em embriões de camundongos) e continua na papila dental através do estágio de capuz até o início do estágio de sino (ED16). O *Fgf3* é expresso no mesênquima dental a partir da décima terceira semana e meia embrionária (ED13,5) do estágio de botão. (D'SOUZA et al., 1999; KETTUNEN et al., 2000; ÅBERG et al., 2004a; ÅBERG et al., 2004). Tanto o potencial odontogênico como o controle do formato do dente permanecem na papila dental até o nascimento do dente (MINA e KOLLAR, 1987; LUMSDEN, 1988; KOLLAR e BAIRD, 1970; KOLLAR e BAIRD, 1969; YOSHIKAWA e KOLLAR, 1981).

1.1.1.3 Proliferação ou capuz

Ao final do estágio de botão e início do estágio de capuz, *Fgf9* é suprarregulado no primeiro nó de esmalte, onde *Fgf4* também é ativado pela via de sinalização de Wnt (KETTUNEN e THESLEFF, 1998; JERNVALL et al., 1994; KRATOCHWIL et al., 2002). A observação da expressão de *Fgf10* no mesênquima dental por volta do ED14, mostrou que FGF10 estimula a proliferação celular apenas no epitélio dental. FGF3, entretanto, pode estimular a proliferação celular no mesênquima dental (KETTUNEN et al., 2000). Em resposta à indução dos sinais epiteliais, o mesênquima dental inicia a expressão de genes que codificam moléculas de sinalização, incluindo *BMP4*, *FGF3*, *activin-βA* e *Wnt5a* (VAINIO et al., 1993; FERGUSON et al., 1998; SARKAR e SHARPE, 1999; KETTUNEN et al., 2000). Estes fatores mesenquimais de crescimento atuam no epitélio dental como sinais de retorno e no mesênquima dental para regular o desenvolvimento dental subsequente (CHEN e MAAS, 1998). A sinalização de BMP do mesênquima para o epitélio é requerida durante o desenvolvimento dental, na transição do estágio de botão para o estágio de capuz (CHEN et al., 1996).

O epitélio expandido dobra-se para dentro do interior do botão, numa direção antero-posterior, deixando a estrutura de massa celular com o aspecto de um capuz virado. À borda, desta estrutura formada, denomina-se alça cervical, a qual cresce, rapidamente, para baixo nos dentes inferiores e para cima, nos superiores (Fig. 8) (JUNG et al., 1998). Na fase do capuz, observa-se um epitélio interno que cobre a sua face interna e é denominado de epitélio interno do esmalte (ie), assim como um epitélio externo, que o reveste externamente, chamado de epitélio externo, ou exterior, do esmalte (oe). Entre estas duas folhas epiteliais encontram-se as células do retículo estrelado (er) e uma camada celular intermediária ou extrato intermediário (si). Este complexo estrutural que engloba o epitélio interno do esmalte, o epitélio externo do esmalte, o retículo estrelado e o extrato intermediário é conhecido como órgão dental ou órgão do esmalte. A massa mesenquimal é denominada papila dental e, no futuro, será chamada de polpa dental. O tecido mesenquimal condensado ao redor da papila dental e do órgão do esmalte é conhecido como folículo dental, o qual participará da diferenciação dos cementoblastos, fibroblastos e osteoblastos (Fig. 4 e 8) (SLAVKIN, 1974).

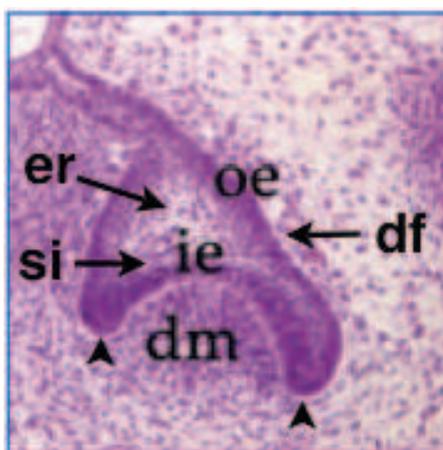


Figura 8 - Estágio do capuz. Corte sagital. Dente humano. Exibe uma camada de epitélio externo do esmalte (oe) e outra camada de epitélio interno do esmalte (ie), o mesênquima dental condensado (dm), o retículo estrelado (er), a região do extrato intermediário (si) e folículo dental (df). Cabeças de setas mostram a região da alça cervical. (Fonte: modificado de KATCHIBURIAN e ARANA, 2004).

Através da proliferação diferencial e dobramento do epitélio, o botão dental adquire a forma de capuz. Neste estágio, as células

mesenquimais secretam vários fatores, tais como “tenascin” e “syndecan”, aumentando a concentração local de muitos fatores de crescimento (THESLEFF, 2003; KAPADIA et al., 2007). Este aumento da concentração dos fatores de crescimento induz multiplicações diferenciais na camada epitelial e a transformação do aspecto de bulbo, apresentado pelo botão, em uma estrutura com aparência semi-piramidal, contínua com a lâmina dental, na ponta do cone. A BMP4 tem sido mostrada como o fator sinalizador mesenquimal que induz a transição do estágio de botão para capuz.

No ED14,5, o componente epitelial apresenta uma dobra específica, a qual é acompanhada pela formação do nó do esmalte, conhecido como um grupo transitório de células epiteliais que não se dividem. O nó do esmalte é, entretanto, considerado um centro sinalizador que controla a padronização das cúspides determinando o seu número e a sua posição, a proliferação celular, a apoptose e, conseqüentemente, o padrão dental (Fig. 4) (JERNVALL et al., 1994; JERNVALL et al., 1998; VAAHTOKARI et al., 1996; COIN et al., 1999). Uma coleção de moléculas sinalizadoras, incluindo Shh, BMP2, BMP4, BMP7, FGF4 e FGF9 são expressas no nó do esmalte (THESLEFF e MIKKOLA, 2002). Além disso, BMP4 mesenquimal induz e mantém a expressão de alguns genes, tais como *Shh* e *p21*, no epitélio dental e na formação do nó do esmalte (JERNVALL et al., 1998; ZHANG et al., 2000). A expressão de *Bmp4* juntamente com *Bmp2* e *Bmp7* no nó do esmalte durante o estágio de capuz do germe dental pode ser responsável pela apoptose das células do nó (THESLEFF e PISPA, 1998; JERNVALL et al., 1998; VAAHTOKARI et al., 1996). Tanto *Edar* como *Edaradd* são expressos no nó do esmalte enquanto *Eda* é expresso no epitélio externo do esmalte (TUCKER et al., 2000; HEADON et al., 2001; ELOMAA et al., 2001). Juntamente com a evidência de que Activin induz a expressão de *Edar*, resultados evidenciam a existência de uma rede regulatória que integra as vias de sinalização de FGF, Wnt, TNF e TGF- β , durante o desenvolvimento dental (LAURIKKALA et al., 2001).

Durante o estágio de capuz do desenvolvimento do dente de camundongo, a expressão de *NF- κ B*, *Ikb* e *Ikk γ* é encontrado no nó do esmalte, enquanto *Ikka* e *Ikk β* são expressos na borda externa do epitélio dental. Dentes molares em mutantes *Ikka* exibem uma morfologia cuspídea anormal, assemelhando-se às encontradas em camundongos mutantes *Eda*, *Edar*, e *Edaradd*,

demonstrando o importante papel da via de sinalização TNF na formação de cúspides de molar (OHAZAMA et al., 2004; NAITO et al., 2002; PISPA et al., 2003; KOJIMA et al., 2000; YAN et al., 2002). Além disso, IKK α mostra uma função independente de NF- κ B pela sinalização de EDA, podendo ser mediado pelo receptor de TNF associado ao fator 6 (TRAF6), conhecido por interagir com os receptores da família TNF e assim ativarem NF- κ B (OHAZAMA et al., 2004; CHUNG et al., 2002). Naito e colaboradores, em 2002, propuseram que *Traf6* funcionaria em duas vias independentes para ativar a proteína NF- κ B (NAITO et al., 2002).

A sinalização de FGF também está ligada com a via de Notch e, desta forma, FGF10 estimula a expressão de L-Fng, um modulador de secreção da sinalização de Notch, no retículo estrelado (NEUBÜSER et al., 1997; ST AMAND et al., 2000; KRATOCHWIL et al., 2002; LAURIKKALA et al., 2001; HARADA et al., 1999). Quanto à expressão de *Shh*, esta é confinada ao nó do esmalte, espalhando-se para as células do epitélio interno do esmalte e para o extrato intermediário, durante os estágios seguintes (VAAHTOKARI et al., 1996; DASSULE et al., 2000; KOYAMA et al., 1996). No décimo quarto dia embrionário e meio (ED14,5) do estágio de capuz, *Wnt4*, *Wnt6* e um receptor Wnt denominado *MFz-6* expressam-se no epitélio dental. Em contraste, *Wnt5a*, *sFrp2* e *sFrp3* são expressos restritamente no mesênquima dental (SARKAR e SHARPE, 1999).

Ao final do estágio do capuz (ED15), a remoção apoptótica das células do primeiro nó do esmalte é iniciada (FERGUSON et al., 1998; COIN et al., 2000; THESLEFF, 2003).

1.1.1.4 Histomorfodiferenciação ou sino

Nesta fase tem início a diferenciação das células epiteliais em pré-ameloblastos e das células mesenquimais em pré-odontoblastos, alterando, conseqüentemente, as formas das mesmas. O aparecimento do primeiro nó de esmalte secundário, por volta do décimo quinto dia embrionário (ED15), em camundongos, marca o início do estágio de sino (Fig. 4 e 9). Mais tarde, o segundo, terceiro e quarto nós de esmalte secundários se formam, nos dentes multicúspides (pré-molares e molares). O epitélio interno do esmalte continua se dobrando, de acordo com os sinais emitidos pelos primeiro e segundo nós do esmalte, desloca o retículo estrelado e adquire a forma de um sino (ED16,5). Os nós, como mencionado

na fase do capuz, localizam-se nas pontas das dobras epiteliais, coordenando a formação e determinando a posição e a altura da cúspide correspondente, na respectiva coroa (COIN et al., 1999).

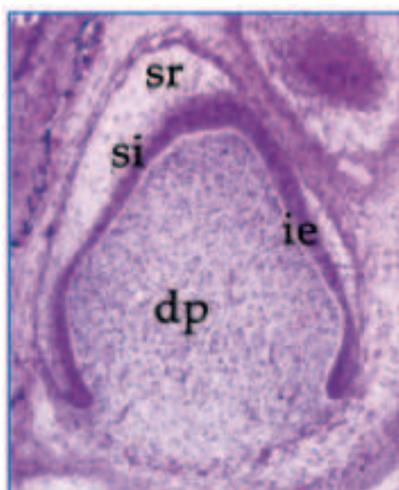


Figura 9 - Estágio de sino. Corte sagital. Dente humano. Exibe a diferenciação do órgão do esmalte, consistindo na diferenciação das camadas celulares do epitélio interno do esmalte (ie), estrato intermediário (si) e retículo estrelado (sr), as quais rodeiam a papila dental (dp) (Fonte: modificado de KATCHIBURIAN e ARANA, 2004).

Durante o subsequente estágio de sino, os ameloblastos originados do epitélio e os odontoblastos originados do mesênquima diferenciam-se. Adicionalmente, as células mesenquimais diferenciam-se no osso alveolar que forma os alvéolos dos dentes (PALMER e LUMSDEN, 1987).

É sugerido que *Cbfa1* regula a expressão de fatores mesenquimais que influenciam a morfogênese e a histodiferenciação do órgão de esmalte epitelial (D'SOUZA et al., 1999). A folistatina também regula a padronização nos incisivos pela inibição assimétrica da sinalização de BMP e diferenciação dos ameloblastos (WANG et al., 2004). Já a sinalização de Notch pertence a um dos sistemas implicados na morfogênese dental, sendo Notch um grande receptor transmembranoso conhecido pelo controle do destino celular e pela formação de compartimentos de tecidos durante o desenvolvimento embrionário (THESLEFF e MIKKOLA, 2002; ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 1999). As proteínas transmembranosas Jagged e Delta são ligantes para os receptores Notch, atando-se a estes que se encontram presos às membranas, os quais requerem íntimo contato

célula-célula e disparam a liberação citoplasmática do domínio de Notch que, subsequentemente funciona como um fator de transcrição no núcleo. A expressão de vários ligantes de Notch, incluindo Delta1 e Jagged-1 tem sido detectado nos dentes em desenvolvimento (MITSIADIS et al., 1997; MITSIADIS et al., 1998; MITSIADIS et al., 1995; MUSTONEN et al., 2002). Tendo sido a expressão de Notch-1, -2 e -3 detectada no epitélio dental desde o estágio inicial até o estágio final de diferenciação. Entretanto, a expressão desses genes *Notch* apresenta-se excluída da camada basal de células epiteliais que formam os ameloblastos. Assim sugere-se que os ameloblastos possam ser determinados muito inicialmente, no estágio de iniciação do dente e a ausência do gene *Notch* pode ser associada com esta determinação (MITSIADIS et al., 1995).

1.1.1.5 Aposição ou sino tardio

O órgão do esmalte é claramente separado da papila dental, as cúspides começam a se formar e as coroas aumentam. A altura de cada cúspide parece depender do tempo de aparição do correspondente nó do esmalte secundário (COIN et al., 1999; SALAZAR-CIUDAD et al., 2002).

Durante o estágio de sino tardio (Fig. 4 e 10) a coroa toma a sua forma final. As células mesenquimais ou odontoblastos, localizadas na borda da polpa dental, anexam-se à membrana basal do epitélio interno do esmalte e secretam a pré-dentina. Imediatamente após a deposição da pré-dentina, as células do epitélio interno do esmalte ou ameloblastos iniciando a síntese e deposição de pré-esmalte. Estas duas substâncias, pré-dentina e pré-esmalte, secretadas por duas diferentes populações celulares e mineralizadas por diferentes mecanismos, produzem a matriz do dente, como, por exemplo, através da aposição de cristais de hidroxiapatita na formação dos bastões de esmalte (SLAVKIN, 1991; LYNGSTADAAS et al., 1998; YOKOZEKI et al., 2003). As células do extrato intermediário auxiliam, consideravelmente, no processo de formação do esmalte e após a erupção dental transformam-se na camada basal do epitélio aderido pela habilidade adquirida para submeter-se à mitose. Neste estágio, a lâmina dental se desintegra, deixando o dente livre do epitélio (SLAVKIN, 1991; LYNGSTADAAS et al., 1998).



Figura 10 - Aposição ou sino tardio. Corte sagital. Dente humano. Os dentes exibem odontoblastos (od) e ameloblastos (am) polarizados, os quais elaboram dentina e esmalte, respectivamente. sr=retículo estrelado; dp=papila dental; ab=osso alveolar (Fonte: KATCHIBURIAN e ARANA, 2004).

1.1.1.6 Coroa ou calcificação

Nesta fase, os dentes adquirem sua forma final. Os odontoblastos produzem e secretam colágeno tipo I, o qual é o maior componente da pré-dentina. A pré-dentina é calcificada pela hidroxiapatita transformando-se em dentina, na presença de elevadas concentrações de tenascin e fosfatase alcalina. Após a excreção e a aposição da dentina, os ameloblastos iniciam a produção de pré-esmalte. No homem, quase que simultaneamente, conforme a pré-dentina e o pré-esmalte vão sendo depositados, os mesmos vão sendo mineralizados pela hidroxiapatita e originando a dentina e o esmalte, respectivamente (Fig. 11) (GOLDBERG et al., 1995). Em ratos e camundongos, primeiramente ocorre a deposição total da matriz do e somente após tem início a sua mineralização.

As células da polpa que fazem contato com a bainha epitelial de Hertwig (hers) (Fig. 11) são instruídas a diferenciarem-se em odontoblastos, os quais formarão a dentina da raiz. Então, a bainha epitelial de Hertwig se desintegra e as células do folículo dental diferenciam-se em cementoblastos. A aposição da dentina e do cimento radicular continua após a erupção dos dentes. A formação da raiz, em humanos, é, normalmente, completada dois a três anos após a erupção dental (MARKS e SCHROEDER, 1996).

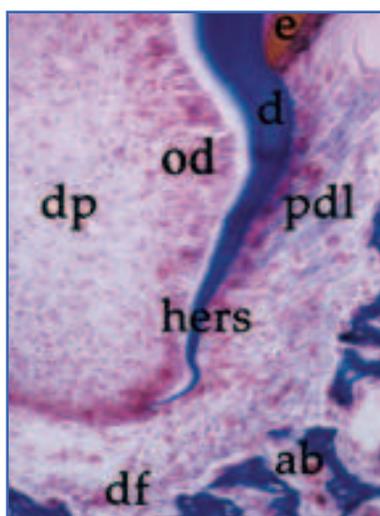


Figura 11 - Coroa ou calcificação. Corte sagital. Dente humano. Podem ser visualizadas estruturas rudimentares da raiz, chamadas de bainha epitelial de Hertwig (hers), osso alveolar (ab), folículo dental (df), tecidos do ligamento periodontal (pdl), odontoblastos polarizados (od) e camadas mineralizadas de dentina (d) e esmalte (e) (Fonte: modificado de KATCHIBURIAN e ARANA, 2004).

1.1.2 A amelogênese

Os eventos relacionados com a formação do esmalte ocorrem no interior do órgão do esmalte ou epitélio interno do esmalte. Nos dentes incisivos de ratos e camundongos, o esmalte, região de camadas celulares fortemente conectadas, apresenta-se na superfície vestibular e, geralmente, é dividida em três zonas: a de pré-secreção, a de secreção e a de maturação (LEBLOND e WARSHAWSKY, 1979). As células formadoras do esmalte ou ameloblastos apresentam numerosas mudanças morfológicas no início, durante e ao final do estágio de formação do esmalte (Fig. 12) (WARSHAWSKY e SMITH, 1974).

A zona de pré-secreção contém os ameloblastos pré-secretadores, células pobremente diferenciadas que não possuem atividade secretora. Na porção apical desta zona, referida como a região onde os ameloblastos recobrem a polpa, tais células originam um epitélio colunar com ativa capacidade de proliferação. Na porção mais incisal da zona, na região onde os ameloblastos margeiam a dentina, a divisão celular é cessada e a diferenciação progressiva é iniciada. Os ameloblastos mostram uma aparente migração na direção incisal (LEBLOND e WARSHAWSKY, 1979).

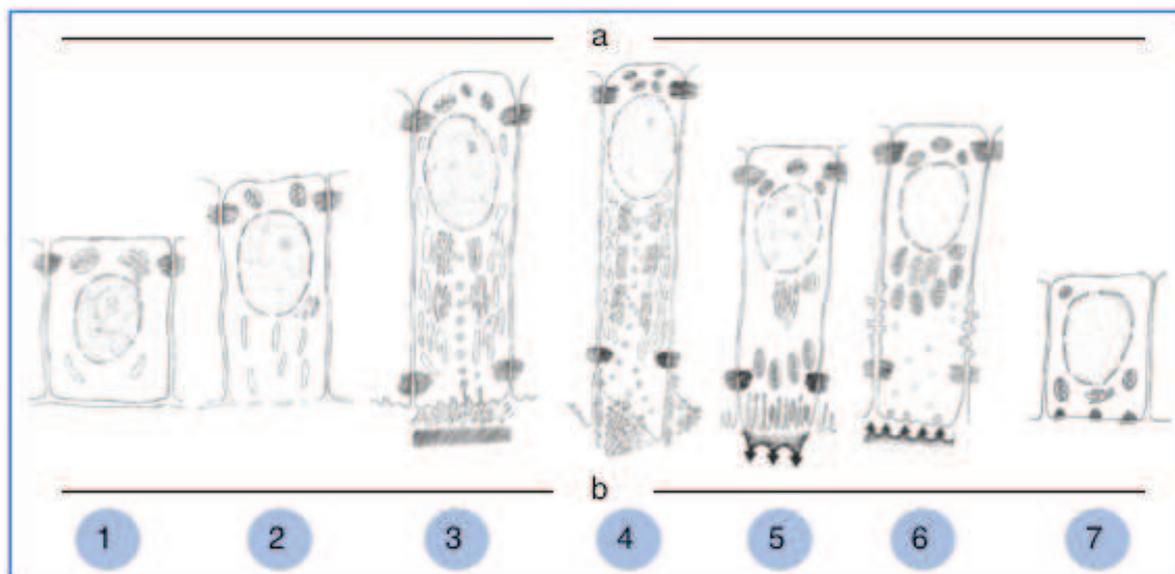


Figura 12 - Mudanças morfológicas ocorridas com os ameloblastos durante a amelogênese. 1-estágio morfogênético; 2-estágio indutivo; 3-estágio secretor inicial (ainda sem processo de Tomes); 4-estágio secretor (com o processo de Tomes); 5-estágio de maturação (ameloblasto com terminação rugosa); 6-estágio de maturação (ameloblasto com terminação lisa); 7-estágio protetor. a=região apical da célula; b=região basal da célula (Fonte: modificado de TEN CATE, 2001a).

Ameloblastos diferenciados, secretando matriz imatura de esmalte, caracterizam a zona de secreção. Quatro regiões, correspondendo às quatro camadas de esmalte produzidas, integram a zona de secreção, sendo denominadas de inicial, interna, externa e final (LEBLOND e WARSHAWSKY, 1979). A deposição da primeira matriz de esmalte inicia-se imediatamente após a primeira deposição de dentina e continua, conforme o ameloblasto vai se afastando da superfície dentinária, deixando para trás uma matriz proteica, na qual são embebidos os cristais minerais imaturos (ROBINSON et al., 1995). Esta matriz extracelular, a qual presume-se que permita o suporte mecânico, tão bem como provê informação estrutural para o desenvolvimento da fase mineral, também sofre alterações profundas durante o estágio secretor (ROBINSON et al., 1995). Nesta primeira matriz, os cristais de hidroxiapatita são muito menos uniformes em tamanho e forma (WARSHAWSKY, 1971). As células precisam de aproximadamente 6 dias para passarem pela região de secreção interna do esmalte e adquirir os processos de Tomes largos e sem corte (região basal celular onde são encontrados grânulos secretores e pequenas vesículas).

Na região de secreção externa do esmalte, os ameloblastos gastam em torno de 1,3 dias, enquanto os seus processos de Tomes tornam-se finos e longos. Após percorrerem a região de secreção final do esmalte, os amelobastos apresentam o retorno do processo de Tomes ao aspecto plano. Esta camada inicial possui, aproximadamente 4 μm de espessura, é localizada ao longo da dentina e a camada final (4 μm), eventualmente, chega à superfície livre de esmalte maduro. Entre estas duas camadas existe a camada interna (89 μm) e a externa (22 μm). Ambas são compostas por uma unidade tridimensional linear, os bastões ou prismas. Cada bastão inicia-se na junção da camada inicial com a interna, segue para fora destas camadas e, obliquamente, entra na camada externa onde segue um curso razoavelmente reto e termina na junção da camada externa com a camada final (Fig. 13) (WARSHAWSKY e SMITH, 1971; LEBLOND e WARSHAWSKY, 1979). O bastão possui em torno de 1,5 μm de largura e é composto de elementos (matriz orgânica e componente mineral, descritas a seguir) que correm paralelos ao longo do seu eixo. Ao longo de todo o seu comprimento, os bastões são separados dos seus vizinhos pelas porções interprismáticas ou interbastões, com 0,5 μm de largura, aproximadamente.

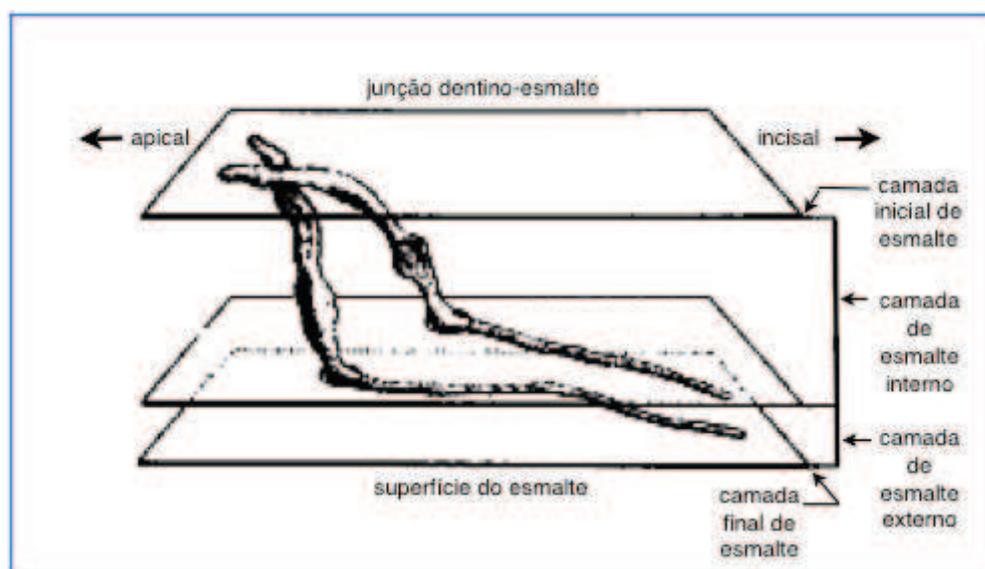


Figura 13 - Ilustração da relação dos bastões de esmalte com as fronteiras anatômicas do esmalte do dente incisivo superior de rato. O padrão é similar nos incisivos superiores e inferiores. Desta forma, a porção do bastão que apresenta-se na camada do esmalte interno inicia-se próxima à camada inicial do esmalte, a qual é adjacente à junção dentino-esmalte, prosseguindo incisalmente e de forma íngreme através da superfície do esmalte, em direção lateral ou mesial. A camada de esmalte externo prossegue incisalmente, no longo eixo do dente e inclina-se, gentilmente, através da superfície do esmalte, onde finaliza-se próximo à camada final do esmalte (Fonte: modificado de LEBLOND e WARSHAWSKY, 1979).

As porções interprismáticas são contínuas com as camadas iniciais e finais do esmalte, sendo compostas dos mesmos elementos que compõem os bastões, rodeando-os, intimamente, nas suas trajetórias (LEBLOND e WARSHAWSKY, 1979).

Seguindo a elaboração da camada inicial de esmalte, na zona de secreção, finos bastões estendem-se para formar as camadas interbastões, futuramente. Entre os finos bastões, ameloblastos secretores alongam-se nos processos de Tomes (Fig.14). Os processos de Tomes são rodeados por regiões divisórias e encontram-se dentro de depressões.

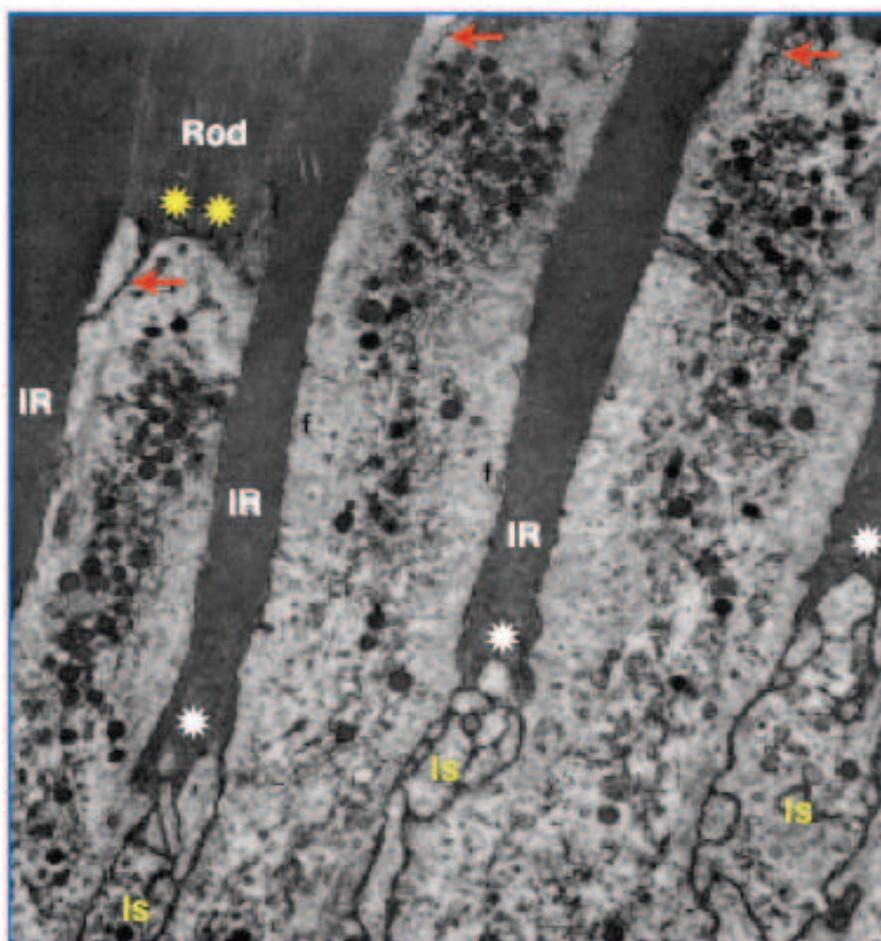


Figura 14 - Fileira de processos de Tomes durante a secreção de esmalte interno e matriz do esmalte associada. As setas vermelhas mostram as dobras na membrana plasmática, na extremidade distal dos ameloblastos, em contato com a matriz do esmalte. Os processos são separados pelas futuras regiões interbastões (IR). Na ponta da parte interna de cada dobra da membrana são vistas invasões, na parte superior das ilhas citoplasmáticas (Is). Os dois asteriscos amarelos sinalizam uma área de crescimento do bastão de esmalte. Os asteriscos brancos referem-se à matriz existente na ponta da futura porção interbastão, denominada de área de crescimento interbastão (Fonte: modificado de LEBLOND e WARSHAWSKY,1979).

As depressões ou poços são organizadas em fileiras, estendendo-se de mesial até o lado do incisivo inferior do rato. Os processos de Tomes que preenchem os poços de uma fileira são inclinados para mesial ou para lateral, enquanto que aqueles das fileiras adjacentes são inclinados na direção oposta (LEBLOND e WARSHAWSKY, 1979). O bastão ocupa o espaço entre as regiões interbastão. Cada bastão parece levantar-se do preenchimento de um poço (WARSHAWSKY, 1978).

A zona de maturação inicia-se com uma região de transição, onde ameloblastos gastam 0,8 dias, enquanto sua altura diminui e 1/4 morrem. No estágio transitório, quando os ameloblastos chegam no limite da superfície do esmalte, a secreção da matriz diminui e finalmente pára. A retirada de matriz, a qual teve início já durante o período de secreção, torna-se mais evidente, e a água que a repõe começa a aumentar dramaticamente, gerando extensiva porosidade no interior do tecido (ROBINSON et al., 1982). Durante o estágio de transição, na sua fase mineral, o crescimento dos cristais ocorre em alguma extensão nas camadas mais profundas do esmalte. Entretanto, a média do conteúdo mineral do tecido não é significativamente alterada e as mesmas camadas antigas de esmalte interno são mantidas até o estado maduro (ROBINSON et al., 1981b, 1982; ROBINSON e KIRKHAM, 1984). A natureza química, particularmente no que diz respeito ao magnésio e ao flúor, tem sido mostrada ser seletivamente adquirida pelo esmalte durante o estágio de transição (HILLER et al., 1975; ROBINSON et al., 1981c; ROBINSON e KIRKHAM, 1984; AOBA e MORENO, 1990).

Ainda no estágio de transição da fase mineral, a matriz exhibe evidências consideráveis de degradação, mostrando um aumento evidente na proporção de componentes com baixo peso molecular (ROBINSON et al., 1982). Muito deste material relaciona-se a produtos de degradação das amelogeninas, mas a degradação de não amelogeninas ricas em prolina também pode gerar fragmentos de baixo peso molecular. Igualmente presentes durante a transição, são enzimas capazes não apenas de gerar produtos com discreta avaria, mas também de degradar, completamente, componentes da matriz (ROBINSON et al., 1995). Ao final do estágio de transição, segue, diretamente, o estágio de maturação do desenvolvimento do esmalte (ROBINSON e KIRKHAM, 1985).

Os ameloblastos reverterem a sua morfologia e a superfície distal perde o aspecto plissado, tornando-se lisa e reduzida (WARSHAWSKY e SMITH, 1974; JOSEPHSEN e FEJERSKOV, 1977; LEBLOND e WARSHAWSKY, 1979). A estrutura interna dos ameloblastos é totalmente reorganizada e em muitas espécies o comprimento celular diminui cerca de 50% (SMITH e WARSHAWSKY, 1975; ROBINSON et al., 1981a).

Iniciando-se a fase de mineralização, a qual possui característica mais ácida do que as subsequentes, sugere-se que o fosfato octacálcio ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), hidroliza a apatita ou adquire um sobrecrecimento, semelhante à apatita. A grande similaridade da estrutura deste cristal com a da apatita oferece a possibilidade de um sobrecrecimento quase isomorfo (BROWN et al., 1962; BROWN, 1966). Concentrações relativamente altas de magnésio e carbonato têm sido mostradas no início da formação do esmalte, próximo à superfície da dentina (HILLER et al., 1975; AOBA e MORENO, 1990).

O conteúdo mineral total do esmalte dispara no início da maturação (ROBINSON et al., 1982; ROBINSON et al., 1984). Este aumento continua até valores característicos do esmalte maduro, aproximadamente 80-90% de mineral por volume, mostrando também que o esmalte não mineraliza homogeneamente. Em regiões que apresentam o esmalte mais espesso, os tecidos internos, frequentemente, apresentam-se menos mineralizados que os tecidos externos (ROBINSON et al., 1995). A apreensão seletiva de fluoreto e magnésio atinge o máximo no início da maturação. Depois disso, ocorre um decréscimo na direção do tecido maduro (HILLER et al., 1975; WEATHERELL et al., 1975, 1977; ROBINSON et al., 1984). O fluoreto como um substituto da estrutura da apatita é diferentemente perdido, uma vez que possui uma maior estabilidade no mineral do esmalte (ROBINSON et al., 1995). No entanto, a preferência pelo carbonato e pelo magnésio neste estágio de desenvolvimento inicial pode estar relacionado às fases menos ordenadas e mais capazes de incluir materiais estranhos e/ou a superfície relativamente grande para a razão da massa dos cristais jovens. Carbonatoapatitas são bem conhecidas nos tecidos esqueléticos e apresentam o carbonato ocupando sítios de fosfato ou sítios hidroxila (REY et al., 1991).

Durante esta fase de maturação as células reabsorvem água da maior parte da matriz orgânica. Simultaneamente, a mineralização é

continuada pelo crescimento dos cristais, que crescem em espessura, mas geralmente permanecem com o comprimento e a largura sem alteração (FRANK et al., 1960). Os ameloblastos elaboram um pigmento alaranjado, rico em ferritina, que é depositado internamente na camada superficial do esmalte, chamada região de pigmentação (RISNES et al., 1996).

No final da zona de maturação, os ameloblastos tornam-se muito reduzidos em altura e terminam seu ciclo de vida descamando-se ao redor da margem gengival, no início da porção dental de erupção (LEBLOND e WARSHAWSKY, 1979).

1.1.2.1 O controle genético e molecular da mineralização do esmalte

Nos dentes incisivos de ratos, a onda de histodiferenciação espalha-se a partir da dentina, a uma velocidade de 0,5 mm/dia, cerca de 151.000 novos ameloblastos iniciam a formação de esmalte, diariamente. Nestes animais, o crescimento aposicional diário do esmalte é muito maior que em humanos, cerca de 13,5 μm (em ratos) contra 4 μm (em humanos) (SMITH, 1998).

Durante as fases de formação do esmalte, os ameloblastos liberam uma intrincada seleção de proteínas da matriz extracelular, otimizada para promover o desenvolvimento de uma fase mineral próxima a região celular (DEUTSCH et al., 1995a). Isto engloba a deposição do mineral, a modulação da sua morfologia, assim como a distribuição química e arquitetural no tecido. Muitas destas proteínas, que compreendem a matriz extracelular orgânica, são únicas no esmalte e os maiores produtos secretados pelos ameloblastos incluem cinco categorias principais de proteínas, as amelogeninas (AMEL), as ameloblastinas (AMBN), as enamelinas (ENAM), as amelotinas (AMTN) e as proteínas odontogênicas associadas com o ameloblasto (ODAM), assim como enzimas processadoras e degradadoras, também conhecidas como proteinases (por exemplo, as metaloproteinases e a serinaproteinase) (ROBINSON et al., 1995; SMITH, 1998; LLANO et al., 1997; SIMMER et al., 1998; IWASAKI et al., 2005; KESTLER et al., 2008). A análise evolutiva dos cinco principais genes mostrou que eles são relacionados e desta forma a AMEL deriva-se da AMBN, a AMTN e ODAM são genes irmãos e todos derivam da ENAM (SIRE et al., 2007).

As amelogeninas (AMEL), nome dado por Eastoe (1965), e seus produtos de processamento, representam a proteína da matriz extracelular mais abundante durante o desenvolvimento do esmalte dental, sendo encontradas em vertebrados superiores e em dentes de anfíbios adultos (HEROLD et al., 1989). Ricas em prolina, glutamina, leucina e histidina (TERMINE et al., 1980), mostram-se críticas reguladoras dos cristalitos de esmalte (SMITH, 1998; FINCHAM et al., 1995; SIMMER e FINCHAM, 1995). Primeiramente evidenciadas nos ameloblastos pré-secretoras (EASTOE, 1965; EGGERT et al., 1973), podem ser observadas intactas e/ou em fragmentos, quando é iniciada a ativação da deposição da camada de esmalte ou por toda a camada de esmalte em formação, mas apresentam-se menos abundantes nos sítios de esmalte em crescimento. Todos os grânulos que contém amelogenina, também contém ameloblastina (NANCI et al., 1998; YAN et al., 2006; ZALZAL et al., 2008).

A amelogenina está envolvida na regulação de agregados supramoleculares, também chamados de nanoesferas (Fig.15). Por toda a camada de esmalte em formação, estas nanoesferas preenchem os espaços existentes entre os cristais de apatita e podem, ainda, determinar a organização espacial destes últimos (FINCHAM et al., 1995; MORADIAN-OLDAK, 2001; MORADIAN-OLDAK et al., 2000; PAINE et al., 2001; FINCHAM et al., 1994).

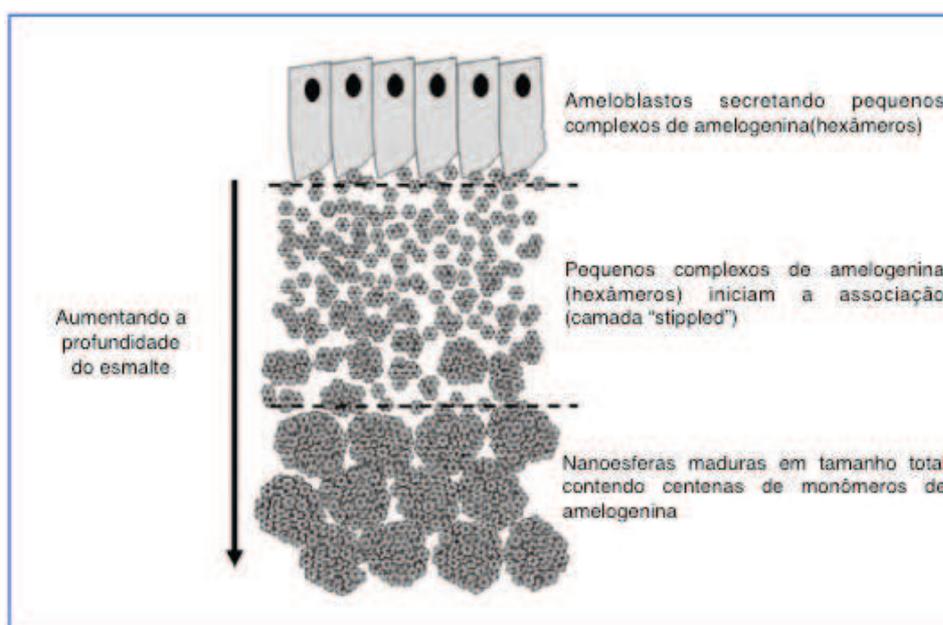


Figura 15 - Ilustração mostrando um modelo proposto para a reunião das nanoesferas. Pequenos complexos pré-fabricados de amelogenina (hexâmeros) são secretados pelos ameloblastos, que depois reúnem-se na matriz extracelular para formar nanoesferas maduras, em tamanho total, contendo centenas de monômeros de amelogenina (Fonte: modificado de BROOKES et al., 2006).

O mapeamento preciso do gene da amelogenina humana (AMG), na região p22 do cromossomo X, e o homólogo (AMGL), no cromossomo Y, foram reportados (SCHAEFER et al., 1993; FOOTE et al., 1992). Com respeito à amelogenina de camundongo, Chapman et al. (1991) analisaram o “locus” no cromossomo X e o gene da amelogenina foi localizado no “locus” mais distal, no mapa genético. Apenas um “locus” do gene amelogenina reside no cromossomo X, em ratos e camundongos (SASAKI e SHIMOKAWA, 1995). Os genes da amelogenina também podem explicar a discrepância quanto ao tamanho dos dentes, dependendo do sexo. Em humanos, os dentes dos machos são, geralmente, maiores que os dentes das fêmeas. Esta discrepância pode ser explicada pela diferença entre os genes da amelogenina humana nos cromossomos X e Y. No caso dos camundongos, os molares dos machos são menores que os molares das fêmeas. Entretanto, foi concluído que molares menores em camundongos machos estão relacionados mais com fatores hormonais que com fatores cromossômiais (BLECHER, 1992).

Ravindranath et al. (2001), documentaram a interação específica entre citoqueratina 14 (CK14) e amelogeninas. O papel funcional de CK14 pode ser similar a proteínas “heat shock”, no sentido de ligarem-se a peptídeos nascentes e carregá-los para a superfície celular. A observação destes autores revelou que o peptídeo “motif” da amelogenina “trityrosil” (ATMP) na região N-terminal da amelogenina funciona como um peptídeo sinalizador para o ligante N-acetil glucosamina - imitador de peptídeo (GMP) de CK14 e este pode executar um papel chaperona durante a amelogênese (Fig. 16).

Apesar da grande expressão, a amelogenina não deve ser usada como um marcador específico para os ameloblastos. Recentes estudos mostraram que os odontoblastos também expressam a amelogenina, apesar de ser em um padrão altamente restrito, dependente do desenvolvimento e associado à formação inicial da dentina do manto (OIDA et al., 2002; PAPAGERAKIS et al., 2003; DEUTSCH et al., 2006).

A ameloblastina (AMBN), reportada por Krebsbach et al., em 1996, foi observada em ameloblastos de dentes incisivos de ratos e expressando-se durante a diferenciação do epitélio interno do esmalte, com intensa localização nos processos de Tomes dos ameloblastos secretores. Esta proteína

ácida foi vista em modestas quantidades na matriz do esmalte e os mais abundantes aminoácidos encontrados foram prolina (Pro), glicina (Gly) e leucina (Leu).

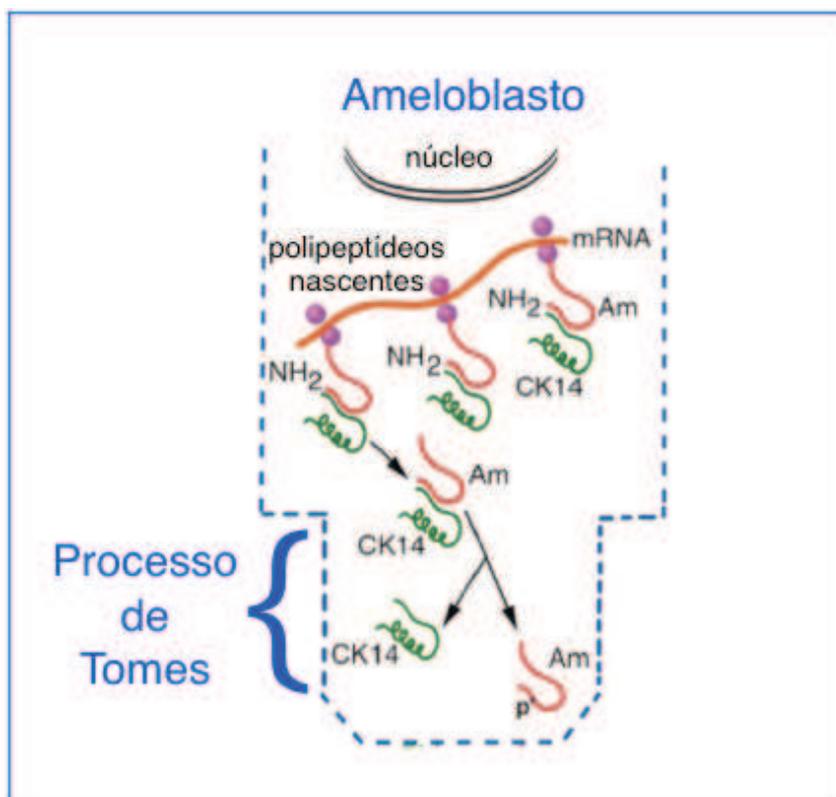


Figura 16 - Esquema do papel funcional putativo para o CK14 na amelogenese. CK14 ata-se ao “motif” ATMP da região N-terminal do polipeptídeo nascente da amelogenina (Am), na região perinuclear. O “motif” ATMP serve como um peptídeo sinalizador. O “motif” GMp na região N-terminal de CK14 atua como um ligante para ligar-se ao peptídeo sinalizador e formar uma co-reunião. O conjunto amelogenina-CK14 migra para o processo de Tomes, onde ocorre o colapso desta união, resultando na liberação da amelogenina. A fosforilação (P) no resíduo serina da amelogenina sugere que esta pode facilitar a dissociação da amelogenina do CK14 (Fonte: modificado de RAVINDRANATH et al., 2001).

No dente incisivo inferior de rato, marcações difusas da AMBN foram vistas na camada superficial do esmalte, próximo dos ameloblastos maduros, uma região composta, principalmente, por matriz de esmalte homogênea. Imunomarcações positivas e irregulares foram também observadas na junção dentino-esmalte (KREBSBACH et al., 1996). O padrão linear da expressão de mRNA ameloblastina, restrito ao epitélio interno do esmalte, é similar ao mostrado pela amelogenina, porém o mRNA AMBN é distribuído mais apicalmente e mais

incisalmente que o mRNA AMEL. Em dentes humanos, revelou-se uma expressão particularmente intensa de mRNA AMBN nas regiões cuspídeas dos germes dentários, quando encontravam-se no estágio inicial de sino. A zona de ameloblastos secretores mostrou-se fortemente marcada, enquanto a zona epitelial de esmalte imaturo mostrou-se negativa. Marcação similar foi encontrada na região cervical do estágio tardio de sino, onde os ameloblastos secretores do estágio inicial iniciam a produção de matriz de esmalte (LEE ET AL., 1996).

Quanto às enamelinas ácidas (ENAM), estas apresentam uma quantidade relativamente baixa na matriz proteica do esmalte, em desenvolvimento (BELCOURT et al., 1982; HU e YAMAKOSHI, 2003), sendo ricas em ácido glutâmico, ácido aspártico, serina e glicina (TERMINE et al., 1980; FUKAE e TANABE, 1987; HU et al., 2005). Compreendem ainda proteínas relacionadas com os tufo de esmalte (tufelina) (WEATHERELL et al., 1968; ROBINSON et al., 1975; DEUTSCH et al., 1991) e certas proteínas do soro, especialmente a albumina (LIMEBACK et al., 1989; STRAWICH e GLIMCHER, 1990).

A natureza ácida das proteínas enamelinas condiz com a habilidade de ligarem-se à superfície fina, alongada e em crescimento dos cristaltos minerais do esmalte. Possuem um papel específico e crucial no controle da nucleação, formação do mineral do cristal e do crescimento do cristal (DEUTSCH et al., 1995; MASUYA et al., 2005). As enamelinas secretadas, persistem por todos os estágios de formação e maturação do desenvolvimento e estão presentes como parte das proteínas do esmalte maduro, frequentemente, referida como proteínas tufo (PAULSON, 1981). Alguns componentes das proteínas tufo são secretadas nos estágios iniciais da amelogênese (ROBINSON et al., 1989).

A tufelina, rica em ácido glutâmico e ácido aspártico (DEUTSCH et al., 1991; 1994), secretada durante os estágios iniciais da formação do esmalte permanece por todo o desenvolvimento do esmalte e é encontrada, provavelmente, em uma forma parcialmente degradada, no tecido maduro (ROBINSON et al., 1975; DEUTSCH et al., 1989; 1995). No entanto, a distribuição de tufelina pelo esmalte apresentou-se mais concentrada na região da junção dentina-esmalte. No ameloblasto, a tufelina foi localizada no retículo endoplasmático rugoso e em vesículas e grânulos secretados, concentrados nos processos de Tomes. Na matriz extracelular, a tufelina mostrou-se presente, principalmente, nas

regiões próximas aos cristalitos (DEUTSCH et al., 1995). Zeichner-David et al. (1993), utilizando sondas específicas para tufelina, na realização de PCR e “Northern blot”, mostraram que a tufelina também foi localizada nos ameloblastos de camundongo e é expressa desde o início da formação do esmalte até a sua maturação.

A presença de uma concentração relativamente alta da proteína enamelinina ácida na área da junção dentina-esmalte, em estágios muito iniciais do desenvolvimento (SLAVKIN et al., 1988; TERMINE et al., 1980; BELCOURT et al., 1982; DEUTSCH et al., 1984, 1986, 1987, 1989; SHIMOKAWA et al., 1984; MASUYA et al., 2005), sugere que algumas das proteínas enamelinina devem estar associadas com a mineralização de regiões de esmalte hipermineralizadas, adjacentes à junção dentina-esmalte, presente no início da formação do esmalte de todas as espécies (SUGA, 1982), criando, assim, uma mineralização frente ao esmalte (DEUTSCH et al., 1991). Desta forma, enamelininas ácidas atariam-se às fibras colágenas da dentina subjacente e esta interação química promoveria a nucleação dos cristais de esmalte (ARSENAULT e ROBINSON, 1989).

Os genes *AMTN* de camundongo e humano, mostraram uma estrutura similar exon-intron e foram expressos nos cromossomos 5 e 4, respectivamente, localizando-se imediatamente próximos aos genes *AMBN* e *ENAM*. Em ambas as espécies, a proteína é particularmente rica em prolina, leucina, glutamina e treonina. A expressão de mRNA *AMTN*, em camundongo, foi restrita aos ameloblastos no estágio de maturação, em molares em desenvolvimento. Nos incisivos de crescimento contínuo, a expressão de amelotina é aumentada, transitando dos ameloblastos no estágio secretor ao estágio de maturação. Tal expressão é mantida durante o estágio de maturação e, gradualmente, declina-se através da zona de ameloblastos reduzidos. A *AMTN* também foi observada na junção epitelial (IWASAKI et al., 2005; MOFFATT et al., 2006).

A proteína odontogênica associada com o ameloblasto (*ODAM*) é formalmente denominada *APin* devido ao fato de ter sido, originalmente, isolada em tumores amilóides odontogênicos de Pindborg, chamados *Apin*. Esta proteína contém uma fosfoproteína secretora que se liga ao cálcio, sendo específica de elementos envolvidos no desenvolvimento de dentes e ossos, assim como na

mineralização destes (KAWASAKI e WEISS, 2003). Nos incisivos de roedores, particularmente, ODAM foi detectada somente nos ameloblastos presentes no órgão do esmalte, iniciando na transição pós-secretora e estendendo-se por todo o estágio de maturação. Em roedores, adicionalmente, também foi localizada nas células da junção epitelial (PARK et al., 2007; MOFFATT et al., 2008; KESTLER et al., 2008).

As proteinases da matriz do esmalte auxiliam na regulação do desenvolvimento do esmalte, processando, rapidamente, as proteínas removidas, antes da maturação do esmalte. Entre as proteinases podemos citar: a matriz metaloproteinase-20 (MMP-20, enamelinina) (Fig.17) e a kallikreina-4[KLK-4, proteinase serina da matriz do esmalte-1(EMSP-1)], degradadoras das amelogeninas (LLANO et al., 1997).

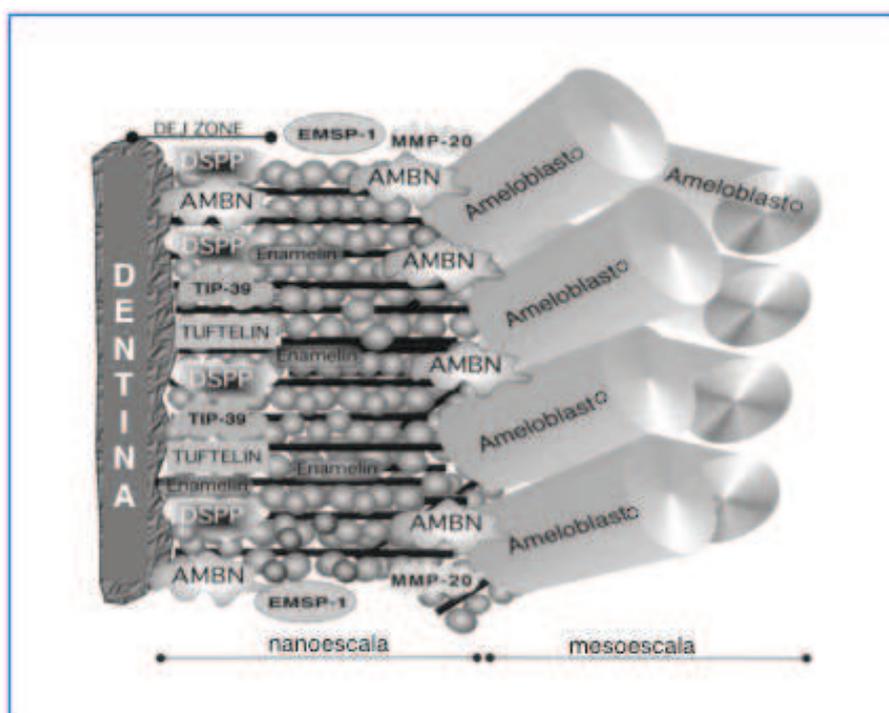


Figura 17 - A criação do esmalte especializado a partir da junção dentina esmalte (DEJ). Ameloblastos transitórios expressam proteínas que são atípicas àquelas proteínas expressas durante a criação da maior parte do esmalte. Durante um curto período no desenvolvimento, genes comumente expressos exclusivamente pelos odontoblastos ou ameloblastos são expressos pelas células derivadas da camada germinativa oposta. Esta mistura única altera as propriedades de auto-reunião da fita de proteínas da matriz extracelular do esmalte. Esta composição não usual das proteínas transmite propriedades físicas desiguais ao esmalte especializado da DEJ servindo para unir o esmalte e a dentina em um órgão/dispositivo unificado. Uma escala é sugerida abaixo das regiões da formação do esmalte para identificar os eventos da nanoescala (proteína/cristalitos) diferenciando-os dos eventos da mesoescala (célula). AMBN=ameloblastina; DEJ ZONE= área da junção dentina esmalte; DSPP=sialofósforoproteína dentinária; EMSP-1=protease serina 1 da matriz do esmalte; Enamelin=enamelina; MMP-20=matriz metaloproteinase-20; TIP-39=proteína de 39-kDa que interage com a tufelina; TUFTELIN=tufelina (Fonte: modificado de PAINE et al., 2001).

Após a secreção de MMP-20, no início do estágio secretor da formação do esmalte, ocorre uma elevada regulação da proteinase serina KLK-4, com a progressão da diferenciação do ameloblasto (FUKAE et al., 1998; HU et al., 2002).

Em primeiros molares maxilares de camundongos, o sinal para enamelinina foi primeiramente detectado em pré-ameloblastos e ameloblastos, mas não nos ameloblastos cobrindo zonas livres de esmalte. Após o declínio do sinal nos ameloblastos, a enamelinina persiste na polpa dental. KLK-4, em contraste, foi primeiramente detectada na polpa dental, depois nos ameloblastos que cobrem a zona livre de esmalte e, em seguida, o sinal de KLK-4 apresentou-se nos ameloblastos existentes no estágio de maturação. De acordo com Hu et al. (2002), as expressões de KLK-4 e MMP-20, pelos ameloblastos de molares de camundongos, é complementar e dependente do estágio de desenvolvimento do esmalte.

Além dessas proteínas, o fator de ativação de transcrição-2 (ATF2), um dos substratos de p38 e JNK (“c-Jun N-terminal kinase”), foi detectado em ameloblastos pré-secretorios e secretorios (NISHIKAWA, 2004). Durante os estágios de secreção e maturação dos ameloblastos observou-se formas fosforiladas de p38, JNK e ERK (“extracellular signal-regulated kinase”), sugerindo que a via de sinalização de MAPK (“mitogen-activated protein kinase”) possui importante papel na amelogênese (ABE et al., 2007).

Paiva et al. (2009), avaliando o padrão da expressão de RECK (“Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs”) em incisivos de rato em crescimento, encontraram uma expressão diferenciada para RECK e MMPs -2 e -9. Em ameloblastos da fase secretora, RECK foi localizada abaixo do núcleo de tais células, assim como próximas a vasos sanguíneos e no retículo estrelado. Da fase de transição para a fase de maturação, a expressão de RECK é aumentada, sendo encontrada durante todas as fases da amelogênese.

1.1.3 O complexo estrutural do esmalte dental maduro

De acordo com Robinson et al., 2004, no corpo de animais dentados, o esmalte (Fig. 18) é um tecido denominado de biocompósito duro nanoestruturado, formando a camada externa do dente, visível na cavidade oral,

oferecendo proteção contra danos mecânicos durante a função mastigatória e participando ativamente da formação do bolo alimentar.



Figura 18 - O esmalte (área branca dos dentes) é o tecido dental responsável pela cobertura da coroa dos dentes (Fonte: imagem de acervo fotográfico clínico do autor).

O esmalte organiza-se de maneira única. Apresenta bastões finos e longos, dispostos paralelamente e formando um intrincado padrão tridimensional. A maior parte do material inorgânico do esmalte dental, é composta de hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (WARSHAWSKY e SMITH, 1971). Os pequenos cristais de hidroxiapatita que formam a estrutura do esmalte dental são fortemente empacotados, consistindo em mais de 87% do volume e em torno de 95% do peso do esmalte (BRUDEVOLD e SÖREMARK, 1967).

Durante o desenvolvimento do esmalte humano e do rato, os cristais do esmalte tornam-se hexágonos alongados, apresentando-se distorcidos no esmalte mais maduro, quando o crescimento de um cristal afeta o crescimento do outro. Na figura 19, a fatia “A” é usada para designar o desenvolvimento do esmalte, da nucleação do cristal até os cristais de esmalte jovens. A fatia “B” refere-se a cristais existentes no esmalte em uma área de transição de ameloblastos secretores a ameloblastos absorptivos. No nível “C” observa-se cristais existentes na região de esmalte maduro, onde o dente erupciona. Em “D”, são observados cristais existentes no esmalte maduro, em uma região mais incisal (Fig. 19 e Fig. 20) (SIMMELINK e ABRIGO, 1989). A complexa estrutura tridimensional do esmalte do incisivo do rato é estabelecida na interface entre os ameloblastos secretores e o esmalte formado, apresentando-se bastante fina, em torno de 100-140 μm de

espessura, sendo maturada pelos ameloblastos, principalmente, após a matriz de esmalte ser depositada em toda a sua espessura (SMITH e WARSHAWSKY, 1975a; RISNES et al., 2002).

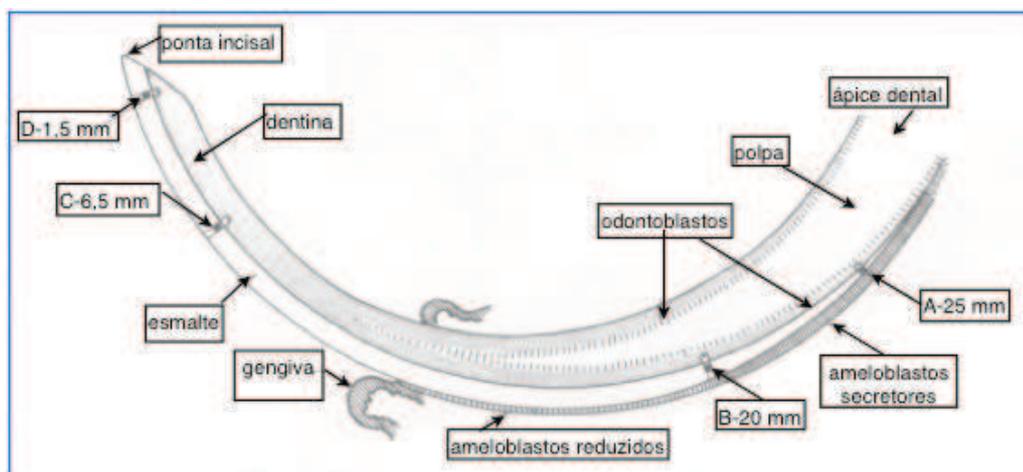


Figura 19 - Desenho esquemático do dente incisivo de rato com erupção contínua, mostrando áreas de esmalte em desenvolvimento e maduras. A, B, C e D representam as áreas de onde foram retiradas fatias para a avaliação dos cristais, mostrados na figura 20 (Fonte: modificado de SIMMELINK e ABRIGO, 1989).

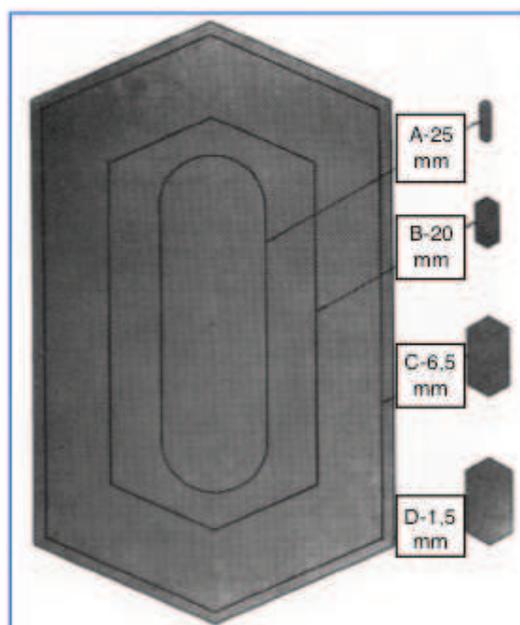


Figura 20 - A ilustração compara, nos cortes transversais, o tamanho e a forma dos cristais do esmalte. A média das espessuras dos cristais foram de 10,5 nm (fatia A), 19,6 nm (fatia B), 32,8 nm (fatia C) e 34,2 nm (fatia D) (Fonte: modificado de SIMMELINK e ABRIGO, 1989).

Os bastões de esmalte originam-se poucos micrômetros a frente da junção dentino-esmalte (JDE), uma vez que a camada justaposta à JDE apresenta ausência dos prismas ou bastões. Semelhantemente, a camada mais externa do esmalte também é aprismática, ou seja, também apresenta ausência de prismas ou bastões (Fig. 21) (RISNES, 1998). Silva, em 2003, observando o esmalte do dente incisivo de rato, em um corte longitudinal, aponta a existência de três nítidas camadas. A camada mais interna, denominada de camada de esmalte interno, é a mais espessa das camadas e apresenta um padrão de entrecruzamento em fileiras simples (Fig. 22), adjacentes, oblíquas e com os bastões inclinados transversalmente em direções opostas. A camada intermediária, designada como a camada de esmalte externo, possui os bastões paralelos a superfície vestibular e seguindo na direção incisal. A camada mais externa do esmalte do incisivo de rato é chamada de camada de esmalte aprismático (Fig. 23). Comparativamente aos dentes do rato, o curso dos bastões ou prismas, nos dentes de humanos, da junção amelodentinária para a superfície do esmalte, mostra-se curvado, em forma de “S” (Fig. 24). Além disso, os bastões, nos dentes humanos, são bem mais espessos, possuem de 1 a 2 mm e formam-se durante um período muito maior, de 12 a 24 meses (RISNES, 1990). Tanto na JDE como próximo à superfície do esmalte, os prismas possuem uma orientação menos regular (SCOTT e SYMON, 1971).

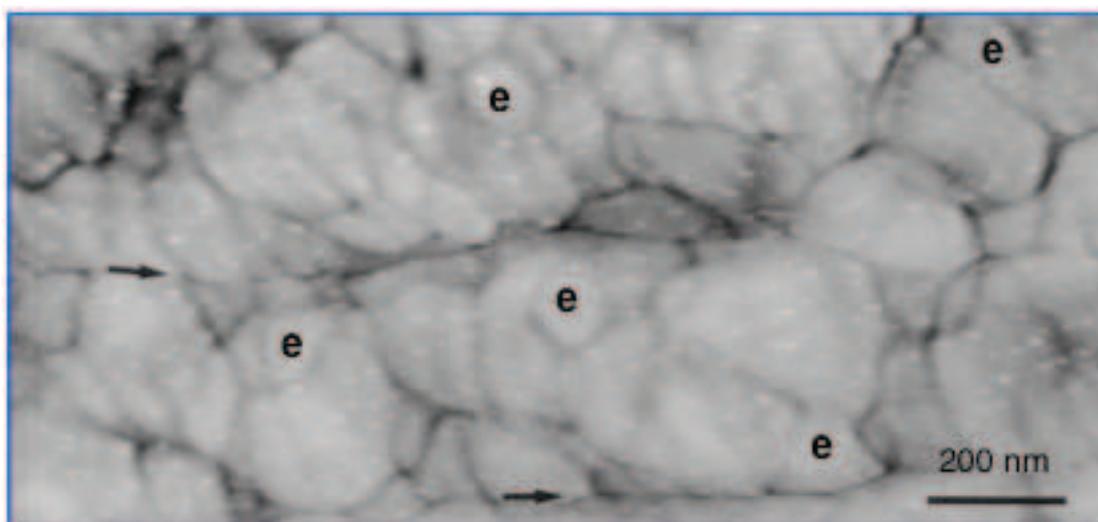


Figura 21 - Imagem de microscopia de força atômica da superfície labial (esmalte) do dente terceiro molar humano, limpo com solução de NaOCl. Vê-se agregados de partículas (esmalte=e) com dimensões variadas. Duas linhas escuras são observadas, representando possíveis microfraturas (setas). As partículas estão em íntimo contato (Fonte: FARINA et al., 1999).

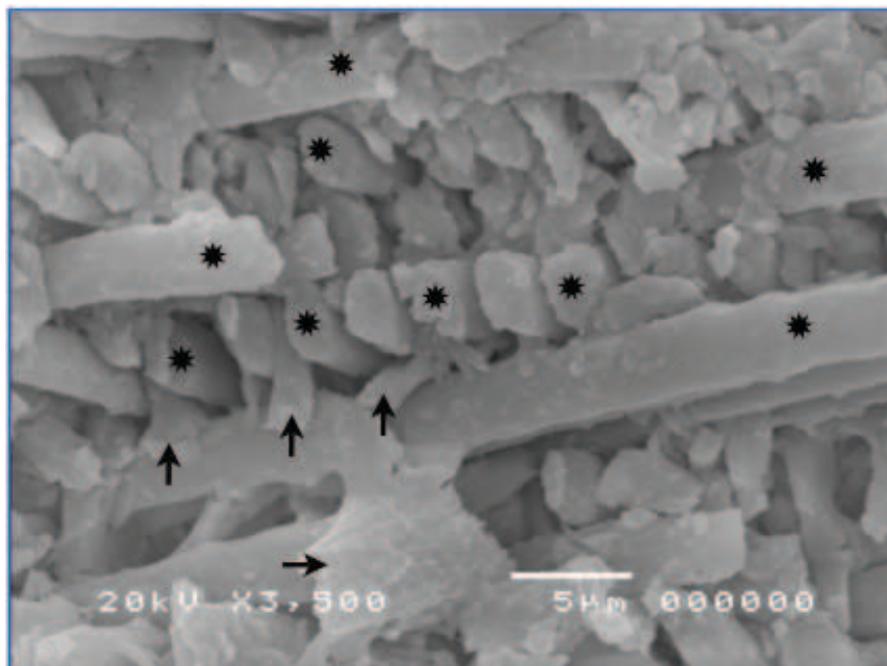


Figura 22 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando detalhe do entrecruzamento dos bastões de esmalte na camada de esmalte interno. Bastões de esmalte (asteriscos pretos) e substância interbastões (setas pretas), do dente incisivo inferior de rato Wistar. Barra=5µm (Fonte: dados próprios - Laboratório de Biomineralização - ICB - CCS - UFRJ).

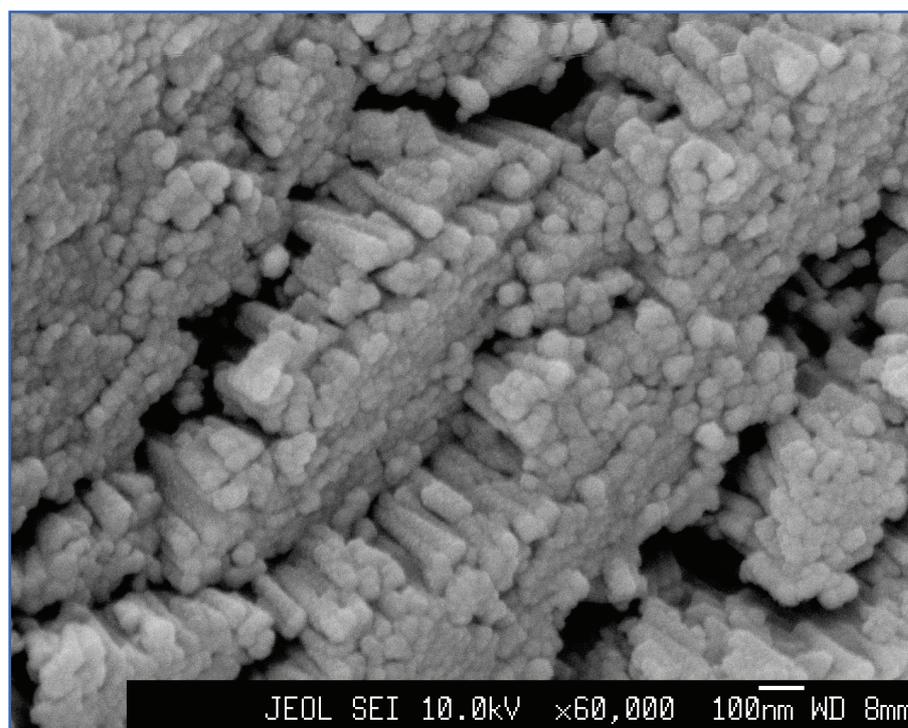


Figura 23 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando o esmalte aprismático (Fonte: ANEXO II - artigo científico a ser submetido - detalhe na figura 7; Laboratório de Biomineralização - ICB - CCS - UFRJ).

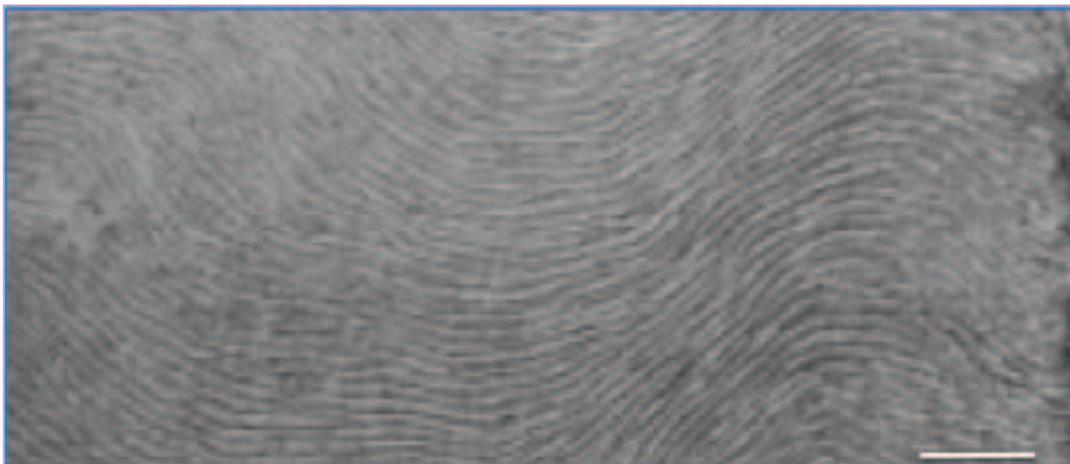


Figura 24 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando a ondulação dos prismas nos 2/3 do esmalte humano interno, plano transversal, atacado com ácido nítrico 1%, por 15 segundos. Bar=50 μ m (Fonte: RISNES, 1998).

1.1.4 O dente incisivo inferior do rato

Os ratos, como os camundongos, somente desenvolvem duas formas diferentes de dentes, três molares proximalmente e um incisivo distalmente em cada lado dos arcos dentários. Na região do arco, onde os humanos desenvolvem os caninos e pré-molares, entre incisivos e molares, uma região desprovida de dentes, nos ratos e camundongos, é chamada de diastema (MILETICH e SHARPE, 2003).

Os incisivos de roedores representam um tipo especial de dente (Fig.25), crescendo continuamente durante a vida do animal. Todos os estágios da formação do dente, incluindo a amelogênese e a dentinogênese podem ser analisadas quando observamos o dente da extremidade apical até a sua ponta incisal. Esta característica faz deste um modelo ideal para o estudo da formação do esmalte, o qual ocorre em vários estágios distintos ao longo do eixo do dente (PINDBORG e WEINMANN, 1959; SMITH e WARSHAWSKY, 1975a; SMITH e WARSHAWSKY, 1976; LEBLOND e WARSHAWSKY, 1979; OHSHIMA et al., 2005; HARADA e OHSHIMA, 2004). À 30 μ m do final apical do epitélio, as características morfológicas são similares àquelas do estágio inicial de botão do germe de um dente molar. O retículo estrelado aparece, claramente, na massa epitelial; a 90 μ m o epitélio possui características morfológicas similares do estágio final de botão. Quando cortado incisalmente, em 120-180 μ m, a forma do epitélio mostra uma forma

parecida com capuz; em 210-300 μ m, uma forma parecida com sino. Em torno de 500 μ m do final apical, quando cortado mais incisalmente, as bainhas radiculares epiteliais de Hertwig (hers), mesial e lateral, podem ser vistas alongando-se através do lado lingual e, finalmente, circundando totalmente a polpa, há aproximadamente 600 μ m (HARADA e OHSHIMA, 2004).

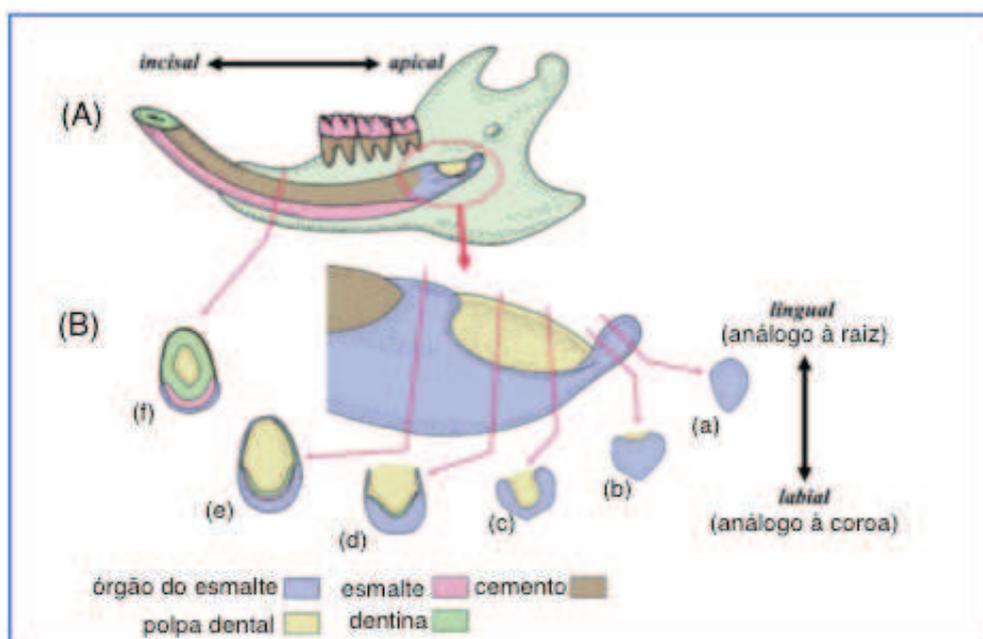


Figura 25 - (A) Desenho esquemático do dente incisivo inferior de rato em uma perspectiva longitudinal. (B) Os cortes transversais exemplificam a transição morfológica de apical até incisal: (a) região correspondente à fase de botão em um dente de crescimento não-contínuo; (b) região correspondente à fase do capuz; (c) região correspondente à fase do sino; (d) região correspondente à fase de coroa; (e) bainha epiteliais radiculares de Hertwig circula completamente a polpa dentária; (f) formação completa de todos os tecidos do dente (Fonte: modificado de OHSHIMA et al., 2005).

1.1.4.1 O mecanismo molecular existente no nicho de célula tronco, em dente com crescimento contínuo

Em dentes com crescimento contínuo, o botão apical e o mesênquima ao redor mostram um padrão de expressão gênica diferente dos dentes que não apresentam crescimento contínuo (HARADA et al., 1999).

Genes ou proteínas expressos durante o desenvolvimento do órgão do esmalte, podem servir como indicadores da progressão da diferenciação celular do epitélio dental. Todas as camadas do órgão do esmalte do incisivo de ratos jovens mostraram reação positiva quando incubados com anticorpo

anti-citoqueratina 1 (anti-CK1), que reage mais especificamente com todas as células epiteliais do laço cervical, e não reconhece outros tipos celulares encontrados na região apical (SMITH et al., 1990; FARGES et al., 1991). A citoqueratina 14 (CK14) apresenta expressão apenas no epitélio dental e não no mesênquima do germe do dente ou nos tecidos ao redor (TABATA et al., 1996). Já o receptor p75 do fator de crescimento neural (p75NGFR) é distribuído apenas no epitélio interno do esmalte (MITSIADIS et al., 1992; MITSIADIS et al., 1993; LUUKKO et al., 1996), enquanto que o mRNA de Notch2 é expresso tanto no retículo estrelado como no epitélio externo do esmalte (HARADA et al., 1999).

A via de sinalização de Notch é evolutivamente conservada como um mecanismo de interação transmembranoso célula-célula (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 1991; ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 1995; LEWIS, 1998; HOGAN, 1999). A expressão de mRNA de Notch 1 foi mostrada, de maneira especialmente forte, no retículo estrelado e epitélio basal, faceando a membrana basal (HARADA et al., 1999; TUMMERS e THESLEFF, 2003). Semelhantemente forte, a expressão de mRNA de HES1 (Hairy/Enhancer of Split), que é um fator de transcrição básico do tipo dupla hélice, foi localizada como um sinal “downstream” de Notch 1.

mRNA de Jagged1 é expresso no epitélio interno do esmalte e continua a ser expresso nos ameloblastos diferenciados.(HARADA e OHSHIMA, 2004).

A expressão do mRNA do fator de crescimento fibroblástico (FGF)-10 é restrita ao mesênquima localizado ao redor do botão apical (HARADA e OHSHIMA, 2004). O FGF-10, secretado pelo mesênquima dental, possui importante papel na formação e manutenção da diferenciação das células tronco encontradas no laço cervical, durante o desenvolvimento dos incisivos de camundongos (HARADA et al., 2002a; THESLEFF, 2003). Incisivos obtidos de camundongos, com deficiência para o gene FGF-10, exibiram um limitado padrão de crescimento *in vitro*. A associação de tais informações indica que o botão apical do dente incisivo, correspondente ao estágio de botão no desenvolvimento do germe dentário do dente molar, de camundongo, é eternamente mantido pela expressão contínua de FGF-10 (HARADA e OHSHIMA, 2004). A expressão do mRNA de FGF-10, que é um dos fatores secretados pelas células mesenquimais, inicia-se no

estágio de botão do germe dentário e também está associado com a invaginação do epitélio na papila dental, durante o desenvolvimento do dente (KETTUNEN et al., 2000; KERÄNEN et al., 1998; TUMMERS e THESLEFF, 2003). Nos incisivos de crescimento contínuo, a expressão ininterrupta de FGF-10 no sítio epitelial apical, durante a vida de camundongos, mantém todas as partes do órgão do esmalte (HARADA e OHSHIMA, 2004). Um laço regulatório entre o FGF-8 e o FGF-10 tem-se mostrado crucial no controle da formação dos botões, assim como na indução e atividade da crista apical ectodérmica.

1.2 Bioengenharia tecidual dental

Os fundamentos moleculares que ocorrem no início da odontogênese como, por exemplo, a informação de que o epitélio oral produz os primeiros sinais indutores à formação do dente (por volta do décimo dia embrionário em camundongos e por volta da quinta semana em humanos), disparando uma cascata de eventos que resultarão na formação de elementos dentários devem, portanto, ser usados para auxiliar na criação de métodos capazes de favorecer a reposição de dentes humanos perdidos (MODINO e SHARPE, 2005).

Existem basicamente quatro modelos experimentais propostos para a construção biológica de dentes e espera-se que, um dia, eles possibilitem a reposição de elementos dentais perdidos. São eles: 1) a utilização de genes, fatores ou moléculas que induzam uma dentição extra (Fig.26A); 2) reconstruir o dente maduro como este aparece na boca (Fig. 26B); 3) criar uma matriz (arcabouço) no formato de um dente, celularizar esta matriz e aguardar o surgimento do elemento dental (Fig.26C); 4) reproduzir o desenvolvimento embrionário de um dente, na boca (Fig. 26D). Todas estas quatro abordagens foram sugeridas e as duas últimas tem sido testadas em laboratório (SARTAJ e SHARPE, 2006).

O trabalho pioneiro de Shirley Glasstone-Hughes, publicado em 1952, demonstrou que o primórdio do dente no estágio embrionário inicial pode ser dividido em dois e cada metade pode gerar um dente de tamanho normal. Isto estabeleceu que o primórdio do dente no estágio inicial possui um nível de herança de capacidade plástica e regenerativa (GLASSTONE-HUGHES, 1952).

Uma das técnicas de maior sucesso para a engenharia tecidual de tecidos simples é a que usa arcabouços biodegradáveis, nos quais células são depositadas e adaptadas à forma do arcabouço. Vacanti e sua equipe, em 1997, publicaram um experimento bem documentado onde, através de uma construção de células com polímero, produziram um tecido cartilaginoso, em forma de orelha, nas costas de um camundongo (CAO et al.,1997).

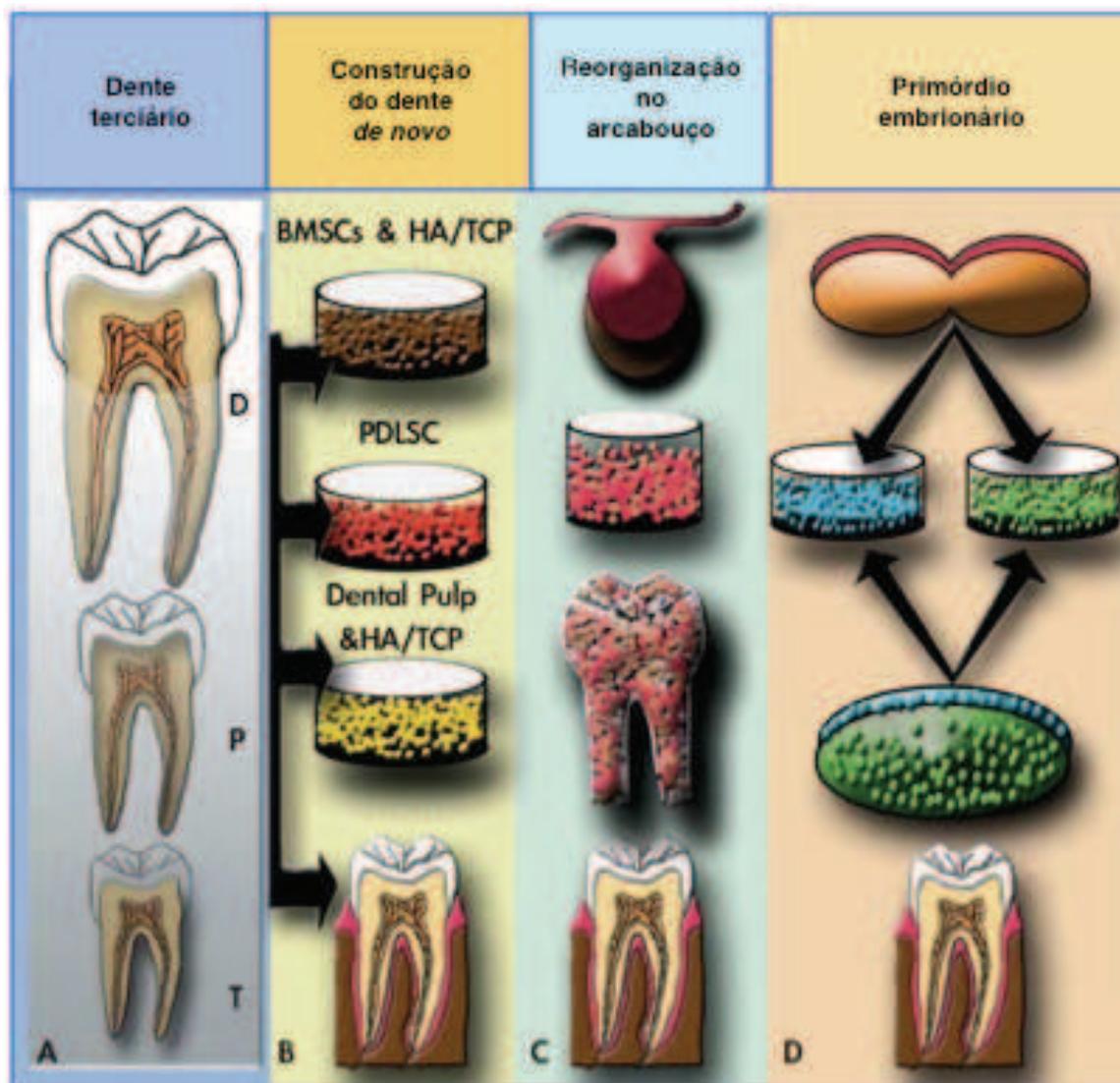


Figura 26 - Resumo esquemático representando quatro diferentes abordagens para a engenharia tecidual de dentes. A: estímulo da terceira dentição (dente terciário) (OTTO et al., 1997); B: construção de um dente adulto *de novo* (ROBEY, 2005); C: semeadura de células, do botão de terceiro molar, dissociadas, em arcabouços com forma de dente (YOUNG et al., 2002; DUAILIBI et al., 2004); D: geração de um primórdio dental a partir de células tronco cultivadas (OHAZAMA et al., 2004). T: terciário; P: primário; D: decíduo; BMSCs: células tronco da medula óssea; HA: hidroxiapatita; TCP: fosfato tricálcio; PDLSC: célula tronco do ligamento periodontal; Dental Pulp: polpa dental (Fonte: modificado de SARTAJ e SHARPE, 2006).

A idéia que a terceira dentição (exemplo, Fig.26A) pode ser, de alguma maneira, localmente induzida para repor os dentes perdidos tem sido discutida em vários textos e é, obviamente, um conceito atraente. Esta abordagem é geralmente apresentada em condições onde moléculas seriam adicionadas para induzir a iniciação do dente *de novo* na boca do adulto, seguinte à perda do dente permanente. Tais moléculas devem ser aquelas que são envolvidas na indução embrionária do dente ou na formação sucessiva do dente. Recentes descobertas têm revelado que o fator de transcrição *Cbfa1* (fator A1 de ligação nuclear) também referido como *Osf2* (factor 2 específico de osteoblasto) é um crítico regulador da diferenciação osteoblástica (DUCY e KARSENTY, 1995) e que a perda da expressão de um alelo de *Cbfa1* é a base para a síndrome da displasia cleidocranial (DCC) em camundongos e humanos (OTTO et al., 1997; LEE et al., 1997; MUNDLOS et al., 1997). DCC caracteriza-se pelo atraso na ossificação, fontanelas patentes, ossos Wormianos e múltiplos dentes extranumerários (JONES, 1997). *Cbfa1* é o homólogo no camundongo do gene *runt* encontrado em *Drosófila* (OGAWA et al., 1993) e a identificação de mutações no *RUNX2* (fator de transcrição 2 relacionado com *runt*) tem atraído a atenção como uma possível rota na direção dos dentes criados através da bioengenharia, uma vez que indivíduos com DCC mostram a formação constante de novos jogos de dentes. A idéia da ativação *de novo* de genes tais como *RUNX2* pode ser usada para induzir a formação de um novo dente na boca adulta, entretanto, possui óbvios perigos como o papel chave na ativação de *RUNX2* em outro processo celular, incluindo a formação óssea (OTTO et al., 1997).

No caso da construção de um dente adulto completo (exemplo, Fig.26B), proposto por Pamela Robey e colaboradores, inicialmente, a preparação óssea (enxerto ósseo), se necessária, seria realizada com células tronco esqueléticas, derivadas da medula óssea. Em seguida, um molde coronário, composto de um material semelhante ao esmalte e preenchido com células tronco da polpa dental associadas ao composto HA/TCP, tendo um leito vascular inserido, poderia ser usado para a construção da coroa do dente. Tais construções poderiam crescer em um número de sítios musculares e então serem transferidas à cavidade oral. Células isoladas do ligamento periodontal poderiam ser utilizadas para criar o cimento e o ligamento periodontal, estruturas essenciais para a função normal do dente (ROBEY, 2005).

A capacidade regenerativa das células dentais foi utilizada nos experimentos de Young et al. (2002) que, em colaboração com Vacanti, construíram arcabouços na forma de diferentes dentes e os semearam com células dissociadas de germes do dente molar de porcos e ratos, no estágio inicial (YOUNG et al.,2002). Semelhantemente, Duailibi et al. (2004), utilizou células do dente molar de ratos com 3-7 dias pós-natal, semeadas em arcabouços de ácido poliglicólico (PGA) e de copolímero poli co-"glycolide" (PLGA) (DUAILIBI et al.,2004) (exemplo, Fig. 26C).

Ohazama e colaboradores, em 2004, publicaram um experimento realizado a partir do cultivo e de um agregado de células tronco embrionárias de camundongo, células tronco neurais fetais e células estromais da medula óssea adulta, resultando na formação de uma massa semi-sólida. Os agregados foram combinados com epitélio oral embrionário, cultivado por 3 dias e transferidos para a cápsula renal de camundongo adulto por 10 dias. Observou-se a formação de coroas dentárias completas, com o tamanho aproximado às dos molares do camundongo e contendo os mesmos tipos celulares de dentes normais (OHAZAMA et al. 2004) (exemplo, Fig.26D). Em 2008, Yen e Sharpe, mostraram imagens de um trabalho não publicado onde um dente, construído nestes mesmos preceitos, teria sido transplantado para a mucosa da área de diastema maxilar de camundongo, desenvolvendo raízes e erupcionando (YEN e SHARPE, 2008).

Mais recentemente, Ikeda et al. (2009), utilizando células epiteliais e mesenquimais de molares de camundongo, no décimo quarto dia embrionário e transplantando tais células para um alvéolo dental, conseguiram criar um dente com todos os tecidos semelhantes aos naturais e com força de erupção. Entretanto, o dente formado através da bioengenharia tecidual apresentava-se menor que os dentes normais e sem o padrão morfológico característico (IKEDA et al., 2009).

1.2.1 Cultura de células de dentes incisivo e molar

Ao longo dos anos foram realizadas publicações relatando experimentos que utilizaram cultivos celulares de dentes incisivos e molares, utilizando-se de diferentes técnicas e reagentes. Farges et al. em 1991, cultivaram células do tecido apical de dentes incisivos de ratos utilizando meio DMEM (meio

Eagle modificado por Dulbecco) / F-12, suplementado com 10% FCS, 100 unidades/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hidrocortisona, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina, 10^{-10} M de toxina da cólera e 10 ng/mL de FGF (fator de crescimento fibroblástico) (Fig. 27).

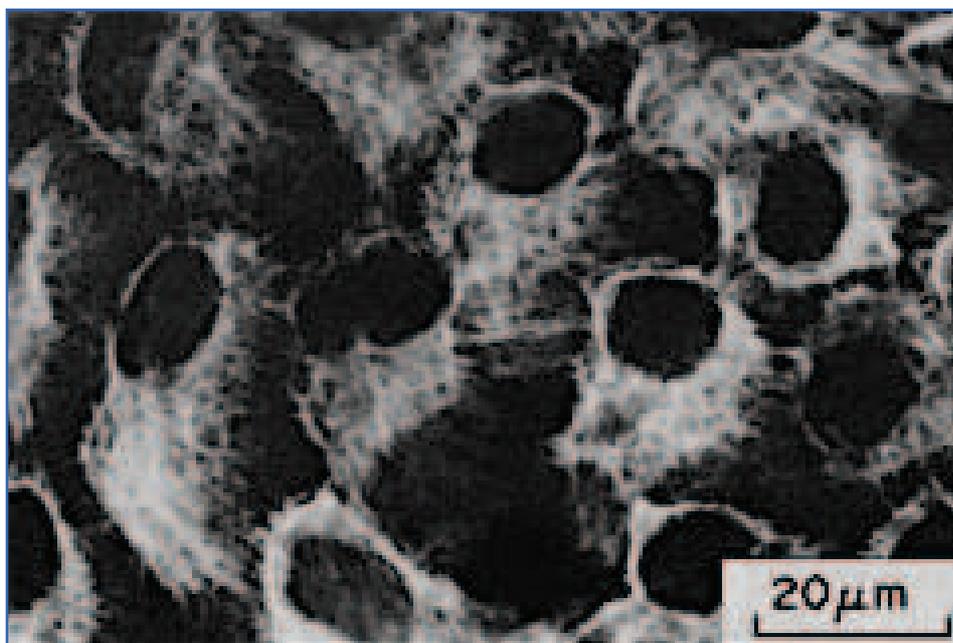


Figura 27 - Fotomicrografia de imunofluorescência de marcação com o anticorpo contra citoqueratina 1 (CK1), dez dias após a semeadura do explante apical do incisivo de rato (Fonte: FARGES et al., 1991).

Harada et al., em 1999, publicaram um trabalho onde foram utilizados incisivos de camundongos cultivados em uma cultura orgânica preconizada por Trowell (1959) (método de cultivo no qual órgãos ou partes destes, geralmente de rato ou camundongo, são mantidos *in vitro*, em um meio sintético simples, com a proposta de um experimento rápido). O meio de cultura utilizado consistiu de DME suplementado com 10% FCS, penicilina/streptomicina, glutamato I e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido ascórbico. Abe et al., em 2007, prepararam as células epiteliais dentais, a partir de incisivos inferiores de ratos que foram mantidas em cultura de monocamada, em meio DMEM / meio Ham's F12, com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram mantidas a 37°C com ar humidificado, contendo 5% de CO_2 , até atingirem 70% de confluência. Young et al., em 2002, utilizaram tecidos de molares de porcos e as células foram mantidas em DMEM, até serem semeadas.

Em 2004, Duailibi et al. mostraram um trabalho executado com molares de dentes de ratos onde as células foram cultivadas em meio DMEM, contendo 10% de FBS, 5mL de Glutamax, 50 Un/mL de penicilina, 2,5 µg/mL de ácido ascórbico e meio F12. Honda et al., em 2006, utilizaram molares não erupcionados de cachorros e para a incubação das células, utilizaram meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino, 100 Un/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37 °C em ambiente com 5% CO₂.

1.2.2 Os arcabouços

Vários polímeros sintéticos biodegradáveis tais como o ácido poliglicólico (PGA) (FREED et al., 1993; KIM et al., 1994; CHOI e VACANTI, 1997; DUAILIBI et al., 2004; HONDA et al., 2006; SUMITA et al., 2006), ácido poliglicólico/poli-L-lactato (PGA/PLLA) (YOUNG et al., 2002), copolímero poli L-lático-ε-caprolactona (HONDA et al., 2003; 2004), Poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA) (KANG et al., 2008; YOUNG et al., 2002) e o copolímero ácido poliglicólico-ácido L-lático (BRITT e PARK, 1998) têm sido usados como arcabouços para a bioengenharia tecidual.

Além dos materiais poliméricos, materiais sintéticos naturais também têm sido utilizados como arcabouços biocompatíveis e biodegradáveis. Dentre estes, a “esponja” de colágeno possui algumas vantagens que a favorecem como arcabouço, uma vez que possui composição similar à matriz extracelular, apresenta baixa imunogenicidade, baixa citotoxicidade e pode assumir formas variadas. Adicionalmente, tem sido reportado que a estrutura da esponja de colágeno apresenta poros propícios à semeadura de células e favorece a diferenciação de osteoblastos. As vantagens somadas, sugerem, para a esponja de colágeno, características ideais para a bioengenharia tecidual dental (SILVER e PINS, 1992; CHEVALLAY et al., 2000; SEOL et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2005; SUMITA et al., 2006; IKEDA et al., 2009).

1.2.2.1 O colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante, encontrada nos vertebrados superiores, sendo o colágeno tipo I, quantitativamente maior,

encontrado em vários órgãos, nos ossos, tendões, ligamentos, pele, dentes e matriz extracelular (JENKIS e RAINES, 2002).

As características primárias de uma molécula de colágeno típica são: ser longa, rígida e apresentar a estrutura em fita tripla hélice. Nesta fita tripla hélice, três cadeias polipeptídicas de colágeno, denominadas de cadeias alfa (α) (sendo duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2), enrolam-se umas nas outras formando uma super-hélice. Uma cadeia α é composta de uma sequência tripla de glicina (Gly)-X-Y, na qual X e Y podem ser qualquer aminoácido (geralmente, X é prolina e Y é hidroxiprolina). Esta composição das cadeias α , individualmente, na tripla hélice, determina o tipo de colágeno. Neste contexto, a prolina é responsável por estabilizar a característica helicoidal em cada cadeia α . A glicina, por sua vez, devido ao fato de ser suficientemente pequena, é o único aminoácido capaz de ocupar o interior apinhado, da tripla hélice. Já a hidroxiprolina, que em outras proteínas somente se apresenta em pequenas quantidades, pode ser utilizada para determinar, em testes, o conteúdo do colágeno (Fig. 28) (BERG e PROCKOP, 1973; DEE et al., 2002).

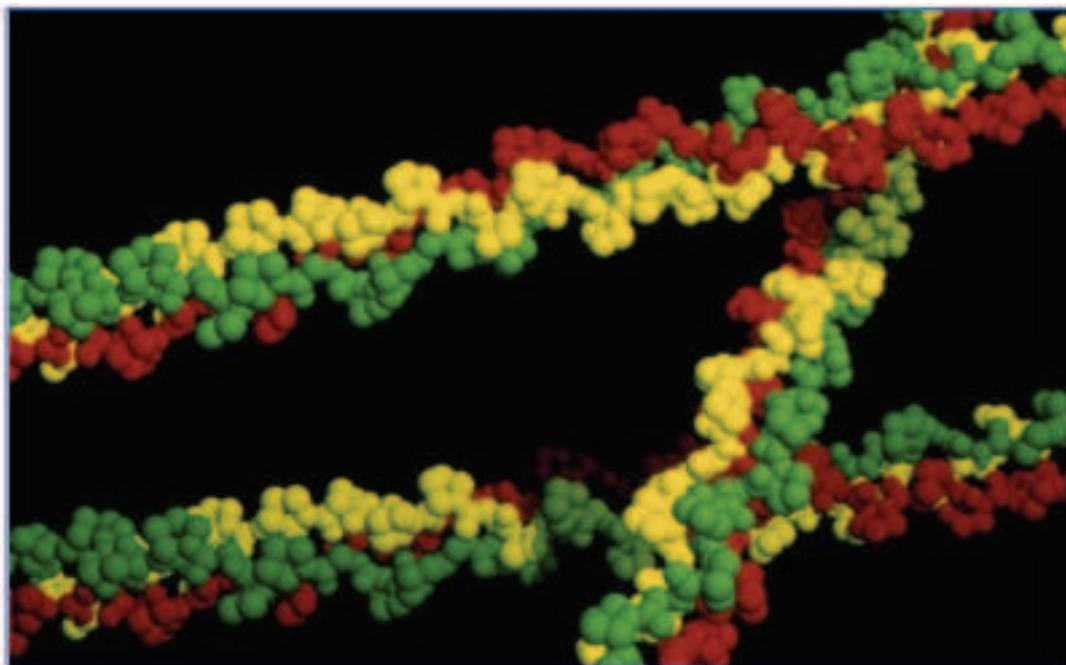


Figura 28 - Modelo das moléculas de proteína do colágeno gerado em computador. Os átomos são representados como esferas coloridas. Três fios são vistos, cada um contendo três subunidades coloridas, que representam os átomos das principais subunidades de glicina, hidroxiprolina e prolina. Muitos destes fios (fibrilas) combinam-se para formar espessas fibras de colágeno (Fonte: Kenneth Eward; Science photo library).

Após a secreção pelas células, os pró-peptídeos são clivados, enzimaticamente, das moléculas de pró-colágeno, formando moléculas de colágeno. Estas moléculas de colágeno medem 1,5 nm de diâmetro por 300 nm de comprimento. Em seguida, essas moléculas sofrem um processo de auto-associação formando as fibrilas de colágeno (10-300 nm de diâmetro). As fibrilas se organizam em zig-zag e, conseqüentemente, obtêm uma característica estriada à cada 67 nm, quando visualizada pela microscopia eletrônica de transmissão. As fibrilas agregam-se para formar as fibras de colágeno, as quais podem ter vários micrômetros de diâmetro (Fig.29) (DEE et al., 2002).

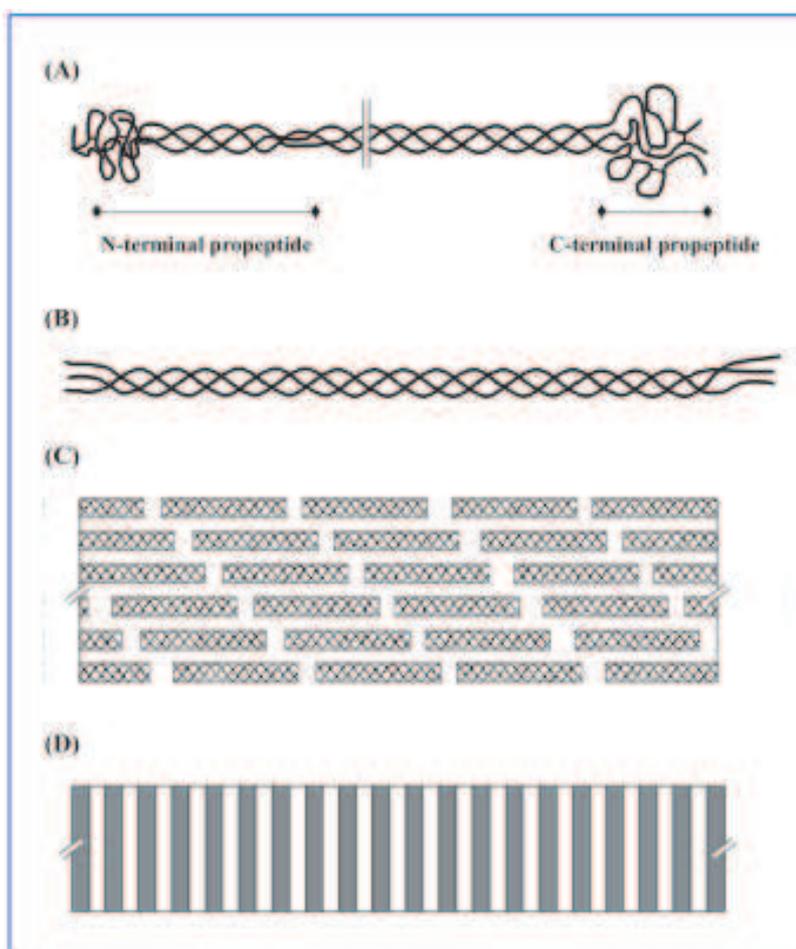


Figura 29- Estrutura do colágeno: (A)molécula de pró-colágeno. (B)molécula de colágeno. (C)arranjo de uma fibrila de colágeno. (D)característica estriada da fibra de colágeno resultante da disposição, em zig-zag, das fibrilas de colágeno, quando observada ao microscópio eletrônico de transmissão, em posição vertical (Fonte: modificado de DEE et al., 2002).

1.3 Semeadura e implantação

Como encontrado para a etapa de cultivo, as etapas de semeadura e implantação de germes dentários ou suas células apresentam variadas abordagens. Duailibi et al. (2004), após o cultivo de células dissociadas de dentes molares, semearam as células sobre arcabouços de PGA e PGLA, implantando-os no omento de ratos, onde permaneceram por 12 semanas. Sumita et al., em 2006, semearam 1×10^7 células em arcabouços de colágeno e PGA com aproximadamente 11 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Estes arcabouços foram implantados em omentos de ratos imunossuprimidos e mantidos por 8-25 semanas. Alguns autores implantaram rudimentos de dentes molares de camundongos com 14,5 dias embrionários na região de diastema maxilar de camundongo adulto, deixando-os por 26 dias (OHAZAMA et al., 2004; MODINO e SHARPE, 2005). Honda et al., em 2006, semearam arcabouços de PGA com dimensões em torno de 5x5x5 mm e implantaram em alvéolos de cães, mantendo-os por 24-26 semanas.

Associando várias das informações acima com a competência do Laboratório de Biomineralização, no estudo da ultra-estrutura do esmalte dental, através de variadas técnicas microscópicas, gerou-se um modelo experimental inédito com o intuito de produzir tecidos dentários, a partir de células dos tecidos apicais dos dentes incisivos inferiores, de ratos Wistar, e arcabouços de colágeno.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Produzir tecido dental a partir de implantes realizados na região de diastema maxilar de ratos Wistar isogênicas, utilizando-se arcabouços de colágeno semeados com células do tecido apical de dentes incisivos inferiores, de outros ratos Wistar isogênicos.

2.2 Específicos

- Analisar anatômica e histologicamente o dente incisivo inferior de ratos Wistar;
- Estudar o esmalte dental do incisivo inferior;
- Contribuir com novas informações a respeito do padrão organizacional dos ameloblastos, em dentes incisivos inferiores;
- Avaliar o posicionamento do botão apical do dente incisivo;
- Estabelecer um protocolo cirúrgico para remoção do botão apical do incisivo;
- Analisar o tecido apical do dente incisivo e a distribuição de células epiteliais;
- Estabelecer técnica de cultura primária das células existentes no botão apical de ratos Wistar;
- Analisar um tipo comercial de arcabouço de colágeno, quanto a sua capacidade de celularização;
- Estabelecer um protocolo cirúrgico para a utilização da região de diastema maxilar como área receptora de implantes teciduais ou celulares;
- Analisar o comportamento de um tipo comercial de arcabouço de colágeno celularizado, em implantações na região de diastema maxilar;
- Analisar um modelo experimental alternativo de bioengenharia tecidual dental;
- Analisar a existência de formação de tecidos componentes do dente, na área receptora dos arcabouços celularizados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Wistar isogênicos (*Ratus norvegicus*), de ambos os sexos, com peso médio de 250 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, e seus tecidos da região apical do dente incisivo inferior e de molares inferiores, foram usados nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Os animais receberam dieta e hidratação **ad libitum**, assim como foram hospedados apropriadamente no citado biotério, quando se fez necessário.

Ratos adultos, com pesos variados e de ambos os sexos, também da linhagem Wistar, desprezados experimentalmente, foram captados para serem utilizados nos experimentos de análises e estudos histológicos da hemimandíbula e dos dentes incisivos.

Todos os procedimentos necessários aos experimentos em questão foram submetidos à Comissão de Avaliação da Utilização de Animais em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde - CAUAP/UFRJ e aprovados sob o protocolo n° DAHEICB 023.

3.2 Experimentos *in vitro*

3.2.1 Dissecções para análises anatômicas e histológicas da hemi-mandíbula, do esmalte e do dente incisivo inferior

Para a execução das dissecções das hemi-mandíbulas e dos dentes incisivos inferiores, foram utilizados: cabo de bisturi cirúrgico n°3 (Great, Pakistan) com lâmina n° 15 (Free-Bac, China), cabo de bisturi cirúrgico n° 7 (Great, Pakistan) com lâmina n° 21 (Free-Bac, China), tesoura Metzenbaum 15cm reta (Great, Pakistan), tesoura Metzenbaum 15cm curva (Great, Pakistan), tesoura de Iris reta (Erwin Guth, Brasil), pinça de dissecção (Great, Pakistan), pinça dente de rato (Great, Pakistan), pinça F-32 (Erwin Guth, Brasil), destacador de perióteo de Mead (Quinelato, Brasil) e pinça Goiva (Quinelato, Brasil) (Fig.30).

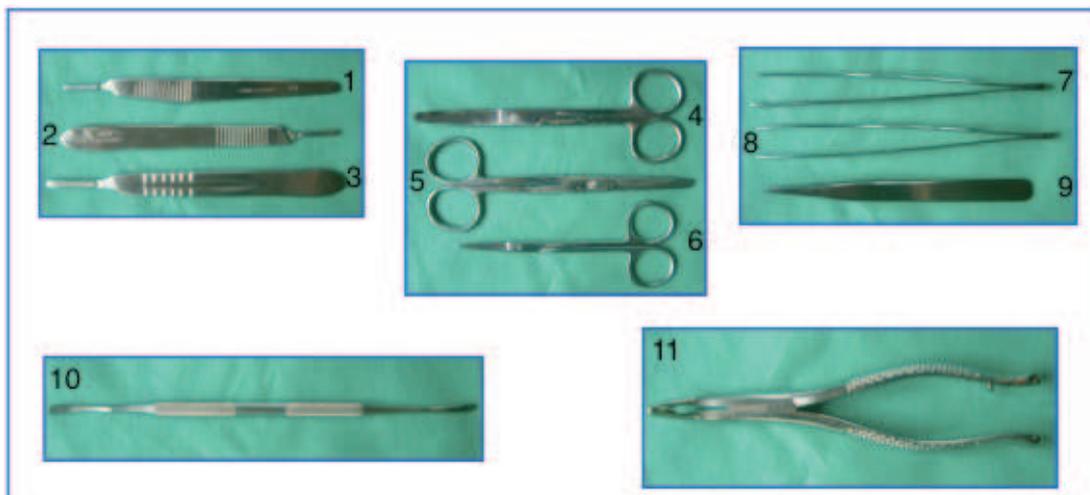


Figura 30 - Instrumentos utilizados para a dissecção das hemi-madíbulas e dos dentes incisivos. 1: cabo de bisturi cirúrgico nº 3 (Erwin Guth, Brasil); 2: cabo de bisturi cirúrgico nº 3 (Great, Pakistan); 3: cabo de bisturi cirúrgico nº 7 (Great, Pakistan); 4: tesoura Metzenbaum 15cm curva (Great, Pakistan); 5: tesoura Metzenbaum 15cm reta (Great, Pakistan); 6: tesoura de Iris reta (Erwin Guth, Brasil); 7: pinça dente de rato (Great, Pakistan); 8: pinça de dissecção (Great, Pakistan); 9: pinça F-32 (Erwin Guth, Brasil); 10: destacador de perióteo de Mead (Quinelato, Brasil); 11: pinça Goiva (Quinelato, Brasil).

3.2.2 Análises histológicas através de microscópio óptico

As mandíbulas e os incisivos dissecados foram divididos em dois grupos: as hemi-mandíbulas e incisivos reservados à avaliação celular foram fixados com glutaraldeído 2,5% em PBS pH 7,4, por 90 minutos. O grupo de hemi-mandíbulas e dentes, destinados à avaliação das estruturas inorgânicas, foram imersos em hipoclorito de sódio a 4%, por 18 horas e por 10 minutos, respectivamente. Após este processamento inicial, cada amostra, a seu tempo, foi lavada em água destilada por 4 vezes durante cinco minutos e desidratada em acetona passo a passo utilizando um gradiente de 35 a 100%. Neste momento, as amostras foram infiltradas com Spurr, para isso utilizamos uma solução de acetona:Spurr (2:1;v,v) até que 100% de Spurr fosse alcançado. Uma vez em Spurr 100%, as amostras foram mantidas em estufa a 70°C, até encontrarem-se polimerizadas (aproximadamente 18 horas) (SALOMON et al., 1991; HADDAD et al., 1998; BANCROFT e GAMBLE, 2002).

Já polimerizados, os blocos com as amostras contendo as hemi-mandíbulas e os dentes foram fatiados em espessuras de aproximadamente 15µm com disco de diamante, tanto transversalmente como longitudinalmente ápico-incisal (Low Speed Diamond Wheel Saw, model 650, South Bay Technology, USA).

Os cortes foram colados com Loctite Super-Bonder (Henkel, Brasil) em lâminas de vidro, lixados e polidos com lixas nº200, nº600, nº1200 e nº2000, corados com azul de toluidina e montados com lamínula e Entellan New (Merck, Germany).

3.2.3 Análises da ultra-estrutura utilizando-se microscópio eletrônico de varredura

Após a dissecação, dois dentes incisivos inferiores foram incubados em solução de hipoclorito de sódio a 4% por 10 minutos para a remoção da parte orgânica. Outros dois dentes incisivos inferiores foram lavados por três vezes de cinco minutos com PBS, como controle. Os dentes tratados de ambas as formas foram fixados em Karnovsky durante 90 minutos; lavados com tampão CaCO₃ 0,1 M por três vezes de dez minutos; desidratados com etanol 50% até o etanol 100%; secagem das amostras (Ponto Crítico) (Bal-Tec, Swiss) e metalizados com camada de ouro (<10nm) (Bal-Tec SCD 050, Swiss).

Já metalizadas, as amostras foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-3510), operando a 15 kV e 20 kV, fotografadas digitalmente e transferidas ao computador através do programa SemAfore® JEOL 3.0 PRO.

3.2.4 Reconstrução tridimensional

Uma das amostras do dente incisivo inferior, não tratada com hipoclorito de sódio e incluída em Spurr, foi preservada e cortada, longitudinalmente no eixo ápico-incisal, selecionando-se a região mais apical. Em seguida, o bloco obtido foi preparado e fatiado em ultramicrótom (Sorvall - Porter Blum, MT2-B Ultramicrotome, USA). Foram obtidas secções finas, com aproximadamente 6µm de espessura, que foram coradas com azul de toluidina e montadas em lâmina com lamínula, utilizando-se Entellan New (Merck, Alemanha).

Uma sequência de oito imagens do mesmo corte e na mesma posição horizontal, com alterações verticais, de um em um micrômetro, controladas através do parafuso micrométrico fino, foram obtidas através do microscópio Axioplan (Zeiss, Germany), com câmera digital (Evolution MP Color - Media Cybernetics, USA) e programa QCapture (Media Cybernetics, USA) (Fig. 31).

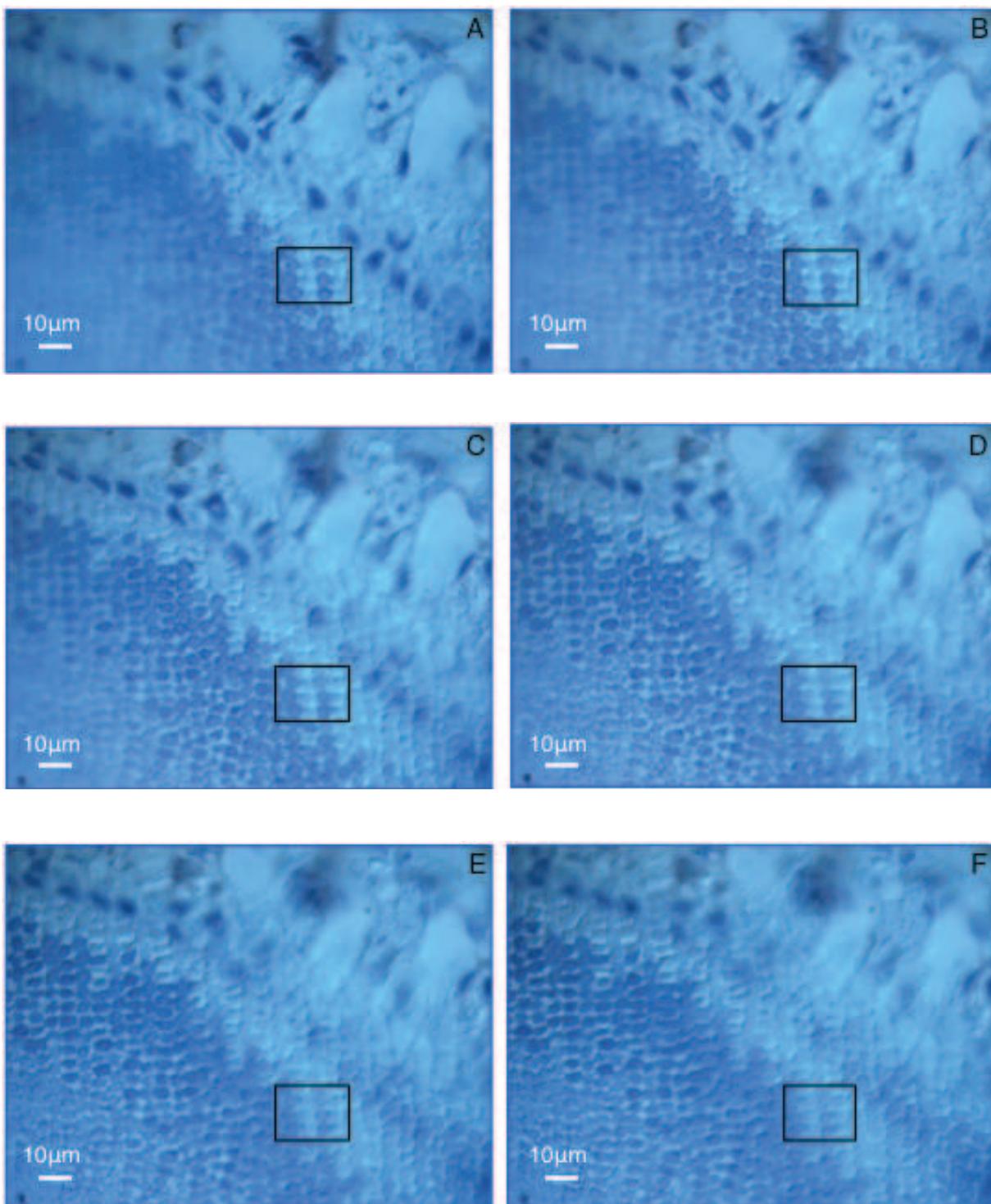


Figura 31 - Algumas das imagens seriadas, obtidas de um em um micrômetro de secção do esmalte de dente incisivo inferior de rato Wistar e utilizadas para a montagem tridimensional. No detalhe contornado em preto observa-se a região trabalhada para a reconstrução 3D.

Com as fotos já digitalizadas, a suíte IMOD, utilizada para o processamento de imagens de secções de micrografia, foi baixada da página <http://bio3d.colorado.edu/imod/> e seguiu-se o tutorial <http://bio3d.colorado.edu/imod/>

doc/3dmodguide.html, da Universidade Boulder-Colorado (KREMER et al., 1996). A reconstrução tridimensional foi realizada com o programa 3dmod, da suíte IMOD 3.13.6 para Microsoft Windows, obtido em <http://bio3d.colorado.edu/imod/>. A partir das imagens seriadas foi possível construir um modelo 3D de parte dos corpos dos ameloblastos através da renderização de seus contornos, identificados nos diferentes planos de foco.

3.2.5 Análise do arcabouço de colágeno CollaPlug® e do arcabouço de poli-hidróxido-butilato (PHB)

O CollaPlug® (Zimmer Dental, USA), arcabouço estéril de colágeno tipo I bovino, utilizado em Odontologia nos sítios de extração dentária ou biópsia, é comercializado na forma de um cilindro com dimensão de 0,9 cm de diâmetro por 1,9 cm de comprimento (Fig.32).

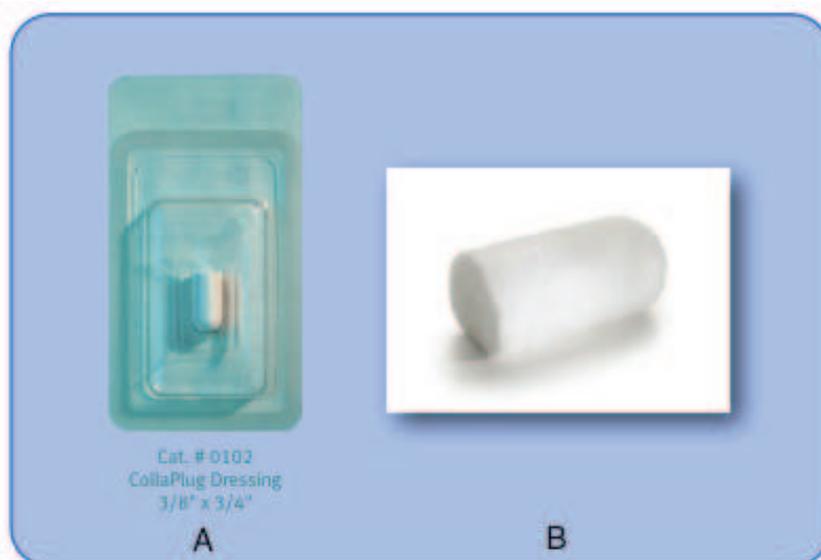


Figura 32 - Imagens do CollaPlug®. A = acondicionamento comercial estéril; B = CollaPlug® após remoção da embalagem (Fonte: modificado de Zimmer Dental, USA).

3.2.5.1 Análise utilizando-se microscópio eletrônico de varredura

Fatias de CollaPlug®, com dimensões variadas, foram coladas com fita de carbono dupla face (8 mm, Ted Pella, USA) em suportes de alumínio (1/8" PIN, Ted Pella, USA) e metalizadas com uma camada de ouro com aproximadamente 10nm de espessura (Bal-Tec, Swiss).

As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM - 3510, Germany) operado a uma kilovoltagem de 15kV ou 20kV. A digitalização das imagens foi realizada através do programa SemAfore 3.0 74PRO (JEOL, Germany).

Utilizando a mesma técnica mencionada realizou-se a preparação, observação e registro das imagens do PHB.

3.2.6 Protocolo cirúrgico para extração do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar

Para remover o tecido apical de dentes incisivos inferiores de ratos Wistar de modo a favorecer um acesso rápido, certo e reduzir os riscos de contaminação, um protocolo cirúrgico foi elaborado.

O primeiro passo foi a limpeza criteriosa de todo o animal utilizando-se álcool 70% e gaze, seguida pela tricotomia dos pelos localizados na face, próximos à região cirúrgica, e descontaminação secundária com Povidine® (JohnsonDiversey, Brasil). A seguir utilizou-se o cabo de bisturi nº 3 com lâmina nº 15 (Free-Bac, China) para a realização de uma incisão vertical única, na lateral da face do animal. Todo o tecido muscular foi destacado da região com o auxílio das tesouras Iris reta e Metzenbaum de 15 cm curva e reta, além do destacador de perióteo de Mead. Com a exposição da área óssea do ramo mandibular, fez-se a osteotomia (retirada da parte óssea) da região correspondente, localizada sobre o ápice do incisivo, utilizando-se um extrator 1/10. Uma vez visualizado o tecido apical do incisivo inferior, a sindesmotomia e o descolamento do mesmo foi realizado com a ajuda de curetas nº 0, nº 5, nº 19 (modificada pelo autor) e nº 20. Finalmente, o tecido foi captado com a pinça F-32 e direcionado para o experimento de escolha (Fig.33 e Fig.34).

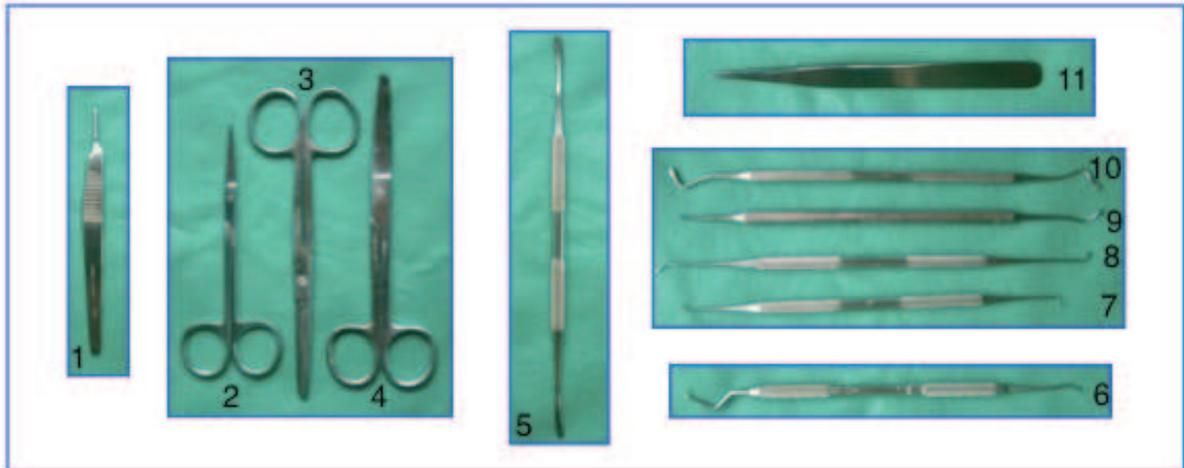


Figura 33 - Instrumentos utilizados no protocolo cirúrgico de remoção do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar. 1: cabo de bisturi cirúrgico nº 3 (Erwin Guth, Brasil); 2: tesoura de Iris reta (Erwin Guth, Brasil); 3: tesoura Metzenbaum 15cm reta (Great, Pakistan); 4: tesoura Metzenbaum 15cm curva (Great, Pakistan); 5: destacadador de perióteo de Mead (Quinelato, Brasil); 6: extrator 1/10 (Golgran, Brasil); 7: cureta nº 0 (Golgran, Brasil); 8: cureta nº 5 (Golgran, Brasil); 9: cureta nº 19 modificada (Duflex, Brasil); 10: cureta nº 20 (Erwin Guth, Brasil); 11: pinça F-32 (Erwin Guth, Brasil).

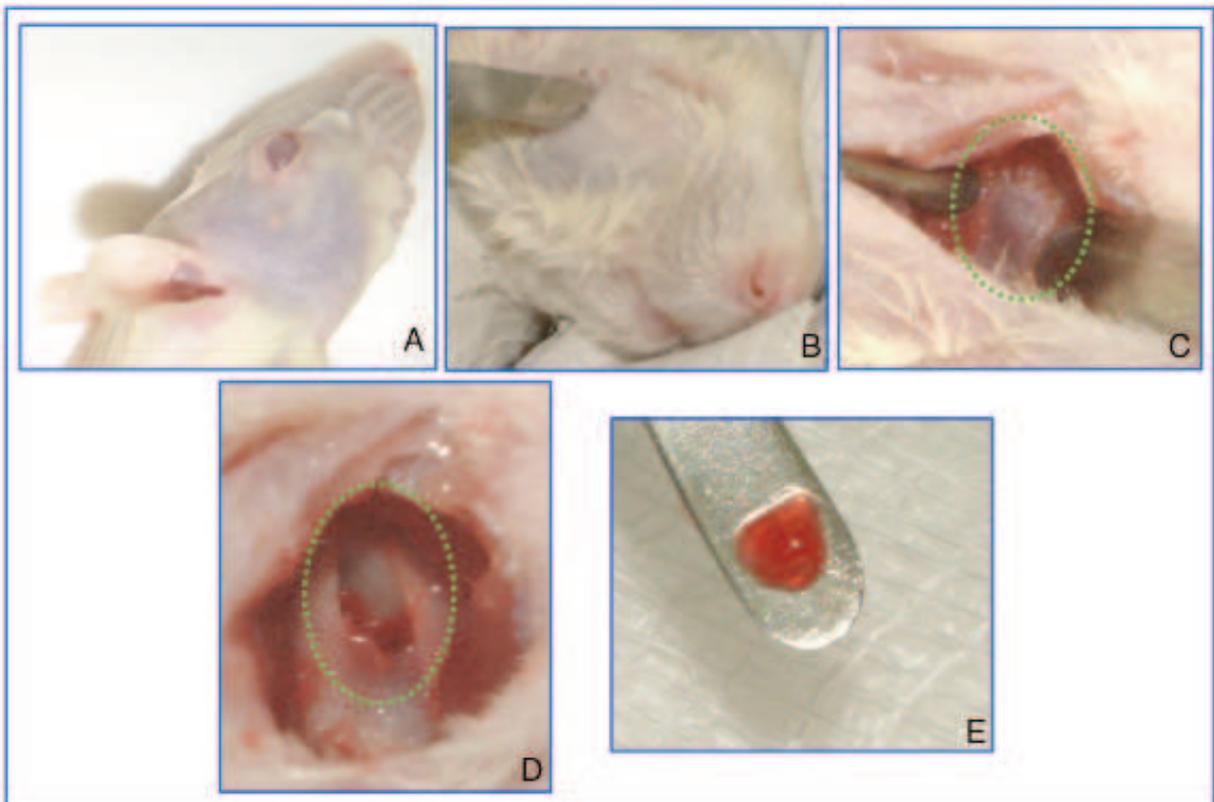


Figura 34 - Etapas do protocolo de extração do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar. A= limpeza com álcool 70% e tricotomia da área próxima à incisão; B= foto mostrando o posicionamento da lâmina do bisturi para uma incisão única e efetiva; C= após o descolamento da musculatura visualiza-se a região apical do dente incisivo inferior, evidenciada pela linha verde pontilhada; D= loja óssea obtida após a remoção do tecido apical, circundada com a linha verde pontilhada; E= tecido apical do dente incisivo de rato Wistar.

3.2.7 Análise do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar

3.2.7.1 Análise utilizando-se o microscópio óptico

O animal, previamente perfundido com paraformaldeído 4% em PBS, teve seus tecidos apicais dos dentes incisivos inferiores, direito e esquerdo, removidos, de acordo com o protocolo cirúrgico citado no campo 3.2.6. Logo após os tecidos foram mergulhados no mesmo fixador e mantidos por 18 horas a 4°C, lavados 5x por 10 minutos com PBS e procedeu-se à desidratação em acetona passo a passo utilizando um gradiente de 35 a 100%. Neste momento, os tecidos apicais foram infiltradas com Spurr, para isso utilizamos uma solução de acetona:Spurr (2:1;v,v) até que 100% de Spurr fosse alcançado. Uma vez em Spurr 100%, as amostras foram mantidas em estufa a 70°C, até encontrarem-se polimerizadas (aproximadamente 18 horas) (SALOMON et al., 1991; HADDAD et al., 1998; BANCROFT e GAMBLE, 2002).

As amostras incluídas em SPURR sofreram alguns ajustes com lâminas de aço, de maneira a preparar as faces do bloco para a ultramicrotomia (Sorvall - Porter Blum, MT2-B Ultramicrotome, USA). Os cortes foram corados sobre lamínulas com azul de toluidina e montados em lâmina de vidro com Entellan New (Merck, Germany). Após a secagem, as lâminas com os cortes do tecido apical dos dentes incisivos inferiores de ratos Wistar foram observadas no microscópio óptico Axioplan (Zeiss, Germany). As imagens foram capturadas com câmera digital (Evolution MP Color - Media Cybernetics, USA) e armazenadas digitalmente através do programa QCapture (Media Cybernetics, USA).

3.2.7.2 Análise da presença de PCK-26 através de fluorescência utilizando-se microscópio óptico confocal a laser

Seguindo o protocolo cirúrgico citado no item 3.2.6, os tecidos apicais dos dentes incisivos inferiores de rato Wistar foram removidos, fixados por 20 minutos com paraformaldeído 4% em tampão PBS pH 7,4 e lavados 3x em PBS, durante 10 minutos. Os tecidos foram permeabilizados com PBS-Triton X-100 0,2% (Sigma-Aldrich, USA) e incubados com o anticorpo primário monoclonal anti pan-citoqueratina PCK-26 (Sigma-Aldrich, USA), na concentração 1:300 (PCK-26:PBS/BSA 1%), e anticorpo secundário anti-mouse IgG Cy³ (Sigma-Aldrich,

USA), na concentração 1:100 (IgG Cy³:PBS/BSA 1%). Os tecidos foram lavados com PBS e colocados em lamínula com Vectashield (Vector, USA), para observação.

Utilizado como controle tecidual e celular, os dentes molares inferiores de ratos Wistar com 4 dias pós-natal foram obtidos, através de intervenção intrabucal. Todos os processos seguintes ocorreram semelhantemente aos realizados para os tecidos apicais dos dentes incisivos inferiores.

As imagens foram registradas através do microscópio confocal Leica TCS SP5 (Zeiss, Germany), no INMETRO.

3.2.8 Protocolo para digestão e cultivo primário das células do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar

Após a eutanásia, utilizando-se CO₂, os tecidos apicais dos dentes incisivos inferiores de quatro ratos Wistar isogênicos adultos, com idades entre 4 e 6 meses, foram extraídos de acordo com a técnica cirúrgica preconizada no campo 3.2.6.

Os explantes foram triturados em pedaços com dimensões lineares menores do que 1 mm, em solução salina balanceada de Hanks (5,37 mM KCl; 136,89 mM NaCl; 0,44 mM KH₂PO₄; 0,34 mM Na₂HPO₄; 5,55 mM D-Glucose), a 37°C. Os tecidos do dente incisivo inferior foram digeridos com colagenase tipo I (0,66 mg/mL, Sigma-Aldrich, USA) e dispase I (0,33 mg/mL, Sigma-Aldrich, USA), dissociados por trituração e lavados 5x em meio Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS, Sorali Biotecnologia Ltda, Brasil), 5ml de Glutamax-I (Gibco-Invitrogen, USA), 50 unidades/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, 2,5 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, USA) e 50% de meio F12 (Gibco-Invitrogen, USA). Suspensões de células simples foram geradas pela filtração através de filtro de 45 µm (MFS, Advantec MFS, Inc, Sierra Court, Dublin, CA, USA). As células foram ressuspendidas em meio DMEM/F12, colocadas em garrafa de cultura de 25 cm² (T25) (Corning Costar Corporation, USA) e expandidas em estufa de CO₂ a 37 °C, durante quatorze dias. Após a confluência as células foram tripsinizadas utilizando-se solução de 0,25% tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 10 minutos a 37 °C, lavadas por duas vezes com o meio DMEM/F12, contadas e 2,5x10⁴ células foram distribuídas sobre cinco lamínulas, existentes em poços de

placas estéreis contendo 24 poços, visando a imunomarcagem. O volume restante foi centrifugado, o sobrenadante dispensado e 5 mL de meio foram adicionados. Em seguida, as células foram colocadas em uma nova garrafa de cultura de 25 cm² (T25) (Corning Costar Corporation, USA) e cultivadas em estufa de CO₂ a 37 °C .

Como controle, os tecidos explantados dos dentes molares inferiores foram submetidos aos mesmos passos citados para os tecidos apicais dos dentes incisivos, como controle.

3.2.9 Caracterização da cultura das células do tecido apical do dente incisivo inferior e de molares de rato Wistar

3.2.9.1 Análise através de fluorescência utilizando-se microscópio óptico

Após o cultivo por quatorze dias, sobre cinco lamínulas redondas, existentes em poços de placas com 24 poços, o meio de cultura foi retirado as células foram lavadas com HBSS, a 37°C . Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em tampão PBS, por 20 minutos. Ao término da fixação, as células foram lavadas com PBS por 3 vezes de 10 minutos. A permeabilização foi realizada incubando-se as células duas vezes por 10 minutos com PBS-Triton X-100 0,2%, lavagem com PBS, pré-incubação com PBS-BSA 5%, incubação com anticorpo primário monoclonal anti pan-citoqueratina PCK-26 (1:300) (Sigma-Aldrich, USA) e anticorpo secundário anti-mouse IgG Cy³ (Sigma-Aldrich, USA), na concentração 1:100. Ainda foram utilizadas faloidina FITC e DAPI, assim como controle negativo do anticorpo primário, utilizando-se somente o secundário.

As células dos tecidos dos dentes molares inferiores foram tratadas identicamente às células dos tecidos apicais dos dentes incisivos inferiores.

Como controle negativo para a marcação com o PCK26, foram utilizadas células osteoblásticas SaOS2.

Após o tratamento necessário, as lamínulas foram montadas com Vectashield (Vector, USA) e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus IX 71). As imagens digitalizadas foram armazenadas através da utilização do programa DP Manager (Olympus micro).

3.2.9.2 Vídeo-microscopia

Para isto, sete dias antes da observação, as células dos tecidos apicais dos dentes incisivos inferiores foram dissociadas com a utilização de tripsina/EDTA e plaqueadas sobre lamínula de vidro 10 x 10 mm e montada em uma placa de Petri estéril de 35 mm de diâmetro. A concentração celular foi de 4×10^4 células/mL mantidas em meio DMEM-F12 a 37 °C e filmadas em microscópio invertido (Olympus IX 71), com câmara CCD, durante 16 horas, utilizando-se contraste de fase e objetiva de 20X. A digitalização, o processamento e a análise posterior foram executadas com o auxílio do programa DP Manager (Olympus micro).

As células dos tecidos dos dentes molares foram tratadas identicamente como mencionado para as células do incisivo. A amostra foi mantida em temperatura constante de 37 °C e 5 % de CO₂. A filmagem, realizada por 16 horas com contraste de fase, foi processada no laboratório de Pinças Ópticas com o auxílio de um microscópio invertido (Eclipse TE300 Nikon), equipado com objetivas Plan APO 100 x 1.4 NA DIC H e Plan APO 60 x 1.4 NA DIC H, assim como dispendo de uma câmara de CO₂, que manteve o controle deste e da temperatura. As imagens foram coletadas por uma câmera CCD (Hamamatsu C2400) e digitalizadas com a ajuda do programa ImagePro Plus (Media Cybernetics, Inc.).

3.2.10 Análise do cultivo das células do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar sobre arcabouços Collaplug® e PHB

Para analisar a resposta celular em relação ao arcabouço CollaPlug® e ao arcabouço PHB realizamos três tipos de ensaio para cada um. No primeiro ensaio, previamente à semeadura das células, os CollaPlug® e os PHB foram imersos no meio de cultura DMEN/F12 por 24 horas, com a intensão de ambientar os arcabouços. No segundo ensaio, as células foram semeadas nos arcabouços secos, ao mesmo tempo. No terceiro experimento as células foram depositadas sobre as lamínulas de vidro e os arcabouços foram colocados sobre as células 24 horas depois destas terem sido depositadas sobre as lamínulas.

Nos dois primeiros experimentos, quando da semeadura das células sobre os arcabouços, foram utilizadas $1,15 \times 10^5$ células em 150 µL.

Nestes casos, após uma hora, 200 µL de meio DMEM/F12 foram depositados nos poços contendo os arcabouços.

No terceiro experimento, foram semeados, sobre as lamínulas, 150 µL de meio DMEM/F12 contendo $6,25 \times 10^4$ células. Após uma hora, 1000 µL de meio DMEM/F12 foram adicionados aos poços e após 24 horas, 700 µL do meio de cultura foram removidos e os arcabouços foram colocados em contato com as lamínulas.

As células foram mantidas em cultura com os arcabouços, a 37 °C e 5 % CO₂, durante 14 dias. Ao final deste período as amostras foram processadas de acordo com o seu destino de avaliação.

Todo o processo de cultura das células seguiu o protocolo de cultivo de células do tecido apical do dente incisivo inferior de Wistar, descrito no item 3.2.8.

3.2.10.1 Análise utilizando-se microscópio eletrônico de varredura

Um exemplar de cada arcabouço e as lamínulas utilizadas no terceiro experimento foram lavados 3 vezes com PBS pH7,4 por 10 minutos; fixadas com Karnovsky durante uma hora e trinta minutos; lavadas 3 vezes com tampão CaCO 0,1 M por 10 minutos; desidratados em concentrações crescentes de etanol (35%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%); secas (Ponto Crítico) e metalizadas.

As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM - 3510, Germany), operado a uma kilovoltagem de 15 kV ou 20 kV. A digitalização das imagens foi realizada através do programa SemAfore 3.0 PRO (JEOL, Germany).

3.3 Experimento *in vivo*

3.3.1 Extração do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar

Procedimentos idênticos aos realizados no item 3.2.6 foram realizados para a captação do tecido apical visando os experimentos *in vivo*. Especificamente para o procedimento *in vivo*, quatorze ratos Wistar adultos, com idade entre 4 e 6 meses sofreram a eutanásia para as extrações dos tecidos apicais dos dentes incisivos inferiores.

3.3.2 Isolamento, cultura e semeadura das células do tecido apical do dente incisivo inferior

Nesta etapa, seguiu-se o exposto no tópico 3.2.6. Adicionalmente, as células foram cultivadas em garrafa 75 cm² (T75) (Corning Costar Corporation, USA) e cresceram em estufa de CO₂ a 37 °C, por 14 dias, quando foi realizada a tripsinização e distribuição de 1x10⁶ células em cada um dos três arcabouços CollaPlug®. Cada arcabouço tinha 2 mm de espessura e 9 mm de diâmetro.

3.3.3 Implantação de arcabouço, celularizado com células do tecido apical do dente incisivo inferior em região de diastema maxilar de ratas Wistar

Os arcabouços celularizados foram mantidos em estufa CO₂ a 37 °C por 48 horas, antes da implantação. Três ratas Wistar isogênicas foram utilizadas e, desta forma, cada uma recebeu um arcabouço celularizado, que foi implantado na região de diastema maxilar esquerda (Fig. 35).

Para a realização desta etapa, os animais receberam um coquetel anestésico contendo 0,15 mL de ketamina 10 % (Cetamin, Syntec, Rhobifarma Ind. Farm. Ltda., Hortolândia, SP, Brasil) e 0,03 ml de xilazina (Anasedan, Vetbrands, Sespo Ind. e Com. Ltda., Jacareí, SP, Brasil), anestesia tópica com cloridrato de lidocaína 2 % (Cristália, Itapira, SP, Brasil) e anestesia local através de cloridrato de lidocaína 2 % com epinefrina (1:100000, v, v) (Alphacaine, DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A tábua óssea da região de diastema foi perfurada utilizando-se brocas esféricas cirúrgicas PM (Komet, Alemanha), motor cirúrgico (Driler, Brasil) e irrigação constante com soro fisiológico estéril (Arboreto, Brasil). Cada um dos três arcabouços celularizados foi depositado na perfuração realizada em cada animal. Uma rata controle recebeu apenas o arcabouço de colágeno com o meio de cultivo sem células. Em seguida, as incisões foram suturadas com fio seda agulhado 0000 (J&J, Brasil) (Fig.35).

Durante o período de sete dias pós-operatório, os animais receberam água à vontade, ração triturada com banana picada e foram medicados com 20 unidades de Cetoprofeno e 3 unidades de Gentamicina 24/24 horas. Todos os animais receberam aquecimento a 36 °C, imediatamente após a implantação e nas 48 horas seguintes.

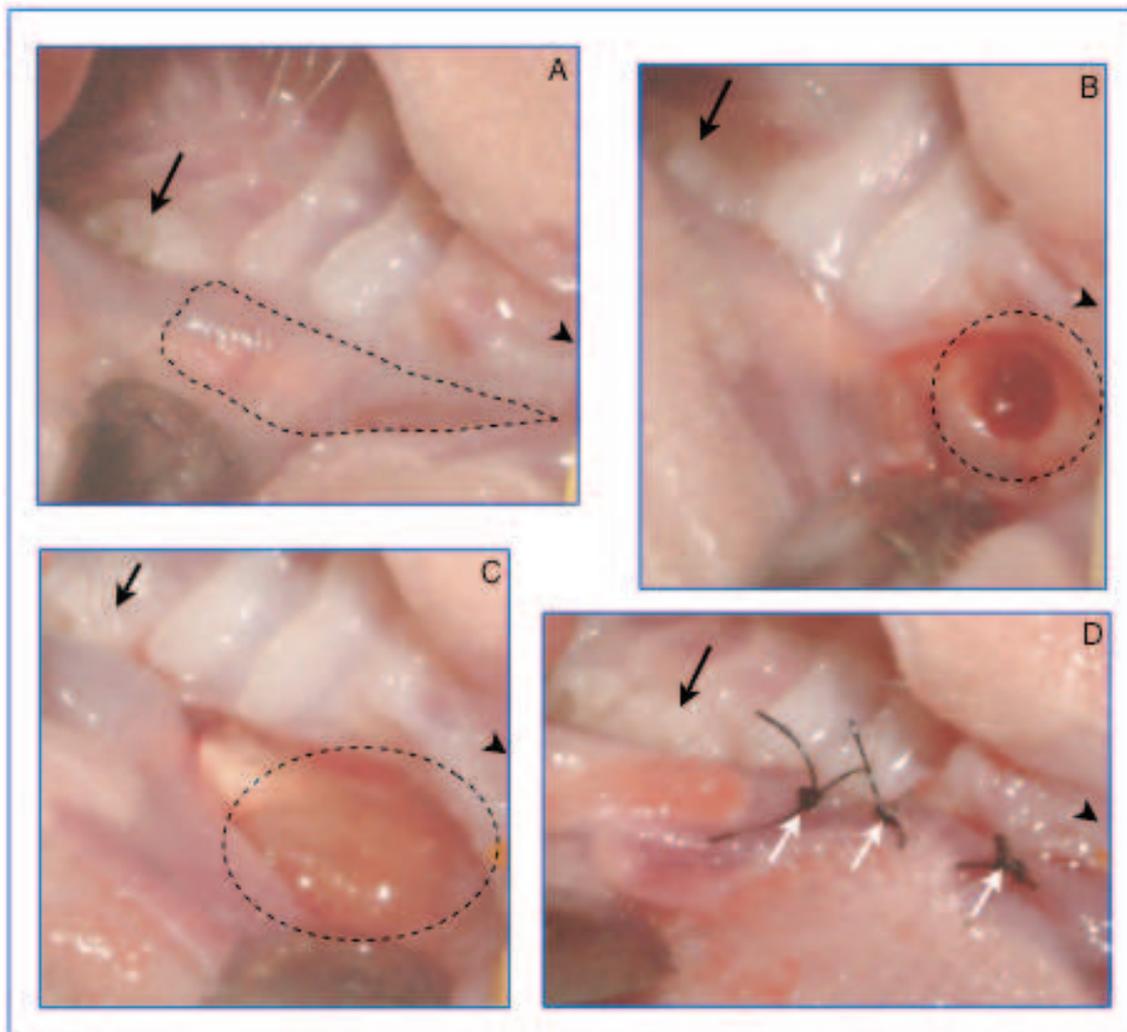


Figura 35 - Etapas de implantação do arcabouço celularizado. A= área de diastema marcada pela linha tracejada, seta mostra a região de molares superiores esquerdos e a cabeça de seta mostra a direção do dente incisivo superior; B= loja óssea confeccionada para receber o arcabouço celularizado marcada com círculo tracejado, seta mostrando a região dos dentes molares, cabeça de seta indicando a direção do dente incisivo superior; C= elipse tracejada mostrando o arcabouço CollaPlug® celularizado colocado na loja óssea, seta preta mostrando a região dos dentes molares, cabeça de seta indicando a direção dos dentes incisivos superiores; D= setas brancas sinalizando os pontos da sutura na região cirúrgica, seta preta mostra a região de molares superiores e cabeça de seta indica a direção dos dentes incisivos superiores.

3.3.4 Exame tomográfico computadorizado dos ratos Wistar que receberam os implantes

A fim de avaliar a progressão do experimento de implantação e registrar imagens das regiões maxilares onde arcabouços celularizados foram implantados, procedeu-se à tomadas de tomografias computadorizadas tipo Cone “Beam” (NewTom3G), dos animais experimentais.

3.3.5 Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada através de analgesia com clorofórmio e perfusão com solução salina 0,9 % e paraformaldeído 4 % em PBS pH 7,4.

Dos animais que receberam o implante de arcabouço celularizado, um sofreu eutanásia ao final de oito semanas de implantação e os outros dois, incluindo o controle cujo arcabouço não foi celularizado, com doze semanas.

3.3.6 Processamento das amostras

3.3.6.1 Desmineralização

Após a perfusão com solução salina 0,9 % e paraformaldeído 4 %, dissecação da maxila e fixação suplementar por 48 horas com o mesmo fixador, as amostras foram submetidas à desmineralização. Exceto uma amostra, direcionada para a inclusão em SPURR, que não foi incluída nesta etapa.

As maxilas foram reduzidas em tamanho, dentro do possível, visando diminuir o conteúdo de cálcio a ser removido e, conseqüentemente, diminuir o tempo do procedimento de desmineralização. As hemi-maxilas direita (sem o implante) e esquerda (com o implante) de cada animal foram colocadas em potes individualizados e estes foram identificados. Os potes apresentavam perfurações visando favorecer a circulação do material desmineralizante.

As amostras foram submetidas à desmineralização em EDTA 10 % (BANCROFT e GAMBLE, 2002) durante 12 semanas, com agitação leve à 4 °C. Neste período, as trocas de solução desmineralizadora foram executadas a cada três dias.

O término da desmineralização foi comandado por dois métodos: um físico e outro químico. No método físico, uma agulha de anestesia odontológica foi utilizada para a conferência da resistência do tecido, através de perfurações em áreas distantes da região implantada e em regiões não interessantes da maxila direita. O método químico foi baseado na publicação de Rosen (1981), que permite a avaliação do ponto final de descalcificação pelo EDTA, através do uso do oxalato de amônia. Em resumo, durante o teste, se o cálcio se

fizesse presente, um precipitado “leitoso” se formaria. E, se a solução se mantivesse transparente após 20 segundos, indicaria a ausência de cálcio ou o “end-point” do EDTA.

3.3.6.2 Crioprocessamento e criomicrosecção

As amostras dos animais foram crioprotegidas com solução de sacarose 10 %, 20 % e 30 %; infiltradas com matriz (Tissue-Tek, USA); congeladas e cortadas em criostato, em fatias de 5 µm de espessura. As secções foram apanhadas com lâminas ImmunoSlide (EasyPath).

3.3.6.3 Análise utilizando-se microscópio óptico

As secções obtidas em criostato foram coradas com hematoxilina e eosina, assim como com tricrômico de Masson (MASSON, 1929) e as lâminas foram montadas com Entellan New (Merck, Germany). Os cortes efetuados no ultramicrotomo foram apanhados com lamínulas e corados com azul de toluidina, antes das lamínulas serem montadas com Entellan New (Merck, Germany). Uma vez prontas as lâminas foram observadas em microscópio óptico Axioplan (Zeiss, Germany), as imagens capturadas com câmera digital (Evolution MP Color - Media Cybernetics, USA) e armazenadas através do programa QCapture (Media Cybernetics, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Esmalte e dente incisivo inferior de rato Wistar

4.1.1 Análise histológica utilizando-se microscópio óptico

A análise histológica da região apical (Fig. 36 A, B e C) foi importante na elucidação das variações celulares existentes na evolução do desenvolvimento dental. As regiões do nicho de células tronco (setas amarelas), o epitélio basal (seta vermelha, na Fig. 36A), o retículo estrelado (estrelas brancas), o epitélio externo do esmalte (setas pretas), o epitélio interno do esmalte (setas vermelhas, na Fig. 36B), os pré-ameloblastos (bolas amarelas) e os pré-odontoblastos (bolas verdes) são registrados (Fig. 36C). Na figura 37 pode-se observar os ameloblastos (bolas vermelhas) e os fusos de esmalte (setas amarelas).

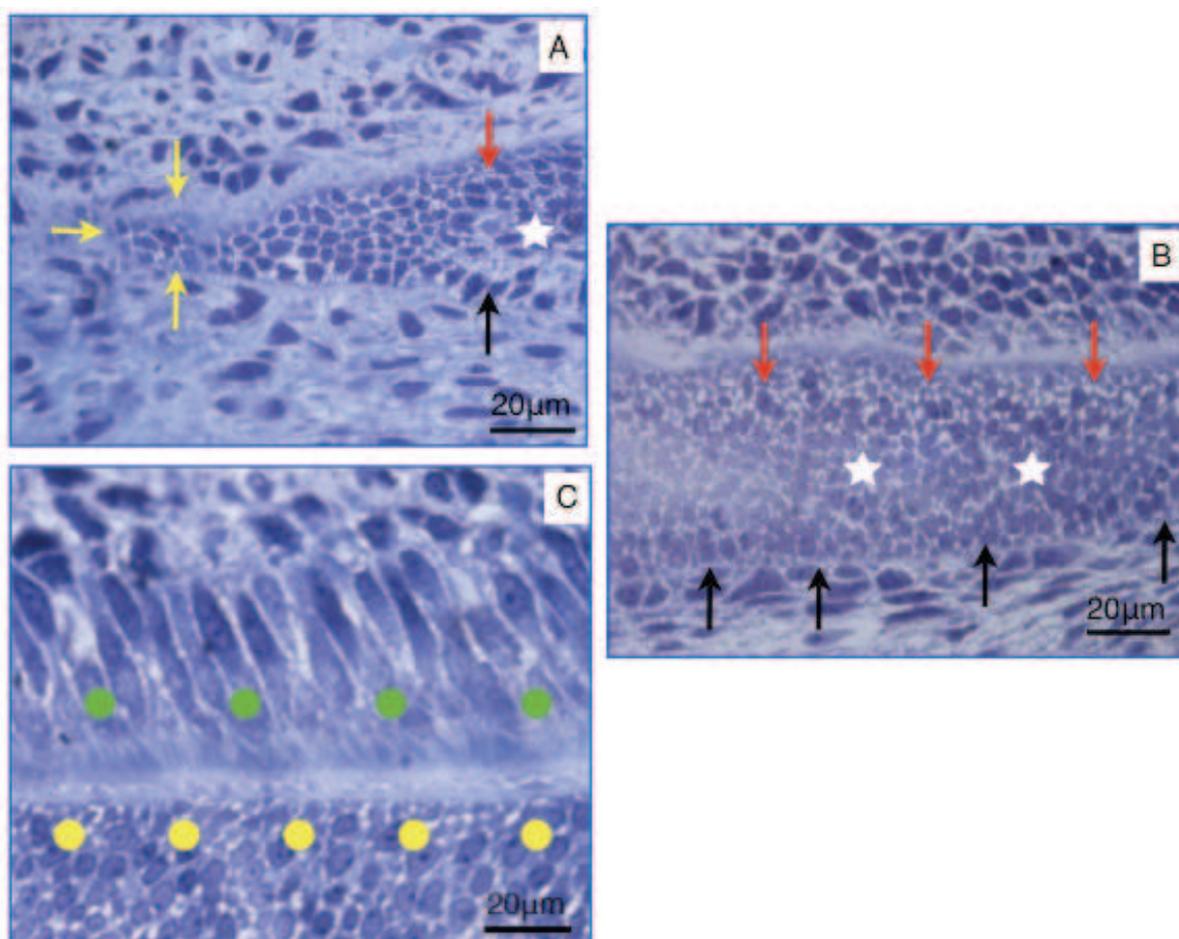


Figura 36 - Imagens da região apical do dente incisivo inferior de rato Wistar. Azul de toluidina. A=início do desenvolvimento do germe dentário, com destaque para o nicho de células-tronco (setas amarelas), epitélio externo do esmalte (seta preta), retículo estrelado (estrela branca) e epitélio basal (seta vermelha); B=nesta imagem, alguns micrometros à frente, vê-se o epitélio externo do esmalte (setas pretas), o retículo estrelado (estrelas brancas) e o epitélio interno do esmalte (setas vermelhas); C=pré-ameloblastos (bolas amarelas) e pré-odontoblastos (bolas verdes).

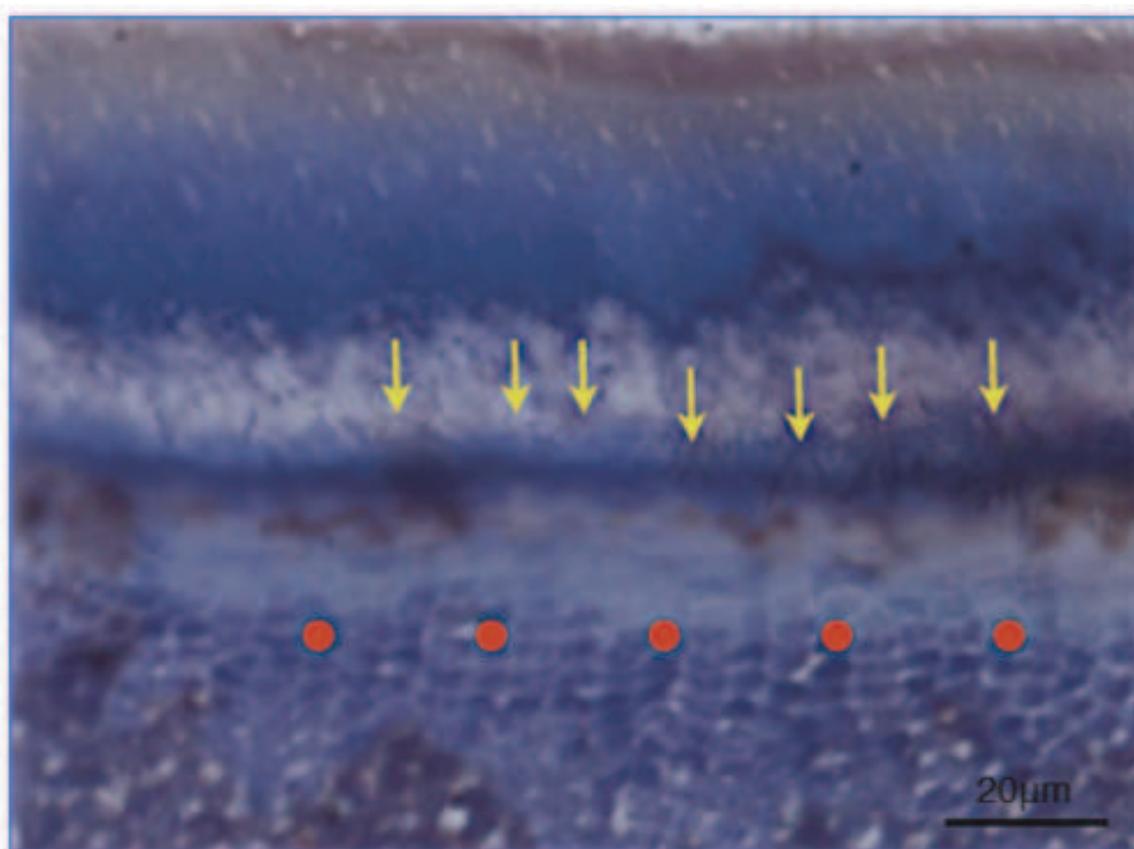


Figura 37 - Região do ápice do dente incisivo de rato Wistar. Destaque para a região de fusos do esmalte (setas amarelas) e ameloblastos (bolas vermelhas). Azul de toluidina.

Nas análises do esmalte maduro jovem, do dente incisivo inferior de rato Wistar, observou-se imagens que informaram sobre a progressão dos ameloblastos, o depósito de matriz e o aspecto cruzado dos bastões do esmalte (Fig.38 e 39).

Na figura 38 A, podemos observar, a partir de um corte transversal, uma região lateral do dente incisivo inferior. Aqui o esmalte apresenta-se mais fino, próximo a alça cervical (círculo tracejado), e vai aumentando em espessura, conforme vai se afastando desta região e caminhando para uma porção mais medial do dente. A figura 38 B mostra, em um corte longitudinal, o início da deposição da dentina (pré-dentina=seta vermelha) e do esmalte (pré-esmalte=seta preta). Ainda na figura 38 B, pode-se observar os processos de Tomes (seta amarela), característicos do período no qual ocorre a deposição da matriz do esmalte.

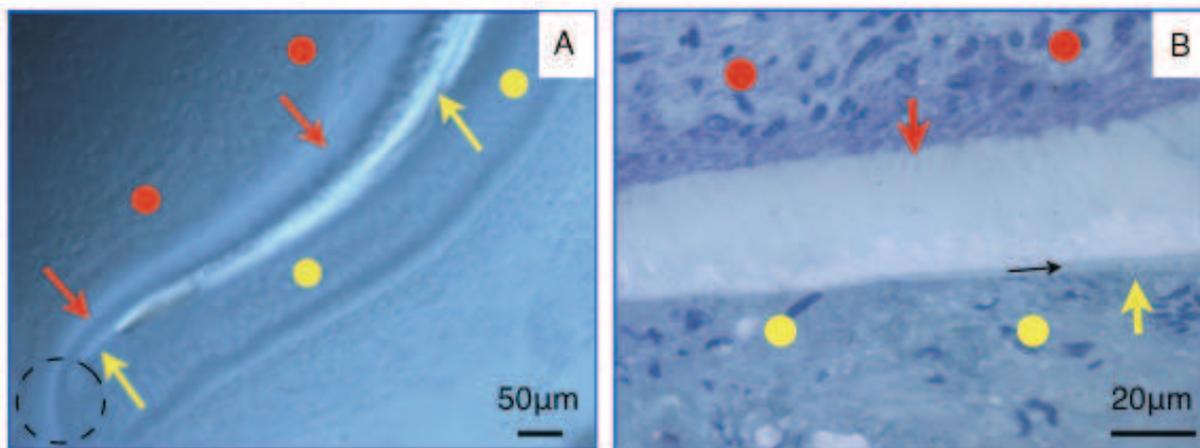


Figura 38 - Imagens em contraste de fase de cortes histológicos do dente incisivo de rato Wistar. Na imagem “A” vê-se em um corte transversal corado com azul de toluidina, uma região mais lateral do dente, possibilitando a observação do crescimento da espessura do esmalte, conforme este caminha para o centro da face vestibular. As setas amarelas mostram regiões de esmalte, as setas vermelhas a dentina, as bolas amarelas a região dos ameloblastos e as bolas vermelhas a região dos odontoblastos. O círculo tracejado mostra parte da alça cervical. Na imagem “B” observa-se, em detalhe, corte longitudinal corado com azul de toluidina mostrando regiões que já apresentam a deposição da matriz do esmalte (pré-esmalte, seta preta), processos de Tomes (seta amarela), pré-dentina (seta vermelha), área referente aos ameloblastos (bolas amarelas) e área referente aos odontoblastos (bolas vermelhas).

4.1.2 Análise através de microscópio eletrônico de varredura

Através da análise em microscópio eletrônico de varredura foi observada a disposição cruzada dos bastões de esmalte (traços azuis e bolas verdes), assim como a presença de esmalte interbastões (setas amarelas) envolvendo e separando cada um dos bastões, independentemente da direção apresentada por estes (Fig. 39 A e B). Observando regiões mais externas, confirmamos a existência de uma fase aprismática (bolas amarelas, Fig. 40 A e B) em íntimo contato com a superfície do esmalte (S, Fig.40 A e B). Na figura 40 A também observa-se a presença de vários bastões que se cruzam (traços azuis) bem próximo da região sem bastões (bolas amarelas). Na figura 40 B, o esmalte sem bastões pode ser visto atingindo a superfície, em uma perspectiva diferente da imagem A. Algumas “folhas” de esmalte (bolas amarelas) encontram-se praticamente paralelas à superfície (S).

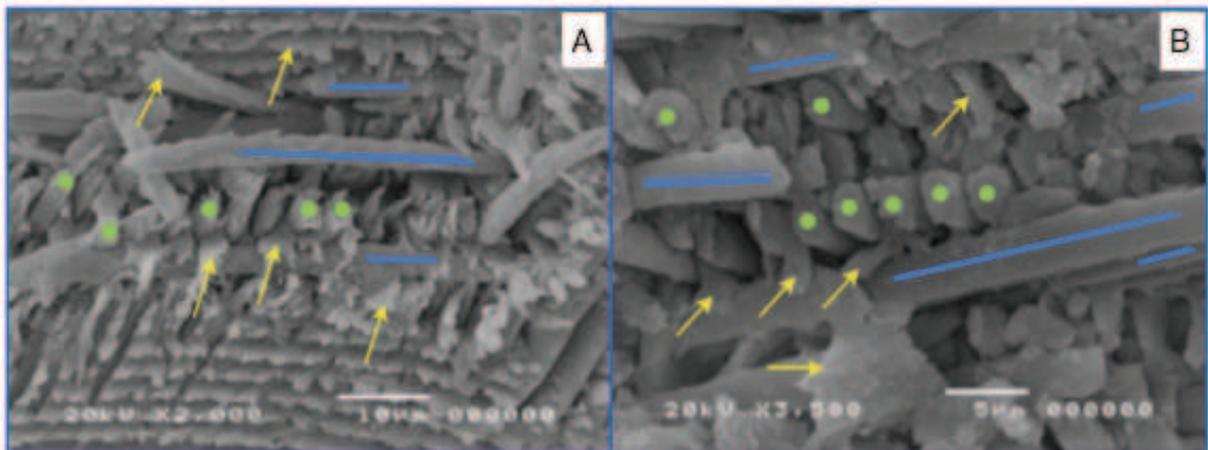


Figura 39 - Secção transversal observada com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura. Em “A” observa-se a organização cruzada dos bastões (círculos verdes e bastões azuis) e a presença do esmalte interbastões (setas amarelas). Na imagem “B”, é visto o detalhe do entrecruzamento (círculos verdes e barras azuis) dos bastões de esmalte. As setas amarelas mostram o esmalte interbastão.

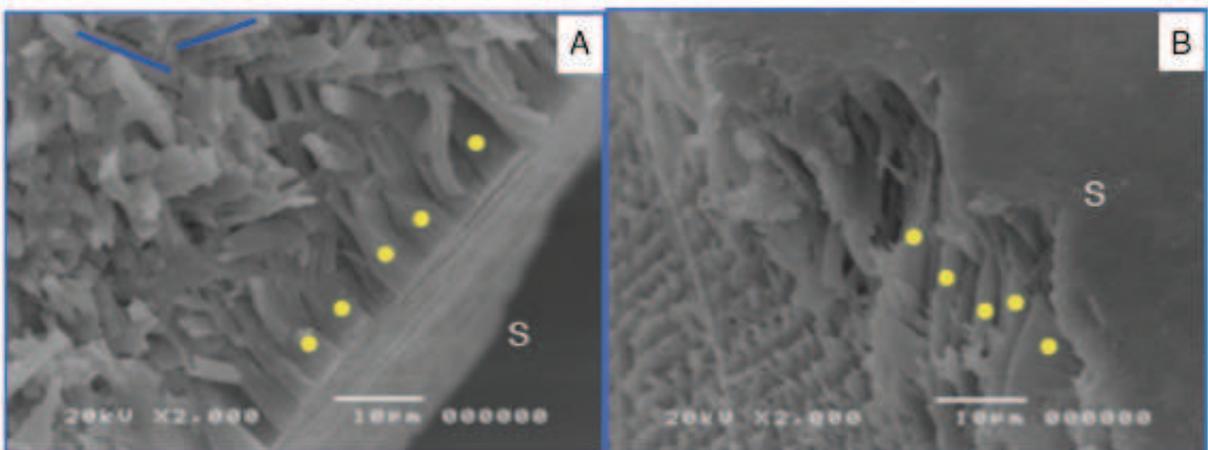


Figura 40 - Na imagem “A” observa-se um corte perpendicular à superfície do esmalte, mostrando o detalhe do esmalte aprismático ou sem bastões (círculos amarelos) na porção mais externa do esmalte. Em “B”, numa secção em ângulo modificado, vê-se as folhas de esmalte aprismático (círculos amarelos) chegando à superfície dental. S=superfície dental.

4.1.3 Reconstrução tridimensional da organização dos ameloblastos secretores

Observou-se que os ameloblastos secretores, tanto nas diferentes fileiras como nas colunas, mantêm contato entre si em regiões específicas, ou seja, ameloblastos existentes em uma determinada camada contactam ameloblastos da mesma camada e de outras camadas vizinhas. Foi

constatado que tais células, inclusive, podem apresentar estes tipos de ligações simultaneamente (Fig.41 A-C).

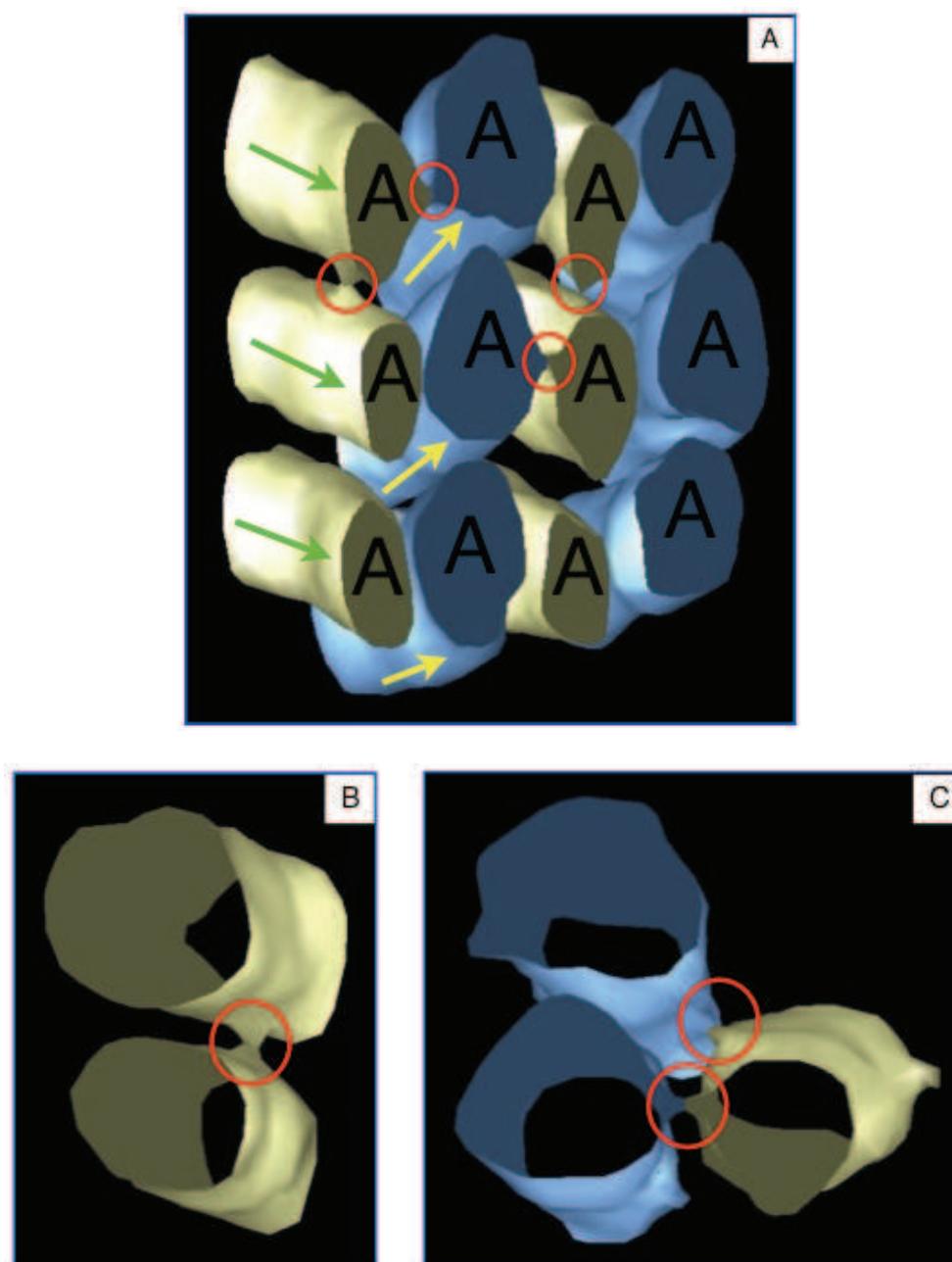


Figura 41 - Reconstrução tridimensional de ameloblastos(A), a partir de cortes histológicos e, posteriormente, trabalhados com a suíte IMOD. Na figura "A", pode-se observar imagem geral dos doze ameloblastos selecionados, após a realização da reconstrução, assim como regiões de contatos (círculos vermelhos) entre vários ameloblastos da mesma camada e/ou de camadas vizinhas. As setas em verde e em amarelo chamam a atenção para o cruzamento dos ameloblastos, nas diferentes camadas. A figura "B" mostra o contato (círculo vermelho) entre dois ameloblastos de uma mesma camada. Na figura "C" o detalhe (círculo vermelho) mostra contatos de um ameloblasto (em amarelo) de uma camada com dois ameloblastos (em azul) de camadas diferentes.

Observa-se também que o corpo dos ameloblastos, em cada camada, orienta-se em paralelo e que o mesmo ocorre nas camadas vizinhas. Entretanto, entre uma camada e a vizinha, a orientação muda. Este padrão lembra o padrão de organização dos bastões de esmalte, mas os ângulos relativos entre os ameloblastos diferem do ângulo entre bastões das camadas vizinhas. As informações obtidas com a reconstrução 3D são inéditas e contribuíram no contexto do artigo científico existente no ANEXO A.

4.2 Caracterização das células do tecido apical do dente incisivo inferior e do dente molar

4.2.1 Vídeomicroscopia

Através de vídeomicroscopia pode-se observar que existe uma grande dinâmica entre as células do tecido apical do dente incisivo inferior. Muitas das células observadas apresentaram nanotubos (PONTES et al., 2008) celulares pelos quais prováveis vesículas e/ou organelas transitam de uma célula para outra (Fig. 42 - setas vermelhas).

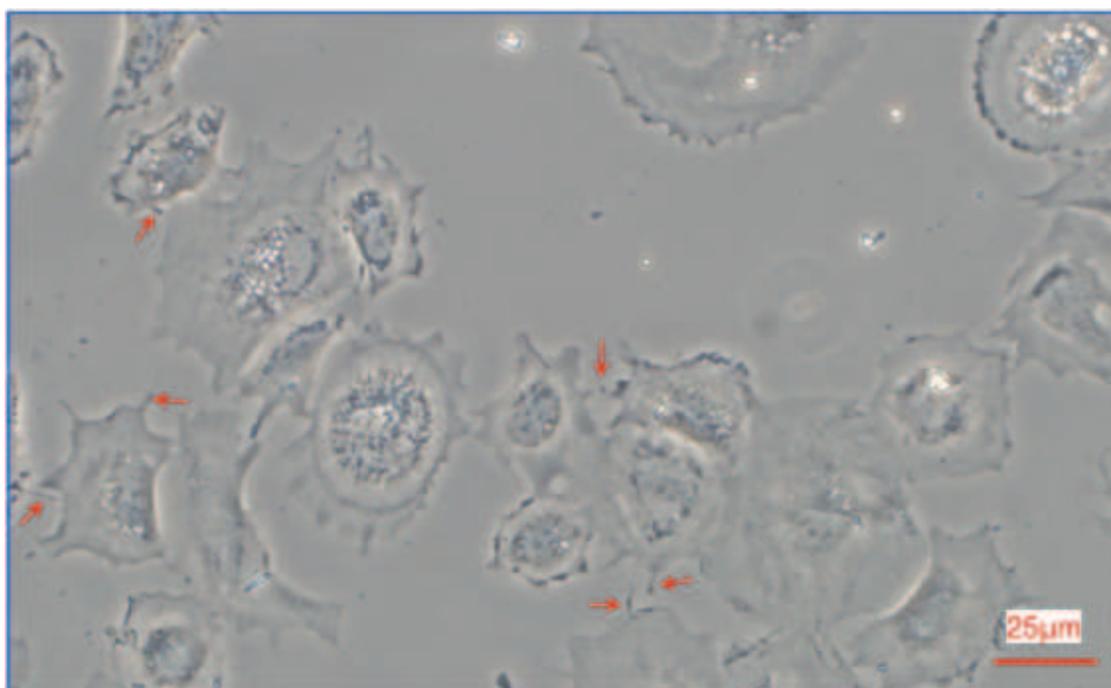


Figura 42 - Imagem extraída de vídeomicroscopia realizada com as células do tecido apical do dente incisivo de rato Wistar em cultura. As setas vermelhas mostram alguns dos nanotubos visualizados na imagem.

Desta forma, as células existentes no tecido apical dos dentes incisivos inferiores constituem um bom modelo para o estudo dos nanotubos, podendo colaborar nos experimentos que visam o entendimento destas estruturas.

Comparadas com as células do incisivo, as células do dente molar, utilizadas como controle, mostraram dinâmica um pouco menor e, igualmente, muitos nanotubos.

4.2.2 Análise de fluorescência com microscópio óptico

Através da utilização do anticorpo primário monoclonal anti-pan-citoqueratina 26 (PCK26) conseguiu-se caracterizar as células da região apical cultivadas e utilizadas nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. A utilização da faloidina FITC, marcando os filamentos de actina, e do DAPI, marcando DNA e, conseqüentemente, evidenciando os núcleos celulares, mostra, na imagem sobreposta, estas diferentes regiões celulares (Fig. 43). A marcação com anti-PCK26 (Fig. 44) evidenciou a região de filamentos intermediários, corroborando com os resultados apresentados por Farges et al. (1991) (Fig. 27).

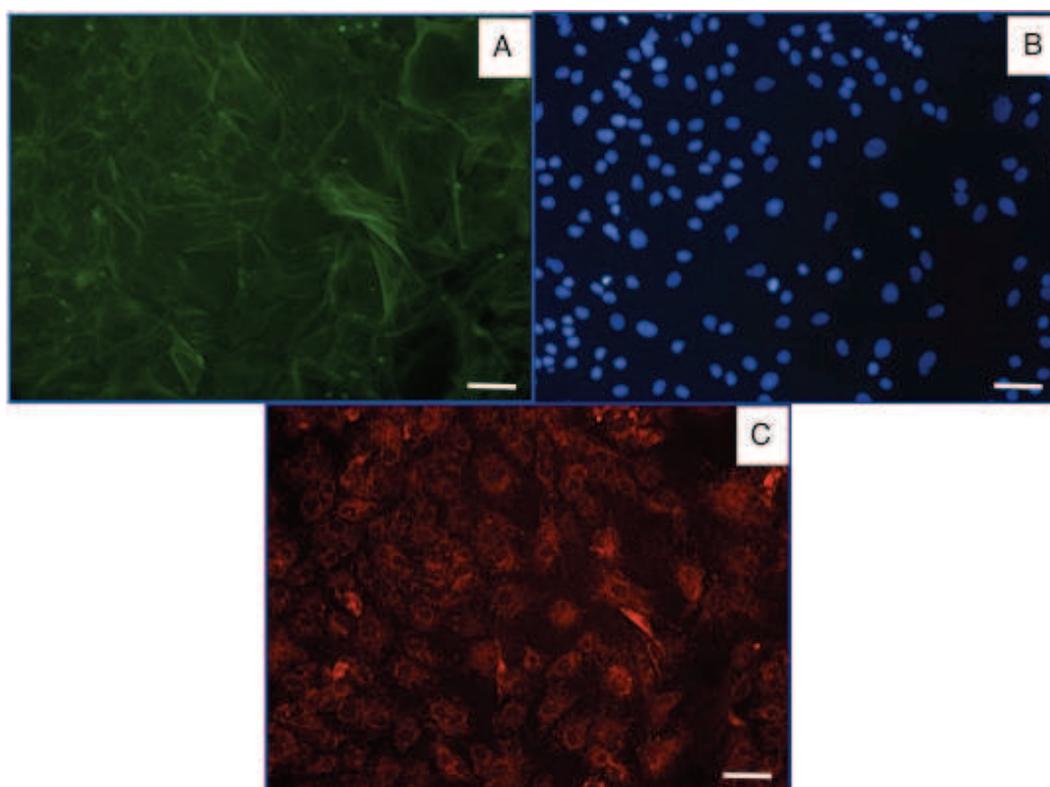


Figura 43 - Imagens de marcações das células do tecido apical do dente incisivo de rato Wistar. A: faloidina - FITC (verde); B: DAPI (azul); C: anti-PCK26 (vermelho). Barra = 50µm.

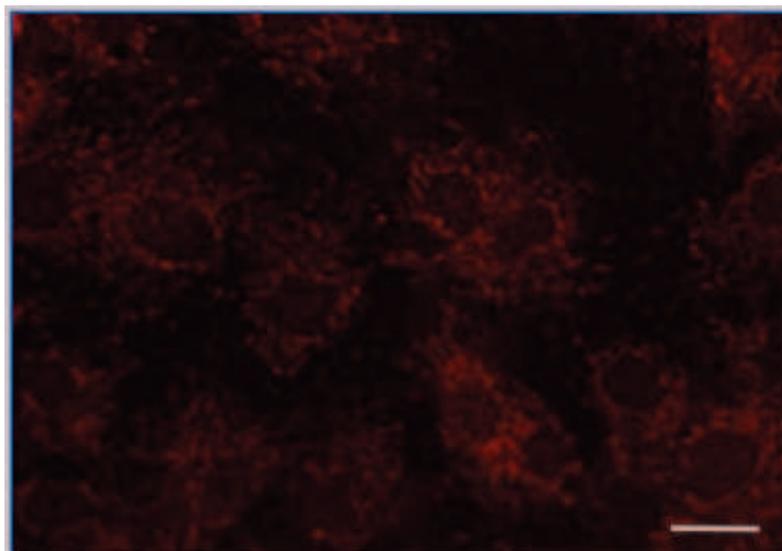


Figura 44 - Detalhe da imunomarcação das células do tecido apical do dente incisivo de rato Wistar, utilizando-se o anti-PCK26. Barra = 25 μ m.

Apesar de conseguida a marcação de tais células com o anti-PCK26, outros anticorpos contra diferentes citoqueratinas, como, por exemplo, o CK14, deverão ser analisados.

Na mesma oportunidade futura, será de grande contribuição a utilização de anticorpos específicos para analisar a existência de outros tipos celulares.

4.2.3 Análise do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar, através da microscopia de fluorescência utilizando microscópio óptico confocal a laser

Através da microscopia confocal de fluorescência, foi constatada a região referente às células epiteliais, precursoras dos ameloblastos, existentes na região apical do dente incisivo inferior de rato Wistar (Fig. 45 A e B). Esta análise mostrou grande eficiência, podendo ser utilizada como um controle para as células isoladas e cultivadas, como realizado neste experimento. Além destas características, a possibilidade de realizar a reconstrução 3D do tecido estudado é de grande valor ilustrativo para análise.

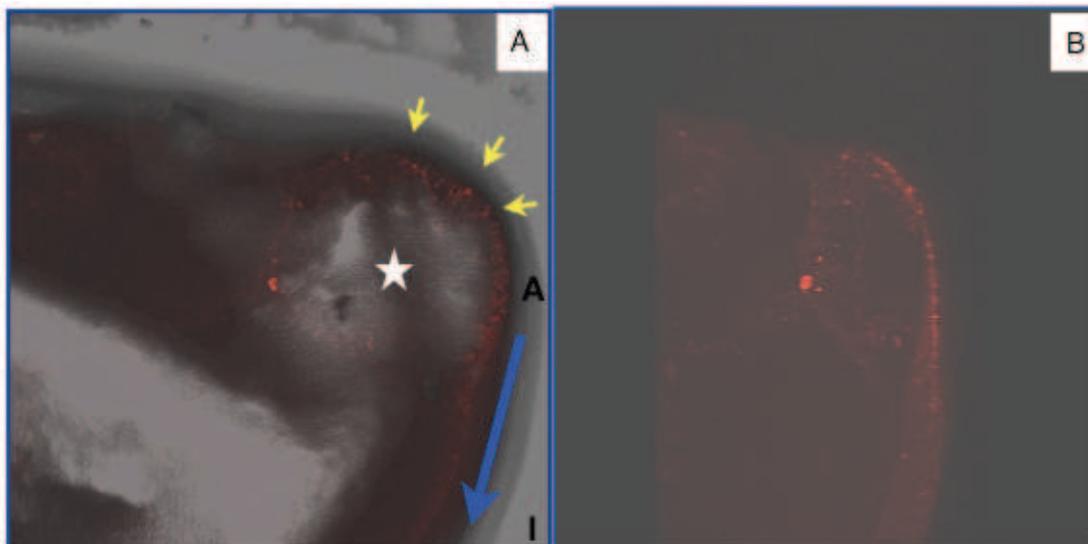


Figura 45 - A imagem “A” mostra o tecido apical do dente incisivo através da sobreposição de imagens de contraste de fase e co-localização da imunomarcagem com anti-PCK26 em duas tomadas da reconstrução tridimensional, realizadas com o microscópio confocal. Setas amarelas = início apical do dente incisivo inferior. Estrela branca = região das células tronco. A seta azul indica o sentido ápico (A) - incisal (I). A Figura “B” mostra a imagem da imunomarcagem com anti-PCK26 em uma tomada da reconstrução tridimensional. Aumento: 10x.

4.3 Arcabouço de colágeno CollaPlug® e arcabouço PHB

4.3.1 Análise da superfície dos arcabouços utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura

Foi observado que o arcabouço CollaPlug® apresenta uma estrutura relativamente uniforme, consistindo de inúmeras folhas que se misturam em variadas posições, formando cavidades com dimensões na faixa de 100-300µm (Fig. 46 A). O arcabouço PHB mostrou-se mais compacto, que o CollaPlug®, formando cavidades com maior dispersão de dimensões (Fig. 46 B).

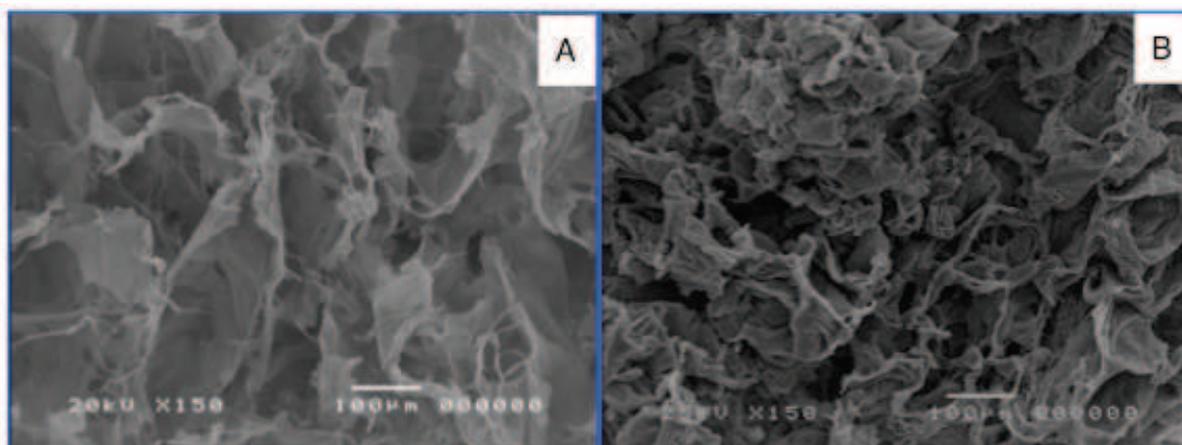


Figura 46 - Figuras mostram análise através de microscopia eletrônica de varredura dos arcabouços CollaPlug® (A) e PHB (B).

4.3.2 Análise das células do tecido apical do incisivo do rato semeadas nos arcabouços CollaPlug® e PHB, através da microscopia eletrônica de varredura

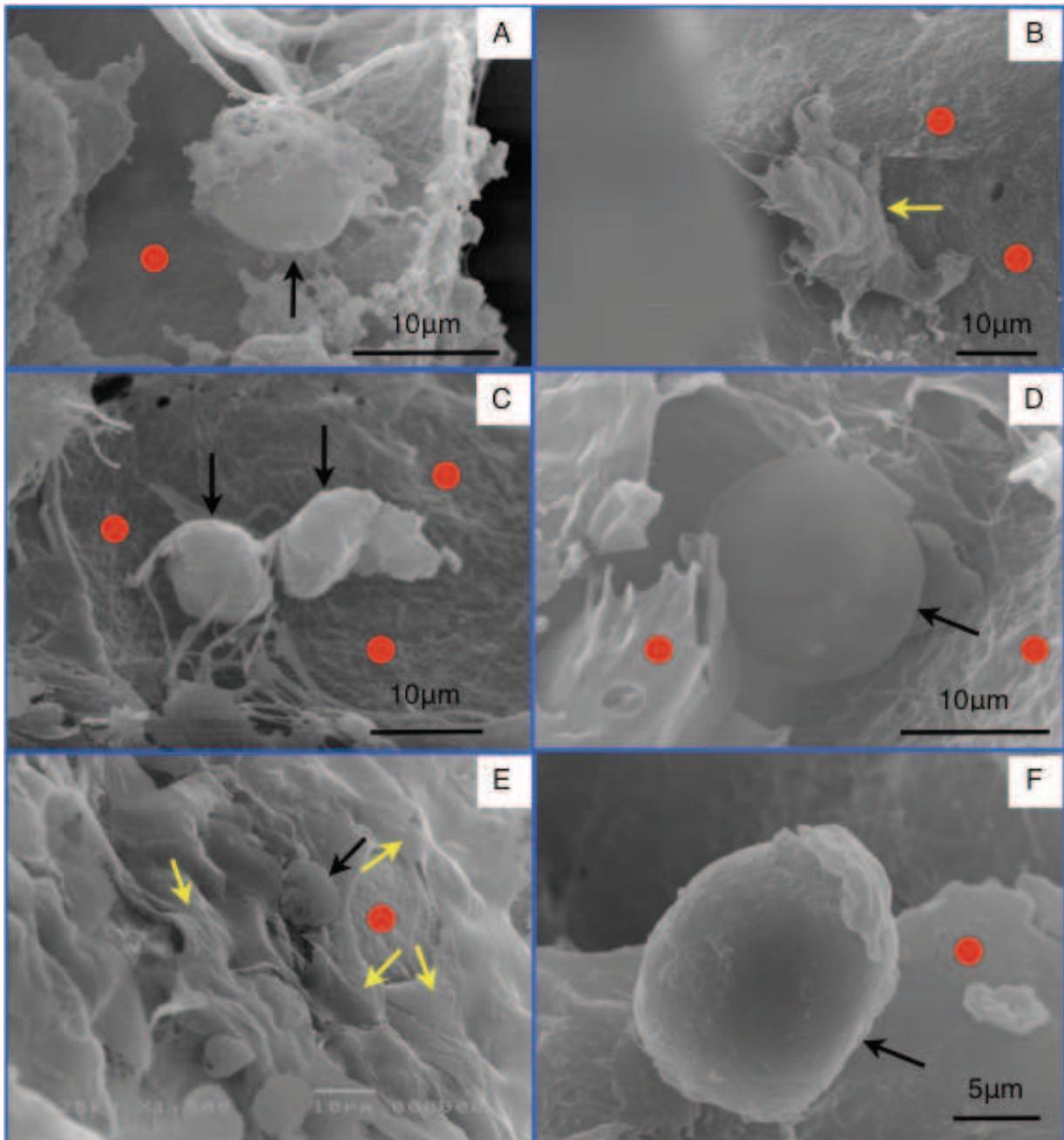


Figura 47 - Imagens de células do tecido apical do dente incisivo inferior de Wistar cultivadas nos arcabouços CollaPlug® e PHB. A - célula em arcabouço CollaPlug® ambientado (*); B - célula em arcabouço PHB ambientado (*); C - célula em arcabouço CollaPlug® não ambientado (*); D - célula em arcabouço PHB não ambientado (*); E - célula em arcabouço CollaPlug® não ambientado (#); F - célula em arcabouço PHB não ambientado (#). 25kV. SS09. WD 16. (*)resultantes de experimento onde as células foram semeadas em lamínula e 24 horas após os arcabouços foram depositados sobre tais lamínulas. (#)resultantes de experimento onde as células foram semeadas diretamente sobre os arcabouços não ambientados. Inferindo nas imagens visualizadas, as setas pretas sinalizam células epiteliais e as setas amarelas células de linhagem mesenquimal. As bolas vermelhas marcam as áreas dos arcabouços.

A observação dos arcabouços celularizados, utilizando a microscopia eletrônica de varredura, mostrou a morfologia celular em um ambiente tridimensional e a adaptação de tais células a estes arcabouços (Fig. 47). Verificou-se uma maior facilidade na visualização de células sobre o arcabouço CollaPlug®, tanto nos experimentos onde tal arcabouço foi ambientado (Fig. 47 A) como nos sem ambientação (Fig. 47 C e E), que superou, de acordo com as nossas observações, a visualização das células nos arcabouços PHB (Fig. 47 B, D e F). Observamos duas formas celulares foram visualizadas neste experimento: uma espalhada, com o máximo contato à superfície do arcabouço, inferimos que estas sejam células de linhagem mesenquimal. O outro tipo celular evidenciado apresentava formato arredondado, com pouco contato com a superfície do arcabouço, inferimos que estas sejam de linhagem epitelial.

De acordo com as avaliações aqui executadas, observamos uma maior aceitação das células pelo arcabouço de colágeno CollaPlug® que pode então ser utilizado como um transportador celular em experimentos que tenham esta necessidade.

4.4 Células do tecido de dente molar inferior de rato Wistar com 4 dias pós-natal

4.4.1 Análise da fluorescência utilizando-se microscópio óptico

Para a imunomarcagem comparativa das células do dente molar, utilizadas como controle, também foi utilizado o anticorpo anti-PCK26. Observou-se uma marcação regional diferente daquelas registradas nas células do tecido apical do dente incisivo inferior, uma vez que sobrepôs a região nuclear, além da reservada aos filamentos intermediários. Estes resultados, mesmo após exaustivas marcações, mostraram a necessidade do aprimoramento da técnica para este tipo celular em experimentos futuros (Fig. 48). Semelhantemente ao realizado para as células do tecido apical do dente incisivo, utilizou-se a faloidina para a marcação dos filamentos de actina e o DAPI para marcar o DNA, sinalizando a localização nuclear.

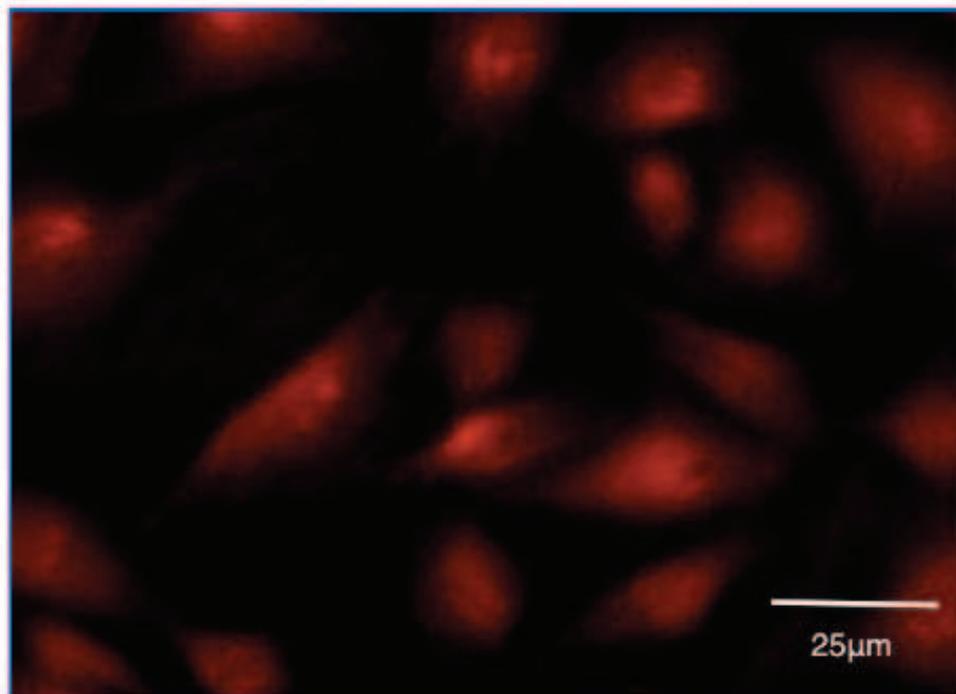


Figura 48 - Imunomarcação das células de molar com 4 dias pós-natal, utilizando-se o anticorpo anti-PCK26.

4.4.2 Análise de fluorescência utilizando microscópio óptico confocal a laser

Através desta análise, pode-se observar a presença e a localização específica das células epiteliais no tecido do dente molar de rato Wistar, com 4 dias pós-natal. A marcação sinaliza uma região semelhante à alça cervical onde se concentram as células do epitélio dentário interno e as células do epitélio dentário externo (Fig.49 e 50).

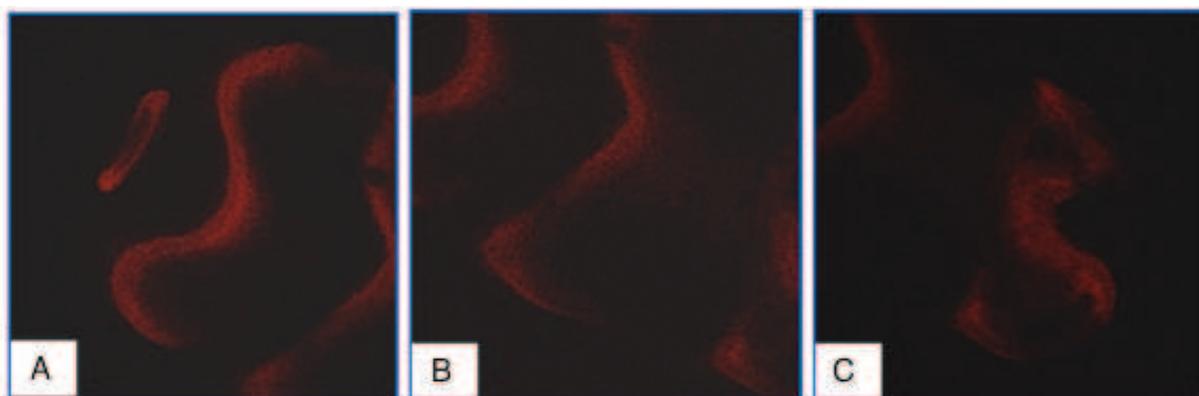


Figura 49 (A, B, C) - Imagem de dente molar de rato Wistar, marcado com anti-PCK26, obtida com o auxílio de microscópio óptico confocal a laser. Aumento: 10x.

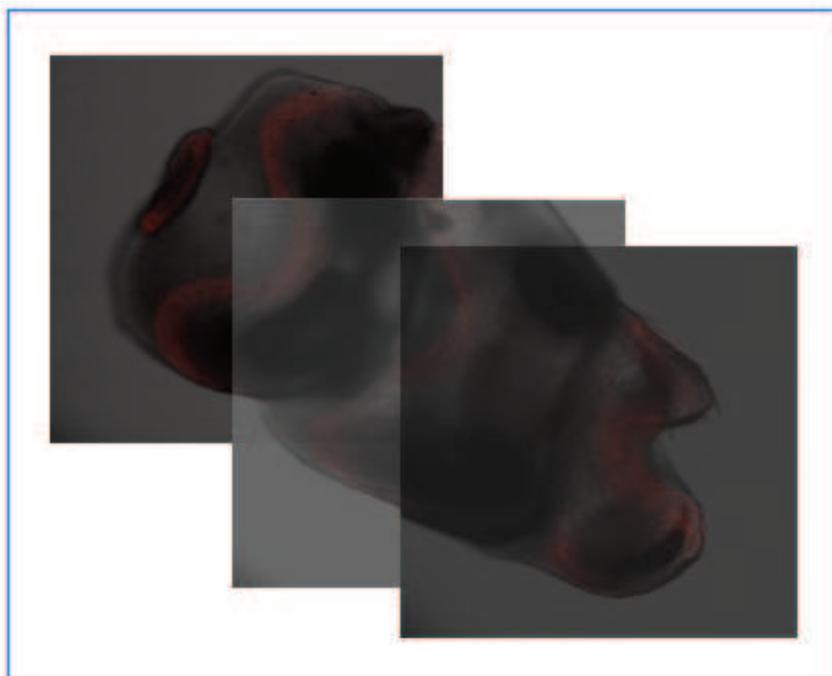


Figura 50 - Conjugação de imagens sobrepostas do dente molar de rato Wistar, com 4 dias pós-natal. As imagens de contraste de fase foram sobrepostas às imagens de fluorescência marcadas com o anticorpo monoclonal anti-PCK 26. Aumento: 10x.

4.5 Amostras com implantação de arcabouços Collaplug® com células do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar

4.5.1 Exame tomográfico computadorizado das ratas que receberam os implantes e da rata controle

A análise tomográfica, revelou a existência de área radiopaca e relevo na hemi-maxila esquerda dos animais implantados e nenhuma imagem semelhante no animal controle (Fig. 51 - A, B, C). Através destes resultados, confirmamos a grande utilidade do exame tomográfico em experimentos cirúrgicos. No entanto, o mesmo continua sendo um auxílio diagnóstico e não pode, por si só, esclarecer o conteúdo das implantações.

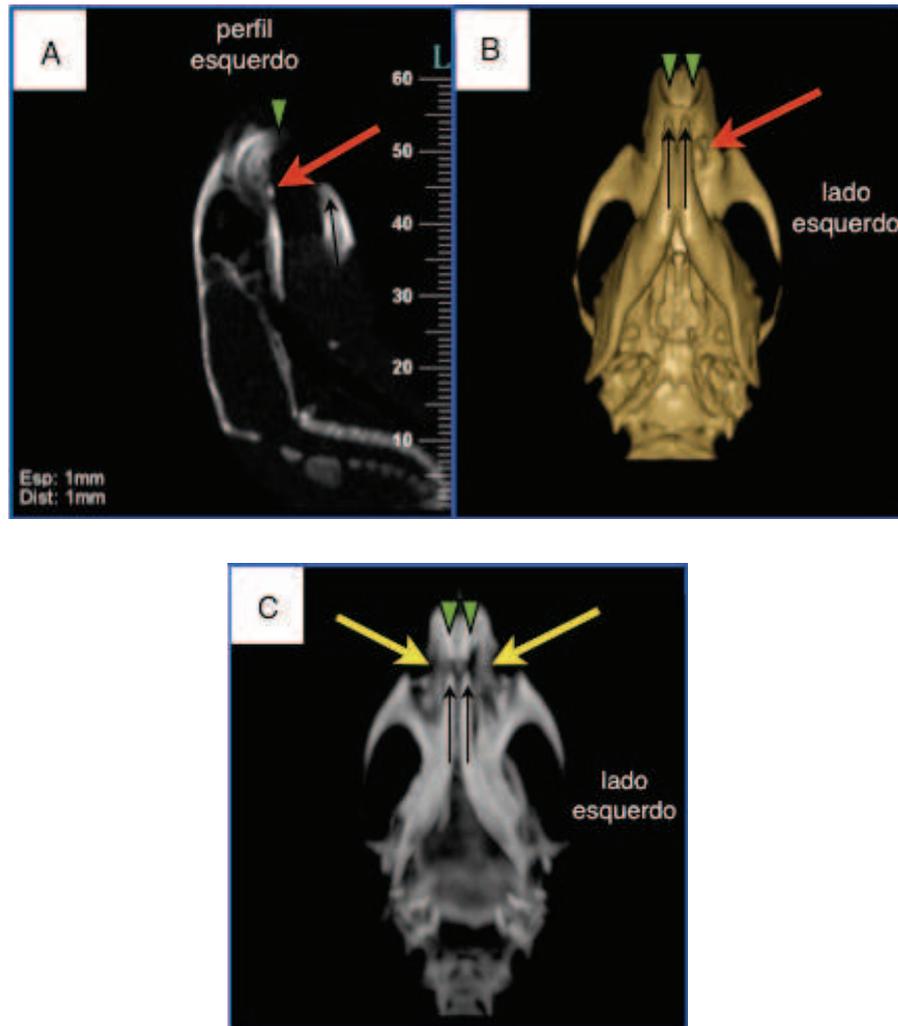


Figura 51 - Imagens tomográficas de ratos utilizados no experimento *in vivo*. A: imagem de perfil; seta vermelha indica área radiopaca visualizada na hemi-maxila esquerda, correspondente à região onde o arcabouço CollaPlug®, com células do tecido apical do dente incisivo inferior, foi implantado. B: reconstrução 3D de rato que recebeu a implantação do arcabouço celularizado, sendo a região deste último sinalizada pela seta vermelha. C: imagem tomográfica do animal controle; as setas amarelas sinalizam a semelhança entre lados direito e esquerdo. Cabeças de setas verdes indicam os dentes incisivos superiores. As setas pretas indicam os dentes incisivos inferiores.

4.5.2 Análise utilizando-se microscópio óptico

4.5.2.1 Amostras desmineralizadas

Após o período de desmineralização, as secções das amostras com os arcabouços CollaPlug® celularizados implantados foram observadas e não foi possível confirmar a existência do desenvolvimento de tecidos dentários (Fig. 52 e 53). No entanto, pode-se avaliar a biocompatibilidade do arcabouço para a utilização em experimentos *in vivo*, mas experimentos futuros

devem ser realizados, seguindo este modelo experimental, variando as quantidades de células semeadas, assim como tipos celulares e sítios de implantação, visando o maior entendimento dos resultados obtidos nesta etapa inicial.

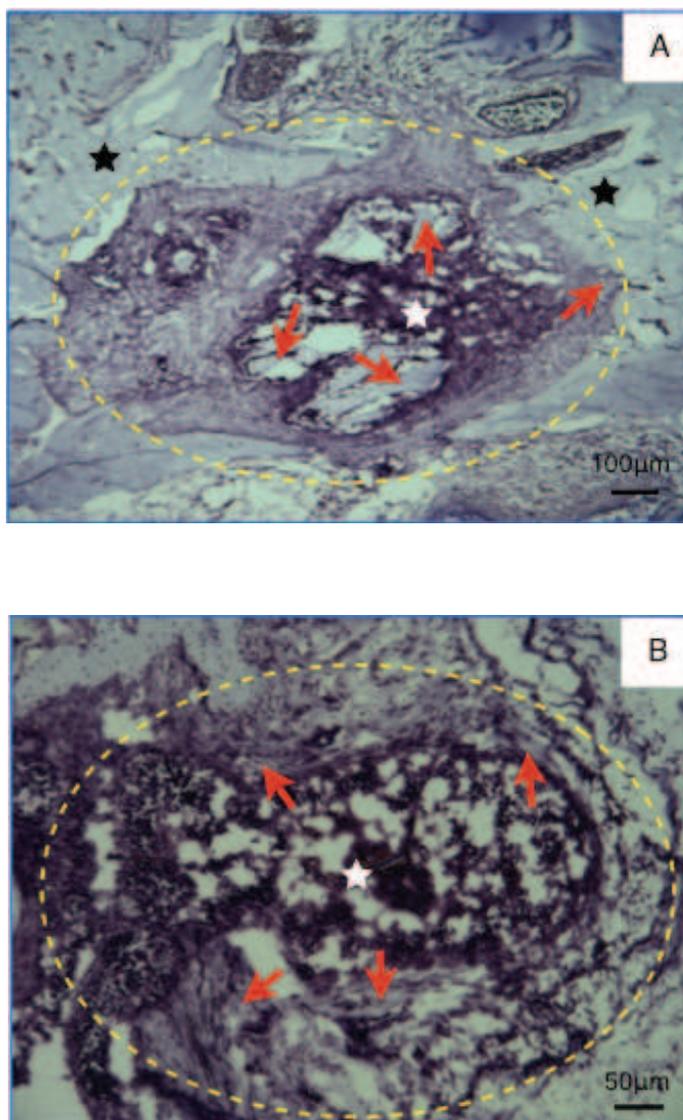


Figura 52 - Imagens de amostras dos implantadas, desmineralizadas, crioprocessadas e coradas com tricrômico de Masson. As figuras A e B, mostram secções de animais que receberam o arcabouço com células do tecido apical do dente incisivo inferior. O tracejado em amarelo evidencia a região onde ocorreram as implantações. As estrelas brancas sinalizam o arcabouço de colágeno celularizado. As estrelas pretas mostram regiões de osso antigo. As setas vermelhas, regiões de osso novo.

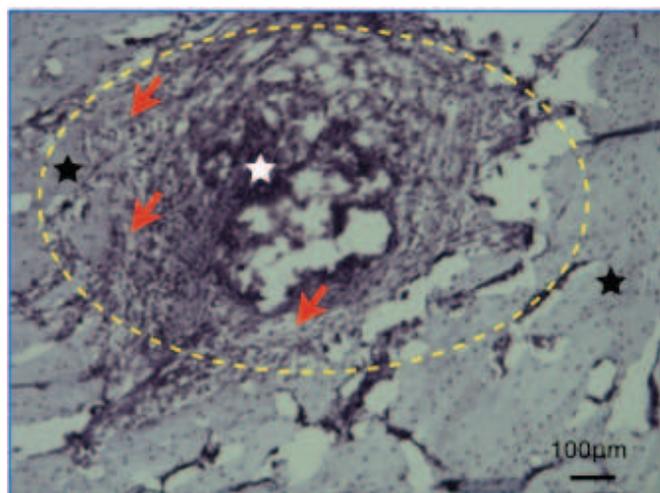


Figura 53 - Imagem de amostra implantada, desmineralizada, crioprocessada e corada com tricrômico de Masson. Secção do animal que recebeu o arcabouço sem células (controle). O tracejado em amarelo evidencia a região onde ocorreram as implantações. As estrelas brancas sinalizam o arcabouço de colágeno celularizado. As estrelas pretas mostram regiões de osso antigo. As setas vermelhas, regiões de osso novo.

5 DISCUSSÃO

5.1 Aspecto tridimensional dos ameloblastos e do esmalte do dente incisivo inferior de rato Wistar

Modelos experimentais utilizando células de incisivos inferiores de roedores, ratos e camundongos, exibem crescimento contínuo, a mesma arquitetura do esmalte (RISNES, 1979a) e todos os estágios de formação ao longo do seu eixo dental, além de conterem os mesmos elementos estruturais do esmalte humano. Tais modelos tornam-se ideais (SUGA, 1959; SMITH e WARSHAWSKY, 1976; LEBLOND e WARSHAWSKY, 1979) quando associados àquelas informações sobre sua ultra-estrutura, permitindo detectar anormalidades (GIBSON et al., 2001; MILETICH e SHARPE, 2003; RISNES et al., 2005; FLEISCHMANN et al., 2008) que, por ventura, possam ocorrer em dentes resultantes da engenharia tecidual.

A morfologia espacial dos ameloblastos e suas respectivas trajetórias padronizam o esmalte dental maduro. A reconstrução tridimensional de cortes histológicos seriados, um processo elaborado e que consome tempo (WARE e LO PRESTI, 1975), tem progredido permitindo análises mais fidedignas e técnicas de processamento mais rápidas (MOENS e MOENS, 1981). Como nos resultados apresentados no item 4.1.3, diferentemente de uma única secção, as reconstruções viabilizaram a análise do movimento dos ameloblastos e de suas conexões intercelulares, permitindo progressos no entendimento da dinâmica de tais células. O resultado obtido no experimento mostrou contatos entre ameloblastos de diferentes colunas e camadas, além dos contatos entre ameloblastos de mesmas colunas e camadas.

Vários autores têm observado a complexa estrutura tridimensional do esmalte, utilizando a microscopia óptica e a microscopia eletrônica de varredura (TOMES, 1850; BOYDE, 1965; FOSSE et al., 1973; WARSHAWSKY et al., 1981; NANJI e WARSHAWSKY, 1984; RISNES, 1987; WARSHAWSKY, 1989; MØINICHEN et al., 1996; SILVA, 2003). Embora a relação entre os ameloblastos e o esmalte, na formação da topografia deste último, ainda seja um desafio para o entendimento da sua construção (RISNES et al., 2002), o trabalho aqui apresentado, a partir da tridimensionalização das secções histológicas, mostra informações ainda

não descritas na literatura confirmando, visualmente, a diferença de angulação existente entre os ameloblastos das diferentes colunas.

5.2 Obtenção e cultivo das células do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar

A técnica de obtenção do tecido apical dos dentes incisivos inferiores de rato Wistar não apresenta-se muito bem descrita na literatura. Alguns autores (FARGES et al., 1991; HARADA et al., 1999; KAWANO et al., 2004; OHSHIMA et al., 2005), descrevem a técnica superficialmente, sem esclarecer as etapas cirúrgicas de obtenção destes tecidos. Estes autores fizeram uso de animais recém-nascidos e jovens, com idade de 2-30 dias pós-natal, diferentemente do experimento executado nesta dissertação, que utilizou ratos adultos, com idades entre 4-6 meses, com a finalidade de confirmar a característica de produção incessante de células precursoras dos tecidos dentais, mantidas, ao longo da vida destes animais, pelo nicho de células tronco existente no ápice dental (OHSHIMA et al., 2005). Observamos que ratos de 6 meses possuem uma redução no tamanho do nicho de células tronco, quando comparados com os ratos de 4 meses. Quando comparada a quantidade de tecido obtida no ápice dos incisivos inferiores com a de tecidos obtidos nas regiões de dentes molares de ratos com 4 dias pós-natal, observa-se que os tecidos de todos os molares juntos produzem um volume maior. No entanto, o fato do dente incisivo poder ser analisado no decorrer de todo o seu desenvolvimento, permite um melhor controle da interpretação dos resultados experimentais. Além disso, o nicho de células tronco existente pode funcionar, ao mesmo tempo, como ferramenta ou material/tecido de pesquisa.

As células epiteliais da região apical do dente incisivo de rato foram caracterizadas por Farges et al., em 1991. Para cultivá-las, utilizaram um substrato de fibroblastos 3T3 (RHEINWALD e GREEN, 1975) sobre lamínulas e meio DMEM/F-12 suplementado com 10 % soro fetal bovino, hidrocortisona, insulina, toxina da cólera e fator epidermal de crescimento. Harada et al., em 1999, para cultivar o tecido apical de incisivos inferiores, utilizaram um tipo de cultura para órgãos preconizada por Trowell (TROWELL, 1959). Foi usado um meio de cultura com DME suplementado com 10 % de soro fetal bovino, glutamato I e ácido ascórbico. Kawano et al., em 2004, utilizaram DMEM/F-12 suplementado com 10 %

de soro fetal bovino e proteína recombinante Fgf10 para o cultivo de células do tecido apical do dente incisivo inferior de rato.

Todas as publicações citadas no parágrafo anterior, possuem uma abordagem direcionada ao cultivo para a caracterização tecidual e celular. Desta forma, o protocolo de cultivo para a execução do experimento descrito neste trabalho associou tais informações, mesclando-as às técnicas descritas por Young et al. (2002) e Duailibi et al. (2004).

O protocolo desenvolvido conseguiu isolar e manter as células epiteliais precursoras dos ameloblastos por períodos de 14 dias, visando a implantação das mesmas. Foi observada a sobreposição de células ou organização em dupla camada, característica mencionada por Farges et al. (1991), assim como um período para a confluência de 10-12 dias. Cultivos por longos períodos podem exigir a inclusão de fatores de crescimento, tais como mencionados por Farges et al. (1991) e Kawano et al. (2004).

5.3 Cultivo de células do tecido apical do dente incisivo inferior de rato Wistar em arcabouço de colágeno CollaPlug®

A escolha do arcabouço de colágeno tipo I CollaPlug®, para a semeadura e implantação das células foi norteadada pela experiência clínica prévia do autor com a sua utilização em alvéolos de extração dentária, demonstrando um processo seguro na sua esterilização, assim como pela sua biocompatibilidade e facilidade de aquisição. Nos experimentos realizados *in vitro* e observados em microscopia eletrônica de varredura, pode-se comprovar a adaptação das células do tecido apical do dente incisivo ao arcabouço de colágeno CollaPlug®, principalmente ao arcabouço seco ou não ambientado.

No entanto, a grande maioria das publicações relacionadas à bioengenharia tecidual dental, utilizam arcabouços de ácido poliglicólico (PGA) para a transferência das células precursoras dentais aos animais receptores (YOUNG et al., 2002; DUAILIBI et al., 2004; IWATSUKI et al., 2006). Isto, provavelmente, foi incentivado pelo trabalho publicado por Choi & Vacanti (1997) relacionado à engenharia tecidual de pequenas estruturas semelhantes ao intestino.

Silver & Pins (1992) e Chevally et al. (2000) enfatizam que a composição do colágeno é similar à da matriz extracelular, apresentando baixa

imunogenicidade e baixa toxicidade. Apontam também a facilidade na sua manipulação possibilitando a sua conformação em formatos variados. Além disso, características como o poro da estrutura da esponja de colágeno, dito como ideal à colonização celular, e a conhecida promoção da diferenciação dos osteoblastos, aumentando a formação óssea (SEOL et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2005), sugerem um grande potencial para o colágeno como material de arcabouços a serem utilizados na bioengenharia tecidual dental.

Recentemente, Ikeda et al. (2009), confirmaram a indicação do colágeno na confecção de arcabouços para o transporte das células precursoras dentais até o animal receptor, com fins à construção dental. Nos nossos experimentos pudemos comprovar a afeição das células do tecido apical do dente incisivo ao arcabouço de colágeno tipo I CollaPlug®, tornando-o indicado ao transporte celular e ferramenta para futuras pesquisas.

5.4 Formação de tecidos dentais a partir da implantação celular

A identificação de populações de células tronco dentais associada ao desenvolvimento de métodos para promover a expansão destas células em arcabouços tridimensionais (3D) representam a base da engenharia tecidual exercida através de matrizes poliméricas celularizadas. A observação da formação de novos elementos dentários nos arcos maxilares e mandibulares representa o objetivo futuro e final deste processo. Alguns trabalhos têm mostrado a formação de um padrão cúspide-coroa irregular ou anormal dos dentes formados através da engenharia tecidual (HONDA et al., 2005; YOUNG et al., 2005).

Alguns autores têm mostrado resultados positivos para a formação de tecidos dentais a partir da implantação celular, repondo um elemento dental funcional construído através da bioengenharia tecidual, embora com deficiências morfológicas (Ikeda et al., 2009). Iwatsuki et al., em 2006, utilizaram arcabouços 3D fabricados em PGA, com dimensões de 1 mm³, cobertos com colágeno tipo I antes da semeadura de 1 x 10⁵ células de germes do primeiro molar mandibular de embriões de camundongo na E14; sendo implantados na cápsula renal de camundongos hospedeiros. Este experimento demonstrou que tais células do germe do dente molar retêm a capacidade de reproduzir dentes que

apresentaram estruturas normais de coroas com cúspides, compostas por esmalte e dentina cobrindo um tecido semelhante à polpa.

Na etapa *in vivo* do experimento desenvolvido para esta dissertação, foi preconizado um modelo crítico, com alto grau de dificuldade, associando área doadora celular, arcabouço, técnica de cultivo celular e técnica de implantação, conhecidos e comprovados cientificamente, em uma nova abordagem. Tendo a área de diastema como região de implantação, este modelo tentou reproduzir a mesma situação clínica de pacientes que tiveram seus dentes perdidos há alguns anos e toda a estrutura organizacional dental, inclusive a de suporte periodontal, necessitam ser recriadas. Diferentemente da abordagem apresentada, com sucesso, por Ikeda et al. (2009), que utilizou um alvéolo fresco para a implantação do arcabouço com as células, o modelo do diastema maxilar de roedores, apresentado aqui, é capaz de testar a real capacidade de uma terapia de bioengenharia tecidual dental, uma vez que tal região receptora em ratos adultos não apresenta, que se conheça até o momento, fatores de transcrição ou genes capazes de disparar e promover o desenvolvimento dental, semelhantemente à regiões que apresentam ausências de dentes definitivos, em humanos.

Recentes elucidações têm mostrado uma vasta rede de sinalizações regulando todo o processo da odontogênese e reforçando a necessidade de uma conjugação entre células, arcabouço e fatores genéticos (FERGUSON et al., 1997; MONREAL et al., 1999; HEADON E OVERBEEK, 1999; GRUNEBERG, 1971; TUCKER ET AL., 2004; OHAZAMA et al., 2004).

De igual importância são avaliações futuras visando a análise de diferentes técnicas de desmineralização e seus controles, visando o aprimoramento do manuseio requisitado para tecidos formados através da engenharia tecidual.

6 CONCLUSÕES

6.1 Extração e manutenção das células do tecido apical do incisivo inferior de rato Wistar

Através deste estudo, concluiu-se que utilizando o protocolo preconizado para a extração do tecido apical dos dentes incisivos inferiores de ratos adultos, assim como lançando mão da técnica de cultivo apresentada, é possível utilizar tais células objetivando o estudo da bioengenharia tecidual dental.

6.2 Manutenção das células do tecido apical do incisivo inferior de rato Wistar no arcabouço de colágeno CollaPlug®

No experimento apresentado, conseguiu-se manter as células do tecido apical no arcabouço utilizado, sendo conclusivo, positivamente, a característica de manutenção e transporte celular do arcabouço CollaPlug® x PHB.

6.3 Implantação *in vivo* do arcabouço celularizado na região de diastema maxilar de rato Wistar

Este trabalho concluiu que a região de diastema, pelo seu acesso facilitado e relativa proximidade de reprodução de regiões com ausências de elementos dentários permanentes, pode ser utilizada para testar técnicas objetivando a bioengenharia tecidual dental. Concluiu-se também que novos ensaios deverão ser realizados alterando a quantidade celular semeada no arcabouço e que fatores de crescimento deverão ser selecionados e utilizados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe K, Miyoshi K, Muto T, Ruspita I, Horiguchi T, Nagata T, Noma T. Establishment and characterization of rat dental epithelial derived ameloblast-lineage clones. *J Biosc Bioengineering* 2007;103:479-485.

Åberg T, Cavender A, Gaikwad JS, et al. Phenotypic changes in dentition of Runx2 homozygote-null mutant mice. *J Histochem Cytochem* 2004a;52:131-139.

Åberg T, Wang XP, Kim JH, Yamashiro T, Bei M, Rice R, Ryoo HM, Thesleff I. Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. *Dev Biol* 2004;270:76-93.

Adams AE. An experimental study of the development of the mouth in the amphibian embryo. *J Exp Zool* 1924;40:311-379.

Aoba T, Moreno EC. Changes in the nature and composition of enamel mineral during porcine amelogenesis. *Calcif Tissue Int* 1990;47:356-364.

Arsenault LR, Robinson BW. The dentino-enamel junction: a structural and microanalytical study of early mineralization. *Calcif Tissue Int* 1989;45:111-121.

Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science* 1995;268:225-232.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999;284:770-776.

Artavanis-Tsakonas S, Simpson P. Choosing a cell fate: a view from the Notch locus. *Trends Genet* 1991;7:403-408.

Bancroft JD, Gamble M, editors(2002). *Theory and practice of histological techniques*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p.743, p.153, p.293.

Bei M, Maas R. FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* 1998; 125:4325-4333.

Belcourt AB, Fincham AG, Termine JD. Acid-soluble bovine fetal enamelins. *J Dent Res* 1982;61:1031-1032.

Berg RA, Prockop DJ. Purification of (14C) protocollagen and its hydroxylation by prolyl-hydroxylase. *Biochemistry* 1973;12:3395-3401.

Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and BMP genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interactions in the mouse embryo. *Dev Biol* 1995; 172:126-138.

Blanco R, Chakraborty R, Barton SA, Carreño H, Paredes M, Jara L, Palomino H, Schull WJ. Evidence of a sexdependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. *Hum Biol* 2001;73:81-89.

Blecher SR. Amelogenin genes and sexual dimorphism of teeth in humans and mice. *Am J Hum Genet* 1992;5:1451-1452.

Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater* 2008;16:1-9.

Boyde A.(1965) The structure of development of mammalian dental enamel. In: *Tooth enamel*, pp.163-167. Bristol: John Wright & Sons.

Britt JC, Park SS. Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:671-677.

Brookes SJ, Lyngstadaas SP, Robinson C, Shore RC, Kirkham J. Intracellular nanosphere subunit assembly as revealed by amelogenin molecular cross-linking studies. *Eur J Oral Sci* 2006;114:(Suppl. 1)280-284.

Brown WE. Crystal growth of bone mineral. *Clin Orthop* 1966;44:205-220.

Brown WE, Smith JP, Lehr JR, Frazier WA. Octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* 1962;196:1048-1055.

Brudevold F, Söremark R.(1967) Chemistry of the mineral phase of enamel. In: *Structural and chemical organization of teeth*, vol. 2, pp. 247-277. New York: Academic Press

Butler PM. Ontogenic aspects of dental evolution. *Int J Dev Biol* 1995;39:25-34.

Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilising a polymer-cell construct to produce tissue engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 1997;100:297-302.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 2000;127:1671-1679.

Chapman VM, Keitz BT, Disteché CM, Lau EC, Snead ML. Linkage of amelogenin (Amel) to the distal portion of the mouse x-chromosome. *Genomics* 1991;10:23-28.

Chen YP, Bei M, Woo I, Satokata I, Mass R. Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development* 1996;122:3035-3044.

Chen YP, Maas R. Signaling loops in the reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of mammalian tooth development. In: C-M Chuong, RG Landes, eds. *Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis*. Austin, TX 1998:265-282.

Chevallay B, Abdul-Malak N, Herbage D. Mouse fibroblasts in long-term culture within collagen three-dimensional scaffolds: influence of crosslinking with diphenylphosphorylazide on matrix reorganization, growth, and biosynthetic and proteolytic activities. *J Biomed Mater Res* 2000;49:448-459.

Chibon P. Analyse expérimentale de la régionalisation et des capacités morphogénétiques de la crête neurale chez l'amphibien urodele *Pleurodeles waltlii* michah. *Mem Soc Zool (France)* 1966;36:1-122.

Chibon P. L'origine de l'organe adamantin des dents. Etude au moyen du marquage nucléaire de l'ectoderme stomodéal. *Ann Embryol Morphogen* 1970;3:203-312.

Choi RS, Vacanti JP. Preliminary studies of tissue-engineered intestine using isolated epithelial organoid units on tubular synthetic biodegradable scaffolds. *Transplant Proc* 1997;29:848-851.

Coin R, Kieffer S, Lesot H, Vonesch JV, Ruch JV. Inhibition of apoptosis in the primary enamel knot does not affect specific tooth crown morphogenesis in the mouse. *Int J Dev Biol* 2000;44:389-396.

Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikei Y, Ruch JV. Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int J Dev Biol* 1999;43:261-267.

Cobourne MT, Hardcastle Z, Sharpe PT. Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *J Dent Res* 2001; 80:1974-1979.

Cobourne MT, Miletich I, Sharpe PT. Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development. *Development* 2004;131:2875-2885.

Crubez E, Murail P, Girard L, et al. False teeth of the roman world. *Nature* 1998;391:29.

Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 2000; 127:4775-4785.

Dassule HR, McMahon AP. Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol* 1998;202:215-227.

Dee KC, Puleo DA, Bizios R.(2002) Proteins. In: An introduction to tissue-biomaterial interactions, pp. 15-36. Ed. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.

Deutsch D, Catalano-Sherman J, Dafni L, David S, Palmon A. Enamel matrix proteins and ameloblast biology. *Connect Tissue Res* 1995a;32:97-107.

Deutsch D, Haisraeli M, Palmon A, Arad A, Alayoff A. (1986) Separation, purification and characterization of enamel proteins using HPLC, 2D electrophoresis and specific polyclonal antibodies. In *Current Advances in Skeletogenesis*(Eds. J. Sela and S. Horowitz). Heileger Publishers, Jerusalem, pp. 165-178.

Deutsch D, Haze-Filderman A, Blumenfeld A, Dafni L, Leiser Y, Shay B, Gruenbaum-Cohen Y, Rosenfeld E, Fermon E, Zimmerman B, Haegewald S, Bernimoulin J-P, Taylor AL. Amelogenin, a major structural protein in mineralizing enamel, is also

expressed in soft tissues: brain and cells of the hematopoietic system. *Eur J Oral Sci* 2006;114:183-189.

Deutsch D, Palmon A, Catalano-Sherman J, Laskov R. Production of monoclonal antibodies against amelogenin proteins of developing enamel matrix. *Adv Dent Res* 1987;1:282-288.

Deutsch D, Palmon A, Dafni L, Catalano-Sherman J, Young MF, Fisher LW. The enamelin (tuftelin) gene. *Int J Dev Biol* 1995;39:135-143.

Deutsch D, Palmon A, Fisher LW, Kolodny N, Termine JD, Young MF. Sequencing of bovine enamelin("tuftelin") a novel acidic enamel protein. *J Biol Chem* 1991;266:16021-16028.

Deutsch D, Palmon A, Fisher L, Termine JD, Young M. (1989) Cloning of bovine enamelin. In *Tooth enamel V*(Ed. RW Fearnhead), Florence Publishers, Yokohama, pp.308-312.

D'Souza RN, Åberg T, Gaikwad J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I. *Cbfa1* is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 1999;126:2911-2920.

Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res* 2004;83:523-528.

Ducy P. *Cbfa1*: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 2000; 219:461-471.

Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific *cis*-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* 1995;15:1858-1869.

Eastoe JE. The chemical composition of bone and teeth. *Adv Fluorine Res Dent Caries Prevent* 1965;3:5-17.

Eggert FM, Allen GA, Burgess RC. Amelogenins - purification and partial characterization of proteins from developing bovine dental enamel. *Biochem J* 1973;131:471-484.

Elomaa O, Pulkkinen K, Hannelius U, Mikkola M, Saarialho-Kere U, Kere J. Ectodysplasin is released by proteolytic shedding and binds to the EDAR protein. *Hum Mol Genet* 2001;10:953-962.

Farges JC, Couble ML, Joffre A, Hartmann DJ, Magloire H. Morphological and immunocytochemical characterization of cultured rat incisor cervical epithelial cells. *Archs Oral Biol* 1991;36:737-745.

Farina M, Schemmel A, Weissmüller G, Cruz R, Kachar B, Bisch PM. Atomic force microscopy study of tooth surfaces. *J Struct Biol* 1999;125:39-49.

Ferguson BM, Brockdorff N, Formstone E, Ngyuen T, Kronmiller JE, Zonana J. Cloning of tabby, the murine homologue of the human EDA gene: evidence for a membrane associated protein with a short collagenous domain. *Hum Mol Genet* 1997;6:1589-1594.

Ferguson C, Tucker AS, Christensen L, Lau AL, Matzuk MM, Sharpe PT. Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. *Genes Dev* 1998;12:2636-2649.

Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP, Sarte P, Lau EC, Diekwisch T, Slavkin HC. Self-assembly of a recombinant amelogenin protein generates supramolecular structures. *J Struct Biol* 1994;112:103-109.

Fincham AG, Moradian-Oldak J, Diekwisch TGH, Lyaruu DM, Wright JT, Bringas P Jr, et al. Evidence for amelogenin "nanospheres" as functional components of secretory-stage enamel matrix. *J Struct Biol* 1995;115:50-59.

Fleischmannova J, Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT. Mouse models of tooth abnormalities. *Eur J Oral Sci* 2008;116:1-10.

Foote S, Vollrath D, Hilton A, Page DC. The human Y chromosome: overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science* 1992;258:60-66.

Fosse G, Risnes S, Holmbakken N. Prisms and tubules in multituberculate enamel. *Calcif Tissue Res* 1973;11:133-150.

Frank RM, Sognaes RF, Kern R. Calcification of dental tissue with special reference to enamel ultrastructure. In: Sognaes RF (ed.): *Calcification in biological systems*. Amer Ass Advanc Sci, Washington 1960.

Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 1993;27:11-23.

Fukae M, Tanabe T. Non-amelogenin components of porcine enamel in the protein fraction free from the enamel crystals. *Calcit Tissue Int* 1987;40:286-293.

Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Lee SK, Ryu OH, Murakami C, Wakida K, Simmer JP, Yamada Y, Bartlett JD. Enamelysin matrix metalloproteinase-20: localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. *J Dent Res* 1998;77:1580-1588.

Chen YP, Bei M, Woo I, Satokata I, Mass R. Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development* 1996;122:3035-3044.

Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 2002; 115:679-688.

Gibson CW, Yuan Zhi-An, Hall B, Logenecker G, Chen E, Thyagarajan T, Sreenath T, Wright JT, Decker S, Piddington R, Harrison G, Kulkarni AB. Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* 2001;34:31871-31875.

Glasstone-Hughes S. The development of halved tooth germs; a study in experimental morphology. *J Anat* 1952;86:12-25.

Goldberg M, Septier D, Lécolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC, Gafni G, Dillouya D, Vermelin L, Thonemann B, Schmalz G, Bissila-Mapahou P, Carreau JP. Dental Mineralization. *Int J Dev Biol* 1995;39:93-110.

Grigoriou M, Tucker AS, Sharpe PT, Pachnis V. Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development* 1998;125:2063-2074.

Gruneberg H. The glandular aspects of the tabby syndrome in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 1971; 25: 1–19.

Haddad A, Sesso A, Attias M, Farina M, Meirelles MN, Silveira M, Benchimol M, Soares MJ, Barth OM, Machado RD, Souto-Padrón T, Souza W. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. ed. Souza W - RJ: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998.

Harada H, Kettunen P, Jung HS, Musonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol* 1999;147:105-120.

Harada H, Mitsuyasu T, Toyono T, Toyoshima K. Epithelial stem cells in teeth. *Odontology* 2002;90:1-6.

Harada H, Ohshima H. New perspectives on tooth development and the dental stem cell niche. *Arch Histol Cytol* 2004;67:1-11.

Harada H, Toyono T, Toyoshima K, Yamasaki M, Itoh N, Kato S, Sekine K, Ohuchi H. FGF-10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development* 2002a;129:1533-1541.

Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development* 1998;125:2803-2811.

Headon DJ, Emmal SA, Ferguson BM, Tucker AS, Justice MJ, Sharpe PT, Zonana J, Overbeek PA. Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature* 2001;414:913-916.

Headon DJ, Overbeek PA. Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nat Genet* 1999; 22: 370–374.

Heikinheimo M, Lawshe A, Shackelford MG, Wilson DB, MacArthur CA. Fgf-8 expression in the post-gastrulation mouse suggest role in the development of the face, limb, and central nervous system. *Mech Dev* 1994; 48:129-138.

Herold RC, Rosenbloom J, Granovsky M. Phylogenetic distribution of enamel proteins: Immunohistochemical localization with monoclonal antibodies indicates the evolutionary appearance of enamelins prior to amelogenesis. *Calcif Tissue Int* 1989;35:88-94.

Hiller CR, Robinson C, Weatherell JA. Variations in the composition of developing rat incisor enamel. *Calcif Tissue Res* 1975;18:1-12.

Hogan BLM. Morphogenesis. *Cell* 1999;96:225-233.

Honda M, Morikawa N, Hata K, Yada T, Morita S, Ueda M, Kimata K. Rat constochondral cell characteristics on poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials* 2003;24:3511-3519.

Honda MJ, Ohara T, Sumita Y, Ogaeri T, Kagami H, Ueda M. Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:283-289.

Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol* 2005; 68: 89–101.

Honda MJ, Yada T, Ueda M, Kimata K. Cartilage formation by serial passaged cultured chondrocytes in a new scaffold: hybrid 75:25 poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) sponge. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:1510-1516.

Hu JC, Sun X, Zhang C, Liu S, Bartlett JD, Simmer JP. Enamelysin and kallikrein-4 mRNA expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci* 2002;110:307-315.

Hu JC, Yamakoshi Y. Enamelin and autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Crit Rev Oral Biol* 2003;14:387-398.

Hu JC, Yamakoshi Y, Yamakoshi F, Krebsbach PH, Simmer JP. Proteomics and genetics of dental enamel. *Cells Tissues Organs* 2005;181:219-231.

Huang C-YF, Ferrel JEJ. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10078-10083.

Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *PNAS* 2009;106:13475-13480.

Imai H, Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Eto K. Contribution of early-emigrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of mandibular molar teeth in rat embryos. *Dev Biol* 1996; 176:151-165.

Iwasaki K, Bajenova E, Somogyi-Ganss E, Miller M, Nguyen V, Nourkeyhani H, Gao Y, Wendel M, Ganss B. Amelotin - a novel secreted, ameloblast-specific protein. *J Dent Res* 2005;84:1127-1132.

Iwatsuki S, Honda MJ, Harada H, Ueda M. Cell proliferation in teeth reconstructed from dispersed cells of embryonic tooth germs in a three-dimensional scaffold. *Eur J Oral Sci* 2006;114:310-317.

Jenkins CL, Raines RT. Insights on the conformational stability of collagen. *Nat Prod Rep* 2002;19:49-59.

Jeong J, Mao J, Tenzen T, Kottmann AH, McMahon AP. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev* 2004;18:937-951.

Jernvall J, Abert T, Kettunen P, Keranen S, Thesleff I. The life history of embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 1998;125:161-169.

Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol* 1994; 38:463-469.

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

Johnson PC, Mikos AG, Fisher JP, Jansen JA. Strategic directions in tissue engineering. *Tissue Engineering* 2007;13:2827-2837.

Jones KL. (1997) *Smith's Recognizable Patterns of Human malformation*. 5th Ed. Philadelphia: WB Saunders Company.

Josephsen K, Fejerskov O. Ameloblast modulation in the maturation zone of the rat incisor enamel organ. A light and electron microscopic study. *J Anat* 1977;124:45-70.

Jung HS, Francis-West PH, Widelitz RB, Jiang TX, Ting-Berreth S, Tickle C, Wolpert L, Chuong CM. Local inhibitory action of BMPs and their relationships with activators in feather formation: implications for periodic patterning. *Dev Biol* 1998;196:11-23.

Kang S-W, Seo S-W, Choi CY, Kim B-S. Porous poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere as cell culture substrate and cell transplantation vehicle for adipose tissue engineering. *Tissue Engineering: Part C* 2008;14:26-34.

Kangas A, Evens A, Thesleff I, Jernvall J. Nonindependence of mammalian dental characters. *Nature* 2004;423:211-214.

Kapadia H, Mues G, D'Souza R. Genes affecting tooth morphogenesis. *Orthod Craniofac Res* 2007;10:237-244.

Katchiburian E, Arana VE. *Histologia e embriologia Oral*, 2ª edição. Guanabara-Koogan: Médica Pan-americana S.A.C.F., 2004.

Kawano S, Saito M, Handa K, Morotomi T, Toyono T, Seta Y, Nakamura N, Uchida T, Toyoshima K, Ohishi M, Harada H. Characterization of dental epithelial progenitor cells derived from cervical-loop epithelium in a rat lower incisor. *J Dent Res* 2004;83:129-133.

Kawasaki K, Weiss KM. Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4060-4065.

Keränen SVE, Åberg T, Kettunen P, Thesleff I, Jernvall J. Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Dev Genes Evol* 1998;208:477-486.

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

Kere J, Srivastava AK, Montonen O, Zonana J, Thomas N, Ferguson B, Munoz F, Morgan D, Clarke A, Baybayan P, Chen EY, Ezer S, Saarialho-Kere U, de la Chapelle A, Schlessinger D. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nat Genet* 1996;13:409-416.

Kestler DP, Foster JS, Macy SD, Murphy CL, Weiss DT, Solomon A. Expression of odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) in dental and other epithelial neoplasms. *Mol Med* 2008;14:318-326.

Kettunen P, Laurikkala J, Itaranta P, Vainio S, Itoh N, Thesleff I. Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 2000;219:322-332.

Kettunen P, Thesleff I. Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 1998;211: 256-268.

Kim WS, Vacanti JP, Cima L, Mooney D, Upton J, Puelacher WC, Vacanti CA. Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers. *Plast Reconstr Surg* 1994;94:233-237.

Kojima T, Morikawa Y, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Senba E, Kitamura T. TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J Biol Chem* 2000;275:20742-20747.

Kollar EJ, Baird GR. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morphol* 1970;24:173-186.

Kontges G, Lumsden A. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* 1996;122:3229-3242.

Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci* 2009;5:226-243.

Koyama E, Yamaai T, Iseki S, Ohuchi H, Nohno T, Yoshioka H, Hayashi Y, Leatherman JL, Golden EB, Noji S, Pacifici M. Polarizing activity, Sonic hedgehog, and tooth development in embryonic and postnatal mouse. *Dev Dyn* 1996; 206:59-72.

Kratochwil K, Dull M, Farinas I, Galcera J, Grosschedl R. Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev* 1996;10:1382-1394.

Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in Lef1^{-/-} mice. *Genes Dev* 2002;16:3173-3185.

Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM, Yamada Y. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. *J Biol Chem* 1996;271:4431-4435.

Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* 1996;116:71-76.

Landacre FL. The fate of the neural crest in the head of urodeles. *J Comp Neurol* 1921;33:1-43.

Laurikkala J, Mikkola M, Mustonen T, Aberg T, Koppinen P, Pispä J, Nieminen P, Galceran J, Grosschedl R, Thesleff I. TNF signaling via the ligand-receptor pair ctodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Dev Biol* 2001; 229:443-455.

Leblond CP, Warshawsky H. Dynamics of enamel formation in the rat incisor tooth. *J Dent Res* 1979;58:950-975.

Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J, Geoffroy V, Ducy P, Karsenty G. Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nature Genet* 1997;16:307-310.

Lee SK, Krebsbach PH, Matsuki Y, Nanci A, Yamada KM, Yamada Y. Ameloblastin expression in rat incisors and human tooth germs. *Int J Dev Biol* 1996;40:1141-1150.

Lewis J. Notch signaling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 1998;9:583-589.

Lidral AC, Reising BC. The role of MSX1 in human tooth agenesis. *J Dent Res* 2002; 81:274-278.

Limeback H, Sakarya H, Chu W, MacKinnon M. Serum albumin and its acid hydrolysis peptides dominate preparations of mineral-bound enamel proteins. *J Bone Joint Surg* 1989;4:235-241.

Liu W, Selever J, Lu MF, Martin JF. Genetic dissection of Pitx2 in craniofacial development uncovers new functions in branchial arch morphogenesis, late aspects of tooth morphogenesis and cell migration. *Development* 2003;130:6375-6385.

Llano E, Pendás AM, Knäuper V, Sorsa T, Salo T, Salido E, Murphy G, Simmer JP, Bartlett JD, López-Otín C. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry* 1997;36:15101-15108.

Lumsden AGS (1984a). Determination in early tooth development. In: Tooth morphogenesis and differentiation. Colloque INSERM, Vol. 125. Belcourt AB, Ruch JV, editors. Paris: INSERM, pp. 19-27.

Lumsden AGS (1984b). Tooth morphogenesis: contributions of the cranial neural crest in mammals. In: Tooth morphogenesis and differentiation. Colloque INSERM, Vol. 125. Belcourt AB, Ruch JV, editors. Paris: INSERM, pp. 29-40.

Lumsden AGS. Tooth forming potential of mammalian neural crest (abstract). *J Embryol Exp Morphol* 1984c; 82(Spec Iss):68.

Lumsden AGS. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* 1988;103 (supp 1):S155-S169.

Luukko K, Moshnyakov M, Sainio K, Saarma M, Sariola H, Thesleff I. Expression of neurotrophin receptors during rat tooth development is developmentally regulated, independent of innervation, and suggests functions in the regulation of morphogenesis and innervation. *Dev Dyn* 1996;206:87-99.

Lyngstadaas SP, Møinichen CB, Risnes S. Crown morphology, enamel distribution, and enamel structure in mouse molars. *Anat Rec* 1998;250:268-280.

Maas R, Bei M. The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:4-39.

Mackenzie A, Ferguson MWJ, Sharpe PT. Expression patterns of homeobox gene, Hox-8, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape. *Development* 1992; 115: 403-440.

Mackenzie A, Leeming GL, Jowett AK, Ferguson MWJ, Sharpe PT. The homeobox gene Hox7.1 has specific regional and temporal patterns during early murine craniofacial embryogenesis, especially tooth development *in vivo* and *in vitro*. *Development* 1991;111:269-285.

Marks SCJr, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec* 1996;245:374-393.

Masson P. Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique. *Bulletin of the International Association of Medicine* 1929;12:75.

Masuya H, Shimizu K, Sezutsu H, Sakuraba Y, Nagano J, Shimizu A, Fujimoto N, Kawai A, Miura I, Kaneda H, Kobayashi K, Ishijima J, Maeda T, Gondo Y, Noda Tetsuo, Wakana S, Shiroishi T. Enamelin(Enam) is essential for amelogenesis: ENU-induced mouse mutants as models for different clinical subtypes of human amelogenesis imperfecta(AI). *Human Molecular Genetics* 2005;14:575-583.

Miletich I, Sharpe PT. Normal and abnormal dental development. *Human Molecular Genetics* 2003;12:R69-R73.

Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-odontogenic mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 1987;32:123-127.

Mitsiadis TA, Angeli I, James, C, Lendahl U, Sharpe PT. Role of *Islet1* in the patterning of murine dentition. *Development* 2003;130:4451-4460.

Mitsiadis TA, Couple P, Dicou E, Rudkin BB, Magloire H. Patterns of nerve growth factor(NGF), proNGF, and p75 NGF receptor expression in the rat incisor: comparison with expression in the molar. *Differentiation* 1993;54:161-175.

Mitsiadis TA, Dicou E, Joffre A, Magloire H. Immunohistochemical localization of nerve growth factor(NGF) and NGF receptor(NGF-R) in the developing first molar tooth of the rat. *Differentiation* 1992;49:47-61.

Mitsiadis T, Henrique D, Thesleff I, Lendahl U. Mouse Serrate-1 (Jagged-1) expression in the developing tooth is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and fibroblast growth factor-4. *Development* 1997;124:1473-1483.

Mitsiadis T, Hirsinger E, Lendahl U, Golidis C. Delta-Notch signaling in odontogenesis: Correlation with cytodifferentiation and evidence for feedback regulation. *Dev Biol* 1998;204:420-431.

Mitsiadis T, Lardelli M, Lendahl U, Thesleff I. Expression of Notch 1, 2, and 3 is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and retinoic acid in the developing mouse tooth and associated with determination of ameloblast cell fate. *J Cell Biol* 1995; 130:407-418.

Modino SAC, Sharpe PT. Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch Oral Biol* 2005;50:255-258.

Moens PB, Moens T. Computer measurements and graphics of three-dimensional cellular ultrastructure. *J Ultrastruct Res* 1981;75:131-141.

Moffatt P, Smith CE, St-Arnaud R, Nanci A. Characterization of APin, a secreted protein highly expressed in tooth-associated epithelia. *J Cell Biochem* 2008;103:941-960.

Moffatt P, Smith CE, St-Arnaud R, Simmons D, Wright JT, Nanci A. Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium. *Biochem J* 2006;399:37-46.

Møinichen CB, Lyngstadaas SP, Risnes S. Morphological characteristics of mouse incisor enamel. *J Anat* 1996;189:325-333.

Monreal AW, Ferguson BM, Headon DJ, Street SL, Overbeek PA, Zonana J. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Genet* 1999; 22: 366–369.

Moradian-Oldak J. Amelogenesis: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biol* 2001;20:293-305.

Moradian-Oldak J, Paine ML, Lei YP, Fincham AG, Snead ML. Self-assembly properties of recombinant engineered amelogenin proteins analyzed by dynamic light scattering and atomic force microscopy. *J Struct Biol* 2000;131:27-37.

Mostowska A, Kobiela A, Trzeciak WH. Molecular basis of non-syndromic tooth agenesis: mutations of MSX1 and PAX9 reflect their role in patterning human dentition. *Eur J Oral Sci* 2003;111:365-370.

Mucchielli M-L, Mitsiadis TA, Raffo S, Brunet JF, Proust JP, Goridis C. Mouse *Otlx2*/RIEG expression in the odontogenic epithelium precedes tooth initiation and requires mesenchyme-derived signals for its maintenance. *Dev Biol* 1997;189:275-284.

Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997;89:773-779.

Mustonen T, Pispä J, Mikkola ML, Pummila M, Kangas AT, Pakkasjärvi L, Jaatinen R, Thesleff I. Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1. *Dev Biol* 2003; 259:123-136.

Mustonen T, Tummers M, Mikami T, Itoh N, Zhang N, Gridley T, Thesleff I. Lunatic fringe, FGF, and BMP regulate the Notch pathway during epithelial morphogenesis of teeth. *Dev Biol* 2002;248:281-293.

Naito A, Yoshida H, Nishioka E, Satoh M, Azuma S, Yamamoto T, Nishikawa S, Inoue J. TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8766-8771.

Nanci A, Warshawsky H. Characterization of putative secretory sites on ameloblasts of the rat incisor. *Am J Anat* 1984;171:163-189.

Nanci A, Zalzal S, Lavoite P, Kunikata M, Chen W-Y, Krebsbach PH, Yamada Y, Hammarström L, Simmer JP, Fincham AG, Snead ML, Smith CE. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem* 1998;46:911-934.

Neubüser A, Peters H, Ballings R, Martin GR. Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: A mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* 1997;90:247-255.

Nishikawa S. Transient increase in anti-p-ATF2 immunoreactivity in the late secretion ameloblasts apical to the transition zone of rat incisors. *Anat Sci Int* 2004;79:87-94.

Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y. PEBP2/PEA2 represents a new family of transcription factor homologous to the products of the *Drosophila runt* and human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6859-6863.

Ohazama A, Courtney J-M, Tucker AS, Naito A, Tanaka S, Inoue J, Sharpe PT. *Traf6* is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Dev Dyn* 2004;229:131-135.

Ohazama A, Hu Y, Schmidt-Ullrich R, Cao Y, Scheidereit C, Karin M, Sharpe PT. A dual role for *Ikka* in tooth development. *Dev Cell* 2004; 6:219-227.

Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 2004;83:518-522.

Ohazama A, Sharpe PT. TNF signalling in tooth development. *Current Opinion Genet Dev* 2004;14:513-519.

Ohshima H, Nakasone N, Hashimoto E, Sakai H, Nakakura-Ohshima K, Harada H. The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. *Arch Oral Biol* 2005;50:153-157.

Oida S, Nagano T, Yamakoshi Y, Ando H, Yamada M, Fukae M. Amelogenin gene expression in porcine odontoblasts. *J Dent Res* 2002;81:103-108.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997;89:765-771.

Paine ML, White SN, Luo W, Fong H, Sarikaya M, Snead ML. Regulated gene expression dictates enamel structure and tooth function. *Matrix Biol* 2001;20:273-292.

Paiva KBS, Zambuzzi WF, Accorsi-Mendonça T, Taga R, Nunes FD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Rat forming incisor requires a rigorous ECM remodeling modulated by MMP/RECK balance. *J Mol Hist* 2009;40:201-207.

Palmer RM, Lumsden AGS. Development of periodontal ligament and alveolar bone in homografted recombinations of enamel organs and papillary, pulpal and follicular mesenchyme in the mouse. *Arch Oral Biol* 1987; 32:281-9.

Papagerakis P, MacDougall M, Hotton D, Bailleul-Forestier I, Oboeuf M, Berdal A. Expression of amelogenin in odontoblasts. *Bone* 2003;32:228-240.

Park JC, Park JT, Son HH, Kim HJ, Jeong MJ, Lee CS, Dey R, Cho MI. The amyloid protein APin is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors. *Eur J Oral Sci* 2007;115:153-160.

Paulson RB. Scanning electron microscopy of enamel tuft development in human deciduous teeth. *Arch Oral Biol* 1981;26:103-109.

Peters H, Balling R. Teeth: where and how to make them. *Trends Genet* 1999; 15:59-65.

Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 1998;12:2735- 2747.

Pispa J, Jung HS, Jernvall J, Kettunen P, Mustonen T, Tabata MJ, Kere J, Thesleff I. Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Dev Biol* 1999;216:521-534.

Pispa J, Mikkola ML, Mustonen T, Thesleff I. Ectodysplasin, Edar and TNFRSF19 are expressed in complementary and overlapping patterns during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 2003; 3:675-679.

Platt JB. Ectodermic origin of the cartilages of the head. *Anat Anz* 1893; 8:506-509.

Platt JB. The development of the cartilaginous skull and of the branchial and hypoglossal musculature in Necturus. *Morph Jahrb* 1897; 25:377-464.

Pontes B, Viana NB, Campanati L, Farina M, Moura Neto V, Nussenzveig HM. Structure and elastic properties of tunneling nanotubes. *Eur Biophys J* 2008;37:121-129.

Radlanski RJ, Renz H. Explainable and critical periods during human dental morphogenesis and their control. *Arch Oral Biol* 2005;50:199-203.

Raven CP. Zur Entwicklung der Ganglienleiste. 1. Die Kinematik der Ganglienleistenentwicklung bei den Urodelen. *Wilhem Roux Arch EntwWecg Org* 1931; 125:210-292.

Ravindranath RMH, Tam W-Y, Bringas PJr, Santos V, Fincham AG. Amelogenin-cytokeratin 14 interaction in ameloblasts during enamel formation. *J Biol Chem* 2001;276:36586-36597.

Rey C, Renugopalakrishnan V, Shimizu M, Collins B, Glimcher MJ. A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopic study of the environment of the CO₃(²⁻) ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation. *Calcif Tissue Int* 1991;49:259-268.

Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331-344.

Risnes S. A scanning electron microscope study of aberrations in the prism pattern of rat incisor enamel. *Am J Anat* 1979a;154:419-436.

Risnes S, Møinichen CB, Septier D, Goldberg M. Effects of accelerated eruption on the enamel of the rat lower incisor. *Adv Dent Res* 1996;10:261-269.

Risnes S. Multiplane sectioning and scanning electron microscopy as a method for studying the three-dimensional structure of mature dental enamel. *Scanning Microscopy* 1987;4:1893-1902.

Risnes S. Growth tracks in dental enamel. *J Hum Evol* 1998;35:331-350.

Risnes S, Peterkova R, Lesot H. Distribution and structure of dental enamel in incisors of Tabby mice. *Arch Oral Biol* 2005;50:181-184.

Risnes S, Septier D, Deville de Periere D, Goldberg M. TEM observations on the ameloblast/enamel interface in the rat incisor. *Connective Tissue Research* 2002;43:496-504.

Risnes S. Structural characteristics of staircase-type Retzius lines in human dental enamel analyzed by scanning electron microscopy. *Anat Rec* 1990;226:135-146.

Robey PG. Post-natal stem cells for dental and craniofacial repair. *Oral Biosci Med* 2005;2:83-90.

Robinson C, Briggs HD, Atkinson PJ. Histology of enamel organ and chemical composition of adjacent enamel in rat incisors. *Calcif Tissue Int* 1981a;33:513-520.

Robinson C, Briggs HD, Atkinson PJ, Weatherell JA. Chemical changes during formation and maturation of human deciduous enamel. *Arch Oral Biol* 1981b; 26:1027-1033.

Robinson C, Connell S, Kirkham J, Shorea R, Smith A. Dental enamel - a biological ceramic: regular substructures in enamel hydroxyapatite crystals revealed by atomic force microscopy. *J Materials Chemistry* 2004;14:2242-2248.

Robinson C, Hallsworth AS, Kirkham J. Distribution and uptake of magnesium by developing deciduous bovine incisor enamel. *Arch Oral Biol* 1984;29:479-482.

Robinson C, Kirkham J. Is the rat incisor typical? *INSERM* 1984;125:377-386.

Robinson C, Kirkham J. (1985) Dynamics of amelogenesis as revealed by protein compositional studies. In *The chemistry and biology of mineralised tissues* (Ed. WT Butler). EBSCO Media Inc., Birmingham, AL, pp.248-263.

Robinson C, Kirkham J, Briggs HD, Atkinson PJ. Enamel proteins from secretion to maturation. *J Dent Res* 1982;61:1490-1495.

Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Bonass WA, Shore RC. The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* 1995;39:145-152.

Robinson C, Kirkham J, Storehouse NJ, Shore RC. (1989) Extracellular processing of enamel matrix and origin and function of Tuft protein. In *Tooth enamel V*(Ed. RW Fearnhead). Florence Publishers, Yokohama, pp.59-63.

Robinson C, Lowe NR, Weatherell JA. Amino acid composition, distribution and origin of "tuft" protein in human and bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 1975;20:29-42.

Robinson C, Weatherell JA, Hallsworth AS. Distribution of magnesium in mature human enamel. *Caries Res* 1981c;15:70-77.

Salazar-Ciudad I, Jernvall J. A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8116-8120.

Salazar-Ciudad I, Jernvall J, Newman SA. Mechanisms of pattern formation in development and evolution. *Development* 2003;130:2027-2037.

Salomon JP, LeGrand JM, Goldberg M. Scanning electron microscopy of the forming enamel of rat incisor: influence of fixative and treatments interacting with the organic matrix. *Scan Microsc* 1991;5:509-517.

Sarkar L, Cobourne M, Naylor S, Smalley M, Dale T, Sharpe PT. Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4520-4524.

Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signaling pathway genes during tooth development. *Mech Dev* 1999; 85:197-200.

Sartaj R, Sharpe P. Biological tooth replacement. *J Anat* 2006;209:503-509.

Sasaki S, Shimokawa H. The amelogenin gene. *Int J Dev Biol* 1995;39:127-133.

Satokata I, Maas R. *Msx-1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 1994; 6:348-356.

Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 2000; 21:138-141.

Schaefer L, Ferrero GB, Grillo A, Bassi MT, Roth EJ, Wapenaar MC, Van Ommen G-JB, Mohandas TK, Rocchi M, Zoghbi HY, Ballabio A. A high resolution deletion map of human chromosome Xp22. *Nature Genet* 1993;4:272-279.

Scott JH, Symon NBB. *Introduction to dental anatomy*. 6th ed. Livingstone, Edinburgh and London 1971.

Semina EV, Reiter RS, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet* 1996;14:392-399.

Seol YJ, Lee Jy, Park YJ, Lee YM, Young-Ku, Rhyu IC, Lee SJ, Han SB, Chung CP. Chitosan sponge as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol Lett* 2004;26:1037-1041.

Sharpe PT. Homeobox genes and orofacial development. *Connect Tissue Res* 1995; 32:17-25.

Sharpe PT, Young CS. Test-tube teeth. *Sci Am* 2005;293:34-41.

Shimokawa H, Wasserman P, Sobel ME, Termine JD. (1984) Characterization of cell-free translation products of mRNA from bovine ameloblasts by monoclonal and polyclonal antibodies. In *Tooth enamel IV*(Eds. RW Fearnhead and S Suga). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp.161-166.

Silva MCA. Uma nova abordagem no estudo da estrutura mineralizada do esmalte dentário. Dissertação(Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/ICB, 2003.

Silver FH, Pins G. Cell growth on collagen: a review of tissue engineering using scaffolds containing extracellular matrix. *J Long Term Eff Med Implants* 1992;2:67-80.

Simmelink JW, Abrigo SC. Decalcification patterns compared in rat and human enamel and synthetic hydroxyapatite. *Adv Dent Res* 1989;3:241-248.

Simmer JP, Fincham AG. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995;6:84-108.

Simmer JP, Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Uchida T, Xue J, Margolis HC, Shimizu M, DeHart BC, Hu C-C, Bartlett JD. Purification, characterization, and cloning of enamel matrix serine proteinase 1. *J Dent Res* 1998;77:377-386.

Sire, JY, vit-Beal T, Delgado S, Gu X. The origin and evolution of enamel mineralization genes. *Cells Tissues Organs* 2007;186:25-48.

Slavkin HC, Bessem C, Bringas P, Zeichner-David M, Nanci A, Snead ML. Sequential expression and differential function of multiple enamel proteins during fetal neonatal and early postnatal stages of mouse molar organogenesis. *Differentiation* 1988;37:26-39.

Slavkin HC. Embryonic tooth formation. A tool for developmental biology. *Oral Sci Rev* 1974;4:7-136.

Slavkin HC. Molecular determinants during dental morphogenesis and cytodifferentiation: a review. *J Craniofac Gent Dev Biol* 1991;11:338-349.

Smith AJ, Wilson C, Matthews JB. An immunocytochemical study of keratin reactivity during rat odontogenesis. *Histochemistry* 1990;94:329-335.

Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:128-161.

Smith CE, Warshawsky H. Cellular renewal in the enamel organ and the odontoblast layer of the rat incisor as followed by radioautography using ³H-thymidine. *Anat Rec* 1975a;183:523-561.

Smith CE, Warshawsky H. Histological and three dimensional organization of the odontogenic organ in the lower incisor of 100 gram rats. *Am J Anat* 1975;142:403-430.

Smith CE, Warshawsky H. Movement of entire cell populations during renewal of the rat incisor as shown by radioautography after labeling with ³H-thymidine. The concept of a continuously differentiating cross-sectional segment. *Am J Anat* 1976;145:225-259.

Soukup V, Epperlein HH, Horáček I, Cerny R. Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature* 2008;455:795-798.

Srivastava AK, Durmowicz MC, Hartung AJ, Hudson J, Ouzts LV, Donovan DM, Cui CY, Schlessinger D. Ectodysplasin-A1 is sufficient to rescue both hair growth and sweat glands in Tabby mice. *Hum Mol Genet* 2001;10:2973-2981.

Srivastava AK, Pispá J, Hartung AJ, Du Y, Ezer S, Jenks T, Shimada T, Pekkanen M, Mikkola ML, Ko MS, Thesleff I, Kere J, Schlessinger D. The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13069-13074.

St Amand TR, Zhang YD, Semina EV, Zhao X, Hu Y, Nguyen L, Murray JC, Chen Y. Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the expression of Pitx1 and Pitx2 in mouse tooth forming anlage. *Dev Biol* 2000; 217:323-332.

Stone LS. Further experiments on the extirpation and transplantation of mesectoderm in *Ambystoma punctatum*. *J Exp Zool* 1926;44:95-131.

Strawich E, Glimcher MJ. Tooth "enamelin" identified mainly as serum proteins. Major "enamelin" is albumin. *Eur J Biochem* 1990;191:47-56.

Suga S. Amelogenesis. Some histological and histochemical observations. *Int Dent J* 1959;9:394-420.

Suga S. Progressive mineralization pattern of developing enamel during the maturation stage. *J Dent Res* 1982;61:1532-1542.

Sumita Y, Honda MJ, Ohara T, Tsuchiya S, Sagara H, Kagami H, Ueda M. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3238-3248.

Tabata MJ, Matsumura T, Liu JG, Wakisaka S, Kurisu K. Expression of cytokeratin 14 in ameloblast-lineage cells of the developing tooth of rat, both in vivo and in vitro. *Arch Oral Biol* 1996;41:1019-1027.

Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2005;26:4856-4865.

Ten Cate AR(2001a) Amelogenesis. In: *Histologia bucal - desenvolvimento, estrutura e função*, pp. 186-204, 5^a ed, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.

Termine JD, Belcourt AB, Christner PJ, Conn KM, Nylén MU. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J Biol Chem* 1980;255:9760-9768.

Thesleff I. Developmental biology and building a tooth. *Quintessence Int* 2003a; 34:613-620.

Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 2003;116:1647-1648.

Thesleff I, Mikkola M. The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol* 2002; 217:93-135.

Thesleff I, Pispala J. The teeth as models for studies on the molecular basis of the development and evolution of organs. In: CM Chuong, RG Landes, eds. *Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis*. Austin, TX 1998:157-179.

Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 1997;67:111-123.

Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol* 1995;39:35-50.

Thomas BL, Tucker AS, Qui M, ET AL. Role of *Dlx-1* and *Dlx-2* genes in patterning of the murine dentition. *Development* 1997;124:4811-4818.

Tissier-Seta JP, Mucchielli ML, Mark M, Mattei MG, Goridis C, Brunet JJ. Barx1, a new mouse homeodomain transcription factor expressed in cranio-facial ectomesenchyme and the stomach. *Mech Dev* 1995; 51:3-15.

Tomes J. On the structure of the dental tissues of the order Rodentia. *Phil Trans R Soc London* 1850;140:529-567.

Trowell OA. The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp Cell Res* 1959;16:118-147.

Tucker AS, Headon DJ, Courtney JM, Overbeek P, Sharpe PT. The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Dev Biol* 2004; 268: 185–194.

Tucker AS, Headon DJ, Schneider P, Ferguson BM, Overbeek P, Tschopp J, Sharpe PT. Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development* 2000; 127:4691-4700.

Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP4 signaling. *Science* 1998; 282:1136-1138.

Tummers M, Thesleff I. Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. *Development* 2003;130:1049-1057.

Vahtokari A, Åberg T, Jernvall J, Keränen S, Thesleff I. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech Dev* 1996;54:39-43.

Vahtokari A, Aberg T, Thesleff I. Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF4. *Development* 1996; 122:121-129.

Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 1993; 75:45-58.

Van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amestel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet* 2000;24:242-243.

Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 1996;13:417-421.

Wada H, Makabe K. Genome duplications of early vertebrates as a possible chronicle of the evolutionary history of the neural crest. *Int J Biol Sci* 2006;2:133-141.

Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Dev Cell* 2004; 7:719-730.

Ware RW, LoPresti V. Three-dimensional reconstruction from serial sections. *Int Rev Cytol* 1975;40:325-440.

Warshawsky H. A freeze-fracture study of the topographic relationship between inner enamel-secretory ameloblasts in the rat incisor. *Am J Anat* 1978;152:153-208.

Warshawsky H, Josephsen K, Thylstrup A, Fejerskov O. The development of enamel structure in rat incisors as compared to the teeth of monkey and man. *Anat Rec* 1981;200:371-399.

Warshawsky H. Organization of crystals in enamel. *Anat Rec* 1989;224:242-262.

Warshawsky H, Smith CE. A three-dimensional reconstruction of the rods in rat maxillary incisor enamel. *Anat Rec* 1971;169:585-592.

Warshawsky H, Smith CE. Morphological classification of rat incisor ameloblasts. *Anat Rec* 1974;179:423-446.

Weatherell JA, Deutsch D, Robinson C, Hallsworth AS. Fluoride concentrations in developing enamel. *Nature* 1975;256:230-232.

Weatherell JA, Deutsch D, Robinson C, Hallsworth AS. Assimilation of fluoride by enamel throughout the life of the tooth. *Caries Res* 1977;11:85-115.

Weatherell JA, Weidmann SM, Eyre DR. Histological appearance and chemical composition of enamel protein from mature human molars. *Caries Res* 1968;2:281-293.

Westbroek P, Martin FA. A marriage of bone and nacre. *Nature* 1998;392:861-862.

www.bite-it.helsinki.fi ; "Gene expression in teeth".

Yan M, Zhang Z, Brady JR, Schilbach S, Fairbrother WJ, Dixit VM. Identification of a novel death domain-containing adaptor molecule for ectodysplasin-A receptor that is mutated in crinkled mice. *Curr Biol* 2002;12:409-413.

Yan Q, Zhang Y, Li W, DenBesten PK. Differentiation of human ameloblast-lineage cells in vitro. *Eur J Oral Sci* 2006;114(Suppl.1):154-158.

Yen AH-H, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res* 2008;331:359-372.

Yokozeki M, Afanador E, Nishi M, Kaneko K, Shimokawa H, Yokote K, Deng C, Tsuchida K, Sugino H, Moriyama K. Smad3 is required for enamel biomineralization. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:684-690.

Yoshikawa DK, Kollar EJ. Recombination experiments on the odontogenic roles of mouse dental papilla and dental sac tissues in ocular grafts. *Arch Oral Biol* 1981; 26:303-307.

Young CS, Kim SW, Qin C, Baba O, Butler WT, Taylor RR, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Developmental analysis and computer modelling of bioengineered teeth. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 259–265.

Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* 2002;81:695-700.

Zalzal SF, Smith CE, Nanci A. Ameloblastin and amelogenin share a common secretory pathway and are co-secreted during enamel formation. *Matrix Biology* 2008;27:352-359.

Zeichner-David M, Thiemann F, MacDougall M. Tuftelin mRNA expression during mouse tooth organ development. *J Dent Res* 1993;72:203.

Zhang Y, Wang SS, Song YQ, Han J, Chai Y, Chen YP. Timing of odontogenic neural crest cell migration and tooth-forming capability in mice. *Dev Dyn* 2003; 226:713-718.

Zhang Y, Zhang Z, Zhao X, Yu X, Hu Y, Geronimo B, Fromm SH, Chen YP. A new function of BMP4: dual role for BMP4 in regulation of Sonic hedgehog expression in the mouse tooth germ. *Development* 2000; 127:1431-1443.

Zhang Y, Zhao X, Hu Y, St Amand T, Zhang M, Ramamurthy R, Qiu M, Chen Y. Msx1 is required for the induction of Patched by Sonic hedgehog in the mammalian tooth germ. *Dev Dyn* 1999; 215:45-53.

GLOSSÁRIO

- * **Activin beta A:** proteína liberadora de hormônio que estimula o folículo; Frp; proteína liberadora de FSH; fator liberador de FSH; fator de diferenciação Eritróide;
- * **AMBN:** ameloblastina.
- * **AMEL:** amelogenina.
- * **Ameloblastos:** células produtoras da matriz do esmalte dental;
- * **Aminoácido:** é uma molécula orgânica formada por átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, unidos de forma característica.
- * **AMTN:** amelotina
- * **Apical:** relativo ao ápice de uma estrutura piramidal ou cônica;
- * **Ápice:** extremidade de uma estrutura cônica ou piramidal, como, por exemplo, a ponta da raiz de um dente;
- * **Arco branquial ou arco faríngeo:** surgem durante o desenvolvimento do embrião, são estruturas chaves para o desenvolvimento da cabeça e do pescoço, compostas de tecido mesenquimatoso coberto externamente por ectoderme e internamente por endoderme;
- * **ATF2:** *ativador do fator de transcrição 2;*
- * **Bainha epitelial de Hertwig:** região do ectomesênquima formada por dupla camada celular consistindo de células do epitélio dental interno e externo na região da alça cervical do órgão dental. A bainha epitelial de Hertwig, tem por função modelar e formar a dentina radicular;
- * **Barx1:** *BARX homeobox 1;*
- * **Bicoid:** bcd; Bcd; BCD;
- * **Bmp2:** *proteína morfogenética óssea 2; Bmp2a;*
- * **Bmp4:** *proteína morfogenética óssea 4; Bmp2b; Bmp2b1;*
- * **Cbfa1:** *fator alfa1 de ligação nuclear; Runx2;*
- * **Cementoblastos:** células responsáveis pela produção de cimento;
- * **Coroa:** porção do dente coberta pelo esmalte; parte do dente já erupcionado visível na boca;
- * **Cromossomo:** localizado no núcleo celular, consiste em uma sequência de DNA contendo vários genes e sequências de nucleotídeos;

- * **Crista neural cranial:** é uma subdivisão formada por uma das rotas migratórias das células da crista neural, que varia de acordo com a posição de origem ao longo do eixo rostrocaudal embrionário. Na crista neural encontramos células multipotentes altamente especializadas, presentes em todos os embriões de vertebrados. as células da crista neural possuem origem ectodérmica e sofrem uma transição para o fenótipo mesenquimal, tornando-se migratórias, no momento em que ocorre o fechamento do tubo neural;
- * **CK1:** citoqueratina 1;
- * **CK14:** citoqueratina 14;
- * **C-terminal:** é uma das extremidades da cadeia polipeptídica, também chamada de carboxi-terminal;
- * **DCC:** síndrome da displasia cleidocranial;
- * **Delta1:** atua como um ligante que se conecta à membrana interagindo com o receptor de Notch e possui um papel crítico na especificação do destino celular;
- * **Dentina:** tecido calcificado que forma a maior parte do dente; substância ebúrneia percorrida por túbulos que contém os prolongamentos dos odontoblastos;
- * **Diastema:** regiões dos arcos maxilar e/ou mandibular com ausência de dentes;
- * **Dlx:** homeobox com redução distal;
- * **DNA:** ácido desoxirribonucleico, é um longo polímero formado por unidades repetidas de nucleódeos;
- * **Ectoderma:** camada externa do embrião, durante o desenvolvimento;
- * **Ectomesênquima:** tecido conjuntivo embrionário derivado das células da crista neural, localizado na região da cabeça (origem neuroectoderma);
- * **EDA:** *Eda*; “ectodysplasin A”; *Tabby*; *Ed1*;
- * **EdaA1:** *Eda*;
- * **EDAR:** *Edar*; *EDA receptor*;
- * **EDARADD:** “EDAR-associated death domain”;
- * **ENAM:** enamelina;
- * **ERK:** “*erk-related tyrosine kinase*”;
- * **Estomódeo:** cavidade bucal primitiva;
- * **Fatores de transcrição:** proteínas que se ligam ao DNA de células eucarióticas com o intuito de favorecer a ligação entre a enzima RNA-polimerase e o DNA, permitindo a transcrição e posterior tradução;
- * **Fgf:** *fator de crescimento fibroblástico*; *FGF*;

- * **FOXD3**: “forkhead box D3”;
- * **FSH**: hormônio folículo estimulante;
- * **Gene**: unidade fundamental formada por uma sequência específica de ácidos nucleicos;
- * **Gli1**: Gli; GLI “family zinc finger 1”;
- * **HA/TCP**: hidroxiapatita/fosfatotricálcio;
- * **Hes1**: “hairy and enhancer of split 1”;
- * **Hh**: hedgehog;
- * **HMG**: “high-mobility group”;
- * **Homeobox**: sequência de DNA conservada, com aproximadamente 180 pares de base e encontrada em genes envolvidos na regulação de padrões do desenvolvimento (morfogênese);
- * **Homeodomain**: domínio evolutivamente conservado encontrado em muitos fatores de transcrição ligados ao DNA que controlam processos biológicos tais como a especificação do tipo celular e a formação do padrão embrionário; é responsável pelo reconhecimento de sequências específicas de DNA para trazer fatores de transcrição para genes alvos apropriados;
- * **IκB** : “nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta”;
- * **Iκkα**: IKKA; IKappaB kinase alfa; IKK1;
- * **Iκkβ**: IKKB; “inhibitor of beta kinase kappa B”; IKK2; IKK-beta;
- * **Iκkγ**: ikbkg; “inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma”;
- * **Implante endósseo**: fixações intra-ósseas, geralmente confeccionadas em liga de titânio, são utilizadas para suportar ou reter coroas ou próteses intra-bucais;
- * **Islet1**: Isl1; ISL1; ISL LIM homeobox 1;
- * **Jagged1**: Jag1;
- * **Jnk**: c-Jun NH2-terminal kinase;
- * **Junção amelodentinária**: superfície de contato entre o esmalte e a dentina subjacente;
- * **KLK-4**: kallikreina-4;
- * **Lef1**: fator linfóide amplificador de adesão 1; fator de transcrição alfa 1 específico de células T;

- * **L-Fng**: “lunatic fringe homolog”; l-fng; lfng;
- * **Lhx6**: *proteína 6 da caixa Lim; Lhx6.1*;
- * **MAPK**: mitogen-activated protein kinase;
- * **Mesênquima**: tecido conjuntivo embrionário não localizado na cabeça ou região cefálica, derivado do mesoderma;
- * **MFz6**: Fzd6; “frizzled homolog 6”; Fz6;
- * **Mmp2**: metaloproteinase 2 da matriz; gelatinase A; colagenase tipo IV-A;
- * **mRNA**: RNAm; ARNm; ARN mensageiro; RNA mensageiro; na célula, executa a transferência de informações do DNA até o local de síntese de proteínas;
- * **Msx1**: *Hox7.1; homeobox (Hox7); Msh (homeobox de segmento muscular) homólogo de drosófila 1*;
- * **Msx2**: *Hox8; Msh (homeobox de segmento muscular) homólogo de drosófila 2*;
- * **NF-κB**: Nfkb1; “nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1”;
- * **NH₂ ou NH2**: grupo amina;
- * **Northern blot**: método utilizado em biologia molecular para a análise do RNA, utilizando-se a eletroforese através de uma sonda hibridizadora;
- * **Notch1**: *NOTCH1; “Notch homolog 1, translocation-associated”*;
- * **N-terminal**: representa uma das extremidades da cadeia polipeptídica, também chamada de amino-terminal;
- * **ODAM**: proteínas odontogênicas associadas com o ameloblasto;
- * **Odontoblastos**: células responsáveis pela produção de dentina;
- * **Organogênese**: é o processo de desenvolvimento do embrião;
- * **Osf2**: *runx2*;
- * **Patched 1**: *ptch1; patched homolog 1*;
- * **Pax9**: “paired box gene 9”; *Pax-9*;
- * **PCR**: reação em cadeia da polimerase;
- * **peptídeos**: são biomoléculas formadas pela ligação de dois ou mais aminoácidos através de ligações do tipo amida;
- * **Pitx2**: *fator de transcrição 2 semelhante ao homeodomain pareado; Otlx2*;
- * **Polpa dentária**: órgão que ocupa a parte central do dente, constituído de vasos sanguíneos, nervos e elementos celulares, inclusive odontoblastos que formam a dentina;

- * **Processo de Tomes:** estrutura formada na região basal dos ameloblastos, quando estes apresentam-se no estágio secretor da amelogênese;
- * **proteínas:** compostos orgânicos que apresentam estrutura complexa e elevada massa molecular, são sintetizadas por organismos vivos através da condensação de alfa-aminoácidos por ligações denominadas ligações peptídicas;
- * **proteínas “heat shock”:** proteínas de choque térmico, são altamente conservadas sugerindo uma grande importância evolutiva; responsáveis pelo correto dobramento de outras proteínas sintetizadas e pela prevenção da agregação proteica; são exemplos em eucariotos os sistemas HSP 90 e HSP 70;
- * **p21:** proteína com 21 quilodáltons de tamanho;
- * **p38:** proteína com 38 quilodáltons de tamanho;
- * **p75NGFR:** Ngfr; “nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)”;
- * **RECK:** “reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs”; ST15;
- * **Runt:** *run; runt; Run; Runt*;
- * **Runx1:** fator de transcrição 1 relacionado com runt; Cbfa2;
- * **Runx2:** RUNX2; “runt-related transcription factor 2”; CBFA1; OSF2;
- * **sFrp2:** SFRP2; “secreted frizzled-related protein 2”; FRP-2;
- * **Shh:** SHH; “sonic hedgehog homolog”;
- * **Sydecan1:** Sdc1; Syn1; Synd1;
- * **tenascin:** Tnc; “tenascin C”;
- * **TNF:** “tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)”;
- * **Traf6:** “Tnf receptor-associated factor 6”;
- * **trityrosil (ATMP):** “amelogenin trityrosyl motif peptide”;
- * **WNT:** *wg; “wingless”; wnt; Wnt; Wnt-1; wnt1*;

ANEXO A

O ANEXO A apresenta um artigo científico que encontra-se em fase de finalização para posterior submissão, que teve adicionado ao seu conteúdo, uma parte dos resultados contidos nesta Dissertação. A informação adicionada, mais especificamente relacionada à reconstrução 3D de cortes histológicos do esmalte dental do incisivo de rato Wistar, retém um ineditismo, colaborando com o interessante trabalho anexado.

A new approach on the study of the structure of the rodent incisors dental enamel

Silva, M.C.A, Valladão, A.S., Querido, W., Farina, M*

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Ciências Biomédicas, Bloco F, sala F2-027
Av. Carlos Chagas Filho, 373, Ilha do Fundão, 21941-902
Rio de Janeiro, RJ, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed

Introduction

The dental enamel is a highly mineralized acellular tissue that covers the teeth of vertebrates. It has approximately 87% from its volume and over 95% from its weight comprised by inorganic matter, most of which defined generally as hydroxyapatite [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], and more specifically, as a poorly crystalline non-stoichiometric carbonate-containing biological apatite (Sasaki, 1990; Risnes, 1998; Simmer, 2001; Dorozhkin, 2009). One of the most fascinating biomineralized structures is the dental enamel (Kimura et al., 1977; Risnes, 1978, 1979b, Risnes et al., 2002; Grine et al., 1987; Reyes-Gasga et al., 1997; Lyngstadaas et al. 1998; Simmelink and Baden, 1998; Meyer et al., 1999; Farina et al., 1999; Zeygerson et al., 2000). The tooth germ has been extensively used in studies of developmental biology, as it illustrates basic biological phenomena, such as differentiation, cellular interaction and synthesis, secretion, organization and mineralization of extracellular matrix (Slavkin, 1991; Møinichen et al., 1996; Thesleff e Sahlberg, 1996; Lyngstadaas et al., 1998; Vu et al., 1999; Lézot et al., 2000). Besides, it has been a challenge for bioengineering to produce a new tooth in cases of lesions and natural or pathogenic lost of permanent teeth. Enamel and dentin, the mineralized tissues of the dental crown, appear along evolution firstly as small structures resembling the extant teeth called odontodes, that were superficial components of the dermal skeleton of primitive agnate fish, the ostracoderms (Sasaki, 1990).

Odontogenesis has been studied particularly in terms of the interaction of the ectoderm-derived epithelium with the underlying neural crest-derived mesenchyme (Slavkin, 1991; Satokata and Maas, 1994; Thesleff and Sahlberg, 1996; Neubüser et al., 1997; Kettunen e Thesleff; 1998; Dassule and McMahon, 1998; Wang et al., 1998; Tucker et al., 1998; Vu et al., 1999; Schwab et al., 1999; Coin et al., 1999; Lézot et al., 2000). Early tooth development depends upon the expression of the paired-box-containing transcriptional factor gene family Pax9 by the underlying mesenchyme, which is controlled by diffusible signaling molecules from the overlying ectoderm. This regulation is made by antagonistic interactions between fibroblastic growth factors (FGF) and bone morphogenetic proteins (BMP) signaling pathways (Neubüser et al., 1997). Fgf8-expressing ectoderm was detected covering and extending over the Pax9 expression domain in the underlying mesenchyme, and FGF proteins, including FGF-8, were shown to induce and maintain Pax9 expression. In the mesenchyme domains where Pax9 is not expressed, the overlying ectoderm was found to express Bmp2 or Bmp4. The Fgf8- and Bmp2/Bmp4-expressing regions of the ectoderm overlap, and in the underlying

mesenchyme of the overlapping-regions, Pax9 is not expressed. This fact is consistent with the role of BMP-2 and BMP-4 proteins as antagonists of FGF signaling, preventing Pax9 expression. This antagonistic control determines the beginning of the dental development, with the condensation of the mesenchyme. In the regions where Pax-9 is not expressed, the teeth will not be formed, being these places the inter-dental areas (Gilbert, 2000).

The morphological events of murine tooth development begins with a thickening of the oral ectoderm, followed by its invagination into the underlying mesenchyme, forming the epithelial bud (bud stage). The mesenchymal cells surrounding the bud proliferate and condensate, ultimately giving rise to the dentin-secreting odontoblasts and the dental pulp. The bud stage progresses to the cap and bell stages and the epithelium differentiates into the enamel-secreting ameloblasts (Neubüser et al., 1997; Fukumoto et al., 2004). After the deposition of a first layer of dental enamel, the ameloblasts dislocate centripetally, moving away from the enamel dentin junction (EDJ) and the recent produced enamel matrix, towards the surface of the tooth. As it migrates, the ameloblasts develop particular cytoplasmic processes in their secretory pole known as the Tomes' processes, which extends itself farther than the distal junctional complex, forming an angle with the ameloblasts body (Sasaki, 1990). The secretory surfaces of the Tomes' processes are responsible for the arrangement of the enamel rods, as it dictates the orientation of the protein-rich enamel matrix which will behave as a scaffold for deposition of the enamel mineral crystallites (Paine et al., 2001). The arrangement of these crystallites allows the distinction of three main structural components: rod, interrod and aprismatic enamel (Dorozhkin, 2009). The enamel rods (formerly known as enamel prisms) are the basic unit of the enamel, found in rows along its thickness, from the EDJ to the surface of the tooth. The enamel crystallites in the rods are tightly packed in an organized pattern. The interrods (or interprismatic) enamel is found surrounding the rods, and is formed by less organized enamel crystallites. In the aprismatic enamel, the crystallites show no alignment. As the Tomes' processes' morphology is different for each species, there is a diversity in the morphological pattern for the enamel rods, giving rise to particular architectures of the enamel (Sasaki, 1990; Risnes et al., 2002).

While some species have the capacity of regenerating teeth that were lost due to anomalies of development, trauma or infectious diseases, such as caries and periodontal diseases, humans lack this capacity. Once we know more about tooth development regulatory signaling, we will have more possibilities to use this signaling cascade to induce pluripotent cells from the mandible and maxile that will potentially differentiate into cells of the odontogenic lineage and create supranumerary teeth in specific sites, where tooth lost has occurred (Paine et al., 2001). Moreover, understanding in deep the morphology and ultrastructure of the enamel, which has being developing along millions of years of evolution, will help in developing substituting materials and processes that mimic the original properties and driving forces for the production of its structure (Paine et al., 2001). In this way, experimental models that possess the characteristics of continuous formation, as rodent incisors, are of fundamental importance to this goal.

In this work we present an original approach for the study of the dental enamel structure aiming to elucidate several characteristics of its complex arrangement pattern. This work also aims in contributing to the study of other biomineralized structures as it proposes a particular approach to study hard tissues based on the observation of diamond

knife sectioned mineralized samples, further observed systematically by different microscopy methods.

Materials and Methods

Animals

This research was approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals at the Institute of Biomedical Sciences - Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. We have used Wistar rats (*Rattus norvegicus*), from both sexes, with ages ranging from zero to 15 days. The animals were anesthetized and sacrificed by decapitation (?). The mandibles of each animal was carefully dissected under a stereoscope.

Characterization of the enamel of the incisors and molars

- Light microscopy

After the dissection of the mandibles, the incisor teeth were extracted, mechanically cleaned and immersed in a 4% sodium hypochlorite solution (Salomon *et al.*, 1991) for 10 minutes, washed in distilled water for 20 minutes and dried in an oven at 60°C. Teeth were included in PolyBed 812® (Polysciences) which was polymerized at 60°C for 48 hours. Transversal sections of the incisors included in the resin were obtained with a low speed diamond wheel saw (SouthBay Technology, Inc), ground and polished in one side, washed in distilled water, and air dried. Each section was glued, using the same resin, to the glass slide for the observation by light microscopy, with the polished section facing the slide, and then polymerized in a oven at 60°C for 48 hours. Afterwards the free side of the sections containing the incisors, were subjected to a series of grinding and polishing procedures under an intense flux of water, until a thickness of circa 50 µm was reached.

Some sections were treated with 10% phosphoric acid for 10 seconds, washed in distilled water, and permanently mounted using Entellan® (Merck) resin. Other sections were stained with 1% toluidine for 30 seconds in a hot plate and further stained with basic fuchsin 1% for 20s, washed with distilled, dried and permanently mounted with the same resin and glass coverslip of 0.17mm thickness, and left still.

The sections were observed in a Zeiss Axioplan optical microscope in the bright field mode and Differential Interference Contrast (DIC – Nomarski) with a CCD camera (Hamamatsu-C2400) attached to the ARGUS-20 Hamamatsu Image Processing system.

- Scanning electron microscopy

To observe the mineralized structure of the enamel by SEM, the incisors were clivated longitudinally under a stereomicroscope, treated with 10% phosphoric acid for 10 seconds, washed in distilled water and air dried. Other incisors were clivated using a conic drill applied to the tip of the tooth in such a way that the planes containing the enamel rods could be apparent (making an angle of circa 50° to the enamel dentin junction EDJ). The clivated surface was treated with 10% phosphoric acid for 10 seconds, washed in distilled water and dried. The fragments of incisors were mounted in aluminium stubs (1/8" PIN- Ted Pella®), with a conductive carbon tape (8mm, Ted Pella®) and sputter coated with gold (circa 10 nm) in a Balzers Union equipment. The samples were observed in a JEOL JSM- 3510, scanning electron microscope (SEM)

operated at 15 kV or 20kV, or a FE-SEM JEOL 6100 at 5kV. Images from JEOL JSM-3510 were digitized using SemAfore® JEOL 3.0 PRO.

To observe serial sections by SEM, glass coverslips with the serial semithin sections were cut with a diamond pen and the selected region with the sections was mounted onto an aluminium stub with double-face carbon tape, and gold sputtered.

Some samples were fixed in glutaraldehyde 2,5% in cacodilate buffer, pos-fixed in 1% Osmium tetroxide, washed in the buffer, dehydrated in an ethanol series (35%, 50%, 70%, 80%, 90%, and three baths of 10 min each in ethanol 100%), critical point dried using CO₂ in a Balzers apparatus, mounted in aluminum stubs with double face carbon tape, sputter coated with gold (< 10 nm) (Balzers Union fl-9496) and observed by SEM.

Analysis of the relation cell/enamel

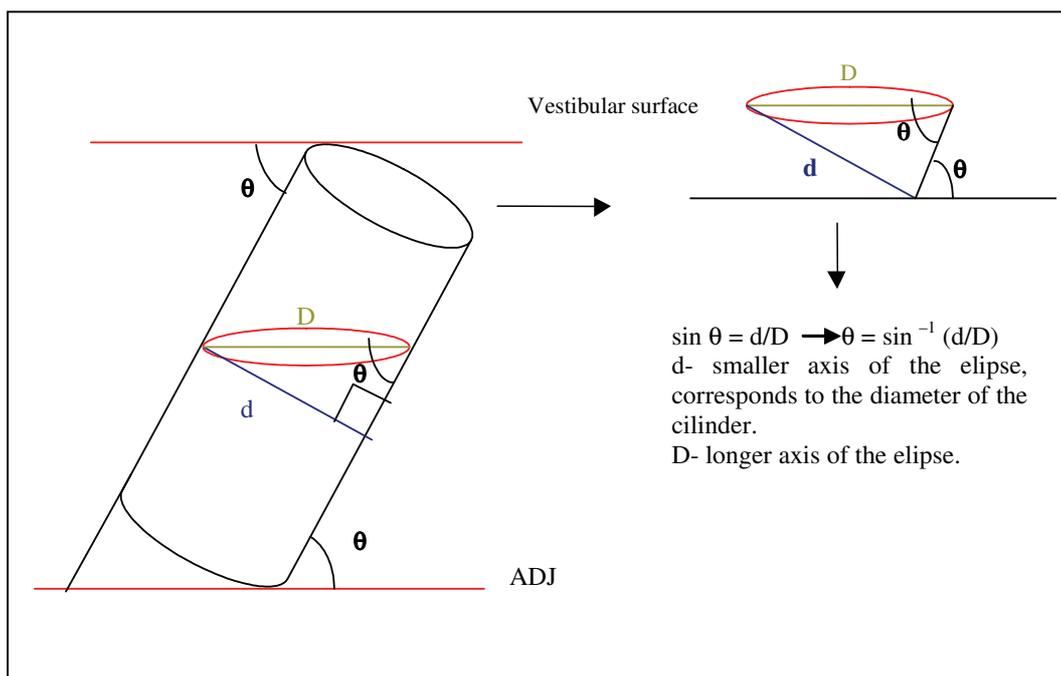
After dissection the mandibles were removed and immersed in a modified Karnovsky fixative solution: glutaraldehyde 2,5% and paraformaldehyde 4% in sodium Cacodilate buffer 0,1M, pH ranging from 7,2 to 7,4 at room temperature. Afterwards the mandible was dissected under a stereomicroscope in a glass Petri dish, in sodium cacodilate 0,1M buffer solution, removing carefully the lower incisors which were fixed by immersion in the same fixative solution. In some samples, the apical tissues were fixed for two hours by immersion, in the same buffer. The samples were washed three times in the same buffer 10 min each, and were post-fixed in 1% Osmium tetroxide in 0.1M cacodilate buffer (pH between 7,2 and 7,4) for 30 min at room temperature, in the dark. Afterwards the samples were washed in the same buffers 10 min each, dehydrated in an acetone series (35% ,50%, 70%, 80%, 90%, 95% and three baths in 100% acetone for 10 min each), embedded in PolyBed 812 ® (Polysciences) by slow infiltration of the resin (acetone/resins ratios: 1:4; 1:3; 1:2; 1:1, and pure PolyBed 812® (Polysciences) resin, approximately 8 hours in each step). In the case of the apical tissues, special care was taken to especially orient the sample in the cavities of embedding molds, before polymerization at 60°C for 48 hours.

The polymerized sample blocks were trimmed and cut in a Sorval Portel-Blum MT2- B ultramicrotome, with a diamond knife (Diatome and Pelco). Thick and semi-thin serial sections were obtained, stained or not with toluidine blue, and observed by light microscopy and SEM.

Characterization of the spatial orientation of the enamel rods from incisors

Images from the serial sections of the vestibular face of incisors obtained by SEM, allowed the measurement of several parameters giving the orientation of individual enamel rods and layers containing rods, relatively to reference planes of the tooth (eg. the EDJ). In a first approximation we can consider the enamel rods at the bulk region of the enamel as having a cylindrical geometry. Thus, a section of the rods by a plane oblique to the rod longer axis will give rise to an elliptical contour. By measuring the lengths of the longer axis and the smaller axis of the ellipse, the angle between the longer axis of each rod and the EDJ could be calculated. Other geometrical information could also be obtained, as for example the angle between the layers that contain rods and the EDJ.

Scheme 1 shows the rationale for the calculation of the angle θ , between each rod axis and the EDJ. From this figure we see that $\theta = \sin^{-1} (d/D)$, where d is the smaller axis of the ellipse (which corresponds also to the diameter of the original cylinder) and D is the longer axis of the ellipse.



Scheme 1. Estimated angle between enamel rods and EDJ. Scheme representing the position of a enamel rod, relatively to EDJ. Note that d corresponds to the smaller axis of the ellipse and also to the diameter of an enamel rod.

Tri-dimensional reconstruction from optical sections

The 3D reconstruction of the ameloblasts was done with the software 3dmod, from the IMOD suite 3.13.6 for Microsoft Windows, available free of charge at the website of the Boulder Laboratory for 3D Electron Microscopy of Cells, University of Colorado (<http://bio3d.colorado.edu/imod/>). A thick transversal section of the cells (approximately tangent to the mineralizing enamel surface) was stained with toluidine blue and examined by DIC method with a Zeiss Axioplan optical microscope, equipped with a MediaCybernetics CCD camera. A sequence of optical sections $1\mu\text{m}$ apart in the Z direction of the secreting ameloblasts were inserted into the 3dmod and the closed contour of the cells from a chosen group of neighbor ameloblasts were manually drawn in each of the focal sections. The contours of the individual cells were connected across sections by a triangular mesh to create a 3D surface model, which was then rendered.

Results

The structure of incisor rat enamel is complex; its symmetry is not easy to follow unless some systematic observations are performed along specific directions. The difficulty for a direct interpretation of the organization pattern of the structure is seen in figure 1, a histological transverse section and figures 2, a longitudinal fracture surface of the tooth, and 3, an oblique fracture surface of the tooth, observed by scanning electron microscopy (SEM). However, by obtaining serial sections with a diamond knife, or by polishing the sample in a certain plane, eg. a plane parallel to the enamel dentin junction (EDJ), several features can be studied, and the organization pattern of the enamel rods begins to be resolved.

When sections parallel to the EDJ of the lower incisor, near the outer surface of the enamel, were obtained and stained with toluidine blue, it was possible to analyze the distribution pattern of the enamel rods (Fig. 4a). The enamel is composed by layers of mineralized rods with a thickness corresponding approximately to the diameter of one ameloblast, which are inclined incisally, and whose rods are by its turn further inclined mesially or distally for alternating layers. Each layer of rods makes an angle with the EDJ. As a consequence, considering that each rod is approximately a cylinder (see figure 3), the oblique sections of rods are ellipses that change systematically the orientation direction of their major axis (Fig. 4a, 4b). In many cases the layers are incomplete, which means that the rods of a particular layer do not go from one side (mesial) to the other (distal), as indicated by the dashed circle in figure 4a. The cells that produced the extracellular matrix which is mineralized as rods, the ameloblasts, are also organized in layers (Fig. 4c), and are usually represented schematically in the literature, with the longer axis perpendicular to the growing enamel surface. We will see later in this work that this is not trough (?) (Figs. 9a and 9b).

A complete reconstruction of a section parallel to the EDJ, by means of obtaining several scanning electron microscopy (SEM) images arranged side by side, allowed the complete interpretation of the organization pattern of rods in the whole structure of the dental enamel of the rat. In figure 5, it is observed an interweaving pattern among the rod layers, with each layer inclined to an opposite side (mesially or distally) relatively to the neighbor layer, and that also the inclination angle of individual rods inside each layer, differs relatively to the neighbors mainly at the mesial or lateral regions. In each layer, rods that present a section more similar to a circle in a certain extremity (mesial or distal) became more elongated ellipses at the opposite extremity (distal or mesial) and tend to point more radically to the incisal extremity. This is shown in figures 5b, 5c and 5d, where it is observed that at the mesial or distal sides, projection contours of rods from adjacent layers are very different (figures 5b and 5d), while in the middle of the distance from mesial to distal sides, the contours of rods of neighbor layers are ellipses with similar eccentricity (figure 5c). Inside each rod, the enamel crystallites are approximately parallel to the rod axis (figure 6), while in the interrod region crystallites are oriented very differently (region between rods in figure 6).

Figure 7 is an elucidative picture; it was obtained by cutting the highly mineralized rat incisor enamel with a diamond knife in a plane parallel to the EDJ, and observing the new surface by SEM. Figs 7a, 7b and 7c represent three major regions of the incisor enamel, from the more internal (Fig. 7a, composed by rods), to outer regions,

where the rods point incisally at the medial and distal sides (Fig. 7b) or the more external region composed by aprismatic enamel (Fig. 7c). The insert in figure 7 shows that the aprismatic region is composed by crystallites that have undulating surface topography, probably associated to circadian processes.

By cutting and polishing the rat incisor enamel in a plane making circa 50° with the EDJ, and observing the section by interference contrast (Fig. 8a), it was possible to have few layers of rods in the same section, and measure the angle between rods of adjacent layers, directly in the image (θ in figure 8a = 82°). Using this approach, it was also possible to observe in the same sections, different regions of the outer enamel and the orientation of the projection of the ameloblasts relatively to the EDJ (Fig. 8b). The ameloblasts observed in figure 8b were related to the deposition of the external layer of the enamel where the decussation was absent. In this projection, it was clear that the longer axis of ameloblasts was perpendicular to the mineralization front (Fig. 8b).

By analyzing tomographycal reconstructions from DIC individual focal optical sections obtained from growing enamel during the secretory phase (with presence of Tomes' processes), it was possible to see that the ameloblasts displayed an interweaving organization pattern consistent to the one observed in the enamel rods (Figure 9). However, the angle between ameloblasts of adjacent layers were smaller than the ones between corresponding rods. It was also possible to see clearly the presence of many junctions between ameloblasts from the same layer (Fig. 9a, dashed circles) and from neighbor layers, with the same cell being able to connect simultaneously with different cells (Fig. 9b, dashed circles).

To confirm that the contours of the rods in serial sections could inform about its 3D organization, the contours observed in SEM images were considered as ellipses, and the larger axis to smaller axis ratio was used to calculate reference angles between rods and layers with a plane tangent to EDJ at each region analyzed. It was observed that each rod changes inclination from one side to the other of the enamel (Fig. 10a) and that the layers containing rods are also inclined relatively to the EDJ (Fig. 10b), as already shown in figure 8a. This is an original way to calculate angles between individual rods and the EDJ, and had not been shown in the literature yet. On the other hand, the calculated angle between layers of rods and the EDJ varied from one side (mesial – distal) to the other (distal – mesial) and the highest value found by us (45° in the middle region) was near to the one described by Risnes (50° , Risnes et al. 2002) showing that this approach can be very useful for comparative morphological studies.

For comparison with the enamel of rat incisor, the same approach (polishing, slightly etching, sputter coated with gold and analyzing by SEM) was performed to study the organization of enamel rods in the lower incisor of the larger rodent *Cuniculus paca* (Fig 11). Different from the rat, it was observed that layers containing rods were thicker and presented a sub-structure; it was composed of sub-layers of rods whose orientation varied slightly from one sub-layer to the neighbor, and after circa of 8 to 10 sub-layers, the orientation changed abruptly, and a new series of slightly changing sub-layers occurred (Fig. 11a and 11b). Incomplete layers were also observed similarly to rat incisor, although in this case, it was composed of several sub-layers (arrows in figure 11a). For comparison between the initial steps on incisors enamel formation from rat and from *C. paca*, a more apical region was chosen. While in the nascent rat enamel it was possible to observe the alternating symmetry of neighbor layers (Fig. 11c), in *C. Paca*,

this organization pattern was scarcely present or was not present at all (Fig. 11d), suggesting a significant role of epigenetic factors in the determination of the whole structure of the enamel.

Discussion.

In this work we presented a systematic approach on the study of the dental enamel which consisted mainly in sectioning the enamel with a diamond knife in a plane parallel to the vestibular surface of the tooth, and analyzing it by different microscopy methods. Different from other authors that use polished sections or sections of demineralized material, we have used in several situations, the sample fractured (clivated) analyzed by SEM after slight etching, which allowed a great detail of interpretation.

Dentition in rats consists of one incisor and three molars in a hemi-arcade of each maxillae. In the maxilla, the incisor is located in an anterior position relatively to the molars; however, in the mandible, the incisor originates behind, and extends below the molars, erupting in the anterior region, with continuous growth throughout the animal's life span, which compensates the functional abrasion at its incisal end. The molars are more similar to those of humans, both morphologically and physiologically, having basically its period of development restricted to the 125 days after birth and suffering low abrasion.

The incisor of rat has been highly studied as it presents continuous growth, which allows the observation of the several stages of enamel formation in an only tooth. Although the incisor has a continuous growth, the formation of the enamel by each individual ameloblast is limited in space and time (Risnes, 1979a, Salomon et al., 1991; Eisenmann et al., 1992; Takano et al., 1996; Wong et al., 2000; Lézot et al., 2000). In the lower incisors of rats the dental enamel is present in the labial (vestibular) face and in the lateral face, free from the contact (distal), being the mesial face almost completely devoid of dental enamel.

The rat enamel layer is thin enough (circa 100 to 140 μm) (Wong et al., 2000; Risnes et al., 2002) to be matured by the ameloblasts after its whole thickness has been deposited. This may indicate that the ameloblasts of the rat are specially adapted to be efficient in the activities related to secretion during the 7.5 to 11 days of the secretory stage, living a great part of the maturation to a later stage. This possibility do not apply to the human teeth enamel, which would require an alternation between secretion and maturation during the secretory stage, due to the higher thickness. The characteristic of maturation to occur in a specific and only phase of the formation of the dental enamel in rats, may be interpreted as an adaptation for a rapid irruption of the rat incisor, that is necessary to compensate the velocity of the incisal grinding process (Risnes et al., 2002).

In rat teeth the architectural pattern of the prismatic enamel may be separated in two distinct layers, according to the disposition and orientation of the enamel rods. A more internal layer, where neighbor rows of rods are crossed, is called inner enamel (Risnes, 1979a; Møinichen et al., 1996). In the inner incisors enamel, the decussation angle between rods in neighbor rows is about 80° , while the angle between the layer containing the rods and the EDJ is 50° (Risnes, 1979b), showing that the rods besides being inclined transversally, are also inclined incisally. This pattern of crossing of rods

occurs because the rods rows incline in opposite directions relatively to the face in which their formation begins (mesial or distal). This arrangement confers a great resistance to the tooth (Møinichen et al., 1996). More externally, there is a layer where the rods are parallel to each other and to the external surface of the enamel and are oriented in the direction of the incisal margin. This layer is called external enamel (Møinichen et al., 1996). The transverse inclination of the ameloblasts during the secretion of the inner enamel and the incisal inclination of the ameloblasts during the secretion of the external enamel are responsible for this architecture of the dental enamel (Risnes, 1998).

It is believed that the complex structure of the enamel of the rat incisor is established at the interface between the secretory ameloblasts and the forming enamel. This interface has a corresponding 3D configuration. Risnes et al. (2002) affirmed that “several works have contributed in the direction of the characterization of the topography of this interface, however a complete understanding has not been reached yet”. In spite of the teeth from rodents and humans have the same basic structures, rods and interrods regions, the enamel of rodents is the only one that presents a decussation of rods, showing also a characteristic division in two layers. Several alterations may occur in the organization of rods in incisor enamel of rats (Risnes, 1978), such as the disposition of the rows of rods, which can present a change in the transverse orientation; the fusion of rows of rods; the bifurcation of a single row; rods that change direction in the same row; and rods from adjacent rows that possess the same orientation. These imperfections were observed in transverse sections of the dental enamel of rat incisors.

Paine et al. (2001) established a methodology to study amelogenesis in a hierarchical form, from the nanoscale, passing through the mesoscale until reaching the macroscale. The nanoscale, the first level of organization, would be defined by the protein-protein and protein-crystallite interactions; this hierarchical scale is dependent of gene expression, which determines the protein specificity of the extracellular matrix of enamel. The main proteins in the forming dental enamel are amelogenins and enamelin, being the former the most abundant (over 90%) (Warshawsky, 1989; Sasaki, 1990; Robinson et al., 1998; Fincham et al., 1999; Paine et al., 2001; Hart et al., 2002; Moradian-Oldak et al., 2002; Brookes et al., 2006). The amelogenins are hydrophobic proteins that belong to a heterogeneous group of low molecular weight (20 to 30-kDa); it plays an essential role in enamel formation (Paine et al., 2001). Although amelogenins present hydrophobic domains, it also present highly conserved hydrophilic amino- and carboxyl-terminal sequences, allowing the self-assembly of spheres of tens of nanometers in diameter, characteristic of enamel matrix (Fincham et al., 1995). The nanospheres' assembly begins intracellularly, with the formation of complexes comprising up to six individual amelogenin monomers (Brookes et al., 2006). After secretion, these prefabricated subunits assemble further to form mature full-size nanospheres containing hundreds of individual amelogenins. These nanospheres may be located adjacent to the a- and b- surfaces of the enamel crystallites, favoring its elongation on the c-axis (Paine et al., 2001). In this way, the amelogenin nanospheres would direct the mineral phase growth and arrangement. The enamelin, is a glycosylated acidic phosphoprotein rich in glutamic acid, aspartic acid and glycine. Its molecular weight is around 65 kD, which is higher than the amelogenins. There is a spatial correlation between the enamelins and the enamel crystallites, which indicates that this protein also has a specific function in the regulation of the formation of the crystallites (Deutsch, 1989; Lowenstam e Weiner,

1989; Sasaki, 1990; Robinson et al., 1998). The complete growth of the enamel crystallites happens in the maturation phase, when the amelogenins are removed together with the water, leaving almost 100% of the enamel mineralized (Glimcher, 1979; Deutsch, 1989; Lowenstam and Weiner, 1989; Fincham et al., 1999; Hunter et al., 1999; Moradian-Oldak, 2001). After the maturation phase has been concluded, the amelins become the major proteins of the dental enamel (Deutsch, 1989; Lowenstam e Weiner, 1989, Fincham et al., 1999).

The nanoscale is organized by cellular events at the mesoscale, where the ameloblasts control the conformation and vector of movement of the secretory Tomes' processes, which dictated the orientation of the protein matrix, and subsequently, of the enamel crystallites (Paine et al., 2001). Mesoscale events include: ordered secretory events; ameloblast-ameloblast, ameloblast-extracellular matrix and ameloblast-stratum intermedium interactions; and ameloblast migration outwards from the EDJ towards the tooth surface (Paine et al., 2001). The oblique migratory path of the ameloblasts produces an interweaving of the neighbor ameloblast layers, which reflects on the organization of the secreted enamel proteins and the creation of the rods and interrod regions. Each rod and interrod is composed by hundreds of enamel crystallites arranged at approximately perpendicular angles to the secretory surfaces of the Tomes' processes. It was suggested that the basal tip of the Tomes' processes contribute to the formation of the rod, while the sides, specially the larger secretory surface along the incisal-orientation, to the formation of the interrods (Paine et al., 2001). As the shape of the secretory surfaces of the Tomes' processes governs the arrangement of the enamel crystallites in rods and interrods, the angle between its orientations is a reflection of the angle between the parts of the processes that contribute to the formations of their respective matrices (Paine et al., 2001). The different parts of the Tomes' processes connect by gradual curves, leading to a blending of the apical surfaces of the rods into the interrod to form a continuum, producing a "fish scale" appearance (Paine et al., 2001).

When describing the macroscale, Paine et al. (2001) considered two zones of "specialized enamel" that presented variations in the genetic programming during the tooth development. The first specialized enamel is the one that forms the EDJ, being deposited onto the adjacent dentine and under the volume of the higher enamel. This layer undergoes modifications in order to perform a gradual transition from the enamel to dentine, allowing a durable union between the enamel of the EDJ and the dentine. The last specialized enamel, by its turn, constitutes a more external enamel zone, that guarantees specialized functions for the intact tooth (Paine et al., 2001).

The enamel crystallites grow along the c-axis concomitant with the advance of amelogenesis (Sasaki, 1990). This growth may happen by renucleation, or by additional growth of an extremity of the crystallite (Lowenstam e Weiner, 1989). The growth mechanism is restricted to a process very well controlled. In all stages, the enamel crystallites are organized in well ordered parallel arrangement among each other, and have notably uniform dimension when observed in a transverse section (Lowenstam e Weiner, 1989).

The enzyme alkaline phosphatase may have a fundamental role in the mineralization process. Besides promoting the hydrolysis of phosphate ions from an organic radical in alkaline pH, giving phosphate ions to the formation of the calcium orthophosphate crystallites in the form of hydroxyapatite, it can interfere in the growth of

the crystallites, degrading the pyrophosphate that, after deposition onto the its surface, would inhibit its growth (Referencia ?).

Although the enamel rods have a geometric morphology and a regular pattern, in the inner enamel they have some changes in patterning, which implies that the organization pattern and periodicity of the enamel structure is not totally symmetric. We observed that in the inner enamel, the rod rows in some instances fuse, which corresponds to a morphological variation in relation to the idealized geometrical pattern, in the formation of the rat dental enamel when sections parallel to the vestibular surface of incisors are observed. This alteration are related to the patterns of ameloblast organization since the beginning of the formation of the enamel, or to changing in the trajectory of the cells, to accommodate the whole system in a limited geometry in 3D. The possibility that there are bifurcation in these rows of rods was suggested by Risnes (1978), when observing polished thin sections of the vestibular face of rat incisors by light microscopy. This scenario is improbable, as there is no register in the literature that supports the possibility of ameloblasts proliferation after differentiation. In this way, it would not be possible for a certain group of already differentiated and in a secretory activity cells in a row, to divide in another row of cells with a capacity of secreting, so that it could produce this pattern of bifurcation of rod rows. Apoptosis could also occur. To test this hypothesis, a continuous serial sections should be performed and the contours of “fusions” and “bifurcations” should be followed to observe possible discontinuities of a particular row. For Risnes (1998), the number of ameloblasts that beggin the production of enamel in the EDJ is the same that ends the formation of the enamel at the enamel outer surface, in contradiction with Kondo et al. (2001) and Joseph et al. (1999) which affirm that, at the end of amelogenesis, only 50% of the ameloblasts are present due to the apoptosis undergone by the other 50% at the phase of transition and/or maturation.

In the region of transition between the inner enamel with the outer enamel, we have observed the rods bending to the incisal direction; besides, it exists an alternance of the rows for this behavior. In a section parallel to the EDJ (see Fig. 5), one row would form a line of external enamel pointing to the incisal end in the mesial region, while the adjacent row would form a line with the same characteristics but pointing to the incisal end only in the distal face. This pattern of organization corresponds to the geometry of rods of inner and outer enamel.

The interrod regions has been described as plates (Risnes et al., 2002) due to the junction of the interrod enamel of adjacent rows. However, in some images, the interrod regions appears with thin groups of crystallites, similar to plates passing between the rods (Fig 6). For Risnes et al. (2002), the orientation relatively to the EDJ required to see the layers of rods transversely (approximately 50°) is not appropriated to fine observations of the interrod region. We agree, as this angle allows the observation of the crossing pattern of rods in adjacent layers, but not the interrod crystallites.

As the outer (vestibular) enamel surface occupies a greater area than the EDJ, Risnes (1998) suggests two possibilities for the fact that the same quantity of cells can satisfy the requisite that is to cover a greater area: (1) enlarging its own diameter while maintaining the position perpendicular to the enamel surface or (2) maintaining the diameter constant and changing its inclination relatively to the surface of the enamel. This kind of movement of the cells, as suggested by Osborn (1970b), is a consequence of the secretory force of the ameloblast. We suggest an increasing in the quantity of the

interrod in the more external region of the enamel, since it does not appear to occur a visible alteration in the diameter of the rods from the EDJ to the more external surface of the enamel (see Figs. 2 and 3). Møinichen et al. (1996) found that there is an increase in the quantity of interrod, combined with the reduction in the number of rods in the external enamel layer, near the surface.

An appreciation of the geometry of the constituents of the dental enamel may contribute to the understanding of amelogenesis (Risnes, 1998). The cylindrical morphology of the rods elucidates its disposition relatively to the vestibular surface of the incisor since the elliptical pattern of the rods in oblique section, indicates that sections parallel to the vestibular surface of the incisor, are oblique to the rod axes. In this way, we get to the conclusion that the rods in the inner enamel layer are not perpendicular to the vestibular surface, but oblique to it. The angles calculated by us between the surface that contains rods and the vestibular surface was smaller than 50° (Risnes et al. (2002), as showed in figure 10b. This may be due to the fact that these angles may vary along the tooth, and also due to a misparallelism between the vestibular surface and the EDJ (our section planes are parallel to the outer surface of the vestibular surface of the tooth) or to a not perfectly cylindrical geometry for the enamel rods (as we calculated this angle at each point by measuring the parameters from the elliptical projected contour). Besides, it can be noted that the surface that contains the rods is not flat, and additionally it makes a higher angle with the EDJ next to the sagittal plane and a lower angle next to the external enamel near the mesial and the distal surfaces. As it was shown in this work, the analysis of the sections of the rods in specific planes by SEM (as the one parallel to the vestibular surface) allowed the determination of several quantitative data about its structure.

The cells form a continuous layer onto the forming enamel, and when we cut the dental germ in section planes tangent to the enamel surface, it is observed a close packed organization similar to the rows of rods seen in the sectioned enamel. In some regions a hexagonal pattern is observed, what would be expected for the minimization of contact energy and optimization of contacts for the total fulfilling of the tissue volume (see Fig. 4c). In this way, it is remarkable that the layers containing ameloblasts move in an opposite direction when compared to two neighbor layers, considering that there is a natural tendency to each ameloblast to have a hexagonal prismatic morphology, and also that they make cellular junctions with neighbors of the same and from adjacent layers (Fig. 9a and 9b, respectively). It would be very interesting to evaluate the force of each individual cell to move, and the extent of energy needed to perform this kind of movement, for individual cells and for the whole enamel tissue.

Each tooth has a shape to adapt itself to its specific function. As shown by Farina et al. (1999), the surface of the tooth related to the aprismatic enamel does not present geometric regularity, although the enamel crystallites align in parallel to each other and perpendicularly to the surface of the tooth (see also insert in Fig. 7). This is probably related to the absence of the Tomes' processes.

Sectioning the incisors enamel parallel to the vestibular surface (and also to the EDJ) allowed the determination of the angles formed by the rods with the vestibular surface, and indirectly with the EDJ. The angles measured are in the same order of magnitude to those informed by Risnes. This was useful to produce sections in appropriate orientations, using samples from the regions of the forming enamel (more apical region of the tooth) that contain both the rods and the ameloblasts with Tomes'

processes. To this purpose it has to be considered a sagittal plane. For the calculations of each angle, a new geometrical approach was used, by considering that each enamel rod has a cylindrical geometry. Thus each oblique section will have an elliptical geometry (see Fig. 4b).

The behavior of each rod inside a certain row implied also a curvature towards the incisal region. Each row behaved differently from the neighbor, with the described curvature being alternated mesially or distally. This relation confirms the alternation of the pattern of the rows when continuing in the external enamel, since the inclination of the rods in relation to the vestibular surface in one of the extremities of each row is smaller than in another one, indicating a tendency to the parallelism of these rods with the vestibular surface (see Figs. 10a and 10b). This relationship is clear when we observed the rods from one of the extremities of the row in continuation with the external enamel, which we know has the rods with a parallel orientation among each other and parallel to the vestibular surface, pointing incisally (Fig. 5). The change in the inclination of individual rods relatively to EDJ has as a consequence the change in the angle between the rods layer and the EDJ, when we go from the center of the structure (near the sagittal plane) to the periphery (mesial or distal surfaces).

When we calculated the angles between the surface that contains the rods with the EDJ, we did not obtain a uniform pattern, demonstrating that, although the rods are parallelized (?) in parallel, each segment of the row may have a distinct inclination relatively to the EDJ. This causes a “C” shape conformation of the rows in sectioned planes parallel to the EDJ in incisors, with the concavity pointing to the incisal end. In this way, we can explain the spatial disposition of the rods that belong to the same row in projection, but this row corresponds to a section of a curved surface in 3D. This is a demonstration of the complexity of the arrangement of the rods in the inner enamel. Thus, there is not a single value for the angle formed between the layers of rods and the EDJ in rat incisors enamel. We suggest in the present paper that this angle should be evaluated locally, for each rod individually or for a few groups of rods, different from some previous suggested values (45°, in Risnes, 1979a and 50° in Risnes et al., 2002).

In conclusion, structural features from rat incisors enamel were studied in this work by several microscopy methods, associated to particular sample preparation procedures which included sections of specially selected regions of the tooth, in specific orientations by using an ultramicrotome with a diamond knife. It was observed that measuring the diameters of the cylindrical contours from the sectioned rods several important parameters for the 3D reconstruction of the structure can be obtained, including original data about the angle that a single ameloblast makes with EDJ. Besides, with serial sections and 3D reconstruction using a software for tomographic sections analysis, it was possible to show that ameloblasts change orientation relatively to the just secreted enamel surface from the synthesis phase to the maturation phase. Also the sectioning method associated to SEM observation of several micrographs properly aligned side by side, allowed a complete interpretation of the enamel rows in a plane, and has a great potential for several quantifications of the structure. This was the case of the interpretation of SEM images of the larger rodent *C. paca*, where each thick layer of arranged rods was found to be composed by 8 to 10 rows of enamel rods, different from the rat which presents only one.

References

- BROOKES, S.J.; LYNGSTADAAS, S.P.; ROBINSON, C.; SHORE, R.C.; KIRKHAM, J. Intracellular nanosphere subunit assembly as revealed by amelogenin molecular cross-linking studies. *European Journal of Oral Science*, v. 114, Suppl. 1, p. 280-284, 2006
- COIN, R. HAIKEL, Y.; RUCH, J.V. Effects of apatite, transforming growth factor β -1, bone morphogenetic protein-52 and interleukin-7 on ameloblast differentiation in vitro. *European Journal of Oral Science*, v. 107, p. 487-495, 1999.
- DASSULE, H.R.; McMAHON, A.P. Analysis of Epithelial-Mesenchymal Interactions in the Initial Morphogenesis of the Mammalian Tooth. *Developmental Biology*, v. 202, p. 215-227, 1998.
- DEUTSCH, D. Structure and Function of Enamel Gene Products. *Anatomical Record*, v. 224, p.189-210, 1989.
- DOROZHKIN, S.V. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials*, v. 2, n. 2, p. 399-498, 2009.
- EISENMANN, D.R.; SALAMA, A.H.; ZAKI, A.M.E. Effects of Vinblastine on Calcium Distribution Pattern and Ca^{2+} , Mg^{2+} - Adenosine Triphosphatase in Rat Incisor Maturation Ameloblasts. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 40, n.1, p.143-151, 1992.
- FARINA, M.; SCHEMMELE, A.; WEISSMÜLLER, G.; CRUZ, R.; KACHAR, B.; BISCH, P. M. Atomic Force Microscopy Study of Tooth Surfaces. *Journal of Structural Biology*, v. 125, p. 39-49, 1999.
- FINCHAM, A.G.; MORADIAN-OLDAK, J.; DIEKWISCH, T.G.; LYARUU, D.M.; WRIGHT, J.T.; BRINGAS, P.JR; SLAVKIN, H.C. Evidence for amelogenin "nanospheres" as functional components of secretory-stage enamel matrix. *Journal of Structural Biology*, v. 115, n. 1, p. 50-59, 1995.
- FINCHAM, A.G.; MORADIAN-OLDAK, J.; SIMMER, J.P. The Structural Biology of the Developmental Dental Enamel Matrix. *Journal of Structural Biology*, v. 126, p. 270-299, 1999.
- FUKUMOTO, S.; KIBA, T.; HALL, B.; IEHARA, N.; NAKAMURA, T.; LONGENECKER, G.; KREBSBACH, P.H.; NANJI, A.; KULKARNI, A.B.; YAMADA, Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *Journal of Cell Biology*, v. 167, n. 5, p. 973-983, 2004.
- GILBERT, S.F. Neural crest cells and axonal specificity. In: GILBERT, S.F. *Developmental Biology*. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2000. p. 411-440.
- GLIMCHER, M.J. Phosphopeptides of Enamel Matrix. *Journal of Dental Research*, v. 58 (suppl.B), p. 790-809, 1979.
- GRINE, F.E.; KRAUSE, D.W.; FOSSE, G.; JUNGERS, W.L. Analysis of individual, intraspecific and interspecific variability in quantitative parameters of caprine tooth enamel structure. *Acta Odontologica Scandinavia*, v. 45, p. 1-23, 1987.

- HART, P.S.; ALDRED, M.J.; CRAWFORD, P.J.M.; WRIGHT, N.J.; HART, T.C.; WRIGHT, J.T. Amelogenesis imperfecta phenotype-genotype correlations with two amelogenin gene mutations. *Archives of Oral Biology*, v. 47, p. 261-265, 2002.
- HUNTER, G.K.; CURTIS, H.A.; GRYPAS, M.D.; SIMMER, J.P.; FINCHAM, A.G. Effects of Recombinant Amelogenin on Hydroxyapatite Formation In Vitro. *Calcified Tissue International*, v. 65, p. 226-231, 1999.
- JOSEPH, B.K.; HARBROW, D.J.; SAVAGE, N.W.; YOUNG, W.G. Apoptosis in Rat Incisor Ameloblasts: An Ultrastructural Study. *Journal of Dental Research (Divisional Abstracts: Australian & New Zealand Division)*, v. 78, n. 5, p. 950-950 , resumo 55, 1999.
- KIMURA, O.; DYKES, E.; FEARNHEAD, W. The Relationship Between The Surface Area of The Enamel Crowns of Human Teeth and That of The Dentine-Enamel Junction. *Archives of Oral Biology*, v. 22, p. 677-683, 1977.
- KONDO, S.; TAMURA, Y.; BAWDEN, J.W.; TANASE, S. The immunohistochemical localization of Bax and Bcl-2 and their relation to apoptosis during amelogenesis in developing rat molars. *Archives of Oral Biology*, v. 46, p. 557-568, 2001.
- LÉZOT, F.; THOMAS, B.; HOTTON, D.; FOREST, N.; ORESTES-CARDOSO, S.; ROBERT, B.; SHARPE, P.; BERDAL, A. Biomineralization, Life-Time of Odontogenic Cells and Differential Expression of the Two Homeobox Genes MSX-1 and DLX-2 in Transgenic Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 15 n. 3, p. 430-441, 2000.
- LOWENSTAM, H.A.; WIENER, S. *On Biomineralization*. Oxford. New York, NY, 1989. 324p.
- LYNGSTADAAS, S.P.; MÖINICHEN, C.B.; RISNES, S. Crown Morphology, Enamel Distribution, and Enamel Structure in Mouse Molars. *Anatomical Record*, v. 250, p. 268-280, 1998.
- MØINICHEN, C.B.; LYNGSTADAAS, S.P.; RISNES, S. Morphological characteristics of mouse incisor enamel. *Journal of Anatomy*, v. 189, p. 325-333, 1996.
- MEYER., J.M.; BODIER-HOULLÉ, P.; CUISINER, F.J.G.; LESOT, H.; RUCH, J.V. Initial Aspects of Mineralization at the Dentino-Enamel Junction in Embryonic Mouse Incisor In vivo and In vitro: A TEM Comparative Study. *In Vitro Cell. Developmental Biology- Animal*, v. 35 n. 3, p. 159-168, 1999.
- MORADIAN-OLDAK, J. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biology*, v. 20, p. 293-305, 2001.
- MORADIAN-OLDAK, J.; BOUROPOULOS, N.; WANG, L.; GHARAKHANIAN, N. Analysis of self-assembly and apatite binding properties of amelogenin proteins lacking the hydrophilic C-terminal. *Matrix Biology*, v. 21, p. 197-205, 2002.
- NEUBÜSER, A.; PETERS, H.; BALLING, R.; MARTIN, G.R. Antagonistic Interactions between FGF and BMP Signaling Pathways: A Mechanism for Positioning the Sites of Tooth Formation. *Cell*, v. 90, p. 247-255, 1997.
- PAINE, M.L.; WHITE, S.N.; LUO, W.; FONG, H.; SARIKAYA, M.; SNEAD, M.L. Regulated gene expression dictates enamel structure and tooth function. *Matrix Biology*, v. 20, p. 273-292, 2001.
- REYES-GASGA, J.; ALCANTARA-RODRIGUEZ, C.M.; GONZALES-TREJO, A.M.; MADRIGAL-COLIN, A. Child, Adult and Aged Human tooth Enamel Characterized by Electron Microscopy. *Acta Microscopica*, v. 6, n. 1, p. 24-38, 1997.

- RISNES, S. A Scanning Electron Microscope Study of Imperfections in The Prism Pattern of Rat Incisor Enamel. *Journal of Ultrastructure Research*, v. 63, p. 86, 1978.
- RISNES, S. A Method of Calculating the Speed of Movement of Ameloblasts During Rat Incisor Amelogenesis. *Archives of Oral Biology*, v. 24, p. 299-306, 1979a.
- RISNES, S. The Prism Pattern of Rat Molar Enamel: A Scanning Electron Microscope Study. *American Journal of Anatomy*, v. 155, p. 245-258, 1979b.
- RISNES, S. Growth tracks in dental enamel. *Journal of Human Evolution*, v. 35, p. 331-350, 1998.
- RISNES, S.; SEPTIER, D.; DEVILLE de PERIERE, D.; GOLDBERG, M.. TEM Observations on the Ameloblast/Enamel Interface in the Rat Incisor. *Connective Tissue Research*, v. 43, p. 496-504, 2002.
- ROBINSON, C.; BROOKES, S.J.; SHORE, R.C.; KIRKHAM, J. The developing enamel matrix: nature and function. *European Journal of Oral Science*, v. 106 (suppl 1), p. 282-291, 1998.
- SALOMON, J.P.; LeGRAND, J.M.; GOLDBERG, M. Scanning Electron Microscopy of the Forming Enamel of Rat Incisor: Influence of Fixative and Treatments Interacting with the Organ Matrix. *Scanning Microscopy*, v. 5 n. 2, p. 509-517, 1991.
- SASAKI, T. Cell biology of tooth enamel formation. *Monographs in Oral Science*, v. 14, p. 1-204, 1990.
- SATOKATA, I.; MAAS, R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature Genetics*, v. 6, p. 348-356, 1994.
- SCHWAB, W.; SCHULZE, E.; WITT, M.; FUNK, H.W.; KASPER, M.. Immunohistochemical localization of the differentiation marker E11 in dental development of rats. *Acta Histochemistry*, v. 101, p. 431-436, 1999.
- SIMMELINK, J.W.; BADEN, S.T. TEM Comparasion of Enamel Prism Border Crystals vs. Body Crystals. *Journal of Dental Research (Mineralized Tissue)*, v. 77, p. 848-848, resumo 1732, 1998.
- SIMMER, J.P. Biochemical Characterization of Mineralizing Matrices: Enamel as a Model System In: *The 8th International Synposium on Biomineralization*. S5-13, p. 104, 2001.
- SLAVKIN, H.C. Molecular determinants during dental morphogenesis and cytodifferentiation: A review. *Journal of Craniofacial Genetic Developmental Biology*, v. 11, p. 338-349, 1991.
- TAKANO, Y.; HANAIZUMI, Y.; OHSHIMA, H. Ocurrance of Amorphous and Crystalline Mineral Deposits at the Epithelial-Mesenchymal Interface of Incisors in the Calcium-Loaded Rat: Implication of Novel Calcium Binding Domains. *The Anatomical Record*, v. 245, p. 174-185, 1996.
- THESLEFF, I.; SAHLBERG, C. Growth factors as inductive signals regulating tooth morphogenesis. *Cell & Developmental Biology*, v. 7, p. 185-193, 1996.
- TUCKER, A.S.; MATTHEWS, K.L.; SHARPE, P.T. Transformation of Tooth Type Induced by Inhibition of BMP Signaling. *Science*, v.. 282, p.1136-1138, 1998.
- VU, D.D.; DANIEL, N.G.; NANCI, A. In Vivo Model for the experimental Manipulation of Calcified Tissues: A Surgical Approach for Acessing the Odontogenic Organ and Associated Tissues of the Rat Incisor. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 47, p. 323-336, 1999.

WANG, Y.; UPHOLT, W.B.; SHARPE, P.T.; KOLLAR, J.; MINA, M.. Odontogenic Epithelium Induces Similar Molecular Responses in Chick and Mouse Mandibular Mesenchyme. *Developmental Dynamics*, v. 213, p. 386-397, 1998.

WARSHAWSKY, H. Organization of Crystals in Enamel. *Anatomical Record*, v. 224, p. 242-262, 1989.

WONG, F.S.L.; ELLIOTT, J.C.; DAVIS, G.R.; ANDERSON, P. X-ray microtomographic study of mineral distribution in enamel of mandibular rat incisors. *Journal of Anatomy*, v. 196, p. 405-413, 2000.

ZEYGERSON, T.; SMITH, P.; HAYDENBLIT, R. Intercusp differences in enamel prism patterns in early and late stages of human tooth development. *Archives of Oral Biology*, v. 45, p. 1091-1099, 2000.

Figure captions

Figure 1:

Transversal section of a rat incisor tooth near the apical region. The early stages of mineralization are seen. From left to right: Ob - odontoblast; Pd - pre-dentine; D - dentine; E - enamel; Am - ameloblast; OE - enamel organ. Toluidine Blue stain. Bar = 16 μ m.

Figure 2:

Sagittal fracture surface of a rat lower incisor, slightly etched with EDTA, observed by scanning electron microscopy (SEM). The top-bottom direction corresponds to apical incisal tooth orientation. The prismatic region is indicated by a circle; the arrow points to the external aprismatic layer. Bar = 50 μ m.

Figure 3

Fracture surface of enamel region of a rat incisor, depicting the complex organization of the rods (arrows) and interprismatic regions (arrowheads). Note that the enamel rods present a cylindrical morphology in this image. Bar = 10 μ m.

Figure 4:

Semithin sections of a rat incisor parallel to the EDJ, near the apical region of the tooth.

4a) Complex arrangement pattern of the layers containing rods, including the presence of incomplete layers are seen, with bifurcation/fusion of adjacent layers of the internal enamel. Bright field light microscopy; staining with 1% Toluidine blue stain. Bar = 18 μ m. 4b) Region similar to the previous one observed by differential interference contrast (DIC) light microscopy method. Note the typical pattern of elliptical contours of each individual enamel rod with the major axis mirrored in a vertical plane relatively to the neighbor. The double arrow indicates the apical-incisal axis of the tooth. Bar = 7 μ m.

4c) In this section it is observed a region containing the ameloblasts. Note that the cells are in close contact, with small contacts resembling junctions (arrows). Cells appear to be organized in parallel rows which are oriented perpendicularly to the apical-incisal axis (double arrow) of the tooth. DIC image of a nonstained section. Bar = 6 μ m

Figure 5:

Section of rat incisor enamel parallel to the EDJ, observed by SEM. 5a) SEM images arranged side by side, showing the organization of the layers containing rods, from the mesial to distal regions of the tooth. The dashed arrow beginning on the top of the figure and pointing down, indicates a layer of rods presenting an elliptical contour with a smaller axial ratio (longer/smaller axis) when compared to the rods of the region indicated by the axis pointing down at the bottom of the figure. It means that the rods in a layer change the angle with the EDJ. Moreover, the rods also change orientation angle relatively to the tooth axis. At the bottom of the figure the dashed arrow pointing down, also points to the right, which is the incisal direction. The same interpretation could be done to the dashed arrows pointing up, but in this case all corresponding rods would be symmetrical relatively to a sagittal plane (horizontal in the figure). Bar = 10 μ m. Figures 5b, 5c and 5d are detailed views of the figure 5a. The arrows in these figures point to the direction of the major axes of the ellipses, which correspond to sections of the enamel rods. Bar = 10 μ m for figures 5b, 5c and 5d.

Figure 6:

Enlarged view of a region observed by SEM in figure 5 showing orientation of enamel crystallites inside the rods. Note that each rod presents crystallites oriented in parallel but have a different angle when compared to rods from the adjacent layer (arrows). The sample in this figure has the same orientation as in figure 5. Bar = 1 μ m.

Figure 7:

Section of a rat incisor enamel from a highly mineralized region, near the vestibular surface of the enamel, obtained with a diamond knife. Three regions of the enamel are seen, from bottom up: (a) inner enamel with typical layers of rods; (b) enamel at the extremities of the rods (mesial and distal regions, where the rods are oriented parallel to the tooth axis); (c) outer aprismatic enamel.

Insert shows that individual crystallites of the outer aprismatic enamel are elongated perpendicularly to the outer surface of the tooth enamel and present subtle and systematic surface undulations (small arrows). Bar = 10 μ m.

Figure 8: Semithin section of rat incisor dental enamel in the plane that contains the layers of enamel rods (thus oblique to the tooth major axis), observed by differential interference contrast light microscopy (DIC). 8A) The analysis of two neighbor layers of regularly oriented rods allows (dashed lines) projected in the same plane allowed the calculation of the angle between rods (θ). It is also observed that in the outer enamel, crystallites are oriented perpendicularly to the outer surface of the enamel (bottom region in figure 8a). 8b) Detailed view of the outer enamel region oriented in the same direction as in the previous figure, where it is possible to see the outer enamel region (top) and the ameloblasts (bottom). Note that the ameloblasts are oriented perpendicularly to the outer surface of the enamel as indicated by the arrows. Angle between rods = 82 $^\circ$. Asterisks in figure 8b, cell nucleus. Bar = 6 μ m

Figure 9:

Idealized three dimensional reconstruction of part of ameloblasts during the process of secretion of enamel rods. The model was obtained by the digital superposition (IMOD – University of Boulder, Colorado) of optical sections obtained by DIC of enamel slices. 9a) It is shown that the major axis of the ameloblasts are not perpendicular to the growing surface of enamel, and are slightly inclined relatively to the ameloblasts from adjacent layers, in a fashion that resembles the enamel rods, although with a smaller angle. Ameloblasts make cell junctions with the neighbors of the same layer (dashed circle); 9b) Ameloblasts from a specific layer make also specialized junctions with cells of neighbor layers (dashed circles). The blue and yellow colors represent secretory ameloblasts from adjacent layers. The double arrow indicate apical-incisal tooth axis.

Figure 10:

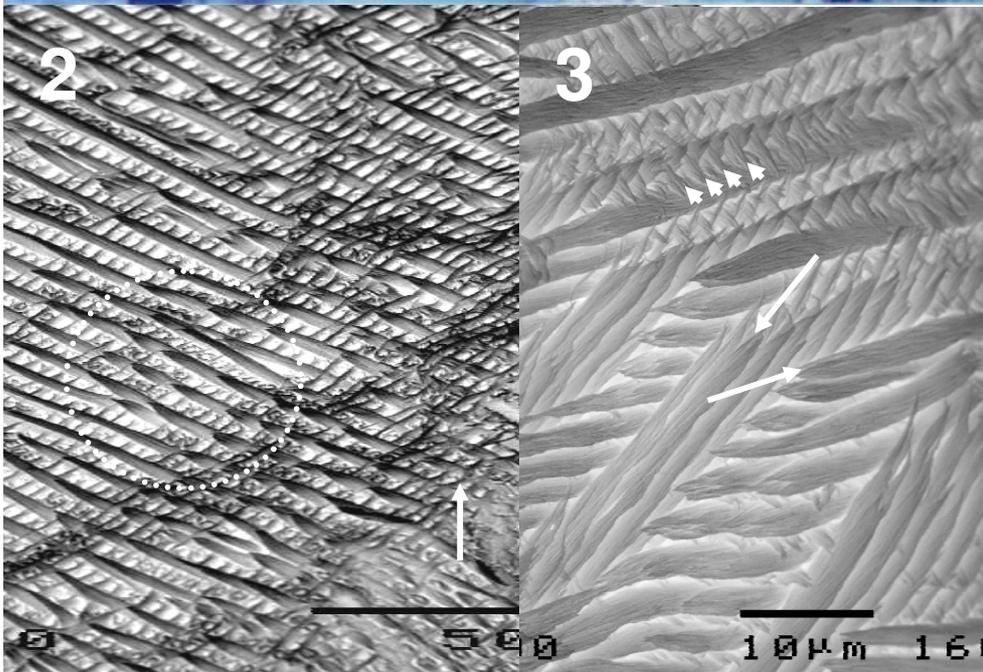
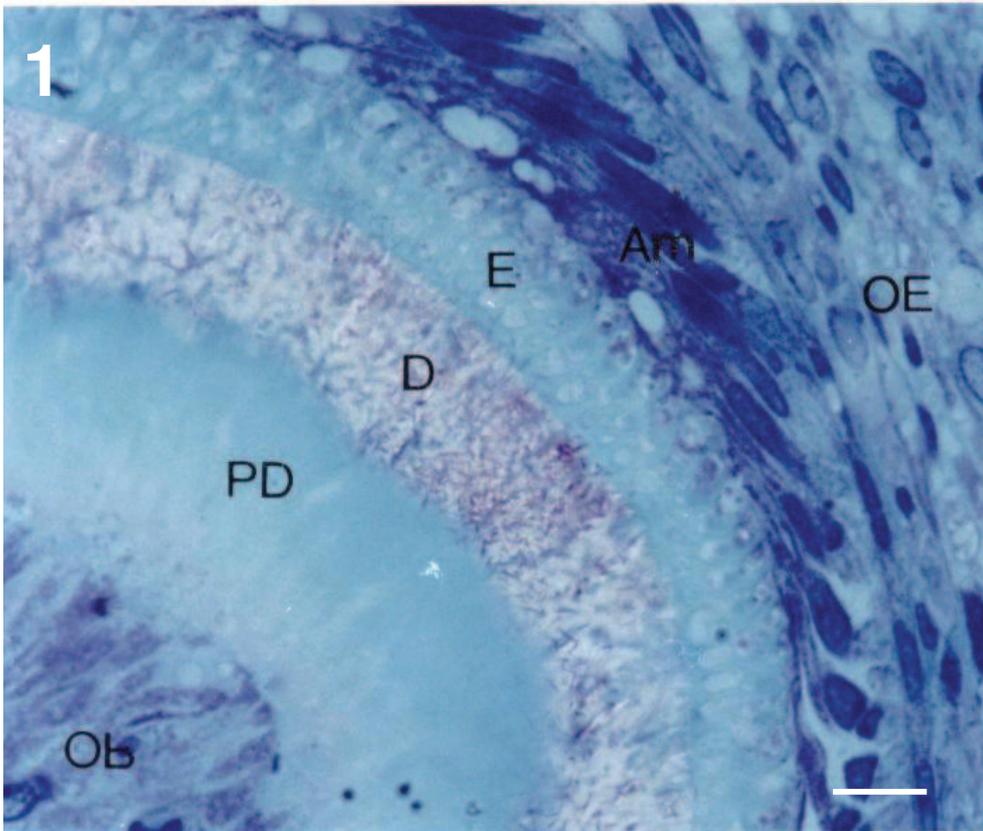
Angles between enamel rods and plane containing rods with EDJ, estimated from contours of each individual rod from SEM images considering a cylindrical morphology of the rods.

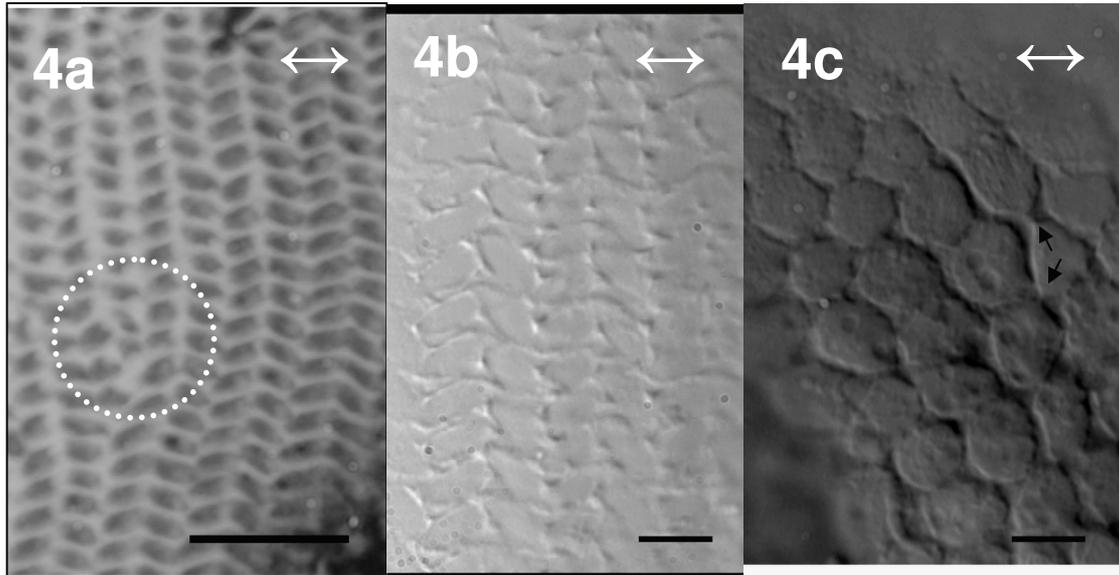
10a) Graphycs showing the angular dispersion of each rod with EDJ, in relation to the distance in micrometers of a certain point of the sequence of images, in the same row. Left part of the graphics correspond to rods more near to the center (sagittal plane), while right part represents rods more lateral (n = 46); 10b) Graphycs showing the angular dispersion (incisal inclination) of the plane that contains the row of rods in relation to EDJ of the lower rat incisor, at each point corresponding to individual rods (n = 28).

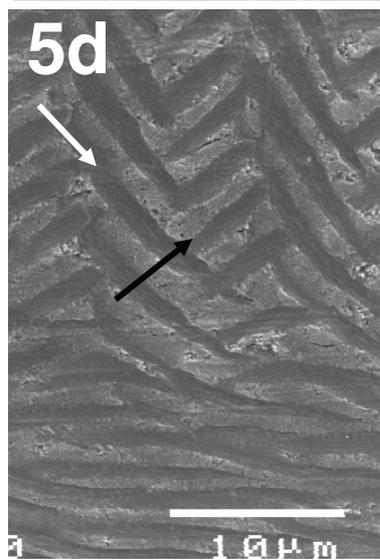
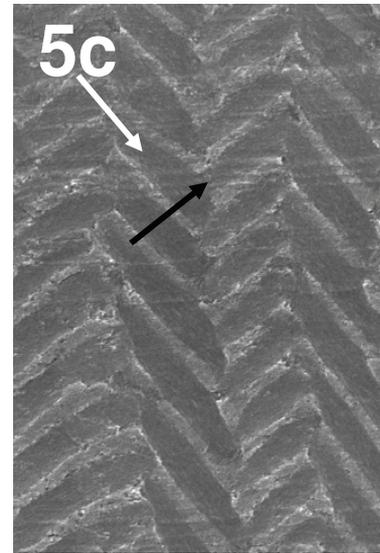
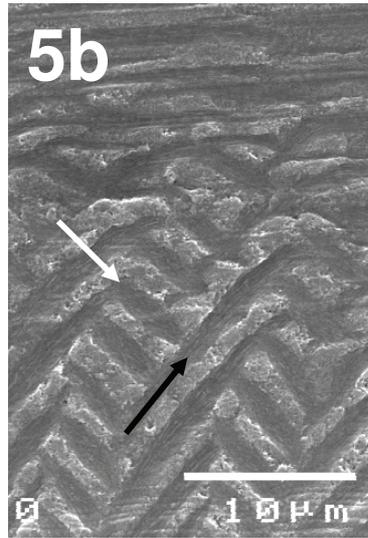
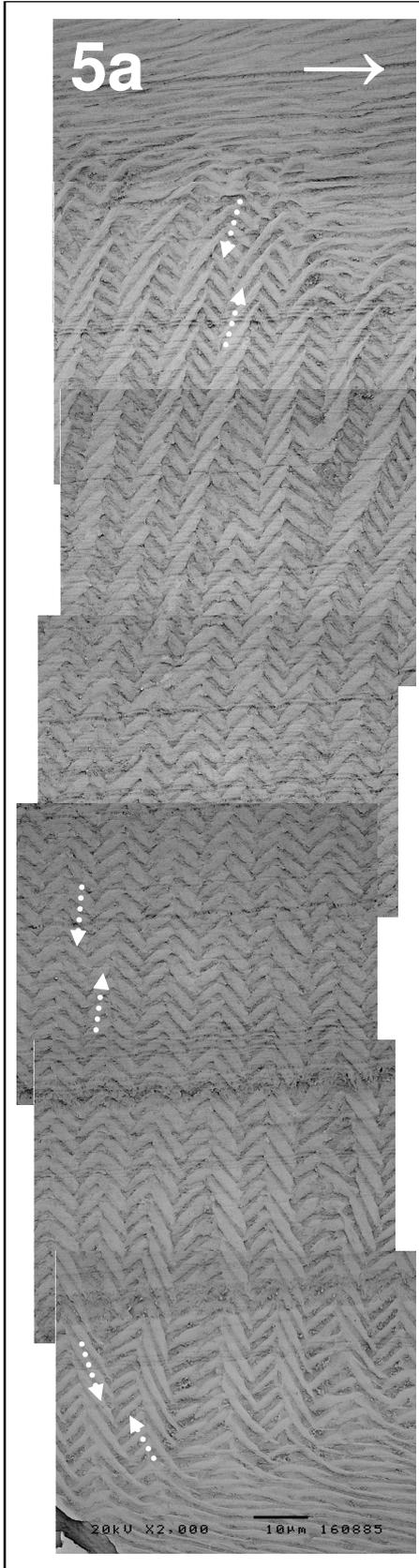
Figure 11:

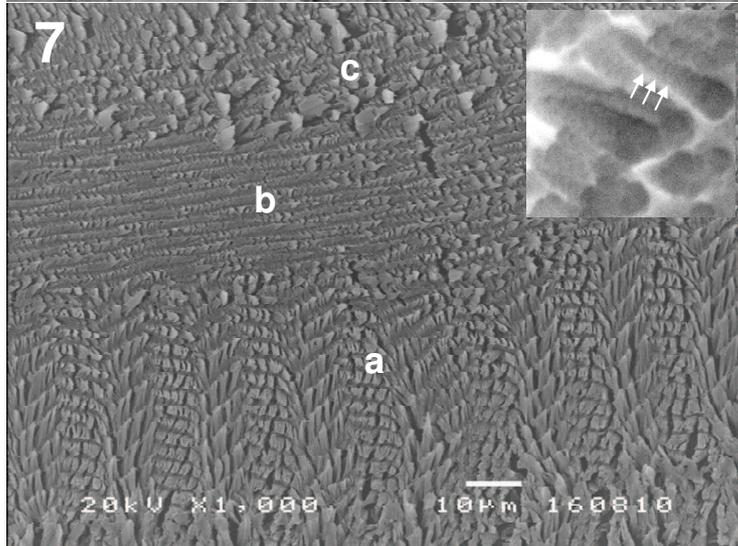
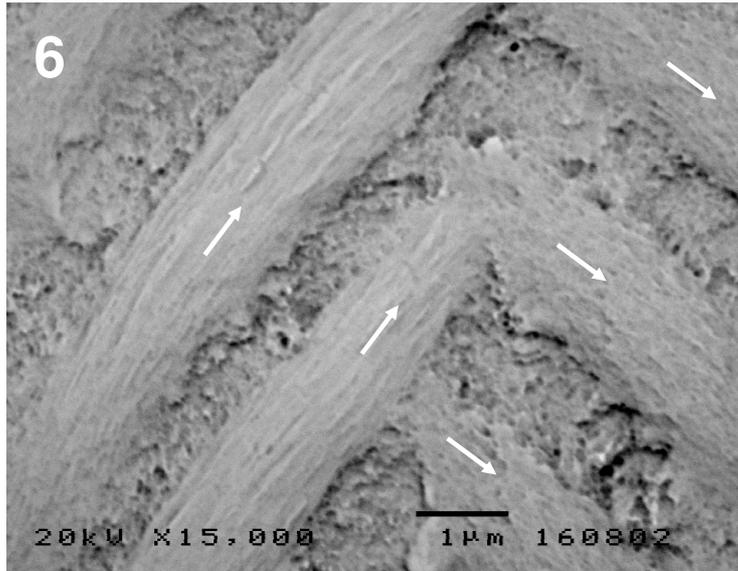
This figure shows a polished and slightly etched surface of the lower incisor enamel of the larger rodent *Cuniculus paca*, parallel to the EDJ.

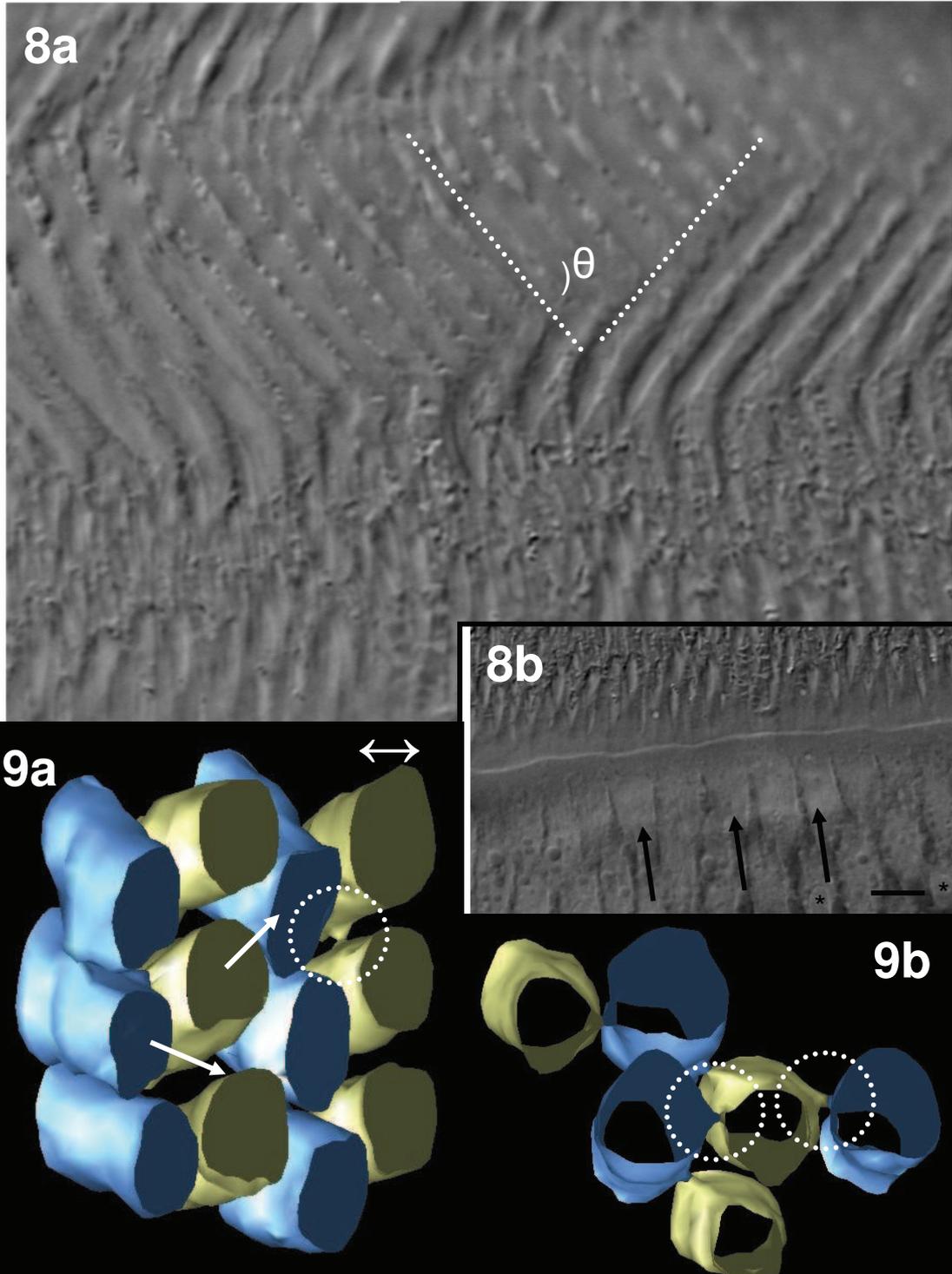
11a) In this image we see that the enamel of *C. paca* is composed not by alternating single layers of rods as in the rat enamel, but it is composed by thick layers that contain several sub-units that we will call sub-layers of individual rods, each one corresponding to a single layer of the rat enamel. Rods in each sub-layer change orientation slightly. After a series of circa 8 to 10 sub-layers of rods, there is an abrupt change in the direction of rods inside layers, producing a visible interface. 11b) Detailed view of the previous image where it can be identified circa of 8 to 10 sub-layers per thick layer. 11c) Region corresponding to the beginning enamel of the rat incisor where it is observed clearly the alternating symmetry of the ellipsoid contours of wholes that correspond to the insertion of the Tomes' processes. 11d) This image represents the beginning of the incisor enamel of *C. paca*. In this case it is not observed a symmetry that corresponds to the already formed enamel rods, as seen in figures 11a and 11b. Bar in figure 11b = 20 μm in Fig. 11a; Bar = 10 μm in Fig. 11b.

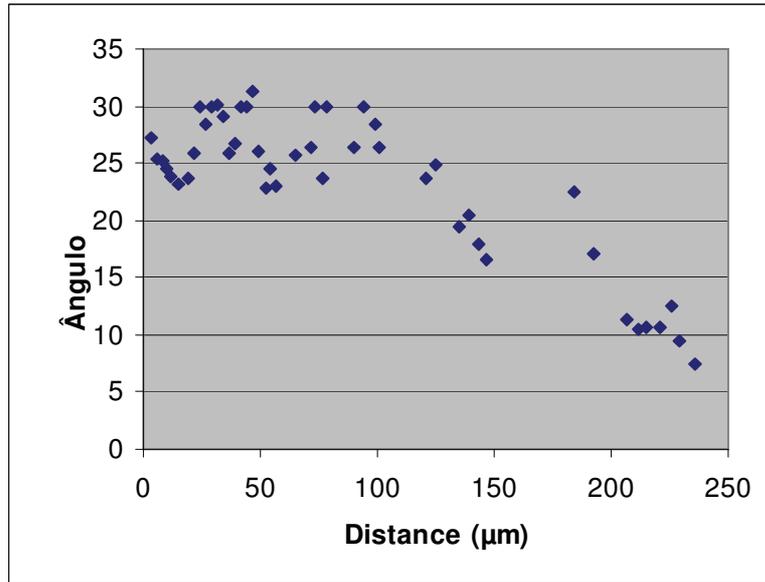
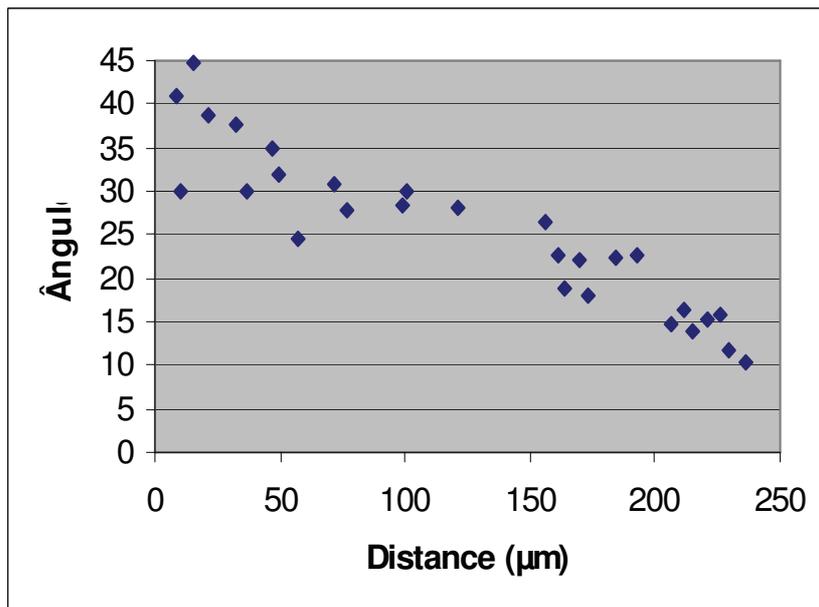


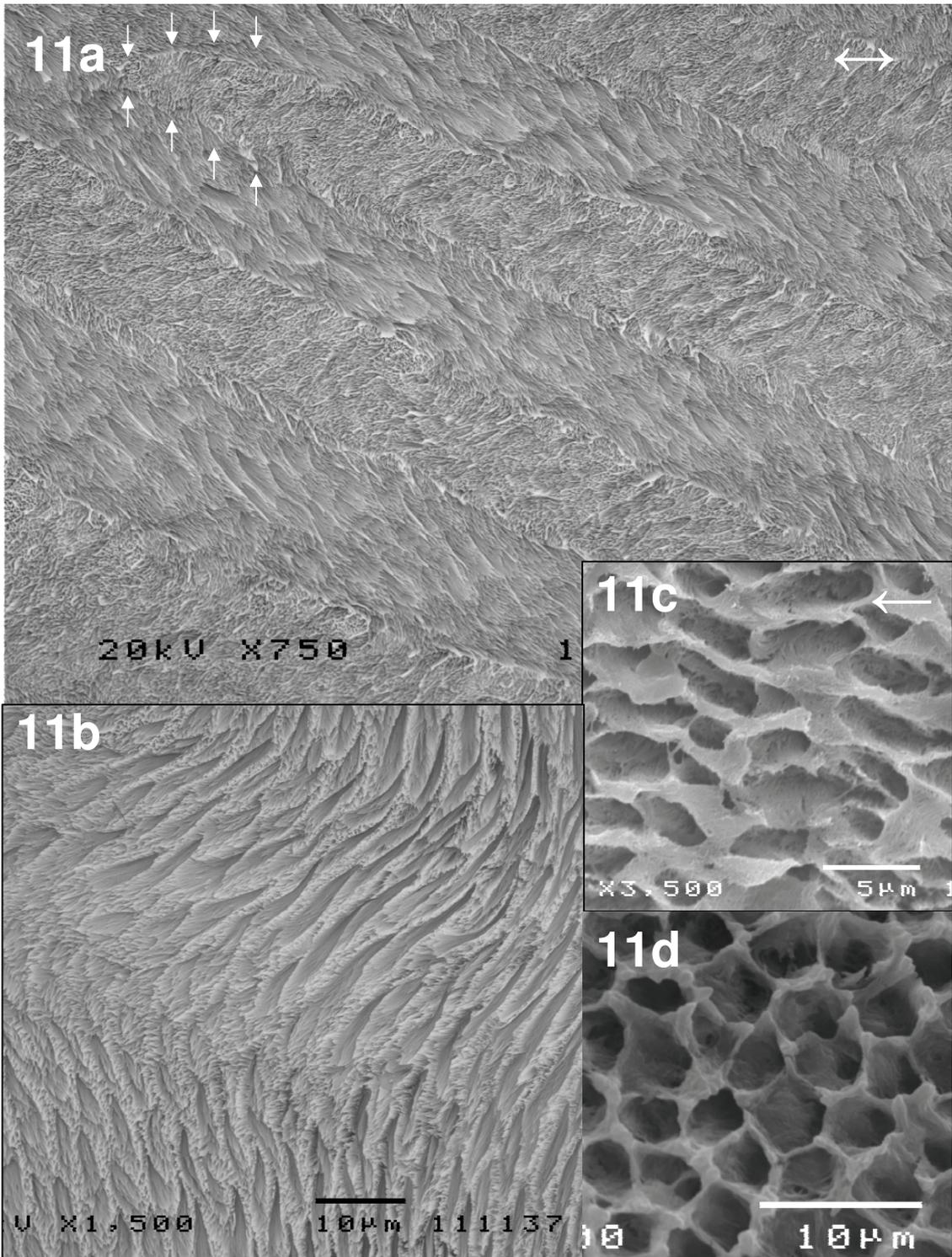








10a**10b**



ANEXO B

O ANEXO B mostra um artigo científico aceito e publicado no periódico Cell Transplantation, vol. 19, pp.1-100, 2010, que consiste, resumidamente, de um apanhado sobre a situação global no que diz respeito ao cultivo de células tronco embrionárias humanas.

As importantes informações catalogadas pelo grupo e organizadas neste trabalho em anexo, também servirão como base científica para um futuro projeto, que visa utilizar células tronco embrionárias humanas e/ou células tronco pluripotentes induzidas (iPS) na bioengenharia dental.

Review

Worldwide Survey of Published Procedures to Culture Human Embryonic Stem Cells

A. M. Fernandes,^{*1} T. Meletti,^{*1} R. Guimarães,[†] M. P. Stelling,^{*}
P. A. N. Marinho,^{*‡} A. S. Valladão,^{*} and S. K. Rehen^{*}

^{*}Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[†]Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[‡]Programa de Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Since their derivation 11 years ago, human embryonic stem (hES) cells have become a powerful tool in both basic biomedical research and developmental biology. Their capacity for self-renewal and differentiation into any tissue type has also brought interest from fields such as cell therapy and drug screening. We conducted an extensive analysis of 750 papers (51% of the total published about hES cells between 1998 and 2008) to present a spectrum of hES cell research including culture protocols developed worldwide. This review may stimulate discussions about the importance of having unvarying methods to culture hES cells, in order to facilitate comparisons among data obtained by research groups elsewhere, especially concerning preclinical studies. Moreover, the description of the most widely used cell lines, reagents, and procedures adopted internationally will help newcomers on deciding the best strategies for starting their own studies. Finally, the results will contribute with the efforts of stem cell researchers on comparing the performance of different aspects related to hES cells culture methods.

Key words: Human embryonic stem (hES) cells; Cell culture protocols; Maintenance of hES cells;
Peer review

INTRODUCTION

Human embryonic stem (hES) cells are isolated from the inner cell mass of the blastocyst. They are pluripotent and, while kept in ideal conditions, can differentiate into specific cell types within the three germ layers and some extraembryonic lineages (21,30,49,53,63). These properties make hES cells a promising tool for cell-based therapies and regenerative medicine (33,45). The majority of the studies about hES cells focus on their self-renewing capabilities, their pluripotent state, and differentiation.

The attention towards embryonic stem cells began over 25 years ago, after the establishment of pluripotent stem cells from mouse embryos (17). While the first hu-

man embryonic stem cells lines were derived only in 1998 (57), several groups have derived original hES cell lines since then (9,24,49,59,60).

Gradually, countries have established their own policies regarding the use of hES cells, which differs worldwide (18). In some countries, laws were created by governmental funding availability, while in others, legal conditions were developed to encourage or discourage governmental and private funding (11). For instance, until 2008 hES cell research in the US was allowed but not eligible for federal government funding, unless the used lines had been derived before August 9, 2001. By now the situation is changing with the US government bringing in new legislation to modify how federal funding of hES cell research occurs (27).

Received May 24, 2009; final acceptance December 21, 2009. Online prepub date: January 6, 2010.

¹These authors provided equal contribution.

Address correspondence to Stevens Rehen, Instituto de Ciências Biomédicas/UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho S/N, bloco F/F14, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel: +55-21-25626460; E-mail: srehen@anato.ufrj.br

In Brazil, research with hES cells was approved in March 2005, for cell lines derived from embryos frozen at least 3 years. However, just after the bill was passed, a petition challenged the law. In 2008, Brazil's Supreme Court rejected the petition, ruling that embryonic stem cell research should be allowed (32,55,58). Countries like the UK, Sweden, Singapore, Israel, and Australia are among the most liberal. On the other hand, Switzerland, Spain, and France allow stem cell research with some limitations. Austria and Germany are restrictive; German scientists, for example, are not allowed to work with cell lines produced after January 1, 2002 (52).

Despite differences in the policies surrounding the field, it is clear that the interest in hES cells increases around the world. In this way, many groups have developed methods for derivation and maintenance of such cells (35,38).

In the beginning, hES cell culture techniques were based on procedures design originally for mouse embryonic stem cells (23), including the use of mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) as feeder layers (49,57). hES cells were cultured in medium containing fetal bovine serum (FBS) and leukemia inhibitory factor (LIF). Later, researchers discovered that hES cells are not dependent on LIF (10,23,28) and, instead, fibroblast growth factor-2 (FGF-2) was the main factor that sustains pluripotency (62).

Over the years, hES cell culture procedures have undergone numerous modifications in order to improve handling and cell propagation, and at this time several protocols are available (39). This inevitable scenario of multiple ways to culture hES cells led to a new challenge: the comparison among findings obtained using multiple hES cell lines, propagation methods, media, supplements, feeder cells, or substrates may contribute to generate skewed conclusions.

In order to identify trends regarding hES cell culture methods, we analyzed 750 articles published by researchers from different regions, highlighting the differences and similarities within the adopted procedures. Our evaluation focused primarily on the fundamental variations for culturing hES cells, such as cell lines, media, substrates, reagents, and propagation methods.

METHODOLOGY

The articles were accessed directly through the "PubMed Central" (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) and the search criteria were based on the keyword "human embryonic stem" for articles published between 1998 and 2008. This search revealed a total of 1,473 articles. In this review, the scientific articles with free access were used, including the journals that most published in this research field (24). Our survey resulted in a total of 750 articles from journals listed in Table 1, which

represents ~51% of the total articles found in PubMed Central. Only articles that had used hES cells as the subject of the study were considered. For all parameters analyzed, a cut-off point of at least five publications for a given culture method was considered in this review and the items with five or less total occurrences were put together as 'others' in the figures.

RESULTS AND DISCUSSION

Since the primary study conducted by Thomson et al. in 1998 (57), the number of hES cell publications has seen an extraordinary increase, mainly concentrated in the last 5 years (Fig. 1). This trend in the number of papers published between 1998 and 2008 was probably due to the period requested by various groups to learn and adapt their technique to culture hES cells. Indeed, it is probable that specific grants to fund stem cells research released in this period and permissive laws in some countries have contributed to the increase as well. Besides, the distribution and derivation of cell lines worldwide and the increasing number of groups working with hES cells may also have had an effect in the number of publications (1,11,38,43).

From the Thomson's work (57) to now, the leading position of the US is evident. Compared with the other continents, North America, with the US as its primary contributor, can easily be considered the world leader in the number of publications, with Europe and Asia coming in second (Fig. 1). Furthermore, even though the continents of Europe and Asia have both gained significant ground in the number of hES cell publications within the same time frame during the last 5 years, they display very different publication profiles. Up to 2007, Europe was clearly led by the UK, which has been responsible for ~40% of the total number of publications from this continent. By 2008, other countries also started to publish significantly and the UK contribution dropped to 30% in relation to whole Europe. Sweden came in second in the number of publications from this continent (Fig. 2A). On the other hand, in Asia there is not a clear leading country. The first position is split among different countries, with a great contribution of Israel, Singapore, Korea, China, and, more recently, Japan and India (Fig. 2B). The observed discrepancies in publication numbers worldwide may be a consequence of differences in available funding opportunities, accessibility of techniques for manipulating hES cells, or legal issues among countries (11,35). These trends provide a clear indication of the state of the art of hES cell research in the world. However, the current trend is more likely expected to evolve during the next few years, especially considering the fact that new research groups are interested in working with hES cells around the world.

Our data indicate that the only continents that had not

Table 1. Journals and the Total Number of Articles Analyzed in the Survey

Journal (No. of Articles)	Journal (No. of Articles)
All Journals (750)	Cancer Research (2)
Stem Cells (177)	Chromosome Research (2)
Stem Cells and Development (62)	Development (2)
Nature Biotechnology (38)	Diabetes (2)
PNAS (31)	DNA Repair (2)
BBCR (20)	European Journal of Cardio-thoracic Surgery (2)
Blood (20)	Experimental and Molecular Medicine (2)
Human Reproduction (20)	Experimental Cell Research (2)
Cloning and Stem Cells (16)	FASEB Journal (2)
Cell Stem Cell (15)	FEBS Letters (2)
PLoS ONE (15)	Genome Biology (2)
BMC Developmental Biology (9)	Genome Research (2)
Experimental Hematology (9)	Journal of Biomedical Science (2)
Nature Methods (9)	Journal of Immunology (2)
Nature Protocols (9)	Journal of Molecular and Cellular Cardiology (2)
Human Molecular Genetics (8)	Journal of Proteome Research (2)
Differentiation (7)	Journal of Structural Biology (2)
Fertility and Sterility (7)	Lab. on a Chip (2)
Journal of Visualized Experiments (7)	Life Sciences (2)
Tissue Engineering (7)	Molecular and Cellular Neuroscience (2)
Biomaterials (6)	Nature Cell Biology (2)
Cell Biology International (6)	PLoS Genetics (2)
Journal of Biotechnology (6)	Proceedings of the 2005 IEEE (2)
The Journal of Biological Chemistry (6)	Science (2)
Cell Research (5)	The American Society of Gene Therapy (2)
Circulation Research (5)	The Lancet (2)
Developmental Biology (5)	Yonsei Medical Journal (2)
Developmental Dynamics (5)	ACS Chemical Biology (1)
Molecular Human Reproduction (5)	Acta Haematologica (1)
Nature (5)	AIDS Research and Therapy (1)
Nature Medicine (5)	Am. J. Physiol. Heart Circulatory Physiology (1)
Biology of Reproduction (4)	American Journal of Pathology (1)
BMC Genomics (4)	Antioxidants and Redox Signaling (1)
Cell Transplantation (4)	Biochemical and Pharmacology (1)
Experimental Neurology (4)	Biochimica et Biophysica (1)
Journal of Cell Science (4)	Biomacromolecules (1)
Molecular Therapy (4)	Bioprocess and Biosystems Engineering (1)
Neuroscience Letters (4)	Bioscience Reports (1)
Regenerative Medicine (4)	Biotechniques (1)
Brain Research (3)	Biotechnology Letters (1)
Cell (3)	BMC Biology (1)
Circulation (3)	BMC Cell Biology (1)
Development Growth and Differentiation (3)	Brain (1)
Experimental Biology and Medicine (3)	British Journal of Pharmacology (1)
International Journal of Developmental Biology (3)	Cell Cycle (1)
Journal of Anatomy (3)	Cell Tissue (1)
Journal of Neurochemistry (3)	Cells Tissues Organs (1)
Molecular and Cellular Proteomics (3)	Chemistry and Biology (1)
Nature Genetics (3)	Cryobiology (1)
Nucleic Acids Research (3)	Current Biology (1)
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology (2)	Development and Disease (1)
Artificial Organs (2)	Development/Plasticity/Repair (1)
BMC Neuroscience (2)	Endocrinology (1)

(continued)

Table 1. Continued

Journal (No. of Articles)	Journal (No. of Articles)
European Journal of Neuroscience (1)	Molecular Cancer (1)
Experimental Eye Research (1)	Molecular Medicine (1)
Frontiers in Neuroanatomy (1)	Nano Letters (1)
Future Medicine (1)	Neuropsychopharmacology (1)
Genes to Cells (1)	Osteoarthritis and Cartilage (1)
Glycobiology (1)	PLoS Computational Biology (1)
Hybridoma (1)	PLoS Medicine (1)
Immunity (1)	Reproduction (1)
In Vitro Cell Developmental Biology (1)	Reproductive Toxicology (1)
International journal of Andrology (1)	Retrovirology (1)
International Journal of Medical Sciences (1)	RNA (1)
Journal of Cellular and Molecular Medicine (1)	Stem Cell Research (1)
Journal of Cellular Physiology (1)	Swiss Medical Weekly (1)
Journal of Molecular Signaling (1)	The American Journal of Human Genetics (1)
Journal of Neuroimmunology (1)	The EMBO Journal (1)
Journal of Neuroscience (1)	The International Journal of Development Biology (1)
Journal of Neurosurgery (1)	The Journal of Cell Biology (1)
Journal of the American College of Cardiology (1)	The Journal of Clinical Investigation (1)
Journal of Thrombosis and Haemostasis (1)	The Journal of Experimental Medicine (1)
Journal of Translational Medicine (1)	The Journal of Microbiology (1)
Journal of Virology (1)	The Journal of Physiology (1)
Leukemia Research (1)	The New England Journal of Medicine (1)
MHR-Basic Science of Reproductive Medicine (1)	Theriogenology (1)
Molecular Biotechnology (1)	Tissue and Cell (1)
Molecular and Cellular Biology (1)	Toxicological Sciences (1)
Molecular and Cellular Neuroscience (1)	Transplant Immunology (1)
Molecular Biology of the Cell (1)	Zygote (1)

The journals are listed in descending order of number of publications.

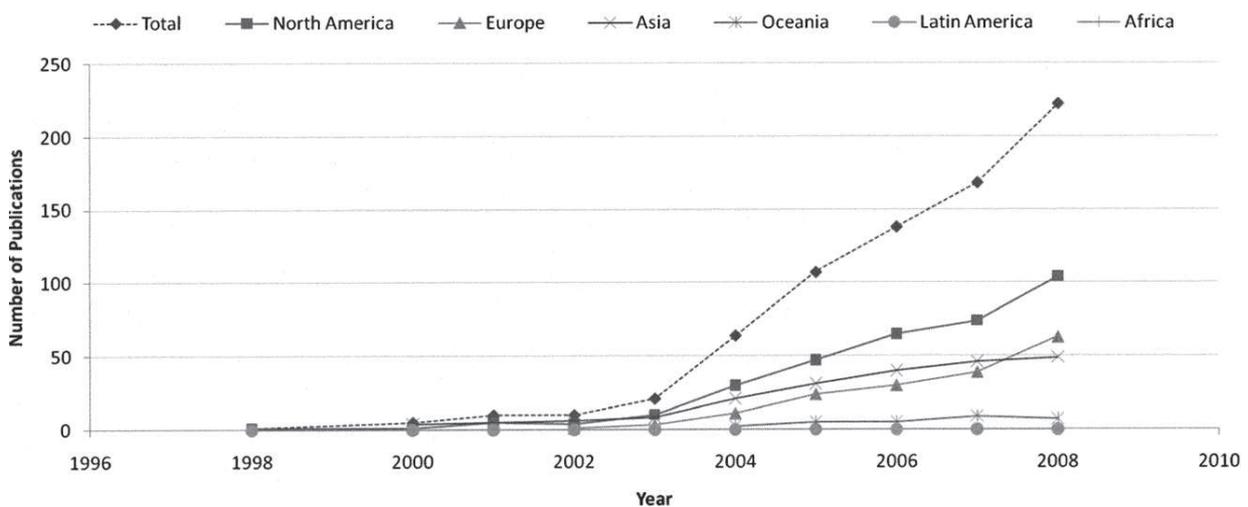


Figure 1. Distribution of hES cell publications worldwide. Number of publications between 1998 and 2008 achieved by the cited search criteria are expressed as the total amount of papers per year, and separated by all continents: North America, Europe, Asia, Oceania, Latin America, and Africa.

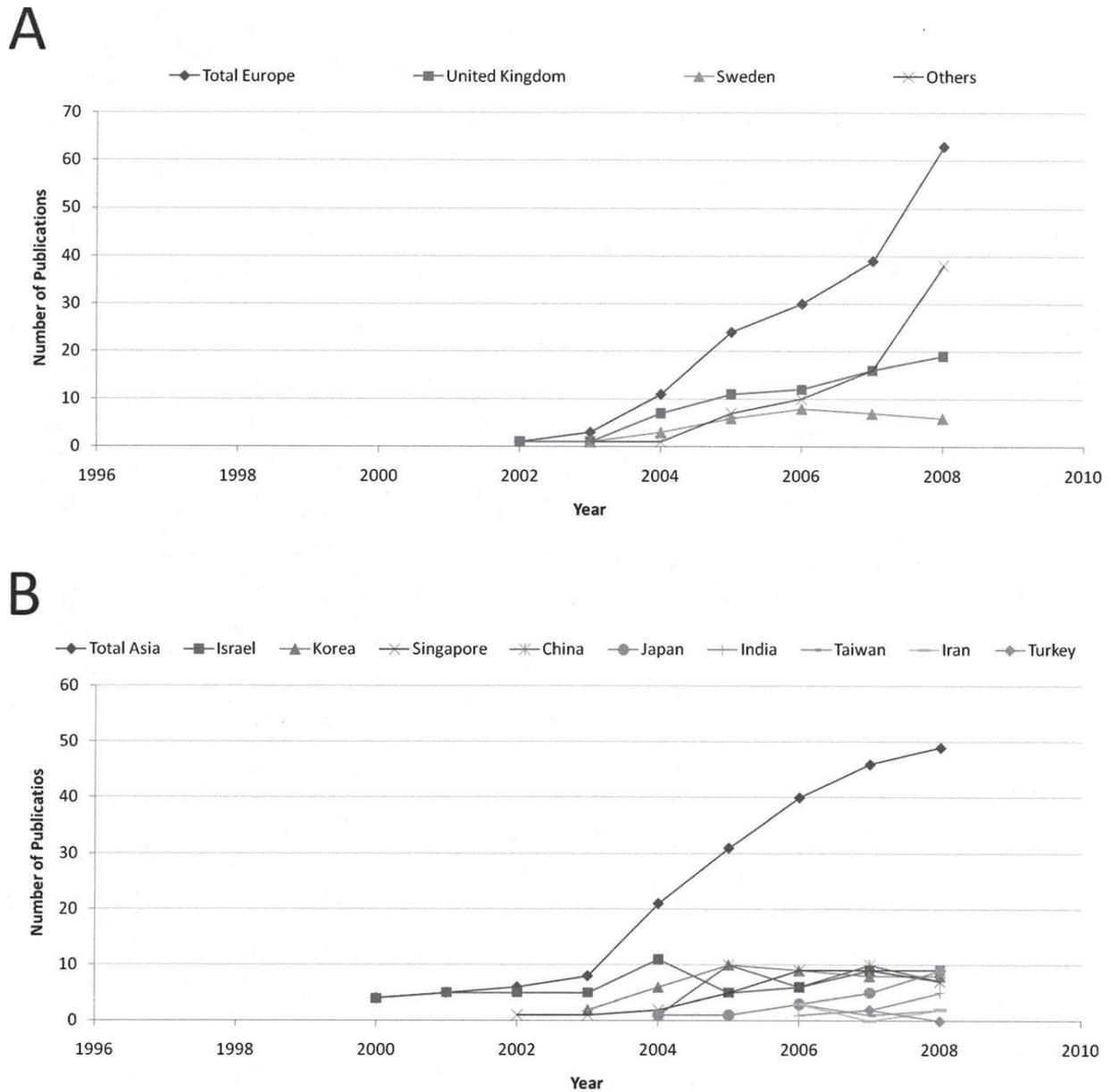


Figure 2. Leading countries in Europe and Asia. (A) Total number of European hES cell publications per year. (B) Total number of Asian hES cell publications per year.

published articles with hES cells until 2008 were Africa and Latin America (Fig. 1). Brazil has changed this scenario, with its first article published in 2009 (19).

The nontrivial differences in developmental potential among hES cell lines pointed to the importance of screening and deriving new cell lines (4,46). One interesting feature of working with hES cells is that each cell line has a different genetic background, and this characteristic may reflect on their behavior. The increasing

amount of cell lines used per year (Fig. 3A), especially after 2003, could be indicative of researchers' efforts to increase the number of hES cell lines, for three main reasons: facilitating research with hES cells, facilitating the comparison between cell lines, studying the capacity of a variety of lines to differentiate into a specific cell type. In this review we observed that a total of 244 cell lines were used in articles published between 1998 and 2008, which represents ~35% of the total registered cell

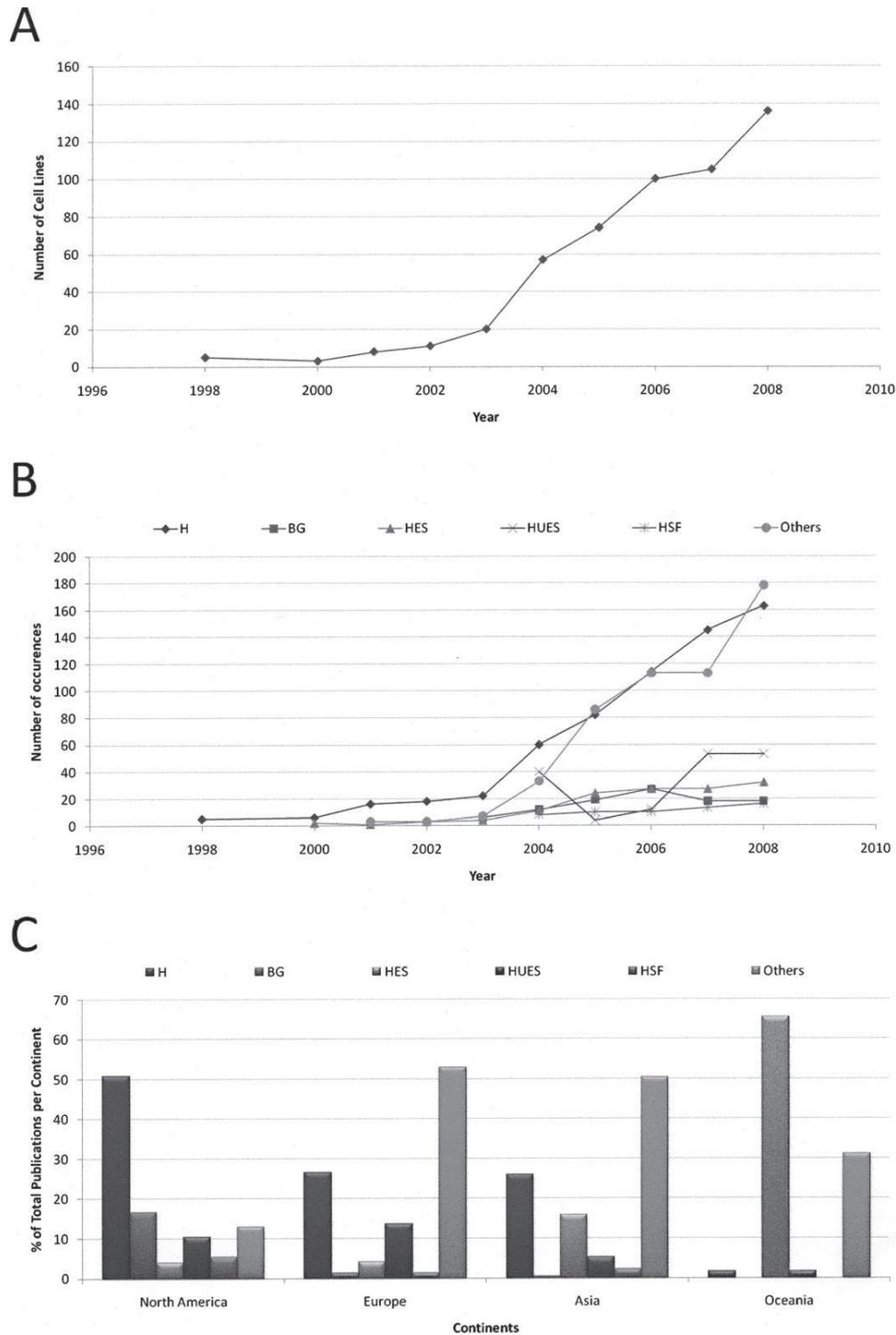


Figure 3. Description in peer-reviewed journals of new derived and most used human embryonic stem cell lines. (A) Total cell lines described in the world over the years. (B) The most published groups of hES cell lines: H group, BG group, HES group, HUES group, HSF group, and other groups. (C) Percentage of the groups of cell lines used in different continents: H group, BG group, HES group, HUES group, HSF group, and other groups. Numbers are expressed as the total amount of articles containing cell line information.

lines (56). The discrepancy between the number of cell lines used and registered ones may indicate that the majority of the cell lines have not been adopted by academic laboratories.

Although each cell line has its own characteristics, historically multiple lines have been derived with similar protocols and by the same research group; therefore, they were grouped together in our analysis. Among the different groups of cell lines derived, certain ones should be highlighted (Fig. 3B): H group (57) (WiCell Research Institute), HES group (49) (ES Cell International), BG group (40) (BresaGen), HUES group (9) (HUES Cell Facility), and HSF group (2) (University of California at San Francisco). All the published groups of hES cell lines other than these were placed as “others” in this analysis. Overall, the H group (i.e., H1, H9) leads, followed by HES (i.e., HES1, HES2), BG (i.e., BG01, BG02), HUES (i.e., HUES1, HUES3), and HSF (i.e., HSF1, HSF6).

We also analyzed the frequency in the use of individual cell lines. We found that the H1 and H9 (WiCell) cell lines were notably the most used ones (data not shown). These lines were described in the first article of human embryonic stem cells (57) and precursors of oligodendrocytes derived from H1, for the first time worldwide, will be used in a clinical trial for human spinal cord injury by Geron (5,22).

When the distribution of cell lines per continent is taken into consideration, we observe regional preferences for their uses (Fig. 3C). In North America, the H group is more frequently used, and this profile might be explained by its availability and by the past policy of NIH funding. In Europe and Asia the use of other cell lines, generally locally derived, was more prominent. Oceania, represented by Australia, uses the HES group more than other cell lines (1). This trend could be explained by the high costs in order to import cell lines from WiCell, which were distributed mainly in the US (38) and authorized for research by NIH.

With regard to the culture methods, adherent substrate and feeder layers were narrowed down to four major categories: mouse embryonic fibroblasts (MEFs), Matrigel (a matrix derived from mouse sarcoma, composed mostly by laminin, collagen IV, and heparin sulfate proteoglycan), human feeders (represented by human fibroblasts or human mesenchymal cells), and STO (a cell line derived from mouse embryonic fibroblasts). Despite the attempt to cultivate hES cells in animal-free or defined conditions (6,15,36,44,50,61), MEFs remain the most widely used substrate, which is probably due to their efficacy and lower costs for keeping pluripotent hES cells, when compared to other methods (Fig. 4A). Several strains of mice have been used to prepare MEFs and CF1 is the most frequently used one (data not

shown). Regardless of the extensive use of MEFs, the uses of Matrigel and human feeders have increased in the last years (Fig. 4A). These may reflect an intent to culture hES cells for clinical purposes or an attempt to reduce the expression of unwanted immunogenic molecules (37), although these unwanted molecules could only be vanished by complete from the culture with the removal of nonhuman products (12).

When the basal media are taken into consideration, we found that the most commonly used are knockout-DMEM (KO-DMEM) and DMEM/F12 (a mixture of DMEM and Ham’s F12) (Fig. 4B). The use of these media could be explained by the following reasons. Knockout-DMEM is a basal medium with reduced osmolality, which reproduce the embryonic microenvironment and may better maintain hES cells in a undifferentiated state; DMEM/F12, richer in nutrients, is also the medium recommended by WiCell, which distribute the most used hES cells. According to our data, the defined medium most frequently used for culturing hES cells is mTeSR1. Two others defined media (the X-VIVO system and the chemically defined medium CDM) had also appeared in the survey, but less than five times between 1998 and 2008 and were included as “others” in Figure 4B. In contrast to “DMEM-based” media, which in general are supplemented with serum or serum replacement, these defined systems use recombinant growth factors and other components such as insulin, transferrin, and albumin, without the use of serum/serum replacement.

In addition, the use of knockout serum replacement (KSR) in hES cell cultures has been prevalent since the earliest years (Fig. 4C). Other sources, like fetal bovine serum (FBS), are still in use, but at a lower frequency. This is one factor that has dramatically changed in the hES cell culture, as the first articles with hES cells used FBS (49,57).

This issue can be explained by the fact that KSR represents a way to achieve reproducible culture conditions. FBS, on the other hand, has unknown components, which can contribute to variations in the culture conditions. Furthermore, studies showed that FBS contains factors that may lead to hES cell differentiation (29,31). In an attempt to achieve a xeno-free culture, some groups have been studying alternatives, including human serum or recombinant human factors to replace the main components of serum (48). In this way, KSR represents the first step for the transition to a culture medium free of animal components (7).

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) is one of the most important factors for keeping pluripotency of hES cells. In order to optimize hES cell culture conditions and maintain the pluripotent state, FGF-2 needs to bind its receptor and activate the ERK1/2 pathway (14). In our survey we found that the concentration of 4 ng/ml is the

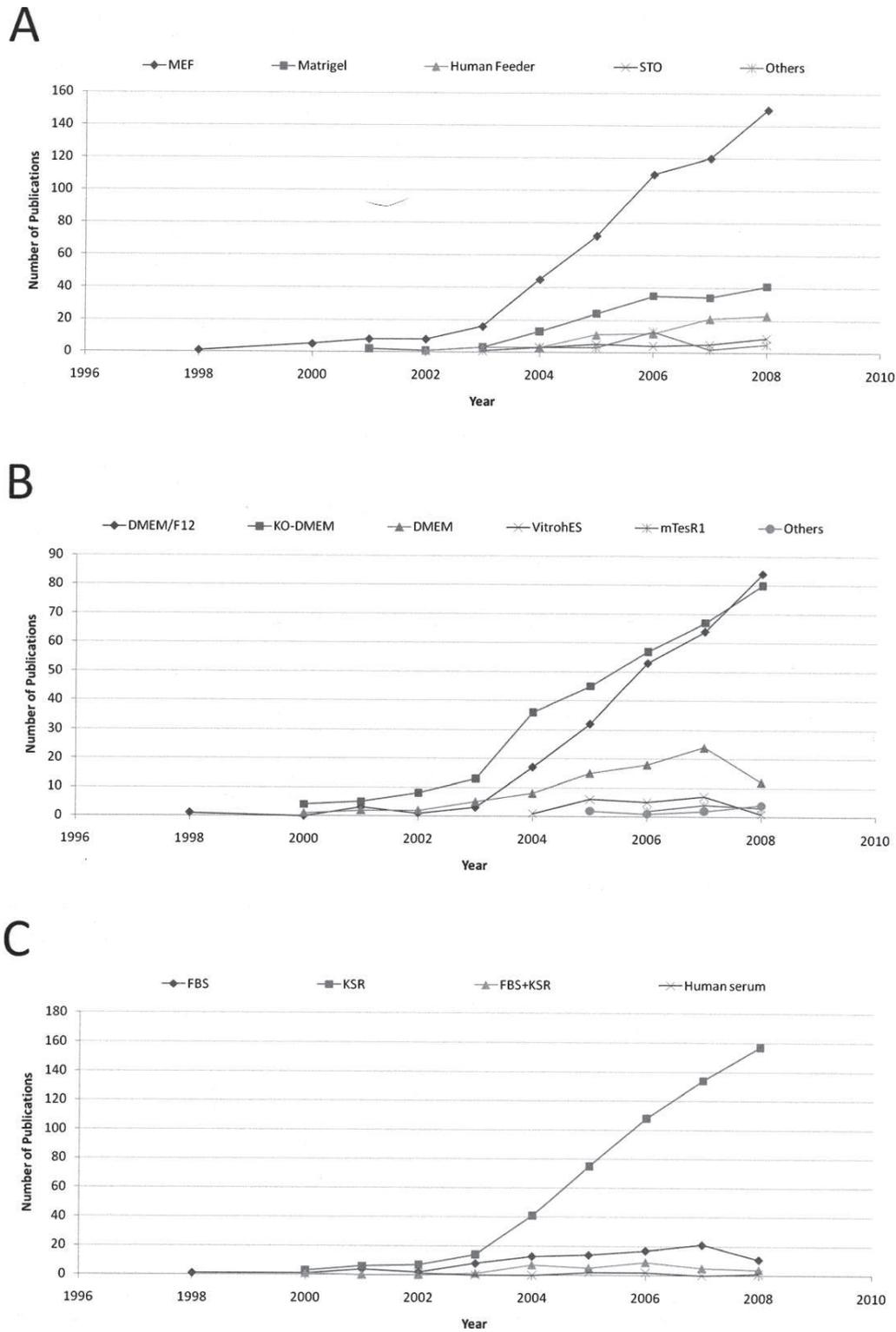


Figure 4. Fundamental components for growing hES cells. (A) Different substrates of adhesion: MEF, Matrigel, human feeders, STO, and others. (B) Media used in the hES cell culture: DMEM/F12, KO-DMEM, DMEM, VitrohES, mTeSR1, and others. (C) Serum and/or serum replacement used as supplement: FBS, KSR, FBS + KSR, and human serum. Numbers are expressed as the total amount of articles with enough information per year.

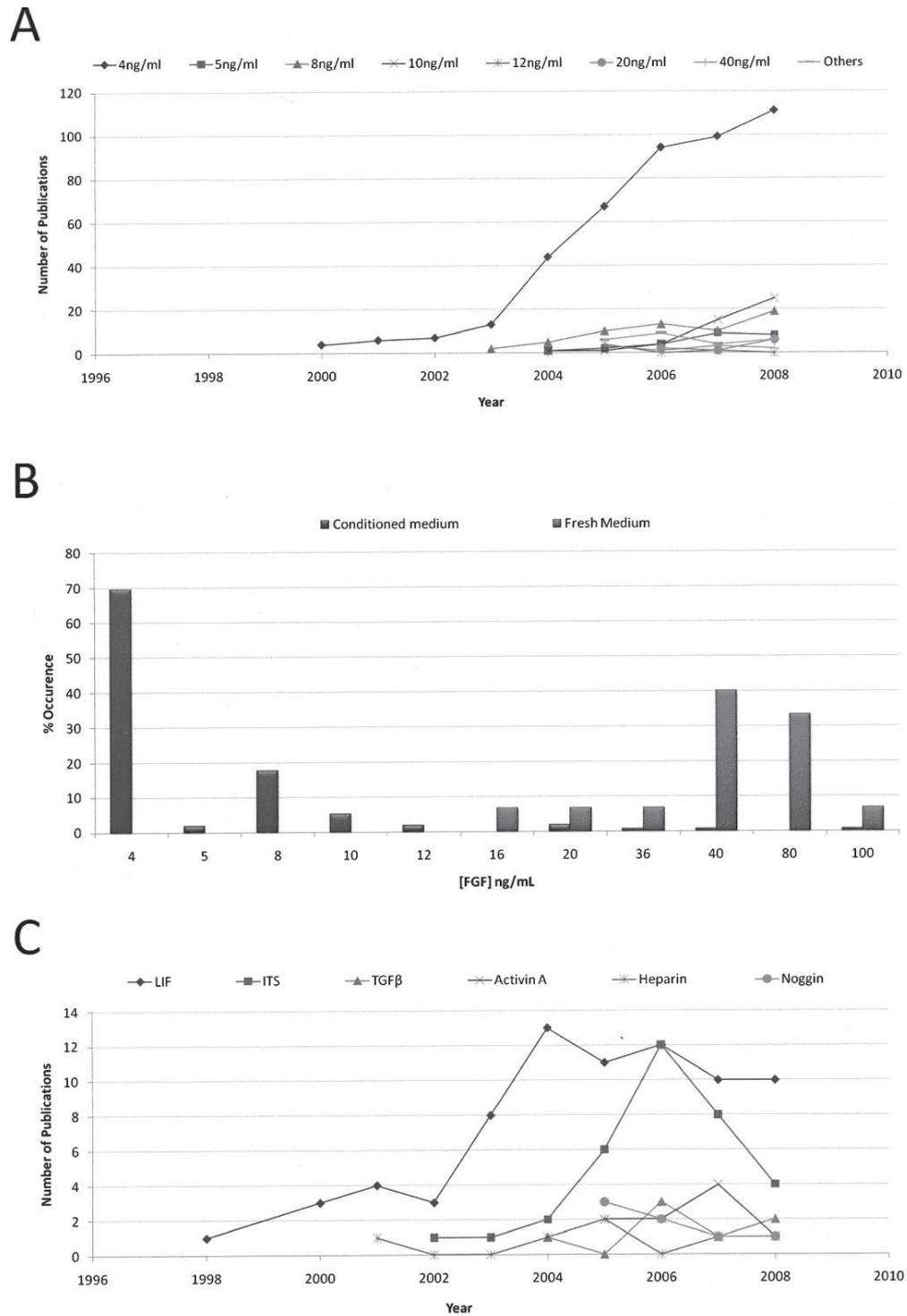


Figure 5. FGF-2 concentrations and other factors used in the hES cell culture. (A) The most used FGF-2 concentrations to culture hES cells: 4 ng/ml, 5 ng/ml, 8 ng/ml, 10 ng/ml, 12 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml, and others. (B) Analysis of FGF concentrations used to culture hES cells in feeder-free conditions: with MEF conditioned medium, fresh medium, without conditioning by MEFs. (C) Other factors added in the hES cell culture: LIF, ITS, TGF- β , activin A, heparin, and noggin. Numbers are expressed as the total amount of articles with enough information per year.

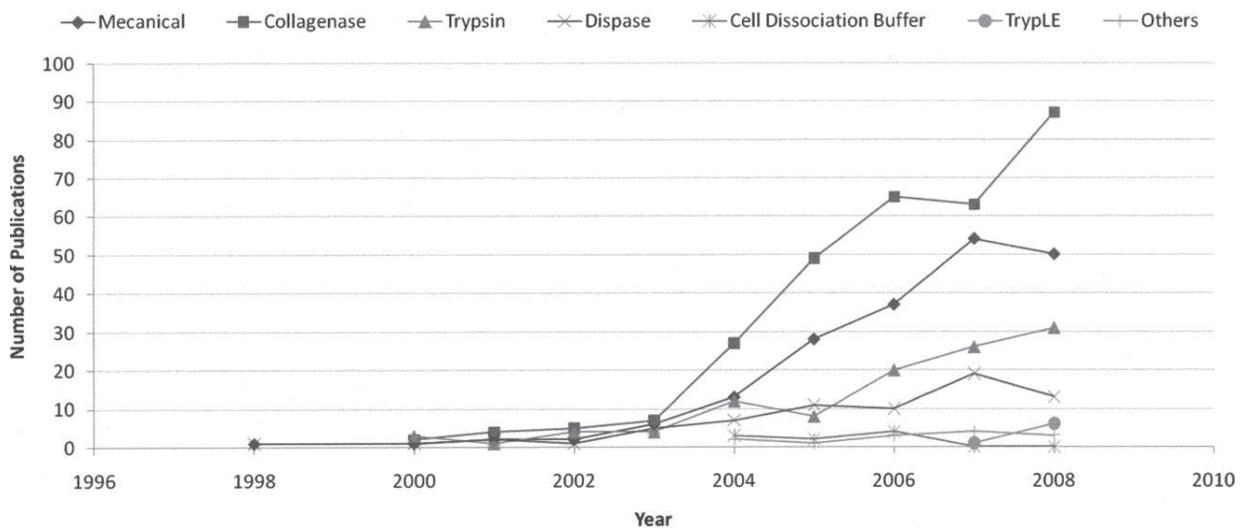


Figure 6. Propagation methods for culturing hES cells. Numbers are expressed as the total amount of papers containing each technique per year: mechanical, collagenase, trypsin, dispase, cell dissociation buffer, TrypLE™, and others.

most used one (Fig. 5A) and has been accepted as sufficient for maintaining the cells on MEFs. However, it was evident by the data analyzed here that if hES cells were grown in feeder-free conditions without MEF conditioned medium, higher concentrations of FGF-2 are necessary (Fig. 5B) (6,34,61). These differences observed in FGF-2 concentration did not seem to have a correlation with the cell line used but with the use of MEFs or MEF conditioned medium. Matrigel and others matrices, despite of acting as an adherent substrate, do not produce/stabilize the factors in the way that MEFs and other feeders do (8,14).

In addition to FGF-2, some research groups have used other factors as supplements in culture. As briefly mentioned, LIF was erroneously thought to be the key factor in maintaining hES cells in a pluripotent state (10,23,28). In spite of this, LIF is the factor with major incidence in the protocols analyzed, followed by the combination of insulin, transferrin, and selenium (ITS), even though the use of this mix have fallen in the last 2 years (Fig. 5C). Activin A, TGF- β , heparin, and noggin have also appeared in our survey as complementary factor to maintain pluripotency (Fig. 5C). Other factors, such as IGF, IL-6, heregulin, and inhibitors of signaling

Table 2. Description of the Most Used Protocols for H1 and H9 Cell Lines

Substrate	Medium	Serum or Replacement	FGF Concentration	Passage	Occurrence
Protocols for H1 cell line					
MEF	DMEM/F12	KSR	4 ng/ml	collagenase	19
MEF	KO-DMEM	KSR	4 ng/ml	collagenase	10
Matrigel	KO-DMEM	KSR	4 ng/ml	collagenase	5
Protocols for H9 cell line					
MEF	KO-DMEM	KSR	4 ng/ml	collagenase	19
MEF	DMEM/F12	KSR	4 ng/ml	collagenase	6
MEF	DMEM/F12	KSR	4 ng/ml	mechanical	5
MEF	DMEM/F12	KSR	4 ng/ml	unknown	5
MEF	KO-DMEM	KSR	4 ng/ml	unknown	4
Protocols for H1 + H9 cell lines					
Matrigel	KO-DMEM	KSR	4 ng/ml	collagenase	11
MEF	DMEM/F12	KSR	4 ng/ml	collagenase	9
Matrigel	KO-DMEM	KSR	8 ng/ml	collagenase	6
MEF	DMEM/F12	KSR	4 ng/ml	dispase	4

Table 3. Percentage of Publication of the Different Parameters Analyzed in 2008 and January to August 2009

Year	Continent (% Publication)					
	North America	Europe	Asia	Oceania	South America	
2008	46.4	28.1	22.3	3.1	0	
2009	45.1	21.8	27.5	5.2	0.5	
Group of Cell Line (% Occurrence)						
	H	BG	HES	HUES	Others	
2008	35.4	3.9	6.9	11.5	42.3	
2009	42	6.2	8.3	9.3	34	
Feeder/Substrate (% Publication)						
	MEF	Matrigel	Human Feeder	STO	Others	
2008	65.5	18.3	10	3.9	2.2	
2009	69.3	16.4	11.1	1.6	1.6	
Basal Medium (% Publication)						
	DMEM/F12	KO-DMEM	DMEM	mTesR1	VitrohES	Others
2008	45.4	43.8	6.5	1.6	0.5	2.2
2009	51.4	33.5	6.7	0.6	3.4	4.5
Serum/Replacement (% Publication)						
	FBS	KSR	FBS + KSR	Human Serum		
2008	6.3	90.8	2.3	0.3		
2009	4.3	91.4	4.3	0		
FGF Concentration (% Publication)						
	4 ng/ml	5 ng/ml	8 ng/ml	10 ng/ml	Others	
2008	62.9	4.5	10.7	14	7.9	
2009	63.7	5.4	11.3	9.5	10.1	
Rev 16.03opagation Method (% Publication)						
	Mechanical	Collagenase	Trypsin	Dispase	Others	
2008	26.2	46.1	16.2	6.8	4.7	
2009	26.9	53.1	8.1	8.8	3.1	

To compare the data obtained in the first 8 months of 2009 with the whole year of 2008, the values were expressed in percentage of publication or occurrence.

pathways were observed in a reduced number and were included in "others" in the analysis.

An important issue regarding the hES cell culture is the maintenance of their genetic stability even after long periods in culture. A few years ago, aneuploidy, a phenomenon characterized by loss or gain of chromosomes, was described in hES cells. Different groups showed aneuploidy such as trisomies of chromosomes 12 and 17 (13), an extra chromosome X (41), or gain of chromosome 20 (51) in hES. It has already been demonstrated that the propagation of hES by enzymatic means, with trypsin for example, can contribute to aneuploidy (25, 26,40,42). In our research, we have noticed a broad range of propagation methods. The most commonly employed techniques include the use of collagenase or me-

chanical dissociation (Fig. 6). While mechanical dissociation is a way to propagate hES cells minimizing microenvironmental disturbance (42), the preference for collagenase over other methods may have been influenced by the following: 1) simplifying routine for expanding hES cells when compared to mechanical dissociation, which is very laborious and time consuming depending on the amount of samples to be propagated (42); 2) the adverse effects of collagenase on hES cells are less prominent than trypsin (4), which may actually contribute to a higher occurrence of aneuploidy (7,25); and 3) collagenase specifically cleaves collagen chains, while trypsin, with its wider spectrum of cleavage sites, may affect cell membrane proteins. In 2007, a new enzymatic mean, using a recombinant enzyme replacement

for cell dissociation (TrypLE™) was found in our survey (Fig. 6). Some articles have suggested that this method does not cause karyotype abnormalities, increases colony formation (16), and easily detaches cells from adherent surfaces, thus bringing to the field a new alternative for passing hES cells (47).

With so many different possibilities to culture hES cells, we decided to compare in detail protocols for culturing H1 and H9 cell lines, as they are the most published hES cell lines in the world (data not shown). Among the publications using H1 and/or H9 cell lines, 250 articles contained enough data for gathering information on protocols (Table 2). Protocols used exclusively for H1 or H9 or as a combination of both cell lines were analyzed. We found 61 different protocols for H1, 95 for H9, and 94 protocols for H1 + H9. Despite the great variability found within the H1 and H9 culture methods, it was possible to highlight 12 protocols with more than four occurrences among the cultivation of H1 and H9 alone or in combination (Table 2). The use of KSR as supplement, MEFs as substrate, collagenase as passage method, and 4 ng/ml of FGF-2 are the most commonly found similarities. The use of DMEM/F12 or KO-DMEM as culture media is the most significant difference. DMEM/F12 is mostly used in H1 cultures while KO-DMEM is mostly used in H9 and H1 + H9 cultures.

Beyond the presented data from 1998 to 2008, we also analyzed articles published from January to August 2009. In spite of the numerous protocols, we noted that during these first 8 months of 2009 the tendencies were kept. We observed that MEFs still are the most used substrate to culture hES cells, and the media and supplements more frequently used are DMEM/F12 or KO-DMEM supplemented with KSR and 4 ng/mL of FGF-2, with collagenase as enzyme for propagation of the cells. To better understand and compare the data from January to August 2009 with the whole year of 2008, Table 3 presents the values of the items analyzed in this review as percentages.

In our own laboratory, reagents that best suit the requirements for the H9 cell line culture are: inactivated MEFs (C57/B16 strain) as the feeder layer in DMEM/F12 supplemented with 8 ng/ml of FGF-2 and 20% KSR, using TrypLE™ to dissociate the cells during passage.

CONCLUSION

Culturing hES cells with such a variety of protocols indicates the capacity of these cells to adapt into different conditions. As refereed by the number of protocols used for culturing H1 or H9 (Table 2), the capacity of hES cells to adapt to different substrates (as Matrigel or human feeders) and to defined media and supplements (as mTeSR and KSR) (20,36,54,61). However, given all

these available types of culture conditions, it is challenging to compare the results obtained by different research groups around the world. Therefore, the data presented in this review may contribute to the International Stem Cell Initiative (ISCI) (http://www.stemcellforum.org/isci_project.cfm), whose aim is to establish common standards and procedures between laboratories, upon comparing the performance of different media and other aspects related to the culture of hES cells.

The ISCI has published an article focusing on the characterization of 59 hES cell lines maintained under different culture conditions (3). Several similarities in gene and antigen expression were observed in these cell lines, as well as significant differences in this expression, that may be specific to some lines, but may also be caused by different culturing conditions (3). Beside this, differences in hES cells microenvironment can cause variations in their molecular signature, as observed by the differential expression of 1,417 genes in cells grown in serum-containing medium compared with those cultured in serum replacement medium (54). Indeed, standardization of protocols used for culturing hES cells may help with the reproducibility issue and also when comparing results obtained by different research groups.

The study of hES cells brings great perspectives not only to regenerative medicine but also for drug discovery and screening as well as studies of human development. The specific needs in growing these cells for use in basic or applied research are different, stimulating the development of protocols that best suit specific goals. With the aim of using hES cells for cell replacement therapies, a great effort has been made to eliminate animal components from culture. On the other hand, scientists focusing on basic research seek to reduce culture costs and to achieve effective culture conditions (an example is the number of publications using MEFs as a substrate even nowadays, representing an almost fourfold increase in relation to Matrigel culture publications) (Fig. 4A). In this regard, it will be imperative that researchers make sure that cells cultured in media containing animal-derived components will have the same characteristics when adapted to a xeno-free equivalent condition.

Herein, by describing trends for culturing hES cells, we hope to provide valuable information regarding the most adopted procedures to culture hES cells. Scrutinizing 750 published articles revealed important parameters in hES cell culture methods. This review could be used as a tool to help researchers already working in the field, and specially also newcomers who want to start their research.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by grants from Faperj—Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à

Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro; CNPq—Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (S.R.), and the Brazilian Ministry of Health/DECIT (S.R.).

REFERENCES

- Abbott, A.; Dennis, C.; Ledford, H.; Smith, K. The lure of stem-cell lines. *Nature* 442(27):336–337; 2006.
- Abeyta, M. J.; Clark, A. T.; Rodriguez, R. T.; Bodnar, M. S.; Pera, R. A.; Firpo, M. T. Unique gene expression signatures of independently-derived human embryonic stem cell lines. *Hum. Mol. Genet.* 13(6):601–608; 2004.
- Adewumi, O.; Aflatoonian, B.; Ahrlund-Richter, L.; Amit, M.; Andrews, P. W.; Beighton, G.; Bello, P. A.; Benvenisty, N.; Berry, L. S.; Bevan, S.; Blum, B.; Brooking, J.; Chen, K. G.; Choo, A. B.; Churchill, G. A.; Corbel, M.; Damjanov, I.; Draper, J. S.; Dvorak, P.; Emanuelsson, K.; Fleck, R. A.; Ford, A.; Gertow, K.; Gertsenstein, M.; Gokhale, P. J.; Hamilton, R. S.; Hampl, A.; Healy, L. E.; Hovatta, O.; Hyllner, J.; Imreh, M. P.; Itskovitz-Eldor, J.; Jackson, J.; Johnson, J. L.; Jones, M.; Kee, K.; King, B. L.; Knowles, B. B.; Lako, M.; Lebrin, F.; Mallon, B. S.; Manning, D.; Mayshar, Y.; McKay, R. D.; Michalska, A. E.; Mikkola, M.; Mileikovsky, M.; Minger, S. L.; Moore, H. D.; Mummery, C. L.; Nagy, A.; Nakatsuji, N.; O'Brien, C. M.; Oh, S. K.; Olsson, C.; Otonkoski, T.; Park, K. Y.; Passier, R.; Patel, H.; Patel, M.; Pedersen, R.; Pera, M. F.; Piekarczyk, M. S.; Pera, R. A.; Reubinoff, B. E.; Robins, A. J.; Rossant, J.; Rugg-Gunn, P.; Schulz, T. C.; Semb, H.; Sherrer, E. S.; Siemen, H.; Stacey, G. N.; Stojkovic, M.; Suemori, H.; Szatkiewicz, J.; Turetsky, T.; Tuuri, T.; van den Brink, S.; Vintersten, K.; Vuorio, S.; Ward, D.; Weaver, T. A.; Young, L. A.; Zhang, W. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat. Biotechnol.* 25(7):803–816; 2007.
- Allegrucci, C.; Young, L. E. Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum. Reprod. Update* 13(2):103–120; 2007.
- Alper, J. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nat. Biotechnol.* 27(3):213–214; 2009.
- Amit, M.; Shariki, C.; Margulets, V.; Itskovitz-Eldor, J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 70(3):837–845; 2004.
- Brimble, S. N.; Zeng, X.; Weiler, D. A.; Luo, Y.; Liu, Y.; Lyons, I. G.; Freed, W. J.; Robins, A. J.; Rao, M. S.; Schulz, T. C. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev.* 13(6):585–597; 2004.
- Chin, A. C.; Fong, W. J.; Goh, L. T.; Philp, R.; Oh, S. K.; Choo, A. B. Identification of proteins from feeder conditioned medium that support human embryonic stem cells. *J. Biotechnol.* 130(3):320–328; 2007.
- Cowan, C. A.; Klimanskaya, I.; McMahon, J.; Atienza, J.; Witmyer, J.; Zucker, J. P.; Wang, S.; Morton, C. C.; McMahon, A. P.; Powers, D.; Melton, D. A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.* 350(13):1353–1356; 2004.
- Daheron, L.; Opitz, S. L.; Zaehres, H.; Lensch, M. W.; Andrews, P. W.; Itskovitz-Eldor, J.; Daley, G. Q. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22(5):770–778; 2004.
- De Trizio, E.; Brennan, C. S. The business of human embryonic stem cell research and an international analysis of relevant laws. *J. Biolaw Bus.* 7(4):14–22; 2004.
- Diaz, S. L.; Padler-Karavani, V.; Ghaderi, D.; Hurtado-Ziola, N.; Yu, H.; Chen, X.; Brinkman-Van der Linden, E. C.; Varki, A.; Varki, N. M. Sensitive and specific detection of the non-human sialic Acid N-glycolylneuraminic acid in human tissues and biotherapeutic products. *PLoS One* 4(1):e4241; 2009.
- Draper, J. S.; Smith, K.; Gokhale, P.; Moore, H. D.; Maltby, E.; Johnson, J.; Meisner, L.; Zwaka, T. P.; Thomson, J. A.; Andrews, P. W. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 22(1):53–54; 2004.
- Dvorak, P.; Hampl, A. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 43(4):203–208; 2005.
- Ellerstrom, C.; Strehl, R.; Moya, K.; Andersson, K.; Bergh, C.; Lundin, K.; Hyllner, J.; Semb, H. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem Cells* 24(10):2170–2176; 2006.
- Ellerstrom, C.; Strehl, R.; Noaksson, K.; Hyllner, J.; Semb, H. Facilitated expansion of human embryonic stem cells by single-cell enzymatic dissociation. *Stem Cells* 25(7):1690–1696; 2007.
- Evans, M. J.; Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154–156; 1981.
- Eve, D. J.; Sanberg, P. R. Stem cell research in Cell Transplantation: An analysis of geopolitical influence by publications. *Cell Transplant.* 16(8):867–873; 2007.
- Fernandes, A. M.; Marinho, P. A.; Sartore, R. C.; Paulsen, B. S.; Mariante, R. M.; Castilho, L. R.; Rehen, S. K. Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42(6):515–522; 2009.
- Genbacev, O.; Krtolica, A.; Zdravkovic, T.; Brunette, E.; Powell, S.; Nath, A.; Caceres, E.; McMaster, M.; McDonagh, S.; Li, Y.; Mandalam, R.; Lebkowski, J.; Fisher, S. J. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil. Steril.* 83(5):1517–1529; 2005.
- Gerami-Naini, B.; Dovzhenko, O. V.; Durning, M.; Wegner, F. H.; Thomson, J. A.; Golos, T. G. Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *Endocrinology* 145(4):1517–1524; 2004.
- Geron Corporation. World's first clinical trial of human embryonic stem cell therapy cleared. *Regen. Med.* 4(2):161; 2009.
- Ginis, I.; Luo, Y.; Miura, T.; Thies, S.; Brandenberger, R.; Gerecht-Nir, S.; Amit, M.; Hoke, A.; Carpenter, M. K.; Itskovitz-Eldor, J.; Rao, M. S. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 269(2):360–380; 2004.
- Guhr, A.; Kurtz, A.; Friedgen, K.; Loser, P. Current state of human embryonic stem cell research: An overview of cell lines and their use in experimental work. *Stem Cells* 24(10):2187–2191; 2006.
- Hanson, C.; Caisander, G. Human embryonic stem cells and chromosome stability. *APMIS* 113(11–12):751–755; 2005.
- Hoffman, L. M.; Carpenter, M. K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 23(6):699–708; 2005.
- Holden, C. Obama executive order. For Congress and

- NIH, headaches ahead on stem cells. *Science* 323(5921):1552–1553; 2009.
28. Humphrey, R. K.; Beattie, G. M.; Lopez, A. D.; Bucay, N.; King, C. C.; Firpo, M. T.; Rose-John, S.; Hayek, A. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells* 22(4):522–530; 2004.
 29. Inzunza, J.; Gertow, K.; Stromberg, M. A.; Matilainen, E.; Blennow, E.; Skottman, H.; Wolbank, S.; Ahrlund-Richter, L.; Hovatta, O. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* 23(4):544–549; 2005.
 30. Khoo, M. L.; McQuade, L. R.; Smith, M. S.; Lees, J. G.; Sidhu, K. S.; Tuch, B. E. Growth and differentiation of embryoid bodies derived from human embryonic stem cells: Effect of glucose and basic fibroblast growth factor. *Biol. Reprod.* 73(6):1147–1156; 2005.
 31. Koivisto, H.; Hyvarinen, M.; Stromberg, A. M.; Inzunza, J.; Matilainen, E.; Mikkola, M.; Hovatta, O.; Teerijoki, H. Cultures of human embryonic stem cells: Serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor. *Reprod. Biomed. Online* 9(3):330–337; 2004.
 32. Leite, M. Stem cell research in Brazil: A difficult launch. *Cell* 124(6):1107–1109; 2006.
 33. Lerou, P. H.; Daley, G. Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev.* 19(6):321–331; 2005.
 34. Levenstein, M. E.; Ludwig, T. E.; Xu, R. H.; Llanas, R. A.; VanDenHeuvel-Kramer, K.; Manning, D.; Thomson, J. A. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24(3):568–574; 2006.
 35. Levine, A. D. Identifying under- and overperforming countries in research related to human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2(6):521–524; 2008.
 36. Ludwig, T. E.; Levenstein, M. E.; Jones, J. M.; Berggren, W. T.; Mitchen, E. R.; Frane, J. L.; Crandall, L. J.; Daigh, C. A.; Conard, K. R.; Piekarczyk, M. S.; Llanas, R. A.; Thomson, J. A. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* 24(2):185–187; 2006.
 37. Martin, M. J.; Muotri, A.; Gage, F.; Varki, A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat. Med.* 11(2):228–232; 2005.
 38. McCormick, J. B.; Owen-Smith, J.; Scott, C. T. Distribution of human embryonic stem cell lines: Who, when, and where. *Cell Stem Cell* 4(2):107–110; 2009.
 39. McDevitt, T. C.; Palecek, S. P. Innovation in the culture and derivation of pluripotent human stem cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19(5):527–533; 2008.
 40. Mitalipova, M.; Calhoun, J.; Shin, S.; Winger, D.; Schulz, T.; Noggle, S.; Venable, A.; Lyons, I.; Robins, A.; Stice, S. Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells* 21(5):521–526; 2003.
 41. Mitalipova, M. M.; Rao, R. R.; Hoyer, D. M.; Johnson, J. A.; Meisner, L. F.; Jones, K. L.; Dalton, S.; Stice, S. L. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 23(1):19–20; 2005.
 42. Moon, S. Y.; Park, Y. B.; Kim, D. S.; Oh, S. K.; Kim, D. W. Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications. *Mol. Ther.* 13(1):5–14; 2006.
 43. Moore, K. E.; Mills, J. F.; Thornton, M. M. Alternative sources of adult stem cells: A possible solution to the embryonic stem cell debate. *Gen. Med.* 3(3):161–168; 2006.
 44. Navarro-Alvarez, N.; Soto-Gutierrez, A.; Yuasa, T.; Yamatsuji, T.; Shirakawa, Y.; Nagasaka, T.; Sun, S. D.; Javed, M. S.; Tanaka, N.; Kobayashi, N. Long-term culture of Japanese human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Cell Transplant.* 17(1–2):27–33; 2008.
 45. Oh, S. K.; Choo, A. B. Human embryonic stem cells: technological challenges towards therapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33(5–6):489–495; 2006.
 46. Osafune, K.; Caron, L.; Borowiak, M.; Martinez, R. J.; Fitz-Gerald, C. S.; Sato, Y.; Cowan, C. A.; Chien, K. R.; Melton, D. A. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat. Biotechnol.* 26(3):313–315; 2008.
 47. Phillips, B. W.; Horne, R.; Lay, T. S.; Rust, W. L.; Teck, T. T.; Crook, J. M. Attachment and growth of human embryonic stem cells on microcarriers. *J. Biotechnol.* 138(1–2):24–32; 2008.
 48. Rajala, K.; Hakala, H.; Panula, S.; Aivio, S.; Pihlajamaki, H.; Suuronen, R.; Hovatta, O.; Skottman, H. Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. *Hum. Reprod.* 22(5):1231–1238; 2007.
 49. Reubinoff, B. E.; Pera, M. F.; Fong, C. Y.; Trounson, A.; Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18(4):399–404; 2000.
 50. Richards, M.; Fong, C. Y.; Chan, W. K.; Wong, P. C.; Bongso, A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 20(9):933–936; 2002.
 51. Rosler, E. S.; Fisk, G. J.; Ares, X.; Irving, J.; Miura, T.; Rao, M. S.; Carpenter, M. K. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev. Dyn.* 229(2):259–274; 2004.
 52. Russo, E. Follow the money—the politics of embryonic stem cell research. *PLoS Biol.* 3(7):e234; 2005.
 53. Schulz, L. C.; Ezashi, T.; Das, P.; Westfall, S. D.; Livingston, K. A.; Roberts, R. M. Human embryonic stem cells as models for trophoblast differentiation. *Placenta* 29 (Suppl. A):S10–16; 2008.
 54. Skottman, H.; Stromberg, A. M.; Matilainen, E.; Inzunza, J.; Hovatta, O.; Lahesmaa, R. Unique gene expression signature by human embryonic stem cells cultured under serum-free conditions correlates with their enhanced and prolonged growth in an undifferentiated stage. *Stem Cells* 24(1):151–167; 2006.
 55. Squizzato, R. Brazilian court decision eases scientists' stem cell worries. *Nat. Med.* 14(7):699; 2008.
 56. Taymor, K.; Scott, C. T. The practical consequences of a national human embryonic stem cell registry. *Stem Cell Rev.* 5(4):315–318; 2009.
 57. Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145–1147; 1998.
 58. Triunfol, M. L. Latin American science moves into the spotlight. *Cell* 131(7):1213–1216; 2007.
 59. Trounson, A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr. Rev.* 27(2):208–219; 2006.
 60. Wang, Q.; Fang, Z. F.; Jin, F.; Lu, Y.; Gai, H.; Sheng, H. Z. Derivation and growing human embryonic stem

- cells on feeders derived from themselves. *Stem Cells* 23(9):1221–1227; 2005.
61. Xu, C.; Inokuma, M. S.; Denham, J.; Golds, K.; Kundu, P.; Gold, J. D.; Carpenter, M. K. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19(10):971–974; 2001.
 62. Xu, C.; Rosler, E.; Jiang, J.; Lebkowski, J. S.; Gold, J. D.; O’Sullivan, C.; Delavan-Boorsma, K.; Mok, M.; Bronstein, A.; Carpenter, M. K. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells* 23(3):315–323; 2005.
 63. Xu, R. H.; Chen, X.; Li, D. S.; Li, R.; Addicks, G. C.; Glennon, C.; Zwaka, T. P.; Thomson, J. A. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat. Biotechnol.* 20(12):1261–1264; 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)