

Karin Berria Tomazelli

**ANÁLISE TÊMPORO-ESPACIAL DA DISTRIBUIÇÃO DE  
OSTERIX, HNK-1 E SOX-10 DURANTE A ODONTOGÊNESE E  
OSTEOGÊNESE DOS MAXILARES**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Odontologia

Orientador: Prof. Dra. Michelle  
Tillmann Biz

Co-orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo  
Siqueira

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Tomazelli, Karin Berria

ANÁLISE TÊMPORO-ESPACIAL DA DISTRIBUIÇÃO DE OSTERIX,  
HNK-1 E SOX-10 DURANTE A ODONTOGÊNESE E OSTEOGÊNESE DOS  
MAXILARES / Karin Berria Tomazelli ; orientadora,  
Michelle Tillmann Biz ; coorientador, Filipe Modolo  
Siqueira. - Florianópolis, SC, 2015.

79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Osteogênese dos maxilares. 3.  
Odontogênese. 4. Células da crista neural. 5. Células-  
tronco mesenquimais. I. Tillmann Biz, Michelle . II.  
Modolo Siqueira, Filipe. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.  
IV. Título.

Karin Berria Tomazelli

**ANÁLISE TÊMPORO-ESPACIAL DA DISTRIBUIÇÃO DE  
OSTERIX, HNK-1 E SOX-10 DURANTE A ODONTOGÊNESE E  
OSTEOGÊNESE DOS MAXILARES**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2015.

---

Prof.<sup>a</sup> Izabel Almeida Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Michelle Tillmann Biz, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Filipe Modolo Siqueira, Dr.  
Co-orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Ricardo Castilho Garcez, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Carolina Amália Barcellos Silva, Dra.  
Universidade do Planalto Catarinense

Este trabalho é dedicado à minha  
família.



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michelle Tillmann Biz. Por ter me orientado nos desafios encontrados para a realização deste trabalho, estando ao meu lado para que sempre encontrássemos solução. Obrigada por toda paciência, apoio, dedicação e confiança que depositou em mim.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira por ter me ofertado atenção quando necessário e por transmitir muito conhecimento.

Aos professores da área de concentração em Diagnóstico Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina que tiveram paciência para me tolerar todos os dias em que estive desenvolvendo este trabalho.

Às minhas colegas e amigas, que vou levar pra sempre no meu coração: Bianca, Kamile, Caroline, Letícia, Mariana; obrigada por todo carinho e apoio nesses últimos 2 anos.

Agradeço muito aos meus pais Arcione e Eneve, responsáveis pela minha educação. Vocês sempre estiveram à frente dos meus sonhos, me apoiando nas decisões, incentivando e sendo meus aliados para que tudo desse certo, muito obrigada.

Ao meu irmão Kauê, o caçula, sempre estando presente quando precisei de seu apoio.

Ao meu amigo e namorado Marcel, sempre me apoiando, tendo paciência e compreensão em todos os momentos que precisei estar ausente. Por ter me impulsionado nos momentos difíceis.

À toda minha família, que sempre fez questão de me mostrar o orgulho que sentem da minha formação e por terem me ajudado em minha educação.

Aos meus amigos, principalmente Vinicius e Raphaella que são essenciais na minha vida. Obrigada por estarem sempre do meu lado e terem entendido meu estresse nesses últimos tempos.



“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)



## RESUMO

A diferenciação de células especializadas na secreção de matriz é essencial para a formação dos maxilares e dos tecidos dentais. A maior parte do tecido mesenquimal na região cefálica é formada pelas células da crista neural (CN). Essas células são migratórias, multipotentes, dando origem a uma variedade de tipos celulares e, por isso, são consideradas de alta plasticidade, indicando que contenham progenitores celulares com grande poder de diferenciação, característica de células-tronco. Neste trabalho, foi avaliada a presença de progenitores indiferenciados de células da CN, além de células-tronco mesenquimais com potencial osteoblástico, durante o processo de odontogênese e osteogênese dos maxilares, em ratos. Para esse fim, lâminas histológicas de cabeças de ratos foram coletadas e analisadas por meio de imunohistoquímica em 2 fases do desenvolvimento: idade fetal de 15 e 17 dias (F15; F17); e 2, 4 e 7 dias após o nascimento (D2; D4; D7). Foi analisada a distribuição dos marcadores de CTM (Osterix) e de CN (Sox-10, HNK-1). Os resultados obtidos demonstram marcação para os anticorpos Osterix e HNK-1 em células ectomesenquimais indiferenciadas ao redor da cartilagem de Meckel e em células da papila dentária e no epitélio do germe dentário; Sox-10 obteve marcação nas mesmas células indiferenciadas apenas em estágios iniciais do desenvolvimento. Houve também positividade para HNK-1 e Osterix nas células ectomesenquimais indiferenciadas adjacentes ao centro de ossificação do palato secundário. Ainda observou-se expressão positiva para HNK-1, Sox-10 e Osterix em células já diferenciadas, como osteoblastos e osteócitos na formação da cripta óssea e ossificação do palato secundário e, também, em ameloblastos e odontoblastos, no período de odontogênese. Em conjunto, os resultados sugerem que o Osterix, HNK-1 e Sox-10 provavelmente participam do processo de diferenciação de osteoblastos, odontoblastos e ameloblastos, sendo importantes para a manutenção do estado indiferenciado destas células em estágios iniciais de secreção de matriz.

**Palavras-chave:** odontogênese. osteogênese. crista neural.



## ABSTRACT

Differentiation of specialized cells for secretion of mineralized matrix is essential to development of mandibular and dental tissues. Most of mesenchymal tissue in facial area is formed by neural crest cells (NC). These multipotent cells are highly migratory, leading to gives rise to a variety of cells, this way they are considered with a high level of plasticity, indicating that contains progenitor cells, with great power of differentiation, characteristic of stem cells. In this study was evaluate the presence of NC cell progenitors, and mesenchymal stem cells (MSC), during maxillaries osteogenesis and odontogenesis in rats. Histological slides were collected and analyzed by immunohistochemistry in 2 phases of development: fetal age of 15 and 17 days (F15; F17), 2, 4 and 7 days after birth (D2; D4; D7). It was performed immunohistochemistry for MSC markers (Osterix) and NC cells (Sox-10, HNK-1). The results showed positive expression for antibodies Osterix and HNK-1 in undifferentiated ectomesenchymal cells around the Meckel's cartilage and dental papilla cells of the epithelium and tooth germ; Sox-10 was present only in early stages in undifferentiated cells. There was also positive for HNK-1 and Osterix in undifferentiated ectomesenchymal cells adjacent to the ossification center of the palate shelf. Also showed positive expression for all antibodies in differentiated cells, such as osteoblasts and osteocytes, in bone crypt and palate shelf formation and ameloblasts and odontoblasts during odontogenesis. Our results suggest that Osterix, HNK-1 and Sox-10 probably participate in differentiation process of osteoblasts, odontoblasts and ameloblasts, and are important for the maintenance of the indiferenciated status of these cells during secretion of mineralized matrix.

**Keywords:** odontogenesis. osteogenesis. neural crest cells.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação do mesoderma extra-embriônico .....	25
Figura 2 – Estruturas do primeiro arco faríngeo .....	27
Figura 3 - Palato secundário fusionado de embrião de rato e início do centro de ossificação .....	28
Figura 4 - Odontogênese em rato nas suas diferentes fases .....	31
Figura 5 - Formação da Crista Neural .....	33
Figura 6 - Esquema representativo de um embrião demonstrando a migração da CN cefálica .....	34
Figura 7 - Reação de imuno-histoquímica para Osterix, HNK-1 e Sox-10 durante a Odontogênese .....	60
Figura 8 - Reação de imuno-histoquímica para Osterix, HNK-1 e Sox-10 durante a formação da cripta óssea.....	61
Figura 9 - Reação de imuno-histoquímica para Osterix, HNK-1 e Sox-10 durante a ossificação do palato secundário .....	62



## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Anticorpos primários utilizados .....	75
--	----



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Intensidade de marcação na odontogênese.....	58
Tabela 2 - Intensidade de marcação na formação da cripta óssea .....	58
Tabela 3 - Intensidade de marcação na formação do palato secundário .....	59



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP: Proteína morfogenética óssea  
CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais  
CN: Crista Neural  
CT: Células-tronco  
CTA: Célula-tronco adulta  
CTE: Célula-tronco embrionária  
CTM: Célula-tronco mesenquimal  
D2: 2 dias após o nascimento  
D4: 4 dias após o nascimento  
D7: 7 dias após o nascimento  
EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético  
EGF: Fator de crescimento epidermal  
FGF: Fator de crescimento de fibroblastos  
FGF2: Fator de crescimento de fibroblastos tipo 2  
F15: Idade fetal de 15 dias  
F17: Idade fetal de 17 dias  
HNK-1 – do inglês *Human Natural Killer-1*  
NIH: *National Institute of Health*  
LPB: Laboratório de Patologia Bucal  
OSX: Osterix  
PBS: Tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)  
SHH: Sonic hedgehog  
Sox-10: do inglês *SRY (sex determining region Y)-box 10*  
SNC: Sistema Nervoso Central  
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina  
VIU: Vida intra-uterina  
WNT: Proteína homóloga a wingless *Drosóphila*



## LISTA DE SÍMBOLOS

°: Grau

g: Grama

%: Por cento

mg: Miligrama

ml: Mililitro

µl: Microlitro

≤: Procedência menor e igual

®: Marca registrada

X: Vezes



## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
1.1 DESENVOLVIMENTO DA FACE .....	25
1.2 DESENVOLVIMENTO DO PALATO .....	27
1.3 DESENVOLVIMENTO DA MANDIBULA .....	28
1.4 ODONTOGÊNESE.....	29
1.5 CÉLULAS DA CRISTA-NEURAL .....	32
1.6 CÉLULAS-TRONCO .....	35
1.6.1 Células-tronco mesenquimais.....	36
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
2.1 Objetivo geral .....	37
2.2 Objetivos específicos.....	38
<b>3 ARTIGO.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>APENDICE A - Metodologia expandida.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO A - Relatório de aprovação do CEUA .....</b>	<b>77</b>



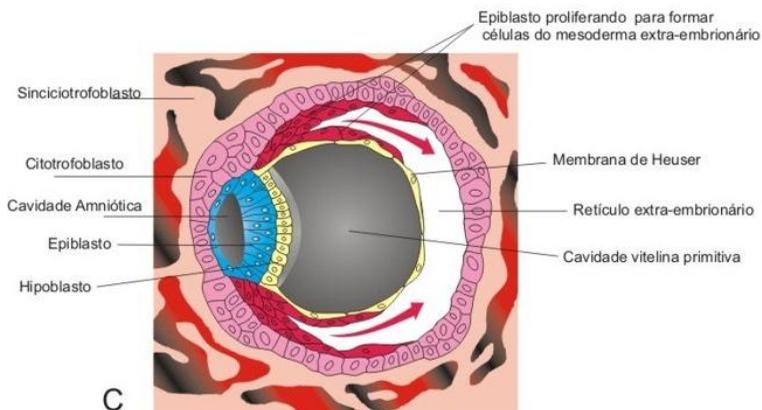
## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Desenvolvimento da face

A face do embrião inicia sua formação a partir da quarta semana de desenvolvimento intra-uterino, entretanto, todos os eventos que ocorrem nas semanas anteriores irão contribuir significativamente para a formação da mesma. O desenvolvimento facial inclui a formação da boca primitiva, do processo mandibular, do processo maxilar, do processo fronto-nasal e do nariz (BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2012).

O embrião até o final da segunda semana aparece como um disco bilaminar composto por duas camadas: o epiblasto e hipoblasto. A concentração de células do epiblasto estabelece uma linha mediana e caudal, a linha primitiva. Essas células da linha primitiva se espalham lateral e cranialmente entre o epiblasto e o hipoblasto e estabelecem outra camada: o mesoderma extra-embriônico (Figura 1). Células da camada mais cefálica da linha primitiva proliferam e migram constituindo um cordão maciço de células denominado notocorda (FERRARIS; MUÑOZ, 2002; KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

**Figura 1. Formação do mesoderma extra-embriônico.** As células do epiblasto proliferam para posteriormente formar o mesoderma extra-embriônico. Fonte: Atlas de embriologia- UFRN, 2010.



Em torno da quarta semana de vida intrauterina inicia-se o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). O ectoderma sofre

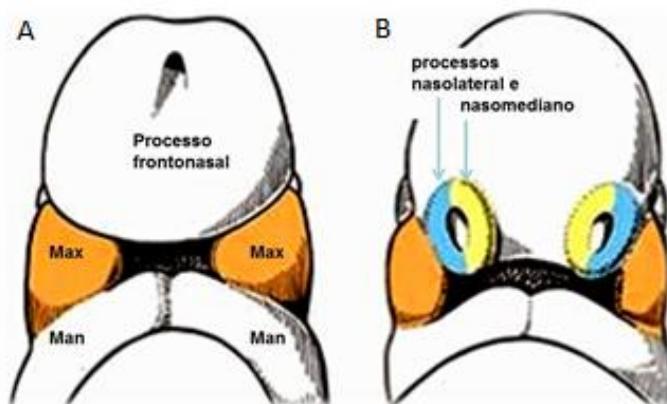
um espessamento por indução da notocorda, formando a placa neural. Logo em seguida, as bordas laterais da placa neural se elevam, constituindo as dobras ou pregas neurais, deixando uma depressão chamada sulco neural. Essas pregas neurais continuam proliferando até fusionarem na linha média, constituindo então o tubo neural. À medida que as pregas neurais estão fusionando, as regiões que correspondem às cristas de cada lado das pregas se separam, migrando lateralmente ao tubo neural, ficando como duas massas celulares, denominadas cristas neurais. Estas células, na quarta semana de vida intra-uterina migram da região dorsal para a região ventral da face do embrião onde irão se misturar com o mesênquima, contribuindo para a formação de estruturas mesenquimais da face (MACHADO, 1993; FERRARIS; MUÑOZ, 2002).

Após esses eventos, ainda durante a quarta semana, o embrião sofre um dobramento no sentido crânio-caudal e no sentido ventral, resultando no surgimento da boca primitiva ou estomodeo (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Da mesma forma, ocorre o aparecimento de projeções bilaterais inferiormente ao estomodeo, chamadas de arcos faríngeos os quais são formadas por seis pares de segmentos responsáveis por grande parte da formação da face e do pescoço (FERRARIS; MUÑOZ, 2002; KATCHBURIAN; ARANA, 2004; BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2012).

Cada par de arcos faríngeos é revestido externamente por ectoderma, internamente por endoderma e apresenta uma região central de mesênquima invadido por células (provenientes da crista neural), o qual é denominado de ectomesênquima. Este tecido é responsável por dar origem a estruturas ósseas, conjuntivas e musculares da região crânio-facial e a determinados tecidos dentais (FERRARIS; MUÑOZ, 2002; BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2012).

Mais tarde, o primeiro arco faríngeo é subdividido em dois processos: 1) processo mandibular, mais volumoso, o qual desenvolve a cartilagem de Meckel e 2) processo maxilar. Ambos formarão mandíbula e maxila, respectivamente. Acima dessa cavidade oral primitiva se forma o processo frontal, onde em sua lateral irá ocorrer o desenvolvimento das fossas nasais (Figura 2). O processo frontal tem a sua porção mais anterior chamada de processo frontonasal, que juntamente com o processo mandibular e maxilar, delimitam a cavidade oral. O segundo arco branquial é responsável pela formação do pescoço e suas estruturas adjacentes (FERRARIS; MUÑOZ, 2002; KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

**Figura 2. Estruturas do primeiro arco faríngeo.** (A) Processo fronto-nasal, processos maxilares e processos mandibulares, (B) Processo fronto-nasal, processos maxilares, processos mandibulares e presença do placóids nasais. Fonte: Hiatt, 2010.

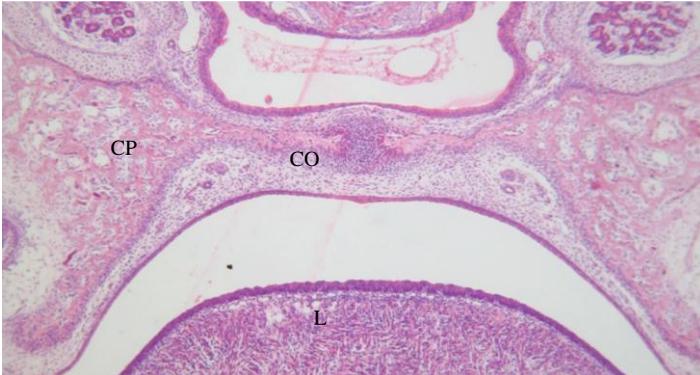


## 1.2 Desenvolvimento do palato

Entre a quinta e sexta semana de vida intra-uterina (VIU) começa o desenvolvimento do palato primário. Primeiramente, ocorre a união dos processos nasais mediais, tanto em superfície quanto em profundidade, surgindo uma estrutura mesenquimal denominada pré-maxila (FERRARIS; MUÑOZ, 2002). O desenvolvimento do palato secundário ocorre entre a sétima e oitava semana de VIU, devido à fusão medial das cristas palatinas (Figura 3). Essas cristas ficam posicionadas nas laterais da face, de cada lado da língua, voltadas para baixo. Posteriormente, ocorre abaixamento da língua e assoalho de boca, o que permite às cristas se elevarem e, então, fundirem-se entre si e depois com o palato primário (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Para que ocorra essa fusão, as células epiteliais superficiais sofrem apoptose e são eliminadas, expondo as células da camada basal as quais se aderem, formando uma linha mediana de epitélio que se rompe ao longo do tempo, restando ilhas de células epiteliais. Entre a décima e décima primeira semana, ocorre a fusão do palato secundário com o palato primário. A ossificação ocorre gradualmente no palato primário e, então, prolonga-se para o palato secundário, sendo do tipo intramembranosa,

onde as células mesenquimais derivadas da crista neural se diferenciam em osteoblastos, formando o centro de ossificação e ocorrendo, então, o desenvolvimento do palato duro (BAEK et al., 2011; BUSH; JIANG, 2012; SOM, NAIDICH, 2014).

**Figura 3. Fusão do palato secundário em embrião de rato e início do centro de ossificação.** (L) Língua; (CO) Centro de Ossificação; (CP) Crista Palatina. Gentilmente cedido por Michelle Tillmann Biz.



### 1.3 Desenvolvimento da mandíbula

Em torno da sexta semana de desenvolvimento embrionário, o processo mandibular contém a cartilagem de Meckel, uma cartilagem primária que serve como guia para a ossificação, sendo as duas barras separadas por tecido ectomesenquimal, na região da linha média. O início da ossificação se dá na altura do ângulo de divisão do nervo alveolar inferior nos ramos incisivo e mentoniano, lateralmente a cartilagem, onde ocorre um processo de condensação do ectomesênquima (BERNICK, PATEK, 1969; SOM, NAIDICH, 2014). Assim como no palato, o mesênquima mandibular é derivado de células da crista neural (NODEN, 1978) as quais condensam-se e diferenciam-se em osteoblastos (HALL; MIYAKE, 1995; HELMS; SCHNEIDER, 2003). Na sétima semana, inicia-se a ossificação intramembranosa do corpo da mandíbula, terminando no ponto de divisão do nervo mandibular nos ramos alveolar inferior e lingual. De cada lado da mandíbula rudimentar encontram-se os centros de ossificação, os quais são separados na região de sínfise, até o nascimento (BERNICK, PATEK, 1969; TYLER; HALL, 1977; NANJI, 2012; SOM, NAIDICH, 2014). A região posterior da mandíbula dará origem aos componentes

do orelha média, sua porção intermediária e o ligamento esfenomandibular (FERRARIS; MUÑOZ, 2002; KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

O restante da cartilagem de Meckel involui, exceto uma pequena parte na zona incisal, na região anterior da cartilagem de Meckel, onde ocorre ossificação do tipo endocondral. Entre a décima e décima quarta semana de vida intra-uterina, aparecem no tecido mesenquimal outros centros de cartilagens, independentes da cartilagem de Meckel, os quais cumprem uma função importante na ossificação do ramo da mandíbula (FERRARIS; MUÑOZ, 2002; KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

#### **1.4 Odontogênese**

A odontogênese compreende o processo de origem e formação dos tecidos dentais. Uma série de mudanças químicas, morfológicas e funcionais começam a ocorrer entre a quinta e a sexta semana de vida intra-uterina, e continuam a ocorrer ao longo de toda vida do dente. Primeiramente há a diferenciação da lâmina dentária, a qual ocorre a partir da indução do ectomesênquima (células mesenquimais e derivadas da crista neural) e epitélio oral (de origem ectodérmica), o qual reveste a cavidade oral primitiva (IMAI et al., 1996; THESLEFF, 2000; FERRARIS; MUÑOZ, 2002).

A odontogênese segue sua evolução dividida em estágios de acordo com as alterações morfológicas que ocorrem, as quais se denominam: fase de botão (Figura 4A e B), de capuz (Figura 4C e D), de campânula (Figura 4E), de coroa e de raiz (NANCI, 2012; THESLEFF, 2003; BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2012).

A fase de botão é a fase em que há uma grande proliferação da lâmina dental, com alta atividade mitótica, dando origem a brotos que penetram no ectomesênquima. Ao final desse processo proliferativo, os futuros arcos maxilares terão em torno de dez botões cada, cada broto originará um germe dentário da dentição decídua. O ectomesênquima adjacente também sofre proliferação e se encontra condensado abaixo do epitélio de revestimento separado por uma membrana basal (BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2012).

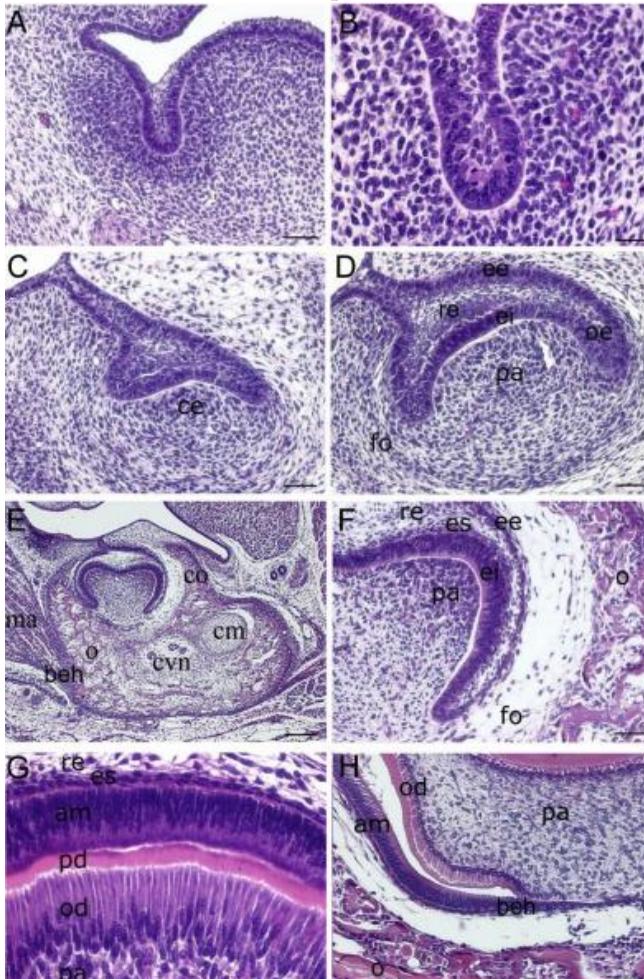
A proliferação assimétrica do broto continua determinando uma estrutura com uma concavidade inferior, com aparência de um capuz, sob o qual é observada uma concentração maior das células ectomesenquimais condensada. Estabelecida essa fase de capuz já é possível distinguir as células que darão origem as estruturas dentárias (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Na concavidade central, onde se

encontra o mesênquima condensado, é a futura papila dentária os quais formarão a dentina e a polpa dentária. O epitélio em contínuo crescimento é denominado órgão do esmalte, o qual é composto por três camadas: o epitélio externo, o epitélio interno e o retículo estrelado e dará origem aos ameloblastos - células secretoras do esmalte. Já as células da periferia do mesênquima condensado que se estendem ao redor do epitélio formando o folículo ou saco dentário (FERRARIS; MUÑOZ, 2002).

Na fase de campânula ocorre o surgimento da morfologia definitiva da coroa do dente. O órgão do esmalte adquire uma nova camada, o estrato intermediário, o que diferencia essa fase da anterior. Além disso, é possível notar modificações estruturais e químicas no órgão do esmalte, papila e folículo dentário, começando a dar forma às estruturas dentárias. Na porção epitelial do germe dentário ocorre a diferenciação dos ameloblastos que secretam o esmalte dentário. Já na mesenquimal adjacente ao epitélio interno ocorre a diferenciação dos odontoblastos responsáveis pela secreção da dentina (FERRARIS; MUÑOZ, 2002).

A etapa seguinte é denominada fase de coroa. Essa etapa inicia pela deposição de dentina de fora pra dentro e posteriormente de esmalte, de dentro pra fora. A formação inicial de dentina é necessária para ocorrer sinalizações permitindo a deposição do esmalte. E por último a fase de raiz, onde a deposição de dentina continua até atingir o comprimento total da raiz e acaba, somente, após a erupção total do dente. Também nesta fase, o folículo dará origem ao cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

**Figura 4. Odontogênese em rato nas suas diferentes fases.** (A e B) fase de botão; (C) início da fase de capuz; (D) fase de capuz; (E) fase de campânula; (F) detalhe da alça cervical em formação; (G) alça cervical com odontoblastos e ameloblastos em diferenciação; (H) detalhe para os odontoblastos com dentina sendo depositada. Condensação ectomesenquimal (ce); papila dental (pa); folículo dentário (fo); órgão do esmalte (oe); cartilagem de Meckel (cm); cripta óssea (co); músculo masseter (ma); bainha epitelial de Hertwig (beh); componente vásculo nervoso (cvn); epitélio interno (ei); epitélio externo (ee); pré-dentina (pd); retículo estrelado (re); osso em formação (o); ameloblastos (am); odontoblastos (od). Barras: (E) 200  $\mu$ m; (A), (C), (D), (F) e (G) 50  $\mu$ m; (B) e (H) 25  $\mu$ m; (C) 12  $\mu$ m. Fonte: Adaptado de Biz, 2007.



## 1.5 Células da crista neural

A crista neural (CN) é uma estrutura embrionária transitória formada por um grupo de células multipotentes, originadas durante o processo de neurulação do desenvolvimento dos vertebrados (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; TRAINOR, 2014). Foi identificada primeiramente em 1868 pelo embriologista suíço Wilhelm His como um grupo de células localizadas entre o tubo neural e a epiderme dos embriões dos vertebrados (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999).

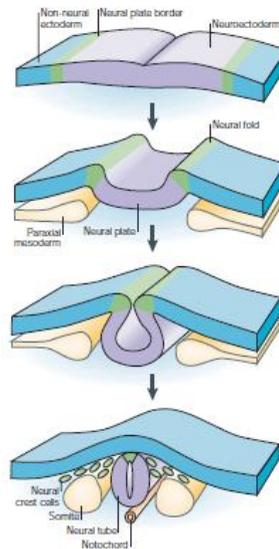
As células da CN originam-se na interface entre o ectoderma da superfície e região dorsal da placa neural, onde no período de fechamento do tubo neural essas células perdem adesão entre si e passam do fenótipo epitelial para o mesenquimal (Figura 5) (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008). A placa neural e a epiderme são especificadas por um aumento progressivo dos níveis da proteína morfogênica do osso (BMP) combinadas com fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), ácido retinóico e as moléculas Wingless (Wnt), os quais induzem a expressão de fatores de transcrição específicos da CN (HARRIS; ERICKSON, 2007). Esses fatores de transcrição estão envolvidos na delaminação das células da CN a partir do tubo neural, que então desprendem-se do neuroepitélio de origem, assumindo um caráter altamente migratório. A partir disso, essas células da CN migram ventro-lateralmente pelo embrião para posteriormente povoar o processo fronto-nasal e os arcos branquiais (Figura 6) (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008).

Para traçar as primeiras vias de migração da CN, existe um anticorpo denominado HNK-1, que reconhece como epítipo um carboidrato na superfície destas células. O HNK-1 está relacionado com adesão e reconhecimento celular e, além de ter sua expressão em células da CN em estágios iniciais de migração, também é expressa em neurônios maduros, células da glia, células de Schwann e ainda em leucócitos. Porém em células da CN já diferenciadas, não há mais expressão desse anticorpo (RICKMANN; FAWCETT; KEYNES, 1985; BRONNER-FRASER, 1986; NORDLANDER, 1993).

Muitas vezes, os mesmos fatores de transcrição que atuam no início da especificação da CN, posteriormente também controlam outras fases de diferenciação da CN. Como exemplo tem-se o Sox-10, que além de regular o destino das células da CN em migração, também está envolvido na diferenciação de melanócitos e nas linhagens sensoriais,

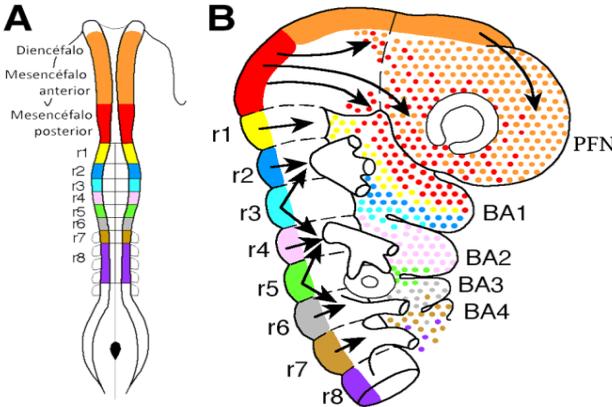
autônomicas e gliais. Já seu parálogo, Sox-9, por sua vez, é responsável pela diferenciação de condrócitos (BRONNER; LE DOUARIN, 2012; ROGERS et al., 2012). O Sox-10, além do relatado, também é essencial para a manutenção das células da CN em estágios indiferenciados (KIM et al., 2003).

**Figura 5. Formação da Crista Neural.** A borda da placa neural (verde) é induzida pela sinalização entre o neuroectoderma (roxo) e o ectoderma não-neural (azul) e da mesoderme paraxial subjacente (amarelo). Durante neurulação, as bordas da placa neural (dobras neurais) elevam-se. As células da CN (verde) delaminam das dobras neurais ou do tubo neural dorsal. Fonte: Gammill; Bronner-Fraser (2003).



O processo de migração e povoamento das células da CN ao longo do embrião permite dividi-las em regiões cefálica, vagal, cardíaca, truncal e sacral. Estas diferentes populações de células da CN seguem diversos caminhos de migração e produzem diferentes tipos celulares, os quais dependem de fatores como a região de onde emergem, as rotas migratórias estabelecidas e o local onde permanecerão (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; KULESA; FRASER, 2000).

**Figura 6. Esquema representativo de um embrião demonstrando a migração da CN cefálica.** As células da CN, originadas da região posterior do mesencéfalo e dos rombômeros (r), migram para os arcos faríngeos (BA) e para o processo frontonasal (PFN). (A e B) As cores representam as diferentes regiões do tubo neural de onde partem as células da CN. (B) As setas indicam as rotas migratórias e os mapas de destino das células da CN correspondente a cada região do tubo neural. Fonte: Modificado de Creuzet; Couly; Le Douarin, 2005



As células da CN cefálica, após se diferenciarem, dão origem aos gânglios cervicais e células gliais, derme facial, osteócitos, adipócitos, condrócitos, odontoblastos, a maioria das células pigmentares da pele e das células musculares lisas dos vasos da face (LE LIÈVRE; LE DOUARIN, 1975; ETCHEVERS et al., 2001; CRANE; TRAINOR, 2006; DUPIN et al., 2010). As células da CN vagal e região sacral contribuem para a formação dos neurônios e células gliais do sistema nervoso entérico. Já a CN cardíaca origina precursores que vão participar da septação cardíaca, separando a circulação pulmonar da aórtica, músculo liso do arco aórtico e gânglios parassimpáticos cardíacos (CRANE; TRAINOR, 2006; MIYAGAWA-TOMITA, 1991; DUPIN et al., 2010). Por fim, temos as células da CN truncal que dão origem a maior parte dos neurônios e todas as células gliais do sistema nervoso periférico, assim como melanócitos (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; CRANE; TRAINOR, 2006).

Por darem origem a vários tipos celulares, as células da CN são consideradas de alta plasticidade, indicando que contenham progenitores celulares com grande poder de diferenciação (CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009). Algumas células progenitoras da crista

neural exibem a propriedade de auto-renovação, característica de células-tronco (TRENTIN et al., 2004). Também é de conhecimento que as células da CN podem conter células-tronco (CT), progenitoras de distintos tipos celulares, já que vários de seus derivados podem novamente se diferenciar em outros tipos celulares, ocorrendo assim desvio do estado da célula já diferenciado para um alternativo (ANDERSON, 1989; DUPIN; CALLONI; LE DOUARIN, 2010; DUPIN; SOMMER, 2012). Seu amplo poder de diferenciação é por possuírem células multipotentes, células oligopotentes e progenitores já comprometidos com alguma linhagem celular, que se diferenciam em neurônios, células gliais, melanócitos, células musculares lisas, condrócitos e osteócitos (TRENTIN et al., 2004; CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009).

O microambiente em que as células se encontram é um fator importante que influencia a plasticidade celular (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999). Foi encontrado no estudo de Costa-Silva e colaboradores (2009), que a proteína da matriz extra-celular, a fibronectina, promove a diferenciação da CN para o fenótipo muscular liso, aumentando consideravelmente a sobrevivência das células da CN e a proporção de progenitores unipotentes e oligopotentes. Já Calloni, Le Douarin e Dupin (2009) demonstraram que os progenitores tratados com sonic hedgehog (Shh), um fator crucial para o desenvolvimento cerebral e facial, são capazes de originar células gliais, neurônios, melanócitos, células de músculo liso, condrócitos e osteócitos. Outro estudo evidenciou que o fator de crescimento epidermal (EGF) promove a diferenciação de células da CN em neurônios e melanócitos, enquanto o fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 (FGF2) atua na diferenciação glial (GARCEZ et al., 2009). Após o fechamento do tubo neural, os progenitores originais da CN desaparecem, porém, recentemente, foi demonstrado que tecidos adultos contêm populações de células multipotentes e autorrenováveis com potencial de desenvolvimento semelhante à CN como nervo ciático, nos gânglios da raiz dorsal, córnea, coração, medula óssea, folículo piloso e até mesmo o dente (KRUGER et al., 2002; MIURA et al., 2003; FERNANDES et al., 2004; MILETICH; SHARPE, 2004; DELFINO-MACHIN et al., 2007; LI; SAY; ZHOU, 2007)

## **1.6 Células-tronco**

CT podem ser descritas como células indiferenciadas com a capacidade de se auto-renovar e também apresentam o potencial de

gerar distintos tipos de células. Nos vertebrados existem dois grupos diferentes de CT: o primeiro grupo é composto por células-tronco embrionárias (CTE), que são derivadas da massa celular interna do blastocisto. Essas células são pluripotentes e podem dar origem a vários tipos celulares em embrião e em adulto (THOMSON et al, 1998; CRANE; TRAINOR, 2006). O segundo grupo é de células-tronco adultas (CTA) extraídas de adultos ou de fetos, as quais possuem capacidade de auto-renovação e potenciais de diferenciação mais limitados que as embrionárias e estão relacionadas principalmente com a manutenção da funcionalidade e capacidade regenerativa de certos tecidos. Um dos melhores exemplos desse grupo é a célula-tronco hematopoética, que gera todos os tipos de células que compõem o sangue e sistema imunológico (CRANE; TRAINOR, 2006), além das CTs epidermais, as CTs neurais e CTs mesenquimais (BIANCO et al., 2008).

### **1.6.1 Células-tronco mesenquimais**

O conceito atualmente popular de células-tronco mesenquimais (CTM), foi determinado primeiramente por Caplan (1991) e foi atribuído devido a experimentos clássicos que demonstraram que as células isoladas da medula óssea teriam propriedades semelhantes às CTE. Nos últimos anos, estas células vêm sendo isoladas de diferentes tecidos, como cordão umbilical (COVAS et al., 2003), placenta (CAVALLO et al., 2011), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), derme, tecido muscular esquelético (YOUNG et al., 2001), polpa dental (GRONTHOS et al., 2002; MIURA et al., 2003) e ligamento periodontal (SEO et al, 2004).

As CTM são células que apresentam a capacidade de se replicar como células indiferenciadas e que têm potencial para se diferenciar em linhagens de células mesenquimais que incluem osteoblastos, condrócitos e adipócitos (PITTENGER et al, 1999; MEIRELLES; NARDI, 2009). Essas células mesenquimais são encontradas no mesoderma dos arcos branquiais os quais são invadidos por células da CN, que passam a se comportar também como mesênquima, sendo denominado, portanto, de ectomesênquima, que dará origem a vários tecidos da face (SERBEDZIJA; BRONNER-FRASER; FRASER, 1992).

Dessa maneira, é possível encontrar CTM durante o período embrionário, no processo de odontogênese e também osteogênese dos maxilares. No período da odontogênese essas células ectomesenquimais

dão origem às seguintes estruturas dentárias: complexo dentino-pulpar, o qual se origina a partir da papila dentária, e ao periodonto de inserção, osso, ligamento e cimento, o qual tem origem a partir do folículo dentário (FERRARIS; MUÑOZ, 2002).

As células da CN que migram para o mesoderma dos arcos branquiais dão origem também a componentes esqueléticos, ósseos e cartilaginosos da face. Dentre esses componentes cartilaginosos está a cartilagem de Meckel, um núcleo de cartilagem temporário o qual será o guia para a ossificação da mandíbula (FERRARIS; MUÑOZ, 2002). A formação óssea mandibular ocorre através do processo de ossificação intramembranoso o qual se dá pela diferenciação das CTM, presentes ao redor da cartilagem de Meckel, em osteoblastos. Sox-9, Runx-2 e Osterix são três fatores de transcrição essenciais no processo de decisão em qual célula as células mesenquimais irão se tornar: condrócitos ou osteoblastos, através da ativação de genes específicos do tipo de células (CHENG et al., 2003; ZOU et al., 2006). Mais especificamente, o Osterix, é um regulador da diferenciação das CTM na linhagem osteoblástica, essencial para formação e maturação óssea, portanto quando sua expressão é inibida não há formação de esqueleto (NAKASHIMA et al., 2002).

Em trabalho anterior realizado no Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) da UFSC, sob o título “Avaliação do ligamento periodontal e da polpa dental como nicho de células tronco derivada da Crista Neural” (DUARTE, 2013), foi observada expressão positiva da proteína Sox-10 nas fases mais iniciais do desenvolvimento dentário mantendo em células já desenvolvidas como odontoblastos e células da polpa dental. Sabe-se que o Sox-10 é expresso somente em células da CN em processo migratório e em células diferenciadas do sistema nervoso; frente ao exposto, levantou-se a hipótese de que o Sox-10 e outros marcadores de CN, como o HNK-1, estariam presentes durante a osteogênese dos maxilares e odontogênese em células já diferenciadas.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

É objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição do marcador de células-tronco mesenquimais com potencial osteoblástico (Osterix) e de progenitores da crista neural (HNK-1 e Sox-10) durante o

desenvolvimento dos maxilares (osteogênese) e desenvolvimento dos dentes (odontogênese) em ratos.

## **2.2 Objetivos Específicos**

- Descrever a distribuição têmporo-espacial de marcadores de células-tronco mesenquimais durante a osteogênese dos maxilares e odontogênese;

- Descrever a distribuição têmporo-espacial de marcadores de progenitores de células da crista neural durante a osteogênese dos maxilares e odontogênese;

- Buscar uma correlação entre a marcação encontrada na osteogênese dos maxilares e na odontogênese.

### 3 ARTIGO

Artigo formatado conforme normas da revista *Tissue & Cell* (acesso em 05.02.2015, <http://www.elsevier.com/journals/tissue-and-cell/0040-8166/guide-for-authors>), exceto em relação ao idioma e as referências, as quais se encontram no formato ABNT.

#### RESUMO

A diferenciação de células especializadas na secreção de matriz é essencial para a formação dos maxilares e dos tecidos dentais. A maior parte do tecido mesenquimal na região cefálica é formada pelas células da crista neural (CN). Essas células são multipotentes e altamente migratórias, dando origem a vários tipos de células, sendo então, considerados com um alto nível de plasticidade, mostrando que contêm progenitores celulares com grande poder de diferenciação. Neste estudo, foi avaliada a presença de progenitores de células da CN e células-tronco mesenquimais (CTM) com potencial osteoblástico durante a osteogênese dos maxilares e odontogênese em ratos. Lâminas histológicas foram coletadas em 2 fases de desenvolvimento: idade fetal de 15 e 17 dias; 2, 4 e 7 dias após o nascimento. Imuno-histoquímica para marcadores de CTM (Osterix) e células da CN (Sox-10, HNK-1) foi realizada. Os resultados mostraram expressão positiva para Osterix e HNK-1 em células ectomesenquimais indiferenciadas nas fases precoce e tardia de desenvolvimento; Sox-10 estava presente apenas nos estágios iniciais em células indiferenciadas. Todos os marcadores estavam presentes em células diferenciadas (osteoblastos, odontoblastos e ameloblastos). Nossos resultados sugerem que o Osterix, HNK-1 10-Sox provavelmente participam do processo de diferenciação de osteoblastos, odontoblastos e ameloblastos e são importantes para a manutenção de tais células durante a secreção da matriz.

**Palavras-chave:** odontogênese. osteogênese. crista neural.

## INTRODUÇÃO

A face do embrião inicia sua formação a partir da quarta semana de vida intra-uterina (VIU). Entre a quinta e sexta semana de VIU começa o desenvolvimento do palato, primeiramente, com a formação do palato primário pela união dos processos nasais e, posteriormente, ocorre o desenvolvimento do palato secundário, devido à fusão medial das cristas palatinas. Essas estruturas estão verticalizadas, no entanto, quando a língua e o assoalho da cavidade bucal sofrem abaixamento essas cristas se horizontalizam e, então, se fundem. Por último, ocorre a fusão do palato secundário com o palato primário. A ossificação ocorre gradualmente no palato primário e, então, prolonga-se para o palato secundário, sendo do tipo intramembranosa, onde as células mesenquimais derivadas da crista neural se diferenciam em osteoblastos, formando o centro de ossificação e ocorrendo o desenvolvimento do palato duro (BAEK et al., 2011; BUSH; JIANG, 2012; SOM, NAIDICH, 2014)

A formação da mandíbula acontece em torno da sexta semana de VIU. O processo mandibular contém a cartilagem de Meckel, uma cartilagem primária que serve como guia para a ossificação, ocorrendo lateralmente a essa cartilagem. Assim como no palato, o mesênquima mandibular é derivado de células da crista neural (NODEN, 1978) as quais condensam-se e diferenciam-se em osteoblastos (HALL; MIYAKE, 1995; HELMS; SCHNEIDER, 2003). Após, inicia-se a ossificação intramembranosa do corpo da mandíbula, sendo visto de cada lado da mandíbula rudimentar os centros de ossificação, presentes até o nascimento (BERNICK, PATEK, 1969; TYLER; HALL, 1977; NANCI, 2012; SOM, NAIDICH, 2014).

Já a origem e formação dos tecidos dentais, chamado de odontogênese, resulta da interação do epitélio oral com células mesenquimais derivadas da crista neural (IMAI et al., 1996; THESLEFF, 2000). A odontogênese segue sua evolução dividida em estágios, de acordo com as alterações morfológicas do germe dentário, sendo denominadas: fase de botão e de capuz, quando ocorre a proliferação celular; campânula, quando ocorre a diferenciação dos ameloblastos e dos odontoblastos; fase da coroa, quando ocorre a deposição de dentina e esmalte; e fase de raiz, quando ocorre diferenciação das células responsáveis pela formação dos tecidos de sustentação do dente (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar) (THESLEFF, 2003; JERNVALL; THERLEFF, 2012; NANCI, 2012).

Em todos estes eventos descritos, ocorre a participação de células da crista neural. A crista neural (CN) é uma estrutura embrionária transitória formada por um grupo de células altamente multipotentes (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; TRAINOR, 2014). As células da CN originam-se na interface entre o ectoderma da superfície e região dorsal da placa neural, onde no período de fechamento do tubo neural perdem adesão entre si e, então, desprendem-se do neuroepitélio de origem e migram ventro-lateralmente pelo embrião para posteriormente povoar o processo fronto-nasal e os arcos branquiais (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008). Estas células originam diversos tipos celulares incluindo as células de ossos e tendões da região crânio-facial; além de neurônios, células da glia, melanócitos, odontoblastos, entre outros (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; TRENTIN et al., 2004; DUPIN et al., 2007; SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008; CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009; DUPIN; CALLONI; LE DOUARIN, 2010)

Para traçar as primeiras vias de migração da CN, usa-se anticorpo HNK-1, que reconhece um carboidrato epítopo na superfície destas células (RICKMANN; FAWCETT; KEYNES, 1985; BRONNER-FRASER, 1986). Fatores de transcrição são necessários para que ocorra essa migração, um deles é o Sox-10, que posteriormente também controla outras fases de diferenciação da CN, em melanócitos, linhagens sensoriais, autonômicas e gliais (BRONNER; LE DOUARIN, 2012; ROGERS et al., 2012). As células da CN geram diversos tipos celulares durante o desenvolvimento dos vertebrados incluindo as células dos ossos, tendões, além de neurônios, células da glia, melanócitos, odontoblastos, entre outros (CRANE; TRAINOR, 2006). Por isso, são consideradas de alta plasticidade, indicando que contenham progenitores celulares, com grande poder de diferenciação. Também é de conhecimento que as células da CN podem conter células-tronco (CT), progenitoras de distintos tipos celulares, já que vários de seus derivados podem novamente se diferenciar em outros tipos celulares, ocorrendo assim desvio do estado da célula já diferenciado para um alternativo (ANDERSON, 1989; TRENTIN et al., 2004; DUPIN; CALLONI; LE DOUARIN, 2010; DUPIN; SOMMER, 2012).

Sabe-se que o Sox-10 é expresso somente em células da CN em processo migratório e em células diferenciadas do sistema nervoso; frente ao exposto, levantou-se a hipótese de que o Sox-10 e outros marcadores de CN, como o HNK-1, estariam presentes durante a osteogênese dos maxilares e odontogênese em células já diferenciadas.

Dentro deste contexto, é objetivo deste estudo avaliar a distribuição do marcador de células-tronco mesenquimais (CTM) com potencial osteoblástico (Osterix) e de progenitores da CN (HNK-1 e SOX-10) durante a odontogênese e a osteogênese dos maxilares.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Questões éticas

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do NIH, e os protocolos foram aprovados pelo Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Santa Catarina. No presente estudo, a distribuição de Osterix, HNK-1 e Sox-10 foi analisada durante o desenvolvimento dos dentes e osteogênese dos maxilares por imuno-histoquímica, desde a fase fetal (15 e 17 dias) e de ratos nascidos (2, 4 e 7 dias).

### Coleta e processamento das amostras de animais em desenvolvimento

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar, fetos de 15 e 17 dias (F15 e F17) e ratos de 2, 4 e 7 dias de nascidos (D2, D4 e D7). Os mesmos foram obtidos a partir do acompanhamento do acasalamento entre macho e fêmea. O dia “zero” da gravidez foi considerado o dia seguinte ao acasalamento, sendo verificado a presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. Chegado ao momento necessário para a coleta dos animais, as fêmeas foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina 5% e xilazina 2% (0,3ml/100g) e os fetos coletados. Os animais foram eutanaziados por decaptação. O número de amostras foi de pelo menos três animais (fetos e nascidos) por período avaliado. Durante o protocolo, os animais foram mantidos no biotério setorial, sob condições normais de ambientação e alimentação.

As amostras foram fixadas com Metacarn por 1 a 4 horas (de acordo com o período de desenvolvimento) a 4°C. Na presença de tecido calcificado, as amostras sofreram hidratação com seqüências decrescentes de álcool e foram descalcificadas utilizando EDTA 4,13% pH 7,2, durante 4 a 14 dias, sob agitação e com trocas da solução de EDTA a cada 2 dias. Após o período de descalcificação, as amostras

foram desidratadas, com seqüência crescente de álcool e seguiu-se o processamento.

Na seqüência do processamento do material foram realizadas três passagens em etanol absoluto (I, II e III) por 30 minutos/cada, e 3 banhos de xilol (I, II e III) por 30 minutos/cada, seguindo-se a infiltração em Paraplast® a 60°C, sendo esta em 3 passagens de 30 minutos, e posterior inclusão. Cortes sagitais seriados de 5µm foram obtidos em micrótomo Spencer 820 e navalha descartável Leica 818.

### Reação imuno-histoquímica

Os anticorpos policlonais contra Osterix foram obtidos a partir de Abcam® (Cambridge, Cambridge, Reino Unido), Sox-10 a partir de Chemicon (Temecula, CA, EUA) e HNK-1 por Developmental Studies Hybridoma Bank (Universidade de Iowa, Iowa, EUA). Já o anticorpo secundário conjugado com biotina foi obtido a partir Dako (DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA).

Primeiramente os cortes foram desparafinados e, então, tratados com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / metanol 6% durante 15 minutos, seguido de 0,1 M tampão de fosfato, pH 7,4 (PBS) e água destilada durante 5 minutos cada. O bloqueio dos sítios de ligações não específicas foi realizado ao longo de 50 minutos com leite desnatado 5%. A incubação com os anticorpos primários (Osterix diluído 1: 150 / Sox-10 diluído 1: 200 / HNK-1 não-diluída) foi realizada durante 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após lavagem com PBS, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado durante 30 minutos, seguido por incubação com o complexo streptavidina-biotina-peroxidase (DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA) durante 30 minutos à temperatura ambiente. A detecção da cor foi conseguida usando DAB (DAB + Substrato Cromógena System®, DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA) como substrato. As amostras foram desidratadas e montadas em Entellan (Merck, Darmstadt, GER). Os controles negativos foram incubados na ausência de anticorpo primário.

### Análise da imuno-histoquímica

A fim de avaliar a intensidade da imunomarcagem de Osterix, HNK-1 e Sox-10 durante a odontogênese e osteogênese dos maxilares, a intensidade da coloração foi categorizada como: sem marcação, leve, moderada ou intensa, de acordo com a permeação da substância

cromógena. As lâminas foram observadas em microscópio Olympus® BX41, e as imagens foram capturadas com uma câmera de 3.3 Mpixel (Q-imaging) e captura Q Pro software 5.1 (Q-imaging). Apenas alguns ajustes de brilho foram elaborados com o Adobe Photoshop®, o que não afetou a interpretação dos resultados.

## RESULTADOS

Neste estudo foi analisada a expressão de marcadores das células da CN indiferenciadas (HNK-1 e Sox-10) e do marcador proteico característico de progenitores celulares com potencial osteoblástico (Osterix) por imuno-histoquímica em cortes histológicos em maxilares de embriões de ratos de 15 e 17 dias e animais com 2, 4 e 7 dias de nascimento, procurando se observar, principalmente, a formação óssea, processo de fusão do palato secundário e desenvolvimento dentário.

### **Análise da expressão dos anticorpos no processo de odontogênese**

Os resultados das análises das marcações para Osterix, HNK-1 e Sox-10 durante a Odontogênese encontram-se resumidos na tabela 1.

Em F15 nota-se leve marcação para Osterix nas células epiteliais do germe dentário, sendo esta mais notada na região basal. As células da papila condensada ao redor do germe dentário apresentam leve positividade, já as células ectomesenquimais mais afastadas apresentam uma marcação mais intensa (Figura 7A). Foi observado no F17, a expressão de Osterix tanto nas células do epitélio do germe dentário quanto nas células da papila, sendo mais evidente no epitélio interno do órgão do esmalte e na papila adjacente ao epitélio interno (Figura 7B). A análise dos nascidos de dois e quatro dias (D2 e D4) demonstrou marcação evidente para Osterix nas células da polpa dental, além do polo distal de ameloblastos e odontoblastos (Figura 7C e D).

A expressão de HNK-1 no F15 evidenciou-se leve nas células epiteliais do germe dentário. Também foi encontrado leve positividade nas células da papila condensada ao redor do germe dentário. Esse padrão de expressão também foi encontrado no F17 (Figura 7E e F). Na idade de D2 e D4, da mesma forma, notou-se marcação evidente no polo

proximal de ameloblastos e odontoblastos e, também, nas células da polpa dental também foi percebida (Figura 7G e H).

Em F15, foi observada uma marcação difusa para Sox-10 nas células epiteliais do germe dentário. Encontrou-se positividade nas células da papila condensada ao redor do germe dentário (Figura 5I). A mesma expressão de marcação foi observada em F17 (Figura 5J). Analisando D2 e D4 notou-se marcação evidente apenas em ameloblastos e odontoblastos, no polo distal (Figura 5K e L).

### **Análise da expressão dos anticorpos Osterix, HNK-1, Sox-10 no processo de formação da cripta óssea**

Os resultados das análises das marcações para Osterix, HNK-1 e Sox-10 durante a formação da cripta óssea encontram-se resumidos na tabela 2.

Na idade de F15 encontrou-se intensa expressão do marcador Osterix nas células ectomesenquimais indiferenciadas adjacentes à cartilagem de Meckel, sendo o mesmo padrão de marcação mantido no F17. Já nos nascidos D2 e D4 foi notado marcação positiva em osteoblastos e osteócitos, além de algumas células ectomesenquimais indiferenciadas (Figura 6A-D).

Nas análises para expressão de HNK-1 nos fetos F15 e F17, encontrou-se moderada marcação nas células ectomesenquimais indiferenciadas adjacentes à cartilagem de Meckel. Em D2 foi observada expressão em Osteoblastos e algumas células ectomesenquimais indiferenciadas com marcação positiva. A mesma marcação foi encontrada em D4 (Figura 6E-H).

Ao observar-se a marcação do Sox-10 no F15 e no F17 ressaltou-se marcação moderada nas células ectomesenquimais indiferenciadas adjacentes à cartilagem de Meckel. Na idade D2 foi vista expressão positiva do marcador em osteoblastos e osteócitos, já em D4 houve marcação apenas em osteócitos (Figura 6I-L).

### **Análise da expressão dos anticorpos Osterix, HNK-1, Sox-10 no processo de formação do palato secundário**

Os resultados das análises das marcações para Osterix, HNK-1 e Sox-10 durante o processo de ossificação do palato secundário encontram-se resumidos na tabela 3.

A análise para Osterix em D2 mostrou osteoblastos e osteócitos jovens com marcação positiva. Também foi visto leve marcação nas células ectomesenquimais indiferenciadas do centro de ossificação. Em D4 foi observada marcação positiva em osteoblastos e osteócitos jovens. As células ectomesenquimais indiferenciadas do centro de ossificação adjacentes ao osso em formação também foram encontradas com marcação positiva. A expressão do marcador em D7 continuou com o padrão de marcação em osteoblastos e osteócitos. Algumas células ectomesenquimais indiferenciadas adjacentes ao osso neoformado apresentaram marcação (Figura 7A-C).

Foi observado nas idade D2 e D4 marcação para HNK-1 em osteoblastos, osteócitos jovens e nas células ectomesenquimais indiferenciadas do centro de ossificação. Na idade D7 a marcação dessas mesmas estruturas se intensifica (Figura 6D-F).

A expressão de Sox-10 foi notada positiva em osteoblastos e osteócitos jovens tanto em D2 e D4. Já em D7 essa marcação se torna mais leve (Figura 6G-I).

Dessa forma, foi visto que a expressão do marcador HNK-1 apresenta-se nas células ectomesenquimais indiferenciadas e nas células já diferenciadas. Por outro lado a expressão de Sox-10 é encontrada em células já diferenciadas e somente em células indiferenciadas em estágios iniciais da formação.

## DISCUSSÃO

As células da crista neural contribuem de forma significativa para a formação de estruturas da maxila e mandíbula durante o desenvolvimento embrionário. Para que isso ocorra, primeiramente, as células derivadas da CN migram para a região fronto-nasal e primeiro arco faríngeo formando a maior parte do mesênquima para então, mais tarde, se localizarem sob a ectoderme oral (NICHOLS, 1981; CHAI et al., 2000). A partir desse momento, por meio de interações epitélio-mesenquimais, passam a constituir o ectomesênquima da face e do pescoço, e, como todo o restante da CN, originam também parte do

sistema nervoso periférico, células pigmentares e parte do sistema endócrino (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; HELMS; SCHNEIDER, 2003; BRONNER; LE DOUARIN, 2012).

Além disso, o fato das células da CN originarem inúmeros tipos celulares tem direcionado a ideia de que estas células têm propriedades de células tronco (TRENTIN et al., 2004). Interessante também é o fato de que células tronco derivadas da crista neural possam ser encontradas em tecidos adultos (ZUK et al., 2001; COVAS et al., 2003; MIURA et al., 2003; SEO et al., 2004; FERNANDES; TOMA; MILLER, 2008; SHAKHOVA; SOMMER, 2010; CAVALLO et al., 2011) sugerindo que estas células permanecem quiescentes por longos períodos ou mantêm sua capacidade de auto-renovação *in situ* (BRONNER; LE DOUARIN, 2012). Desta forma, neste presente estudo foi investigada a presença de progenitores de células da CN (HNK-1, Sox-10) e de progenitores indiferenciados com potencial osteoblásticos (Osterix) na odontogênese e na osteogênese dos maxilares durante o desenvolvimento facial de ratos.

O Osterix / SP7 é uma proteína com domínio dedo de zinco que pertence à Sp / KLF ( Krüppel Like Factor) da família de fatores de transcrição (BOUWMAN; PHILIPSEN, 2002). O Osterix é essencial para a transformação de precursores bipotentes mesenquimais nas linhagens condrocítica ou osteoblástica, dessa forma pode-se dizer que exerce papel fundamental na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (CHENG et al., 2003). Como esperado, a marcação de Osterix foi encontrada em células ectomesenquimais indiferenciadas adjacentes à cartilagem de Meckel na formação da mandíbula e em células ectomesenquimais indiferenciadas do centro de ossificação do palato secundário, corroborando o estudo de Nakashima e colaboradores (2003) que encontraram expressão do Osterix em células mesenquimais de futuras membranas ósseas em embriões de quatorze dias. O Osterix é, também, um fator de transcrição necessário no processo de formação e mineralização óssea (NAKASHIMA et al., 2002), já que regula a expressão de importantes genes presentes na diferenciação óssea como a sialoproteína, osteopontina, osteocalcina e colágeno tipo I (TAI et al., 2004; MARIE, 2008; SINHA; ZHOU, 2013). Assim como este estudo, Nakashima e colaboradores (2003) demonstraram expressão aumentada deste marcador em trabéculas ósseas neoformadas e centro de ossificação secundária, sugerindo seu envolvimento na diferenciação de osteoblastos em estágios iniciais e avançados de osteogênese.

No que diz respeito à odontogênese, houve positividade para Osterix nas células da papila condensada ao redor do germe dentário,

intensificando-se nas células da papila dental adjacente ao epitélio interno na fase anterior à diferenciação celular, em odontoblastos, bem como células ectomesenquimais mais afastadas do germe dentário (folículo dental), marcação também encontrada por Chen e colaboradores (2009) e Yang e colaboradores (2014). Esta marcação foi também encontrada nas células epiteliais do germe dentário, tornando-se mais intensa no epitélio interno do órgão do esmalte e permanecendo em ameloblastos, resultado partilhado por Chen e colaboradores (2009). Desta forma, é possível que Osterix desempenhe um papel importante na iniciação e manutenção da diferenciação destas células (CHEN et al., 2009).

Como marcadores de células da CN indiferenciadas foram analisados o HNK-1 e Sox-10. O antígeno HNK-1 (*human natural killer 1*) é conhecido como uma porção de carboidratos ligados a várias moléculas que fazem adesão e reconhecimento celular (NORDLANDER, 1993). O anticorpo anti-HNK1, específico para marcação deste carboidrato, foi desenvolvido para reconhecimento da célula de defesa *human natural killer*. Sua expressão, primeiramente foi observada em neurônios maduros, células da glia, e células de Schwann e em uma subpopulação de leucócitos. Posteriormente, foi visto que são expressas, também, em células da CN durante os estágios iniciais de migração. Entretanto, após o processo migratório de diferenciação dessas células sua expressão não é mais observada (VINCENT; THIERY, 1984; BRONNER-FRASER, 1986; LUIDER et al., 1992; NORDLANDER, 1993).

No presente estudo para o marcador HNK-1, foi encontrada marcação nas fases embrionárias do desenvolvimento ósseo: nas células ectomesenquimais indiferenciadas adjacentes à cartilagem de Meckel e adjacentes ao centro de ossificação do palato secundário. Ainda na fase embrionária foi observada leve marcação em fases iniciais do desenvolvimento dentário, nas células epiteliais do germe dentário e nas células da papila condensada ao redor do germe dentário. Obtendo um padrão de marcação em células que mais posteriormente irão secretar algum tipo de matriz.

Após o nascimento, foi notado marcação evidente em odontoblastos. Na cripta óssea e no processo de ossificação do palato secundário, houve expressão do HNK-1 em osteoblastos e, também, em osteócitos. Esses resultados mostram marcação positiva para células que irão secretar ou secretam matriz. Luider e colaboradores (1992) demonstraram que, após a migração das células da CN, o HNK-1 não é mais expresso, sem haver comprovação de que este seja essencial para a

manutenção das células da CN nos tecidos já diferenciados (VINCENT; THIERY, 1984; BRONNER-FRASER, 1986). Desta forma, os resultados encontrados neste estudo mostram um padrão não descrito na literatura, sugerindo que as células da CN possam ter migrado, auxiliado na formação das estruturas ectomesenquimais da face, como osso e tecidos dentais, e seus marcadores mantêm-se presentes durante o processo de secreção da matriz, quando a célula já se apresenta diferenciada, demonstrando uma possível participação na manutenção do estágio diferenciado celular.

Já o Sox-10 (Sry-related HMG-BOX gene 10) é um gene que codifica uma família de fatores de transcrição expressos em células da CN em processo migratório e também em seus derivados já diferenciados, como em células gliais do sistema nervoso periférico. O Sox-10 pode regular o destino das células da CN em migração de acordo com estímulos extracelulares específicos, e também desencadear a diferenciação dessas células, sendo essencial para o desenvolvimento embrionário (DUTTON et al., 2001; KIPANYULA et al., 2014). Além disso, Sox-10 é fundamental para manter as células da CN em estágios indiferenciados; recentemente, Kim e colaboradores (2014) obtiveram células progenitoras de CN a partir de fibroblastos humanos reprogramados para a expressão de Sox-10 (KIM et al., 2014).

Neste trabalho, para Sox-10 observou-se expressão moderada em células ectomesenquimais indiferenciadas nas fases iniciais de desenvolvimento, onde ainda não há presença de células diferenciadas. Em estágios mais tardios de desenvolvimento, foi encontrada marcação positiva apenas em células já diferenciadas como nos osteoblastos e osteócitos da cripta óssea, no centro de ossificação do palato secundário e em odontoblastos. Cabe aqui ressaltar que pouco tempo depois do início da migração, as células da CN, que formarão o mesênquima da face, deixam de expressar Sox-10, ficando este restrito às células que formarão os gânglios nervosos (SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008). Sendo assim, a expressão positiva desse marcador não é comum em células pós-migratórias ou já diferenciadas, como demonstrado neste estudo. Da mesma forma, Lau, Hari e French (2015) encontraram expressão de SOX-10 em células ganglionares diferenciadas do tumor paraganglioma gangliocítico, que normalmente só é encontrado em fases mais precoces de diferenciação, corroborando os resultados encontrados neste estudo. Pode-se dizer que a positividade encontrada nas células indiferenciadas neste estudo se dá por esse fator de transcrição ser fundamental para a sobrevivência das células da CN, manutenção da sua potencialidade e também regulação da diferenciação

dessas células, estando relacionado com a manutenção do estado indiferenciado de progenitores celulares com características da CN (KIM et al., 2003; SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008; KIPANYULA et al., 2014). E, ao que parece, as células já comprometidas em formar tecido mineralizado estão recapitulando a expressão de Sox-10 ao tornarem-se diferenciadas.

Neste estudo, tanto HNK-1 quanto Sox-10 foram encontrados em células indiferenciadas no processo inicial de formação óssea e odontogênese, mas também em células já diferenciadas como odontoblastos, osteoblastos e osteócitos. Embora o Sox-10 e o HNK-1 sejam conhecidos como marcadores de células da CN em fase migratória (DUTTON et al., 2001; NORDLANDER, 1993), esses achados indicam sobreposição e coerência na distribuição destes marcadores, uma vez que os dois foram encontrados nas células diferenciadas estudadas, apresentando um dado novo no que diz respeito à distribuição tardia destes marcadores.

Por fim, interessante observar a marcação encontrada para os ameloblastos: positiva para Osterix, HNK-1 e Sox-10. A presença de Osterix em ameloblastos foi relatada anteriormente, mostrando um possível papel deste no processo de iniciação e manutenção do estado diferenciado desta célula (CHEN et al., 2009). Por outro lado, a presença de HNK-1 e Sox-10 pode ser um resultado surpreendente, já que os ameloblastos são derivados do ectoderma oral e não a partir de células da CN. Entretanto, deve-se recapitular que durante a formação de gânglios como o trigêmeo, algumas células da ectoderme adjacente despreendem-se e migram em direção ao gânglio em desenvolvimento, passando a formar neurônios e células de Schwann, ou seja, eram células da ectoderme que passaram a expressar marcadores de CN (Sox-10) para poder formar derivados neurais (STEVENTON; MAYOR; STREIT, 2014; TRAINOR, 2014). Da mesma forma os ameloblastos possuem origem na ectoderme oral, ou seja, possivelmente, mesmo não tendo origem da crista neural, ao comprometerem-se com fenótipos que produzirão tecido mineral, assim como odontoblastos e osteoblastos, passam a expressar marcadores de CN, como HNK-1 e Sox-10.

Sendo assim, este estudo demonstra que HNK-1 está presente em células indiferenciadas ao longo do processo de desenvolvimento, Sox-10 em células indiferenciadas em estágios iniciais de desenvolvimento, e ambas estão presentes em células já diferenciadas em início do processo de secreção de matriz. Possivelmente HNK-1 e Sox-10 participam do processo de diferenciação e da manutenção destas células durante este processo de secreção de matriz.

## CONCLUSÕES

Este estudo mostra a presença de Osterix e HNK-1 em células indiferenciadas ao longo dos períodos analisados; Sox-10 em células indiferenciadas nas fases iniciais da osteogênese dos maxilares e odontogênese; e Osterix, HNK-1 e Sox-10 em células diferenciadas no início do processo de secreção de matriz na osteogênese dos maxilares e odontogênese. É possível que Osterix, HNK-1 e Sox-10 estão relacionados ao processo de diferenciação celular e na manutenção dos odontoblastos, ameloblastos e osteoblastos durante o processo de secreção de matriz.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D.J. The neural crest Cell lineage problem: Neurogenesis? **Neuron**, v.3, p. 1-12, 1989.
- BAEK, J. A.; LAN, Y.; LIU, H.; MALTBY, K. M.; MISHINA, Y.; JIANG, R. 2011. Bmpr1a signaling plays critical roles in palatal shelf growth and palatal bone formation. **Dev Biol**, v. 350, p 520-531, 2011.
- BERNICK, S.; PATEK, P. Q. Postnatal development of the rat mandible. **J Dent Res**, v.48, p. 1258–1263, 1969.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n.4, p. 313-319, 2008.
- BOUWMAN, P.; PHILIPSEN, S. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. **Mol Cell Endocrinol**, v.195, p. 27–38, 2002.
- BRONNER-FRASER, M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. **Dev Biol**, v. 115, p. 44-55, 1986.
- BRONNER, M. E.; LE DOUARIN, N. M. Evolution and development of the Neural crest: An overview. **Dev Biol**, v. 366, n. 1, p. 2-9, 2012.

BUSH, J. O.; JIANG, R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. **Development**, v. 139, p. 231-243, 2012.

CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic and osteogenic differentiation capacities. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, p. 8947-8952, 2009.

CAVALLO, C. et al. Comparison of alternative mesenchymal stem cell sources for cell banking and musculoskeletal advanced therapies. **Journal of cellular biochemistry**, v. 112, n. 5, p. 1418-1430, 2011.

CHAI et al. Fate of mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. **Development**, v.127, p. 1671-1679, 2000.'

CHEN, S. et al. Runx2, osx, and dspp in tooth development. **J Dent Res**, v.88, p. 904–909, 2009.

CHENG, S.L. et al. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. **J Biol Chem**, v.278, p.45969–45977, 2003.

COVAS, D. T. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Braz J Med Biol Res**, v.36, p.1179-1183, 2003.

CRANE, J. F.; TRAINOR, P. A. Neural Crest Stem and Progenitor Cells. **Rev Cell Dev Biol**, v. 22, p. 267-286, 2006.

DUPIN, E.; CALLONI, G.; REAL, C.; GONÇALVES-TRENTIN, A.; LE DOUARIN, N.M. Neural crest progenitors and stem cells. **C R Biol**, v. 330, p.521-529, 2007

DUPIN, E.; CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M. The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities. **Cell cycle**, v. 9, n. 2, p. 238-249, jan. 2010.

DUPIN, E.; SOMMER, L. Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. **Dev Biol**, v. 366, n. 1, p. 83-95, jun. 2012.

DUTTON, K.A.; et al. Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. **Development**, v. 128, p. 4113-4125, 2001.

FERNANDES, K. J; TOMA, J. G.; MILLER, F. D. Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 363, p. 185-198, 2008.

HALL, B. K.; MIYAKE, T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. **Int J Dev Biol**, v. 39, p. 881-893, 1995.

HELMS, J.A.; SCHNEIDER, R.A. Cranial skeletal biology. **Nature**, v. 423, p. 326-331, 2003.

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**, v. 176, p. 151-165, 1996.

JERNVALL, J.; THERLEFF, I. Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. **Development**, v. 139, p. 3487-3497, 2012.

KIM, Y. J.; et al. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. **Neuron**, v. 38, n. 1, p. 17-31, 2003.

KIM, Y. J.; et al. Generation of Multipotent Induced Neural Crest by Direct Reprogramming of Human Postnatal Fibroblasts with a Single Transcription Factor. **Cell Stem Cell**, v.15, n.4, p. 497-506, 2014.

KIPANYULA, M.J.; et al. Signaling pathways bridging fate determination of neural crest cells to glial lineages in the developing peripheral nervous system. **Cellular Signalling**, v. 26, p.673–682, 2014.

LE DOUARIN, N. M.; KALCHEIM, C. **The Neural Crest**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. p. 34-35

LAU, N.; HARI, D.; FRENCH, S. SOX10 expression in a gangliocytic paraganglioma: A case report. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 98, p. 99-101, 2015.

LUIDER, T. M.; PETERS-VAN DER SANDEN, M.J.H.; MOLENAAR, J.C.; TIBBOEL, D.; VAN DER KAMP, A.W.M.; MEIJERS, C. Characterization of HNK-1 antigens during the formation of the avian enteric nervous system. **Development**, v. 115, p. 561-572, 1992.

MARIE, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, p. 98–105, 2008.

MEIRELLES, L. da S.; NARDI, N. B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Frontier in bioscience**, v. 14, n. 7, p. 4281-4298, 2009.

MIURA, M. et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 5807-5812, 2003.

NAKASHIMA, K. et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, v. 108, p.117–129, 2002.

NAKASHIMA, K.; CROMBRUGGHE B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. **Trends Genet** v. 19, p. 458–466, 2003.

NANCI, A. **Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function**. Elsevier: St. Louis, Missouri, 2012.

NICHOLS, D. H. Neural crest formation in the head of the mouse embryo as observed using a new histological technique. **J. Embryol Exp. Morph.**, v. 64, p.105-120, 1981.

NODEN, D.M. The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissues. **Dev Biol**, v.67, p. 296-312, 1978.

NORDLANDER, R. H. Cellular and subcellular distribution of HNK-1 immunoreactivity in the neural tube of *Xenopus*. **The Journal of comparative neurology**, v. 335, n. 4, p. 538-51, set. 1993.

PITTENGER, M. F., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. **Science**, v.284, p.143–147, 1999.

RICKMANN, M.; FAWCETT, J. W.; KEYNES, R. J. The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. **J. Embryol Exp Morphol**, v. 90, p. 437-455, 1985.

ROGERS, C.D.J.C.S.; NIE, S.; BRONNER, M.E. Neural crest specification: tissues, signals, and transcription factors. **WIRES Dev Biol**, v. 1, p. 52–68, 2012.

SAUKA-SPENGLER, T.; BRONNER-FRASER, M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 7, p. 557-68, jul. 2008.

SEO, B. M., et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v.364, p.149-155, 2004.

SERBEDZIJA, G. N.; BRONNER-FRASER, M.; FRASER, S. E. Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. **Development**, v. 116, p. 297-307, 1992.

SHAKHOVA, O; SOMMER, L. **StemBook 2008-2010. Neural crest-derived stem cells**. Harvard Stem Cell Institute: Cambridge, 2010.

SINHA, K. M.; ZHOU, X. Genetic and Molecular Control of Osterix in Skeletal Formation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.114, p. 975–984, 2013.

SOM, P.M., NAIDICH, T.P. Illustrated Review of the Embryology and Development of the Facial Region, Part 2: Late Development of the Fetal Face and Changes in the Face from the Newborn to Adulthood. **R Am J Neuroradiol**, v. 35, p.10–18, jan 2014.

STEVENTON, B.; MAYOR, R.; STREIT, A. Neural crest and placode interaction during the development of the cranial sensory system. **Dev Biol**, v.389, p.28–38, 2014.

TAI, G. et al. Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix. **Tissue Eng** v.10, p.1456–1466, 2004.

TYLER, M. S.; HALL, B.K. Epithelial influences on skeletogenesis in the mandible of the embryonic chick. **Anat Rec**, v. 188, p. 229-239, 1977.

THESLEFF, I. Genetic basis of tooth development and dental defects. **Acta Odontol Scand**, v.58, p.191-194, 2000.

THESLEFF, I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. **J Cell Sci**, v. 116, p. 1647-1648, 2003.

THOMSON, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147,1998.

TRAINOR, P. **Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease**. 1.ed. San Diego: Elsevier, 2014. p. 488.

TRENTIN, A G; GLAVIEUX-PARDANAUD, C; LE DOUARIN, N M; DUPIN, E. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. **PNAS**, v. 101, n. 13, p. 4495-4500, 2004.

VINCENT, M., and THIERY, J. P. A cell surface marker for neural crest and placodal cells: Further evolution of the peripheral and central nervous system. **Dev. Biol** v.103, p.468-481, 1984.

YANG et al. The Effects of Osterix on the Proliferation and Odontoblastic Differentiation of Human Dental Papilla Cells. **J Endod** v.40, n.11, Nov. 2014

ZOU, L. et al. Molecular mechanism of osteochondroprogenitor fate determination during bone formation. **Adv Exp Med Biol**, v. 585, p. 431–441, 2006.

ZUK, P. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

**Tabela 1: Intensidade de marcação na odontogênese.**

	Localização	Osterix	HNK-1	Sox-10	
Odontogênese	F15	Epitélio do germe	+/-	+/-	+
		C. Papila	+/-	+/-	+
	F17	Epitélio do germe	+	+/-	+
		C. Papila	+	+/-	+
		C. Polpa dental	+	+	-
	D2	Odontoblasto	++	++	++
		Ameloblasto	++	++	++
		C. Polpa dental	+	+	-
	D4	Odontoblasto	++	++	++
		Ameloblasto	++	++	++

Sem marcação (-); Leve (+/-); Moderado (+); Intenso (++). Célula da Papila (C. Papila).

**Tabela 2: Intensidade de marcação na formação da cripta óssea.**

	Localização	Osterix	HNK-1	Sox-10	
Cripta Óssea	F15	C.E. Indiferenciada	++	+	+
	F17	C.E. Indiferenciada	++	+	+
	D2	C.E. Indiferenciada	+	+	-
		Osteoblastos	+	+	+
		Osteócitos	+	+	+
	D4	C.E. Indiferenciada	+	+	-
		Osteoblastos	+	+	+
		Osteócitos	+	+	-

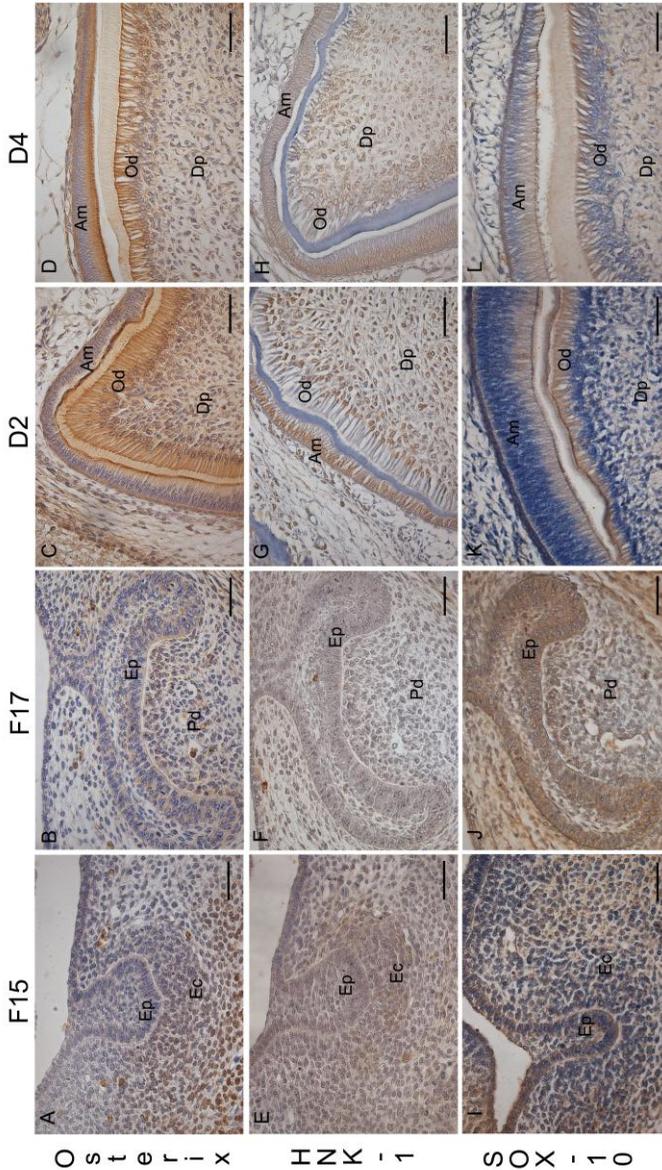
Sem marcação (-); Leve (+/-); Moderado (+); Intenso (++). Célula Ectomesenquimal indiferenciada (C.E. Indiferenciada).

**Tabela 3: Intensidade de marcação na formação do palato secundário.**

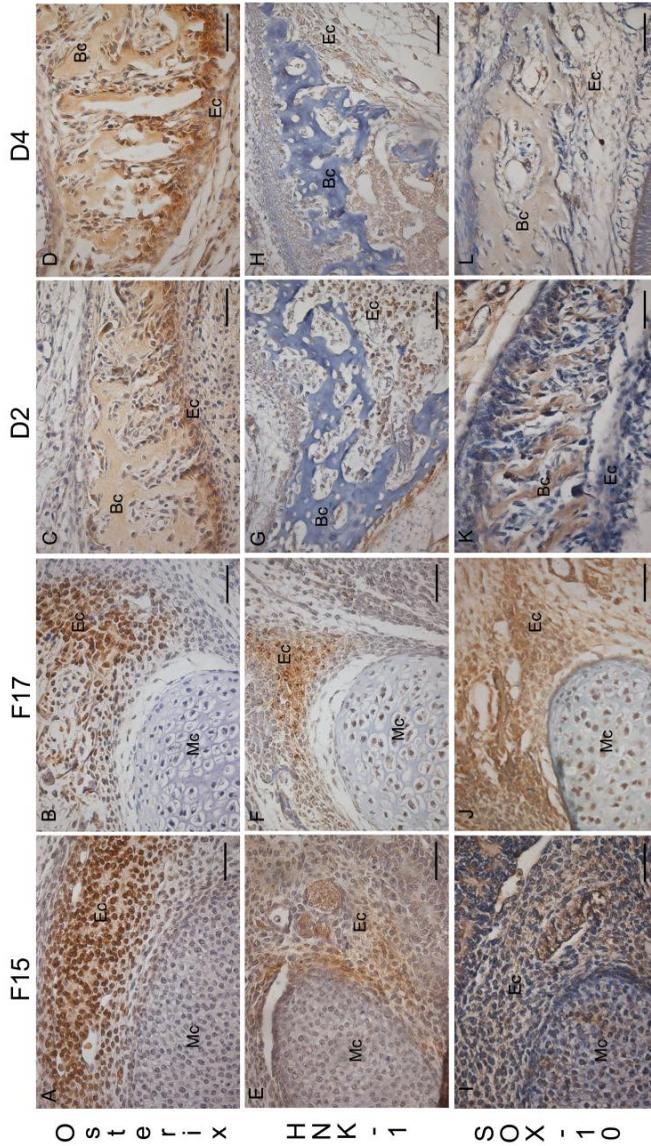
	Localização	Osterix	HNK-1	Sox-10	
Palato 2°	D2	C.E. Indiferenciada	+/-	+	-
		Osteoblastos	+	+	+
		Osteócitos	+	+	+
	D4	C.E. Indiferenciada	+	+	-
		Osteoblastos	+	+	+
		Osteócitos	+	+	+
	D7	C.E. Indiferenciada	+	++	-
		Osteoblastos	+	++	+/-
		Osteócitos	+	++	+/-

Sem marcação (-); Leve (+/-); Moderado (+); Intenso (++). Célula Ectomesenquimal indiferenciada (C.E. Indiferenciada)

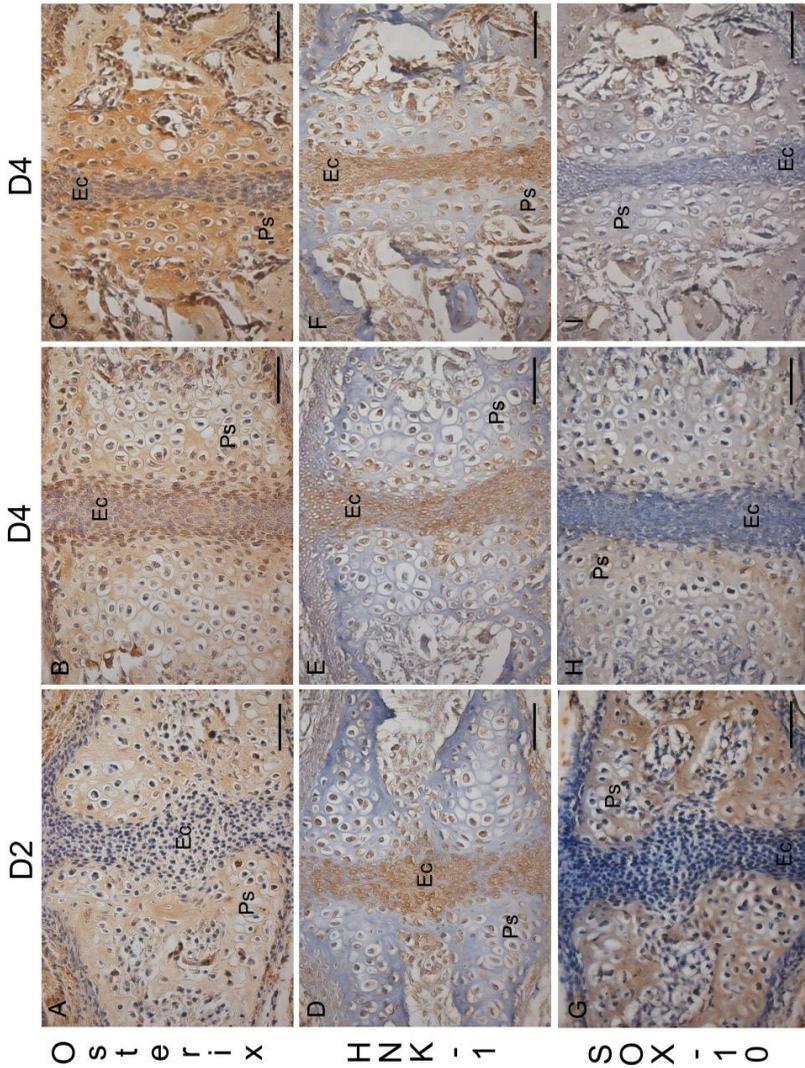
**Figura 7: Reação de imunohistoquímica para Osterix, HNK-1 e Sox-10 durante a Odontogênese.** Positividade da imunohistoquímica em marrom; contra-coloração com hematoxilina. (Ep) Epitélio; (Ec) Células Ectomesenquimais; (Ie) Epitélio Interno; (Dp) Papila dental; (Am) Ameloblastos; (Od) Odontoblastos; (Dp) Polpa Dental. Barras A-L: 50um.



**Figura 8: Reação de imunohistoquímica para Osterix, HNK-1 e Sox-10 durante a formação da cripta óssea.** Positividade da imunohistoquímica em marrom; contra-coloração com hematoxilina. (Mc) Cartilagem de Meckel; (Ec) Células ectomesenquimais; (Bc) Cripta óssea; Barras A-L: 50um.



**Figura 9: Reação de imunohistoquímica para Osterix, HNK-1 e Sox-10 durante a ossificação do palato secundário.** Positividade da imunohistoquímica em marrom; contra-coloração com hematoxilina. (Ps) Palato secundário; (Ec) Células ectomesenquimais. Bars A-I: 50um.



## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D.J. The neural crest Cell lineage problem: Neurogenesis? *Neuron*, v.3, p. 1-12, 1989.
- BARBOZA, C. A. G. Atlas de embriologia. Rio Grande do Norte: UFRN, 2010. Disponível em: <http://http://embriologiaufrn.webnode.com.br/o-desenvolvimento-humano->
- BAEK, J. A.; LAN, Y.; LIU, H.; MALTBY, K. M.; MISHINA, Y.; JIANG, R. 2011. Bmpr1a signaling plays critical roles in palatal shelf growth and palatal bone formation. *Dev Biol*, v. 350, p 520-531, 2011.
- BATH-BALOGH, M.; FEHRENBACH, M. J. Anatomia, Histologia e Embriologia dos Dentes e Estruturas Orofaciais. 3. ed. São Paulo: Elsevier Ltd, 2012. p. 98-132
- BERNICK, S.; PATEK, P. Q. Postnatal development of the rat mandible. *J Dent Res*, v.48, p. 1258–1263, 1969.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*, v. 2, n.4, p. 313-319, 2008.
- BIZ, M. T. Distribuição, expressão e papel das GTPases, RhoA e Rac1 nas fases iniciais do desenvolvimento do germe dentário e na diferenciação de ameloblastos e odontoblastos. 2007. 119 (doutorado). *Biologia Celular e do Desenvolvimento*, Universidade de São Paulo
- BOUWMAN, P.; PHILIPSEN, S. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol*, v.195, p. 27–38, 2002.
- BRONNER-FRASER, M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev Biol*, v. 115, p. 44-55, 1986.
- BRONNER, M.E.; LE DOUARIN, N.M. Development and evolution of the neural crest: an overview. *Dev Biol*, v. 366, p. 2-9, 2012.

BUSH, J. O.; JIANG, R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development*, v. 139, p. 231-243, 2012.

CALLONI, G. W; LE DOUARIN, N. M; DUPIN E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic and osteogenic differentiation capacities. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, p. 8947-8952, 2009.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991

CAVALLO, C. et al. Comparison of alternative mesenchymal stem cell sources for cell banking and musculoskeletal advanced therapies. *Journal of cellular biochemistry*, v. 112, n. 5, p. 1418-1430, 2011

CHAI, Y. et al. Fate of mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, v.127, p. 1671-1679, 2000.'

CHEN, S., et al. Runx2, osx, and dspp in tooth development. *J Dent Res*, v.88, p. 904–909, 2009.

CHENG, S.L. et al. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem*, v.278, p.45969–45977, 2003.

COSTA-SILVA, B. et al: Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. *Exp Cell Res*, v.315, n.6, p.955-67, abr. 2009.

COVAS, D. T. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res*, v.36, p.1179-1183, 2003.

CRANE J. F; TRAINOR P. A. Neural Crest Stem and Progenitor Cells. *Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 22, p. 267-286, 2006.

CREUZET, S.; COULY, G.; LE DOUARIN, N. M. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. *Journal of anatomy*, v. 207, n. 5, p. 447-59, nov. 2005.

DELFINO-MACHÍN, M. et al. The Proliferating Field of Neural Crest Stem Cells. *Developmental Dynamics*, v.236, p. 3242–3254, 2007.

DUARTE, B. D. P. Avaliação do ligamento periodontal e da polpa dental como nicho de células tronco derivada da Crista Neural. 2013. (mestrado). *Biologia Celular e do Desenvolvimento*, Universidade Federal de Santa Catarina

DUPIN, E.; CALLONI, G.; REAL, C.; GONÇALVES-TRENTIN, A.; LE DOUARIN, N.M. Neural crest progenitors and stem cells. *C R Biol*, v. 330, p.521-529, 2007

DUPIN, E.; CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M. The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities. *Cell cycle*, Georgetown, v. 9, n. 2, p. 238-49, 15 jan. 2010.

DUPIN, E.; SOMMER, L. Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Developmental biology*, v. 366, n. 1, p. 83-95, 1 jun. 2012.

DUTTON, K.A.; et al. Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Development*, v. 128, p. 4113-4125, 2001.

ETCHEVERS, H. C.; VINCENT, C.; LE DOUARIN, N. M.; COULY, G. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development*, v.128, p. 1059-1068, 2001.

FERNANDES, K. J. et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat. Cell Biol.*, v. 6, p. 1082-1093, 2004.

FERNANDES, K. J; TOMA, J. G.; MILLER, F. D. Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 363, p. 185-198, 2008.

FERRARIS, M. E. G. DE; MUÑOZ, A. C. *Histologia e embriologia bucodental*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 33-67

- GARCEZ, R. C.; TEIXEIRA, B. L.; SCHMITT, S. S.; ALVAREZSILVA, M.; TRENTIN, A. G. Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v.29, p.1087 – 1091, 2009.
- GAMMILL, L.S.; BRONNER-FRASER, M. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature Reviews Neuroscience*, v.4, p.795-805, 2003.
- GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.*, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.
- HALL, B. K.; MIYAKE, T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol*, v. 39, p. 881-893, 1995.
- HARRIS, M. L.; ERICKSON, C. A. Lineage specification in neural crest cell pathfinding. *Developmental Dynamics*, v. 236, n. 1, p. 1-19, 2007.
- HELMS, J.A.; SCHNEIDER, R.A. Cranial skeletal biology. *Nature*, v. 423, p. 326-331, 2003.
- HIATT, J.L.; GARTNER, L.P. *Anatomia cabeça & pescoço*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- 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*, v. 176, p. 151-165, 1996.
- JERNVALL, J.; THERLEFF, I. Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development*, v. 139, p. 3487–3497, 2012
- KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. *Histologia e embriologia oral*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 3-18

KIM, J. et al. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron*, v. 38, n. 1, p. 17-31, 2003.

KIM, Y. J.; et al. Generation of Multipotent Induced Neural Crest by Direct Reprogramming of Human Postnatal Fibroblasts with a Single Transcription Factor. *Cell Stem Cell*, v.15, n.4, p. 497-506, 2014.

KIPANYULA, M.J.; et al. Signaling pathways bridging fate determination of neural crest cells to glial lineages in the developing peripheral nervous system. *Cellular Signalling*, v. 26, p.673–682, 2014.

KRUGER, G.M. et al. Neural crest stemcells persist in the adult gut but undergo changes in self renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*, v. 35, p. 657–669, 2002.

KULESA, P. M.; FRASER, S. E. In ovo time-lapse analysis of chick hindbrain neural crest cell migration shows cell interactions during migration to thebranchial arches. *Development*, v. 127, p. 1161-1172, 2000.

LE DOUARIN, N. M.; KALCHEIM, C. *The Neural Crest*. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. p. 34-35

LE LIEVRE; LE DOUARIN, N. M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos . *Embryol. exp. Morph.* v. 34, n.1, p. 125-154, 1975.

LAU, N.; HARI, D.; FRENCH, S. SOX10 expression in a gangliocytic paraganglioma: A case report. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 98, p. 99-101, 2015.

LI, H. Y.; SAY, E. H.; ZHOU, X. F. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root Ganglia. *Stem Cells*, v. 25, p. 2053-2065, 2007.

LUIDER, T. M.; PETERS-VAN DER SANDEN, M.J.H.; MOLENAAR, J.C.; TIBBOEL, D.; VAN DER KAMP, A.W.M.; MEIJERS, C. Characterization of HNK-1 antigens during the formation of the avian enteric nervous system. *Development*, v. 115, p. 561-572, 1992.

MACHADO, A. *Neuroanatomia Funcional*. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993. p. 32-35

MARIE, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*, v. 473, p. 98–105, 2008.

MEIRELLES, L. da S.; NARDI, N. B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontier in bioscience*, v. 14, n. 7, p. 4281-4298, 2009.

MIURA, M. et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, p. 5807-5812, 2003.

MIYAGAWA-TOMITA, S. et al. Temporospacial study of the migration and distribution of cardiac neural crest in quail-chick chimeras. *Am. J. Anat.*, v. 192, p. 79-88, 1991.

MILETICH, I.; SHARPE, P. T. Neural Crest Contribution to Mammalian Tooth Formation. *Birth Defects Research*, v.72, p. 200–212, 2004.

NAKASHIMA, K. et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, v. 108, p.117–129, 2002.

NAKASHIMA, K.; CROMBRUGGHE B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet* v. 19, p. 458–466, 2003.

NANCI, A. *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. Elsevier: St. Louis, Missouri, 2012.

NICHOLS, D. H. Neural crest formation in the head of the mouse embryo as observed using a new histological technique. *J. Embryol Exp. Morph.*, v. 64, p.105-120, 1981.

NODEN, D.M. The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissues. *Dev Biol*, v.67, p. 296-312, 1978.

NORDLANDER, R. H. Cellular and subcellular distribution of HNK-1 immunoreactivity in the neural tube of *Xenopus*. *The Journal of comparative neurology*, v. 335, n. 4, p. 538-51, 22 set. 1993.

PITTENGER, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. *Science*, v.284, p.143–147, 1999.

PROCKOP, D. J.; GREGORY, C. A; SPEES, J. L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n.1, p. 11917-11923, 30 set. 2003.

RICKMANN, M.; FAWCETT, J. W.; KEYNES, R. J. The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *J. Embryol Exp Morphol*, v. 90, p. 437-455, 1985.

ROGERS, C.D.J.C.S.; NIE, S.; BRONNER, M.E. Neural crest specification: tissues, signals, and transcription factors. *WIRES Dev Biol*, v. 1, p. 52–68, 2012.

SAUKA-SPENGLER, T.; BRONNER-FRASER, M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 9, n. 7, p. 557-68, jul. 2008.

SEO, B. M., et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, v.364, p.149-155, 2004.

SERBEDZIJA, G. N.; BRONNER-FRASER, M.; FRASER, S. E. Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development*, v. 116, p. 297-307, 1992.

SHAKHOVA, O; SOMMER, L. *StemBook 2008-2010*. Neural crest-derived stem cells. Harvard Stem Cell Institute: Cambridge, 2010.

SINHA, K. M.; ZHOU, X. Genetic and Molecular Control of Osterix in Skeletal Formation. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.114, p. 975–984, 2013.

SOM, P.M.; NAIDICH, T.P. *Illustrated Review of the Embryology and Development of the Facial Region, Part 2: Late Development of the*

Fetal Face and Changes in the Face from the Newborn to Adulthood. R Am J Neuroradiol, v. 35, p.10–18, jan 2014.

STEVENTON, B.; MAYOR, R.; STREIT, A. Neural crest and placode interaction during the development of the cranial sensory system. Dev Biol, v.389, p.28–38, 2014.

TAI, G. et al. Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix. Tissue Eng v.10, p.1456–66, 2004.

TYLER, M. S.; HALL, B.K. Epithelial influences on skeletogenesis in the mandible of the embryonic chick. Anat Rec, v. 188, p. 229-239, 1977.

THESLEFF, I. Genetic basis of tooth development and dental defects. Acta Odontol Scand, v.58, p.191-194, 2000.

THESLEFF, I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. J Cell Sci, v. 116, p. 1647-1648, 2003.

THOMSON, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. Science, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147,1998.

TRAINOR, P. Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease. 1.ed. San Diego: Elsevier, 2014. p. 488.

TRENTIN, A G; GLAVIEUX-PARDANAUD, C; LE DOUARIN, N M; DUPIN, E. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. PNAS, v. 101, n. 13, p. 4495-4500, 2004.

VINCENT, M.;THIERY, J. P. A cell surface marker for neural crest and placodal cells: Further evolution of the peripheral and central nervous system. Dev. Biol v.103, p.468-481, 1984.

YANG, G. et al. The Effects of Osterix on the Proliferation and Odontoblastic Differentiation of Human Dental Papilla Cells. J Endod v.40, n.11, nov. 2014

YOUNG, H. E. et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *The Anatomical record*, v. 264, n. 1, p. 51-62, 2001.

ZOU, L. et al. Molecular mechanism of osteochondroprogenitor fate determination during bone formation. *Adv Exp Med Biol*, v. 585, p. 431–441, 2006.

ZUK, P. A; ZHU, M.; MIZUNO, H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.



## **APÊNDICE A- Metodologia expandida**

### **Questões éticas**

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA/UFSC) Ofício nº 041/CEUA/PROPESQ/2013.

### **Coleta das amostras de animais em desenvolvimento**

Para a análise da osteogênese e odontogênese foram utilizados ratos Wistar - fetos de 15 e 17 dias (F) e ratos nascidos de 2, 4 e 7 dias (D). Para tanto, foi realizado o acasalamento entre macho e fêmea, sendo o dia “zero” gestacional, considerado o dia seguinte ao acasalamento, quando verificado a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal.

Chegado o momento necessário para a coleta, as ratas mães foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina 5% e xilazina 2% (0,3ml/100g) e os fetos removidos por acesso abdominal. Imediatamente após a remoção dos fetos, as ratas mães e os fetos foram sacrificados por decaptação.

Os ratos nascidos foram sacrificados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina 5% e xilazina 2% (0,3ml/100g), seguido de decaptação.

### **Coleta e processamento das amostras**

As amostras coletadas foram fixadas em Methacarn por 1 a 4 horas a 4°C e submetidas a desmineralização com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 10% por três meses, com troca da solução realizada duas vezes por semana.

Após a desmineralização, as amostras foram submetidas ao aparelho histotécnico, para a substituição da água dos tecidos por parafina, através da desidratação em álcool etílico de concentrações crescentes, começando com álcool a 70% e terminando em álcool absoluto, com duração de aproximadamente oito horas. O material processado foi incluído em blocos de parafina para obtenção de cortes de 3µm espessura, os quais foram estendido em lâminas de vidro limpas e desengorduradas, previamente tratadas com poli-L-lysine 0,1% (Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA) e então utilizados para marcação imuno-histoquímica.

## Reação de imuno-histoquímica

Foi realizada reação imuno-histoquímica utilizando-se o método estreptavidina-biotina-peroxidase para avaliação dos antígenos Osterix (marcador de progenitor de células tronco), Sox-10 e HNK-1 (marcadores de progenitores de células da crista neural). Para todos os anticorpos foram utilizados controles positivos internos (Quadro 1). O controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

O início do processamento deu-se pela desparafinização e reidratação dos cortes com uma sequência de dois banhos de xilol (I e II) por vinte minutos/cada, etanol absoluto (I), etanol absoluto (II), etanol 95%, etanol 85% por 5 minutos/cada e banho em água destilada por cinco minutos.

Para o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em câmara escura com dois banhos em solução de peróxido de hidrogênio 6% por quinze minutos, seguido de um banho com tampão fosfato 0.1M pH 7.4 (PBS) e então de água destilada por cinco minutos/cada.

O bloqueio dos sítios inespecíficos ocorreu por meio de incubação com solução de leite desnatado 5% em PBS por cinquenta minutos, seguido de dois banhos em tampão PBS por cinco minutos/cada. A seguir os cortes foram incubados com anticorpos primários (**Quadro 1**) por 18 horas a 4°C.

Após o período de incubação, os cortes foram submetidos a dois banho em tampão PBS por cinco minutos/cada e então incubados com o anticorpo secundário anti-IgG biotinado (DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA), por trinta minutos. Posteriormente, foi realizada a incubação do complexo streptavidina-biotina-peroxidase durante quarenta minutos. A revelação da reação ocorreu com o cromógeno diaminobenzidina (DAB+Substrate Chromogen System®, DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA), por dois minutos. Após lavagem em água destilada, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris por dois minutos e então lavados em água corrente. Em seguida, removou-se o pigmento formólico por meio de rápida imersão em solução aquosa de hidróxido de amônia 1% e, imediatamente, lavados em água corrente.

A desidratação e a diafanização foram realizadas por uma sequência crescente e banhos de etanol (85%, 95%, absoluto I,II,III) por cinco minutos cada e xilol I e II, por vinte minutos cada. Por fim, as lâminas foram montadas utilizando-se Entellan (Merck, Alemanha).

**Quadro 1 – Anticorpos primários utilizados**

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>	<b>Controle positivo</b>
Osterix	Policlonal	Abcam®	1:150	Osso
HNK-1	Monoclonal	Developmental Studies Hybridoma Bank	S/diluição	Encéfalo
SOX-10	Policlonal	Chemicon	1:200	Encéfalo

**Análise da imuno-histoquímica**

A análise das reações imuno-histoquímicas foi realizada através do microscópio Olympus® Bx41 e as imagens foram capturadas através de uma câmera 3.3 mpxel (Q-imaging) e Q-capture Pro 5.1 software (Q-imaging). As figuras foram preparadas com Adobe Photoshop® para pequenos ajustes de brilho, os quais não afetam a interpretação dos resultados.

A fim de avaliar a intensidade de marcação imuno-histoquímica para os anticorpos Osterix, HNK-1 e Sox-10 durante a odontogênese e osteogênese dos maxilares, a intensidade de coloração foi categorizada como: sem marcação, leve, moderada ou intensa marcação, de acordo com a permeação da substância cromógena a qual é caracterizada pela coloração castanha das células. As células que apresentaram coloração roxa foram consideradas negativas para a marcação.



## ANEXO A – Relatório de aprovação do CEUA

### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**  
 PRO0548  
**Título**  
 METODOLOGIAS UTILIZADAS PELO GRUPO DE PESQUISA HISTOPATOLOGIA DA REGENERAÇÃO TECIDUAL  
**Data de Entrada**  
 19/04/2013

**Resultado :**  
 Aprovado  
**Data/Prazo**  
 01/11/2013

**Considerações**  
 Ofício nº 114/CEUA/PROPEQ/2013  
 Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA  
 Ao(à): Prof(a) Dr(a) Michelle Tillmann Biz, Departamento de Ciências Morfológicas – CCB

Prezado(a) Professor(a),  
 Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO a inclusão de procedimento conforme solicitação anexa.

Adita-se o Ofício nº 041/CEUA/PROPEQ/2013  
 Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA  
 Ao(à): Prof(a) Dr(a) Michelle Tillmann Biz, Departamento de Ciências Morfológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),  
 Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de quinhentos ratos (Rattus Norvegicus).

- Procedência do animal: Biotério Central - UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**  
**Data 12/06/2017**

Data 05/11/2013

**Parceiro (a):**



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC**  
**PRESIDENTE**