

JOSÉ PAULO DE PIZZOL JÚNIOR

**PARTICIPAÇÃO DA METALOPROTEINASE DA MATRIZ-1
(MMP-1) E DA FOSFATASE ÁCIDA NA DEGRADAÇÃO DA VIA
ERUPTIVA EM MOLARES DE RATOS**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências**

São Paulo

2015

JOSÉ PAULO DE PIZZOL JÚNIOR

**PARTICIPAÇÃO DA METALOPROTEINASE DA MATRIZ-1
(MMP-1) E DA FOSFATASE ÁCIDA NA DEGRADAÇÃO DA VIA
ERUPTIVA EM MOLARES DE RATOS**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

**Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Estela Sasso
Cerri**

São Paulo

2015

Pizzol-Jr, José Paulo

Participação da metaloproteinase da matriz-1 (mmp-1) e da fosfatase ácida na degradação da via eruptiva em molares de ratos/ José Paulo de Pizzol Júnior. —São Paulo, 2015.

v, 65f

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.

Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em
Biologia Estrutural e Funcional.

Título em inglês: Involvement of matrix metalloproteinase-1 (MMP -1) and acid phosphatase in the degradation of the eruptive pathway in rat molars

1. Erupção dentária 2. Tecido conjuntivo 3. Metaloproteinase da matriz

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E
FUNCIONAL

Chefe do departamento: Sima Godosevicius
Coordenador do curso de pós-graduação: Sítia Iole Nogueira
Belangero

JOSÉ PAULO DE PIZZOL JÚNIOR

**PARTICIPAÇÃO DA METALOPROTEINASE DA MATRIZ-1
(MMP-1) E DA FOSFATASE ÁCIDA NA DEGRADAÇÃO DA VIA
ERUPTIVA EM MOLARES DE RATOS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

Profª Drª Marta Maria Antoniazzi

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez

Profª Drª Ticiania Sidorenko de Oliveira Capote

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri por ter confiado em mim na realização deste trabalho, e principalmente por ter servido como exemplo profissional. Agradeço por ter me dado a oportunidade desde a graduação de aprender a cada dia o caminho da ciência;

Agradeço a Prof. Dra. Estela Sasso Cerri pela coorientação durante toda minha graduação e pós-graduação, e pela assistência em todas as etapas da minha formação

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco A Ossamu Tanaka da ESALQ-USP por ter me auxiliado na microscopia eletrônica de transmissão;

Agradeço aos meus pais Marli T. Libardi de Pizzol e José Paulo de Pizzol e minha irmã Patrícia Libardi de Pizzol, pois sem eles nenhuma realização minha seria possível.

Agradeço a Prof^a. Dr^a.. Eleny Roslindo, ao Prof. Dr. Breno Caneguim, a Dr^a. Flávia Beltrame, Dr. Guilherme Ferreira, ao doutorando Tiago Fonseca, a mestre Priscila Aparecida e Juliana Damieli e a aluna de iniciação científica Talita Bonato pelo apoio e ajuda que prestaram durante toda minha pós-graduação.

Agradeço aos técnicos do laboratório, Luiz Potenza e Pedro Simões pela ajuda e disposição.

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro dado durante minha pós-graduação.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro dado ao laboratório, de fundamental importância à realização desta pesquisa.

Agradeço aos meus amigos Bruna Maitan, Jessica Hayakawa, Conrado Nogueira, Diego Bussanelli Jaquelyne Versiani e Fernando Vazquez.

Quero agradecer também aos amigos da República Diretoria, Vitor Racca, Leonardo Albino, Pedro Otani, Lucca Gurgel, Matheus Shiota, Michel Marques, Felipe Hugo, Allan Botinhon, Gustavo Annichino, Denis Cavacic, Bruno Schmittel, David Costa e ao Bife.

Sumário

AGRADECIMENTOS	PAG. vi
RESUMO	PÁG. viii
1. INTRODUÇÃO	PÁG. 1
2. REVISÃO DE LITERATURA	PÁG. 3
1.1 Erupção dentária	PAG. 3
1.2 Estabelecimento da via eruptiva	PAG. 4
1.3 Remodelação da lâmina própria	PAG. 6
3. PROPOSIÇÃO	PÁG. 12
4. MÉTODOS	PAG. 13
4.1 Procedimentos com animais	PAG. 13
4.2 Forma de análise dos resultados	PAG. 13
4.2.1 Microscopia de luz	PAG. 13
4.2.2 Análise ao microscópio de polarização	PAG. 13
4.2.3 Método Imuno-histoquímico para detecção de MMP-1	PAG. 15
4.2.4 Densidade numérica de células imunopositivas à MMP-1	PAG. 16
4.2.5 Método imuno-histoquímico para detecção da fosfatase ácida (ACP2)	PAG. 16
4.2.6 Método imuno-fluorescente para detecção da fosfatase ácida (ACP2)	PAG. 17
4.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão	PAG. 17
4.2.8 Método histoquímico – identificação de fosfatase ácida em MET	PAG. 18
5. RESULTADOS	PÁG. 20
6. DISCUSSÃO	PÁG. 39
7 CONCLUSÕES	PÁG. 44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	PÁG. 45
9. APÊNDICE	PÁG. 55
9.1 Comitê de Ética em Pesquisa	PAG. 55
9.2 Abstract	PAG. 56

Resumo

A erupção dentária é o fenômeno de movimentação do germe dentário de sua posição intraóssea inicial, à posição de oclusão na cavidade oral. Neste processo, é necessário que os tecidos situados na via eruptiva, como o tecido conjuntivo da lâmina própria, sofram remodelação. A degradação do colágeno, principal componente da matriz extracelular (MEC) da lâmina própria, ocorre por metaloproteinases da matriz (MMPs), sendo a MMP-1 uma enzima fundamental. Assim, componentes da matriz extracelular bem como corpos apoptóticos devem ser internalizados pelos macrófagos e digeridos pela ação de enzimas lisossomais, tais como a fosfatase ácida (ACP). O objetivo deste trabalho foi estudar a participação da MMP-1 e da ACP na degradação da MEC da lâmina própria situada na via eruptiva. Fragmentos de maxila contendo o 1º molar de ratos com 9, 11, 13 e 16 dias de idade foram fixados e incluídos em parafina (n=20) e araldite (n=20). Após a fixação, alguns fragmentos foram previamente incubados com β -glicerofosfato para detecção ultraestrutural da ACP. Os cortes corados com picrossirius foram usados para análise do conteúdo de colágeno birrefringente na lâmina própria. A imunoexpressão de MMP-1, ACP bem como a densidade numérica de células MMP-1-positivas foram analisadas. A análise estatística foi realizada com o OneWay ANOVA e teste de Tukey ($p \leq 0.05$). Os cortes ultrafinos foram analisados ao microscópio eletrônico de transmissão (MET). Os germes dentários dos ratos com 9 e 11 dias estavam na fase eruptiva intraóssea enquanto os germes dos ratos de 13 e 16 dias estavam na fase de penetração na mucosa. Intensa imunoexpressão de MMP-1 e ACP foi verificada na lâmina própria da mucosa oral dos ratos de 13 e 16 dias. Além disso, o número de células MMP-1 positivas foi significativamente maior nestes períodos. Por outro lado, o conteúdo de colágeno birrefringente diminuiu significativamente aos 13 e 16 dias em comparação aos 9 e 11 dias. A ACP foi observada nos lisossomos e vacúolos de fibroblastos e macrófagos em todos os períodos, embora tenham sido mais frequentes nos períodos de 13 e 16 dias. Os resultados indicam que a MMP-1 e a fosfatase ácida participam da degradação dos componentes da matriz extracelular da lâmina própria, incluindo o colágeno, durante o processo eruptivo.

1-Introdução

A erupção dentária é o fenômeno de movimentação do germe dentário de sua posição intraóssea inicial, à posição de oclusão na cavidade oral (Marks et al. 1995). Em virtude do processo eruptivo, deve ser formada a via eruptiva, isto é, o “caminho” no qual o germe dentário deve percorrer de sua posição intraóssea inicial à posição final na cavidade oral, resultando na degradação e remodelação dos tecidos situados na via eruptiva (Cerri et al., 2010). Há evidências de que a formação da via eruptiva ocorre independente da estrutura dental, contudo é essencial que o folículo dentário permaneça intacto, sugerindo desse modo um papel fundamental do folículo dentário na erupção dentária (Marks, Cahill, 1984; Larson et al., 1994). Sabe-se que as células do folículo dentário secretam moléculas tais como Fator de Crescimento de Colônias-1 (CSF-1) e o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) que estimulam a osteoclastogênese e, portanto, exercem um importante papel na remodelação óssea, necessária para a erupção dentária (Wise et al., 2005). Assim como a reabsorção óssea é necessária, principalmente na porção oclusal da cripta óssea, a degradação da lâmina própria também deve ocorrer, principalmente, na fase eruptiva de penetração na mucosa (Cerri et al., 2010).

A lâmina própria, um tecido conjuntivo frouxo interposto ao epitélio oral e o tecido ósseo que recobre a porção oclusal do germe dentário, contém uma matriz extracelular com colágeno tipo I e III, além de componentes da substância fundamental amorfa. Os fibroblastos e macrófagos são as células mais frequentes da lâmina própria, embora células mesenquimais indiferenciadas e mastócitos estejam também presentes (Squier, Kremer, 2001; Cerri et al., 2010; Marynka-Kalmani et al., 2010). Durante o processo eruptivo os componentes da matriz extracelular da via eruptiva devem ser degradados, em especial na fase de penetração na mucosa. Tem sido demonstrado que as metaloproteinases da matriz (MMPs) participam na degradação e na remodelação dos componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo (Mauch, 1998; Vu, Werb, 2000; Duarte et al., 2015).

Metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de enzimas endopeptidases zinco-dependentes com especificidade ao substrato, responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular, dentre eles o colágeno (Nagase et al., 2006). Estas enzimas atuam na regulação da remodelação da matriz extracelular,

assim como na regulação da interação célula-célula e célula-matriz (Murphy, Nagase, 2008). Dentre a família de MMPs, a MMP-9 destaca-se por ser responsável pela clivagem do colágeno tipo IV, sendo, portanto, importante no processo de remodelação da membrana basal, assim como participa da degradação do colágeno tipo I previamente clivado, e componentes da substância fundamental amorfa (Cerri et al., 2010; Łukaszewicz-Zajac et al., 2014). Em nosso laboratório demonstramos a presença de metaloproteinase-9 (MMP-9), na via eruptiva da lâmina própria, bem como uma possível correlação entre o aumento significativo de mastócitos com o aumento de osteoclastos na superfície óssea durante a fase eruptiva intraóssea (Cerri et al., 2010). Além da MMP-9, a MMP-1 é uma metaloproteinase responsável pela degradação dos colágenos tipo I, II e III (Vincenti et al., 1996) e apresenta uma participação em diversos processos fisiológicos e patológicos que envolvem a degradação e/ou a remodelação do tecido conjuntivo. Considerando que estes tipos de colágenos estão presentes na lâmina própria, a MMP-1 deve ter uma participação na degradação da lâmina própria durante a formação da via eruptiva.

As MMPs possuem ação na matriz extracelular, contudo, é provável que alguns componentes parcialmente degradados sejam internalizados por fagócitos, e degradados por enzimas lisossomais. Dentre estas enzimas, a fosfatase ácida é uma enzima hidrolítica responsável pela catalisação da reação de hidrólise de ésteres fosfóricos, resultando na liberação de fosfato inorgânico (Suter et al., 2001). Assim, a fosfatase ácida exerce um papel importante em tecidos em formação (Bailey et al, 2014) bem como em processos de involução tecidual (Katz, 2005), participando na degradação de componentes internalizados.

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações estruturais na matriz colágena, bem como investigar a participação das enzimas MMP-1 e fosfatase ácida no processo de degradação da lâmina própria da via eruptiva.

2- Revisão de Literatura

2.1 Erupção dentária

A erupção dentária é o fenômeno de movimentação do germe dentário desde seu local de formação até sua posição final de oclusão (Marks, Schroeder, 1996; Kjær, 2014).

O germe dentário forma-se a partir da interação ectoderma/ectomesênquima; células da camada basal do epitélio oral proliferam e mergulham no ectomesênquima subjacente determinando a formação da banda epitelial primária. A proliferação celular coordenada nesta banda epitelial primária leva a formação de duas lâminas: a lâmina vestibular e a lâmina dentária. A partir da proliferação da extremidade da lâmina dentária em sítios específicos, promove a formação do germe dentário. Dessa maneira, o germe dentário inicia o seu desenvolvimento e crescimento no interior dos ossos maxilares (Ten Cate, 2008).

O germe dentário, logo após o início da formação da raiz, inicia o movimento axial, com a face oclusal voltada para o plano oclusal. Para atingir sua posição final de oclusão é necessária a formação da via eruptiva, isto é, o “caminho” que o germe dentário faz até o plano de oclusão. Portanto, é fundamental que ocorra a remodelação do tecido ósseo que circunda o germe dentário (Wise, 2009; Cerri et al., 2010; Wise et al., 2011). Há evidências que apontam o folículo dentário como sendo uma estrutura fundamental para a remodelação tecidual e consequente formação da via eruptiva (Cahil, Marks, 1980). Células do folículo dentário sintetizam e secretam moléculas quimiotáticas para células mononucleadas precursoras de osteoclastos, sugerindo que o folículo dentário deve ter um papel importante no processo eruptivo (Wise et al., 2005).

Considerando que o germe dentário inicia o seu desenvolvimento no interior de uma cripta óssea, o movimento eruptivo que permite que o dente alcance o plano oclusal seja dividido em diferentes fases: fase eruptiva intraóssea, fase eruptiva de penetração na mucosa e fase pré-oclusal (Katchburian, Arana, 2012). Na fase intraóssea, o germe dentário localizado dentro da cripta óssea, inicia o movimento em direção ao plano oclusal. Nessa fase ocorre a reabsorção e formação seletiva das paredes da cripta óssea; evidente processo de reabsorção é observado na porção oclusal da cripta óssea (Cerri et al., 2010; Kactburian, Arana, 2012).

O folículo dentário sofre alterações estruturais, tornando-se mais denso, e há um aumento em quantidade e espessura de colágeno (Marks, Schroeder, 1996; Katchburian, Arana, 2012). Ocorre concomitantemente um aumento na expressão de moléculas quimiotáticas para células precursoras de osteoclastos, bem como a remodelação do tecido ósseo adjacente ao germe dentário (Wise et al., 2005).

Ao atingir a altura da crista alveolar inicia-se a fase de penetração na mucosa. Nesta etapa, há um aumento na velocidade da erupção. O epitélio reduzido do órgão do esmalte se funde com o epitélio oral, dessa forma a lâmina própria não é exposta na cavidade oral. A coroa do dente então é exposta e a erupção continua até a atingir o plano oclusal. O dente em atividade funcional sofre pequenos movimentos, constituindo a fase pós-oclusal (Marks, Schroeder, 1996; Katchburian, Arana, 2012). A erupção é, assim, um processo ativo e dinâmico, que envolve diversas vias de sinalização, sendo, portanto, um bom modelo de estudo para a remodelação tecidual.

2.2 Estabelecimento da via eruptiva

O germe dentário em erupção deve ultrapassar o tecido ósseo e a mucosa oral para atingir sua posição na cavidade bucal (Cahill, Marks, 1980; Kjær, 2014). Sendo assim, é necessária a degradação e remodelação desses tecidos situados na trajetória percorrida pelo dente em erupção, ou seja, na via eruptiva (Cerri et al., 2010).

A reabsorção do tecido ósseo é realizada por células denominadas osteoclastos, que são células gigantes multinucleadas, de origem hematopoiética. Estas células apresentam grande quantidade de lisossomos e elevada presença de fosfatase ácida tartarato-resistente (Roodman, 1996; Horowitz et al., 2001). A formação e maturação dos osteoclastos, a osteoclastogênese, depende do complexo RANK/RANKL/OPG. O RANK (Receptor Ativador do Fator Kappa B) é um receptor de superfície expresso em células precursoras de osteoclastos enquanto que o RANKL (Ligante do Receptor Ativador do Fator Kappa B) é o ligante da proteína RANK, expresso em pré-osteoblastos (Pérez-Sayáns et al., 2010; Martin, 2013). A ligação RANKL ao RANK promove a fusão e dos precursores de osteoclastos e diferenciação destas células em osteoclastos (Teitelbaum, 2007). A OPG é uma glicoproteína, pertencente à superfamília do Fator de Necrose Tumoral

(TNF), que atua como reguladora da osteoclastogênese. A ligação da OPG (Osteoprotegerina) ao RANKL impede a ligação de RANK com RANKL e, dessa forma, impossibilita a osteoclastogênese (Khosla, 2001). A osteoclastogênese depende da migração de células da linhagem monocítica precursoras da medula óssea para a região aonde ocorrerá a reabsorção óssea (Robling et al., 2006). A osteoclastogênese é de fundamental importância à erupção dentária. O folículo dentário parece exercer um papel importante nesta sinalização desde que sintetiza proteínas que induzem a migração dos precursores mononucleados de osteoclastos, dentre elas a proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) e o fator estimulador de colônias-1 (CSF-1) (Que, Wise, 1997). Além disso, há evidências de que a administração do bisfosfonato alendronato de sódio, fármaco que inibe a reabsorção de tecidos mineralizados, durante o período eruptivo, impede a erupção dentária, pois o fármaco age de forma a interferir na ativação de osteoclastos (Bradaschia-Correa et al., 2007).

Considerando que ocorre um significativo aumento de mastócitos na lâmina própria da via eruptiva na fase eruptiva intraóssea, foi sugerido que estas células possam exercer também um papel na formação e migração dos osteoclastos (Cerri et al., 2010). Mastócitos liberam diversos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, incluindo a histamina, citocinas tais como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e várias proteases (Artuc et al., 2002; Naesse et al., 2003). A histamina, produzida e secretada pelos mastócitos, pode estimular a produção de IL-1, IL-6, M-CSF e GM-CSF pelas células hematopoiéticas (Mor et al., 1995) e células mesenquimais (Takamatsu, Nakano, 1998) via receptor H_2 (Vannier, Dinarello, 1994; Jilka, 1998). Estas citocinas estimulam a formação, diferenciação e atividade de osteoclastos (Riggs, 2000; Phan et al., 2004). Portanto, a presença de numerosos mastócitos concomitantemente a fase de intensa reabsorção do osso situado entre o germe dentário em erupção e a mucosa oral da via eruptiva foi interpretado como uma possível participação dos mastócitos no controle da reabsorção óssea (Cerri et al., 2010).

Após a reabsorção óssea, o dente em erupção alcança a mucosa oral e, portanto, um intenso processo de degradação e remodelação da lâmina própria deve ocorrer para permitir o estabelecimento da via eruptiva.

2.3 Remodelação da lâmina própria

A lâmina própria da mucosa oral constitui-se num tecido conjuntivo intensamente vascularizado (Moharamzadeh et al., 2007) o qual contém, predominantemente, fibroblastos; no entanto, macrófagos e mastócitos também estão presentes (Squier, Kremer, 2001; Cerri et al., 2010). A matriz extracelular (MEC) da lâmina própria consiste em uma intrincada rede de macromoléculas, que compreendem as fibras colágenas, principalmente do tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas, que promovem sustentação à arquitetura tecidual e regulam o tráfego molecular do tecido (Katchburian, Arana, 2012; Adair-Kirk, Senior, 2008).

A principal macromolécula da MEC é o colágeno; o colágeno é a proteína mais abundante nos mamíferos, sendo o colágeno tipo I o predominante. A síntese do colágeno ocorre nos fibroblastos que sintetizam a molécula de pró-colágeno que apresenta peptídeos em sua extremidade que impedem a formação de fibras colágenas no meio intracelular. Para ser funcional, o pró-colágeno é secretado para o meio extracelular, aonde se encontra a enzima collagenase. A clivagem da molécula de pró-colágeno resulta na molécula de tropocolágeno. A partir do tropocolágeno é formado o colágeno (Alberts et al., 2010).

A molécula do colágeno consiste em uma estrutura longa e resistente em tripla-hélice. A molécula dispõe-se em espiral, contendo estruturas terciárias e quaternárias distintas. Contém três polipeptídios separados, denominados cadeias- α , que se dispõem torcidas umas sobre as outras, com torção no sentido anti-horário, contrariamente à torção super-helicoidal da molécula. As cadeias- α variam em tamanho de 662 a 3152 amino ácidos (Ricard-Blum, 2011). Existem hoje descritos 28 tipos de colágenos, sendo a cadeia- α a principal diferença entre cada tipo de molécula. Os aminoácidos constituintes do colágeno são, em geral, grande parte compostos por glicina (Gly), seguido por prolina (Pro), 4-hidroxiprolina (4-Hyp) e em menor quantidade por alanina (Ala) (Alberts et al., 2010).

O colágeno é rico em aminoácidos básicos, que por sua vez, interagem com corantes ácidos. Há descrito variadas técnicas para identificação de fibras colágenas, dentre elas tricrômio de Masson e tricrômio de Mallory (Behmer et al., 1976). Um método amplamente utilizado para investigar a organização do colágeno

é o picosirius associado à microscopia de polarização (Junqueira et al., 1979; Matteini et al., 2007; Retamoso et al., 2010).

A microscopia com luz polarizada permite identificar, seletivamente, estruturas anisotrópicas. Estruturas com características anisotrópicas apresentam o fenômeno físico da birrefringência. A birrefringência é a capacidade de um objeto transmitir luz em plano polarizado em diferentes velocidades sob diferentes azimutes. O arranjo molecular paralelo aumenta a birrefringência de uma estrutura. A intensidade é maior em objetos alinhados em ângulo de 45° com o plano polar, em contrapartida, objetos alinhados em paralelo a um plano da polarização aparecem invisíveis sob luz polarizada (Wolman, 1975). Fibras colágenas são longas e apresentam orientação paralela ocorrendo, portanto, naturalmente ocorre o fenômeno da birrefringência (Wolman, 1975; Whittaker et al., 1994).

A técnica picosirius amplifica a birrefringência do colágeno (Junqueira et al., 1979). O corante Sirius Supra Red F3BA, utilizado na técnica, é uma molécula alongada que contém seis grupamentos ácidos sulfônicos, o que confere a molécula afinidade seletiva a estruturas colágenas (Junqueira et al., 1979; Montes, Junqueira, 1991). Os grupamentos exercem forte ligação com a molécula do colágeno devido a esta ser altamente básica. Em pH ácido, o corante interage com o grupamento amino das lisinas e hidroxilisinas, e grupamento guanidina da arginina, ambos componentes da molécula do colágeno.

Colágenos tipos I, II e III purificados têm grande afinidade ao corante Sirius Supra Red F3BA (Junqueira et al., 1979). Devido ao alto coeficiente de extinção da molécula, isto é, a capacidade que um mol da substância apresenta em absorver luz em certo comprimento de onda e a presença de quatro grupamentos azo, isto é, grupamentos formados por uma dupla ligação de nitrogênio (N=N), aonde o deslocamento de elétrons confere cores vívidas, o método Picosirius-polarização possibilita a identificação de pequenas quantidades de colágeno (Lopez-De Leon, Rojkind, 1985; Montes, Junqueira, 1991; Bouas-Laurent, 2003). Alguns autores sugerem que as diferenças na equivalência de cor do colágeno corado pela técnica Picosirius, observados sob luz polarizada, podem ser explicadas pelo grau de organização tridimensional da molécula do colágeno (Lopez-De Leon, Rojkind, 1985). Foi demonstrado que a diferença na cor da birrefringência do colágeno pela

técnica de picosirius não pode ser atribuída ao tipo de colágeno, mas sim à orientação e à densidade das fibras (Piérard, 1989).

Durante o estabelecimento da via eruptiva, diversos componentes da matriz extracelular da lâmina própria, entre eles o colágeno, devem ser, pelo menos parcialmente, degradados. Se o colágeno exerce algum papel no processo eruptivo bem como se sua degradação constitui elemento essencial para a erupção dentária são ainda pontos controversos. Um estudo realizado com perfusão de morruato de sódio, um composto que reduz a maturação de colágeno, sugeriu que a remodelação do colágeno não seria necessária à erupção (Marks et al., 1995). Em contrapartida, animais knockout à Metaloproteinase de Membrana Tipo-1 (MT1-MMP), uma metaloproteinase localizada na superfície celular cuja ação está relacionada à ativação de outra metaloproteinase (metaoproteinase-2), apresentaram inibição na erupção dentária e na formação radicular. Nestes animais, o tecido ósseo na porção oclusal da cripta óssea foi reabsorvido, no entanto não houve erupção, sugerindo-se assim que o colágeno possa exercer resistência física à erupção dentária; além disso, é possível que a remodelação do colágeno do ligamento periodontal deve exercer algum papel no processo eruptivo (Beertsen et al., 2002).

A degradação dos constituintes da matriz extracelular (MEC) é feita por enzimas específicas denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs). As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco mediadoras de eventos catabólicos. São responsáveis pela clivagem de componentes da MEC, sendo, portanto, as principais enzimas envolvidas no processo de remodelação tecidual (Birkedal-Hansen et al., 1993).

As MMPs constituem uma família de cerca de vinte enzimas bioquimicamente distintas. Estas enzimas são sintetizadas na forma inativa de zimogênio, apresentando em seu domínio catalítico um complexo composto por um pró-peptídeo cisteína e um sítio ativo de átomo de zinco. As MMPs podem ser secretadas ou ancoradas à superfície celular (Ra, Parks, 2007). Os mecanismos de ativação das MMPs ainda são incertos, porém, acredita-se que na forma de latência, ou zimogênio, o complexo pró-peptídeo bloqueie o sítio ativo impedindo a água de se ligar ao zinco (Van Wart, Birkedal-Hansen, 1990), uma vez que a água é o ligante universal de todos os sítios catalíticos de zinco (Vallee, Auld, 1990). Para que

as MMPs sejam ativadas é necessário que ocorra a clivagem do pro-peptídeo, fazendo com que o sítio ativo esteja livre para se ligar à água (Van Wart, Birkedal-Hansen, 1990).

Alguns trabalhos mostraram que as MMPs podem atuar sobre outros componentes que não sejam da MEC, como citocinas e quimiocinas (Van Lint, Libert, 2007). As MMPs, portanto, desempenham um papel maior que a simples catálise dos componentes da matriz extracelular. Estas estão envolvidas em processos de regulação da interação celular e interação entre células e os componentes da MEC (Page-McCaw et al., 2007).

A MMP-1 é a collagenase de maior expressão em mamíferos. É codificada na região 11q22 e é expressa por fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, células tumorais, dentre outras células (Brinckerhoff et al., 2000). A MMP-1 está envolvida na degradação de colágeno dos tipos I, II e III. Sendo estes os colágenos mais abundantes, é, portanto, uma enzima crítica para a remodelação tecidual (Vincenti et al., 1996).

Durante a erupção dentária, o tecido conjuntivo da via eruptiva sofre degradação e remodelação; portanto, as MMPs devem ter uma participação importante neste processo. A presença de mRNA de MMP-8 durante a erupção dentária e a formação do periodonto foi demonstrado por meio de RT-PCR, sugerindo a participação desta MMP na formação e remodelação tecidual durante a erupção dentária (Tsubota et al., 2002). Ratos *knockout* para metaloproteinase de membrana tipo-1 (MT1-MMP) revelaram que a MT1-MMP é essencial para a remodelação dos tecidos adjacentes ao germe dentário em erupção, particularmente, o periodonto em desenvolvimento (Beertsen et al., 2002). Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram a presença de MMP-9 (Gelatinase B), metaloproteinase associada à degradação, principalmente de componentes da substância fundamental amorfa, na lâmina própria durante a erupção de molares de ratos; a expressão da MMP-9 foi evidentemente mais acentuada na fase final de penetração da mucosa (Cerri et al., 2010). Considerando que o principal componente da MEC da lâmina própria é o colágeno tipo I, acreditamos que uma análise imuno-histoquímica para verificar a imunoexpressão da MMP-1 na lâmina própria nas diferentes fases eruptivas possa contribuir para o

melhor entendimento do processo de degradação do tecido conjuntivo da via eruptiva.

Durante a remodelação fisiológica dos tecidos conjuntivos, o conteúdo da MEC, incluindo colágeno parcialmente degradado, é fagocitado por células específicas, sendo o macrófago a principal célula a exercer essa função, mas podendo ser também executada por fibroblastos (Everts et al., 1996; Lee et al., 2006). A digestão do conteúdo fagocitado ocorre, principalmente por enzimas, as fosfatases ácidas. As fosfatases são enzimas hidrolíticas responsáveis pela catalisação da reação de hidrólise de ésteres fosfóricos, resultando na liberação de fosfato inorgânico. As fosfatases ácidas são produzidas no retículo endoplasmático rugoso, sendo direcionadas ao complexo de Golgi. Fosfatases, assim como outras enzimas lisossomais, apresentam o resíduo manose-6-fosfato, que são reconhecidos no complexo de Golgi por receptores ao resíduo. Assim, as fosfatases são direcionadas para o interior dos lisossomos, organela que armazena a maior parte do conteúdo de enzimas hidrolíticas no meio intracelular (Braukle, Bonifacino, 2009).

Fosfatases podem ser classificadas como fosfatases alcalinas ou ácidas, devido ao pH ótimo de atuação destas. Fosfatases alcalinas são mais evidentes em células responsáveis pela produção de matriz do tecido, osteoblastos, condrócitos, ameloblastos odontoblastos (Hoshi et al., 1997; Bonucci, Nanci, 2001; Foster et al., 2013). Fosfatases ácidas são expressas em maior quantidade por células fagocitárias, como macrófagos, neutrófilos e osteoclastos (Bull et al., 2002); porém, fibroblastos também podem apresentá-la nos lisossomos (Deporter, Ten Cate, 1973; Katz 2005).

Existem ao menos seis diferentes tipos de fosfatases (ACP1; ACP2; ACP3; ACP4; ACP5 e ACP6 (Moss et al., 1995; Suter et al., 2001). Para a remodelação dos tecidos, destacam-se as fosfatases ACP2 e ACP5 (Suter et al., 2001). A fosfatase ácida lisossomal, ou ACP2, corresponde à fosfatase secretada no interior dos lisossomos. Apresenta duas subunidades, uma α e uma β , e é responsável pela hidrólise dos monoésteres ortofosfóricos em álcool e fosfato. Sua ação exata no tecido não está bem elucidada, porém a deficiência de ACP2 está relacionada a deficiências esqueléticas e acúmulo de substratos nos lisossomos (Saftig et al., 1997) Assim, ACP2 deve desempenhar papel fundamental na dinâmica de tecidos

em formação (Bailey et al., 2014), bem como em tecidos em involução fisiológica (Katz, 2005). A ACP5 é denominada fosfatase ácida tartarato resistente, devido à resistência deste subtipo de fosfatase ao tratamento com tartarato (Baumbach et al., 1991; Kawamura et al., 2014). A ACP5 está presente em osteoclastos, macrófagos ativados e neurônios. O mecanismo de ação exato é incerto, porém animais knockout à ACP5 apresentaram osteopetrose, uma patologia associada à redução na atividade de osteoclastos (Hayman et al., 1996). No tecido ósseo, a fosfatase ácida lisossomal relaciona-se com a fosfatase ácida tartarato resistente, presente em osteoclastos, e essa relação é essencial para o processamento de osteopontina, uma proteína estrutural da matriz extracelular óssea, sendo desse modo uma enzima fundamental para a manutenção da homeostase óssea (Suter et al., 2001). A identificação da fosfatase pode ser realizada em preparos para microscopia eletrônica de transmissão (Barka, 1960; Katz, 2005), fornecendo detalhes em relação a sua localização e distribuição no interior das células e, conseqüentemente, possibilitando uma melhor compreensão do seu papel nos processos de degradação e remodelação dos tecidos (Sheldon et al., 1955; Katz, 2005).

Considerando que a mucosa oral deve sofrer modificações estruturais durante a erupção dentária, foi nosso propósito investigar se ocorrem alterações no colágeno, bem como se a MMP-1 e a fosfatase ácida (ACP2), enzimas responsáveis pela degradação do colágeno extra e intracelular respectivamente, participam do processo de degradação da lâmina própria e, conseqüentemente, do estabelecimento da via eruptiva.

3- Proposição

O objetivo deste estudo foi verificar se ocorrem modificações no conteúdo e na organização estrutural do colágeno e durante o processo de degradação da lâmina própria situada entre o epitélio oral e a porção oclusal do 1º molar superior de ratos, em diferentes fases de erupção. Além disso, foi nosso propósito investigar se a MMP-1 (metaloproteinase da matriz 1) e a fosfatase ácida participam do processo de degradação da lâmina própria e, conseqüentemente, do estabelecimento da via eruptiva. Assim, na lâmina própria da via eruptiva pretendeu-se:

- Analisar se há alterações no conteúdo bem como com o arranjo do colágeno da lâmina própria nas diferentes fases eruptivas
- Investigar a imunoexpressão de MMP-1 nas células da lâmina própria nas diferentes fases da erupção dentária;
- Detectar a enzima fosfatase ácida nas células da via eruptiva e verificar se há uma associação da imunoexpressão desta enzima com as fases eruptivas.

4- Métodos

4.1 Procedimentos com os animais

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (CEUA – Proc. nº 13/2013) e ao CEUA da UNIFESP (Proc nº 608419) que aprovaram a sua execução. Foram utilizados 40 ratos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*) com 09, 11, 13 e 16 dias, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP. Foram utilizados ratos de diferentes idades para investigar as alterações nas diferentes fases da erupção do 1º molar superior, ou seja, o 1º molar dos animais com 09 e 11 dias apresentam-se na fase eruptiva intraóssea enquanto nos animais com 13 e 16 dias estão na fase eruptiva de penetração na mucosa (Cerri et al., 2010).

A eutanásia dos animais foi realizada com *overdose* de Cloridrato de Ketamina (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda. - Brasil) associada a Cloridrato de Xilazina (União Química Farmacêutica Nacional S/A - Brasil). Os animais foram então decapitados e, com auxílio de um microscópio estereoscópio (Wild M7, Wild Heerbrugg – Suíça), as maxilas foram removidas; as hemimaxilas foram separadas e reduzidas, de maneira que os fragmentos da região do rebordo alveolar com os germes dos molares em desenvolvimento foram separados.

4.2 Forma de Análise dos Resultados

4.2.1 Microscopia de Luz

Para análise ao microscópio de luz, foram utilizados, no total, 20 animais (05 animais/idade). As hemimaxilas foram imersas em formaldeído 4% (preparado a partir de paraformaldeído) tamponado com fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante 48 horas. Os fragmentos foram descalcificados, durante 10-21 dias, em EDTA (ácido etileno-diamino tetracético) 7% tamponado com fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2), a temperatura ambiente. Após a lavagem em água corrente durante 4 horas, os fragmentos de maxila foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina.

Com auxílio de um micrótomo (Microm, HM325) foram obtidos cortes sagitais com 6µm de espessura; os cortes foram corados com hematoxilina de Carazzi e eosina (H&E) para seleção da área de interesse, ou seja, a lâmina própria da via eruptiva do 1º molar.

4.2.2 Análise ao microscópio de polarização

Para análise do conteúdo, arranjo e distribuição do colágeno na lâmina própria foi utilizada a técnica picrosirius associado à análise ao microscópio com luz polarizada, preconizada por Junqueira et al. (1985). Para isso foram utilizados no total, 60 cortes corados com picrosirius e analisados ao microscópio de polarização; assim, foram analisados 3 cortes/animal, totalizando 15 cortes/idade.

Os cortes foram desparafinizados e hidratados em séries decrescentes de etanol até água destilada. Os cortes foram imersos em solução de 0,1% de Sirius-Red por 1 hora. Após lavagem, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados para análise em microscopia de polarização.

Os cortes corados com picrosirius foram analisados com os filtros de polarização acoplados ao microscópio de luz Olympus (modelo BX-51). Foi realizada análise semi-quantitativa do colágeno presente na lâmina própria nas diferentes fases eruptivas. Foram utilizados 3 (três) cortes/animal, corados com picrosirius, com intervalo mínimo de 100 μm . Em cada corte, foram mensuradas 03 (três) áreas de aproximadamente 0,09mm², totalizando 0,27 mm² por corte. As frequências de colágeno com birrefringência vermelho/alaranjado (matiz 2-38 e 230-256), amarelo (matiz 39-51) e a verde (matiz 52-128) foram estimadas. Os valores de matiz foram seguidos de acordo com Rich & Whittaker (2005).

Para a medição dos matizes foi utilizado o programa ImageJ[®] (NIH). Foi padronizado um tamanho de imagem, sendo este 480x4080 pixels, portanto, 1.958.400 pixels no total. A imagem foi carregada no programa e convertida para 8bits com canal de cores de 256 cores. A partir do comando "Colour Threshoud" foram isolados os canais de cores (matiz) específicos de cada cor, sendo que, desse modo, somente o matiz específico (vermelho, por exemplo) apareceria na imagem, os demais (amarelo, verde etc.) foram excluídos. Foi gerada uma nova imagem contendo somente pixels correspondentes ao matiz determinado. Essa nova imagem foi convertida em branco e preto, automaticamente pelo programa. Foi utilizado sobre essa imagem o comando "Analyse Particles". Desse modo foi possível obter o valor absoluto de pixels preto na imagem. A partir desse valor foi determinada a frequência de pixels pretos da imagem em relação ao número total de pixels, obtendo assim um valor em porcentagem. O valor obtido representa a porcentagem

de pixels de uma determinada cor que existe na imagem. A metodologia de análise foi realizada de acordo com Manni et al. (2001), a qual preconizou a medição a partir das imagens obtidas. A média e desvio padrão de cada grupo foram calculados e os dados foram submetidos à análise estatística, utilizando-se do programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA). Foi utilizado o teste estatístico OneWay ANOVA para múltiplos grupos e o teste de comparação de Tukey; o nível de significância estabelecido foi de $p \leq 0,05$.

4.2.3 Método Imuno-histoquímico para detecção de MMP-1

Com o propósito de investigar a presença de MMP-1 na lâmina própria da via eruptiva, cortes aderidos às lâminas silanizadas foram desparafinizados e hidratados. Os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para inativação da peroxidase endógena. Após lavagem em tampão fosfato de sódio (PBS), com pH ajustado para 7,2, os cortes foram, então, submetidos ao tratamento em micro-ondas, por aproximadamente 30 minutos a temperatura de 94°C. Após o resfriamento, os cortes foram lavados em tampão PBS e, subsequentemente, incubados com BSA (Albumina de soro bovino) a 2% por 15 min, para evitar a inespecificidade. Os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-MMP-1 produzido em coelho (rabbit MMP-1, Abcam), na diluição de 1:400 durante 16 horas a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão PBS e incubados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho/ camundongo/cabra biotinilado (Dako LSAB® + System-HRP, Dako, USA) por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão PBS, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase (System-HRP, Kit Dako - USA) durante 30 minutos. Os cortes foram lavados com tampão PBS, a atividade da peroxidase foi revelada com solução de 3,3-diaminobenzidina (*Betazoide DAB Chromogen Kit®* - Biocare Medical, USA) durante 5 minutos; após a lavagem, os cortes foram lavados e contracolorados com hematoxilina. No controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro não imune, e os cortes foram submetidos às mesmas etapas que àqueles incubados com os anticorpos primários.

4.2.4 Densidade numérica de células imunopositivas à MMP-1

A densidade numérica de células imunopositivas à MMP-1 (número de células/mm²) foi estimada na lâmina própria. Foram utilizados 2 cortes por animal, com distância mínima de 100µm, sendo 05 animais de cada período, obtendo, desse modo, 10 cortes por período. A partir destes cortes, foram obtidas imagens da lâmina própria da via eruptiva, com a objetiva de 40x, com auxílio da câmara de captura (DP-71 – Olympus); obteve-se uma área teste de aproximadamente 0,1 mm² em cada animal, totalizando 0,5mm² por período. Assim, foram contadas as células MMP-1-positivas com o auxílio do programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus – Japão). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de variância OneWay ANOVA para múltiplos grupos e teste de comparação de Tukey; o nível de significância estabelecido foi de $p \leq 0,05$.

4.2.5 Método imuno-histoquímico para detecção da fosfatase ácida (ACP2)

Para detecção da enzima fosfatase ácida (ACP2) nas células da lâmina própria da via eruptiva, cortes aderidos às lâminas silanizadas foram desparafinizados e hidratados. Os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para inativação da peroxidase endógena. Após lavagem em tampão PBS (pH 7,2), os cortes foram submetidos ao tratamento com tripsina 1:250, em estufa à 37° C por 1 hora e 30 min. Após lavagem em tampão, os cortes foram incubados com BSA por 20 min e, subsequentemente, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-ACP2 produzido em camundongo [ACP2 antibody (4B5) mouse monoclonal IgG2b – Santa Cruz Biotechnology, Inc ®, Santa Cruz, CA - EUA], na diluição de 1:100, durante 16 horas a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão PBS e incubados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho/camundongo/cabra biotilado (Dako LSAB® + System-HRP, Dako, USA) por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão PBS, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase (System-HRP, Kit Dako - USA), durante 30 minutos. Após lavagem em tampão, a atividade da peroxidase foi revelada com solução de 3.3-diaminobenzidina (*Betazoide DAB Chromogen Kit®* - Biocare Medical, USA). Após 5 minutos na solução contendo DAB, os cortes foram lavados e contracolorados com hematoxilina. No controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro não imune, e os cortes foram submetidos às mesmas etapas que àqueles incubados com o anticorpo primário.

4.2.6 Método imuno-fluorescente para detecção da fosfatase ácida (ACP2)

Para detecção da enzima fosfatase ácida (ACP2) nas células da lâmina própria da via eruptiva, cortes aderidos às lâminas silanizadas foram desparafinizados e hidratados. Os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para inativação da peroxidase endógena. Após lavagem em tampão PBS (pH 7,2), os cortes foram submetidos ao tratamento com tripsina 1:250, em estufa à 37°C por 1 hora e 30 min. Após lavagem em tampão, os cortes foram incubados com BSA por 20 min e, subsequentemente, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-ACP2 produzido em camundongo [ACP2 antibody (4B5), mouse monoclonal IgG2b – Santa Cruz Biotechnology, Inc®, Santa Cruz, CA - EUA], na diluição de 1:100, durante 16 horas a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário (IgG) fluorescente (FITC) produzido em camundongo (anti-mouse IgG-FITC, cód. sc-2010, Santa Cruz Biotechnology®, USA), na diluição de 1:500, por 30 minutos, a temperatura ambiente, protegido da luz. Após a lavagem em tampão PBS, os cortes foram incubados com o marcador fluorescente para núcleo DAPI (NucBlue® DAPI, Life Technologies, USA), diluído em 2 gotas por 1 ml. Após 5 minutos na solução contendo DAPI, os cortes foram lavados e montados com meio de montagem para fluorescência (VectaShield® Hard Set, Vector Laboratories Inc., USA). No controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro não imune, e os cortes foram submetidos às mesmas etapas que àqueles incubados com o anticorpo primário. Os cortes foram analisados no microscópio de fluorescência Leica (modelo DFC550).

4.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise ultraestrutural foram utilizados, no total, 20 animais (05 animais/idade). Após a eutanásia dos ratos, os fragmentos da hemimaxila direita contendo lâmina própria da via eruptiva do 1º molar foram imediatamente imersos em solução contendo 4% de glutaraldeído e 4% de formaldeído (preparado a partir de paraformaldeído) em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante 16 a 20 horas. Em seguida, os fragmentos foram descalcificados em EDTA 7% tamponado com cacodilato de sódio 0,1M e pH 7,2, durante 7 dias. Subsequentemente, os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2), por 4 horas com 2 trocas, e foram seccionados para permitir melhor processamento do material. Os espécimes foram imersos em 1% de tetróxido de ósmio, durante 1 hora. Após a

contrastação *in bloc* em solução aquosa de acetato de uranila a 2,0% durante 2 horas, a desidratação foi feita paulatinamente com concentrações crescentes de etanol, a partir do etanol 30GL até o absoluto. Após a passagem pelo óxido de propileno, foi feita a infiltração do material com mistura de óxido de propileno/Araldite. A infiltração em resina pura foi realizada por 48 horas; o material foi incluído em formas e a polimerização da resina foi feita em estufa a 56°C durante 72 horas.

Com auxílio de um ultramicrotomo (Leica, UCT) os blocos foram aparados para obtenção de cortes semifinos que foram corados com solução aquosa contendo 1% de azul de toluidina e 1% de borato de sódio para seleção das áreas de interesse. Os blocos foram então aparados e com faca de diamante (Drukker International, Netherlands) os cortes ultrafinos (70-90nm) foram obtidos; os cortes foram coletados com telas de cobre (300 mesh) e contrastados com solução alcóolica de acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo. Os cortes foram analisados ao microscópio eletrônico de transmissão (Philips CM 100 e TECNAI) do Instituto de Ciências Biológicas de Botucatu (UNESP).

4.2.8 Método histoquímico – identificação de fosfatase ácida em MET

Para detecção ultraestrutural da fosfatase ácida foram utilizadas as hemimaxilas do lado esquerdo dos mesmos animais utilizados para a microscopia eletrônica de transmissão (n=5 por período). Após a remoção da hemimaxila esquerda, com auxílio de um microscópio estereoscópico e uma lâmina de bisturi descartável, a mucosa sobre o rebordo alveolar da região do 1º molar foi removida. A mucosa oral foi reduzida a pequenos fragmentos que foram imediatamente imersos em solução contendo 0,5% de glutaraldeído e 2% de formaldeído (preparado a partir de paraformaldeído) tamponado com 0,1M cacodilato de sódio com pH 7,2, durante 16 a 20 horas.

Os fragmentos foram então lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2), por 20 minutos. Subsequentemente, os fragmentos foram imersos no meio de incubação preparado a partir de 0,1M de tampão acetato de sódio com pH 5,0 onde foi dissolvido 20mM de nitrato de chumbo; 10mM de β -glicerofosfato de sódio foi adicionado a esta solução (Barka, 1964). Após a solução apresentar-se homogênea, a solução foi filtrada e os fragmentos de mucosa oral foram incubados

a 37 °C, durante 1 hora. Como controle, fragmentos foram imersos no meio de incubação sem β -glicerofosfato, durante 1 hora a 37 °C. Os fragmentos foram então fixados em glutaraldeído a 3% tamponado a pH 7,2 com cacodilato 0,1M por 2h a 4°C. Após lavagem em tampão, os fragmentos foram imersos em 1% de tetróxido de ósmio, durante 1 hora. Após a contrastação *in bloc* em solução aquosa de acetato de uranila a 2% durante 2 horas, a desidratação foi feita paulatinamente com concentrações crescentes de etanol, a partir do etanol 30° GL até o absoluto. Após a passagem pelo óxido de propileno, foi feita a infiltração do material, através da mistura de óxido de propileno/Araldite. A infiltração em resina pura foi realizada por 48 horas; o material foi incluído de acordo com os métodos convencionais e a polimerização da resina foi feita em estufa a 56°C durante 72 horas.

Após os blocos serem aparados, cortes semifinos foram obtidos com navalha de vidro acoplada ao ultramicrotomo (Leica, UCT) e corados com azul de toluidina para seleção das áreas. Com navalha de diamante (Drukker International, Netherlands) os cortes ultrafinos (70-90 nm) foram coletados com telas de cobre. Os cortes contrastados com solução alcóolica de acetado de uranila a 2% e citrato de chumbo foram analisados ao microscópio eletrônico de transmissão (Philips CM 100 e TECNAI) do Instituto de Ciências Biológicas de Botucatu (UNESP). Alguns cortes ultrafinos não contrastados foram também analisados para verificar a positividade da reação para fosfatase ácida.

4- Resultados

As análises dos cortes corados com picrosirius ao microscópio de luz auxiliaram na caracterização morfológica dos estágios eruptivos. Os animais com 9 dias apresentaram o 1º molar superior com formação completa das coroas e início da formação da raiz. O germe dentário encontrava-se totalmente envolto por trabéculas ósseas interconectadas, sendo que a porção oclusal apresentava-se, dessa maneira, recoberta por trabéculas ósseas. A lâmina própria continha típicos feixes de fibras colágenas, coradas em vermelho (Fig. 1A). No período de 11 dias, o germe dentário apresentava-se parcialmente recoberto por trabéculas ósseas descontínuas e finas. No entanto, a constituição fibrilar da lâmina própria estava, aparentemente, inalterada (Fig. 1B). As cúspides dos germes dos 1^{os} molares dos ratos de 13 dias estavam invadindo a lâmina própria e, portanto, o epitélio reduzido do esmalte estava próximo ao epitélio oral. Os feixes de colágeno na lâmina própria apresentaram-se descontínuos e, aparentemente, mais delgados em relação aos períodos anteriores (Fig. 1C). Nos animais de 16 dias, a lâmina própria estava restrita a uma camada delgada, sendo que em alguns cortes o epitélio reduzido do esmalte estava justaposto ao epitélio oral. A lâmina própria observada, principalmente, nas regiões entre as cúspides do germe dentário, continha fibras colágenas finas e curtas (Fig. 1D).

A análise dos cortes corados com picrosirius ao microscópio com luz polarizada revelou a presença de feixes de fibras colágenas birrefringentes na lâmina própria, em todos os períodos (Figs. 2A-2D). Os períodos de 9 e 11 dias apresentaram intensa birrefringência, principalmente de matiz vermelho/alaranjado. O arranjo das fibras colágenas mostrou-se predominantemente paralelo ao epitélio oral, contudo apresentando fibras entrelaçadas. Nestes períodos, os feixes de fibras colágenas apresentaram-se espessos e extensos (Figs. 2A, 2B, 3A e 3B). No período de 13 dias, uma mudança no padrão da birrefringência das fibras colágenas na lâmina própria foi observada (Fig. 2C). Houve uma visível redução na coloração avermelhada, tornando-se predominante as cores amarelo e verde. Além disso, os feixes de fibras colágenas apresentaram-se delgados e frouxamente distribuídos (Figs. 2C e 3C). A estreita faixa de lâmina própria da via eruptiva nos ratos com 16 dias mostrou evidente redução no conteúdo de feixes de fibras colágenas

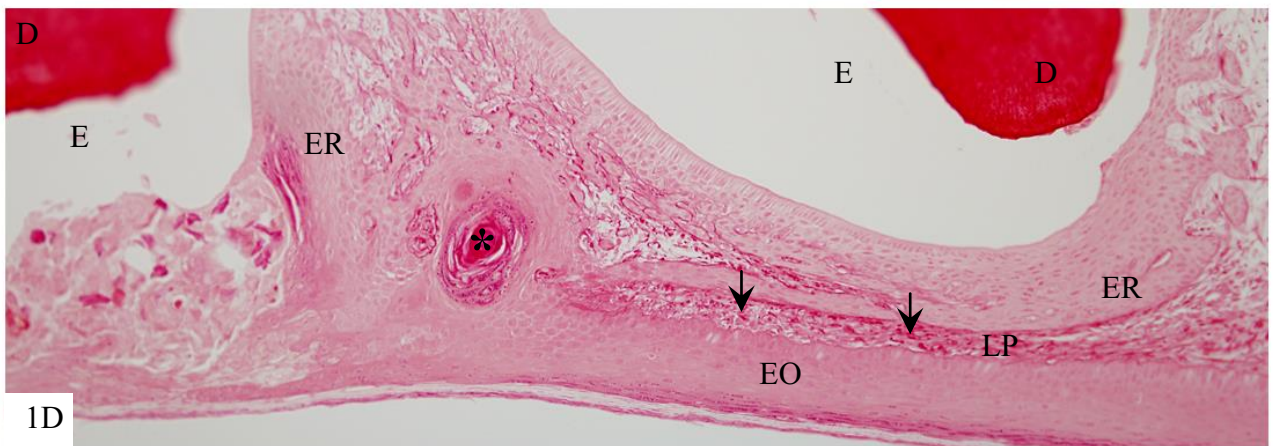
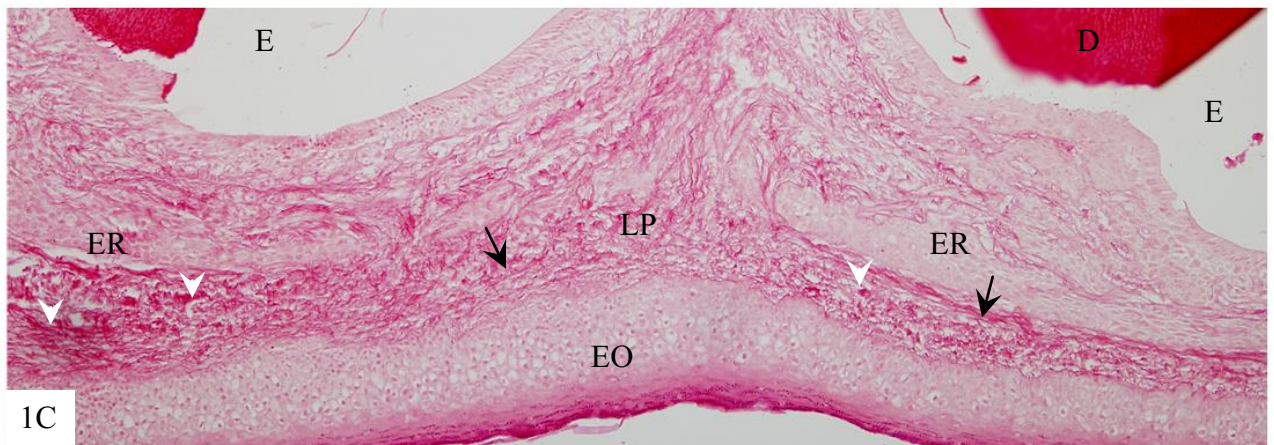
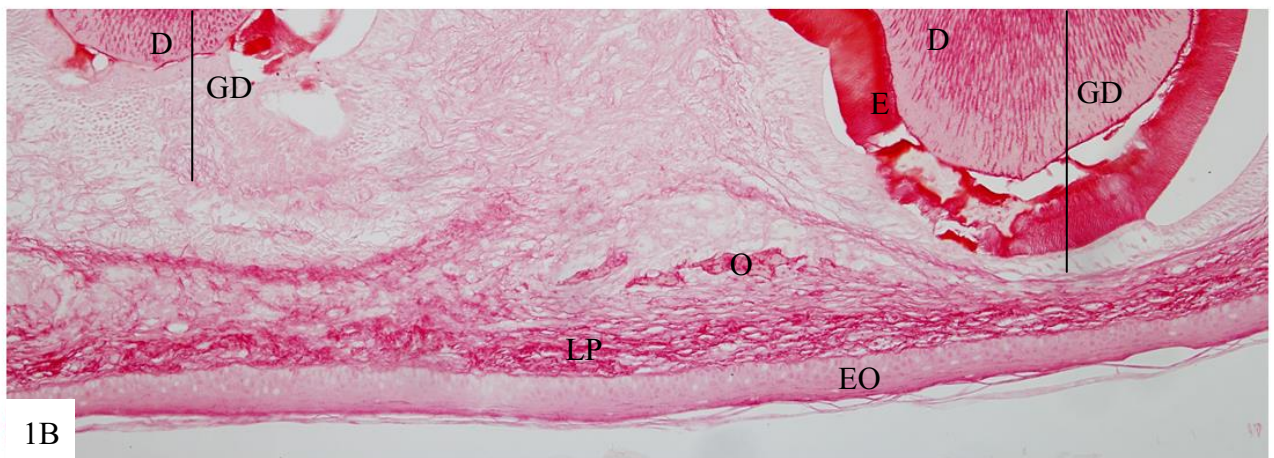
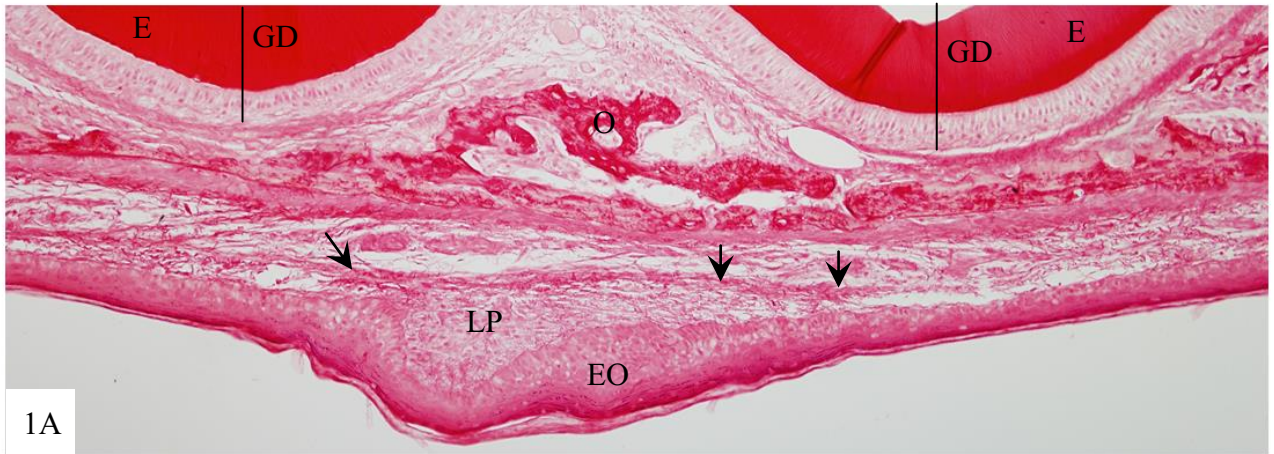
birrefringentes (Fig. 2D). As escassas fibras colágenas apresentaram-se delgadas, de pequeno comprimento e dispostas aleatoriamente (Fig. 3D).

De acordo com a Tabela 1, a quantificação da birrefringência das fibras colágenas na via eruptiva revelou diferenças significantes entre os períodos de 09 e 16 dias, assim como entre os períodos de 11 e 16 dias. O percentual de colágeno birrefringente foi significativamente maior na lâmina própria dos animais de 9 e 11 dias em comparação aos de 16 dias. Embora, em média, o conteúdo de colágeno na via eruptiva dos ratos de 13 dias (21,47%) foi superior aos ratos de 16 dias (11,54%), as diferenças não foram estatisticamente significantes.

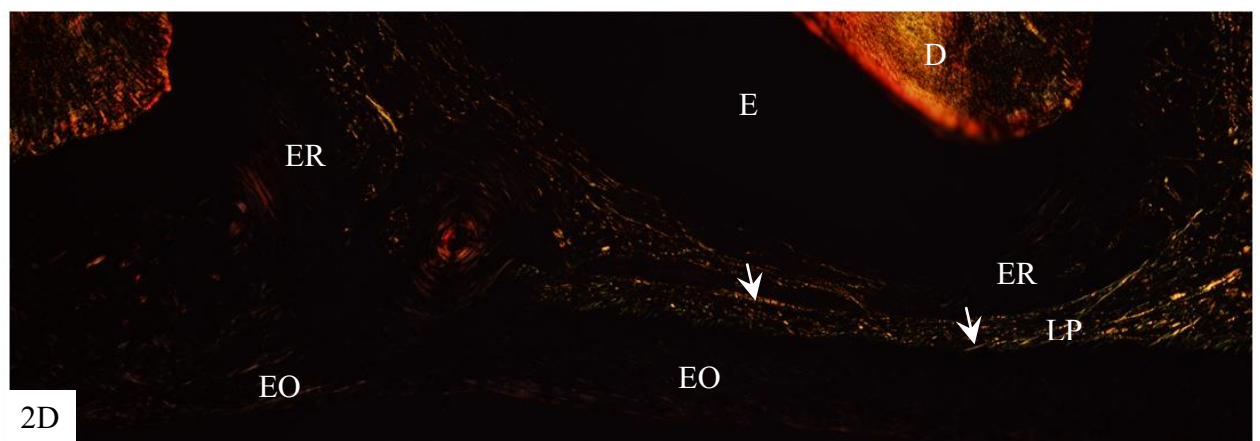
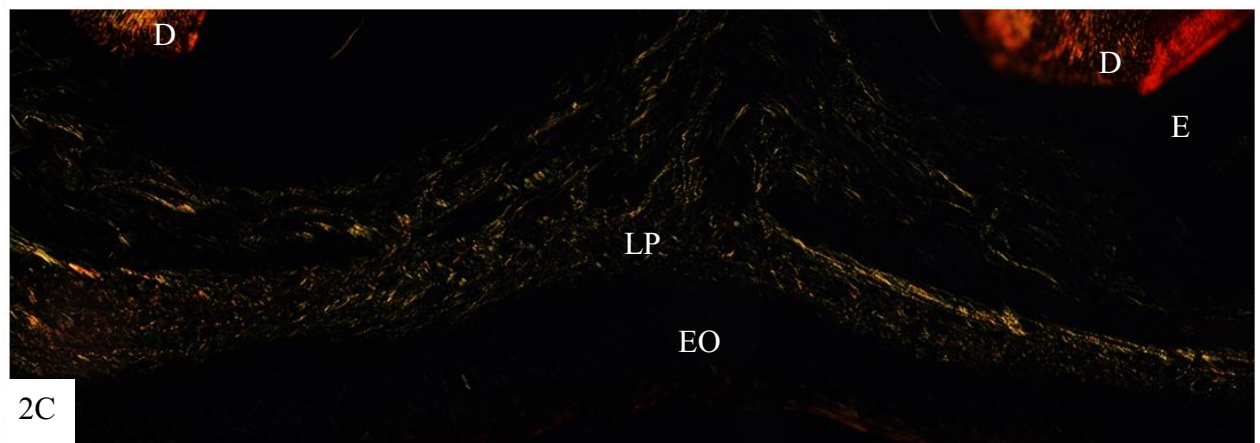
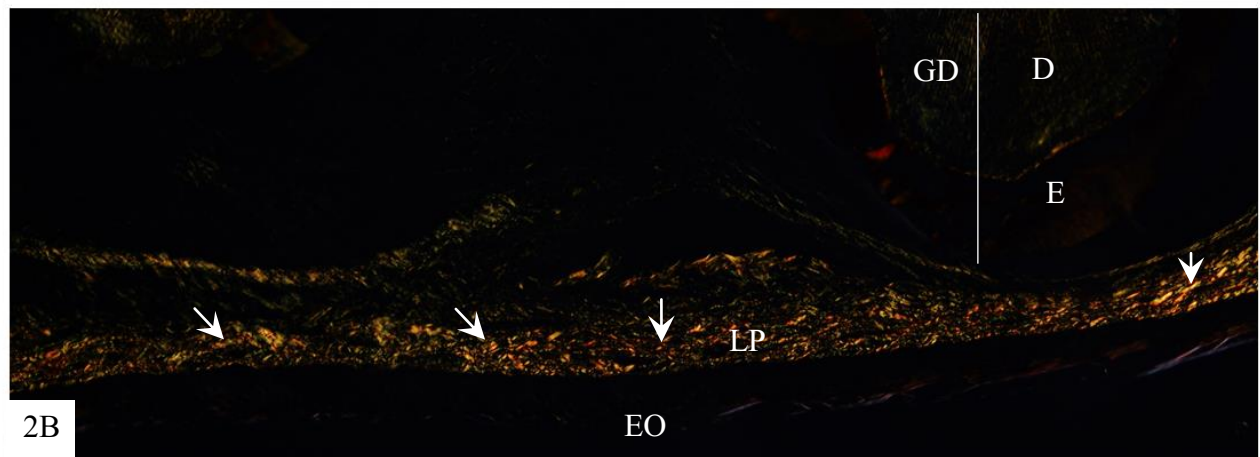
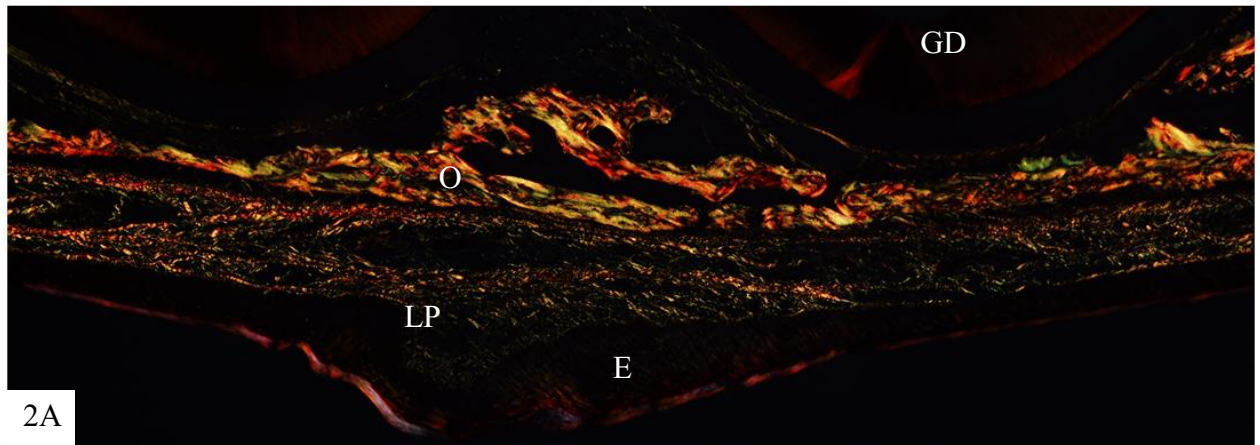
Tabela 1 – Frequência do colágeno exibindo birrefringência com os matizes vermelho/laranja (230-258; 0-38), amarelo (39-51) e verde (52-128) na lâmina própria da via eruptiva em 1^{os} molares de ratos com 9, 11, 13 e 16 dias.

Matiz	9 dias	11 dias	13 dias	16 dias
Vermelho/laranja	26,93	28,90	21,09	11,34
Amarelo	0,017	0,28	0,250	0,13
Verde	0,038	0,071	0,131	0,089
TOTAL	26,99±10,13^a	29,25±12,58^a	21,47±11,84^{a,b}	11,56±2,01^{b*}
Anisotropia	73,01	70,75	78,53	88,42

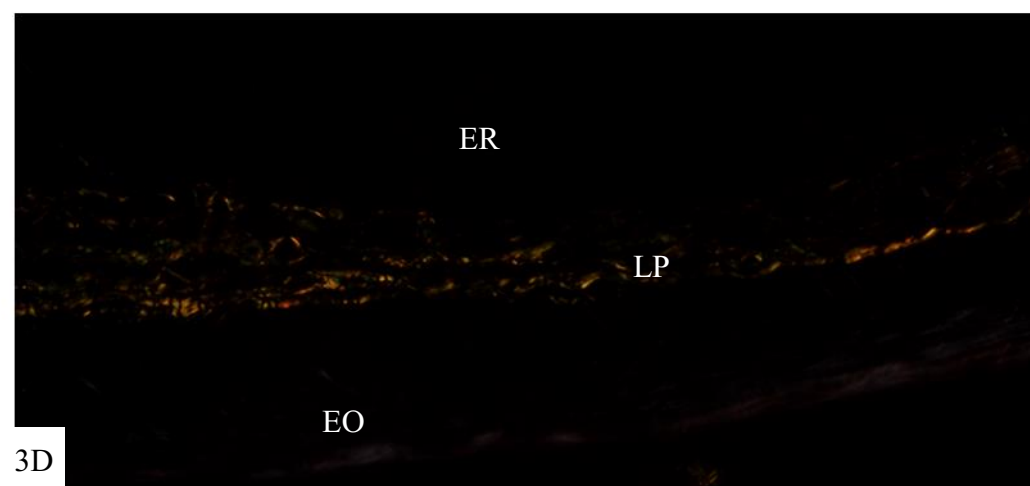
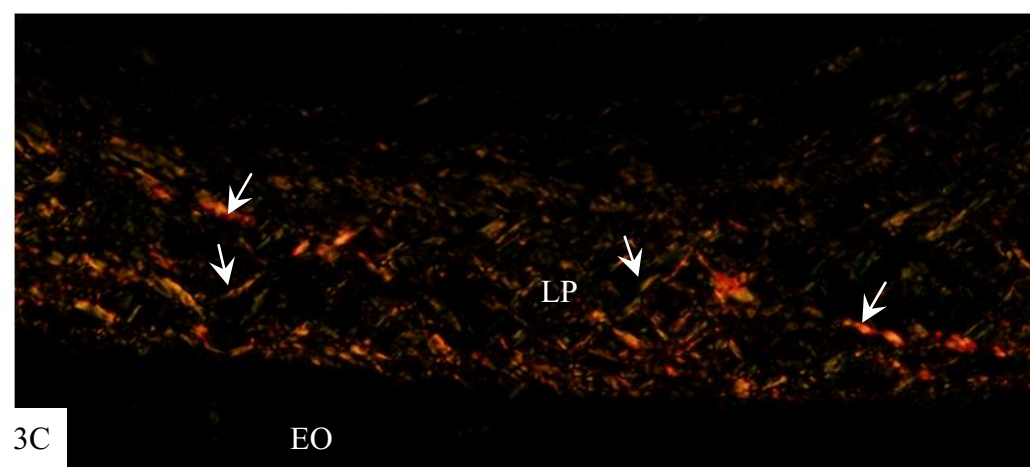
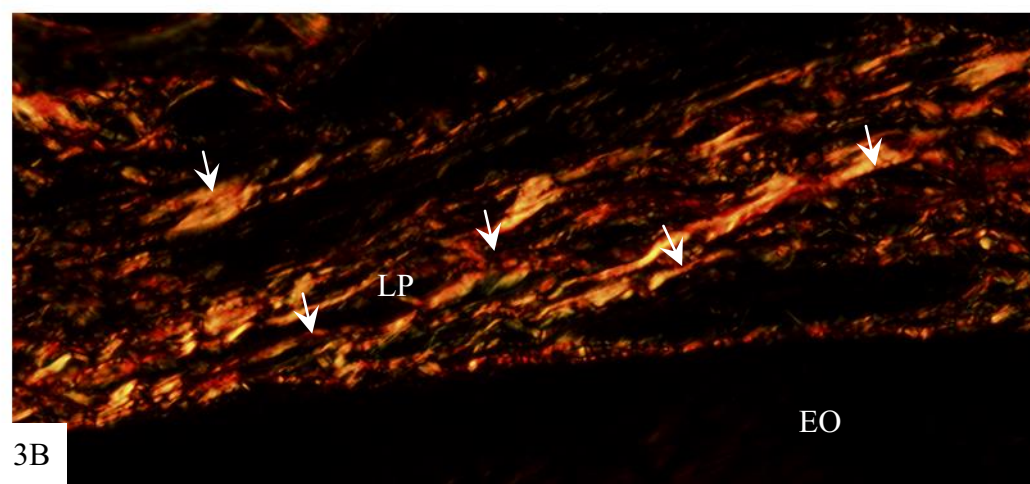
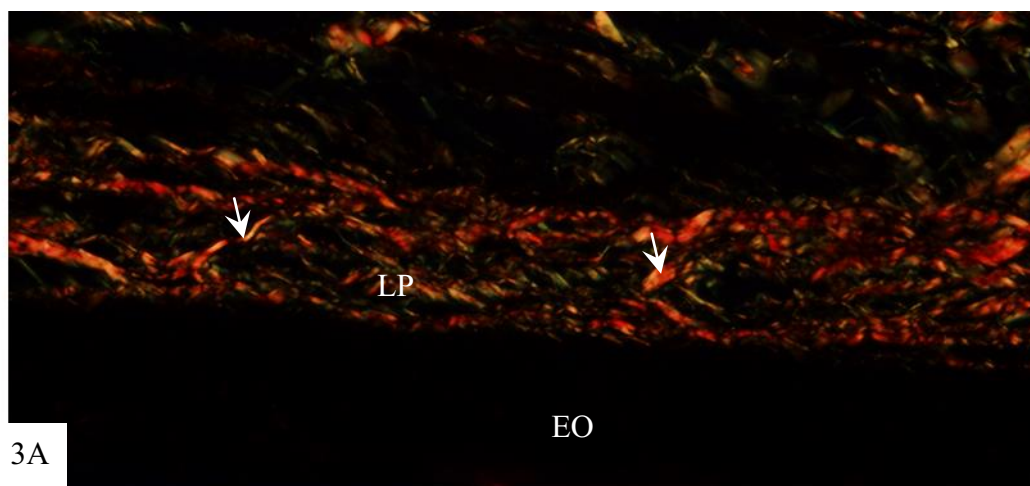
Letras diferentes = Estatisticamente significante $p \leq 0,05$.



Figuras 1A-1D – Fotomicrografias de porções da lâmina própria coradas com picrossirius da via eruptiva de 1^{os} molares de ratos com 9 (**Fig. 1A**), 11 (**Fig. 1B**), 13 (**Fig. 1C**) e 16 dias (**Fig. 1D**). Na **Fig. 1A (9 dias)** observa-se a presença de trabéculas ósseas (O) interpostas entre as cúspides do germe dentário (GD) e a lâmina própria (LP) da via eruptiva. Nota-se a intensa coloração vermelha das fibras colágenas (setas) coradas pelo método do picrossirius. (EO) Epitélio oral. 310x. A **Fig. 1B (11 dias)** – presença de trabéculas ósseas (O) delgadas e descontínuas entre a lâmina própria (LP) e o germe dentário (GD). É evidente a presença de feixes de fibras colágenas (em vermelho) na lâmina própria (LP); esses feixes de fibras colágenas, em sua maior parte, orientam-se paralelamente à superfície do epitélio oral (EO). (D) dentina; (E) Esmalte. 310x. Na **Fig. 1C (13 dias)**, as fibras colágenas na lâmina própria (LP) formam grumos (cabeças de setas); escassos feixes de fibras colágenas paralelos à superfície do epitélio (setas) são observados. O epitélio reduzido do esmalte (ER) está próximo ao epitélio oral (OE). (E) Espaço do esmalte; (D) Dentina. 310x. A **Fig 1D (16 dias)** mostra escassas fibras colágenas (setas) representadas por pequenos grumos corados em vermelho, na camada delgada de lâmina própria (LP). No lado esquerdo, observa-se a fusão do epitélio reduzido do esmalte (ER) com o epitélio oral (EO). (D) Dentina; (E) Espaço do esmalte; (Asterisco) Pérola de queratina. 310x.



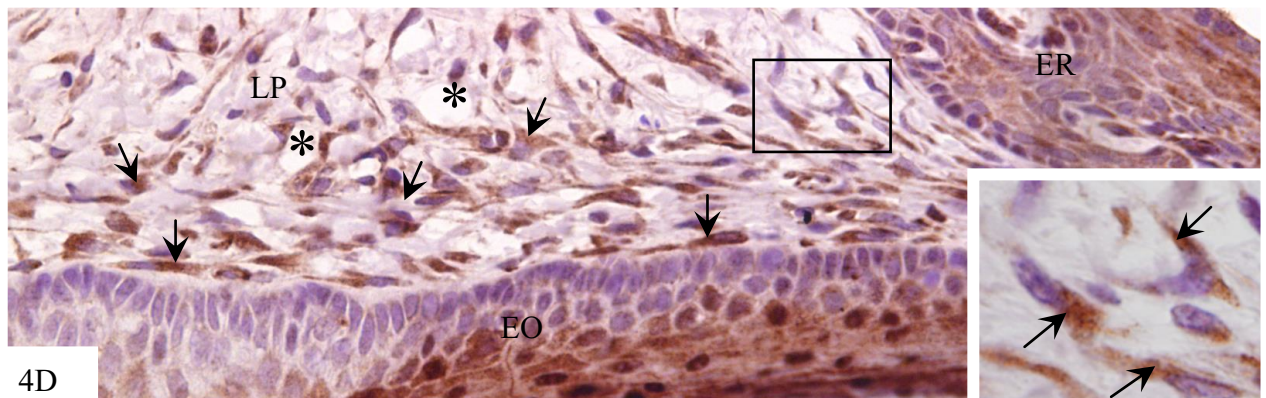
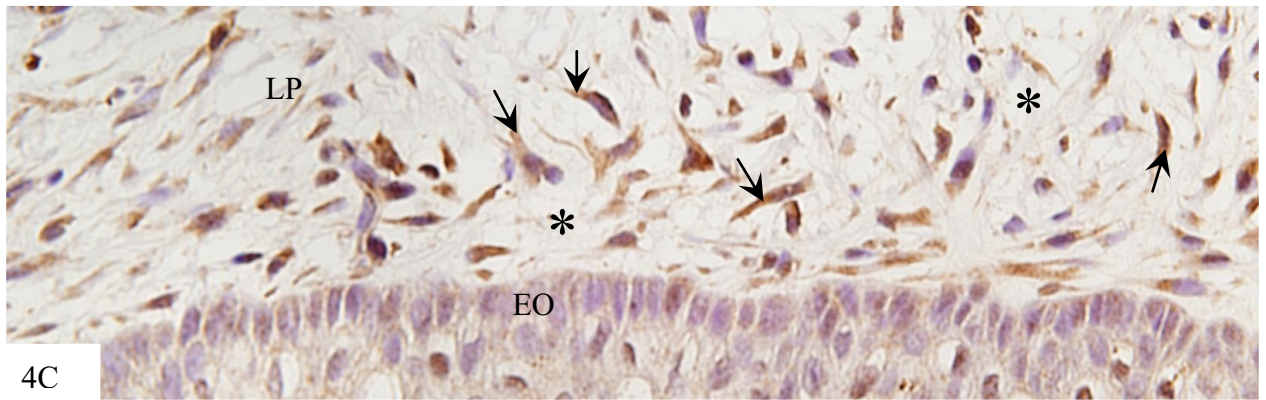
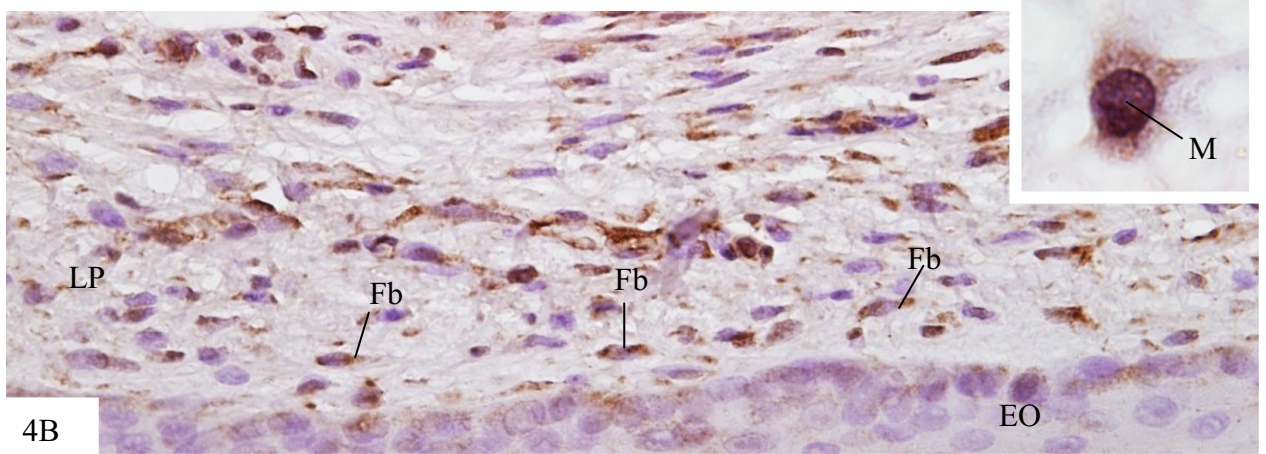
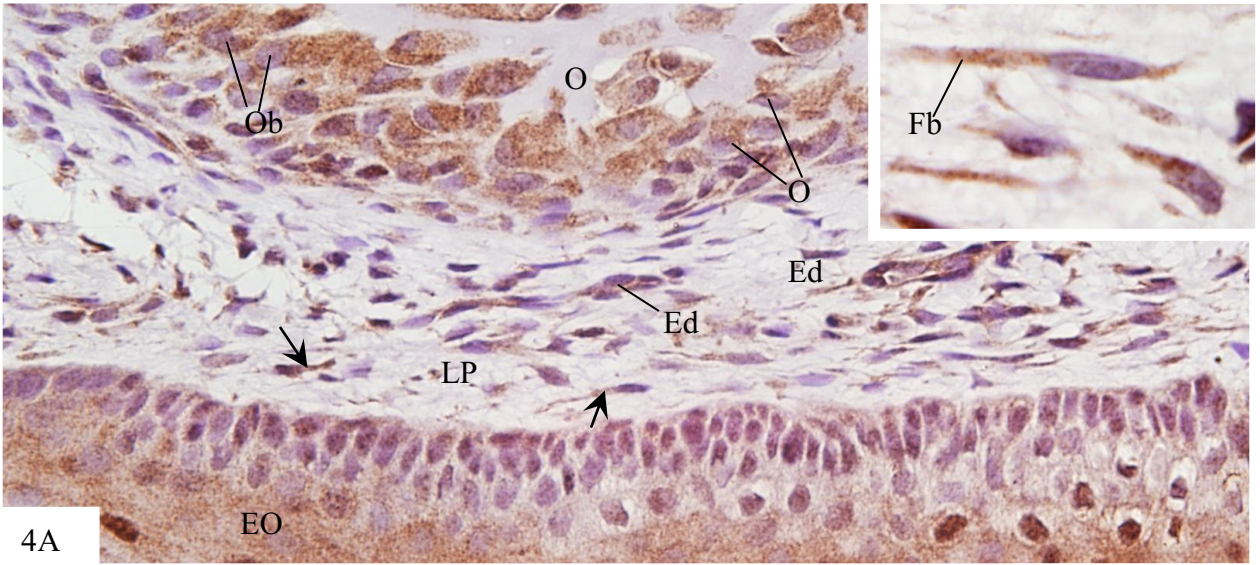
Figuras 2A-2D - Fotomicrografias de porções da lâmina própria da via eruptiva de 1^{os} molares de ratos com 9 (**Fig. 2A**), 11 (**Fig. 2B**), 13 (**Fig. 2C**) e 16 dias (**Fig. 2D**); os cortes foram corados com picrossirius e analisados ao microscópio com luz polarizada. Na **Fig. 2A**, a lâmina própria (LP) apresenta intensa birrefringência; predomínio de feixes de fibras colágenas exibindo birrefringência vermelho/alaranjado (setas) com orientação, principalmente, paralela à superfície do epitélio oral (EO). Trabéculas ósseas (O), dispostas entre a lâmina própria (LP) e as cúspides do germe dentário (GD), exibem intensa birrefringência. 310x. **Fig. 2B** - evidente birrefringência é observada na lâmina própria (LP), com presença de feixes de fibras colágenas dispostas em diferentes orientações (setas). (E) espaço do esmalte; (D) dentina; (EO) epitélio oral. 310x. Na **Fig. 2C** observa-se a alteração no padrão da birrefringência do colágeno da lâmina própria (LP), apresentando maiores áreas anisotrópicas. (E), esmalte; (D), dentina. 310x. A **Fig. 2D** mostra a delgada faixa de lâmina própria (LP) com reduzida birrefringência. Os escassos feixes de fibras colágenas apresentam-se delgados (setas). (ER), epitélio reduzido do esmalte; (EO), epitélio oral; (E) espaço do esmalte; (D) dentina. 310x.



Figuras 3A-3D - Fotomicrografias de porções da lâmina própria da via eruptiva de 1^{os} molares de ratos com 9 (**Fig. 3A**), 11 (**Fig. 3B**), 13 (**Fig. 3C**) e 16 dias (**Fig. 3D**); os cortes foram corados com picrosirius e analisados ao microscópio de luz polarizada. A **Fig. 3A** mostra intensa birrefringência dos feixes de fibras colágenas, com matiz predominantemente vermelho, na lâmina própria (LP). Numerosos e espessos feixes de fibras colágenas orientam-se paralelamente à superfície do epitélio oral (EO); entre estes feixes, há feixes de colágeno birrefringentes dispostos obliquamente (setas). 695x. **Fig. 3B** – intensa birrefringência na lâmina própria (LP) com predomínio do matiz vermelho/alaranjado. As fibras colágenas se agrupam em feixes com orientações paralelas entre si (setas). 695x. **Fig. 3C** – evidente diminuição no padrão da birrefringência é observado na lâmina própria (LP), apresentando maiores áreas de anisotropia (áreas escuras). Os feixes de fibras colágenas são finos e curtos (setas) e dispõem-se em diferentes orientações. (EO), Epitélio oral. 695x. **Fig. 3D** – a delgada faixa de lâmina própria (LP) da via eruptiva exibe uma redução evidente na birrefringência das fibras colágenas, sendo notável um aumento das áreas anisotrópicas. Notam-se escassos feixes de fibras colágenas que são delgados e pequenos. (ER), epitélio reduzido do órgão do esmalte; (EO), epitélio oral. 695x.

A reação imuno-histoquímica para MMP-1 revelou diversas células da lâmina própria imunomarcadas, nas diferentes fases eruptivas. Por outro lado, a matriz extracelular da lâmina própria apresentou-se negativa à imunomarcação. Os fibroblastos da lâmina própria exibiram intensa marcação citoplasmática nos diferentes períodos (Figs. 4A-4D). No entanto, uma acentuada marcação foi observada em fibroblastos volumosos no período avançado da fase de penetração na mucosa, ou seja, aos 16 dias (Fig. 4D, *inset*). Células irregulares exibindo núcleo esférico e amplo, características semelhantes às dos macrófagos, também apresentaram citoplasma imunomarcado (*inset*, Fig. 4B). Além das células da lâmina própria, osteoblastos justapostos à superfície das trabéculas ósseas situadas entre o germe dentário e a mucosa oral também exibiram o citoplasma positivo à MMP-1 (Fig. 4A). Aos 16 dias, imunopositividade nas células do epitélio oral e do epitélio reduzido do esmalte, principalmente nas áreas onde estes epitélios apresentaram-se em fusão, foi observada (Fig. 4D). Os cortes incubados com soro não imune (controle negativo), não exibiram estruturas positivas (dados não ilustrados).

A análise quantitativa revelou um aumento significativo na densidade numérica de células MMP-1 na lâmina própria na fase eruptiva de penetração da mucosa, ou seja, nos ratos de 13 e 16 dias. Diferenças significantes não foram detectadas no número de células positivas à MMP-1 na via eruptiva dos ratos de 9 e 11 dias bem como entre os de 13 e 16 dias (Figura 5).



Figuras 4A-4D- Fotomicrografias de porções de lâmina própria (LP) da via eruptiva de 1^{os} molares de ratos com 9 (**Fig. 4A**), 11 (**Fig. 4B**), 13 (**Fig. 4C**) e 16 dias (**Fig. 4D**); os cortes foram submetidos a reação imuno-histoquímicas para MMP-1 e contracolorados com hematoxilina. A **Fig. 4A** mostra a lâmina própria com alguns fibroblastos exibindo imunomarcacão citoplasmática (setas). A matriz extracelular da lâmina própria (LP) não exibe positividade à MMP-1. Osteoblastos (Ob) justapostos à superfície do osso (O) interposto entre o germe dentário e a mucosa oral exibem evidente imunomarcacão citoplasmática. Células do epitélio oral (EO) e células endoteliais (Ed) também apresentaram positividade. 695x. ***Inset*** – mostra, em aumento maior, fibroblastos (Fb) exibindo evidente imunopositividade citoplasmática. 1745x. **Fig. 4B** – fibroblastos com imunopositividade citoplasmática (Fb) estão dispersos pela lâmina própria (LP) da via eruptiva. O ***inset*** mostra evidente marcação citoplasmática no citoplasma de uma célula semelhante a macrófago (M). Epitélio oral (EO). 695x; 1745x (***inset***). **Figs. 4C (13 dias) e 4D (16 dias)** – Numerosas células exibem positividade à MMP-1; fibroblastos exibem evidente imunomarcacão citoplasmática (setas). Note que entre as células há escassas fibras colágenas e amplos espaços (asteriscos). **Fig. 4D** – O epitélio oral (EO) exibe as camadas espinhosa e superficial, fortemente positivas; o epitélio reduzido do órgão do esmalte (ER) na sua porção mais oclusal também exibe positividade. O ***inset***, área demarcada em 4D, mostra fibroblastos (setas) exibindo amplo citoplasma fortemente positivo à MMP-1. Figs. 4C e 4D: 695x; ***inset***: 1.745x.

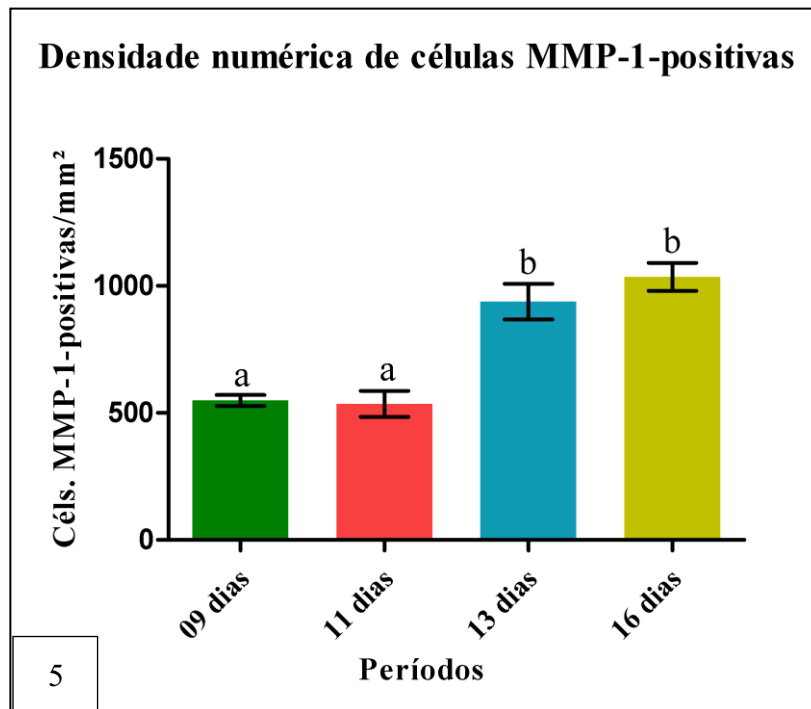
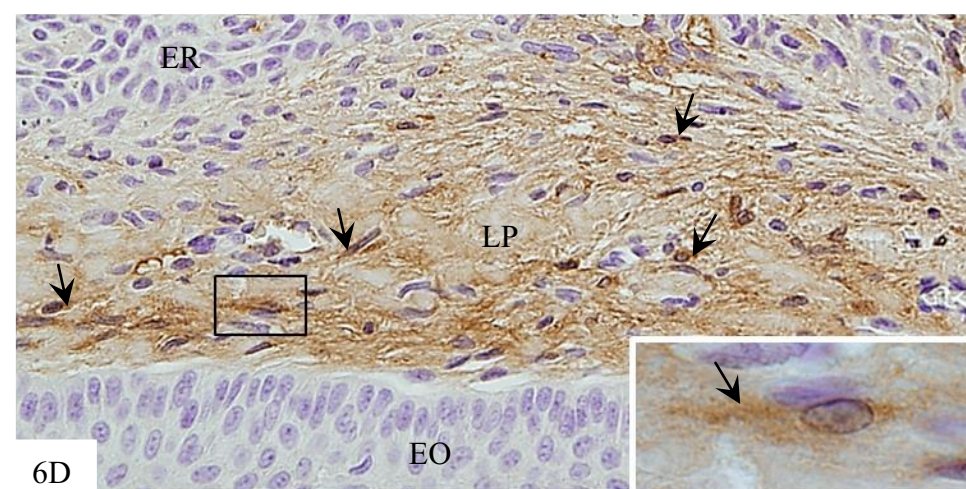
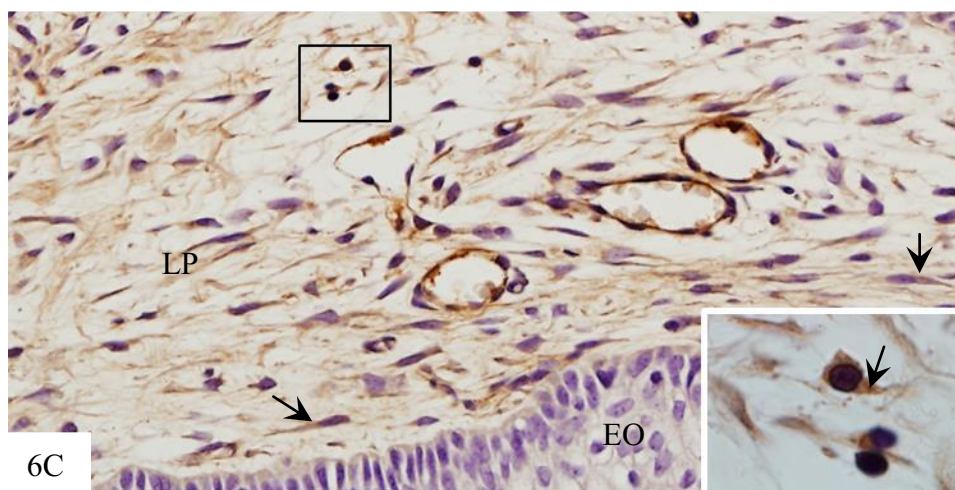
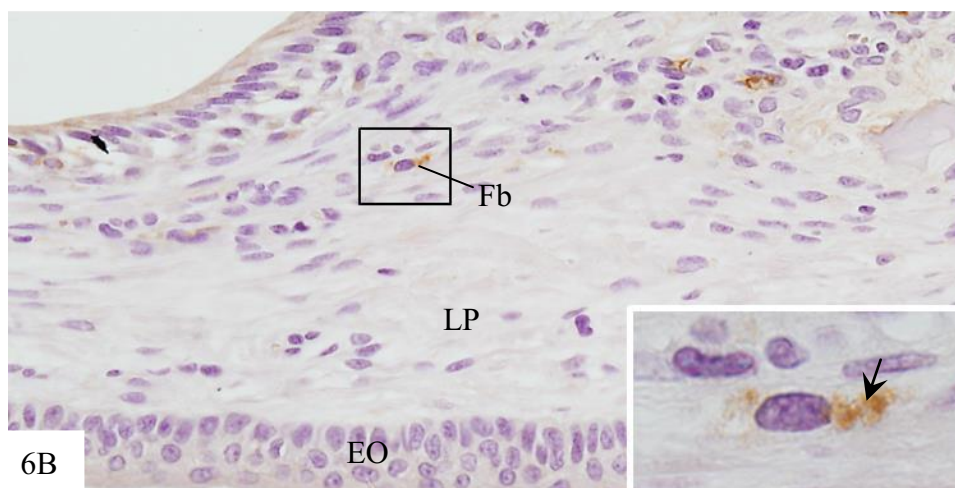
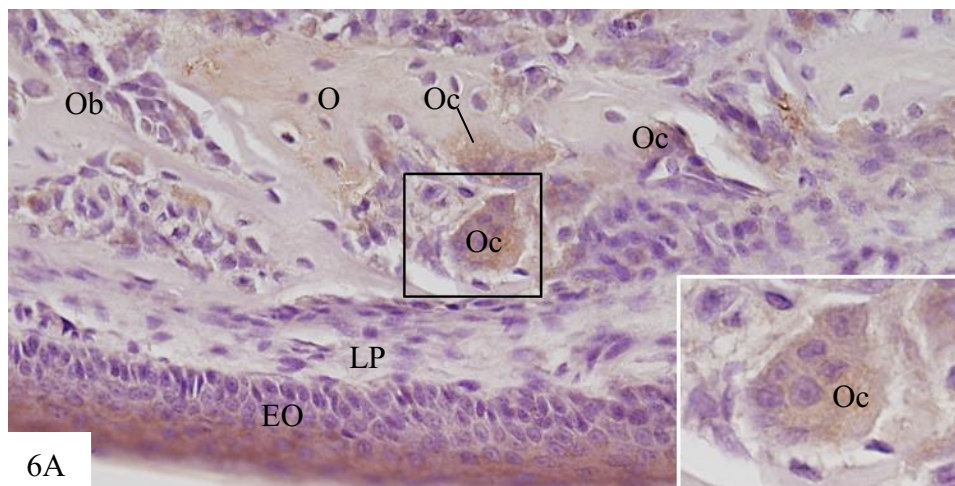


Figura 5 – Gráfico ilustrando os valores em média da densidade numérica de células MMP-1 positivas na lâmina própria da via eruptiva nos ratos de 9, 11, 13 e 16 dias. O número de células MMP-1-positivas foi significativamente maior nos períodos de 13 e 16 dias em comparação aos de 9 e 11 dias. Letras diferentes sobrescritas representam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

A reação imuno-histoquímica para fosfatase ácida lisossomal (ACP2) revelou escassas células da lâmina própria exibindo imunomarcagem citoplasmática, nos ratos de 9 e 11 dias (Figs. 6A-6B). Em contrapartida, evidente imunomarcagem foi frequentemente observada no citoplasma de osteoclastos adjacentes à superfície do osso situado entre o germe dentário em desenvolvimento e a lâmina própria (*inset*, Fig. 6A). Na via eruptiva, raros fibroblastos exibiram positividade à fosfatase ácida (Fig. 6B). Em contraposição, aos 13 e 16 dias uma acentuada marcação foi observada nos fibroblastos, bem como nas células endoteliais da microcirculação na lâmina própria da via eruptiva (Figs. 6C e 6D). A matriz extracelular da lâmina própria exibiu positividade à reação nos ratos de 13 e 16 dias, ou seja, na fase de penetração na mucosa (Figs. 6C e 6D); note que nos ratos de 9 e 11 dias, a matriz apresentou-se negativa à reação (Figs. 6A e 6B). Os cortes incubados com soro não imune (controle negativo), não exibiram estruturas positivas (dados não ilustrados).

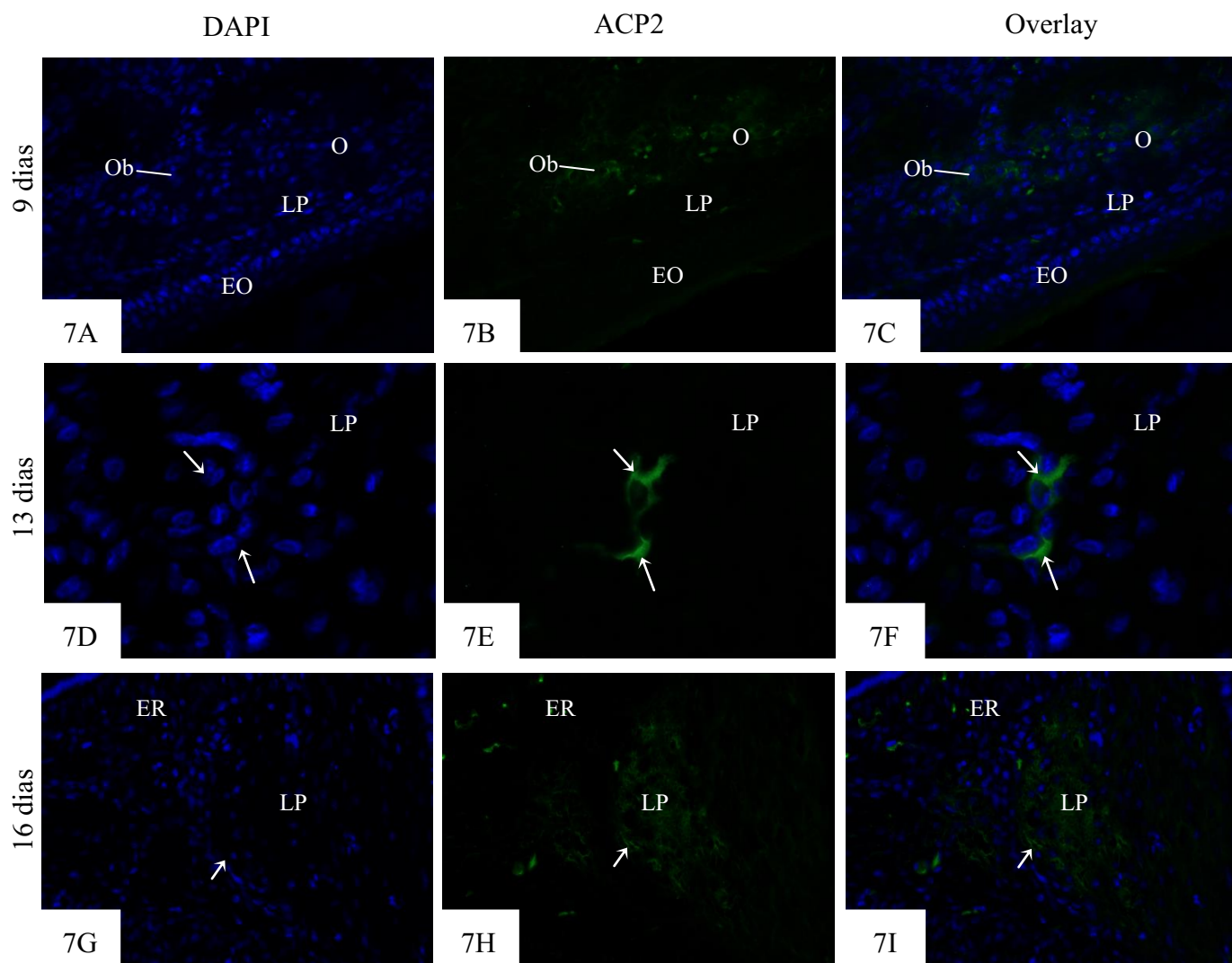


Figuras 6A-6D- Fotomicrografias de porções de lâmina própria (LP) da via eruptiva de 1^{os} molares de ratos com 9 (**Fig. 6A**), 11 (**Fig. 6B**), 13 (**Fig. 6C**) e 16 dias (**Fig. 6D**); os cortes foram submetidos à reação imuno-histoquímicas para fosfatase ácida (ACP2) e contracolorados com hematoxilina. A **Fig. 6A** mostra a lâmina própria, bem como as trabéculas ósseas (O) adjacentes ao germe dentário com imunomarcação citoplasmática em osteoblastos (Ob) e osteoclastos (Oc); o *inset*, área demarcada em 5A, mostra imunomarcação no citoplasma de um osteoclasto (Oc). Note que as células da lâmina própria (LP) apresentam-se negativas à ACP2. 385x. 695x (*inset*)

Fig. 6B – A lâmina própria (LP) exibe inúmeras células negativas à ACP2; somente um fibroblasto (Fb) exibindo imunomarcação citoplasmática é observado entre a LP e o folículo dentário (FD). O *inset*, a área demarcada em 6B, mostra evidente imunomarcação citoplasmática à ACP2 (seta). Epitélio oral (EO). 385x; 1.745x (*inset*).

Figs. 6C (13 dias) e 6D (16 dias) – diversos fibroblastos positivos à ACP2 (setas) são observados na lâmina própria (LP). O *inset* na **Fig. 6C**, área demarcada, mostra forte imunopositividade citoplasmática (seta) numa célula irregular exibindo núcleo esférico. O *inset* da **Fig. 6D** mostra evidente imunomarcação no citoplasma de um fibroblasto (seta). Note na **Fig. 6D** que áreas da matriz extracelular na lâmina própria (LP) exibem imunopositividade à ACP2 (asteriscos). Epitélio reduzido (ER). Figs. 6C e 6D: 385x; *inset*: 1.745x.

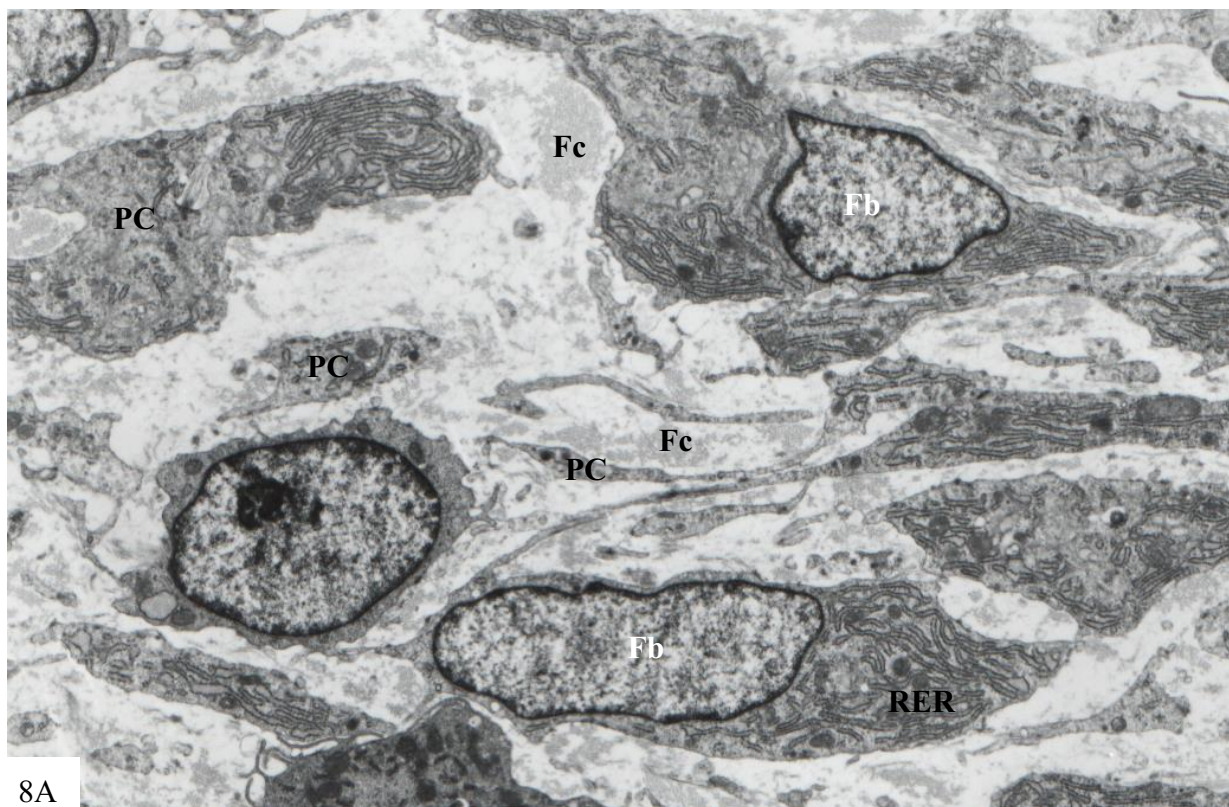
A reação de imunofluorescência para fosfatase ácida lisossomal (ACP2) revelou poucas células da lâmina própria exibindo imunomarcacão citoplasmática, nos ratos de 9 dias. Contudo, foram observadas frequentemente, imunopositividade no citoplasma de osteoblastos, bem como no citoplasma de osteoclastos adjacentes à superfície do tecido ósseo situado entre o germe dentário em desenvolvimento e a lâmina própria (Figs. 7A-C). Na via eruptiva, evidente imunomarcacão foi observada em alguns fibroblastos da lâmina própria dos ratos de 13 (Figs. 7E e 7F) e 16 dias (Figs. 7H e 7I). A matriz extracelular da lâmina própria exibiu positividade à reação nos ratos de 13 e 16 dias, ou seja, na fase de penetração na mucosa (Figs. 7H e 7I). Os cortes incubados com soro não imune (controle negativo), não exibiram estruturas positivas (dados não ilustrados).



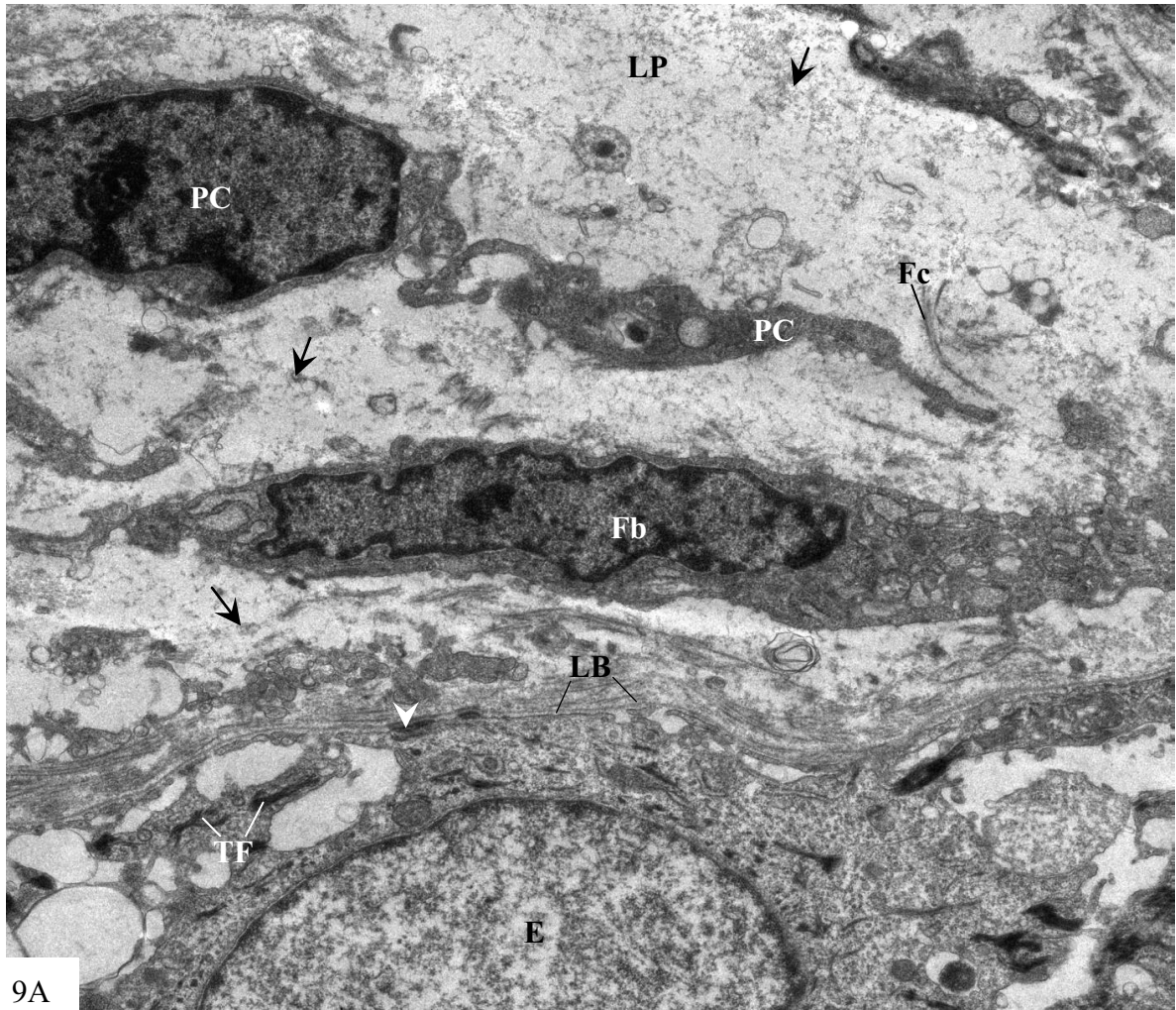
Figuras 7A-7I - Fotomicrografias de porções de lâmina própria (LP) da via eruptiva de 1^{os} molares de ratos com 9 (**Figs. 7A-7C**), 13 (**Figs. 7D-7F**) e 16 dias (**Figs. 7G-7I**); os cortes foram submetidos à reação imunofluorescência para fosfatase ácida (ACP2) e os núcleos contracolorados com DAPI. Nas Figs. **7A-7C** notam-se osteoblastos ACP-2 positivos (Ob) adjacentes à superfície do tecido ósseo (O) que recobre o germe dentário. Na lâmina própria (LP) poucas células positivas são observadas. EO, epitélio oral. 250x. As Figs. **7D-7F** mostram duas células apresentando intensa imunofluorescência (setas) na lâmina própria (LP) da via eruptiva. 600x. Nas **Figs. 7G-7I** evidente imunopositividade é observada nas células (setas) bem como em áreas da matriz extracelular (verde) da lâmina própria (LP). EO, epitélio oral; ER, epitélio reduzido do órgão do esmalte. 250x.

A análise ultraestrutural da lâmina própria revelou diversos fibroblastos exibindo núcleos elípticos ou irregulares e numerosos perfis de retículo endoplasmático rugoso no amplo citoplasma. Estas células emitiam projeções citoplasmáticas em direção as células vizinhas, constituindo uma malha celular densa, principalmente nos ratos de 9 e 11 dias de idade. Além de fibroblastos, macrófagos e mastócitos foram também observados na lâmina própria nas diferentes fases da erupção dentária. No entanto, feixes de fibras colágenas em diferentes orientações foram frequentemente observados entres as células da lâmina própria nos períodos de 9 e 11 dias (Fig. 8A). Nas fases mais avançadas da erupção dentária (13 e 16 dias), escassos feixes de fibras colágenas foram observados (Figs. 8B e 9A). O espaço intercelular exibia frequentemente um material de aspecto granuloso e filamentososo, além de fibrilas colágenas curtas e delgadas (Figs. 9A e 9B). Estruturas elétron-opacas, exibindo tamanho e formas variados, foram observadas, aparentemente, no interior de macrófagos e de fibroblastos (Fig. 8B).

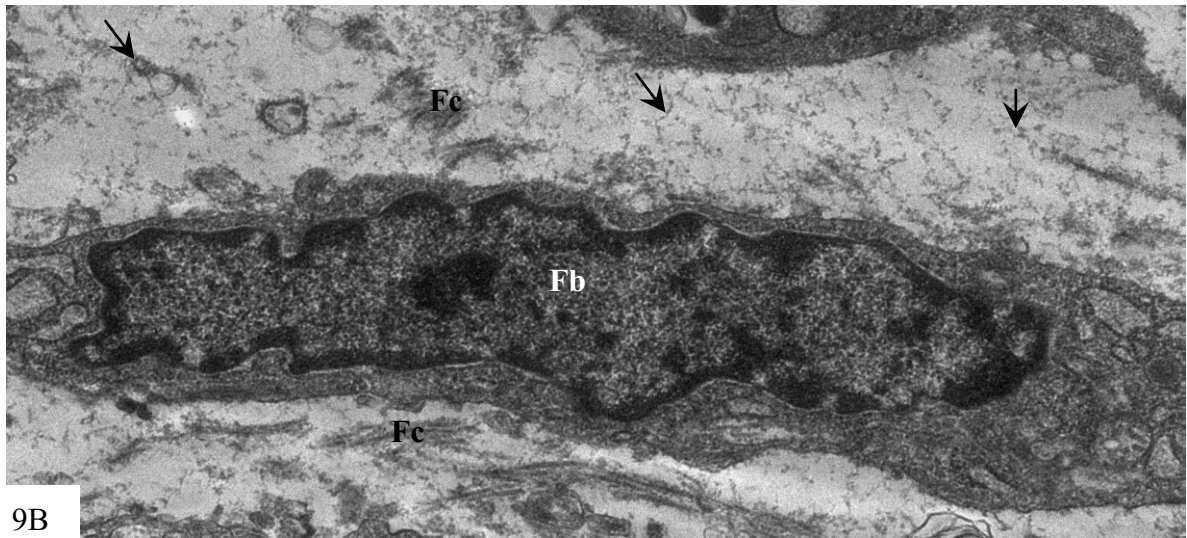
A análise dos cortes ultrafinos dos fragmentos de mucosa oral submetidos à reação da fosfatase ácida *in bloc* revelou estruturas elétron-opacas em fibroblastos e macrófagos da lâmina própria (Figs. 10A, 10B, 11A, 11B, 12A-12C). No interior das células, o produto de reação para fosfatase ácida foi observado como depósitos elétron-opacos distribuídos irregularmente nos lisossomos (Figs. 10A, 10B, 11A, 11B, 12A e 12B) e vacúolos (Fig. 12A e 12C). Amplos vacúolos exibindo depósitos elétron-opacos e material parcialmente digerido foram observados em macrófagos da lâmina própria, principalmente nos estágios mais avançados da fase eruptiva de penetração da mucosa (Figs. 12A e 12C). Depósitos elétron-opacos foram também observados no interior de pequenas porções de células situadas geralmente em áreas onde a matriz extracelular apresentava-se parcialmente degradada. Ocasionalmente, algumas estruturas arredondadas/ovoides exibindo atividade à fosfatase ácida foram observadas aparentemente livres na matriz extracelular da lâmina própria (Figs. 10A e 10C). Depósitos elétron-opacos (produto da reação) não foram observados nos cortes ultrafinos do controle negativo (Fig. 13).



Figuras 8A-B – Eletromicrografias de porções de lâmina própria da via eruptiva de 1º molar de ratos com 09 (**Fig. 8A**) e 13 dias (**Fig. 8B**). A **Fig. 8A** mostra fibroblastos (Fb) exibindo diversos perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER); porções de células (PC) contendo vários perfis de retículo endoplasmático (RER) são também observadas entre os fibroblastos. Feixes de fibrilas colágenas (FC) situam-se entre os fibroblastos (Fb) e porções de células (PC). 3.200x. Na **Fig. 8B**, um fibroblasto (Fb) contém estruturas elétron-opacas e globulares (S) no seu citoplasma; o citoplasma deste fibroblasto (Fb) exhibe diversos perfis de retículo endoplasmático rugoso evidente (RER). Duas células (C) próximas ao fibroblasto (Fb) exibindo retículo endoplasmático rugoso (RER) são também observadas. Fibrilas colágenas (Fc) apresentam-se dispersas entre as células; note a presença de um material fibrilar e de aspecto granuloso (setas) distribuído irregularmente entre escassos feixes de fibras colágenas (Fc). 3.200x.

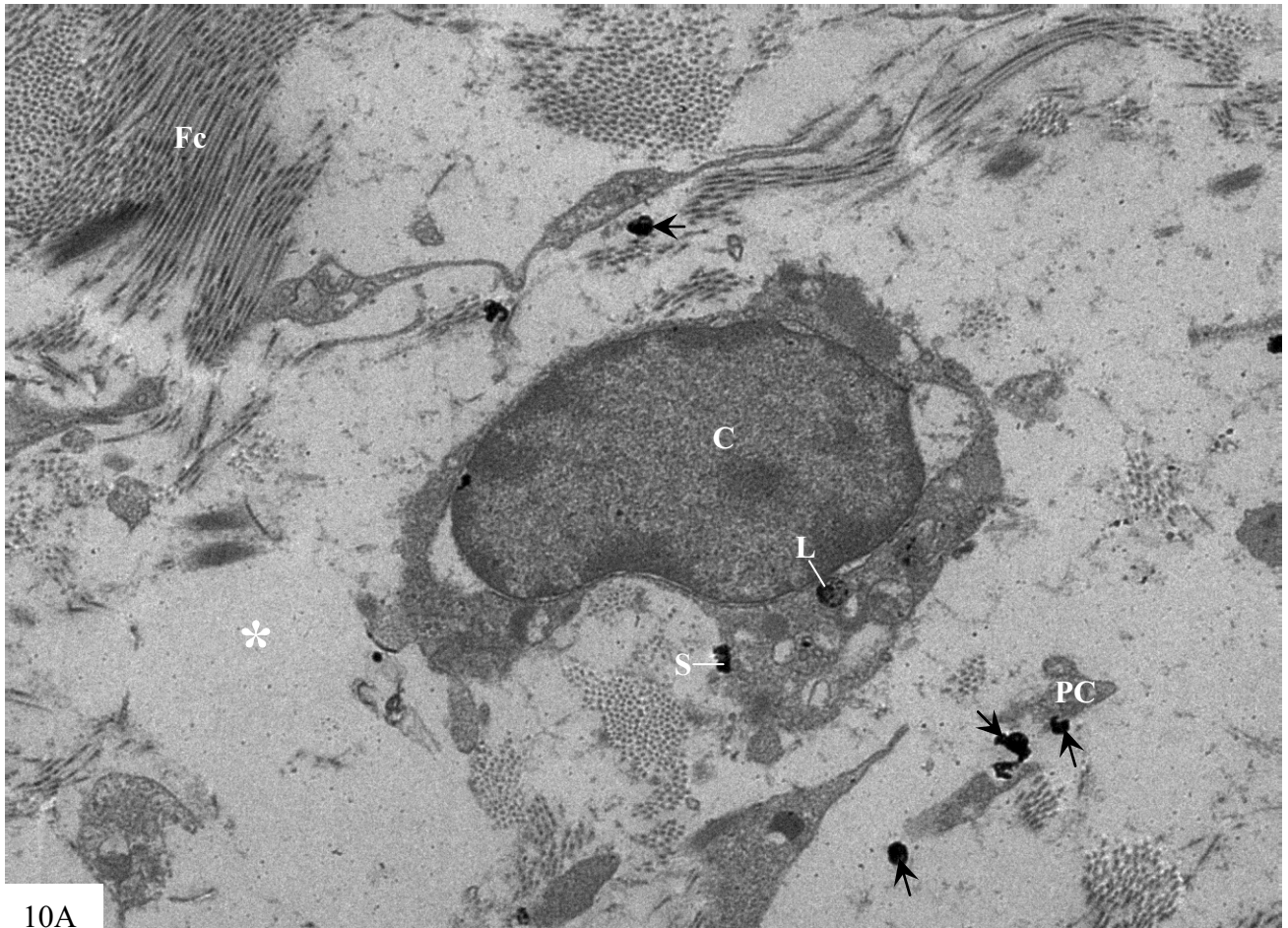


9A

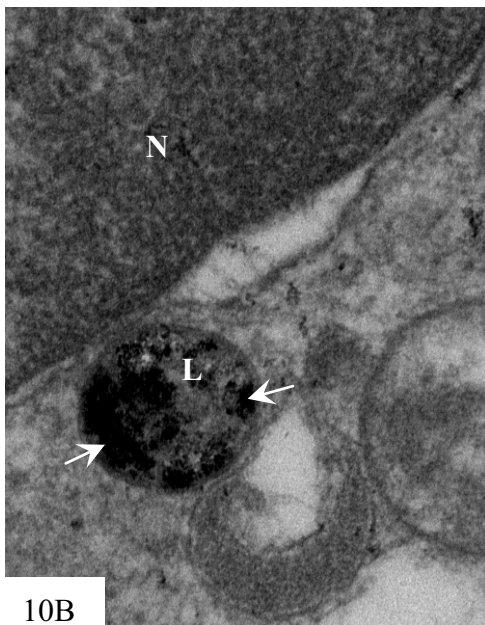


9B

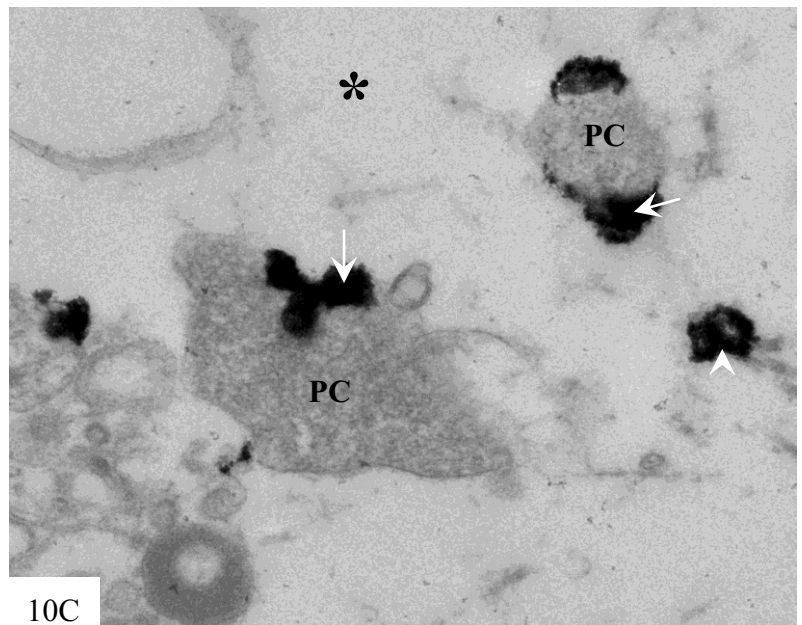
Figuras 9A e 9B – Eletromicrografias de porção de lâmina própria (LP) da via eruptiva de 1º molar de rato com 16 dias de idade. Na **Fig. 9A**, um fibroblasto fusiforme (Fb) exibe retículo endoplasmático rugoso (RER) evidente. Adjacente ao fibroblasto (Fb) observa-se porções de células (PC). A matriz extracelular é constituída, em sua maior parte, por um material de aspecto granular e floculento (setas); escassas fibrilas colágenas (Fc) são observadas. LB, lâmina basal; E, célula epitelial do órgão reduzido do esmalte; TF, tonofilamentos; cabeça de seta, hemidesossomo. 3.200x. A **Fig. 9B**, detalhe da Fig. 9A, mostra a matriz extracelular ao redor do fibroblasto (Fb) constituída pelo material de aspecto floculento (setas); material filamentoso e granuloso que formam uma fina rede material. As escassas fibrilas colágenas (Fc) apresentam-se com pequena extensão. 5.100x.



10A

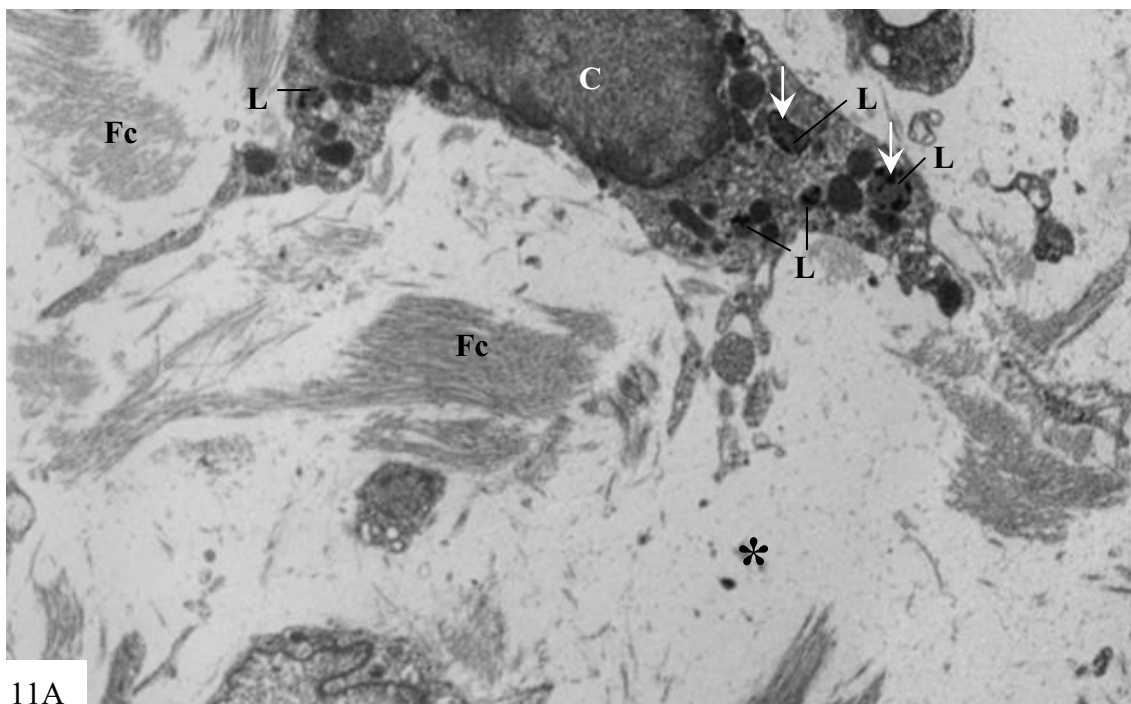


10B

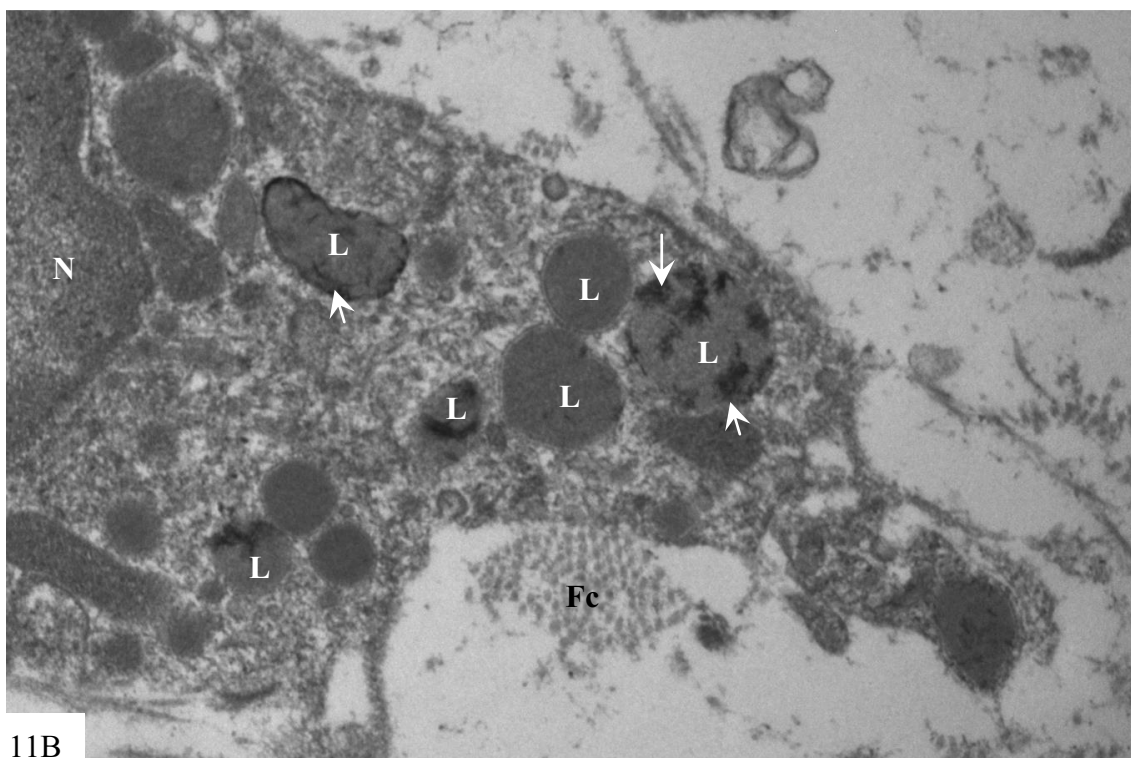


10C

Figuras 10A-10C – Eletromicrografias de porções de lâmina própria da via eruptiva de 1º molar de ratos com 11 dias fosfatase ácida. Na **Fig. 10A**, uma célula mononucleada (C) de contorno irregular exhibe no seu escasso citoplasma, lisossomo (L) contendo precipitado fortemente elétron-opaco, ou seja, positivo à fosfatase ácida; uma estrutura irregular positiva à fosfatase ácida (S) é observada na superfície da célula (C). Pequenas estruturas com formatos irregulares exibindo forte elétron-opacidade (setas) são observadas na matriz extracelular, próximas à célula (C) ou a porções de células (PC). Escasso material fibrilar é observado no espaço extracelular (asteriscos), ao redor da célula (C). Fc, feixes de fibrilas colágenas. 2.475x. A **Fig. 10B**, detalhe da área demarcada em 10A, mostra o lisossomo (L) exibindo material de aspecto heterogêneo positivo à fosfatase ácida (setas). N, núcleo. 15.400x. **Fig. 10C** – mostra material precipitado positivo à fosfatase ácida, fortemente elétron-opaco (setas), no interior de estruturas delimitadas de aspecto indistinguível a de porções citoplasmáticas (PC), situados na matriz extracelular (asterisco). 7.890x

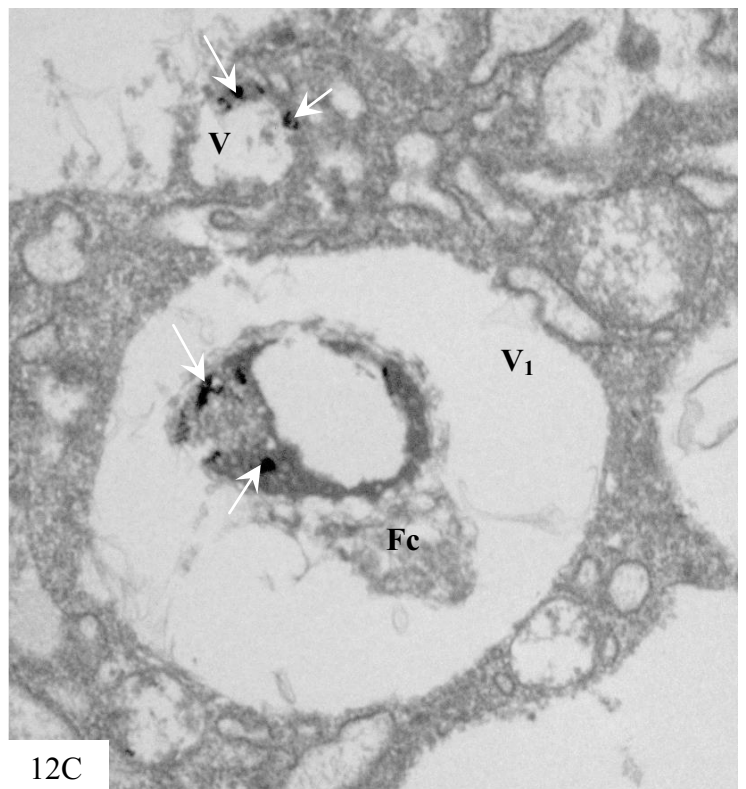
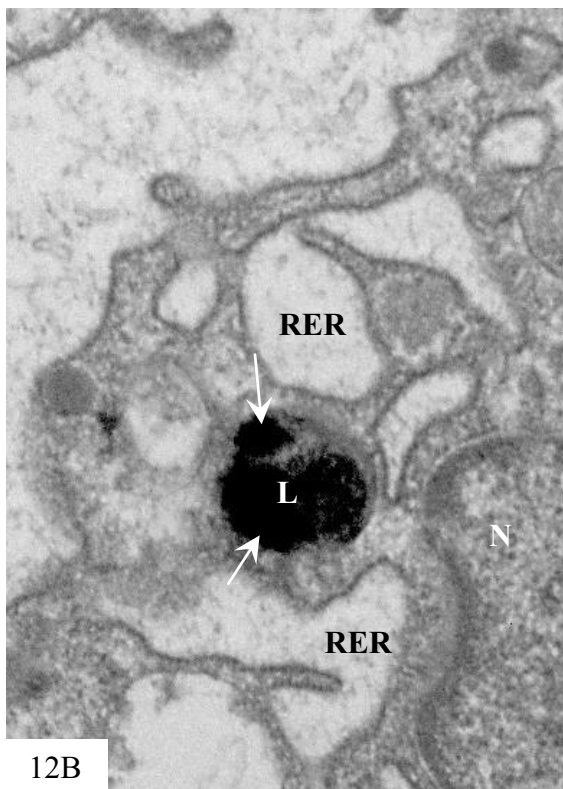
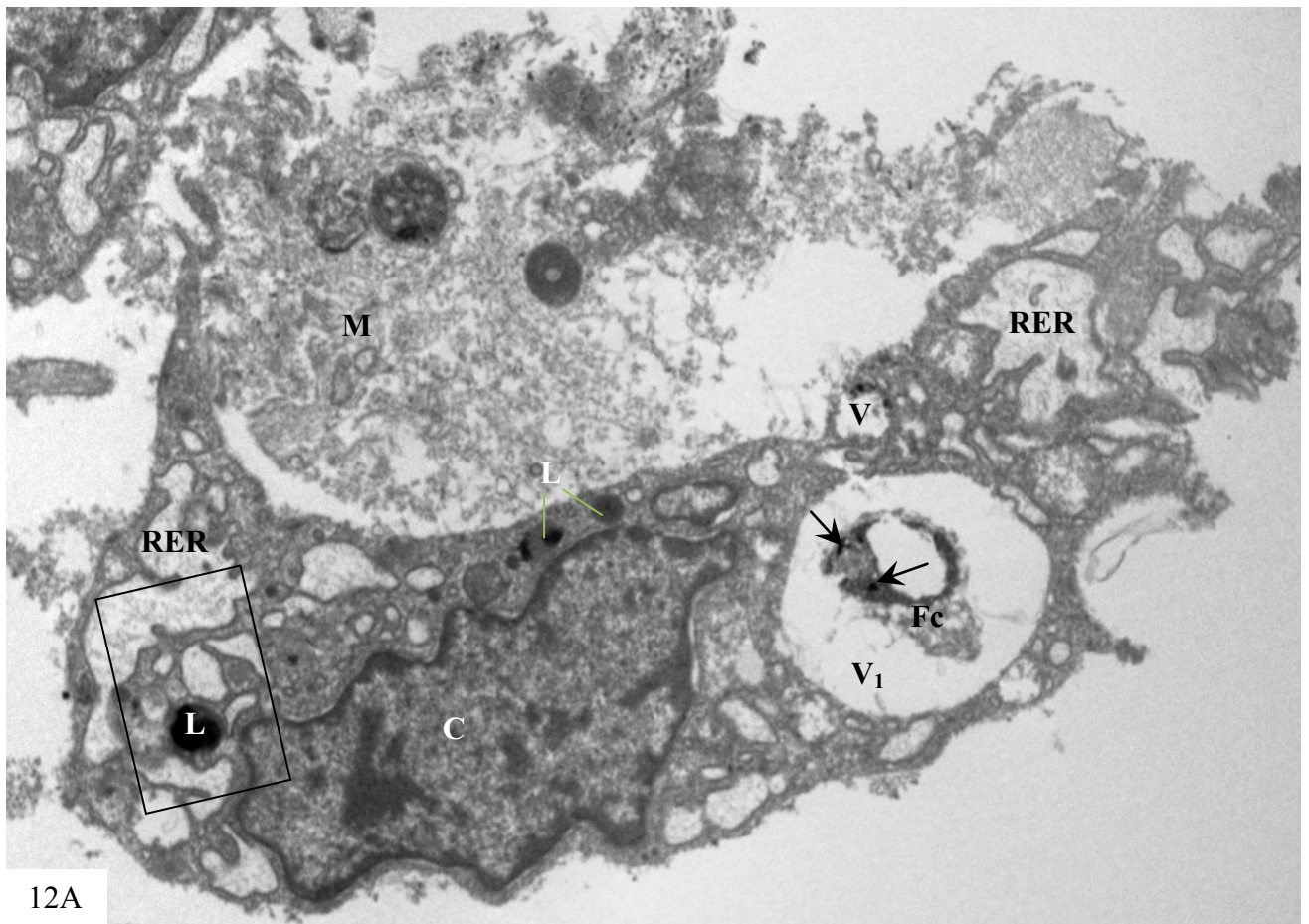


11A



11B

Figuras 11A e 11B – Eletromicrografias de porção da lâmina própria da via eruptiva de 1º molar de rato com 16 dias, incubada com o substrato para reação da fosfatase ácida. **Figura 11A** – uma porção de um fibroblasto (C), apresenta diversos lisossomos (L) exibindo depósitos de formato irregular e fortemente elétron-opacos (setas). Um material de aspecto floculento (asterisco) situa-se entre a célula “C” e alguns feixes de fibrilas colágenas (Fc). 3.800x A **Fig. 11B** mostra uma porção da célula “C” da Fig. 11A. Lisossomos (L) esféricos e elípticos/alongados exibem massas elétron-opacas irregularmente depositadas no seu interior (setas). N, Núcleo; Fc, Fibrilas colágenas. 13.800x.



Figuras 12A-12C – Eletromicrografias de uma porção da lâmina própria da via eruptiva do 1º molar de rato de 16 dias incubada com substrato para fosfatase ácida. Na **Fig. 12A**, uma célula irregular (C), com aparência de macrófago, exibe lisossomos (L) e alguns vacúolos (V) com tamanho variável contendo depósitos fortemente elétron-opaco, ou seja, positivos à fosfatase ácida. Um vacúolo amplo (V₁) contém restos de material (Fc) com depósitos positivos à fosfatase ácida (setas). Note que um material de aspecto granular e membranoso (M) está parcialmente circundado pela célula “C”. RER, retículo endoplasmático rugoso. 5.300x. A **Fig. 12B**, detalhe da área demarcada em 12A, mostra um lisossomo (L) quase totalmente preenchido por depósito elétron-opaco revelando a positividade à fosfatase ácida (setas). N, núcleo; RER, retículo endoplasmático rugoso. 16.180x. **Fig. 12C** – detalhe do vacúolo amplo (V₁) da Fig. 12A. Alguns depósitos positivos à fosfatase ácida (setas) são observados sobre o material de aspecto floculento/granular (Fc). Acima, nota-se um vacúolo menor (V) contendo depósitos elétron-opacos, atividade fosfatase ácida positiva, na sua porção periférica. 10.320x.

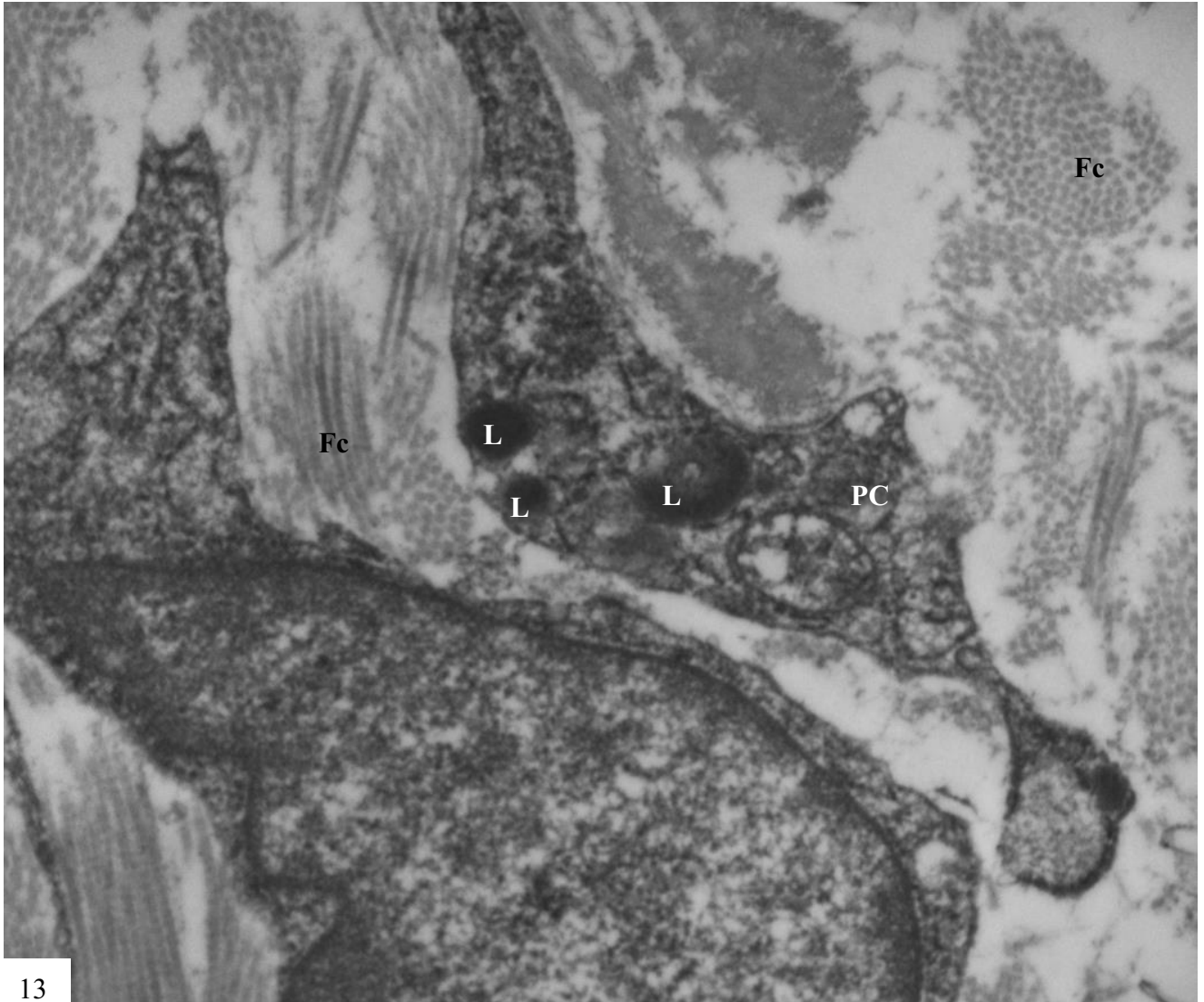


Figura 13 – Eletromicrografia de porção da lâmina própria da via eruptiva de 1º molar de rato com 16 dias, incubada sem o substrato β -glicerofosfato (controle negativo) da reação da fosfatase ácida. Uma porção de uma célula (PC) exhibe lisossomos (L); note que não são observados os depósitos elétron-opacos, típicos do produto de reação da fosfatase ácida. Fc, Fibrilas colágenas; (Fb), porção de um fibroblasto. 14.084x.

6 – Discussão

Com base na análise morfológica da via eruptiva dos primeiros molares de ratos com 9 a 16 dias, foi possível caracterizar as fases da erupção dentária. Desse modo, nossos resultados mostraram que os animais com 9 e 11 dias de idade apresentam-se na fase eruptiva intraóssea, sendo evidente o processo de reabsorção nas trabéculas ósseas na porção oclusal do germe dentário, tal como previamente relatado (Cerri et al., 2010; Oralová et al, 2014). Neste período, há uma intensa atividade de remodelação do tecido ósseo adjacente, evidenciada pela presença de osteoclastos ativos na região (Wise, 2009; Cerri et al., 2010). Nos períodos subsequentes, 13 e 16 dias de idade, o 1º molar superior apresentava-se atravessando a mucosa oral, enquanto que nos ratos de 16 dias, o germe dentário apresentou-se muito próximo à irrupção; dessa maneira, a lâmina própria apresentava-se restrita a uma fina camada de tecido conjuntivo interposto entre o epitélio reduzido do esmalte e o epitélio oral. Assim, com base nestas evidências morfológicas, podemos classificar os períodos de 13 e 16 dias como fase de penetração na mucosa (Marks, 1995; Marks, Schroeder, 1996; Cerri et al., 2010).

Nossos resultados revelaram que ocorre uma redução significativa na porcentagem de fibras birrefringentes da lâmina própria na fase de penetração na mucosa, em comparação à fase eruptiva intraóssea (ratos com 9 e 11 dias). A lâmina própria dos animais com 11 e 13 dias não apresentou diferença significativa entre si, resultado que pode ser atribuído ao fato destes períodos representarem fases de transição, ou seja, momento final da fase eruptiva intraóssea e início da fase de penetração da mucosa. A análise dos matizes limitou-se aos matizes vermelho-laranja, amarelo e verde, pois o colágeno, sob luz polarizada, refrata apenas estes três comprimentos de onda, havendo uma relação direta da espessura das fibras com a cor refratada (Pérez-Tamayo, Montfort, 1980), embora a espessura das fibras não seja o único fator responsável pela variação de cor (Dayan et al., 1989; Wan et al., 2013). Com a técnica picrosirius sob luz polarizada, foi possível observar que há uma expressão mais evidente do matiz vermelho em comparação aos demais matizes. Este resultado é reforçado pela análise morfológica que revelou, nos períodos de 9 e 11 dias, fibras colágenas espessas e contínuas,

formando feixes densos; estes densos feixes de colágeno exibiram forte birrefringência com coloração vermelha-alaranjada. O colágeno representa uma parte considerável da lâmina própria nestes períodos, aproximadamente 26-29%. Assim, estes resultados são condizentes com a ideia de que o tecido conjuntivo da lâmina própria possa exercer, pelo menos no início, uma resistência mecânica ao dente em erupção, assim como ocorre com o tecido conjuntivo durante a formação do ligamento periodontal (Beertsen et al., 2002). Em contrapartida, no início da fase eruptiva de penetração na mucosa (ratos de 13 dias), verificou-se uma redução sutil na birrefringência vermelha/laranja, indicando uma perda no conteúdo de colágeno. Além disso, houve aumento de áreas anisotrópicas e mudanças estruturais nos feixes de fibras colágenas, tais como uma diminuição na espessura destes feixes. Na lâmina própria dos ratos de 16 dias, esta redução foi de aproximadamente 60% em relação aos períodos iniciais (9 e 11 dias); as mudanças estruturais dos feixes de colágeno também foram nítidas, restringindo-se a pequenos fragmentos birrefringentes. Portanto, estes resultados indicam que durante a fase eruptiva de penetração na mucosa ocorre um processo de degradação do colágeno, acarretando na sua redução.

Além da redução do colágeno, os nossos resultados referentes à MMP-1 revelaram um aumento significativo no número de células positivas indicando, portanto, que esta enzima deve ter uma participação importante na degradação do durante a erupção. A MMP-1 pertence à família de metaloproteinase da matriz com importante participação na degradação de colágeno tipo I. As MMPs não são armazenadas na maioria das células, salvo em macrófagos e neutrófilos. As MMP-1 são pró-metaloproteinases e que são clivadas e ativas na degradação do colágeno, somente na matriz extracelular. Contudo, vários fatores podem ativar a transcrição da MMP-1, tais como FGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos), TGF (Fator de Crescimento Transformador) e Interleucina-1 (IL-1) (Nagase, Woessner, 1999; Pardo, Selman, 2005). As MMP-1 não são liberadas se não houver uma sinalização para a participação destas enzimas nos processos de degradação e remodelação dos tecidos (Woessner, 1991). A MMP-1 participa da degradação dos colágenos I, II, III, V e XI (Amălinei et al., 2010); portanto a imunoexpressão de MMP-1 pelas células da lâmina própria, bem como a redução significativa de colágeno birrefringente são

fortes evidências de que esta enzima participe do processo de degradação do colágeno da via eruptiva. Uma variabilidade na imunexpressão de MMP-9 na lâmina própria da via eruptiva de molares de ratos, com evidente aumento no número de células positivas, bem como na intensidade da reação na fase mais avançada de penetração na mucosa (16 dias) já foi demonstrado (Cerri et al., 2010). Considerando que a MMP-9 (Gelatinase B) é uma metaloproteinase da matriz envolvida com a degradação de componentes da substância amorfa e colágeno I denaturado, foi sugerido que o aumento da imunexpressão de MMP-9 deveria estar envolvido com o processo de degradação da lâmina própria da via eruptiva (Cerri et al., 2010). No presente estudo, os nossos achados indicam que a MMP-1 é produzida pelas células da lâmina própria, principalmente, fibroblastos e macrófagos. O aumento significativo no número de células MMP-1-positivas, associado à significativa redução no conteúdo de colágeno, indica que esta metaloproteinase deve ser produzida pelas células da lâmina própria, as quais secretam esta enzima para a matriz extracelular (aonde é ativada) e, conseqüentemente, atua na degradação do colágeno da via eruptiva.

Os resultados obtidos da reação imuno-histoquímica para detecção de fosfatase ácida lisossomal (ACP2) sugerem a participação desta enzima no processo de degradação da via eruptiva. A positividade à ACP2, observada principalmente em osteoclastos no período intraósseo da erupção, ou seja, 9 e 11 dias, sugere uma participação desta enzima no processo de remodelação da cripta óssea para o estabelecimento da via eruptiva. Nestes períodos, raras células foram positivas à ACP2; a análise ultraestrutural mostrou poucas células contendo lisossomos positivos à fosfatase ácida. Este resultado deve-se ao fato de que o germe dentário ainda não atingiu o íntimo contato com a lâmina própria e, portanto, a degradação do tecido ainda não foi iniciada. Estas observações suportam os dados obtidos com o picrossírius, no qual o colágeno da lâmina própria não mostra alterações significantes na fase eruptiva intraóssea.

Em contrapartida, aos 13 e 16 dias, ou seja, na fase de penetração na mucosa, a lâmina própria apresentou evidente imunopositividade à ACP2 em fibroblastos, macrófagos bem como células endoteliais. A análise ultraestrutural

revelou que escassos feixes de fibras colágenas estavam presentes, principalmente, circundando as células que continham diversos lisossomos positivos à fosfatase ácida. Usualmente, o espaço extracelular apresentava material de aspecto granular e floculento, bem como sinais evidentes de degradação dos componentes da matriz extracelular (Ashworth et al., 1999; Bosman, Stamenkovic, 2003; Sawada, 2011). Depósitos elétron-opacos, representando a positividade à fosfatase ácida, foram também observados em porções celulares de variados tamanhos e formas, aparentemente, dissociados das células. A presença de macrófagos e fibroblastos com depósitos elétron-opacos, portanto positivos à fosfatase ácida, no interior de amplos vacúolos contendo restos de material digeridos indicam a participação desta enzima no processo de degradação intracelular de componentes da matriz extracelular bem como de restos celulares da via eruptiva.

Durante a embriogênese de diferentes espécies animais a ACP2 parece exercer um papel fundamental para o desenvolvimento, sendo evidente no tecido nervoso de rato (Geier et al., 1992), vesícula vitelínea de anfíbios (Lemanski, Aldoroty, 1977), ou mesmo no endométrio de ratas (Katz, 2005) e em processos patológicos, como na doença periodontal (Kina et al., 1996). Em um experimento utilizando ratos *knockout* à ACP2, os animais apresentaram anormalidades esqueléticas, acúmulo de material heterogêneo em lisossomos de células da glia, em podócitos e néfrons, sendo, portanto, evidente a importância da ACP2 na formação dos tecidos (Saftig et al., 1997). Estes exemplos reforçam a importância da ACP2 na dinâmica degradação/remodelação de diferentes tecidos. Assim, a presença e participação da ACP2 na degradação da lâmina própria durante a erupção, confirmada pelos resultados imuno-histoquímicos e ultraestruturais, é um dado inédito na literatura e parece ser mais um exemplo que reforça o papel desta enzima em processos dinâmicos de degradação e remodelação tecidual.

Um resultado intrigante, verificado no presente estudo, foi a imunopositividade da matriz extracelular à ACP2, conforme observado nas análises imuno-histoquímicas (convencional e imunofluorescência) bem como ultraestrutural. Embora a ACP2 seja uma enzima lisossomal, ou seja, intracelular, houve uma forte imunomarcagem na matriz extracelular na fase de penetração da mucosa,

principalmente na fase mais avançada (ratos de 16 dias). A presença de fosfatase ácida ativa na matriz extracelular foi relatada no tecido decidual anti-mesometrial de útero de ratas durante a involução (Katz, 1998; Katz, 2005), bem como foi demonstrada na matriz extracelular do disco epifisário (Thyberg, Friberg, 1970). Porém, há controvérsias quanto a possível presença da fosfatase ácida na matriz extracelular, pois esta pode ser ocasionada pela fixação química (Akisaka et al., 1988), ou ser de fato secretada para a matriz (Roach, 1999). Portanto, a ocorrência da imunopositividade à ACP2 na matriz pode sugerir uma participação desta enzima em tecidos de rápida degradação, como na via eruptiva. Contudo, a ACP2 pode estar presente de forma não associada ao lisossomo, ou parcialmente associada à membrana lisossomal (Lemansky et al., 1985; Pohmann et al., 1988). Tal fato pode ser um indício para explicar a presença de estruturas positivas à ACP2 na matriz extracelular sem, contudo, estarem associadas às células.

Portanto, os nossos resultados indicam que os componentes da matriz extracelular da lâmina própria, como o colágeno, são intensamente degradados durante o processo eruptivo. Adicionalmente, a MMP-1 e fosfatase ácida participam da degradação dos componentes da matriz extracelular. Entretanto, mais estudos são necessários para a melhor compreensão da presença da fosfatase ácida na matriz extracelular.

7 - CONCLUSÕES

6- Conclusões

- O estabelecimento da via eruptiva envolve alterações estruturais dos feixes de colágeno na lâmina própria que culminam na redução significativa desta proteína na fase eruptiva de penetração na mucosa.
- O aumento significativo de células positivas à MMP-1 na fase mais avançada da erupção (16 dias) indica que esta metaloproteinase da matriz participa na degradação do colágeno durante a erupção dentária;
- A presença da fosfatase ácida nas células da lâmina própria, principalmente nas fases avançadas da erupção, evidencia uma participação na digestão intracelular dos remanescentes de colágeno pelas células da lâmina própria, contribuindo, assim, para o estabelecimento da via eruptiva.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8- Referências Bibliográficas

Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(6-7):1101-10

Akisaka T, Kawaguchi H, Subita GP, Shigenaga Y, Gay CV. Ultrastructure of matrix vesicles in chick growth plate as revealed by quick freezing and freeze substitution. *Calcif Tissue Int.* 1988; 42(6):383-93.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M et al. Fundamentos da Biologia Celular. 3ª edição. Trad: Ana Loone Chies Santiago-Santos et al. Porto Alegre. Artmed. 2011. p 704-705.

Amălinei C, Căruntu ID, Giușcă SE, Bălan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51(2):215-28

Artuc M, Steckelings UM, Henz BM. Mast cell-fibroblast interactions: human mast cells as source and inducers of fibroblast and epithelial growth factors. *J Invest Dermatol.* 2002; 118(3):391-5.

Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochem J.* 1999; 340: 171-81.

Bailey K1, Rahimi Balaei M1, Mannan A2, Del Bigio MR3, Marzban H1. Purkinje cell compartmentation in the cerebellum of the lysosomal Acid phosphatase 2 mutant mouse (nax - naked-ataxia mutant mouse). *PLoS One.* 2014; 9(4):e94327.

Barka T. A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase. *Nature.* 1960; 187:248-9.

Baumbach GA, Saunders PT, Ketcham CM, Bazer FW, Roberts RM. Uteroferrin contains complex and high mannose-type oligosaccharides when synthesized in vitro. *Mol Cell Biochem.* 1991; 105(2):107-17.

Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, et al. On the role of MT1-MMP, a matrix metalloproteinase essential to collagen remodeling, in murine molar eruption and root growth. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110(6):445-51.

- Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas-Neto AG.** Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. 1ª ed. EDART. São Paulo. 1976.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al.** Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med. 1993; 4(2):197-250.
- Bonucci E, Nanci A.** Alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase in osteoblasts of normal and pathologic bone. Ital J Anat Embryol. 2001;106(2 Suppl 1):129-33.
- Bosman FT, Stamenkovic I.** Functional structure and composition of the extracellular matrix. J Pathol. 2003; 200(4):423-8.
- Bouas-Laurent, H.** Photochromism: molecules and systems. 1ª Ed. Amsterdam (NLD). Elsevier. 2003.
- Bradaschia-Correa V, Massa LF, Arana-Chavez VE.** Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. Cell Tissue Res. 2007; 330(3):475-85
- Braukle T, Bonifacino J.S.** Sorting of lysosomal proteins Biochim Biophys Acta. 2009; 1793(4):605-14.
- Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U.** Interstitial collagenases as markers of tumor progression Clin Cancer Res. 2000; 6(12):4823-30.
- Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN.** Acid phosphatases. Mol Pathol. 2002; 55(2):65-72.
- Cahill DR, Marks SC Jr.** Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. J Oral Pathol. 1980; 9(4):189-200.
- Cerri PS, Pereira-Júnior JA, Biselli NB, Sasso-Cerri E.** Mast cells and MMP-9 in the lamina propria during eruption of rat molars: quantitative and immunohistochemical evaluation. J Anat. 2010; 217(2):116-25.
- Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M.** Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? Histochemistry 1989; 93(1):27-9.

- Deporter DA, Ten Cate AR.** Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase in collagen-containing vesicles of fibroblasts. *J Anat.* 1973; 114(Pt 3):457-61.
- Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ.** Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol.* 2015. pii: S0945-053X(15)00005-0. doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.004.
- Everts V, van der Zee E, Creemers L, Beertsen W.** Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodelling. *Histochem J.* 1996; 28(4):229-45.
- Foster BL, Nagatomo KJ, Tso HW, Tran AB, Nociti FH Jr, Narisawa S, Yadav MC, McKee MD, Millán JI, Somerman MJ.** Tooth root dentin mineralization defects in a mouse model of hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(2):271-82.
- Geier C, Kreysing J, Boettcher H, Pohlmann R, von Figura K.** Localization of lysosomal acid phosphatase mRNA in mouse tissues. *J Histochem Cytochem.* 1992; 40(9):1275-82.
- Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, et al.** Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development.* 1996; 122(10):3151-62.
- Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA.** Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12: 9-18.
- Hoshi K, Amizuka N, Oda K, Ikehara Y, Ozawa H.** Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biol.* 1997; 107(3):183-91.
- Jilka RL.** Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone.* 1998; 23(2):75-81.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR.** Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11(4):447-55.
- Katchburian E, Arana V.** *Histologia e Embriologia Oral: texto-atlas-correlações clínicas.* 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2012. 372p.

Katz SG. Demonstration of extracellular acid phosphatase activity in the involuting, antimesometrial decidua in fed and acutely fasted mice by combined cytochemistry and electron microscopy. *Anat Rec.* 1998; 252(1):1-7.

Katz SG. Extracellular breakdown of collagen by mice decidual cells. A cytochemical and ultrastructural study. *Biocell.* 2005; 29(3):261-70.

Kawamura M, Tanaka K, Toiyama Y, Okugawa Y, Okigami M, Yasuda H, et al. Clinical significance of tartrate-resistant acid phosphatase type-5 expression in human gastric cancer. *Anticancer Res.* 2014; 34(7):3425-9.

Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001; 142(12):5050-5.

Kina, J.R.; Taga, E.M.; Silva, V.G.; Garcia, V.G. Quantificação das enzimas lisossômicas aril-sulfatase, beta hexosaminidase e fosfatase ácida na placa bacteriana dental. *Revista de Odontologia da UNESP*, vol.25, n.1, p.125-133, 1996.

Kjær I. Mechanism of Human Tooth Eruption: Review Article Including a New Theory for Future Studies on the Eruption Process. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:341905. Epub 2014.

Larson EK, Cahill DR, Gorski JP, Marks SC Jr. The effect of removing the true dental follicle on premolar eruption in the dog. *Arch Oral Biol.* 1994; 39(4):271-5.

Lee H, Overall CM, McCulloch CA, Sodek J. A critical role for the membrane-type 1 matrix metalloproteinase in collagen phagocytosis. *Mol Biol Cell.* 2006; 17(11):4812-26.

Lemanski LF, Aldoroty R. Role of acid phosphatase in the breakdown of yolk platelets in developing amphibian embryos. *J Morphol.* 1977; 153(3):419-25.

Lemansky P, Gieselmann V, Hasilik A, von Figura K. Synthesis and transport of lysosomal acid phosphatase in normal and I-cell fibroblasts. *J Biol Chem.* 1985; 260(15):9023-30.

- López-De León A, Rojkind M.** A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem.* 1985; 33(8):737-43.
- Łukaszewicz-Zajac M1, Mroczko B, Słowik A.** Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neural Transm.* 2014; 121(11):1387-97.
- Manni ML, Czajka CA, Oury TD, Gilbert TW.** Extracellular matrix powder protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Tissue Eng Part A.* 2011 Nov;17(21-22):2795-804.
- Marks SC Jr, Schroeder HE.** Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec.* 1996; 245(2):374-93.
- Marks SC Jr, Gorski JP, Wise GE.** The mechanisms and mediators of tooth eruption--models for developmental biologists *Int J Dev Biol.* 1995; 39(1):223-30
- Marks SC Jr.** The basic and applied biology of tooth eruption. *Connect Tissue Res.* 1995; 32(1-4):149-57.
- Marks SC Jr, Cahill DR.** Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *Arch Oral Biol.* 1984;29(4):311-22.
- Martin TJ.** Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. *World J Orthop.* 2013; 18;4(4):186-97.
- Marynka-Kalmani K1, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, Pitaru S.** The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells.* 2010 May;28(5):984-95. doi: 10.1002/stem.425.
- Matteini P, Rossi F, Menabuoni L, Pini R.** Microscopic characterization of collagen modifications induced by low-temperature diode-laser welding of corneal tissue. *Lasers Surg Med.* 2007; 39(7):597-604.
- Mauch C.** Regulation of connective tissue turnover by cell-matrix interactions. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290 Suppl:S30-6.
- Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Thornhill MH.** Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *J Dent Res.* 2007; 86(2):115-24.

Montes GS, Junqueira LC. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86 Suppl 3:1-11.

Mor S, Nagler A, Barak V, Handzel ZT, Geller-Bernstein C, Fabian I. Histamine enhances granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol.* 1995; 58(4):445-50.

Moss DW1, Raymond FD, Wile DB. Clinical and biological aspects of acid phosphatase. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1995; 32(4):431-67.

Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 2008. 29:290–308

Naesse EP, Schreurs O, Helgeland K, Schenck K, Steinsvoll S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival mast cells in persons with and without human immunodeficiency virus infection *J Periodontal Res.* 2003; 38(6):575-82.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006; 69(3):562-73.

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30;274(31):21491-4.

Oralová V, Chlastáková I, Radlanski R, Matalová E. Distribution of BMP6 in the alveolar bone during mouse mandibular molar eruption. *Connect Tissue Res.* 2014; 1:1-27. [Epub ahead of print].

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(3):221-33.

Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37(2):283-8.

Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Rey JM, García-García A. RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(5):679-86.

- Pérez-Tamayo R, Montfort I.** The susceptibility of hepatic collagen to homologous collagenase in human and experimental cirrhosis of the liver. *Am J Pathol.* 1980; 100(2): 427–442.
- Phan TC, Xu J, Zheng MH.** Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol.* 2004; 19(4):1325-44.
- Piérard G.** Sirius red polarization method is useful to visualize the organization of connective tissues but not the molecular composition of their fibrous polymers. *Matrix.* 1989; 9: 68-71.
- Pohlmann R1, Krentler C, Schmidt B, Schröder W, Lorkowski G, Culley J et al.** Human lysosomal acid phosphatase: cloning, expression and chromosomal assignment. *EMBO J.* 1988; 7(8):2343-50.
- Que BG, Wise GE.** Colony-stimulating factor-1 and monocyte chemotactic protein-1 chemotaxis for monocytes in the rat dental follicle. *Arch Oral Biol.* 1997; 42(12):855-60.
- Ra HJ, Parks WC.** Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol.* 2007; 26(8):587-96.
- Retamoso LB, Montagner F, Camargo ES, Vitral RW, Tanaka OM.** Polarized light microscopic analysis of bone formation after inhibition of cyclooxygenase 1 and 2. *Anat Rec (Hoboken).* 2010; 293(2):195-9.
- Ricard-Blum S.** The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(1):a004978. doi: 10.1101/cshperspect.a004978.
- Rich L, Whittaker P.** Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. J. Morphol. Sci.* (2005) 22(2), 97-104
- Riggs BL.** The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest.* 2000; 106(10):1203-4.
- Roach HI.** Association of matrix acid and alkaline phosphatases with mineralization of cartilage and endochondral bone. *Histochem J.* 1999; 31(1):53-61.
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH.** Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006; 8:455-98.

- Roodman GD.** Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev.* 1996; 17(4):308-32.
- Saftig P, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Wolff J, Evers M, Köster A, et al.** Mice deficient in lysosomal acid phosphatase develop lysosomal storage in the kidney and central nervous system. *J Biol Chem.* 1997; 272(30):18628-35.
- Sawada T.** Resorption of elastic fibers in monkey gingival connective tissue: ultrastructural and immunocytochemical evidence. *J Mol Histol.* 2011; 42(2):123-8.
- Sheldon H, Zetterqvist H, Brandes D.** Histochemical reactions for electron microscopy: acid phosphatase. *Exp Cell Res.* 1955; 9(3):592-6
- Squier CA, Kremer MJ.** Biology of Oral Mucosa and Esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001 (29): 7-15
- Suter A, Everts V, Boyde A, Jones SJ, Lüllmann-Rauch R, Hartmann D, et al.** Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice. *Development.* 2001; 128(23):4899-910.
- Takamatsu S, Nakano K.** Regulation of interleukin-6, and macrophage colony-stimulating factor mRNA levels by histamine in stromal cell line (MC3T3-G2/PA6) *Inflamm Res.* 1998; 47(5):221-6.
- Teitelbaum SL.** Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol.* 2007; 170(2):427-35.
- Ten Cate AR.** Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função. 7^a ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. 2008. 410p
- Thyberg J, Friberg U.** Ultrastructure and acid phosphatase activity of matrix vesicles and cytoplasmic dense bodies in the epiphyseal plate. *J Ultrastruct Res.* 1970; 33(5):554-73.
- Tsubota M, Sasano Y, Takahashi I, Kagayama M, Shimauchi H.** Expression of MMP-8 and MMP-13 mRNAs in rat periodontium during tooth eruption. *J Dent Res.* 2002; 81(10):673-8.
- Vallee BL, Auld DS.** Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(1):220-4.

- Van Lint P, Libert C.** Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007 Dec;82(6):1375-81
- Van Wart HE, Birkedal-Hansen H.** The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(14):5578-82.
- Vannier E, Dinarello CA.** Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-6 gene expression and protein synthesis via H2 receptors in peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem.* 1994; 269(13):9952-6.
- Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinckerhoff CE.** Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1996;6(4):391-411.
- Vu TH, Werb Z.** Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000; 14(17):2123-33.
- Wan C, Hao Z, Wen SA** quantitative comparison of morphological and histological characteristics of collagen in the rabbit medial collateral ligament. *Ann Anat.* 2013; 195(6):562-9.
- Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG.** Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol.* 1994; 89(5):397-410.
- Wise GE, Yao S, Odgren PR, Pan F.** CSF-1 regulation of osteoclastogenesis for tooth eruption. *J Dent Res.* 2005; 84(9):837-41.
- Wise GE.** Cellular and molecular basis of tooth eruption. *Orthod Craniofac Res.* 2009; 12(2):67-73.
- Wise GE, He H, Gutierrez DL, Ring S, Yao S.** Requirement of alveolar bone formation for eruption of rat molars. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119(5):333-8.

Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991; 5(8):2145-54

Wolman M. Polarized light microscopy as a tool of diagnostic pathology. *J Histochem Cytochem.* 1975; 23(1):21-50.

São Paulo, 25 de agosto de 2014
CEUA N 608419

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Jose Paulo De Pizzol Junior
Depto/Disc: Depto. De Morfologia E Genética/ Disc. De Histologia
Paulo Sérgio Cerri (orientador)

Título do projeto: "A participação de metaloproteinase de matriz (MMP-1) e da fosfatase ácida na degradação da via eruptiva".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A erupção dentária é definida como o fenômeno de movimentação do germe dentário de sua posição intraóssea inicial à sua posição de oclusão. Para a movimentação, é necessário que os tecidos adjacentes sofram remodelação. Na fase intraóssea, as trabéculas ósseas que envolvem o germe dentário sofrem remodelação, ao passo que o germe dentário movimenta-se no sentido oclusal. Na fase de penetração de mucosa, o germe dentário atravessa a lâmina própria constituída por tecido conjuntivo interposto entre epitélio oral e o germe dentário em erupção. A remodelação do tecido conjuntivo é mediada por enzimas dentre elas, as metaloproteinases de matriz (MMPs). Sendo o colágeno tipo I o principal constituinte da matriz extracelular da lâmina própria, supõe-se que a enzima responsável pela degradação do colágeno esteja presente no estabelecimento da via eruptiva. O colágeno parcialmente degradado é fagocitado por macrófagos ou fibroblastos residentes. Uma vez fagocitado, deve sofrer degradação nos vacúolos fagocíticos no interior destas células. Sendo assim, com o intuito de estudar as mudanças estruturais na lâmina própria durante a erupção dentária, serão utilizados ratos com 09, 11, 13 e 16 dias. Os fragmentos de maxila serão processados e incluídos em parafina; os cortes serão corados com H&E e submetidos a reação imuno-histoquímica para MMP-1. A densidade numérica de células MMP-1 positivas será estimada na lâmina própria dos ratos nas diferentes idades. A presença de MMP-1 será também avaliada pela técnica de Western Blotting. Fragmentos de maxila contendo a via eruptiva do 1º molar serão fixados em glutaraldeído/formaldeído e incluídos em araldite, para análise ultraestrutural da lâmina própria. Fragmentos de lâmina própria serão fixados e incubados com B-glicerofosfato para detecção da fosfatase ácida. Os ultrafinos serão analisados ao microscópio eletrônico de transmissão Philips.

Para o estudo serão utilizados 32 ratos isogênicos com idades entre 9 a 16 dias. os animais serão provenientes e mantidos no Biotério da faculdade de odontologia de Araraquara - UNESP.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 22/03/2013, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Abstract

Tooth eruption is the phenomenon whereby tooth germ moves from its intraosseous location to its functional position within the oral cavity. For this process, the remodeling of the tissues located in the eruptive pathway, such as the connective tissue of lamina propria, is necessary. The collagen is the major component of lamina propria, and its degradation is made mainly by matrix metalloproteinases (MMPs), especially MMP-1. Additionally, portions of previously degraded collagen are internalized into the lysosomes and degraded by acid phosphatases (ACP). In this study, we evaluate the participation of MMP-1 and ACP in extracellular matrix degradation of lamina propria of the eruptive pathway. Fragments of maxilla containing first molars of 9-, 11-, 13- and 16-day-old rats were fixed and embedded in paraffin (n=20) and Araldite (n=20). Before embedding, some fragments were previously incubated in β -glycerophosphate for ACP ultrastructural detection. The picrosirius method was used for the analysis of the birefringent collagen content in the lamina propria. The immunoexpression of MMP-1 and ACP2 as well as the numerical density of MMP-1-positive cells were analyzed. Statistical analyses were performed following the OneWay ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.05$). The ultrathin sections were analyzed under transmission electron microscope (TEM). Tooth germ of 9- and 11-day-old animals were at intraosseous phase while the germs of 13- and 16- day-old rats were at mucosal penetration stage. Enhanced MMP-1 and ACP2 immunoexpression was verified in the lamina propria at 13 and 16 days. Moreover, the number of MMP-1-immunolabelled cells increased significantly at these ages. Otherwise, the birefringent collagen decreased significantly at 13 and 16 days in comparison to 9 and 11 days. ACP2 was observed in the lysosomes and vacuoles of fibroblasts and macrophages of lamina propria at all ages, mainly at 13 and 16 days. In conclusion, MMP-1 and ACP2 play a role in the degradation of the components of the extracellular matrix of lamina propria, including collagen, during tooth eruption.