

# EFEITOS DO EGF E DO TGF- $\beta$ SOBRE O DESENVOLVIMENTO E SOBRE OS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR DO GERME DENTAL *IN VITRO*

## EFFECTS OF THE EGF AND THE TGF- $\beta$ ON THE DEVELOPMENT AND COMPONENTS OF THE EXTRACELLULAR MATRIX OF TOOTH GERMS *IN VITRO*

Sebastião Hetem<sup>1</sup>  
Luciano Alves da Silva<sup>2</sup>  
Odilon Vitor Porto Denardin<sup>3</sup>  
Fabio Petroucic<sup>4</sup>

### RESUMO

*Germes dentais de molares de fetos de camundongos de 14 ou de 17 dias foram cultivados na presença de EGF ou de TGF- $\beta$  com a finalidade de estudar os efeitos desses fatores de crescimento sobre o desenvolvimento do germe dental e sobre os componentes da matriz extra celular do tecido conjuntivo. Após o período de observação os germes foram incluídos em parafina, cortados e corados com hematoxilina e eosina ou congelados em nitrogênio líquido, cortados e submetidos a reação imunocitoquímica para laminina, fibronectina ou colágeno tipo I. Os resultados mostraram uma série de efeitos que permitiram chegar às seguintes conclusões. 1. Houve estimulação da proliferação celular, atraso no desenvolvimento do germe dental e inibição da diferenciação celular sob ação do EGF e mais acentuadamente sob o TGF- $\beta$ . 2. O EGF e o TGF- $\beta$  não interferiram na presença e distribuição dos componentes da matriz do conjuntivo estudados. 3. A laminina foi identificada nas interfaces epitélio-ectomesênquima do órgão do esmalte com a papila e com o folículo dentais e da gengiva e em formações vasculares na papila e no folículo dentais. 4. A fibronectina foi identificada na papila e no folículo dentais principalmente nos germes dentais de fetos mais idosos e entre o epitélio interno do órgão do esmalte e a papila dental. 5. O colágeno tipo I foi identificado entre o epitélio do órgão do esmalte e o ectomesênquima da papila e o do folículo dentais e em regiões específicas dessas estruturas.*

**Descritores:** EGF; TGF- $\beta$ ; germes dentais; matriz do conjuntivo.

A cultura de órgãos tem sido considerada interessante e importante método de estudo da interação epitélio-mesênquima e do desenvolvimento do germe dental e tem contribuído para aumentar a quantidade de informações referentes às mudanças na expressão dos padrões moleculares durante o desenvolvimento<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Professor Titular - Departamento de Morfologia - Curso de Odontologia das Faculdades Unificadas (FEB) Barretos - SP

<sup>2</sup>Mestre em Ciências da Saúde - Departamento de Morfologia FEB

<sup>3</sup>Professor Departamento de Pós-Graduação - Hospital Heliópolis - São Paulo - SP

<sup>4</sup>Professor Departamento de Materiais Dentários e Prótese - Faculdade de Odontologia - USP - Ribeirão Preto - SP

Introdução

A cultura e órgãos permitiu estudar o papel da papila dental tanto no desenvolvimento quer de estruturas dentais a partir de epitélio não dental<sup>2</sup> quanto na determinação da forma do órgão dental<sup>3,4</sup>. Permitiu também verificar o efeito de drogas sobre o desenvolvimento do germe dental por meio da análise de substâncias capazes de inibi-lo tanto por interferir com as células derivadas da crista neural<sup>5</sup> quanto com a síntese ou deposição de colágeno<sup>6</sup>, além da realização de testes de biocompatibilidade<sup>7,8</sup>.

Os eventos morfogenéticos e de diferenciação durante o desenvolvimento do germe dental são caracterizados por mudanças nas moléculas da matriz extracelular como fibronectina, colágeno tipo III<sup>9</sup>, sulfatos de condroitina<sup>10</sup>, fatores de crescimento como o EGF<sup>1,11</sup> e o TGF- $\beta$ <sup>1</sup> particularmente nos estágios finais de citodiferenciação dos odontoblastos e dos ameloblastos; o fator de transcrição Runx2 (Cbfa 1) é essencial para morfogênese dental e os dentes, que se formam como um derivado ectodérmico, têm o seu desenvolvimento regulado por interações entre o epitélio e o mesênquima<sup>12</sup>.

A associação de metodologias de trabalho tem permitido uma grande evolução dos conhecimentos além de possibilitar um maior e melhor inter-relacionamento das observações.

Diversos fatores de crescimento agem como indutores na mediação das interações epitélio-mesênquima em diversos órgãos e, particularmente os grupos EGF e TGF- $\beta$  têm sido implicados na formação da condensação mesenquimal e na morfogênese epitelial de muitos órgãos inclusive dos dentes<sup>1</sup>.

O EGF e o TGF- $\beta$  regularam a proliferação, a diferenciação e a transformação celulares *in vitro* e tiveram importante papel nos processos de desenvolvimento<sup>13</sup>. Quando adicionados ao meio de cultura de germes dentais produziram estimulação da vascularização, porém, ambos inibiram profundamente a morfogênese e a diferenciação do germe dental; por outro lado, a proliferação celular foi diferentemente afetada por esses fatores de crescimento<sup>14</sup>.

O EGF que, assim como TGF- $\beta$ , pode ser produzido pelos tecidos odontogênicos e pode mediar a sinalização intercelular durante o desenvolvimento embrionário<sup>15</sup> estimula a proliferação celular mas inibe enormemente a morfogênese dental e a diferenciação de odontoblastos e de ameloblastos; ressalte-se, entretanto, que a proliferação celular foi estimulada no epitélio mas inibida no mesênquima dental, o que pode ter causado a inibição da morfogênese<sup>16</sup>.

É o propósito deste trabalho verificar os efeitos do EGF e TGF- $\beta$  sobre o desenvolvimento do germe dental "in vitro" e determinar as variações que podem ocorrer pela ação dessas substâncias no conteúdo de laminina, fibronectina e colágeno tipo I na matriz extracelular e relacioná-las às alterações produzidas.

## MATERIAL E MÉTODO

Fêmeas de camundongos prenhes foram sacrificadas aos 14 ou aos 17 dias de gestação após a detecção do plug vaginal, dia zero de gestação. Os fetos foram removidos, decapitados e os primeiros molares inferiores, direito e esquerdo, dissecados com o auxílio de um microscópio estereoscópico e conservados em meio de cultura até serem colocados numa incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 ° C.

O meio de cultura foi preparado com a seguinte constituição:

MEM-Eagle	-	1000ml
glutamina	-	300 mg
glicina	-	50 mg
HEPES	-	3,57 g
ácido ascórbico (vitamina C)	-	100 mg
bicarbonato de sódio	-	850 mg
penicilina-estreptomicina	-	10 ml

O pH do meio foi ajustado para 7.4 pela adição de NaOH e descontaminado pela passagem da solução por um filtro Millipore Sterivex –GS.

Os germes dentais controle foram cultivados no meio com a composição acima e para os grupos experimentais foi adicionado ou 10 ng/ml de EGF ou 1 ng/ml de TGF- $\beta$ , como concentração final.

Os germes dentais foram cultivados nesses meios de cultura durante um período máximo de 6 dias, entretanto, algumas amostras foram retiradas a cada 2 ou 3 dias da cultura para análise; além disso, germes dentais foram analisados logo depois de serem obtidos.

Depois da dissecação os germes dentais foram colocados sobre a superfície e próximo da extremidade de uma peça retangular de filtro de Millipore; a peça de Millipore com os germes dentais foi depositada sobre uma tela de inox que foi assentada no círculo interno de uma placa para cultura de órgãos; dentro do círculo foi colocado meio de cultura até a metade da altura dos germes dentais e o conjunto incubado na estufa de CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub> + 95% ar + umidade) a 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

Para as observações morfológicas, alguns espécimes dos animais com 14 ou com 17 dias logo após serem obtidos ou após 2, 4 ou 6 dias de cultura em meio controle ou em meio experimental e um espécime de animal com 14 dias cultivado por 7 dias em meio de cultura controle, foram fixados em paraformaldeído a 4% durante 24 horas, incluídos em parafina e cortados com 6µm de espessura e corados pelo método de hematoxilina e eosina para exame em microscopia de luz. Algumas peças foram colocadas em compostos de OCT em moldes de papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas em freezer a -20° C. Para análise dessas peças, cortes com 7 µm de espessura foram obtidos em criostato, fixados em acetona por 1 minuto e submetidas a reações específicas para laminina, fibronectina ou colágeno tipo I. Para a laminina foi usado anticorpo de coelho anti-camundongo (diluição 1/50); para fibronectina anticorpo de coelho anti-humano (diluição 1/50); e para o colágeno tipo I, anticorpo de cabra anti-cabra (diluição 1/20).

Para laminina e para a fibronectina foi usado como reação secundária anticorpo de suíno anti-coelho conjugado com fluoresceína (diluição 1/40). Para colágeno tipo I foi usado como reação secundária anticorpo de coelho anti-cabra conjugado com fluoresceína (diluição 1/40).

A combinação com os anticorpos foi localizada por meio de microscopia de fluorescência e a especificidade das reações foi realizada utilizando-se cortes controle corados com soro de coelho normal.

Alguns cortes obtidos com criostato foram colocados em fixador de Bouin e corados com hematoxilina e eosina para comparação com o aspecto morfológico encontrado nas lâminas submetidas às reações imunocitoquímicas.

## RESULTADO

### Animais com 14 dias

Os germes dentais estavam presentes em todos os casos, isto é, nos animais controle e naqueles que cresceram na presença dos fatores de crescimento. Os germes dentais cultivados em meio controle mostraram-se, já no segundo dia em cultura, mais desenvolvidos quando comparado com a sua morfologia apresentada no momento em que foram obtidos (Figura 1A) e continuaram crescendo nos períodos subseqüentes, tanto sob o aspecto morfológico quanto da diferenciação celular (Figura 1B). Os germes dentais que se desenvolveram na presença de EGF, mostraram, particularmente, as estruturas epiteliais bem desenvolvidas, entretanto os germes dentais não mostravam o mesmo

estágio de evolução tanto em relação ao aspecto morfológico quanto ao da diferenciação celular (Figura 1C). À microscopia de fluorescência, em todos os casos, a laminina estava presente na junção epitélio-mesênquima da gengiva, entre o epitélio interno do órgão do esmalte e a papila dental e entre o epitélio externo do órgão do esmalte e o folículo dental; a intensidade da fluorescência foi a mesma nessas regiões. A laminina foi também identificada revestindo formações nodulares, correspondentes aos vasos sanguíneos, no folículo e na papila dentais (Figura 1D). A fibronectina foi identificada, em todos os casos, na papila e no folículo dentais, desses animais de uma maneira pouco evidente. O colágeno tipo I foi identificado, em todos os casos, entre o epitélio interno do órgão do esmalte e a papila dental e entre o epitélio externo do órgão do esmalte e o folículo dental e em algumas regiões particulares do tecido conjuntivo da papila e do folículo dentais (Figura 1E).

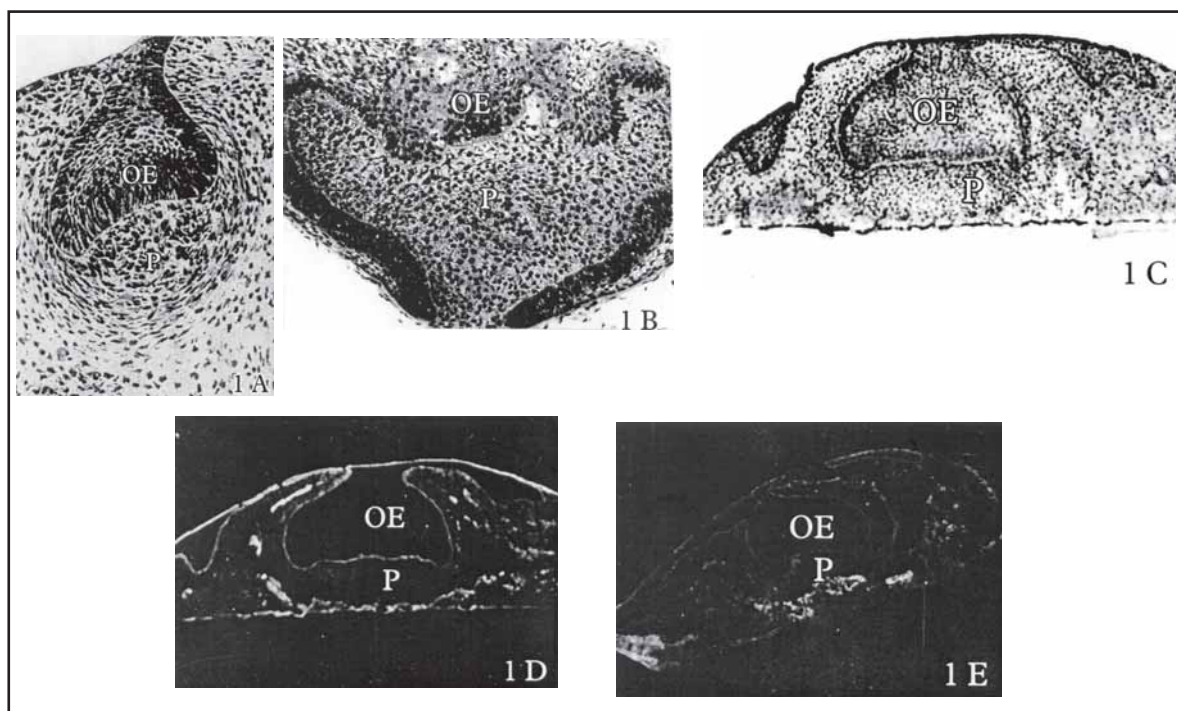


Figura 1 - Germes dentais de fetos com 14 dias.

1A- Recém obtido em fase de capuz. HE. 225x.

1B- Após 7 dias em meio de cultura controle em fase de campânula HE. 175x.

1C- Após 6 dias em cultura em meio com EGF: a morfogênese e a diferenciação celular foram inibidas HE. 125x.

1D- Corte do mesmo espécime e imunocoloração para laminina que é vista na membrana basal circundando o órgão do esmalte, entre o epitélio e o tecido conjuntivo da gengiva e circundando os vasos sanguíneos. 125x.

1E. Após 4 dias em meio de cultura com EGF e submetido à imunocoloração para colágeno tipo I que é identificado circundando o epitélio interno do órgão do esmalte e envolvendo os vasos sanguíneos 125x. (OE- órgão do esmalte; P- papila dental)



Na presença do TGF- $\beta$  os germes dentais mostraram as estruturas epiteliais bem desenvolvidas sem alcançarem o mesmo estágio de evolução dos controles, quer com relação à evolução quer com relação à diferenciação celular (Figura 2A). À microscopia de fluorescência, a laminina (Figura 2B), a fibronectina e o colágeno tipo I estavam sempre presentes e a sua distribuição era semelhante à descrita para os grupos anteriores.

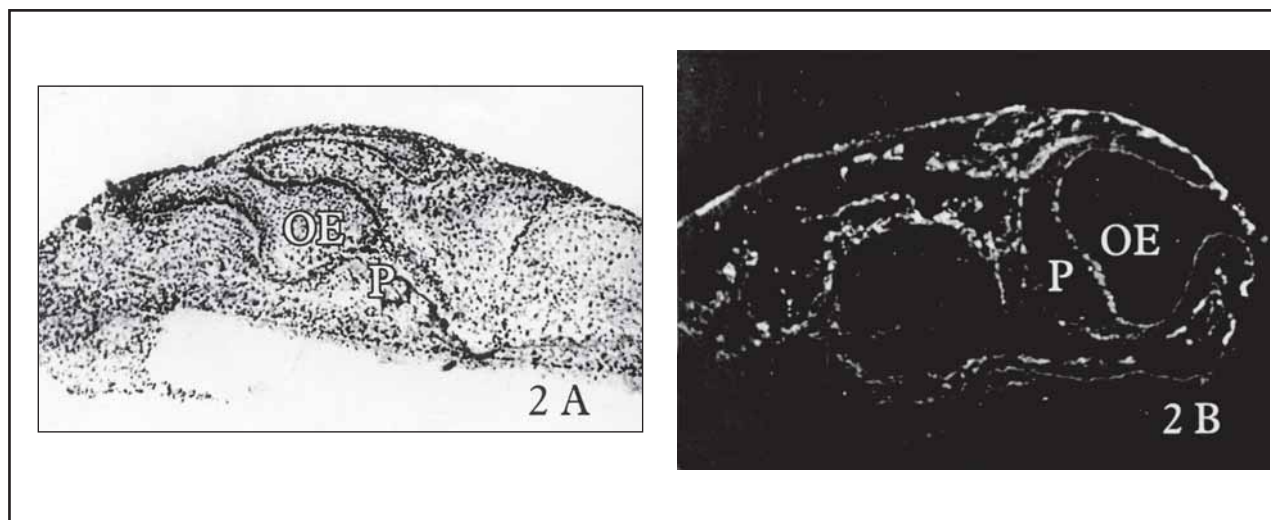


Figura 2 - Germes dentais de fetos com 14 dias.

2A- Aspecto histológico após 4 dias em meio de cultura com TGF- $\beta$  mostrando inibição da morfogênese e da diferenciação celular. HE. 125x.

2B- Após 2 dias em meio de cultura com TGF- $\beta$  e imunocoloração para laminina que aparece na membrana basal circundando o órgão do esmalte, entre o epitélio e o tecido conjuntivo da gengiva e circundando os vasos sanguíneos. 125x. (OE- órgão do esmalte; P- papila dental).

### Animais com 17 dias

Em meio controle, desde dois dias em cultura, pôde ser vista a evolução dos germes dentais quando comparados com seu aspecto quando recém obtidos (Figura 3A); após 4 dias em cultura, as células do epitélio interno do órgão do esmalte e as da periferia da papila dental mostravam avançada diferenciação celular. (Figura 3B)

À microscopia de fluorescência, a laminina, presente em todos os casos, apresentava uma distribuição semelhante à descrita para os germes dentais dos animais com 14 dias. A fibronectina apresentou-se uniformemente distribuída na papila e no folículo dentais e estava sempre presente entre as células do epitélio interno do órgão do esmalte e as células da papila dental o que não acontecia entre as células do epitélio externo do órgão do esmalte e o tecido do folículo dental (Figura 3C). O colágeno tipo I apresentou distribuição semelhante à descrita para os germes dentais de 14 dias

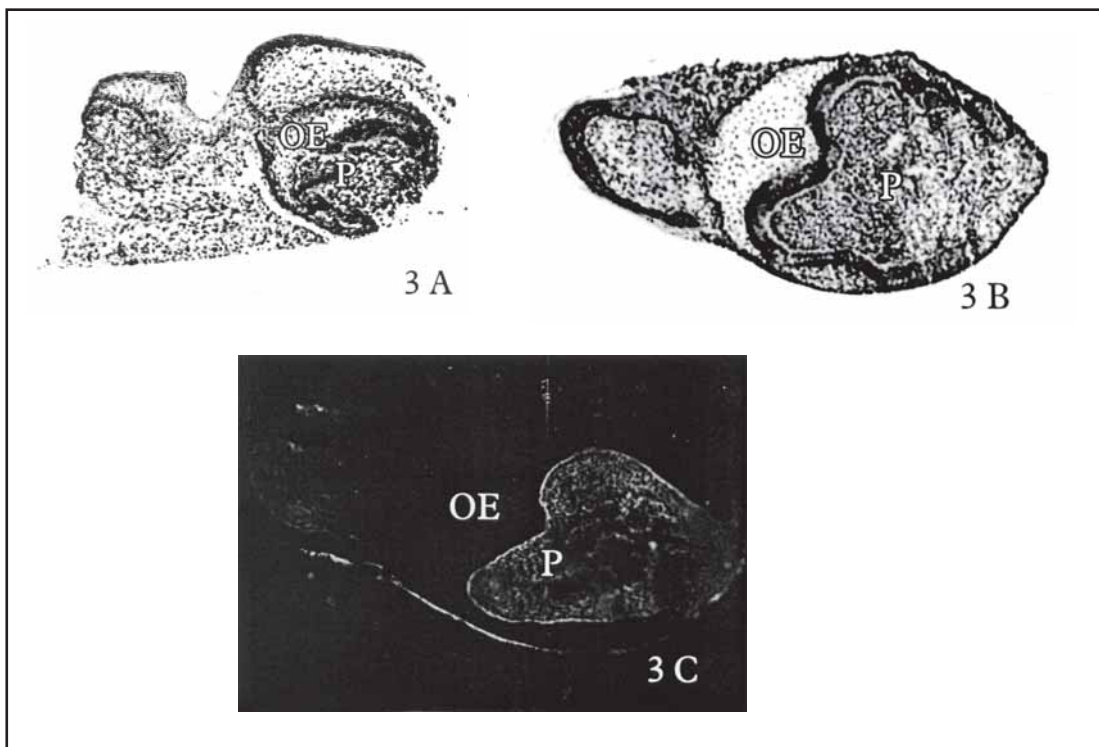


Figura 3- Germes dentais de fetos com 17 dias.

3A- Recém obtido em fase de campânula. HE. 125x.

3B- Após 4 dias em meio de cultura controle, em fase de campânula com diferenciação dos ameloblastos e dos odontoblastos. HE. 125x.

3C- Após 4 dias em meio de cultura controle e imunocoloração para fibronectina que aparece uniformemente distribuída na papila dental 125x (OE- órgão do esmalte; P- papila dental).

Na presença de EGF, após 6 dias em cultura, apesar de apresentar um certo grau de evolução e de diferenciação celular os germes dentais não apresentavam o mesmo estágio de evolução dos germes do grupo controle (Figura 4A).

À microscopia de fluorescência, a laminina, a fibronectina (Figura 4B) e o colágeno tipo I (Figura 4C) mostraram distribuição semelhante à descrita para os germes dentais dos animais do grupo controle.

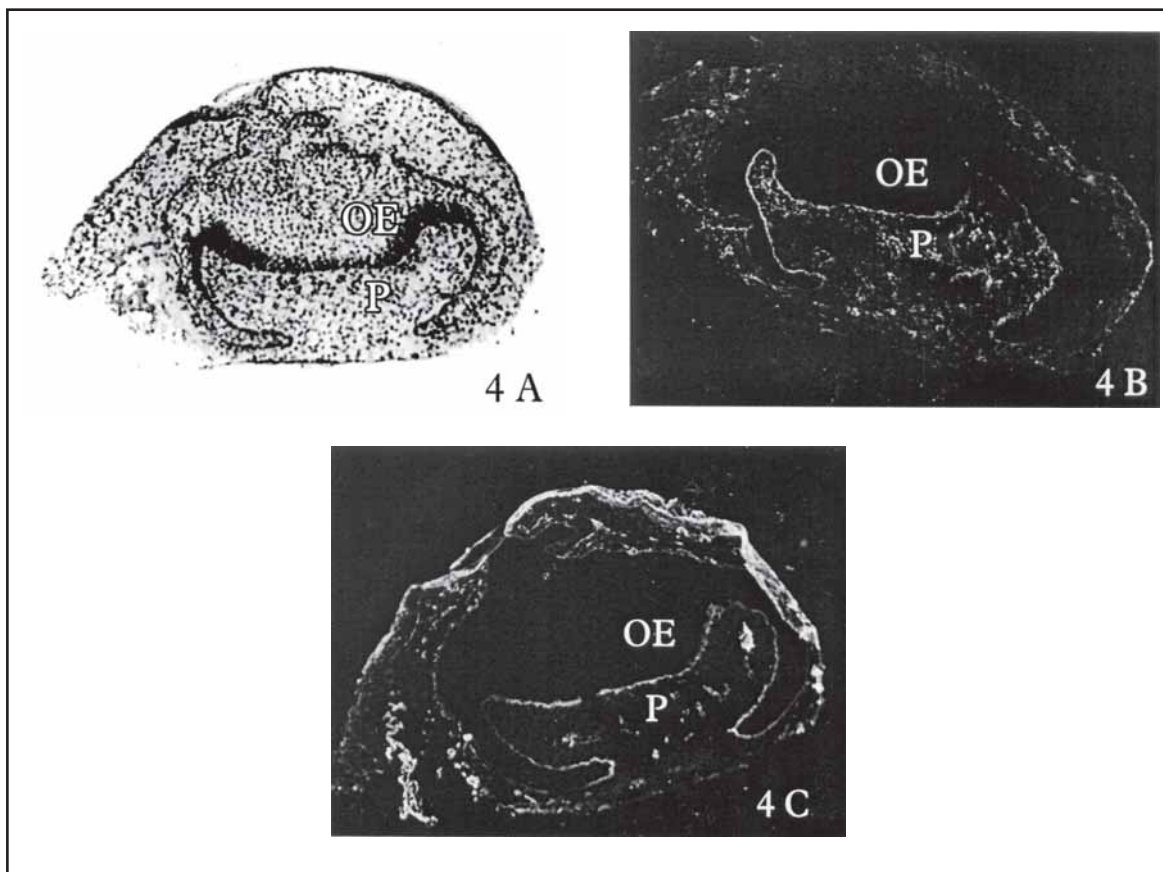


Figura 4 - Germes dentais de fetos com 17 dias.

4A- Após 6 dias em meio de cultura com EGF: inibição da morfogênese e da diferenciação celular. HE. 125x.

4B- Corte do mesmo espécime com imunocoloração para fibronectina que aparece entre o epitélio interno do órgão do esmalte e a papila dental e uniformemente distribuída na papila e no folículo dentais.

4C- Corte do mesmo espécime submetido à imunocoloração para colágeno tipo que aparece entre o epitélio do órgão do esmalte e o ectomesênquima da papila e do folículo dentais e ao redor dos vasos sanguíneos do tecido ectomesenquimal. 125x. (OE- órgão do esmalte; P- papila dental).

Os germes dentais que cresceram na presença de TGF- $\beta$  mostravam evolução depois de 2 dias em cultura, mas após 6 dias (Figura 5A) não foi verificada uma correspondência de suas fases de desenvolvimento em relação ao período em análise, uma vez que os germes dentais encontravam-se menos desenvolvidos quando comparados ao aspecto encontrado no período de 2 dias em cultura. À microscopia de fluorescência a laminina, a fibronectina e o colágeno tipo I (Figura 5B) apresentaram-se com distribuição semelhante à descrita para os grupos anteriores.



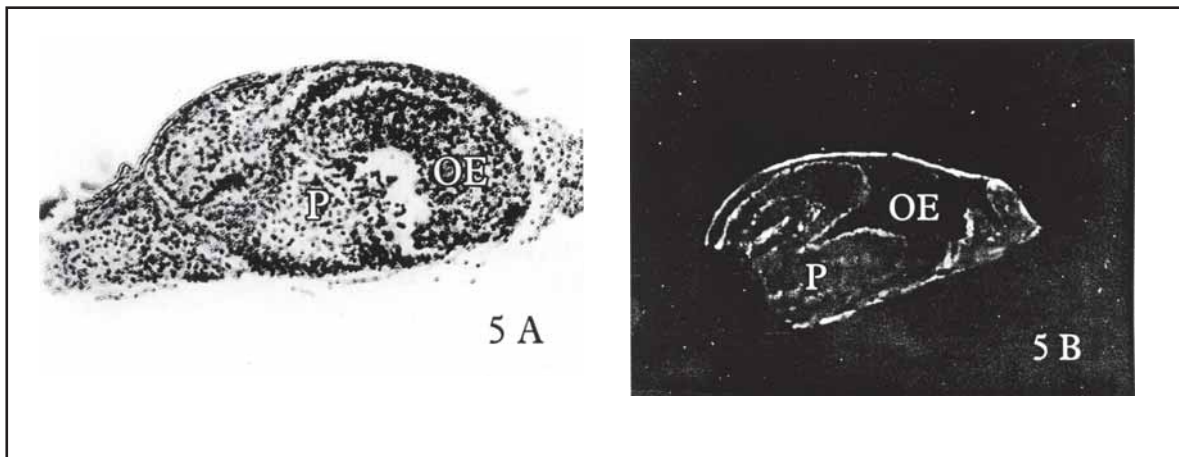


Figura 5 - Germes dentais de fetos com 17 dias.

**5A-** Após 6 dias em meio de cultura com TGF- $\beta$ ; inibição da morfogênese e da diferenciação celular. HE 125x.

**5B-** Após 2 dias em cultura em meio com TGF- $\beta$  e imunocoloração para colágeno tipo I que é visto circundando o órgão do esmalte e em áreas específicas da papila e do folículo dentais. 125x. (OE- órgão do esmalte; P- papila dental).

## DISCUSSÃO

Os fatores de crescimento são substâncias protéicas que estimulam a multiplicação de certos tipos celulares como o fator neuronal de crescimento, o fator de crescimento epitelial (epidermal) (EGF) e a eritropoetina que estimula a formação de hemácias<sup>8</sup> ou que exercem uma grande variedade de efeitos sobre a diferenciação, a proliferação e a transformação celulares.<sup>13,18,19</sup>

Conforme mostram os resultados encontrados neste trabalho, os germes dentais provenientes dos animais com 14 dias que cresceram na presença do EGF, mostram as estruturas epiteliais bem desenvolvidas, porém, sem alcançar o mesmo estágio de evolução que os germes dentais que cresceram em meio controle tanto sob o aspecto morfológico quanto da diferenciação celular. Já os germes dentais provenientes dos animais com 17 dias estavam na fase de campânula no momento da sua obtenção e quando cresceram na presença do EGF mostraram as projeções cervicais do órgão do esmalte no ectomesênquima mais profundas com a ocorrência da diferenciação do epitélio interno do órgão do esmalte e das células periféricas da papila dental, corroborando, portanto, as observações de que a sensibilidade ao EGF depende do estágio do desenvolvimento dental<sup>20</sup>; ressalte-se, entretanto, que os germes dentais dos animais com 17 dias não apresentaram o mesmo grau de evolução dos controles; o que indica que mesmo germes dentais em fases mais avançadas do desenvolvimento são sensíveis ao EGF, divergindo portanto das observações que afirmam o contrário<sup>16,20</sup>.

O EGF é um potente mitogênico para vários tipos celulares, inclusive células não epiteliais, que afeta funções como diferenciação, síntese de macromoléculas e reabsorção óssea, além da divisão celular<sup>21</sup>. Há marcadas alterações na distribuição dos tecidos aos receptores do EGF durante o desenvolvimento dental<sup>3,18</sup> acentuadamente nos estágios de botão e de capuz, fases iniciais do desenvolvimento<sup>16,20,22</sup>. No estágio de campânula os receptores para o EGF permanecem apenas no folículo dental onde aparecem de maneira acentuada<sup>21</sup>. Ficou demonstrado que o EGF estimula a proliferação celular mas ao mesmo tempo inibe acentuadamente a morfogênese e a diferenciação dos ameloblastos e dos odontoblastos em culturas de germes dentais<sup>16-20</sup>, evidenciando que fatores de crescimento que aumentam a proliferação celular e até mesmo a vascularização não necessariamente estimulam a morfogênese e a diferenciação<sup>14</sup>, o que foi confirmado nesta investigação.

Por outro lado, o EGF estimula a proliferação celular do epitélio dental mas a inibe no mesênquima, provável causa da inibição da morfogênese<sup>16</sup>; órgãos que se originam de tecidos epiteliais e mesenquimais, compartilham fatores morfológicos comuns<sup>12</sup>. Interações recíprocas e seqüenciais entre os tecidos epitelial e mesenquimal desempenham um papel central na regulação da morfogênese dos órgãos. Particularmente, o EGF e o TGF- $\beta$  estão envolvidos na morfogênese de vários órgãos, inclusive dos dentes<sup>23</sup>, sendo o fator de transcrição Runx2 essencial para a morfogênese dental<sup>12</sup>. Como no estágio inicial de capuz a distribuição de receptores para o EGF no epitélio e no mesênquima dentais não se mostrou relacionada à estimulação da proliferação celular pelo EGF nesses tecidos, é provável que as interações epitélio-mesênquima possam controlar a resposta dos tecidos dentais ao EGF<sup>20</sup>. A acentuada diferença entre as várias populações celulares às reações de combinação do <sup>125</sup>I-EGF mostra que essas células diferem na sua sensibilidade ao EGF com uma clara variação da sua localização nos diferentes estágios de evolução do germe dental<sup>9,23</sup>.

O TGF- $\beta$  é um peptídeo multifuncional que controla proliferação, diferenciação e outras funções em muitos tipos celulares. Os efeitos inibitórios do TGF- $\beta$  sobre a proliferação de diversos tipos de células, inclusive da maioria das células epiteliais pode, em alguns casos, estar combinado a uma inibição de posterior diferenciação celular<sup>24,26</sup>. Assim, os TGF- $\beta$ s, conhecidos como moduladores da expressão de várias moléculas da matriz extracelular envolvidas em crescimento celular, diferenciação e

morfogênese<sup>25</sup>; podem inibir ou estimular a diferenciação de células epiteliais o que também é verdade para células mesenquimais<sup>19</sup>.

O TGF- $\beta$  influencia a matriz celular produzida por diferentes tipos de células e conduz a um aumento na matriz celular ou por aumentar a sua produção ou por diminuir a sua degradação. Considerando que parte dos dentes forma-se como um derivado ectodérmico e que seu desenvolvimento é regulado pelas interações entre o epitélio e o mesênquima<sup>12</sup> os fatores de crescimento e a matriz extracelular podem formar uma alça regulatória recíproca em que os fatores de crescimento influenciam a produção das matrizes extracelulares e as matrizes extracelulares influenciam a resposta aos fatores de crescimento<sup>19</sup>. É interessante observar que a combinação de cada fator de crescimento diminui à medida que aumenta densidade celular como consequência da redução no número de receptores<sup>18,19,27</sup>.

Na presença do TGF- $\beta$ , de acordo com os resultados encontrados neste trabalho, embora as estruturas epiteliais estivessem bem desenvolvidas, os germes dentais provenientes dos animais com 14 dias não mostram estágio de evolução comparável com os dos animais controle, quer sob o ponto de vista do desenvolvimento quer sob o ponto de vista da diferenciação celular. Nos germes dentais dos animais com 17 dias há uma evolução inicial seguida de um processo de involução nos períodos mais longos em cultura. Assim, ficou evidente a interferência do TGF- $\beta$  sobre o desenvolvimento do germe dental em cultura de maneira mais acentuada que a verificada na presença do EGF.

Aos 14 dias os germes dentais de embriões de camundongos estão no estágio de capuz do desenvolvimento. Esses germes dentais apresentam evolução da morfogênese em meio de cultura controle, pois, após 7 dias cúspides proeminentes se formam e ocorre diferenciação dos odontoblastos e secreção de pré-dentina. O EGF impede a morfogênese dental e inibe a diferenciação dos odontoblastos, porém de maneira mais fraca que a inibição causada pelo TGF- $\beta$ <sup>14</sup>, observações com as quais nossos resultados concordam.

Os epitélios apresentam na sua superfície de contato com o tecido conjuntivo a lâmina basal que tem múltiplas funções e é formada, principalmente, por colágeno tipo IV, proteoglicanas e as glicoproteínas entactina e laminina<sup>28</sup>. Pesquisas com heteroenxertos em mamíferos, sugerem que o epitélio interno do órgão do esmalte tem importante papel na diferenciação dos odontoblastos, a qual é mediada pela membrana basal

situada entre o epitélio e o ectomesênquima e constituída, entre outras substâncias, por colágenos I e IV, laminina, heparan sulfato, fibronectina, ácido hialurônico e sulfatos de condroitina. Diversos produtos como fatores de crescimento, fatores de transcrição, moléculas de adesão, integrinas e elementos da matriz extracelular participam de várias interações epitélio-mesênquima que constituem a indução recíproca<sup>29</sup>. O EGF estimula a proliferação celular nos transplantes, demonstrado pela incorporação maior de timidina nas culturas tratadas que nas culturas controle e causa estimulação dos tecidos circundantes do germe dental, tendo sido identificadas estruturas nodulares com laminina ao seu redor<sup>14</sup>. Em todos os casos analisados neste trabalho, a laminina foi identificada com características semelhantes nas diferentes idades e sob a influência do EGF e do TGF- $\beta$  mostrando a não interferência desses fatores de crescimento na sua presença e na sua localização apesar da influência dos mesmos na odontogênese.

A laminina é vista na membrana basal circundando o órgão epitelial do esmalte e forrando o endotélio dos vasos sanguíneos em germes dentais de 14 dias recém obtidos, ou após 7 dias em cultura<sup>14,17</sup>, o que é confirmado pelos nossos resultados. Além disso, após 7 dias em cultura na presença do EGF, a morfogênese da cúspide não alcança o mesmo estágio de desenvolvimento verificado nas culturas em meio controle e não há diferenciação dos odontoblastos e dos ameloblastos e os tecidos circundantes aumentaram em quantidade, corroborando relatos anteriores<sup>14</sup>.

A localização por imunofluorescência da laminina mostra que ela está presente na lâmina basal bem como na periferia dos nódulos que consistem de elementos vasculares.

A fibronectina é uma glicoproteína sintetizada pelos fibroblastos e algumas células epiteliais com sítios de ligação para células, colágeno e glicosaminoglicanas que ajudam a intermediar e a manter normais as migrações e adesões celulares<sup>28</sup>. A fibronectina identificada, de acordo com os nossos resultados, entre o órgão do esmalte e a papila dental nos germes dentais provenientes dos fetos com 17 dias, mostra que ela faz parte da membrana basal<sup>17,28,29</sup>, embora não fosse identificada na interface órgão do esmalte-folículo dental. Além disso, a sua presença constante na papila e no folículo dentais mostram sua efetiva participação nas estruturas do tecido conjuntivo, fazendo a interligação das mesmas. A sua concentração maior nos germes dentais provenientes dos fetos com mais idade caracteriza aumento e persistência de sua produção com o avançar da idade. Tal observação corrobora relatos

referentes a alterações na distribuição da fibronectina durante o desenvolvimento dos germes dentais<sup>17</sup>. Alterações na imunocoloração são também descritas em função da idade do animal mostrando que o receptor interleucina-1 tipo I (IL-1RI) se localiza inicialmente no folículo dental com intensidade máxima logo após o nascimento e torna-se grandemente reduzido no 10º dia de vida e que moléculas que aumentam a expressão do EGF e do TGF- $\beta$  também aumentam a expressão do IL-1RI.<sup>27</sup>

Neste trabalho não foram identificadas alterações relativas à fibronectina que pudessem ser atribuídas aos fatores de crescimento estudados.

O colágeno constitui uma família de proteínas que se diferenciam durante a evolução para exercer funções diversificadas. As fibrilas de colágeno tipo I são as mais abundantes e amplamente distribuídas no organismo fazendo parte de muitos tecidos<sup>28</sup> inclusive da lâmina basal entre o epitélio e o ectomesênquima<sup>29</sup>. De acordo com os nossos resultados, o colágeno tipo I é identificado entre as estruturas epiteliais do órgão do esmalte e as estruturas ectomesenquimais da papila e do folículo dentais, além de estar presente em regiões particulares dos tecidos da papila e do folículo dentais. Essas observações confirmam a presença do colágeno tipo I como integrante da membrana basal, mostrando o aumento de sua concentração com a evolução do germe dental. Intensa fluorescência já foi descrita nos tecidos circundantes ao germe dental pela utilização de anticorpos contra procolágeno tipo III<sup>14</sup>. Em relação ao colágeno tipo I, neste trabalho não foram identificadas diferenças que pudessem ser atribuídas ao EGF ou ao TGF- $\beta$ .

De acordo com as nossas observações, tanto nos espécimes que cresceram na presença dos fatores de crescimento quanto nos espécimes controle não ocorreram alterações nos componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo estudados o que deve ser atribuído à persistência dessas estruturas com as mesmas características durante o período de avaliação, apesar das variações do aspecto morfológico dos germes dentais.

## CONCLUSÃO

1. O EGF estimula a proliferação celular mas interfere negativamente no desenvolvimento do germe dental e na diferenciação celular.

2. O TGF- $\beta$  estimula a proliferação celular mas interfere negativamente, de maneira mais acentuada que o EGF, sobre o desenvolvimento do germe dental e da diferenciação celular.



3. A laminina está presente na lâmina basal tanto entre os epitélios interno e externo do órgão do esmalte e o ectomesênquima da papila e do folículo dentais quanto entre o epitélio e a lâmina própria da gengiva; ela aparece também nos vasos sanguíneos na papila e no folículo dentais.

4. A fibronectina está presente na papila e no folículo dentais e na interface epitélio-ectomesênquima da papila dental de maneira mais acentuada nos germes dentais de fetos mais idosos.

5. O colágeno tipo I está presente entre os epitélios interno e externo do órgão do esmalte e a papila e o folículo dentais e em algumas áreas específicas do ectomesênquima da papila e do folículo dentais.

## AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP-pela concessão de Auxílio à Pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho (Processo Odontologia n. 90/3422-0) e ao Professor Mark W.J. Ferguson da Turner Dental School , Manchester University, Manchester, UK., pela gentileza da cessão dos anticorpos utilizados neste trabalho.

## ABSTRACT

*Effects of the EGF and the TGF- $\beta$  on the development and components of the extra-cellular matrix of tooth germs in vitro. Molar tooth germs of 14 or 17 days old mice fetuses were cultivated with EGF or TGF- $\beta$  in order to study the effects of these growth factors on the tooth germ development and on the components of the connective tissue's extra-cellular matrix. After the observation times, the tooth germs were embedded in paraffin, cut and stained with hematoxylin and eosin; or, frozen in liquid nitrogen, cut and submitted to immunocytochemical reaction for laminin, fibronectin or type I collagen. The results showed several effects, which allowed the following conclusions. 1. There was cell proliferation stimulation, delay of the tooth germ development, and inhibition of cell differentiation in the presence of EGF, and even more in the presence of TGF- $\beta$ . 2. EGF and TGF- $\beta$  did not interfere with the presence and distribution of the connective tissue's extra-cellular matrix's components. 3. Laminin was present in the enamel, dental papilla and dental follicle, gingival epithelium-ectomesenchyme interfaces, and in vascular structures of dental papilla and dental follicle. 4. Fibronectin was found in the dental papilla and dental follicle, particularly in tooth germs of older animals, and between the inner enamel epithelium and the dental papilla. 5. Type I collagen was found among the enamel organ epithelium, the dental papilla, and the dental follicle, as well as in specific sites of these structures.*

**Key words:** EGF; TGF- $\beta$ ; tooth germs; development; connective matrix; mouse.

## REFERÊNCIAS

1. Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of and other organs. *Int J Dev Biol.* 1995;39: 35-50.
2. Kollar EJ, Baird G. Tissue interaction in developing mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morph.* 1970; 24: 173-186.
3. Heritier M. Étude de la morphogenese dentaire dans les conditions de la greffe intratesticulaire chez la souris. *Sci Odontostomatol.* 1971; 3: 11-15.
4. Kollar EJ, Baird G. Effect of 3-2-thienyladamine in developing mouse tooth germs *in vitro*. *J Dent Res.* 1968; 47: 433-443.
5. Kollar EJ. The use of organ cultures of embryonic tooth germs for teratological studies. In: Kollar EJ. *Tests of teratogenicity in vitro*. North Holland: Amsterdam; 1976.
6. Hetem S, Kollar EJ, Cutler LS, Yaeger JA. The effect of  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl on the basement membrane of tooth germs *in vitro*. *J Dent Res.* 1975; 54: 783-786.
7. Hetem S, Jowett AK, Ferguson MWJ. Biocompatibility testing of a posterior composite and dental cements using a new organ culture model. *J Dent.* 1989; 17: 155-161.
8. Karakusevic S. A new biocompatibility model system: Murine tooth germs organ culture on collagen. *J Dent Res.* 1988; 67: 651.
9. Thesleff I, Vainio S, Jalkanen M. Cell-matrix interactions in tooth development. *Int J Dent Biol.* 1989; 33: 91-97.
10. Mark MP, Baker JR, Morrison K, Ruch JV. Chondroitin sulphates in developing mouse tooth germs. Differentiation. 1990; 43: 37-50.
11. Snead MI, Luo W, Oliver P, Nakamura M, Don Wheeler G, Bessem, C. Localization of epidermal growth factor precursor in tooth and lung during embryonic mouse development. *Dent Biol.* 1989; 134: 420-429.
12. Aberg T, Wang XP, Kim JH, Yamashiro T, Bei M, Rice R, Thesleff I. Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. *Dev Biol.* 2004; 270: 76-93.
13. Cam Y, Neumann MR, Ruch JV. Immunolocalization of transforming growth factor beta 1 and epidermal growth factor receptor epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of *in vitro* production of transforming activity. *Arch Oral Biol.* 1990; 35: 813-822.
14. Thesleff I, Ekblom P, Keski-Oja J. Inhibition of morphogenesis and stimulation of vascular proliferation in embryonic tooth cultures by a sarcoma growth factor preparation. *Cancer Res.* 1983; 43: 5902-5909.
15. Slavkin HC. Gene regulation in the development of oral tissues. *J Dent Res.* 1988; 67: 1142-1149.
16. Partanen AM, Ekblom P, Thesleff I. Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. *Develop Biol.* 1985; 111: 84-94.
17. Thesleff I, Barrach HJ, Foidart JM, Vaehri A, Pratt RM, Martin GR. Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Dev Biol.* 1981; 81: 182-192.
18. Heikinheimo K, Voutilainen R, Happonen RP, Miettinen PJ. EGF receptor and its ligands, EGF and TGF- $\alpha$ , in developing and neoplastic human odontogenic tissues. *Int J Dev Biol.* 1993; 37: 386-396.
19. Rizzino A. Transforming Growth Factor- $\beta$ : multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. *Develop Biol.* 1988; 130: 411-422.
20. Partanen AM, Thesleff I. Growth factors and tooth development. *Int J Dev Biol.* 1989; 33: 165-172.
21. Thesleff I. Does epidermal growth factor control tooth eruption? *J Dent Child.* 1987: 321-329.
22. Partanen AM, Thesleff I. Localization and quantification of  $^{125}I$  - epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. *Develop Biol.* 1987; 120: 186-197.
23. Thesleff I, Partanen AM, Rihniemi L. Localization of epidermal growth factor receptors in mouse incisors and human premolars during eruption. *Eur J Orthod.* 1987; 9: 24-32.
24. Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang MLS, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massagué J. The transforming growth factor- $\beta$  system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell.* 1987; 48: 409-415.

25. Mahmood R, Flanders KC, Morris-Kay GM. Interactions between retinoids and TGF-bs in mouse morphogenesis. *Develop.* 1992; 115: 67-74.
26. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assolan RK. Transforming growth factor-b: biological function and chemical structure. *Science.* 1986, 233: 532-534.
27. Wise GE, Zhao L. Immunostaining and transcriptional enhancement of interleukin-1 receptor type I in the rat dental follicle. *Arch Oral Biol.* 1997; 42: 339-344.
28. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
29. Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral. Texto - atlas-correlações clínicas.* São Paulo: Panamericana; 1999.