



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

CAMILA AMBRÓSIO DIAS

**Distribuição das teneurinas na região orofacial de
ratos durante o desenvolvimento embrionário e pós-
natal**

**Araçatuba-SP
2015**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

CAMILA AMBRÓSIO DIAS

**Distribuição das teneurinas na região orofacial de ratos
durante o desenvolvimento embrionário e pós-
natal**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

**Araçatuba-SP
2015**

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus por ter me agraciado com esta benção de estudar e me graduar nesta Universidade. Obrigada meu Senhor!

Aos meus pais José e Dirce, que sempre foram e são os meus alicerces. Se hoje cheguei até aqui foi porque os senhores me conduziram e não existem palavras para expressar minha gratidão por tê-los como meus pais. Eu amo vocês!

À minha irmã Carolina que sempre me incentivou nos estudos e me apoiou em tantas decisões que tomei ao longo do caminho. Obrigada por estar comigo sempre! Eu te amo!

Ao meu futuro esposo Carlos por estar ao meu lado neste e em tantos momentos. Eu te amo!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti, que me ensinou muito nesses anos de convivência. Muito obrigada professor por toda sua dedicação e paciência, por todo auxílio com os relatórios e apresentações, enfim por todo suporte. Obrigada pelas orientações e insistência nos trabalhos de laboratório. Com certeza guardarei eterna gratidão pela oportunidade que me proporcionaste em estagiar e aprender com o senhor. Sinto-me privilegiada e muito agradecida pelas experiências que tive nesses anos de iniciação científica.

À doutoranda Kelly Regina Torres da Silva e ao mestrando Gestter Willian Lattari Tessarin, que sempre me auxiliaram nas pesquisas e deram amparo nos momentos difíceis no laboratório. Quero agradecer imensamente aos dois! Saibam que muito desse trabalho foi possível graças também ao apoio de vocês. Vocês foram peças importantes para que tudo ocorresse da melhor forma e ajudaram muito nas imunohistoquímicas, relatórios e todo tipo de trabalho. Obrigada por toda amizade!

À minha amiga Isabella Zacarin Guiati, que sempre me acompanhou não somente nos períodos no laboratório como também nas aulas de graduação, pois além de companheira de estágio, também é uma grande amiga de turma da faculdade. Você sempre esteve comigo nos melhores e piores momentos. Nos desesperos de provas, relatórios, e estágio estivemos sempre juntas, e quando tudo acumulava, ríamos e uma dava apoio para a outra no que fosse preciso. Obrigada pela sua amizade e saiba que sempre torcerei pelo seu sucesso!

Aos professores Alaíde Gonçalves e Edilson Ervolino por toda sabedoria compartilhada comigo nas conversas e nos momentos de dúvidas, pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais, e pela maravilhosa convivência. Muito obrigada, professores!

Aos professores José Américo de Oliveira, Paulo Roberto Botacin e Roberta Okamoto pelos ensinamentos, conversas e momentos de confraternização. Obrigada, professores!

Aos meus amigos Érica Araújo de Oliveira, Cecília Alves de Sousa, Caio Debortoli, Emilie Vicentin, Fred Lucas, Lidiane Mendes, Denise Rós e Janaina Dias gostaria de agradecer pela amizade de vocês e apoio, tornando este período da minha vida ainda mais

agradável e feliz. Lembrarei-me de cada um para sempre. Com certeza marcaram minha caminhada. Muito obrigada por tudo!

A todos os meus familiares que me acompanharam nesta jornada que foram estes cinco anos. Em vários momentos da minha vida vocês me animaram dando forças para continuar e sou eternamente grata aos meus avós, tios, primos e primas que estiveram comigo! Eu amo vocês!

Agradeço à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao Departamento de Ciências Básicas e aos servidores deste departamento, André Luís Mattos Piedade, Arnaldo César dos Santos, Sandra Aparecida dos Santos Pinheiro, Eliseide Maria Ferreira Silva Navega, que estiveram presentes na obtenção dos cortes em parafina, no cuidado com os animais para a pesquisa, e de tantas outras formas contribuíram para a realização deste projeto e na minha formação. Muito obrigada por toda ajuda e pela convivência!

Ao Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela disponibilização dos animais necessários para este projeto de pesquisa.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociência de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pelo auxílio na aquisição das imagens obtidas em microscopia confocal.

À FAPESP (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*), pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica sob o processo Nº 2013/01635-0, tornando possível a realização desse projeto.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Tereza de Calcutá

DIAS, C.A. Distribuição das teneurinas na região orofacial de ratos durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal. 2015. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

As Teneurinas (TENs) são constituídas por quatro proteínas homólogas (teneurina 1 a 4), descritas inicialmente em mamíferos. As TENs apresentam similaridade com uma proteína da matriz extracelular denominada tenascinas. Deste modo, as TENs apresentam expressão principalmente durante o desenvolvimento do sistema nervoso central. Interessantemente, a expressão das TENs é preservada ao longo das espécies. Estudos anteriores apontam que sua expressão também pode ser observada em tecidos não neuronais, principalmente durante a morfogênese de alguns órgãos e tecidos. Alguns estudos relataram a expressão das TENs na região anterior de embriões de aves e ratos, sugerindo um possível papel dessa família no desenvolvimento orofacial. O presente estudo é uma análise detalhada da distribuição dos quatro membros da família das TENs (TEN1-4) em tecidos e órgãos da região orofacial de roedores através de técnicas de imuno-histoquímica. Portanto, ratos em diferentes estádios de desenvolvimento orofacial foram utilizados para avaliar a participação de TENs no desenvolvimento do território orofacial. A análise imuno-histoquímica das TENs também foi realizada durante a regeneração do complexo polpa-dentina, em particular, no comportamento dos odontoblastos frente uma lesão experimental dos molares de ratos. Além disso, analisamos a expressão das TENs na polpa dentária humana através de métodos de RT-PCR e imuno-histoquímica convencionais. Os dados mostraram que a imunorreatividade da TEN2 está presente nos odontoblastos durante sua diferenciação, e esta se manteve presente nos dentes maduros. Mostraram também que a TEN1 é discretamente expressa durante a diferenciação dos odontoblastos. A imunorreatividade da TEN2 nos odontoblastos foi modulada pela inflamação da polpa. Expressão gênica e métodos imuno-histoquímicos confirmaram a presença de TEN2 na polpa dentária humana. Em conclusão, o presente estudo é o primeiro a confirmar a presença de TEN2 em odontoblastos de ratos e humanos. Além disso, a TEN2 pode ser modulada nos odontoblastos pelo processo de inflamação induzida em dente molar de ratos.

Palavras-chave: Ratos. Odontoblastos. Imuno-histoquímica. Polpa dentária.

DIAS, CA. **Teneurin distribution in the rat orofacial region during embryonic and postnatal development.** 2015. 56 f. Final course assignment (Bachelor) – School of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

Teneurins (TENs) are constituted by four homologous proteins (teneurin 1 to 4), initially described in mammals. TENs are similar to proteins of the extracellular matrix denominated tenascins. Thus, TENs are expressed mainly during central nervous system development. Interestingly, TEN expression is preserved throughout species. Previous studies pointed out that her expression can also be noted in non-neural tissues, primarily during the morphogenesis of some organs and tissues. Some studies have reported the expression of TENs in the anterior region of chicken and mice embryos, suggesting a possible role of this family in orofacial development. The present study is a detailed analysis of the distribution of the four family members of the TENs (TEN1-4) in tissues and organs of the orofacial region of rodents through immunohistochemical techniques. Therefore, rats at different orofacial development stages were used to assess the participation of TENs in the development of the orofacial territory. Immunohistochemical analysis of TENs was also performed during regeneration of the dentin-pulp complex, particularly the behavior of odontoblasts during experimental injury in rat molars. Furthermore, we analyzed TENs expression in human dental pulp through immunohistochemical and conventional RT-PCR methods. The data showed that TEN2 immunoreactivity is present in odontoblasts during differentiation, and this remained present in mature teeth. Showed also that TEN1 is discretely expressed during odontoblast differentiation. TEN2 imunoreactivity in odontoblasts was modulated by pulp inflammation. Gene expression and immunohistochemical methods confirmed the presence of TEN2 in human dental pulp. In conclusion, the present study is the first to confirm the presence of TEN2 in rat and human odontoblasts. In addition, TEN2 can be modulated in odontoblasts by inflammation process induced in rat molar tooth.

Keywords: Rats. Odontoblasts. Immunohistochemistry. Dental pulp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo estrutural esquemático das proteínas teneurinas ilustrando a constituição e a organização dimérica. 11
- Figura 2.** Fotomicrografia em campo claro de cortes histológicos de dente molar inferior de rato (A-C) e de fragmento da polpa dentária humana (D-E) submetidos ao teste imuno-histoquímico de adsorção empregando anticorpo anti-TEN2 e o peptídeo correspondente (imunógeno). 27
- Figura 3.** Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN1 na fase de coronogênese do primeiro molar do rato Wistar em P7 (A-A'). 29
- Figura 4.** Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN2 na fase de capuz (A) e campânula (B-E) do primeiro molar do rato Wistar em E17 (A) e P0 (B-E). 30
- Figura 5.** Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN2 na fase de coronogênese (A-A') do primeiro molar do rato Wistar em P5 (A-A'). 32
- Figura 6.** Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN2 na cartilagem hialina de Meckel do rato Wistar em E17 (A-A'). 33
- Figura 7.** Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (dente controle), mostrando o complexo dentina-polpa, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. 36
- Figura 8.** Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (3 dias de pós-operatório – lesão traumática na superfície oclusal), mostrando o complexo dentina-polpa, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. 37
- Figura 9.** Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (7 dias de pós-operatório – lesão traumática na superfície oclusal), mostrando o complexo dentina-polpa, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. 38

- Figura 10.** Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (15 dias de pós-operatório – lesão traumática na superfície oclusal), mostrando o complexo dentina-polpa, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. 39
- Figura 11.** Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (15 dias de pós-operatório – lesão traumática na superfície oclusal), submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. 41
- Figura 12.** Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (15 dias de pós-operatório – lesão traumática na superfície oclusal), mostrando áreas do periodonto de sustentação, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. 42
- Figura 13.** Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de fragmento de polpa dentária humana. 43
- Figura 14.** Fotomicrografia em fluorescência de gel de agarose. 44

LISTA DE ABREVIATURAS

Base A: Base Adenina

Base C: Base Citosina

Base G: Base Guanina

Base T: Base Timina

PB: Pares de Base

RGC: Células Ganglionares da Retina

SNC: Sistema Nervoso Central

TEN: Teneurina

TEN1: Teneurina 1

TEN2: Teneurina 2

TEN3: Teneurina 3

TEN4: Teneurina 4

TENs: Teneurinas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	53

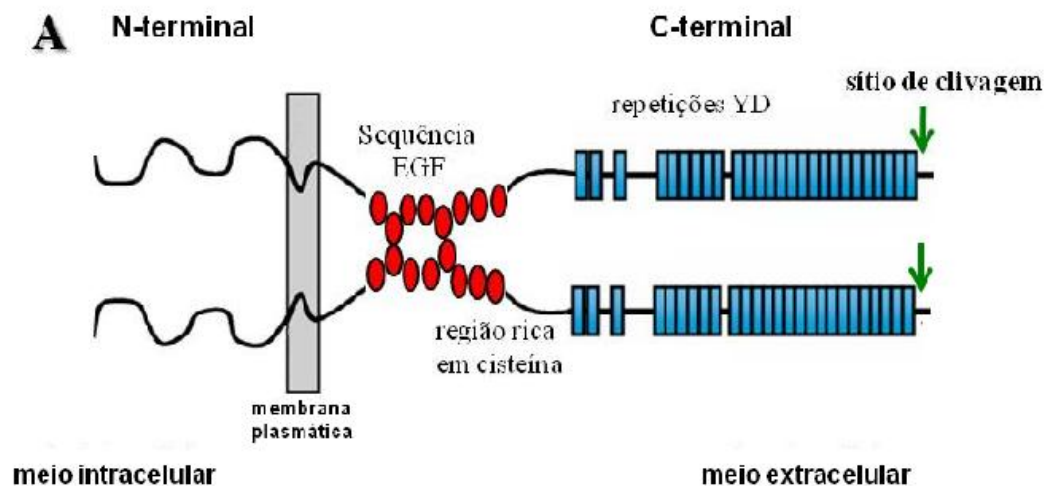
1 INTRODUÇÃO

A morfologia e a diferenciação dos organismos multicelulares são eventos regulados, coordenados e dependentes da interação célula-célula e célula-matriz extracelular (CHIQUET-EHRISMANN, 2004; TUCKER; CHIQUET-EHRISMANN, 2006). Esta interação é crucial para o desenvolvimento destes organismos sendo constatada a importante participação de proteínas do tipo transmembrana na regulação destes eventos. Inseridas nesta, uma nova família de proteínas transmembrana foram caracterizadas, denominadas de teneurinas (TENS) (TUCKER; CHIQUET-EHRISMANN, 2006).

As TENS são compostas por quatro membros (teneurina 1 a 4) e, foram descritas inicialmente em mamíferos em 1999, por estarem relacionadas as proteínas da matriz extracelular denominadas de tenascinas (ten) e apresentarem intensa expressão no sistema nervoso central (neurinas) (MINET et al., 1999; OOHASHI et al., 1999). Portanto, uma vez que esta família de proteínas transmembrana possui homologia com as tenascinas e está localizada preferencialmente no sistema nervoso central, foi estabelecida a denominação teneurinas (TUCKER; CHIQUET-EHRISMANN, 2006). Interessante que esta família de proteínas apresenta-se conservada ao longo das espécies sendo que em todos os organismos estudados notou-se sua expressão principalmente durante a morfogênese (TUCKER; CHIQUET-EHRISMANN, 2006).

As moléculas das TENS são classificadas como proteínas transmembrana do tipo II por apresentarem terminal carboxila e amino com orientação extracelular e intracelular, respectivamente (Figura 1). Apresentam em sua composição aproximadamente 2500 a 2800 aminoácidos e peso molecular de 300 kDa. O domínio extracelular é constituído por 2300 aminoácidos com vários resíduos com afinidade a moléculas da matriz extracelular sendo que este domínio apresenta elevada identidade entre as TENS de vertebrados e invertebrados, evidenciando sua conservação ao longo das espécies (MINET; CHIQUET-EHRISMANN, 2000; TUCKER; CHIQUET-EHRISMANN 2006; TUCKER et al., 2007, 2012). Além disso, foi verificado que a região carboxi-terminal das TENS apresenta capacidade de dimerização, após serem transportadas para a membrana plasmática; sugerindo a complexidade funcional na qual as TENS podem estar envolvidas devido a formação de várias moléculas a partir de um conjunto limitado de genes (FENG et al., 2002; LOVEJOY et al., 2006).

Figura 1 - Modelo estrutural esquemático das proteínas teneurinas ilustrando a constituição e a organização dimérica



Fonte: Adaptada de LOVEJOY et al., 2006.

Entre as funções atribuídas às TENs podemos citar a participação na interação homofílica entre células, orientação axonal, proliferação celular e regulação da transcrição gênica (BAGUTTI et al., 2003; KINEL-TAHAN, 2007; LEAMEY et al., 2008; NUNES et al., 2005; RUBIN et al., 2002; TUCKER; CHIQUET-EHRISMANN, 2006; YOUNG; LEAMEY, 2009). Esta regulação gênica é possível uma vez que as TENs possuem domínios intracelulares que são clivados frente a estímulos extracelulares comportando-se como fatores de transcrição para outros genes (BAGUTTI et al., 2003; NUNES et al., 2005). Assim sendo, o domínio intracelular da teneurina pode interagir com componentes do citoesqueleto através de sua interação com uma proteína adaptadora denominada de CAP/ponsina, proteína citoplasmática que se liga ao citoesqueleto durante a interação intercelular (NUNES et al., 2005). Em prosseguimento, o domínio intracelular da teneurina sofre proteólise e interage com uma segunda classe de proteínas ligantes citoplasmáticas de ação nuclear denominadas

de MBD1 (proteína 1 com domínio para ligação metil-CpG nuclear) ou zic (“zinc-finger transcription factor”), as quais têm atividade regulatória da transcrição gênica (BAGUTTI et al., 2003; NUNES et al., 2005).

O gene da teneurina tem sido sequenciado e quatro homólogos têm sido caracterizados em vertebrados, assim como seus respectivos transcritos, denominados de TEN1, TEN2, TEN3 e TEN4 (TUCKER; CHIQUET-EHRISMANN, 2006). Um dado interessante é que o gene da TEN1 está localizado na região Xq25 que está envolvida na Síndrome do X-frágil (BUERVENICH et al, 2001). Além disso, outras anormalidades mentais associadas à dismorfologias facias e dos membros têm sido mostradas em translocações e trissomias envolvendo o locus 5q34 que aloja o gene da TEN2 (DUBOVSKY et al., 1994; VIK; YATHAM, 1998). Estes dados sugerem importante papel funcional desta família no que se refere à neurogênese e organogênese. Porém, é notado que a maioria dos trabalhos de distribuição das TENS enfocam a distribuição no sistema nervoso central (SNC) que é o maior sítio de expressão porém, alguns trabalhos citam a distribuição na região orofacial de camundongos e aves principalmente na fase embrionária (BEN-ZUR et al., 2000; MINET et al., 1999; OOHASHI et al., 1999; RUBIN et al., 1999, 2002; TUCKER et al., 2001; ZHOU et al., 2003).

Em camundongos a distribuição do RNAm para TEN3 e TEN4 no estágio embrionário E12.5 foi observada no epitélio nasal, epitélio da córnea, retina e língua (BEN-ZUR et al., 2000). Interessantemente, embriões de camundongos mutantes para TEN4 nos estágios E6.5 a E17 apresentaram defeitos no padrão de formação, sobrevivência e proliferação celular durante a formação do tubo neural e organogênese, sugerindo importante participação das TENS no desenvolvimento (LOSSIE et al., 2005). Em aves no estágio E21 o RNAm para TEN2 foi verificado nos arcos branquiais, sendo expressiva a distribuição no mesênquima craniofacial. Esta expressão foi realçada no estágio E27 na região da face em desenvolvimento com sinal de expressão da TEN2 nos processos maxilar e mandibular (TUCKER et al., 2000, 2001). Desta maneira, estes resultados sugerem a participação das TENS no desenvolvimento embrionário favorecendo a organização tecidual em territórios craniofaciais.

Um estudo demonstrou que a TEN3 é necessária para o desenvolvimento estrutural e funcional de algumas células da retina como células ganglionares da retina (RGC), células amácrinas e nos neurônios tectais pós-sinápticos às RGC em peixes; sugerindo um papel na orientação das interações sinápticas no sistema visual (ANTINUCCI et al., 2013). Neste mesmo estudo, a diminuição (“knockdown”) da expressão do gene da TEN3 produziu alterações na morfologia dos axônios e dendritos das RGCs na camada nuclear interna da retina. Outros trabalhos que mencionam a participação da TEN3 na via visual mostraram que ela possui um papel importante no mapeamento neuronal da retina ao colículo superior do lado ipsilateral (DHARMARATNE et al., 2012) portanto, controlando a orientação do axônio da retina para o núcleo geniculado lateral dorsal (MERLIN et al., 2013). Também foi verificado que há expressão da TEN2 na retina, núcleo geniculado lateral dorsal, colículos superiores e córtex visual primário durante o desenvolvimento de ratos, complementando as informações sobre a expressão da TEN3; sugerindo que ambos os membros das TENs são importantes no processamento da informação visual (YONG et al., 2013). Além disso, tem sido demonstrado que a TEN3 também é importante para a estruturação da via olfatória, pois orienta às combinações específicas entre os axônios dos neurônios receptores olfatórios e dendritos das projeções neuronais (parceiros sinápticos) através da atração homofílica (HONG et al., 2012).

Recentemente, um trabalho mostrou a expressão da TEN4 em área de condensação mesenquimal em fêmur de ratos no estágio embrionário E13.5 (SUZUKI et al., 2014). Entretanto, essa expressão encontrou-se diminuída na placa de crescimento do fêmur no estágio embrionário E18.5. Os resultados do estudo sugerem que a TEN4 suprime a diferenciação condrogênica e regula a expressão e ativação das chaves moleculares para condrogênese (SUZUKI et al., 2014).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste projeto de pesquisa foi analisar a distribuição dos membros da família das TENS (TEN1-4) em tecidos orofaciais de ratos em diferentes fases de desenvolvimento através da técnica de imuno-histoquímica, baseando-se no fato de estudos relatarem a presença desta família de proteínas, através da expressão do RNAm, na região anterior (cranial) de embriões de aves e roedores. Também analisamos a imunorreatividade das TENS (TEN1-4) em molares de ratos adultos, durante lesão do complexo polpa-dentina, através da técnica de imuno-histoquímica. Além disso, a presença de TENS foi avaliada em polpa dentária humana, através dos métodos imuno-histoquímicos e de RT-PCR convencional.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e obtenção dos cortes histológicos

Foram utilizados ratas Wistar que foram colocadas para cruzamento (duas ratas por rato) às 18:00 horas, sendo que as mesmas foram analisadas no dia seguinte às 7:00 horas a fim de averiguar a presença de “plug” vaginal. As ratas positivas à presença do “plug” vaginal foram separadas em gaiolas individuais, sendo considerado dia 0 de gestação. A partir desta data, foram estabelecidos os dias de sacrifício das ratas para coleta dos embriões (15, 17 e 20 dias de vida i.u.). As demais ratas foram mantidas para a gestação final e nascimento da ninhada, sendo coletadas as amostras dos animais com 0, 5 e 7 dias de vida pós-natal.

Todos os animais foram mantidos no período experimental na sala de experimentação localizada no Setor de Morfologia do Departamento de Ciências Básicas sob o ciclo claro-escuro de 12-12 horas, temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com acesso a água e ração livre. O protocolo experimental seguiu os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Depois de constatado o acasalamento foi acompanhado os estágios de desenvolvimento embrionário de 15, 17 e 20 dias (E15, E17 e E20) das ratas progenitoras seguindo os sacrifícios dos embriões nestes estágios. O sacrifício das ratas progenitoras foi realizado com dose excessiva de anestésico através da injeção intramuscular de pentobarbital (100mg/kg) e em seguida os embriões de cada estágio foram removidos e decapitados. Os animais do grupo pós-natal foram submetidos ao sacrifício nos períodos de zero, cinco e sete dias de vida (P0, P5 e P7), após anestesia com cloridrato de cetamina e xilazina e em seguida decapitados. As cabeças dos embriões e ratos recém-nascidos permaneceram em solução fixadora (paraformaldeído 4% em PBS a 0,1M; pH 7,4) por 24 horas (embriões) e 48 horas (recém nascidos), seguido de descalcificação em EDTA 10% em PBS a 0,1M, durante 3 a 10 dias, seguido de lavagem em água corrente por 12 horas e lavagens finais em PBS.

Após a descalcificação, as amostras foram processadas em parafina obtendo cortes de 5 μm que foram estocados a temperatura ambiente. Para o processamento em parafina, as seguintes etapas foram seguidas: a) lavagem em água corrente; b) lavagem em PBS; c) desidratação em série crescente de alcoóis (70-100° – 40 minutos cada banho em sistema de vácuo); d) álcool-xilol (40 minutos) em sistema de vácuo; e) xilol I-III (40 minutos cada banho) em sistema de vácuo; f) parafina I-III (40 minutos cada banho) em estufa 56°C sob

controle microprocessado; g) inclusão e emblocamento; h) seccionamento com 5 µm em micrótomo automático Leica (RM2155, Leica Microsystems Inc.).

Após a microtomia das amostras, os cortes histológicos foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica, pelo método da imunofluorescência e, em seguida ao método da imunoperoxidase indireta para identificação da TEN1-4. Os protocolos utilizados para os métodos de imunofluorescência e imunoperoxidase são descritos a seguir.

3.2 Técnica de imuno-histoquímica

3.2.1 Método de imunofluorescência

Inicialmente os cortes histológicos foram montados em lâminas e submetidos às seguintes etapas: A) Desparafinização, os cortes histológicos montados em lâminas foram mantidos em estufa por um período de 30 minutos a 56°C e, submetidos a uma sequência de banhos em xilol I-III, durante cinco minutos cada passagem; B) Desidratação, álcool 100% por dois minutos, álcool 95% por dois minutos e álcool 70% por dois minutos. C) Lavagens, seguiu-se uma sequência de três lavagens em PBS (0,1M, pH 7,4), PBS/Triton (PBS 0,1M acrescido de 0,03% de triton X-100), seguido por PBS 0,1M, durante cinco minutos cada passagem; D) Recuperação antigênica, os cortes em lâminas foram tratados em calor úmido em câmara pressurizada (Decloaking Chamber – Biocare Medical, CA, USA), empregando solução de 1% de tampão citrato (100x Citrate Buffer, pH 6,0, Spring Bioscience, CA, USA); E) Resfriamento: os recipientes foram retirados da câmara pressurizada e passaram por resfriamento em temperatura ambiente por um período de uma hora e trinta minutos; F) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; G) Bloqueio das marcações inespecíficas, através da incubação dos cortes em PBS/Triton, acrescido de 5% de leite em pó desnatado, durante duas horas em temperatura ambiente; H) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; I) Bloqueio das marcações inespecíficas, através da incubação dos cortes em PBS/Triton, acrescido de BSA (albumina de soro bovina, SIGMA, CA, USA), durante duas horas. J) incubação em anticorpo primário (TEN1, 1:100, ABNO-H00010178-A01, ABNOVA, Taipei, Taiwan/ TEN2, 1:100, sc-165674, N-13, Santa Cruz Biotechnology CA, USA/ TEN3, 1:250, sc-136918, P-12, CA, USA/ TEN4, 1:500, sc-134883, H-50), durante 24 horas a 4°C; K) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; L) Incubação em anticorpo secundário biotilado (1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluído em

PBS/Triton, durante uma hora a temperatura ambiente; M) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; N) incubação em Cy3-Estreptavidina (1:500, Jackson ImmunoResearch, PA, USA), durante uma hora; O) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; P) contra-coloração com DAPI, segundo orientações do fabricante (TR-100-FJ BIOSSENSIS, CA, USA); Q) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa C; R) montagem com meio de montagem aquoso à base de glicerol e lâminulas de vidro.

3.2.2 Método de imunoperoxidase indireta

Para tal propósito, os cortes histológicos foram submetidos ao método de imunoperoxidase; entretanto, inicialmente foi realizada a recuperação antigênica (etapas A-F, citadas na página anterior), seguindo as seguintes etapas: A) Lavagens, seguiu-se uma sequência de três lavagens em PBS (0,1M, pH 7,4), PBS/Triton (PBS 0,1 M acrescido de 0,03% de triton X-100), seguido por PBS 0,1M, durante cinco minutos cada passagem; B) inibição da peroxidase endógena em solução de PBS/Triton, acrescido de 0,3% de H₂O₂; C) Lavagens, empregando solução de PBS, até que não haja mais bolhas no tecido; D) Inibição da avidina-biotina endógena, através da incubação inicial em solução de avidina/PBS durante 30 minutos, seguida de lavagens em PBS e, bloqueio final com biotina endógena durante 30 minutos (avidin/biotin kit blocking, Invitrogen, CA, USA); E) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa A; F) bloqueio das marcações inespecíficas, através da solução contendo PBS/Triton acrescido de 5% de leite em pó desnatado, durante 1h; G) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa A; H) bloqueio das marcações inespecíficas em PBS/Triton acrescido de 3% de soro normal de burro (Jackson ImmunoReserch, PA, USA), durante 24h; I) incubação no anticorpo primário diluído em solução PBS/Triton, acrescido de 2% soro normal de burro, além de um dos anticorpos primários anti-TEN (TEN1, 1:500, ABNO-H00010178-A01, ABNOVA, Taipei, Taiwan/ TEN2, 1:500, sc-165674, N-13, Santa Cruz Biotechnology CA, USA/ TEN3, 1:500, sc-136918, P-12, CA, USA/ TEN4, 1:1000, sc-134883, H-50 Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), durante 24hs a temperatura ambiente; J) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa A; K) Incubação com anticorpo secundário biotinilado específico (1:800, vector Laboratories, CA, USA), durante 1h a temperatura ambiente; L) Lavagens, como descrito anteriormente na etapa A; M) Incubação em solução do complexo avidina-biotina (1:100, ABC, Vector Laboratories, CA, USA), durante 1h a

temperatura ambiente; N) Lavagens, três lavagens em PBS, durante 10 minutos cada; O) Revelação da reação de imuno-histoquímica, através da solução de tampão PBS, acrescido de 0,05% de tetracloreto de diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical, MO, USA), 5% de sulfato-níquel-amônia (Fisher Scientific, NJ, USA) em tampão acetato e 0,006% de H₂O₂ a 30%, sob controle em microscopia de luz; P) lavagens em PBS e desidratação a temperatura ambiente, durante 24 horas. Em prosseguimento, as lâminas histológicas foram desidratadas, deslipidificadas e montadas com meio de montagem DPX (Sigma Chemical, MO, USA) e lamínulas de vidro.

3.2.3 Reações controle – imuno-histoquímica

3.2.3.1 Teste de adsorção

Ressaltamos que o mesmo protocolo da técnica de imunoperoxidase ou imunofluorescência foi utilizado para estabelecer a concentração ideal do anticorpo primário através do teste de titulação e para determinar a especificidade do anticorpo primário empregado através do teste de adsorção ou omissão do anticorpo primário. No que se refere ao teste de adsorção, este é baseado no conceito de verificar se o anticorpo primário se liga especificamente ao antígeno de interesse. Para isso é realizado, antes das etapas iniciais da técnica de imunoperoxidase ou imunofluorescência, a ligação do anticorpo primário com seu respectivo antígeno (peptídeo obtido comercialmente) considerando a concentração ideal do anticorpo TEN1, TEN2 e TEN3, obtido no teste de titulação. Desta forma, como exemplo, para o anticorpo TEN2 foi preparada soluções contendo concentrações decrescente do peptídeo (0,1 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,001 mg/ml, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), mantendo-se constante a concentração do anticorpo anti-TEN2 (1:100 – imunofluorescência ou 1:500 para imunoperoxidase), durante 18hs a 4 °C, sob agitação. Esta solução é empregada durante a incubação do anticorpo primário no protocolo de imuno-histoquímica, já descrito anteriormente.

Com relação à TEN4, o anticorpo comercial anti-TEN4 (H-50, fornecido pela empresa Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) não possui disponível comercialmente o peptídeo correspondente, impedindo a confirmação da sua especificidade pelo método de adsorção. Entretanto, em contato com o suporte técnico da Santa Cruz Biotechnol., assegurou-se que a especificidade deste anticorpo foi testada através de ensaios de Western Blot.

3.2.3.2 Omissão do anticorpo primário

A omissão do anticorpo primário também é um dos métodos de controle da reação de imuno-histoquímica conhecido como controle negativo, que visa determinar se o anticorpo secundário empregado é específico para reconhecer o anticorpo primário e não antígenos teciduais que poderiam gerar resultados falsos positivos. Para tanto séries de cortes histológicos foram submetidos ao protocolo da técnica de imuno-histoquímica retirando apenas a etapa de incubação do anticorpo primário. Em nossos resultados verificamos que os anticorpos secundários comerciais anti-coelho e anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology®) não marcaram nenhuma região dos tecidos orofaciais confirmando a especificidade dos anticorpos secundários em reconhecer apenas os anticorpos primários empregados na técnica de imuno-histoquímica.

3.3 Análise microscópica

As lâminas histológicas submetidas à imunofluorescência foram analisadas inicialmente em microscopia de epifluorescência (Axioplan, Leica Microsystem Inc.), sendo que os cortes histológicos que apresentaram marcação adequada foram reanalisados em microscopia confocal equipado com lasers diodo, Hélio-Neon e Argônio (modelo TCS-SP5 AOBS Tandem Scanner, LEICA, Germany), acoplado a um microscópio óptico invertido (Leica DMI 6000CS), no centro de microscopia eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (IBB -UNESP). A marcação de fundo (background) foi controlada em tempo real através do fotomultiplicador de voltagem e, ajustada para se obter o melhor resultado entre sensibilidade e inespecificidade. Foram utilizadas objetivas Planapochromat de 20x, 40x e 63x (abertura numérica 1,30) com imersão a óleo, que possibilitaram uma resolução de até ~150nm nos eixos x, y, além de ~300nm no eixo -z. As imagens digitais foram coletadas em formato TIFF. Os cortes histológicos submetidos à imunoperoxidase foram analisados em microscópio de luz (Axioplan, Leica Microsystem Inc., GmbH, Alemanha) acoplado com câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss MicroImaging, GmbH, Alemanha) e com auxílio do sistema de aquisição de imagens AxioVision Rel 4.8.2. software (Carl Zeiss MicroImaging, GmbH, Alemanha). As imagens foram ajustadas conforme

necessidade (brilho, contraste e intensidade), contudo sem alterar o padrão de imunomarcacão através do software Corel Draw.

3.4 Análise imuno-histoquímica das teneurinas durante lesões experimentais do complexo polpa-dentina

Para tal propósito, foram utilizados seis ratos machos adultos Wistar que foram submetidos a desgaste superficial dos molares inferiores com broca esférica (broca KG diamantada 1014) em peça de mão em baixa rotação (Strong 210 35k, Saeshin, Korea). Para isso, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina 0,5mg/g e xilazina 0,05mg/g e em seguida feitos os desgastes. Os animais foram mantidos no período experimental na sala de experimentação localizada no Setor de Morfologia do Departamento de Ciências Básicas sob o ciclo claro-escuro de 12-12 horas, temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com livre acesso a água e ração. A partir disto, foram estabelecidos os seguintes períodos pós-operatórios de 3, 7 e 15 dias para o sacrifício dos ratos para análise dos molares. Foram sacrificados dois animais para cada período experimental. O protocolo experimental seguiu os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Os animais foram sacrificados por perfusão transcardíaca nos períodos pós-operatórios citados acima, sendo inicialmente lavado o sistema circulatório com solução fisiológica (100 ml), seguido de solução fixadora (500 ml) de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio a 0.1M (pH 7,4) a 4°C . As mandíbulas foram dissecadas e permaneceram na solução fixadora citada por 24 horas. Em prosseguimento, as mandíbulas foram submetidas à descalcificação em EDTA 10% em PBS a 0,1M, durante 21 dias, seguido de lavagem em água corrente por 12 horas e lavagens finais em PBS.

O material foi processado em parafina obtendo cortes de 5 μm que foram coletadas em lâminas apropriadas para a reação imuno-histoquímica (carregadas positivamente), desidratadas a temperatura ambiente por 24 horas e mantidas em caixas para serem protegidas de sujeira e umidade. Para o processamento das amostras em parafina, as seguintes etapas foram seguidas: a) desidratação em série crescente de alcoóis (70-100° – 40 minutos cada banho em sistema de vácuo); b) álcool-xilol (40 minutos) em sistema de vácuo; c) xilol I-III (40 minutos cada banho) em sistema de vácuo; d) parafina I-III (40 minutos cada banho) em estufa 56°C sob controle microprocessado; e) inclusão e emblocamento; f)

seccionamento com 5 µm em micrótomo automático Leica (RM2155, Leica Microsystems Inc, SP, Brazil).

Após a microtomia das amostras, os cortes histológicos foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica pelo método da imunoperoxidase indireta. O protocolo utilizado para o método imunoperoxidase segue o mesmo descrito anteriormente.

3.5 Análise da expressão das tens e dos tcaps através do método de rt-pcr convencional

3.5.1 Confeção dos *Primers*

Inicialmente, para desenhar os *primers* que foram utilizados para a realização da técnica de RT-PCR, as sequências genômicas das TENs 1-4 e dos TCAPs 1-4 (expressos pelo último éxon das teneurinas) de humanos foram extraídas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) e ENSEMBL (www.ensembl.org). Após a coleta de informações, foram desenhados os *primers*, seguindo os critérios já conhecidos e atestados por software específicos (Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>)). Os *primers* foram testados previamente através de uma PCR (dados não mostrados) a partir disso foram selecionados os que tiveram melhor resultado para realizar a RT-PCR, mostrados na tabela 1. Os tamanhos dos produtos de RT-PCR obtidos pela amplificação gênica são mostrados na tabela 2.

Tabela 1 - Descrição dos primers para realização de RT-PCR. Abreviaturas: Ten: teneurina; H: humano; E: éxon; P3: primer obtido pelo Primer3plus; C: TCAP (peptídeo associado ao terminal carboxila das teneurinas); FWD: forward; RVS: reverse; *primers utilizado como controle (β-actina e GAPDH).

Ten1H-E30(P3)FWD	GTACTTCTATGAATACGATGCTGATGG
Ten1H-E30(P3)RVS	GCCATAAGGTGTGTATAGTATCTCCT
TCAP1H-E32(C)FWD	TTCATTTCCTTGGACCAACTACCTATG
TCAP1H-E32(C)RVS	CTGCTGCTTTTCCCCTTCTGTCCATGC
Ten2H-E23(P3)FWD	GAGAACAATGTCATCCTTCGAATC
Ten2H-E23(P3)RVS	CGTTGAAAACATATAACTCCTGCTC

TCAP2H-E29(C)FWD	GACAAGATGCACTACAGCATCGAG
TCAP2H-E29(C)RVS	CCATCTCATTCTGTCTTAAAACTGG
Ten3H-E21(P3)FWD	TGTTACCAGAGTGGAGATGGCTAC
Ten3H-E21(P3)RVS	CCAGTTTCATCACTTTTAGTGGCTA
TCAP3H-E27(C)FWD	CAACAACGCCTTCTACCTGGAGAAC
TCAP3H-E27(C)RVS	CGATCTCGCTCTGCCGCAGGAAC
Ten4H-E28(P3)FWD	CCCAATGGACAACCTCACTTTATGT
Ten4H-E28(P3)RVS	GTCCCCAGTGTAGGTGAAGTTGTA
TCAP4H-E34(C)FWD	TTTGCATCCAGCGGCTCAGTCTTT
TCAP4H-E34(C)RVS	TGGATGTTGTTGGCGCTGTCTGAC
MBACTINFWDC(PB)-HUMANO*	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
MBACTINRVSC(PB)-HUMANO*	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
MGADPHFWDC(PB)-HUMANO*	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
MGADPHRVSC(PB)-HUMANO*	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

Fonte: Autor Gestter Willian Lattari Tessarin

Tabela 2 - Número de pares de base (bp) dos produtos utilizadas para o presente estudo.

Primers	Pares de Base (bp)
Teneurina 1 e TCAP 1	585
Teneurina 2 e TCAP 2	496
Teneurina 3 e TCAP 3	498
Teneurina 4 e TCAP 4	602

Fonte: Autor Gestter Willian Lattari Tessarin

Os *primers* foram obtidos comercialmente (Síntese Biotecnologia Ltda., MG, Brasil) e os mesmos foram reconstituídos em tampão TE (10mM Tris base, 1mM EDTA, pH 8,0) na concentração de 100mM e aliquotados em tubos para PCR de 0,2 ml (PCR Tubes, Axygen Scientific, USA). A alíquota empregada para as reações de RT-PCR foram novamente diluídas para obter uma concentração de trabalho de 10mM.

3.5.2 Extração de RNA total de dentes humanos

Os dentes foram obtidos de pacientes com indicação cirúrgica para extração dos terceiros molares superiores e inferiores. O protocolo experimental e os procedimentos clínicos foram aprovados pela comissão de ética em pesquisa – humanos (Faculdade de Odontologia de Araçatuba). Os dentes extraídos foram cuidadosamente limpos com gases estéreis embebidas em clorexidina 0,12% (Periogard sem álcool, Colgate-Palmolive Company, USA) e rapidamente armazenados em nitrogênio líquido. Após esse processo, os dentes foram removidos do nitrogênio e armazenados em freezer -86°C (ULTRA Freezer 923, Forma Scientific, USA). No momento da extração do RNA total, os elementos dentários (n=11) foram removidos do freezer, transferidos para uma placa de Petri estéril e fraturados com auxílio de pinça hemostática odontológica. Os fragmentos pulpare e a superfície interna da câmara pulpar foram imediatamente curetados e transferidos para tubos livres de RNase e DNase estéreis com 1 ml de solução de Trizol (Ambion, Life Technologies, USA). Em seguida os tubos contendo trizol e o material coletado foi homogeneizado por 40 segundos (Tissue-Tearor, Biospec Products, USA) para lise tecidual e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Decorrido esse tempo, foi adicionado 200ul de clorofórmio (Amresco, Biotechnology Grade, USA) para cada 1ml de trizol utilizado inicialmente e, homogeneizado vigorosamente em vórtex (K40-1010, Multifuncional Vortex, Kasvi) durante 15 segundos e sequencialmente incubado no gelo durante 3-5 minutos. Após essa etapa e visualizado o processo inicial de separação de fases da solução foi realizada uma centrifugação (Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, Alemanha) durante 15 minutos a 12.000xg a 4°C. Este processo possibilitou uma maior separação de fases do eluato, permanecendo o RNA total na fase superior (fase aquosa) da solução. Em prosseguimento, a fase aquosa foi removida por pipetagem e transferida para um novo tubo de 2ml estéril (Kasvi, USA), sendo adicionado 0,5ml de isopropanol 100% (Sigma, USA) para cada 1ml de trizol utilizado inicialmente e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, realizou-se uma centrifugação a 12.000xg durante 10 minutos a 4°C, resultando na formação de um pequeno *pellet* na parede do tubo, permitindo a remoção do sobrenadante, restando somente o *pellet* no tubo de 2 ml. O *pellet* foi dissolvido em 1ml de álcool 75% (750ul de álcool 100% - Amresco, Biotechnology Grade, USA + 250ul de água Sigma, USA) e homogeneizado brevemente no vórtex. Uma nova centrifugação (7.500xg) foi realizada

durante 5 minutos a 4°C, sendo descartado o sobrenadante, deixando no tubo somente o *pellet* novamente formado. Este *pellet* foi desidratado a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Decorrido esse tempo, foram adicionados 100ul de água RNase e DNase “free” para ressuspensão do RNA total e incubado em bloco de aquecimento a seco (Dry Bath Incubator, Major Science, USA) durante 15 minutos a 57°C. A solução de RNA total foi então submetida a uma nova etapa de purificação, descrita abaixo.

Objetivando alcançar uma purificação do RNA e uma melhor qualidade do mesmo para as aplicações futuras, todo o RNA total extraído foi submetido a um processo de purificação utilizando o sistema de colunas do kit *Direct-zol™ RNA MiniPrep* (Zymo Research, EUA) no qual foi adicionado a mesma quantidade em microlitros de álcool 100% diretamente no volume inicialmente ressuspendido de RNA total, alcançando um volume álcool/RNA total de 1:1. Após a adição, o tubo foi vigorosamente homogeneizado no vórtex e o eluato foi transferido para uma coluna de purificação de RNA presente no kit, posicionada dentro de um tubo coletor e, centrifugado por 1 minuto a 16.000xg e 4°C. Decorrida a centrifugação, o lavado foi descartado, sendo adicionados 400ul de *Direct-zol™ RNA PreWash* no centro da coluna e centrifugado novamente por 1 minuto a 16.000xg a 4°C. Para alcançar uma lavagem mais eficiente da coluna e promover a remoção de possíveis contaminantes, este último passo foi repetido. Em seguida, foram acrescentados 700ul de *RNA Wash Buffer* na coluna e centrifugado a 16.000xg a 4°C durante 1 minuto. O lavado gerado foi descartado e uma nova centrifugação nas mesmas condições foi realizada. Em prosseguimento, o tubo coletor juntamente com o lavado foi descartado e a coluna foi posicionada dentro de um novo tubo de 2 ml estéril. Finalmente foi adicionado 100ul de água RNase e DNase “free” (presentes no kit) no centro da coluna e centrifugado a 16.000xg durante 1 minuto a 4°C. A solução final com o RNA total foi estocada em freezer -86C.

A quantidade de RNA foi mensurada através de espectrofotômetro (Optizen POP Series UV/Vis Espectro photo meter, Mecasys, Coréia) empregando microvolumes da amostra (1 µl). A qualidade do RNA (presença das subunidades 28S e 18S) foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose, nas condições citadas no subitem abaixo.

3.5.3 RT-PCR

Para as reações de RT-PCR foram empregadas as soluções do kit Verso 1-Step RT-PCR Hot-Star (#AB-1455/B, Thermo Scientific). As soluções do kit, assim como o RNA e os primers (TCAPs, TENs, β -actina) foram lentamente descongelados e mantidos em gelo, após serem retirados do freezer -20°C. As soluções de RT-PCR e o RNA foram previamente aliquotadas em tubos de PCR (0,2 ml PCR tubes, 3210105, Axygen) na seguinte sequência: a) 0,5 μ l de uma mistura de enzima transcriptase reversa e inibidor de RNase (Verso enzyme mix); b) 12,5 μ l de tampão contendo DNA polimerase (2X 1-Step PCR Hot-Star Master Mix); c) 1,25 μ l de solução para remover a contaminação por DNA (RT Enhancer); d) 0,5 μ l de cada primer (10nM); e) 2 μ l de template (RNA); f) 7,75 μ l de água RNase DNase “free”. Os tubos com as soluções serão agitados por 20 segundos, centrifugados brevemente e posicionados no termociclador (Matercycler Gradient, Eppendorf), empregando o seguinte programa: a) síntese de cDNA a 50°C por 15 minutos; b) inativação da transcriptase reversa (verso enzyme mix) a 95°C por 15 minutos; c) desnaturação a 95°C por 20 segundos; d) anelamento a 53°C por 1 minuto; e) extensão a 72°C por 1 minuto; f) repetição as etapas *c*, *d* e *e* durante 50 vezes, g) extensão final a 72°C por 5 minutos; h) manutenção a 4°C. Após o término da amplificação gênica, os tubos foram agitados por 20 segundos, centrifugados e mantidos em gelo.

Para análise dos produtos da RT-PCR, foi confeccionado um gel de agarose (Agarose RA, AMRESCO, USA) na concentração de 1,5% em tampão 0,5x (Tampão TBE (45mM Tris base; 45mM ácido bórico; 1mM de EDTA, pH 8,0, SIGMA, USA) com 0,05 μ l/ml de brometo de etídeo (AMRESCO, USA). Em cada cavidade do gel de agarose foram depositados 15 μ l da amostra da RT-PCR acrescidos de 3 μ l de corante para DNA (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03% de azul de bromofenol; 0,03% de cianol FF xileno; 60% de glicerol; 60mM EDTA, 6x loading dye solution, SM 0241, Fermentas, Thermo Scientific, USA). Após a eletroforese de nucleotídeos em tampão TBE 0,5x, submetida a 40 volts por 120 minutos, o gel foi levado ao Image Quant LAS 500 (GE Healthcare, Japão) para análise ultravioleta e captura das imagens através de câmera acoplada ao Image Quant e salvo em arquivo eletrônico.

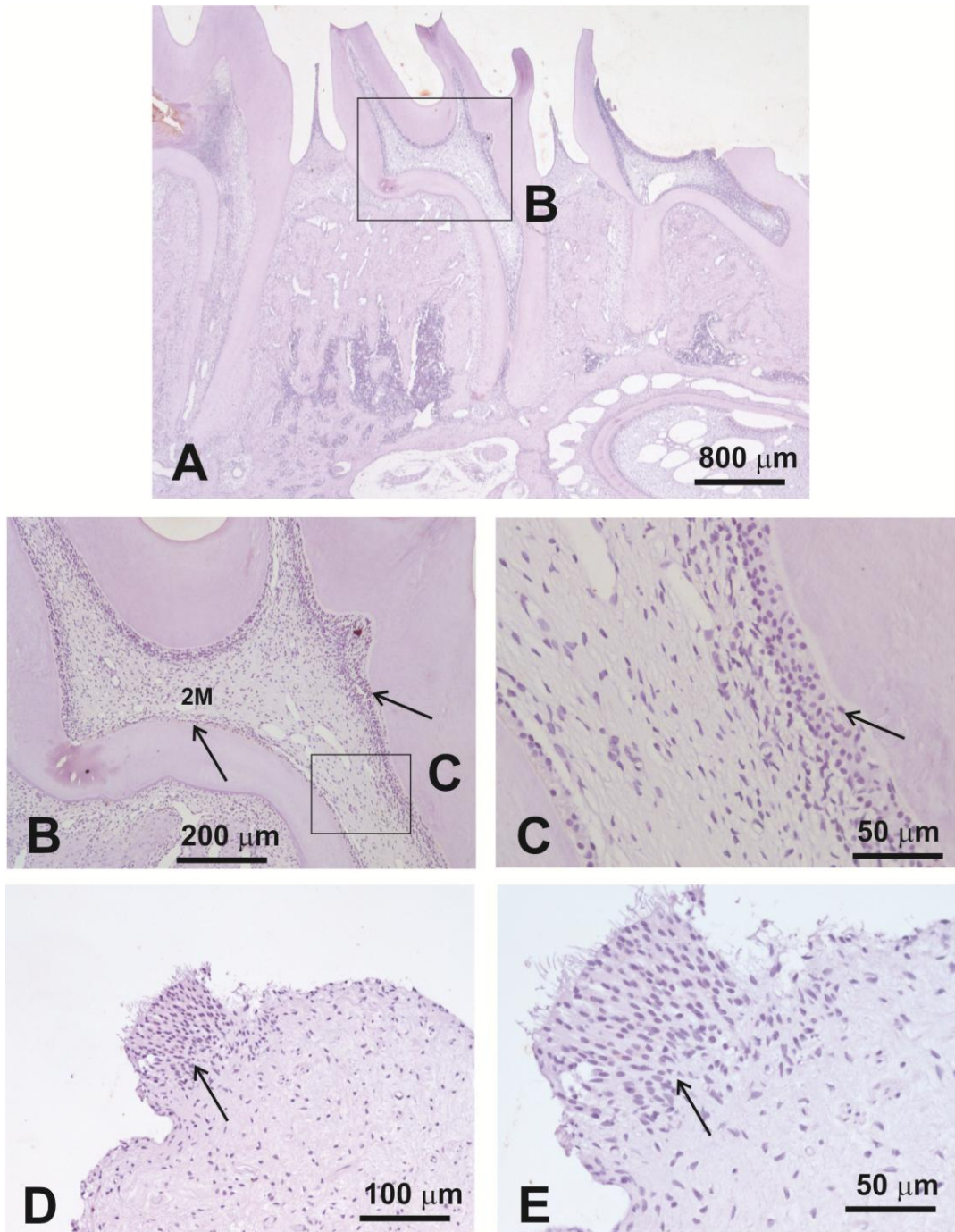
4 RESULTADOS

4.1 Imuno-histoquímica

4.1.1 Reação controle

A especificidade dos anticorpos empregados foi testada através da omissão do anticorpo primário assim como em testes de adsorção, sendo verificada a ausência total de imunomarcação tanto em amostras de ratos assim como nos fragmentos da polpa dental humana (Figura 2). Nos testes de adsorção, a imunomarcação foi totalmente eliminada na concentração elevada de peptídeo adsorvido com anticorpo TEN2 (1:40) (Figura 2); enquanto nas concentrações menores de peptídeo (1:10; 1:5; 1:1), a imunomarcação foi gradativamente tornando-se visível. Não foram realizados testes de adsorção para testar os demais anticorpos anti-teneurinas, pois a marcação imuno-histoquímica mais evidente foi somente relacionada a TEN2.

Figura 2 - Fotomicrografia em campo claro de cortes histológicos de dente molar inferior de rato (A-C) e de fragmento da polpa dentária humana (D-E) submetidos ao teste imuno-histoquímico de adsorção empregando anticorpo anti-TEN2 e o peptídeo correspondente (imunógeno). As áreas destacadas são mostradas em maior aumento em B e C. Observar a total ausência de imunorreatividade dos odontoblastos a TEN2 (setas). Observação: os odontoblastos são as células que apresentam intensa imunorreatividade a TEN2 (ver próximas figuras). Abreviaturas: 2M, segundo molar inferior.



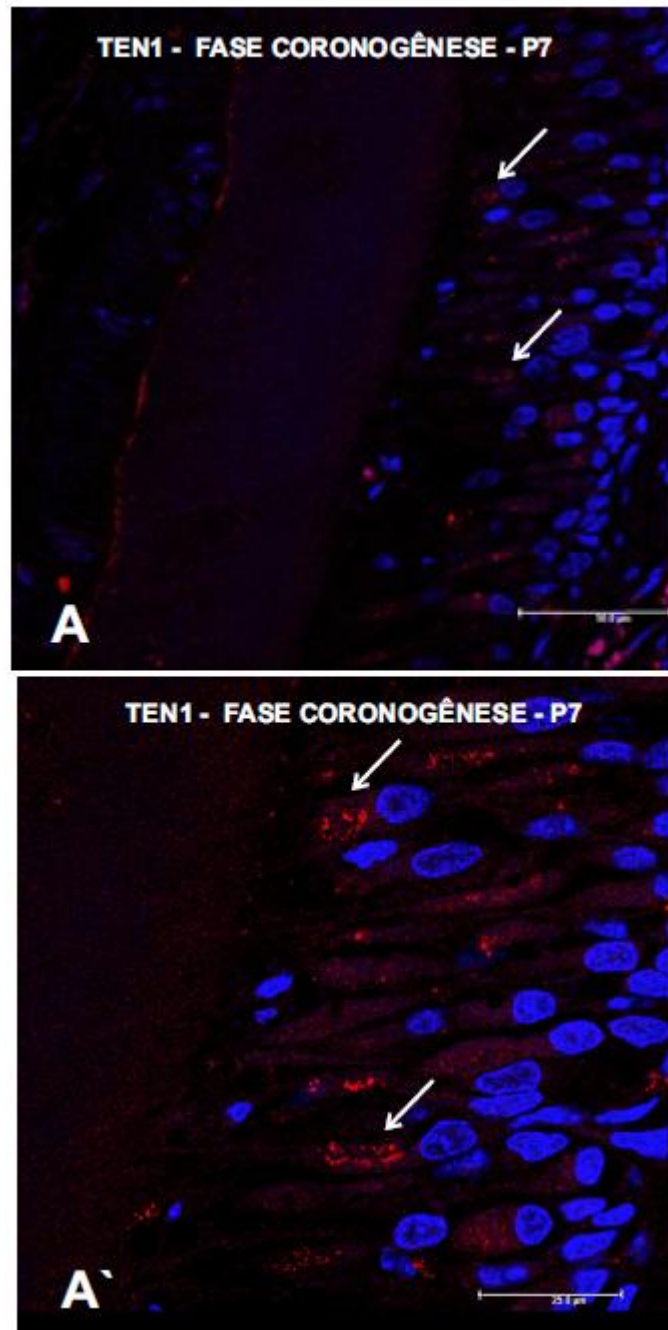
Fonte: Do Autor

4.1.2 Imuno-histoquímica para detecção de TENs na região orofacial e do germe dental durante desenvolvimento dentário

A imunorreatividade foi restrita as células presentes ao germe dental. Em especial, as células da linhagem odontoblástica exibiram imunorreatividade para TEN1 e TEN2, sendo que a imunorreatividade para a TEN1 foi discreta e evidente apenas nas células odontoblásticas durante a coronogênese (Figura 3). Enquanto, a imunorreatividade para a TEN2 foi inicialmente observada durante a diferenciação dos odontoblastos (pré-odontoblastos – fase de campânula inicial) e aumentava significativamente durante a fase tardia de desenvolvimento dentário (odontoblastos – fase de campânula tardia e coronogênese), assim como em dentes completamente formados (Figuras 4 e 5).

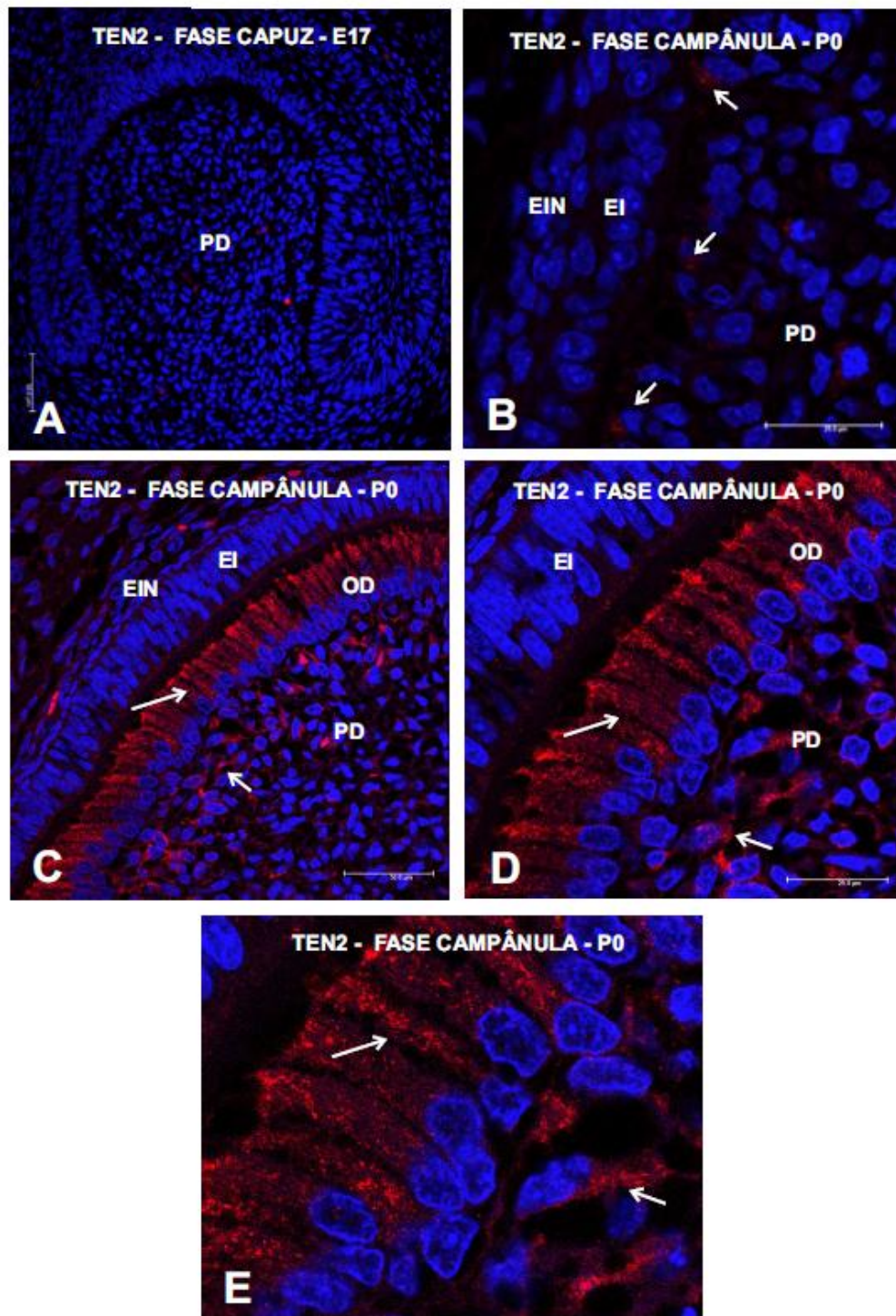
As células da linhagem condroblásticas da cartilagem de Meckel também exibiram imunorreatividade para TEN2 (Figura 6).

Figura 3 - Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN1 na fase de coronogênese do primeiro molar do rato Wistar em P7 (A-A'). Observar uma moderada imunorreatividade no citosol do polo apical dos odontoblastos, próximo ao núcleo (setas). Nota: Imunofluorescência - TEN1 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul.



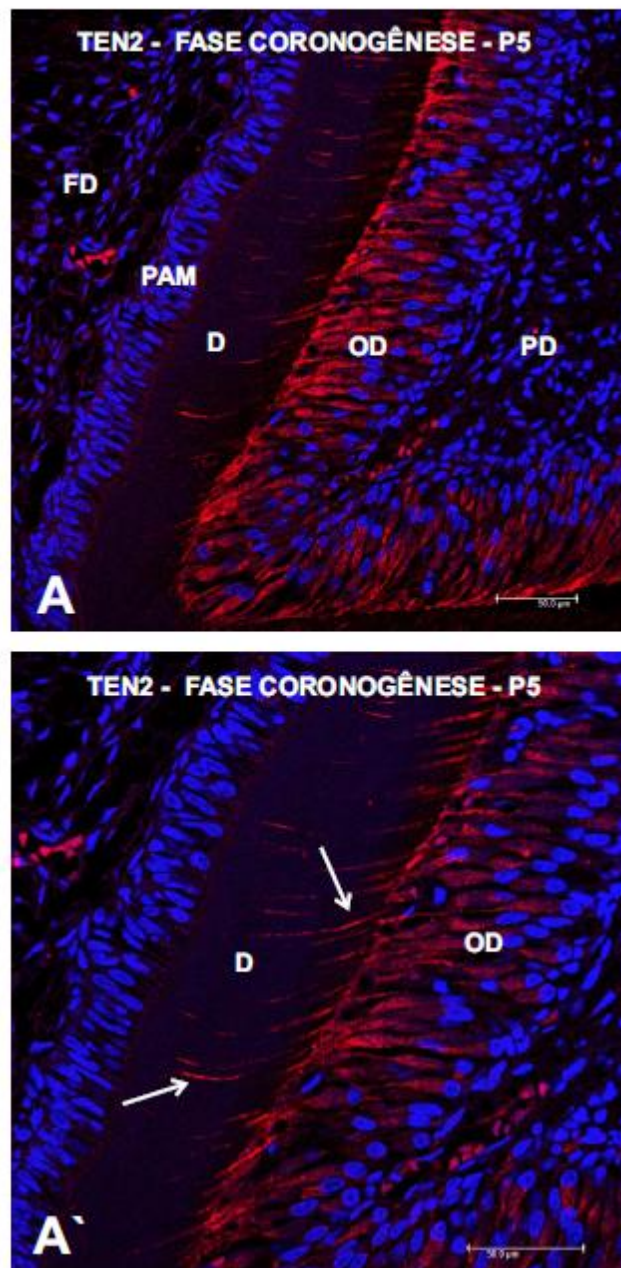
Fonte: Do Autor

Figura 4 - Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN2 na fase de capuz (A) e campânula (B-E) do primeiro molar do rato Wistar em E17 (A) e P0 (B-E). Observar uma moderada imunorreatividade nos pré-odontoblastos na papila dental na fase de campânula (B – setas menores). A imunorreatividade a TEN2 torna-se intensa à medida que os odontoblastos se diferenciam (C-D, setas maiores). Notar também que a imunorreatividade está situada no citosol com predominância no polo apical, próximo ao núcleo celular (E). Algumas células pré-odontoblásticas permanecem exibindo imunorreatividade a TEN2, na papila dentária próxima aos odontoblastos (D-E). Nota: Imunofluorescência – TEN2 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul. Abreviaturas: EI, epitélio interno do órgão do esmalte; EIN, extrato intermediário; OD, camada de odontoblastos; PD, papila dentária.



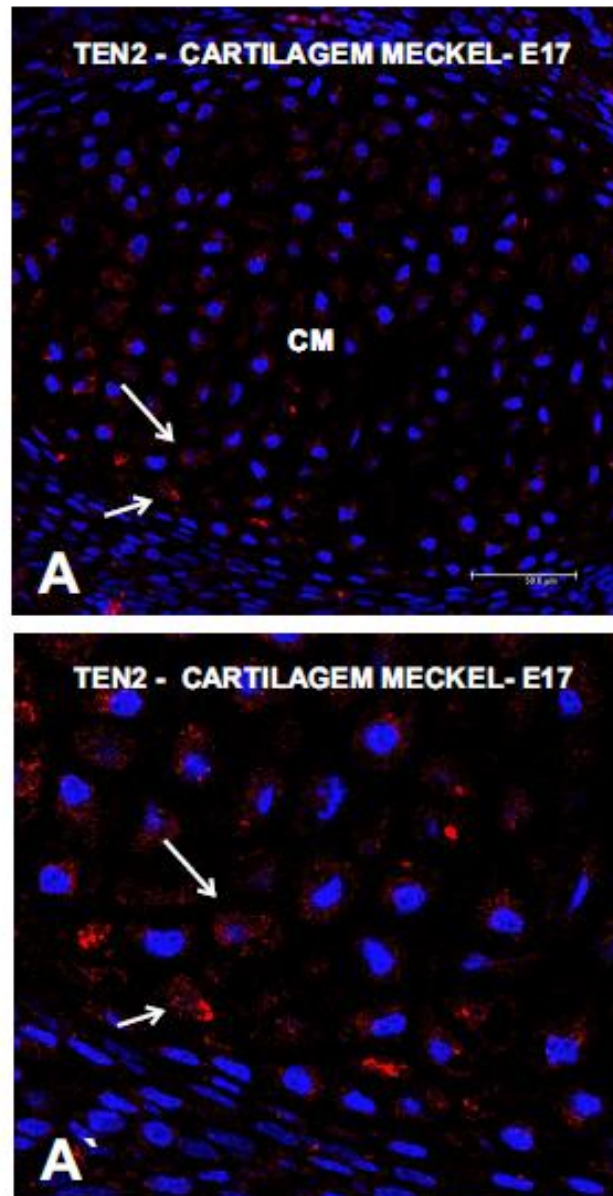
Fonte: Do Autor

Figura 5 - Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN2 na fase de coronogênese (A-A') do primeiro molar do rato Wistar em P5 (A-A'). Observar uma intensa imunorreatividade nos odontoblastos. A imunorreatividade a TEN2 também esta presente nos prolongamentos odontoblásticos (setas). Nota: Imunofluorescência – TEN2 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul. Abreviaturas: D, dentina; FD, folículo dentário; OD, camada de odontoblastos; PAM, pré-ameloblastos; PD, papila dentária



Fonte: Do Autor

Figura 6 - Fotomicrografia em microscopia confocal mostrando a imunorreatividade para a TEN2 na cartilagem hialina de Meckel do rato Wistar em E17 (A-A'). Observar imunorreatividade nos condroblastos (seta menor) e condrócitos (seta maior). A imunorreatividade a TEN2 é predominantemente citosólica. Nota: Imunofluorescência – TEN2 revelado com o anticorpo secundário marcado com Cy3, fluorescência vermelha; núcleos marcados com DAPI, fluorescência azul. Abreviaturas: CM, cartilagem de Meckel.



Fonte: Do Autor

4.1.3 Análise imuno-histoquímica das teneurinas durante lesão experimental do complexo dentina-polpa

Os desgastes da superfície oclusal (trauma mecânico) dos molares inferiores, através do uso de broca esférica em baixa rotação, resultaram em processos inflamatórios com diferentes graus de severidade no complexo dentina-polpa. Frequentemente, o desgaste foi mais acentuado no primeiro molar inferior e menos severo no segundo e terceiro molar inferior. Entretanto, em alguns casos, a lesão pulpar evoluiu para um processo necrótico, impossibilitando a avaliação temporal do processo de regeneração tecidual. Por outro lado, os casos experimentais com processos inflamatórios de graus moderado, permitiram evidenciar a diferenciação de novos odontoblastos a partir de células mesenquimais indiferenciadas da polpa, principalmente na polpa coronária. Isto foi, especialmente, observado no prazo de 15 dias de pós-operatório.

As análises imuno-histoquímicas, através do método da imunoperoxidase indireta revelaram que a principal imunorreatividade das proteínas da família das teneurinas presente no complexo dentina-polpa é decorrente da expressão da TEN2 pelos odontoblastos (Figura 7). A imunorreatividade a TEN2 é similar àquela presente durante o desenvolvimento dentário quando da diferenciação dos odontoblastos, na fase de coronogênese. A imunoreatividade da TEN2 está distribuída pelo citosol dos odontoblastos tanto na região do corpo celular assim como em seus prolongamentos odontoblásticos, em toda a extensão dos túbulos dentinários (Figura 7). A imunorreatividade a TEN2 não está presente na região central da polpa dentária.

Os odontoblastos, que permaneceram viáveis durante o processo inflamatório induzido pelo trauma mecânico no complexo dentina-polpa, reduziram significativamente a imunorreatividade à TEN2; não somente na região subjacente a lesão dentinária, mas também no assoalho da polpa dentária e na região inicial dos canais radiculares no período pós-operatório de 3 dias (Figura 8). Portanto, de alguma forma, os odontoblastos, mesmo não afetados diretamente pelo trauma mecânico, são sinalizados a reduzirem a expressão da TEN2 (Figura 8F). É interessante salientar que algumas células da polpa central apresentaram imunorreatividade a TEN2, nesse período de pós-operatório (Figura 8D).

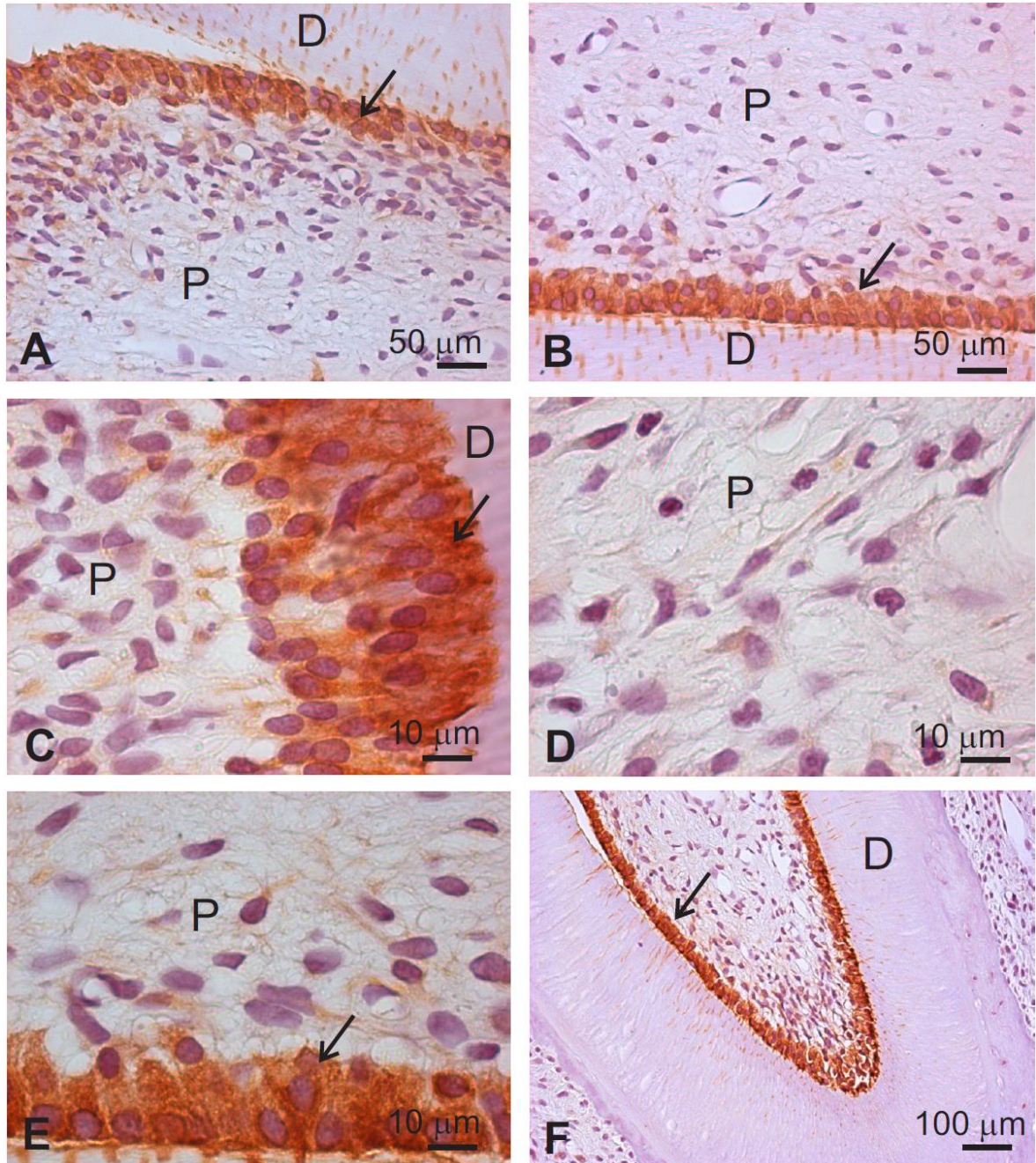
A imunorreatividade a TEN2 aumentou no 7º. dia de pós-operatório tanto em decorrência da diferenciação de novos odontoblastos (Figura 9A-B), como na imunorreatividade que torna-se presente na camada sub-odontoblástica (possivelmente em células mesenquimais indiferenciadas que estão se diferenciando em pré-odontoblastos,

Figura 9F), além da presença de imunorreatividade também em algumas células da polpa central (Figura 9D). A imunorreatividade, aparentemente, também aumenta nos odontoblastos situados distantes do foco inflamatório da polpa coronária (Figura 9E).

Avaliação do complexo dentina-polpa no 15º dia de pós-operatório revelou que os odontoblastos estão se organizando e formando novamente uma camada contínua de células, concomitante com o aumento da imunorreatividade da TEN2 (Figura 10); contudo, exibindo menor imunorreatividade que nos odontoblastos de dentes sadios.

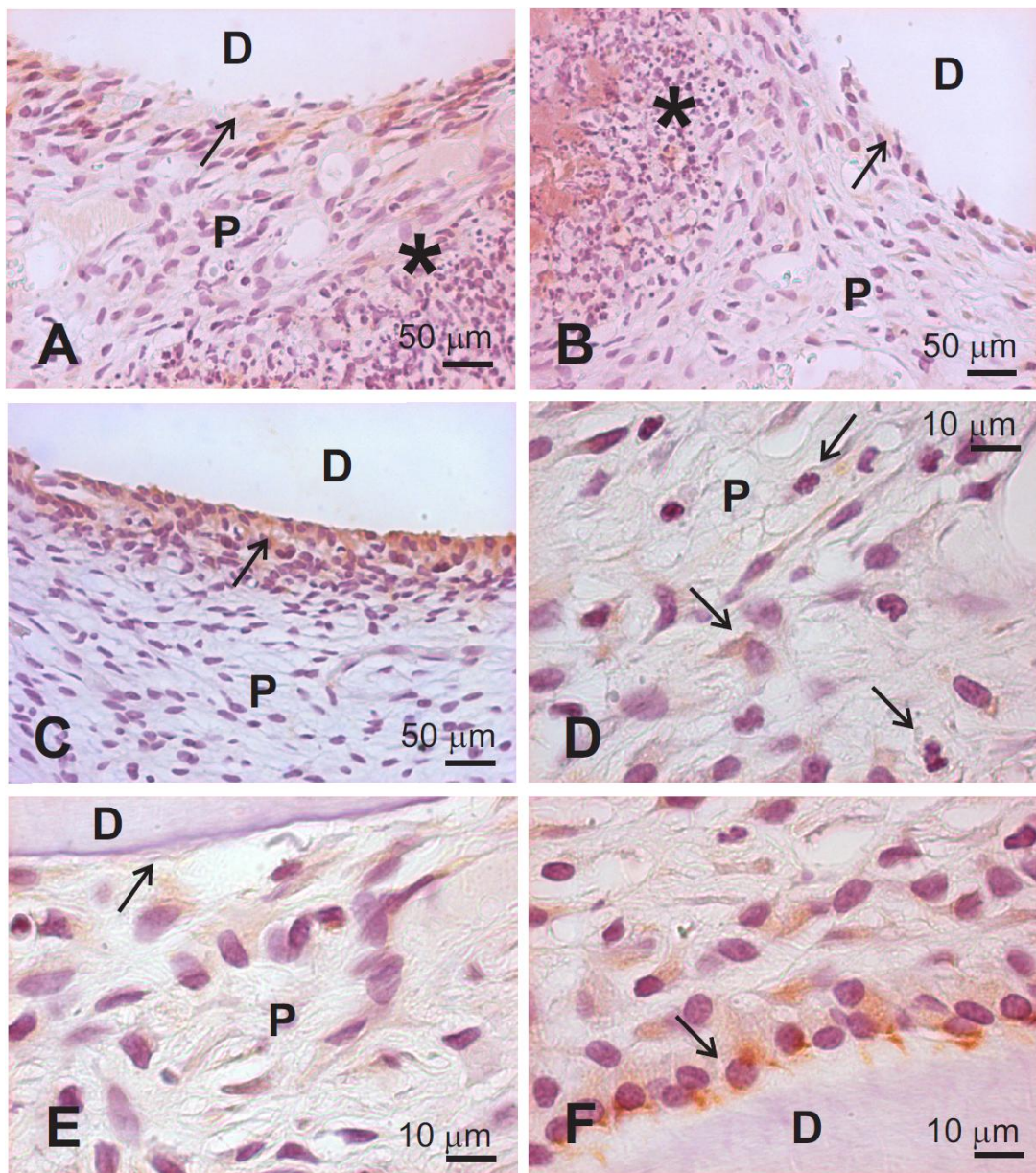
Um ponto a ser destacado é que a imunorreatividade a TEN2 não ficou apenas restrita aos odontoblastos e algumas outras células pulpares (possivelmente células mesenquimais indiferenciadas), mas também estava presente em osteoblastos e cementoblastos com características de elevada atividade de síntese proteica (Figura 12). Assim sendo, observamos imunorreatividade em osteoblastos situados em áreas sensíveis ao trauma dentário, tais como na crista óssea alveolar e no septo interradicular, nos quais se notou clara atividade osteogênica (Figura 12). Interessantemente, somente os cementoblastos ao redor do periápice exibiram imunorreatividade a TEN2, mostrando também um claro sinal que estas células estavam em intensa atividade metabólica (Figura 12). Possivelmente, estes cementoblastos estão aumentando a secreção de cemento celular de fibras extrínsecas e intrínsecas, sugerindo um mecanismo prévio de tentativa de selamento do canal radicular antevendo uma possível expansão do processo inflamatório, que está evoluindo na polpa coronária. A intensa imunorreatividade a TENS pelos cementoblastos foi principalmente notada nos dentes cuja evolução do processo inflamatório evoluiu negativamente, resultando na necrose pulpar, suportando a hipótese acima mencionada.

Figura 7 - Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (dente controle), mostrando o complexo dentina-polpa, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. Observar a intensa imunorreatividade a TEN2, principalmente nos odontoblastos (setas), na região coronária (A e C), parede lateral da polpa coronária (B, menor aumento/ E, maior aumento) e no canal radicular (F). Abreviaturas: D, dentina; P, polpa.



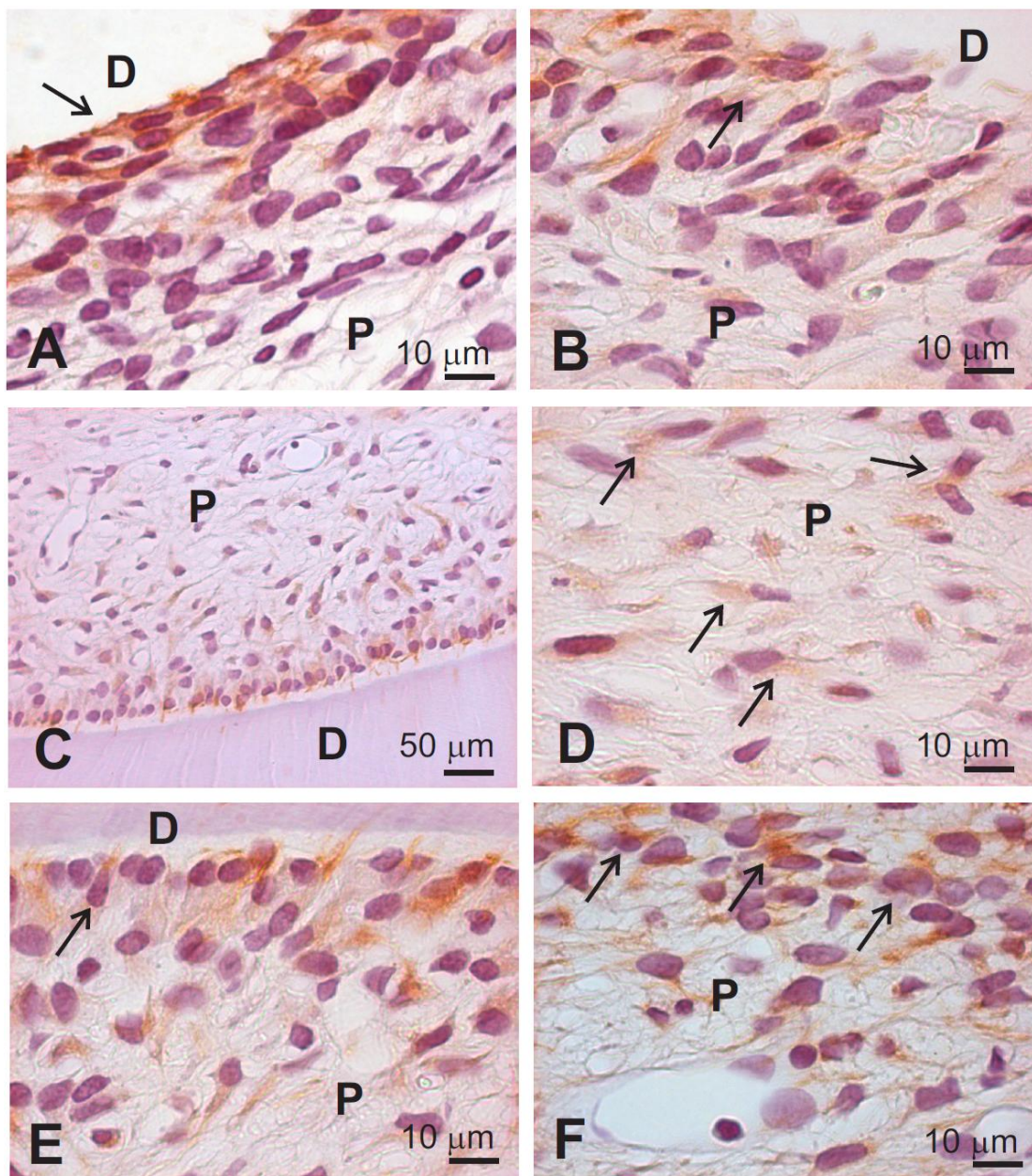
Fonte: Do Autor

Figura 8 - Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (3 dias de pós-operatório – lesão traumática na superfície oclusal), mostrando o complexo dentina-polpa, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. Observar que a típica camada de odontoblasto foi eliminada nas áreas subjacente a lesão traumática (A-C, setas) e também no assoalho da polpa coronária (E, seta). Entretanto, os odontoblastos do canal radicular permaneceram íntegros, mas exibindo discreta imunorreatividade a TEN2 (F, seta). Alguns odontoblastos (seta) que persistem próximo à região da lesão inflamatória pulpar (asterisco), ainda exibem imunorreatividade a TEN2, porém discreta (A-C). Notar que as células da polpa central começam a apresentar imunorreatividade a TEN2 (D, setas). Abreviaturas: D, dentina; P, polpa.



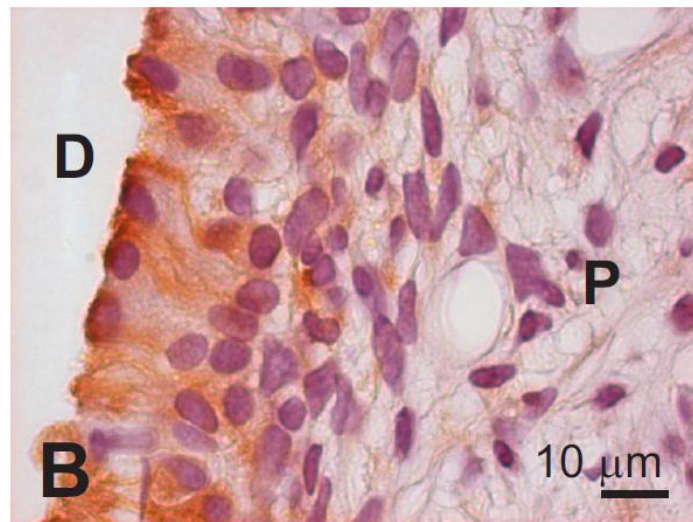
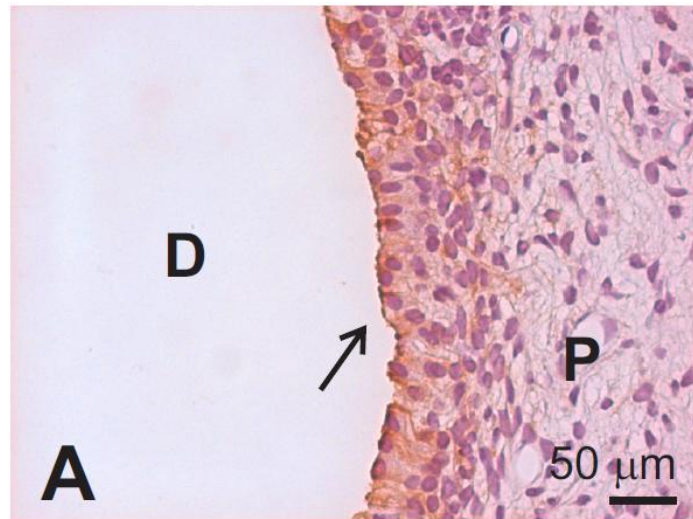
Fonte: Do Autor

Figura 9 - Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (7 dias de pós-operatório – lesão traumática na superfície oclusal), mostrando o complexo dentina-polpa, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. Observar que a quantidade de odontoblastos aumentou nas áreas subjacentes à lesão traumática (A-B, setas), assim como a imunorreatividade a TEN2 tornou-se mais evidente. Notar que um maior número de células da polpa periférica (F, zona rica em células, setas) e da polpa central (D, setas) apresentam imunorreatividade a TEN2. Além disso, observar que os odontoblastos, distante da lesão inflamatória, tais como no assoalho da câmara pulpar e nos canais radiculares também aumentam a imunorreatividade a TEN2 (C e E, seta). Abreviaturas: D, dentina; P, polpa.



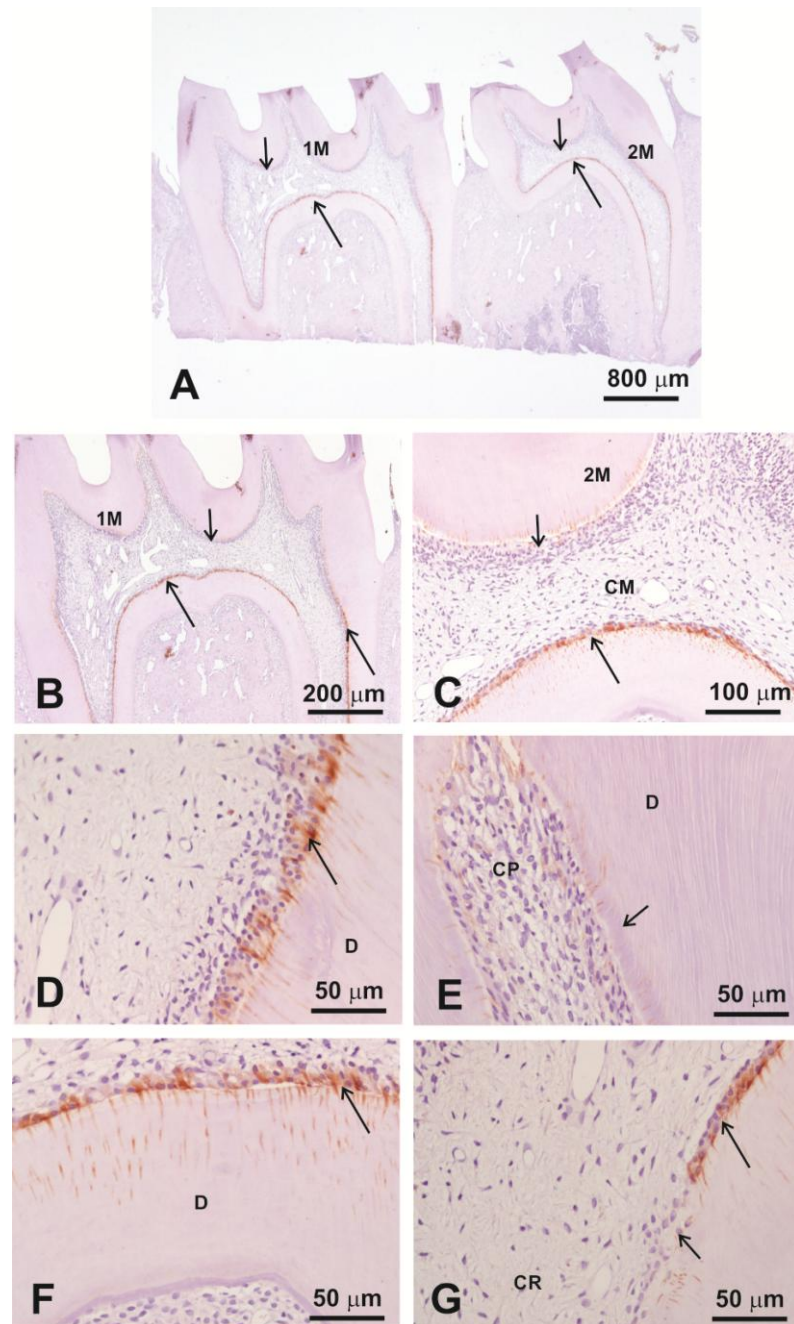
Fonte: Do Autor

Figura 10 - Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (15 dias de pós-operatório – lesão traumática na superfície oclusal), mostrando o complexo dentina-polpa, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. Observar um claro aumento na quantidade de odontoblastos que se diferenciaram nas áreas subjacentes a lesão traumática (A, menor aumento; B, maior aumento, setas), assim como a imunorreatividade a TEN2 tornou-se mais evidente nas demais áreas (Figura C, seta). Abreviaturas: D, dentina; P, polpa.



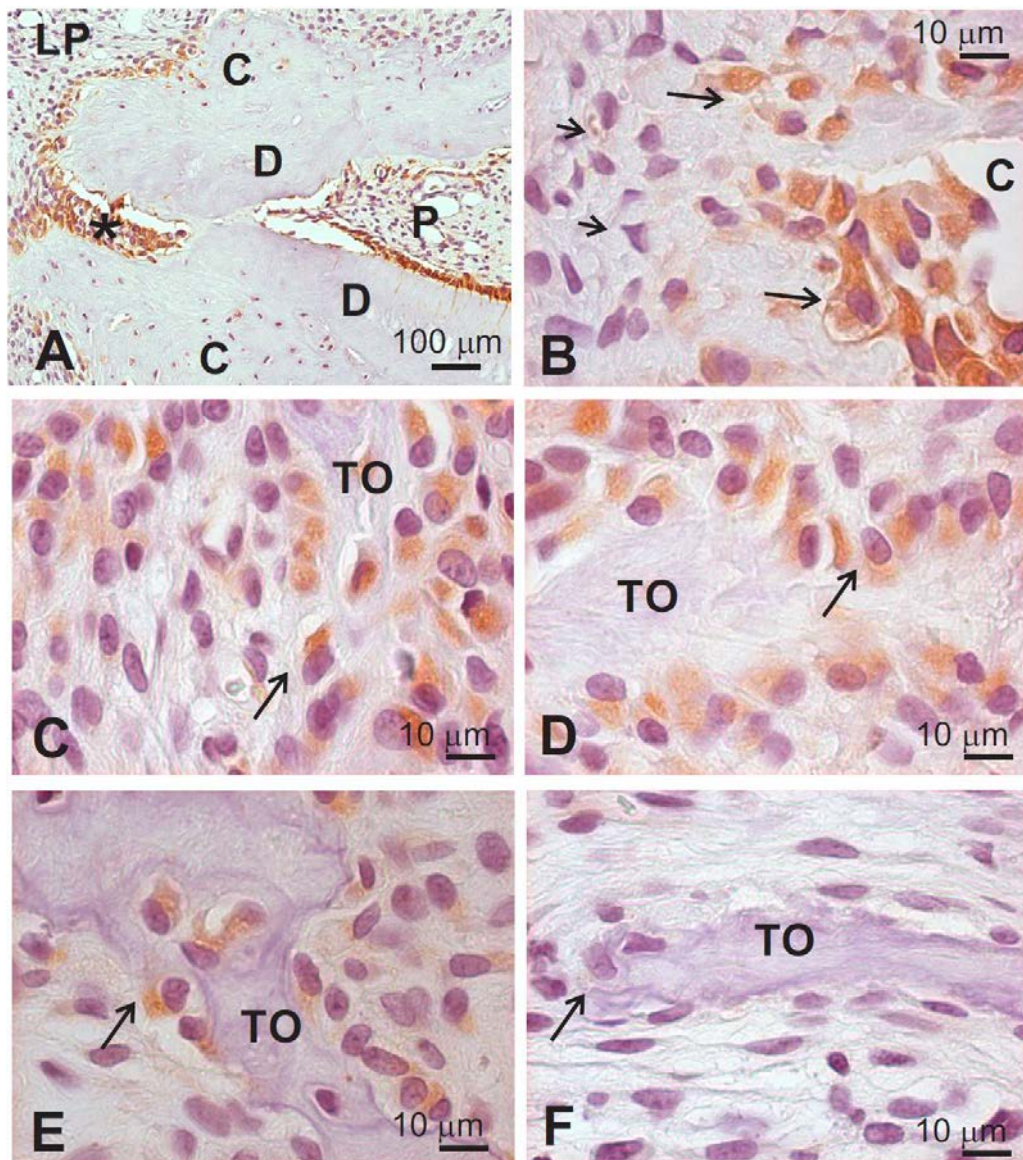
Fonte: Do Autor

Figura 11 - Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (15 dias de pós-operatório – lesão traumática na superfície oclusal), submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. Observar que neste espécime, a lesão traumática do complexo polpa-dentina apresentou menor severidade com regeneração dos odontoblastos e produção discreta de dentina terciária (seta menor em D). Observar a persistência de áreas com odontoblastos não exibindo imunorreatividade a TEN2 (setas menores). Abreviaturas: 1M, primeiro molar; 2M, segundo molar; CM, câmara pulpar; CP, corno pulpar; CR, canal radicular; D, dentina.



Fonte: Do Autor

Figura 12 - Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de dente molar inferior de rato (15 dias de pós-operatório – lesão traumática na superfície oclusal), mostrando áreas do periodonto de sustentação, submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TEN2. Observar uma nítida imunorreatividade a TEN2 em células do periodonto (cementoblastos e osteoblastos, A-E, setas). Em A é mostrado em menor aumento a região do periápice, tangenciando a abertura do forame apical (asterisco), dentina radicular (D) e o cemento celular de fibras extrínsecas e intrínsecas (C). Em B é mostrado os cementoblastos (setas) imunorreativos a TEN2 no periápice dental. Os osteoblastos também exibem uma nítida imunorreatividade a TEN2 no septo interradicular (C e E) e na crista óssea alveolar (D), enquanto em áreas da mandíbula distante do periodonto, os osteoblastos na superfície das lamelas de tecido ósseo (TO) não apresentam imunorreatividade a TEN2 (E)



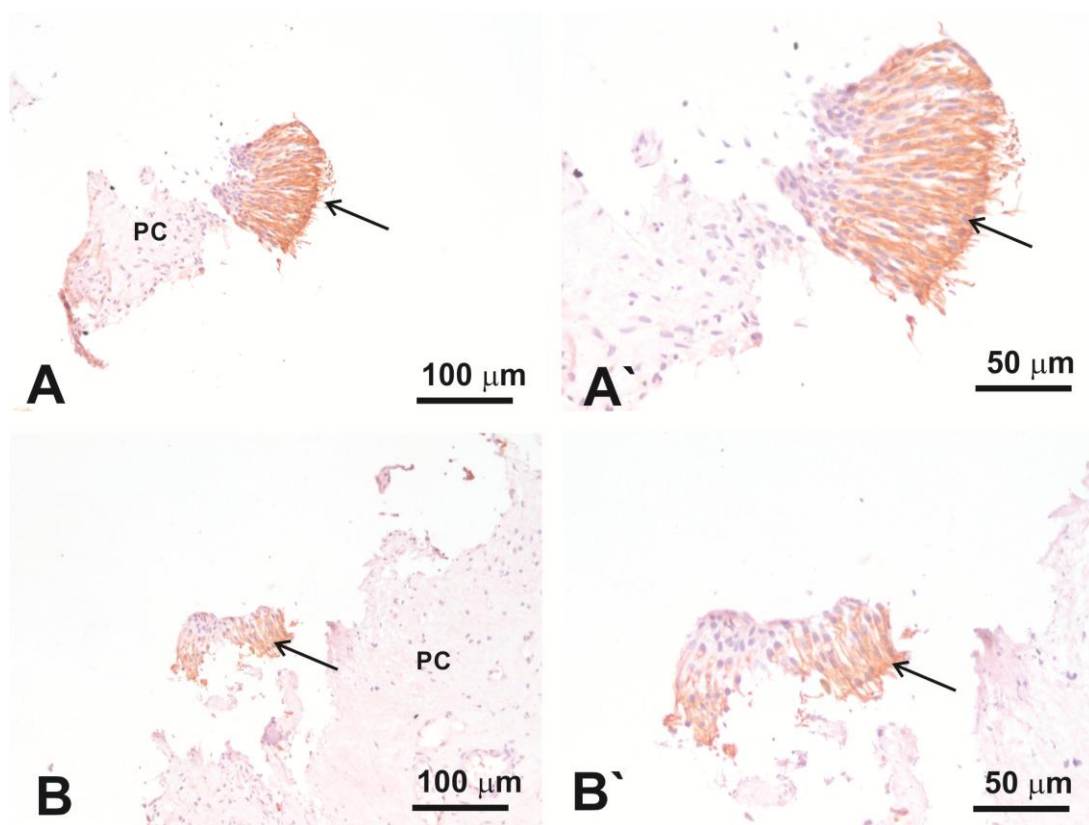
Fonte: Do Autor

4.2 Análise da expressão das teneurinas em amostras de polpa dentária humana

4.2.1 Imuno-histoquímica

Os fragmentos de polpa humana (n=4) submetidas à imunoperoxidase revelaram que os odontoblastos são as únicas células pulpares que apresentaram imunorreatividade a TEN2 (Figura 13). A imunorreatividade foi similar àquela observada em dentes molares de rato, ou seja, os odontoblastos apresentaram imunorreatividade homogênea em todo o seu citoplasma (Figura 13).

Figura 13 - Fotomicrografia em campo claro de corte histológico de fragmento de polpa dentária humana. Observar a presença da camada de odontoblastos (setas) mostrando intensa imunorreatividade a TEN2.



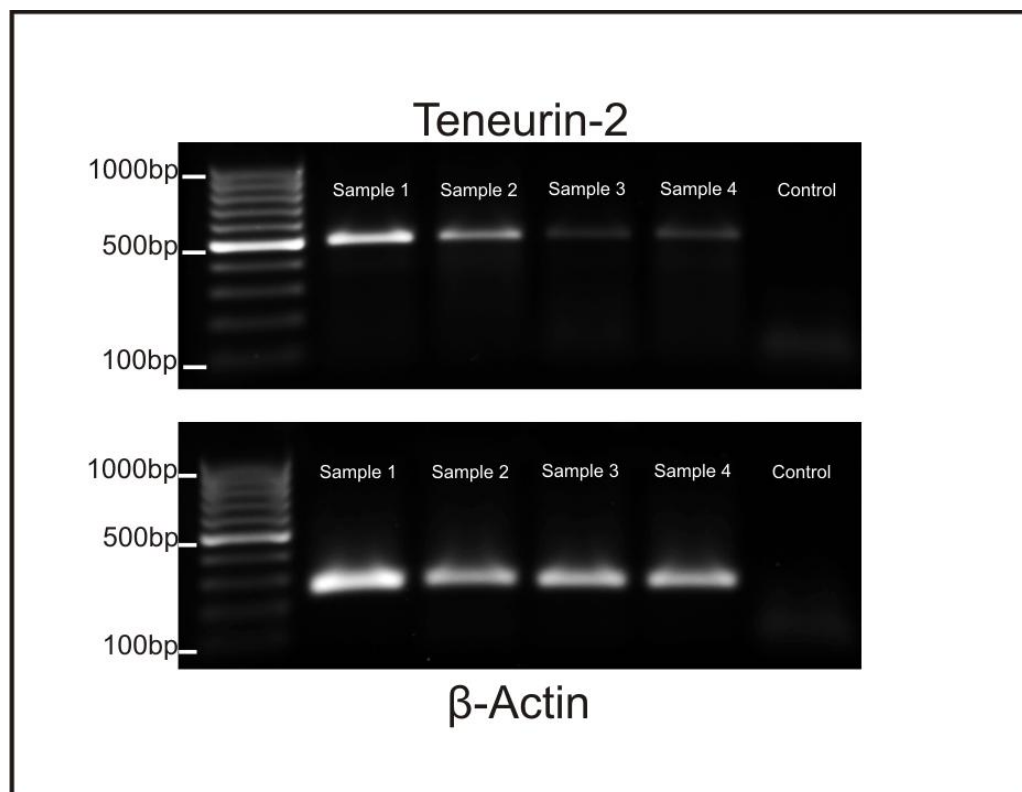
Fonte: Do Autor

4.2.2 RT-CR convencional

Nesta etapa foi extraído o RNA total de 11 dentes terceiros molares provenientes de quatro pacientes. A análise da qualidade do RNA através de gel de agarose revelou que o mesmo estava preservado em todas as amostras coletadas, evidenciado pela clara presença das duas bandas de RNA ribossômico (28S e 18S, dados não mostrados). Os resultados de RT-PCR confirmaram a expressão da TEN2 (Figura 14) na polpa dentária de todas as amostras.

Nas reações controle foi omitida a adição do RNA e nenhuma banda foi observada no gel de agarose. Não foi realizada reação controle de PCR apenas, pois existe uma DNase no kit de RT-PCR que elimina qualquer vestígio ou contaminação de DNA previa a reação de transcriptase reversa. A amplificação da beta-actina foi realizada como controle positivo das reações de RT-PCR e para normalização dos dados, se necessário (Figura 14).

Figura 14. Fotomicrografia em fluorescência de gel de agarose. Em A é mostrado o resultado do RT-PCR convencional empregando RNA total extraído da polpa dentária de polpa proveniente de 4 pacientes e *primers* para amplificar a sequência da TEN2. Em B, observar a expressão de beta-actina nas mesmas amostras, como controle.



Fonte: Do Autor

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez a presença de teneurina, em particular a presença de TEN2 em odontoblastos. Esta expressão da TEN2 em odontoblastos foi também evidenciada em amostras humanas, comprovada através da expressão gênica (RT-PCR). Além disso, também notamos que a imunorreatividade a TEN2 pelos odontoblastos é sensível a modulação durante lesão traumática da polpa dentária de ratos adultos. As demais TENs não revelaram imunorreatividade significativa ou fidedignas na região orofacial ou durante o desenvolvimento orofacial. Vale ser ressaltado, que a imunorreatividade a TEN1 foi transiente nos odontoblastos durante o desenvolvimento dentário.

Estudos anteriores indicaram uma possível expressão das teneurinas durante a fase inicial da morfogênese cranial (arcos branquiais), sem mencionar sua expressão durante o desenvolvimento dentário (BEN-ZUR et al., 2000; MIEDA et al., 1999; TRZEBIATOWSKA et al., 2008; TUCKER et al., 2000, 2001; ZHOU et al., 2003). Nossos dados apontam que a TEN2 pode estar diretamente relacionada à diferenciação dos odontoblastos a partir das células ectomesenquimais da papila dentária (fase de campânula); além da manutenção destas células diferenciadas, haja vista que sua expressão permanece intensa em odontoblastos de dentes maduros.

Baseado no fato que as teneurinas são proteínas transmembranas de interação homofílica ou heterofílica, que permitem que neurônios estabeleçam circuitos sinápticos precisos (MOSCA, 2015); podemos inferir que a TEN2 haja através de interação homofílica entre os odontoblastos. Deste modo, mantendo estas células justapostas para formar a camada de odontoblastos. Vale ser ressaltado, que recentemente foi observado que as latrofilinas (proteína de membrana que interage com a alfa-latrotoxina, uma toxina de aracnídeos) são um dos possíveis receptores para as teneurinas. Em particular, foi observado que a latrofilina 1 interage com uma proteína variante (*splice variant*) da TEN2 denominado de Lasso (BOUCARD et al., 2014; WOELFLE et al., 2015). Baseado nestes dados, nosso grupo de pesquisa analisou se os odontoblastos apresentam imunorreatividade às latrofilinas, sendo que os resultados apontaram ausência de imunorreatividade às latrofilinas (dados não apresentados). Esta informação indica que a TEN2, de fato, está mediando uma interação homofílica entre os odontoblastos, ou seja, a TEN2 de um odontoblasto se acopla a proteína TEN2 do odontoblasto adjacente.

A diminuição da imunorreatividade da TEN2 nos odontoblastos, durante lesão pulpar, pode também sugerir que esta alteração poderia permitir um processo de desacoplamento celular, facilitando a migração dos odontoblastos ou, mesmo, facilitando a ruptura da camada de odontoblastos, sendo este um evento inicial do processo de reparo tecidual pulpar.

Interessantemente, a imunorreatividade a TEN2 estava difusamente presente no citosol dos odontoblastos. Este dado demonstra que a TEN2 nos odontoblastos, possa não somente ser uma proteína transmembrana, mas também uma proteína secretora. Existem trabalhos indicando que as teneurinas apresentam *splice variants*, ou seja, o RNAm pode ser transcrito com outros formatos, gerando proteínas com pequeno peso molecular que possam atuar diferentemente nas células, inclusive sendo secretados para o meio extracelular (TUCKER et al., 2001; 2006). Disto posto, novos estudos necessitam esclarecer se a TEN2 nos odontoblastos são apenas proteínas transmembranas, ou também podem estar envolvidos em outros processos celulares.

Os resultados obtidos das amostras de polpa humana através do método imuno-histoquímico e pelo RT-PCR convencional indicaram que a expressão da TEN2 mantém-se conservada em primatas humanos. Estes dados reforçam a importância desta proteína transmembrana nos odontoblastos, suportando novos estudos que possam esclarecer a função(ões) da TEN2 nestas células.

Finalmente, devemos destacar que os odontoblastos são uma linhagem celular diferenciada, cuja origem é das células ectomesenquimais da crista neural, que por sua vez são provenientes do neuroectoderma (ARANA-CHAVEZ; MASSA, 2004; MAYOR; THEVENEAU, 2014). Portanto, não é surpresa que os odontoblastos possam expressar proteínas típicas de células neuronais ou de origem neuronal. Assim sendo, é sabido que os odontoblastos expressam nestina (proteína do filamento intermediário presente em neurônios) (QUISPE-SALCEDO et al., 2012), proteína tau associada aos microtúbulos - mapt (MIYAZAKI et al., 2015), proteína 1B associada aos microtúbulos (MAURIN et al., 2009), proteína de canais de potássio (MAGLOIRE et al., 2003), entre outras.

6 CONCLUSÕES

Os odontoblastos apresentam imunorreatividade à proteína TEN2, desde a fase de diferenciação celular, observada na fase de campânula dos germes dentários de molares de ratos. Esta imunorreatividade permaneceu presente nos odontoblastos em dentes molares completamente formados.

A imunorreatividade a TEN2 dos odontoblastos é sensível à modulação por processo inflamatório, induzido experimentalmente, na polpa dentária de molares de ratos.

A polpa dentária de humanos apresentam também odontoblastos imunorreativos a TEN2. A expressão de TEN2 na polpa dentária de humanos foi confirmada através do método de RT-PCR.

REFERÊNCIAS

- ANTINUCCI, P.; NIKOLAOU, N.; MEYER, M.P.; HINDGES, R. Teneurin-3 specifies morphological and functional connectivity of retinal ganglion cells in the vertebrate visual system. *Cell. Rep.*, v. 5, n. 3, p. 582-592, nov. 2013.
- ARANA-CHAVEZ, VE; MASSA, LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 36, n. 8, p. 1367-73, aug. 2004
- BAGUTTI, C.; FORRO, G.; FERRALLI, J.; RUBIN, B.; CHIQUET-EHRISMANN, R. The intracellular domain of teneurin-2 has a nuclear function and represses zic-1-mediated transcription. *J. Cell. Sci.*, n. 116, n. 14, p. 2957-66, aug. 2003.
- BEN-ZUR, T.; FEIGE, E.; MOTRO, B.; WIDES, R. The mammalian Odz gene family: homologs of a *Drosophila* pair-rule gene with expression implying distinct yet overlapping developmental roles. *Dev. Biol.*, n. 217, n. 1, p. 107-120, jan. 2000.
- BOUCARD, AA; MAXEINER, S; SÜDHOF, TC. Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, v. 289, n. 1, p. 387-402, jan. 2014.
- BUERVENICH, S.; XIANG, F.; SYDOW, O.; JONSSON, E.G.; SEDVALL, G.C.; ANVRET M; OLSON L. Identification of four novel polymorphisms in the calcitonin/alpha-CGRP (CALCA) gene and an investigation of their possible associations with Parkinson disease, schizophrenia, and manic depression. *Hum. Mutat.*, v. 17, n. 5, p. 435-436, may 2001.
- CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 36, n. 6, p. 986-990, jun. 2004.
- DHARMARATNE, N; GLENDINING, KA; YOUNG, TR; TRAN, H; SAWATARI, A; LEAMEY, CA. Ten-m3 is required for the development of topography in the ipsilateral retinocollicular pathway. *PLoS One*, v. 7, n. 9, doi: 10.1371/journal.pone.0043083, sep. 2012.
- DUBOVSKY, SL; THOMAS, M; HIJAZI, A; MURPHY, J. Intracellular calcium signalling in peripheral cells of patients with bipolar affective disorder. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, v. 243, n. 5, p. 229-234, feb. 1994.
- FENG, K; ZHOU, XH; OOHASHI, T; MÖRGELIN, M; LUSTIG, A; HIRAKAWA, S; NINOMIYA, Y; ENGEL, J; RAUCH, U; FÄSSLER, R. All four members of the Ten-m/Odz family of transmembrana proteins form dimmers. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n.29, p. 26128-35, jul. 2002.
- HONG, W; MOSCA, TJ; LUO, L. Teneurins instruct synaptic partner matching in an olfactory map. *Nature*, v. 484, n. 7393, p. 201-207, mar. 2012.

KINEL-TAHAN, Y; WEISS, H; DGANY, O; LEVINE, A; WIDES, R. *Drosophila* *odx* gene is required for multiple cell types in the compound retina. *Dev. Dyn.*, v. 236, n. 9, p. 2541-54, sep. 2007.

LEAMEY, CA; GLENDINING, KA; KREIMAN, G; KANG, ND; WANG, KH; FASSLER, R; SAWATARI, A; TONEGAWA, S; SUR, M. Differential gene expression between sensory neocortical areas: potential 12 roles for *Ten_m3* and *Bcl6* in patterning visual and somatosensory pathways. *Cereb Cortex*, v. 18, n. 1, p. 53-66, jan. 2008.

LOSSIE, AC; NAKAMURA, H; THOMAS, SE; JUSTICE, MJ. Mutation of *17Rn3* shows that *Odz4* is required for mouse gastrulation. *Genetics*, v. 169, n. 1, p. 285-99, jan. 2005.

LOVEJOY, DA; AL CHAWAF, A; CADINOUCHE, MZ. Teneurin C-terminal associated peptides: an enigmatic family of neuropeptides with structural similarity to the corticotropin-releasing factor and calcitonin families of peptides. *Gen. Comp Endocrinol.*, v. 148, n. 3, p. 299-305, sep. 2006.

MAGLOIRE, H; LESAGE, F; COUBLE, ML; LAZDUNSKI, M; BLEICHER, F. Expression and localization of TREK-1 K⁺ channels in human odontoblasts, *J. Dent. Res.*, v. 82, n. 7, p. 542-5, jul. 2003.

MAURIN, JC; COUBLE, ML; STAQUET, MJ; CARROUEL, F; ABOUT, I; AVILA, J; MAGLOIRE, H; BLEICHER, F. Microtubule-associated protein 1b, a neuronal marker involved in odontoblast differentiation. *J. Endod.*, v. 35, n. 7, p. 992-6, jul. 2009.

MAYOR, R; THEVENEAU, E. The role of the non-canonical Wnt-planar cell polarity pathway in neural crest migration. *Biochem. J.*, v. 457, n. 1, p. 19-26, jan. 2014.

MERLIN, S; HORNG, S; MAROTTE, LR; SUR, M; SAWATARI, A; LEAMEY, CA. Deletion of *Ten-m3* induces the formation of eye dominance domains in mouse visual cortex. *Cereb Cortex*, v. 23, n. 4, p. 763-74, apr. 2013.

MIEDA, M; KIKUCHI, Y; HIRATE, Y; AOKI, M; OKAMOTO, H. Compartmentalized expression of zebrafish *ten-m3* and *ten-m4*, homologues of the *Drosophila* *ten(m)/odd* *Oz* gene, in the central nervous system. *Mech. Dev.*, v. 87, n. 1-2, p. 223-7, sep. 1999.

MINET, A; CHIQUET-EHRISMANN, R. Phylogenetic analysis of teneurina genes and comparison to the rearrangement hot spot elements of *E. coli*. *Gene*, v. 257, n. 1, p. 87-97, oct. 2000.

MINET, AD; RUBIN, BP; TUCKER, RP; BAUMGARTNER, S; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurin-1, a vertebrate homologue of the *Drosophila* pair-rule gene *ten-m*, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. *J. Cell. Sci.*, v. 112, n. 12, p. 2019-32, jun. 1999.

MIYAZAKI, T; BABA, TT; MORI, M; MORIISHI, T; KOMORI, T. Microtubule-associated protein tau (Mapt) is expressed in terminally differentiated odontoblasts and severely down-regulated in morphologically disturbed odontoblasts of Runx2 transgenic mice. *Cell Tissue Res.*, v. 361, n. 2, p. 457-66, aug. 2015.

MOSCA, TJ. On the Teneurin track: a new synaptic organization molecule emerges. *Front Cell. Neurosci.*, v. 27, n. 9, p. 204, may 2015.

NUNES, SM; FERRALLI, J; CHOI, K; BROWN-LUEDI, M; MINET, AD; CHIQUET-EHRISMANN, R. The intracellular domain of teneurin-1 interacts with MBD1 and CAP/ponsin resulting in subcellular codistribution and translocation to the nuclear matrix. *Exp. Cell. Res.*, v. 305, n. 1, p. 122-32, apr. 2005.

OOHASHI, T; ZHOU, XH; FENG, K; RICHTER, B; MÖRGELIN, M; PEREZ, MT; SU, WD; CHIQUET EHRISMANN, R; RAUCH, U; FÄSSLER, R. Mouse ten-m/Odz is a new family of dimeric type II transmembrane proteins expressed in many tissues. *J. Cell. Biol.*, v. 145, n. 3, p. 563-77, may 1999.

QUISPE-SALCEDO, A; IDA-YONEMOCHI, H; NAKATOMI, M; OHSHIMA, H. Expression patterns of nestin and dentin sialoprotein during dentinogenesis in mice. *Biomed. Res.*, v. 33, n. 2, p. 119-32, apr 2012.

RUBIN BP; TUCKER RP; MARTIN D; CHIQUET-EHRISMANN R. Teneurins: a novel family of neuronal cell surface proteins in vertebrates, homologous to the *Drosophila* pair-rule gene product Ten-m. *Dev. Biol.*, v. 216, n. 1, p. 195-209, dec. 1999.

RUBIN, BP; TUCKER, RP; BROWN-LUEDI, M; MARTIN, D; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurin 2 is expressed by the neurons of the thalamofugal visual system in situ and promotes hemophilic cell-cell adhesion in vitro. *Development*, v. 129, n. 20, p. 4697-705, oct. 2002.

SILVA, JP; LELIANOVA, VG; ERMOLYUK, YS; VYSOKOV, N; HITCHEN, PG; BERNINGHAUSEN O; RAHMAN, MA; ZANGRANDI, A; FIDALGO, S; TONEVITSKY, AG; DELL, A; VOLYNSKI, KE; USHKARYOV, YA. Latrophilin 1 and its endogenous ligand Lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, v. 108, n. 29, p. 12113-8, jul. 2011.

SUZUKI, N; MIZUNIWA, C; ISHII, K; NAKAGAWA, Y; TSUJI, K; MUNETA, T; SEKIYA, I; AKAZAWA, C. Teneurin-4, a transmembrane protein, is a novel regulator that suppresses chondrogenic differentiation. *J. Orthop. Res.*, v. 32, n. 7, p. 915-22, jul. 2014.

TRZEBIATOWSKA, A; TOPF, U; SAUDER, U; DRABIKOWSKI, K; CHIQUET-EHRISMANN, R. *Caenorhabditis elegans* teneurin, ten-1, is required for gonadal and pharyngeal basement membrane integrity and acts redundantly with integrin ina-1 and dystroglycan dgn-1. *Mol. Biol. Cell.*, v. 19, n. 9, p. 3898-908, sep. 2008.

TUCKER, RP; BECKMANN, J; LEACHMAN, NT; SCHÖLER, J; CHIQUET-EHRISMANN, R. Phylogenetic analysis of the teneurins: conserved features and premetazoan ancestry. *Mol. Biol. Evol.*, v. 29, n. 3, p. 1019-29, may 2012.

TUCKER, RP; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurins: A conserved family of transmembrane proteins involved in intercellular signaling during development. *Dev. Biol.*, v. 290, n. 2, p. 237-45, feb. 2006.

TUCKER, RP; CHIQUET-EHRISMANN, R; CHEVRON, MP; MARTIN, D; HALL, RJ; RUBIN, BP. Teneurin-2 is expressed in tissues that regulate limb and somite pattern formation and is induced in vitro and in situ by FGF8. *Dev. Dyn.*, v. 220, n. 1, p. 27-39, jan. 2001.

TUCKER, RP; KENZELMANN, D; TRZEBIATOWSKA, A; CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurins: transmembrane proteins with fundamental roles in development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 39, n. 2, p. 292-7, 2007.

TUCKER, RP; MARTIN, D; KOS, R; CHIQUET-EHRISMANN, R. The expression of teneurin-4 in the avian embryo. *Mech. Dev.*, v. 98, n. 1-2, p. 187-91, nov. 2000.

VIK, A; YATHAM, LN. Calcitonin and bipolar disorder: a hypothesis revisited. *J. Psychiatry Neurosci.*, v. 23, n. 2, p. 109-117, may 1998.

WOELFLE, R; D'AQUILA, AL; PAVLOVIĆ, T; HUSIĆ, M; LOVEJOY, DA. Ancient interaction between the teneurin C-terminal associated peptides (TCAP) and latrophilin ligand-receptor coupling: a role in behavior. *Front Neurosci.*, v. 24, n. 9, p. 146, apr 2015.

YOUNG, TR; BOURKE, M; ZHOU, X; OOHASHI, T; SAWATARI, A; FÄSSLER, R; LEAMEY, CA. Ten-m2 is required for the generation of binocular visual circuits. *J. Neurosci.*, v. 33, n. 30, p. 12490-509, jul. 2013.

YOUNG, TR; LEAMEY, CA. Teneurins: important regulators of neural circuitry. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 41, n. 5, p. 990-3, may 2009.

ZHOU, XH; BRANDAU, O; FENG, K; OOHASHI, T; NINOMIYA, Y; RAUCH, U; FÄSSLER, R. The murine Tenm/Odz genes show distinct but overlapping expression patterns during development and in adult brain. *Gene Expr. Patterns*, v. 3, n. 4, p. 397-405, aug. 2003.

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUMANA

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: DISTRIBUIÇÃO DAS TENEURINAS (TEN) E DOS PEPTÍDEOS ASSOCIADOS AO TERMINAL CARBOXILA DAS TENEURINAS (TCAP) EM DENTES HUMANOS

Pesquisador: CLÁUDIO PARECIDO CASATTI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45716415.9.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.166.058

Data da Relatoria: 31/07/2015

Apresentação do Projeto:

As teneurinas (TENS) são constituídas por quatro membros (TEN1-4), descritos inicialmente em mamíferos. As TENS apresentam alguma similaridade com as proteínas da matriz extracelular denominadas de tenascinas (ten); entretanto, apresentam expressão preferencialmente no sistema nervoso central. Interessantemente, a expressão das TENS está conservada ao longo das espécies e, ocorre preferencialmente durante a morfogênese em diferentes órgãos e tecidos. O terminal carboxila (extracelular) da TEN1-4 também apresenta um sequencia peptídica denominada de peptídeo associado ao terminal carboxila da teneurina (TCAP1-4), com elevada homologia ao fator liberador de corticotrpina (CRF), que pode ser transcrita separadamente do gene da TEN. O propósito deste trabalho é analisar detalhadamente a distribuição dos quatro membros da família das TENS (TEN1-4) e dos TCAPs (TCAP1-4) em dentes humanos extraídos por indicação ortodôntica ou cirúrgica através, das técnicas de imunohistoquímica e da reação em cadeia da polimerase pela transcriptase reversa (RT-PCR convencional). Estudos prévios relataram a expressão de algumas TENS na região anterior de embriões de aves e camundongos, sugerindo uma possível participação desta família no desenvolvimento orofacial. Os dentes extraídos serão seccionados parcialmente na região coronária com broca esférica diamantada (broca KG diamantada 1014) acoplada em alta

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

UF: SP

Município: ARACATUBA

CEP: 16.015-050

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE**



Continuação do Parecer: 1.166.058

rotação. Em seguida os dentes serão fraturados e imediatamente imersos em fixador histológico para processamento histológico (1 dente de cada paciente) e análise imuno-histoquímica ou congelados em nitrogênio líquido (1 dente de cada paciente) para extração do RNA e análise da expressão gênica.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é analisar a distribuição das TENs e dos TCAPs em dentes molares humanos através dos técnicas imuno-histoquímica e do RT-PCR convencional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

a participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas (RISCO MÍNIMO, POIS SE TRATA DO USO DE DENTES QUE SERIAM INCINERADOS APÓS A EXTRAÇÃO). Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução nº.466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade

Benefícios:

Aquisição de conhecimento básico do sistema das teneurinas/TCAPs que poderá indicar possível aplicação clínica de estimuladores da expressão da teneurina na regeneração pulpar. Espera-se que este estudo resulte em informações importantes sobre A POSSÍVEL PRESENÇA DESTAS PROTEÍNAS NO DENTE HUMANO, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa SUBSIDIAR O ESTABELECIMENTO DE PROCEDIMENTOS CLÍNICOS QUE POSSAM ESTIMULAR A PRODUÇÃO DESTA PROTEÍNA EM DENTES LESIONADOS E, CONSEQUENTEMENTE MELHORAR O PROCESSO DE REGENERAÇÃO DESTE TECIDO

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa baseada em dados científicos. Serão coletados oito dentes terceiros molares de quatro pacientes, previamente extraídos por indicação ortodôntica ou cirúrgica na clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão adequadamente descritos e o projeto de pesquisa está de acordo com a resolução 466/12.

Recomendações:

nada a declarar

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



Continuação do Parecer: 1.166.058

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

nada a declarar

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Salientamos que, de acordo com a Resolução 466 CNS, de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 08/02/2016.

ARACATUBA, 31 de Julho de 2015

Assinado por:

Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamune
(Coordenador)

ANEXO B - COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "*Identificação das teneurinas em tecidos e órgãos de roedores*" sob responsabilidade do Pesquisador **CLÁUDIO APARECIDO CASATTI** e colaboração de Kelly Regina Torres está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **02401-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research "*Identification of teneurins in tissue and organs of rodents*", process number **02401-2012**, under responsibility of **CLÁUDIO APARECIDO CASATTI** and with collaboration of Kelly Regina Torres agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP
Rua José Bonifácio, 1193 - CEP-16015-050 - Araçatuba - SP
Tel. (18) 3636-3234