

ÍRIA GABRIELA DIAS DOS SANTOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS FATORES DE
CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICOS 2, 3 E 4 DURANTE A
ODONTOGÊNESE DE MOLARES DO GAMBÁ *Didelphis
albiventris*, UM MODELO PROMISSOR PARA ESTUDOS
EM BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Julho/2014

ÍRIA GABRIELA DIAS DOS SANTOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS FATORES DE
CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICOS 2, 3 E 4 DURANTE A
ODONTOGÊNESE DE MOLARES DO GAMBÁ *Didelphis
albiventris*, UM MODELO PROMISSOR PARA ESTUDOS
EM BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof^ª. Dra. Erika Cristina Jorge

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Gerluza Aparecida Borges Sil-
va

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Julho/2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a quem mais aturou minhas lamúrias, ouviu pedidos de milagres. Milagres de bandas aparecendo em géis, de bactérias proliferando em placas, de tecidos histológicos maravilhosamente bem cortados, de coloração roxa na hibridização, de coloração marrom na imuno, de gambá brotando em armadilhas, de textos se desnove-lando em páginas em branco do Word, de força para ler artigos na madrugada. É, eu sei que Deus não faz técnicas de biologia molecular, nem colore lâminas, nem poderia fazer pipocar gambás. Ainda assim, sou imensamente grata por me carregar quando eu não tinha forças para me manter de pé, e por me permitir concluir este trabalho. Obrigada, Deus.

À minha orientadora, Erika, que provavelmente ouviu tantas lamúrias quanto Deus, mas sem poder fazer milagres. Obrigada pelo espírito alegre e inovador, pela presença (no laboratório até tarde, nos e-mails, pelo telefone, pelo Whatsapp, pelo Skype... é muita comunicação!), pela paciência, pelo esforço (indo mesmo à bancada e colocando a mão na massa), pelo incentivo, pela referência de profissionalismo, pelos puxões de orelha, pelos “porres” de sorvete com batata frita.

À minha co-orientadora de Mestrado, Gerluza. Obrigada por ter me orientado, me acolhido e me aguentado desde a Iniciação Científica (iniciada no finalzinho de 2008). Obrigada pelo capricho, pela didática, pela doçura, pelos dotes artísticos, por me incentivar a melhorar sempre, pela animação incrível em nossas festinhas, pelos bolos inesperados no meio da tarde, pelos puxões de orelha, por zumbizar comigo por e-mail.

À minha família, que sempre me incentivou em relação aos estudos, que se mostra orgulhosa e me impele a evoluir. Obrigada pelo carinho que vem de Belo Horizonte, Sabará, Ouro Branco e Luz. Em especial, agradeço aos meus pais, Piedade e Afonso, pelo carinho, pela dedicação, por acreditarem no meu potencial e por me darem condições para a continuidade dos estudos, mesmo quando isso implicou em algum sacrifício. Obrigada também à minha irmã, Talita, que mesmo de longe e me achando doida por trabalhar com gambá, mostra carinho e interesse. Não posso deixar de agradecer, ainda, ao meu primo (e irmão por curto tempo) Mateus, possivelmente o primeiro a me abrir os olhos e a mostrar as possibilidades de uma pós-graduação, além dos excelentes conselhos nas conversas da madrugada.

Ao meu noivo, André. Como agradecer a uma pessoa tão doce, companheira e prestativa? Obrigada pelo carinho, apoio, esforço, incentivo, encorajamento, paciência, confiança. Agradeço imensamente por me ajudar com o Mestrado desde o processo seletivo (na revisão do texto, no processamento de dados, dando opiniões, lendo artigo comigo até de madrugada e a caminho da prova), por me dar força e tranquilidade em meio às tribulações, por comemorar vitórias comigo. Principalmente nessa reta final, seu apoio foi essencial para que eu terminasse o trabalho, abrindo mão de suas férias para me ajudar diariamente a cuidar da minha família, da minha casa, da minha dissertação e de mim. Te amo!

À equipe de garbo, elegância e muita finesse do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento, que sempre teve muita paciência, carinho, boa vontade, bom humor, alegria e veia artística. Obrigada por tornarem cada dia de trabalho menos estressante e mais divertido, por estarem sempre a postos para ajudar. Agradeço ao Igor (mais que amigo, um irmão de enxurrada), Rayan (minha dupla de canto), Aline Martins (amiga competente e sensata), Aline Copola (tão estabanada quanto eu, com enorme coração), Alinne Costa (Alinnerd), Bruno (obrigada pelas novas ideias sobre gambás), Samira (divandando na Europa), Júlia (a cara da riqueza), Albergaria (sempre alegre e faminto), Fernando (apesar de atleticano, uma excelente pessoa), Cynthia (direto de Itaúna), Wenderson (o rei dos brigadeiros), Cris (nossa consultora de beleza), Letícia (modelo, manequim e médica), Chico (o técnico mais disputado do ICB). Aos “anexos” Verlane e Sérgio, sempre bem vindos. Aos que passaram por nós e nos deixaram saudades: Débora, Matheus, Lucas e Graciene. Às “novas aquisições” do laboratório (Márcio, Luíza, Nat, Ana Luíza, Elizabeth), que vieram dar reforço à equipe. Aos que passaram pelo laboratório e me ajudaram no projeto: Guilherme, Estéfane, Ana e Joice.

À equipe do Laboratório de Biologia Cardíaca, sempre amigos (saudades de quando estávamos no mesmo laboratório): Marcos, Giselle, Vanessa, Marilda, Patrícia, Dani, Fúlvia.

À equipe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, pela infraestrutura e disposição em ajudar: professor Alfredo, Marina, Carol, Cíntia, Elis, Thaís, Natássia.

À equipe do professor Vasco Azevedo, que gentilmente nos abriu as portas do laboratório.

À equipe do professor Professor Luiz Lehmann Coutinho pelos sequenciamentos.

À equipe da Pós-Graduação em Biologia Celular, professores, coordenadores, secretariado e técnicos, que me ajudaram direta ou indiretamente, obrigada pelo zelo, dedicação e desprendimento: Tânia Mara, Cleida de Oliveira, Gregory Kitten, Fernanda, Hélio Chiarini, Denise Carmona, Paula Rocha, José Carlos Nogueira, Rhuanna, Diana, Fidência, Carlos, Kaylla.

Aos colegas guerreiros que cursaram Biologia Celular comigo na turma de 2013.

Aos meus amigos, sempre apoiando, de perto ou de longe: Sylvia, Pablo, Thiago, Cláudia Costa, Paula Granja, Carol, Ester, Priscilla, Lata, Poliana, Rodrigo, Grazi, Nayara, Alan, Carlos.

À banca, que se dispôs a avaliar e contribuir com meu trabalho: Tânia Mara, Fernando Mauad e Fernanda Radicchi.

A todos e a cada um que contribuíram, das mais variadas formas (incentivos, ombros amigos, conselhos, opiniões, críticas, mão de obra) desde minha entrada até a conclusão do Mestrado.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Aspecto histológico da banda epitelial primária.	4
FIGURA 2. Esquema representativo e aspecto histológico da lâmina vestibular e dentária. A) Formação de lâminas vestibular e dentária a partir da banda epitelial primária. B) Formação do sulco vestibular.	4
FIGURA 3. Aspecto histológico da lâmina dentária.	5
FIGURA 4. Aspecto histológico da condensação do ectomesênquima em torno do botão.	5
FIGURA 5. A) Aspecto histológico e esquema mostrando o início de fase de capuz em que se observa uma depressão central. B) Progressão da fase de botão para a fase de capuz.	6
FIGURA 6. Aspecto histológico de germe dentário em fase de capuz.	7
FIGURA 7. Aspecto histológico de germe dentário em fase de campânula.	9
FIGURA 8. Neonatos de dois dias na bolsa marsupial de fêmea de <i>Didelphis albiventris</i>	188
FIGURA 9. Desenho esquemático mostrando o padrão dentário de <i>Didelphis albiventris</i>	199
FIGURA 10. Alinhamento das sequências de aminoácidos disponíveis para FGF2 para espécies diferentes: <i>Homo sapiens</i> , <i>Sarcophilus harrisii</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Monodelphis domestica</i> . .	288
FIGURA 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos disponíveis para FGF3 para espécies diferentes: <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Monodelphis domestica</i>	299
FIGURA 12. Alinhamento das sequências de aminoácidos disponíveis para FGF4 para espécies diferentes: <i>Mus musculus</i> , <i>Homo sapiens</i> e <i>Monodelphis domestica</i>	30
FIGURA 13. Fotografias ao estereomicroscópio, mostrando, comparativamente, diferentes idades pós-natais do gambá <i>D. albiventris</i> : 0 dia, 2 dias, 5 dias, 8 dias, 10 dias e 14 dias.	388
FIGURA 14. Fotografia ao estereomicroscópio, mostrando um dos membros anteriores de neonato de 0 dia de gambá <i>D. albiventris</i> , evidenciando a presença de garras.	388
FIGURA 15. Valores médios de pesos e medidas do comprimento crista-occipital/inserção da cauda (CR) e do comprimento rostro/inserção da cauda (SR) para amostras de <i>D. albiventris</i> em P0, P2, P5, P8, P10 e P14.	399
FIGURA 16. Fotomicrografias de amostras de neonatos de <i>D. albiventris</i> coradas em HE.	42
FIGURA 17. Imunolocalização de FGF2 em germes dentários de neonatos de <i>D. albiventris</i>	475
FIGURA 18. Imunolocalização de FGF3 em germes dentários de neonatos de <i>D. albiventris</i>	50
FIGURA 19. Imunolocalização de FGF4 em germes dentários de neonatos de <i>D. albiventris</i>	54
FIGURA 20. Alinhamento de sequências de FGF3 de <i>Monodelphis domestica</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> e <i>Gallus gallus</i>	566
FIGURA 21. Alinhamento de sequências de FGF4 de <i>Monodelphis domestica</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> e <i>Gallus gallus</i>	58
FIGURA 22. Resultado da RT-PCR para detectar a expressão de um gene constitutivo (β -actina) nas amostras de cDNA de <i>D. albiventris</i> em idade P2.	599
FIGURA 23. Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% confirmando resultado de RT-PCR para FGF4, evidenciando a presença de banda de cerca de 350 pb.	599
FIGURA 24. Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a extração de DNA plasmidial (A) e digestão por <i>EcoRI</i> para clonagem de FGF4 (B).	60
FIGURA 25. Análise nucleotídica para o resultado de sequenciamento de FGF4 contra o banco de dados do <i>GenBank</i> , do NCBI, utilizando algoritmos do BLAST.	611
FIGURA 26. Alinhamento nucleotídico para o resultado de sequenciamento de <i>FGF4</i> de <i>D. albiventris</i> e de <i>M. domestica</i> , utilizando o software online MultAlin.	611
FIGURA 27. Orientação da clonagem do fragmento de PCR no vetor pGEM-T Easy. (A) Mapa e sequências de referência para o vetor. (B) Promotores T7 e SP6 e múltiplas sequências de clonagem do vetor.	622

FIGURA 28. Resultado do BLASTN mostrando o <i>query</i> e o <i>subject</i> para o sequenciamento de <i>FGF4</i> de <i>D. albiventris</i> .	633
FIGURA 29. Resultado da amplificação de um fragmento molde de <i>FGF4</i> contendo os sítios promotores nas extremidades e da síntese das sondas antisense e senso de <i>FGF4</i> . (A) Resultado da PCR que utilizou o DNA plasmidial como molde e o par de oligos universal M13, gerando um fragmento linear de aproximadamente 500 pb. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando síntese de sondas SP6 e T7 para <i>FGF4</i> .	644
FIGURA 30. Hibridização <i>in situ</i> com sonda <i>FGF4</i> em seções transversais de cabeças de <i>D. albiventris</i> .	666
FIGURA 31. Visão geral do tronco de um neonato de <i>D. albiventris</i> , mostrando as regiões selecionadas para análise de expressão de <i>FGF4</i> por hibridização <i>in situ</i> .	677
FIGURA 32. Hibridização <i>in situ</i> com sonda <i>FGF4</i> em seções longitudinais de corpos de <i>D. albiventris</i> , utilizando sonda antisense.	698
FIGURA 33. Hibridização <i>in situ</i> em seções longitudinais de corpos de <i>D. albiventris</i> em P10, utilizando sonda senso, como controle.	699
FIGURA 34. Comparação de seções longitudinais de corpos de <i>D. albiventris</i> em P14 submetidas a hibridização <i>in situ</i> com sonda antisense e imunoperoxidase.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valor do comprimento crista-occipital/inserção da cauda (CR) para amostras de <i>D. albiventris</i> estudadas.	233
Tabela 2. Fases do germe dentário do primeiro molar do <i>Didelphis albiventris</i> de 0 a 60 dias.	255
Tabela 3. Oligonucleotídeos desenhados para amplificar FGF3 e FGF4 de <i>D. albiventris</i>	322
Tabela 4. Valores médios de pesos e medidas do comprimento crista-occipital/inserção da cauda (CR) e do comprimento rostro/inserção da cauda (SR) para amostras de <i>D. albiventris</i> das idades pós-natais 0, 2, 5, 8, 10 e 14 dias.	399
Tabela 5. Imunolocalização de FGF2 em várias estruturas dentárias nos sete estágios odontogênicos estudados: lâmina dentária, botão inicial, botão final, capuz inicial, capuz tardio, campânula inicial e meados de campânula.	444
Tabela 6. Imunolocalização de FGF3 em várias estruturas dentárias nos sete estágios odontogênicos estudados: lâmina dentária, botão inicial, botão final, capuz inicial, capuz tardio, campânula inicial e meados de campânula.	488
Tabela 7. Imunolocalização de FGF4 em várias estruturas dentárias nos sete estágios odontogênicos estudados: lâmina dentária, botão inicial, botão final, capuz inicial, capuz tardio, campânula inicial e meados de campânula.	522
Tabela 8. Comparação dos estágios da odontogênese entre as espécies <i>Didelphis albiventris</i> , <i>Monodelphis domestica</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> e <i>Homo sapiens</i> em estágios da odontogênese (lâmina dentária, botão, capuz e campânula).	755
Tabela 9. Sobreposição de imunomarcção positiva para FGF2, FGF3 e FGF4 durante estágios da odontogênese.	822
Tabela 10. Comparação entre marcação para FGF2 em germes dentários de <i>D. albiventris</i> e de <i>M. musculus</i> durante estágios da odontogênese.	833
Tabela 11. Comparação entre marcação para FGF3 em germes dentários de <i>D. albiventris</i> e de <i>M. musculus</i> durante estágios da odontogênese.	844
Tabela 12. Comparação entre marcação para FGF4 em germes dentários de <i>D. albiventris</i> e de <i>M. musculus</i> durante estágios da odontogênese.	855
Tabela 13. Localização de FGF3 e FGF4 em germes dentários de molares de mamíferos durante estágios da odontogênese.	866

RESUMO

O processo de odontogênese é guiado por uma cascata de sinalização na qual inúmeras moléculas, como os fatores de crescimento fibroblástico 2, 3 e 4 (FGF2, FGF3 e FGF4), garantem o desenvolvimento dos grupos dentários. A maioria dos dados sobre a odontogênese advém de roedores, que não possuem todos os grupos dentários. O gambá *Didelphis albiventris* é um mamífero marsupial com dentição mais próxima à humana. Além disso, a odontogênese nesta espécie ocorre nos neonatos já no marsúpio, facilitando o acesso e a coleta de amostras para o estudo da formação dos dentes. O objetivo deste estudo foi determinar o padrão de expressão de FGF2, FGF3 e FGF4 durante a odontogênese de *D. albiventris*. Para isso, neonatos de *D. albiventris* foram coletados e processados para seguintes análises: (1) histológica, para caracterizar morfológicamente a odontogênese de molares de *D. albiventris*; (2) de imunolocalização, para caracterizar o padrão de expressão de FGF2, FGF3 e FGF4 durante a odontogênese nesta espécie de gambá; e (3) de expressão gênica, para clonar e sequenciar essas moléculas de interesse no gambá, além de permitir a caracterização do padrão de expressão dos RNAm para FGFs, por hibridização *in situ*. A análise histológica foi realizada por coloração HE; e a imunolocalização dos FGFs foi realizada por imunoperoxidase indireta. Para a análise de expressão gênica, oligonucleotídeos foram construídos com base na sequência conhecida de *Monodelphis domestica*, o marsupial mais próximo com genoma sequenciado. Oligos foram desenhados para amplificar fragmentos de FGF3 e FGF4 (uma vez que FGF2 já havia sido sequenciado anteriormente). A sonda de RNA antisense foi sintetizada *in vitro*, com marcação para digoxigenina. A análise histológica das fases da odontogênese mostrou que o gambá *D. albiventris* possui as mesmas estruturas presentes em roedores, nos mesmos estágios da odontogênese, além de apresentar uma lâmina dentária secundária vestigial. A imunohistoquímica permitiu a observação de FGF2, FGF3 e FGF4 em um maior número de estruturas dentárias em relação à literatura referente a roedores, sugerindo um papel mais amplo dessas moléculas no gambá. Não foi possível amplificar FGF3 de *D. albiventris*, sugerindo diferenças nas sequências entre as espécies de gambás. O fragmento de FGF4 foi clonado e sequenciado. O clone também serviu como molde para a síntese da sonda de RNA antisense, utilizada na hibridização *in situ*. O padrão de expressão indicou a presença de *FGF4* no germe dentário, tecido conjuntivo, musculatura esquelética, cartilagem, epitélio, fígado e tecido nervoso. O conhecimento da sinalização que determina a odontogênese em um modelo animal com dentição completa pode contribuir para o desenvolvimento de terapias para a reposição de dentes

perdidos. Este estudo ainda representa mais um passo no conhecimento dessa espécie de gambá e na sua implementação para estudos em Biologia do Desenvolvimento.

ABSTRACT

Odontogenesis is guided by a complex signaling cascade in which several molecules, including the fibroblastic growth factors 2, 3 and 4 (FGF2, FGF3 and FGF4), ensure dental groups development and specificity. Most of the data on odontogenesis derives from rodents, which does not have all dental groups. *Didelphis albiventris* is a marsupial mammal with the closest dentition to humans. Besides, odontogenesis in this species occurs when the newborns are already in the pouch, favouring samples harvesting for the study of tooth development. This study aimed to determinate the expression pattern of FGF2, FGF3 and FGF4 during the *D. albiventris* odontogenesis. For this, *D. albiventris* newborns were harvested and processed for the following analysis: (1) histological, to allow the morphological characterization of the *D. albiventris* molars odontogenesis; (2) immunolocalization, to establish FGF2, FGF3, and FGF4 expression pattern during odontogenesis; and (3) of gene expression, to allow the cloning and sequencing of these molecules in this opossum species, providing tools for the local-temporal characterization of the FGFs mRNA expression patterns, by *in situ* hybridization. Histological analysis was performed using HE; and FGFs immunolocalization was performed by indirect immunoperoxidase. For gene expression analysis, oligos were obtained based on sequences available for *Monodelphis domestica*, the closest marsupial with genome sequenced. Oligos were obtained to amplify *D. albiventris* FGF3 and FGF4 (as FGF2 was cloned and sequenced before). Antisense RNA probe were *in vitro* synthesized, using digoxigenin for labelling. Histological analysis of the odontogenesis stages showed similarity of dental structures between *D. albiventris* and rodents, at the same odontogenesis stages, in addition to the presence of a vestigial secondary dental lamina in opossum. Immunolocalization allowed the observation of FGF2, FGF3 and FGF4 in a larger number of dental structures than related data for rodents, suggesting broader functions for these molecules in this opossum species. It was not possible to amplify *D. albiventris* FGF3, suggesting differences in the sequence level between these two opossum species. A FGF4 fragment was cloned and sequenced. This clone was also used to allow the synthesis of an antisense RNA probe, for *in situ* hybridization. *FGF4* transcripts were detected in the dental germ, connective tissue, skeletal muscle, cartilage, epithelium, liver, and nervous tissue. The knowledge of the signaling that determinates odontogenesis in an animal model with complete dentition may contribute to the development of therapies for the replacement of lost teeth. The present study represents

one step further in knowing this opossum species and in its implementation for Developmental Biology studies.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1- O processo de formação do dente	3
2.1.1- Lâmina dentária e lâmina vestibular.....	3
2.1.2- Fase de Botão	5
2.1.3- Fase de Capuz	6
2.1.4- Fase de Campânula	7
2.2- O papel da família FGF na odontogênese.....	9
2.2.1- FGF2	11
2.2.2- FGF3	12
2.2.3- FGF4	123
2.3- Modelos animais no estudo da odontogênese.....	155
3- OBJETIVOS	211
3.1- Objetivo geral.....	211
3.2- Objetivos específicos	211
4- MATERIAIS E MÉTODOS	222
4.1- Coleta de amostras de neonatos de <i>D. albiventris</i>	2222
4.2- Inclusão e cortes histológicos	255
4.3- Método histológico	266
4.4- Método Imunohistoquímico.....	266
4.5- Clonagem e sequenciamento de <i>FGF3</i> e <i>FGF4</i> de <i>D. albiventris</i>	311
4.6- Síntese da sonda de RNA antisense e hibridização <i>in situ</i>	344
4.7- Microscopia e Documentação.....	366
5- RESULTADOS.....	377
5.1- Análise da morfologia macroscópica dos neonatos em diferentes idades	377
5.2- Caracterização histológica	399
5.3- Imunohistoquímica	433

5.3.1- <i>FGF2</i>	433
5.3.2- <i>FGF3</i>	477
5.3.4- <i>FGF4</i>	511
5.4- Clonagem e sequenciamento de <i>FGF3</i> e <i>FGF4</i> de <i>D. albiventris</i>	555
5.4.1- <i>FGF3</i> e <i>FGF4</i>	555
5.4.2- Desenho dos pares de oligonucleotídeos.....	555
5.4.3- RT-PCR.....	588
5.4.4- RT-PCR para <i>FGF3</i> e <i>FGF4</i>	599
5.4.5- Clonagem dos insertos amplificados	60
5.4.6- Sequenciamento de análise das sequências.....	60
5.5- Hibridização <i>in situ</i>	622
6- DISCUSSÃO	733
6.1- Morfologia dentária de <i>D. albiventris</i> comparada com outros mamíferos	744
6.2- Padrão de expressão de marcadores da odontogênese	777
6.2.1- <i>FGF2</i>	777
6.2.2- <i>FGF3</i>	788
6.2.3- <i>FGF4</i>	80
6.3- Sobreposição da expressão de <i>FGF2</i> , <i>FGF3</i> e <i>FGF4</i> na odontogênese do gambá	822
6.4- Resumo da comparação entre os sítios de expressão de <i>FGF2</i> , <i>FGF3</i> e <i>FGF4</i> na odontogênese de modelos animais diferentes.	833
6.5- Clonagem e sequenciamento de <i>FGF4</i> de <i>D. albiventris</i>	866
6.6- Padrão de expressão de <i>FGF4</i> durante o desenvolvimento de <i>D. albiventris</i>	877
6.6.1- Padrão de expressão de <i>FGF4</i> no tronco de neonatos do gambá <i>D. albiventris</i> . 877	
6.6.2- Padrão de expressão de <i>FGF4</i> nos germes dentários de neonatos do gambá <i>D. albiventris</i>	888
6.6.3- Comparação da localização de transcritos e proteína de <i>FGF4</i> durante o desenvolvimento de <i>D. albiventris</i>	899
7- CONCLUSÃO	90
8- REFERÊNCIAS.....	922
9- ANEXOS	110
9.1- Anexo 1	110
9.2- Anexo 2	110

1- INTRODUÇÃO

A importância dos dentes para os seres humanos, em relação à saúde, nutrição e estética justifica o grande interesse científico por sua origem evolutiva e pelos processos relacionados à sua formação. A perda dentária e de tecidos periodontais devido a processos congênitos, traumáticos e infecciosos ainda é um problema odontológico de alta prevalência na população brasileira. Segundo dados de 2012 da Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença periodontal grave, a qual resulta em perda de dentes, é encontrada em 15-20% dos adultos de 35 a 44 anos de idade. Cerca de 30% das pessoas de 65 a 74 anos não possuem dentes naturais (OMS, 2012). Há, ainda, os problemas decorrentes de agenesia dentária, uma doença hereditária que afeta até 20% da população mundial (Kapadia *et al.*, 2007). A expressão incorreta de alguns genes que codificam para moléculas sinalizadoras, fatores de transcrição e fatores controladores da proliferação e diferenciação celular tem sido associada com o desenvolvimento dentário incorreto, podendo inclusive contribuir para a agenesia dentária (Celikoglu *et al.*, 2010; Thesleff, 2003; Vieira *et al.*, 2013). A saúde oral é uma condição de ausência de dor facial e bucal, câncer oral e de garganta, infecções e feridas orais, doença periodontal, perda do dente, e outras doenças e desordens que limitam a capacidade individual em morder, mastigar, sorrir e falar (Kapadia *et al.*, 2007).

A compreensão do processo de formação do dente, a odontogênese, é o primeiro passo para buscar soluções para os diversos problemas que acometem o órgão. Durante o início da formação do dente, o ectoderma se espessa e forma um placóide que prolifera em direção ao ectomesênquima subjacente, derivado da crista neural. O epitélio sinaliza para o ectomesênquima, o qual condensa ao redor do broto epitelial. Na morfogênese subsequente, chamado estágio de capuz, o epitélio dobra e cresce para envolver a condensação ectomesenquimal à sua frente. Uma vez isolada do restante do ectomesênquima, essa condensação envolta por epitélio passa a constituir a papila dentária. A forma final da coroa do dente se torna definida durante o estágio de campânula, quando células de formação dos tecidos duros do dente, odontoblastos e ameloblastos, diferenciam na interface do epitélio e ectomesênquima e depositam matrizes de dentina e esmalte, respectivamente (Kettunen *et al.*, 2000; Thesleff, 2003).

Neste sentido, dados sobre o desenvolvimento dentário de vertebrados demonstraram que as vias de sinalização induzidas pelos membros da família de Fatores de Crescimento Fibroblásticos (FGF) estão envolvidas em vários eventos de sinalização e, por isso, representa

um ponto favorável de investigação de mecanismos genéticos conservados do desenvolvimento dentário em novos modelos biológicos (Torres *et al.*, 2006).

Assim, um maior entendimento da odontogênese em modelos com dentição completa poderá contribuir, futuramente, para o desenvolvimento de terapias gênica e celular a serem testadas em casos de agenesia dentária e perdas patológicas de tecidos dentais e periodontais humanos. A dentição marsupial tem recebido atenção como um modelo potencial para estudos genético-moleculares do desenvolvimento dentário (Jernvall, 1995; Smith, 2006). Muitas espécies de gambás (como *Monodelphis domestica*, *Didelphis virginiana* e *Didelphis marsupialis*) tem sido utilizadas em laboratórios, abrindo um vasto campo para o estudo e o conhecimento dos hábitos, doenças, dieta e biologia reprodutiva desses animais, a qual é diferente de outros mamíferos (Malta & Luppi, 2007; Bertassoli *et al.*, 2013). Considerando esse modelo animal, torna-se evidente a importância do conhecimento dos fatores de crescimento, como os FGFs, envolvidos também na cascata de sinalização para o desenvolvimento de outros órgãos e tecidos, o que pode contribuir para posteriores pesquisas na área da Medicina e Biologia do Desenvolvimento, especialmente para a compreensão dos processos de agenesias e malformações congênitas.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo analisar o padrão de expressão de *FGF2*, *FGF3* e *FGF4* durante a odontogênese, utilizando *D. albiventris* como modelo animal, a fim de promover uma caracterização espaço-temporal dessas moléculas sinalizadoras envolvidas na interação epitélio-mesenquimal que regula os estágios da odontogênese.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- O processo de formação do dente

O processo de desenvolvimento do dente é denominado odontogênese. Esse processo inicia-se como resultado da interação entre o epitélio oral e o ectomesênquima subjacente, originando a banda epitelial primária e, a seguir, a lâmina dentária. Os germes dentários passam pelas fases de botão, capuz, campânula, coroa e raiz (Katchburian & Arana, 2012; Fleischmannova *et al.*, 2008).

Durante a iniciação do dente, o ectoderma espessa e forma um placóide que brota para o ectomesênquima subjacente, tecido formado pela associação de células mesenquimais às células da crista neural, estas últimas de origem ectodérmica (Imai *et al.*, 1996; Köntges & Lumsden, 1996). O epitélio sinaliza para o ectomesênquima, o qual condensa ao redor do broto epitelial. Durante a morfogênese subsequente, o epitélio dobra e cresce para cercar o ectomesênquima da papila dentária (estágio de capuz). A forma final da coroa do dente se torna constante durante o estágio de campânula, quando células de formação de tecido duro do dente (odontoblastos e ameloblastos) se diferenciam na interface do epitélio e ectomesênquima, e depositam matrizes de dentina e esmalte, respectivamente (Thesleff, 2003).

2.1.1- Lâmina dentária e lâmina vestibular

No embrião de vertebrados, a cavidade oral primitiva é revestida por um epitélio de duas a três camadas de células, que recobre um tecido que está sendo ocupado por uma população de células de origem ectodérmica geradas nas cristas neurais. Essas células migram e chegam até as regiões do futuro crânio e da face, onde ocorre a diferenciação em ectomesênquima (Katchburian & Arana, 2012).

O epitélio oral primitivo se prolifera, invadindo o ectomesênquima subjacente e formando uma banda epitelial contínua – a banda epitelial primária (Lumsden, 1988; Ten Cate, 1995; Katchburian & Arana, 2012; Chai *et al.*, 2000; Stock, 2001; **Figura 1**). Esse processo é modulado por vários fatores de crescimento, como BMP, FGF, SHH, WNT, TNF e activina (Thesleff, 2003; Thesleff & Mikkola, 2002; Zhang *et al.*, 2005). O primeiro sinal morfológico do desenvolvimento dentário de mamíferos é o espessamento do epitélio oral para formar a lâmina dentária (Butler, 1956; Ruch, 1995; Jernvall, 1995, Stock, 2001).

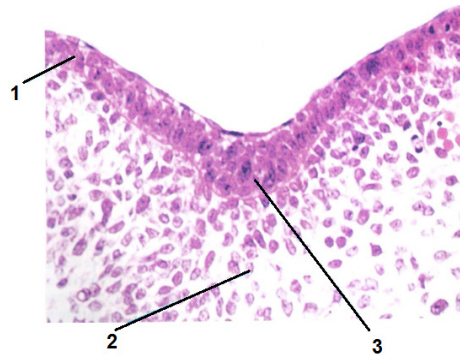


FIGURA 1. Aspecto histológico da banda epitelial primária. 1 = epitélio oral; 2 = ectomesênquima; 3 = banda epitelial primária. Adaptado de Katchburian & Arana, 2012.

Ocorrem interações entre epitélio e ectomesênquima e forma-se uma bifurcação na banda epitelial primária, originando a lâmina vestibular e a lâmina dentária (Katchburian & Arana, 2012; **Figuras 2 e 3**). O brotamento da lâmina dentária marca a mudança do potencial indutivo do epitélio do dente para o mesênquima (Mina & Kollar, 1987).

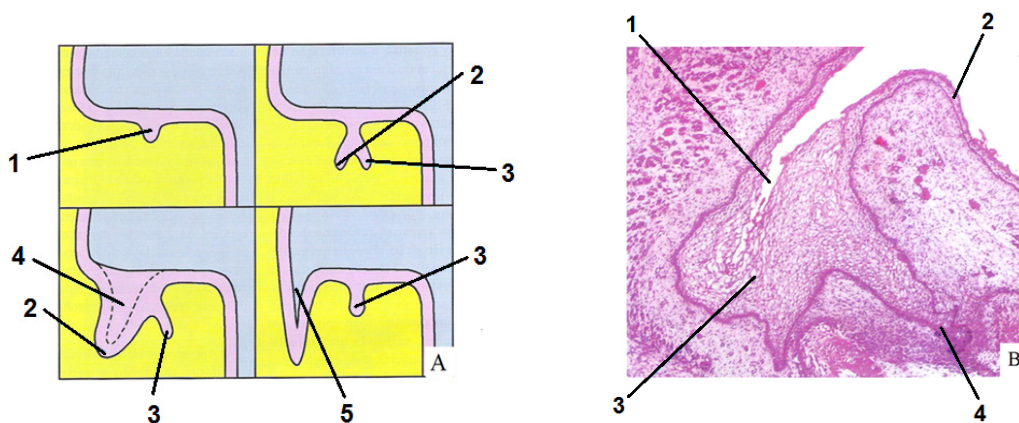


FIGURA 2. Esquema representativo e aspecto histológico da lâmina vestibular e dentária. A) Formação de lâminas vestibular e dentária a partir da banda epitelial primária. 1 = banda epitelial primária; 2 = lâmina vestibular; 3 = lâmina dentária; 4 = região em degeneração; 5 = sulco vestibular. B) Formação do sulco vestibular. 1 = sulco vestibular; 2 = epitélio oral; 3 = lâmina vestibular. Adaptado de Katchburian & Arana, 2012.

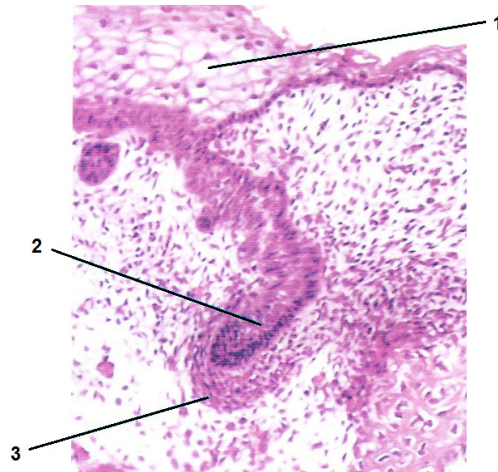


FIGURA 3. Aspecto histológico da lâmina dentária. 1 = epitélio oral; 2 = lâmina dentária; 3 = ectomesênquima. Adaptado de Katchburian & Arana, 2012.

2.1.2- Fase de Botão

A lâmina dentária apresenta, em alguns locais, atividades mitóticas diferenciadas (Katchburian & Arana, 2012). A estrutura epitelial invagina para o ectomesênquima subjacente para formar um botão. Células ectomesenquimais condensam ao redor do botão, futuramente originando a papila dentária (Lumsden, 1988; Ten Cate, 1995; Katchburian & Arana, 2012; Chai *et al.*, 2000; Stock, 2001; **Figura 4**).

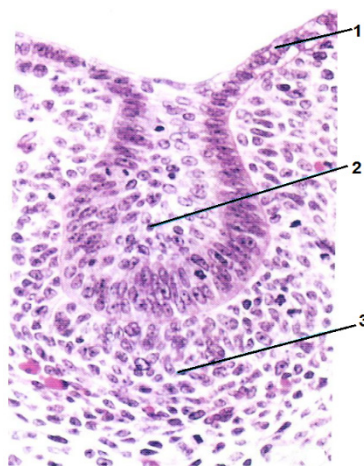


FIGURA 4. Aspecto histológico da condensação do ectomesênquima em torno do botão. 1 = epitélio oral; 2 = botão; 3 = condensação do ectomesênquima. Adaptado de Katchburian & Arana, 2012.

2.1.3- Fase de Capuz

Com a continuação da proliferação epitelial, o botão apresenta um crescimento desigual, adotando forma semelhante a um capuz. No centro de sua parte mais profunda, o capuz epitelial apresenta uma concavidade, sob a qual é observada uma maior concentração de células ectomesenquimais, em relação ao observado no estágio de botão (Katchburian & Arana, 2012; **Figura 5**).

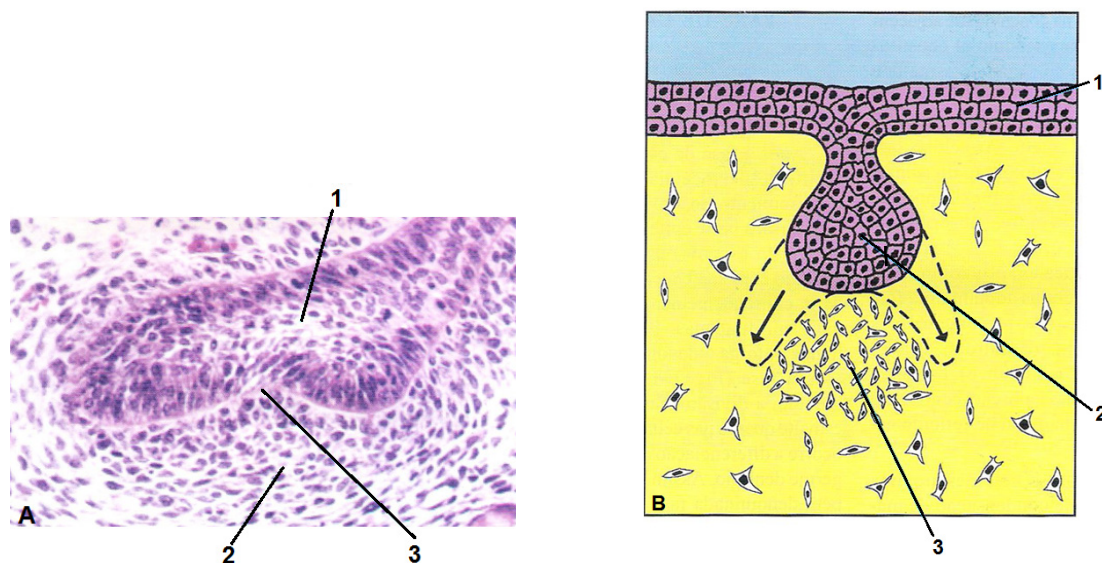


FIGURA 5. A) Aspecto histológico e esquema mostrando o início de fase de capuz em que se observa uma depressão central. 1 = capuz inicial; 2 = ectomesênquima condensado; 3 = depressão. B) Progressão da fase de botão para a fase de capuz. 1 = epitélio oral; 2 = botão; 3 = ectomesênquima condensado. Adaptado de Katchburian & Arana, 2012.

O dobramento do componente epitelial dá origem ao órgão do esmalte (composto pelo epitélio dentário interno, epitélio dentário externo, retículo estrelado e estrato intermediário) e a forma da junção do órgão do esmalte e a papila dentária espelham a forma da coroa do dente final (Butler, 1956; Stock, 2001). Observam-se vários componentes no germe dentário (**Figura 6**). A porção epitelial – órgão do esmalte – apresenta várias regiões distintas e é responsável pela formação do esmalte dentário. As células localizadas na concavidade adjacente à condensação ectomesenquimal constituem o epitélio interno do órgão do esmalte. Já as localizadas na face externa do capuz epitelial em contato com as células do folículo constituem o epitélio externo do órgão do esmalte. As células da região central do órgão do esmalte, entre o epitélio interno e o externo, adotam formato estrelado, com vários prolongamentos e, por isso,

a porção central do órgão dentário é chamada de retículo estrelado (Katchburian & Arana, 2012).

O ectomesênquima mais condensado passa a ser denominado papila dentária, responsável pela formação da dentina e da polpa. O ectomesênquima que rodeia tanto o órgão do esmalte quanto a papila dentária sofre uma condensação de maneira que suas células se alinhem em torno do germe em desenvolvimento, formando uma cápsula – folículo ou saco dentário – que é responsável pela formação do cemento, do ligamento periodontal e do osso alveolar. A nutrição da porção epitelial do germe dentário provém da vascularidade do folículo (Katchburian & Arana, 2012).

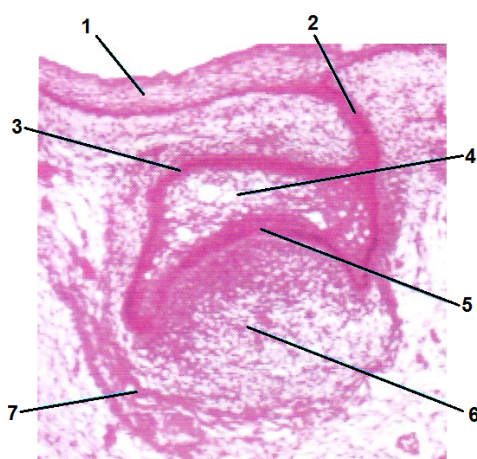


FIGURA 6. Aspecto histológico de germe dentário em fase de capuz 1 = epitélio oral; 2 = lâmina dentária; 3 = epitélio externo; 4 = retículo estrelado; 5 = epitélio interno; 6 = papila dentária; 7 = folículo dentário. Adaptado de Katchburian & Arana, 2012.

2.1.4- Fase de Campânula

Nesta fase, há redução da proliferação das células epiteliais e do crescimento do órgão do esmalte. A parte epitelial do germe dentário apresenta aspecto de sino, com sua concavidade mais acentuada e margens mais aprofundadas (**Figura 7**). Tanto no órgão do esmalte quanto nas células ectomesenquimais, ocorre a diferenciação das diversas células do germe dentário. Por isso, essa fase também é conhecida por fase de morfo- ou histodiferenciação (Katchburian & Arana, 2012).

O retículo estrelado continua a crescer em volume. A membrana basal rodeia o órgão do esmalte no seu contorno total, separando as células do epitélio externo e do interno do ór-

ção do esmalte, do folículo e da papila, respectivamente. O folículo dentário começa a envolver o germe dentário na sua totalidade. A porção da lâmina dentária entre o órgão do esmalte e o epitélio bucal se desintegra. O dente em desenvolvimento separa-se do epitélio oral (Katchburian & Arana, 2012).

Uma massa de células dispostas concentricamente e agrupadas compactamente aparece no interior do órgão do esmalte: o nó do esmalte. As células nesse nó expressam conjuntos de moléculas-chave, e, como tal, tem sido proposto como centro sinalizador que direciona a morfogênese do dente e a formação da cúspide do dente (Jernvall *et al.*, 1994; Mandler & Neubüser, 2001; Liu *et al.*, 2014), pelo controle do crescimento diferencial e dobramento do epitélio (Jernvall & Thesleff, 2000). O nó do esmalte é uma estrutura transiente que desaparece por apoptose, após a qual, em dentes com várias cúspides (como molares de camundongos) novos nós de esmalte se formam nos lugares das futuras pontas de cúspides (Jernvall *et al.*, 1994). O primeiro nó do esmalte e os nós de esmalte formados posteriormente são chamados, respectivamente, de nós do esmalte primário e secundário (Jernvall *et al.*, 1994). O nó do esmalte secundário é não-proliferativo e é removido por apoptose (Vaahtokari *et al.*, 1996; Coin *et al.*, 1999) e é o primeiro sinal de padrão de cúspide espécie-específico (Jernvall & Thesleff, 2000).

As células do epitélio interno se transformam em pré-ameloblastos. Na papila dentária adjacente, as células ectomesenquimais voltadas para a membrana basal, sob influência dos pré-ameloblastos, param de se dividir, aumentam de tamanho e começam sua diferenciação em odontoblastos, passando a secretar a primeira camada de matriz de dentina – a dentina do manto. A presença da matriz dentinária e contatos entre odontoblastos e pré-ameloblastos desencadeiam a diferenciação final destes em ameloblastos, os quais sintetizam e secretam a matriz do esmalte jovem do dente (Thesleff & Hurmerinta, 1981; Katchburian & Arana, 2012).

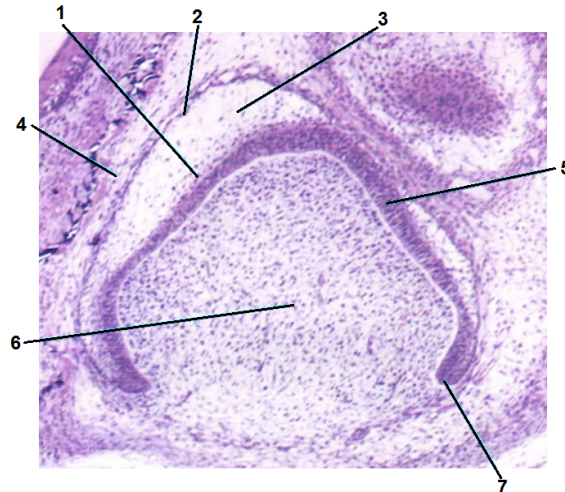


FIGURA 7. Aspecto histológico de germe dentário em fase de campânula. 1 = estrato intermediário; 2 = epitélio externo; 3 = retículo estrelado; 4 = folículo dentário; 5 = epitélio interno; 6 = papila dentária; 7 = alça cervical do órgão do esmalte. Adaptado de Katchburian & Arana, 2012.

2.2- O papel da família FGF na odontogênese

A odontogênese é determinada por uma cascata de sinalização que se estabelece entre o epitélio oral e o ectomesênquima subjacente, dita interação epitélio-mesenquimal (Satokata & Maas, 1994; Thesleff & Nieminen, 1996; Peters *et al.*, 1998; Bei *et al.*, 2000; Thesleff, 2003). Inúmeras moléculas participam desse processo, no qual fatores de crescimento e morfógenos difusíveis, receptores, sinalizadores intracelulares e fatores de transcrição são ativados no momento e local apropriados, garantindo o desenvolvimento dos grupos dentários.

A expressão de cerca de 300 genes tem sido mapeada e contribuído para o entendimento do desenvolvimento dentário (Landin *et al.*, 2012). No desenvolvimento de dente em mamíferos, no estágio de botão, em resposta a sinais indutivos epiteliais, o mesênquima dentário começa a expressar genes que codificam moléculas de sinalização, incluindo proteínas morfogenéticas do osso (BMP4), fatores de crescimento fibroblásticos (FGF3), activina- β A, *sonic hedgehog* (SHH) e Wnt5a (Zhang *et al.*, 2005). FGF8, FGF9, BMP4 e BMP2 são expressos pelo epitélio odontogênico durante a fase inicial do desenvolvimento dentário (Chen *et al.*, 1996; Bei & Maas, 1998; Mandler & Neubüser, 2001). Essas moléculas são responsáveis pela indução da expressão de genes nas células ectomesenquimais subjacentes, incluindo os que codificam para fatores de transcrição, como *Pax9*, *Msx1* e *Lef1*, e para uma cascata de fatores de crescimento, abrangendo os fatores de crescimento fibroblásticos, como FGF2,

FGF3 e FGF4, os quais serão expressos em fases subsequentes do desenvolvimento dentário. Todos esses fatores estão envolvidos na interação epitélio-mesenquimal que regula a odontogênese (Satokata & Maas, 1994; Thesleff & Nieminen, 1996; Peters *et al.*, 1998; Bei *et al.*, 2000).

Membros das famílias de sinalizadores SHH, BMP e Wnt, expressos no epitélio dentário espessado, tem sido associados como indutores de expressão de um grande número de fatores de transcrição no núcleo das células ectomesenquimais adjacentes, incluindo *Dlx1*, *Dlx2*, *Gli2*, *Gli3*, *Pax9*, *Msx1*. A inativação de alguns desses fatores de transcrição em camundongos causam uma detenção nos estágios de espessamento epitelial ou botão do desenvolvimento dentário (Bei & Maas, 1998; Peters & Balling, 1999; Tucker & Sharpe, 1999; Jernvall & Thesleff, 2000; Stock, 2001). A inativação do gene *FGF8* no epitélio mandibular resulta na ausência de molares e de expressão de *Pax9*, mas incisivos rudimentares (e seu domínio de expressão de *Pax9*) estão presentes (Trumpp *et al.*, 1999).

A família dos FGFs representa um grupo de fatores de crescimento polipeptídicos encontrados em uma grande variedade de organismos multicelulares, incluindo invertebrados, e que desencadeiam seus efeitos via ativação de receptores tirosinoquinases – FGFRs. FGFs são polipeptídeos com sítios de ligação para glicosaminoglicanos ácidos, incluindo heparina e sulfato de heparana (Chang *et al.*, 2000; Ornitz, 2000; Yayon *et al.*, 1991). Na presença de sulfato de heparana, FGFs estabilizam a ligação aos FGFRs, conduzindo à formação de dímeros 2:2:2 FGF-FGFR-sulfato de heparana (Mohammadi *et al.*, 2005). A nomenclatura da família de FGFs descreve 23 membros, apesar de haver apenas 18 ligantes de FGFR (Turner & Grose, 2010). A maioria dos FGFs medeiam respostas biológicas como a síntese de proteínas extracelulares pela ligação aos FGFRs (Itoh & Ornitz, 2004; Ornitz & Itoh, 2001; Thisse & Thisse, 2005). Entretanto, os FGFs 11-14 funcionam como proteínas intracelulares, atuando de modo independente de FGFR (Goldfarb, 2005). A família de *FGF* de mamíferos pode ser dividida em uma subfamília intracelular (*iFGFs*) – *FGF11/12/13/14* –, na subfamília semelhante a hormônios (hFGFs) – *FGF15/19/21/23* – e na subfamília de *FGFs* canônicos – *FGF1/2/5*, *FGF3/4/6*, *FGF7/10/22*, *FGF8/17/18* e *FGF9/16/20* (Itoh & Ornitz, 2008). O *FGF19* é um ortólogo humano para o *FGF15* de camundongo (Itoh & Ornitz, 2008); logo, a família de genes FGFs de humanos/camundongos compreende 22 membros (Ornitz & Itoh, 2001; Itoh & Ornitz, 2004). Estudos filogenéticos para *FGFs* de camundongos indicam a existência de sete subfamílias [*FGF1* (1, 2), *FGF4* (4, 5, 6), *FGF7* (7, 10, 22), *FGF8* (8, 17,

18), *FGF9* (9, 16, 20), *iFGFs* (11, 12, 13, 14) e *hFGFs* (15, 21, 23); Itoh & Ornitz, 2008], condizendo com as famílias em humanos (Itoh & Ornitz, 2004). Entretanto, a análise de conservação de *loci* gênicos para camundongos indica uma subdivisão em seis subfamílias (*FGF1/2/5*, *FGF3/4/6/15/21/23*, *FGF7/10/22*, *FGF8/17/18*, *FGF9/16/20* e *iFGFs*; Itoh & Ornitz, 2008). Todos os *FGFs* estão evolucionariamente relacionados e supostamente o gene similar a *FGF13* é o antecessor evolucionário mais provável entre toda a família de *FGFs* (Itoh & Ornitz, 2008).

As propriedades funcionais da maioria dos integrantes da família FGF estão relacionadas ao desenvolvimento embrionário, ao reparo tecidual e ao estímulo da atividade mitogênica de vários tipos celulares (Mason, 1994). Estão envolvidos em diversos processos celulares, incluindo apoptose, sobrevivência da célula, quimiotaxia, adesão celular, migração, diferenciação e proliferação (Böttcher & Niehrs, 2005); medeiam a homeostase, resposta a injúria, reparação tecidual e tumorigênese (Ornitz & Itoh, 2001; Dono, 2003; Kumano & Smith, 2002; Smallwood *et al.*, 1996; Cronauer *et al.*, 2003); controlam a formação do plano corporal e a organogênese em vertebrados (Alvarez *et al.*, 2003); possuem funções regulatórias importantes na formação de vários órgãos, como membros, mesencéfalo, pulmão, pelo, glândula pituitária e pena (Kettunen *et al.*, 2000). Vários membros da família dos FGFs, incluindo FGF2, FGF3, FGF8, FGF10 e FGF19, tem sido associados à formação de diferentes estágios de formação do ouvido interno (Baker & Bronner-Fraser, 2001; Rinkwitz *et al.*, 2001; Noramly & Grainger, 2002). São aparentemente difusíveis e capazes de agir de modo dose-dependente (Böttcher & Niehrs, 2005). Os FGFs da subfamília canônica funcionam de maneira parácrina (Itoh & Ornitz, 2008): são secretados (proteínas extracelulares) e se ligam a FGFRs, induzindo sua dimerização e a fosforilação de resíduos de tirosina citoplasmático específicos (Eswarakumar *et al.*, 2005). FGFs estimulam a proliferação de células ectomesenquimais e epiteliais, e podem regular o crescimento das cúspides dentárias, em cujas extremidades se inicia a diferenciação dos odontoblastos, induzida por sinalização do nó do esmalte (Thesleff *et al.*, 2001).

2.2.1- FGF2

FGF2, também conhecido como FGF básico, foi originalmente isolado de cérebro e de extrato de glândula pituitária bovina (Gospodarowicz, 1974; Gospodarowicz & Moran, 1974; Gospodarowicz *et al.*, 1975); e detectada como fator indutor de proliferação de células C3T3

de camundongo em cultura (Basilico & Moscatelli, 1992). A proteína possui 288 aminoácidos em humanos. FGF2 mostra uma preferência para se ligar a FGFR2c e FGFR3c (Ornitz *et al.*, 1996; Powers *et al.*, 2000). Essa molécula não possui sequências-sinal identificáveis (Itoh & Ornitz, 2008), podendo, portanto, ser liberada por células avariadas ou por mecanismos exocíticos que independem da via retículo endoplasmático-Golgi (Mignatti *et al.*, 1992).

De forma geral, FGF2 foi descrito com propriedades de ligar-se a componentes da matriz extracelular, particularmente ao sulfato de proto-heparana, regulando, *in vitro*, a proliferação, diferenciação e morfologia de células da neuroectoderme e de origem mesodermal (Cam *et al.*, 1992). Está envolvido em várias respostas biológicas, como mitogênese (Westall *et al.*, 1978), angiogênese (Klagsbrun, 1989), metabolismo de colágeno e reparo de feridas (Gospodarowicz & Ferrara, 1987), assim como em vários processos específicos envolvendo eventos indutivos como desenvolvimento de osso, pelos, membros e dentes (Gospodarowicz & Ferrara, 1987; Klagsbrun, 1989).

Na odontogênese, FGF2 está distribuído no mesênquima dentário e no retículo estrelado de germes dentários, além de já ter sido relacionado à proliferação celular no mesênquima dentário nos estágios de botão e capuz (Kettunen *et al.*, 1998) e ao reparo na dentina (Tsuboi *et al.*, 2003). Ainda como fator extracelular, foi sugerido que FGF2 se liga a colágeno tipo IV, laminina e fibronectina, o que pode justificar sua localização em odontoblastos durante a deposição de matriz dentinária (Russo *et al.*, 1998), uma vez que pré-odontoblastos se aderem à fibronectina e à laminina quando em maturação, a fim de depositar dentina. Além de fator extracelular, também foi relatado que FGF2 adicionado exogenamente pode ser translocado para o núcleo de células do epitélio odontogênico (Bonnet *et al.*, 1996; Bailly, *et al.*, 2000). A presença de FGF2 nuclear nessas células, associado com sua expressão em fibromas amelo-blásticos e fibro-odontomas ameloblásticos, sugere que o FGF2 pode estar envolvido em direcionar a atividade nuclear no estágio de histodiferenciação da odontogênese (So *et al.*, 2001). Camundongos *knockout* para FGF2 apresentam diminuída contratilidade do músculo liso vascular, resultando em hipotensão (Zhou *et al.*, 1998), além de apresentarem hiperplaquetose (Zhou *et al.*, 1998) e reduzida densidade neuronal do córtex motor (Ortega *et al.*, 1998).

2.2.2- FGF3

FGF3, também conhecido como *int2*, foi primeiramente identificado como um oncogene em tumores mamários de camundongos induzidos por vírus (MMTV; revisado por Dick-

son *et al.*, 1989). FGF3 pertence à família dos fatores de crescimento ligantes de heparina e tem peso molecular entre 29 e 31 kDa (Antoine *et al.*, 2000; Ornitz, 2000). Em humanos, sua sequência proteica é composta por 239 aminoácidos (Antoine *et al.*, 2000). É uma proteína secretada com peptídeos sinais amino terminais cliváveis (Ornitz & Itoh, 2001).

Há evidências de que FGF3 desempenha funções importantes durante a formação óssea e durante o desenvolvimento de membros por meio da via de sinalização SHH (Farré *et al.*, 2007; Mayshar *et al.*, 2008). *FGF3* é expresso no rombencéfalo em desenvolvimento, está envolvido na formação do ouvido interno de diversas espécies de vertebrados, incluindo *zebrafish*, *Xenopus*, galinha e camundongo (Alvarez *et al.*, 2003; Tekin *et al.*, 2007). Estudos com camundongos *knockout* para *FGF3* demonstraram pequenos efeitos no padrão do rombencéfalo (Mansour *et al.*, 1993) – padrão similar ao observado em embriões de *zebrafish* que tiveram a expressão de *FGF3* diminuída pela ação de morfolinós (oligonucleotídeos morfolinós são moléculas estáveis, sem carga e solúveis em água que se ligam a sequências complementares de RNAm, inibindo seu processamento, leitura e ligação de proteínas nesses locais; Maves *et al.*, 2002; Moulton & Yan, 2008) – e perda ocasional do canal semicircular posterior (Pauley *et al.*, 2003; Mansour *et al.*, 1993).

Os fenótipos mais evidentes dos animais *knockout* para FGF3 foram os de microtia (desenvolvimento anormal do pavilhão auditivo) e microdontia (condição em que os dentes são menores do que o normal) (Tekin *et al.*, 2007). Estudos indicaram que interações de *MSX1*, *PAX9* e *FGF3* estão envolvidas na hipodontia, ou agenesia dentária (Ogawa *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2013). Sabe-se que a expressão de seu receptor, *FGFR2b*, é restrita ao epitélio dentário (Kettunen *et al.*, 2000). O animal *knockout* para *FGFR2b* resulta em malformações graves do ouvido interno, que incluem uma ausência do ducto endolinfático (Pirvola *et al.*, 2000), além do dente estagnado no estágio de botão (Celli *et al.*, 1998; De Moerlooze *et al.*, 2000).

2.2.3- FGF4

FGF4, também é conhecido como HST ou K-FGF (KGF: fator de crescimento de queratinócito; Fuller-Pace *et al.*, 1991), foi identificado em tumor estomacal humano (HST) e em lesão de sarcoma de Kaposi (Delli-Bovi *et al.*, 1987; Niswander & Martin, 1992; Sakamoto *et al.*, 1986; Taira *et al.*, 1987). Em humanos, possui 206 aminoácidos (Galzie *et al.*, 1997).

No embrião em desenvolvimento, o gene *FGF4* é expresso durante os estágios de pré- e pós-implantação inicial e mais tardiamente em vários tecidos, incluindo arcos branquiais, brotos de membros e epitélio dentário (Niswander & Martin, 1992; Drucker & Goldfarb, 1993), além de ter sido mostrado como estimulador de proliferação de células progenitoras de megacariócito (Konishi *et al.*, 1996). Mutantes *knockout FGF4^{-/-}* são letais (Feldman *et al.*, 1995).

Na odontogênese, FGF4 é um potente mitógeno para células epiteliais e mesenquimais (Jernvall *et al.*, 1994; Niswander & Martin, 1993; Rifkin & Moscatelli, 1989). Ele se liga a formas derivadas de *splicing* de FGFR1, que são expressas tanto no mesênquima da papila dentária quanto no epitélio dentário, e a FGFR3b, que é expresso no epitélio dentário durante os estágios de capuz e campânula de camundongos (Mansukhani *et al.*, 1990; Ornitz *et al.*, 1996; Orr-Urtreger *et al.*, 1993). Estudos em molares de camundongo mostram expressão de *FGF4* localizada estritamente no nó do esmalte na fase de capuz (Jernvall *et al.*, 1994) e nos nós do esmalte secundários na fase de campânula (Kettunen & Thesleff, 1998).

2.3- Modelos animais no estudo da odontogênese

A maior parte dos relatos sobre estas cascatas de sinalização molecular no desenvolvimento dentário advém de estudos em embriões de roedores e dados comparativos com outros vertebrados são escassos. Embora os roedores sejam modelos tradicionais para o estudo do desenvolvimento dentário, algumas características da sua dentição, tais como incisivos especializados, número reduzido de grupos dentários e molares sem esmalte nas pontas de cúspides, limitam consideravelmente a extrapolação de dados para outros mamíferos em geral (Fuenzalida *et al.*, 2000; Jernvall & Thesleff, 2000). Além disso, os roedores possuem apenas dois grupos dentários – incisivos e molares –, o que difere muito da dentição humana. Estudos em primatas e em cães também contribuíram para o conhecimento das moléculas sinalizadoras da odontogênese em modelos com dentição completa. Entretanto, as pesquisas com esses modelos são onerosas, exigem infraestrutura específica para a manutenção dos animais experimentais. Além disso, há uma dificuldade crescente de liberação para as pesquisas pelos comitês de ética, uma vez que o acesso aos embriões nesses mamíferos placentários exige o sacrifício das fêmeas prenhes (Fuenzalida *et al.*, 2000; Jernvall & Thesleff, 2000).

A base molecular da perda evolucionária dos dentes de roedores foi investigada em camundongos e ratos selvagens (Turescova *et al.*, 1995; Keränen *et al.*, 1999). Os ratos de laboratório não possuem caninos nem pré-molares em ambas as maxilas, e os incisivos e molares remanescentes são separados entre si por um diastema – espaço entre dentes (Ruch *et al.*, 1997). Seus diastemas maxilares contém botões de dente rudimentares, presentes somente durante a embriogênese (Jernvall & Thesleff, 2000), ou seja, botões de dentes se formam na área do diastema embrionário, mas sofrem apoptose e regridem, não se desenvolvendo em dentes (Klein *et al.*, 2006; Moustakas *et al.*, 2011; Peterková *et al.*, 2002). Membros da família *Sprouty* (*Spry*) são identificados como genes que reprimem o desenvolvimento do dente no diastema – *Spry2* no epitélio e *Spry4* no mesênquima (Klein *et al.*, 2006) – e parecem ter ação intracelular regulando negativamente FGF e outras sinalizações por receptores tirosinaquinase (RTK) por diversos mecanismos bioquímicos, frequentemente via efeitos na via RAS-MAPK (Kim & Bar-Sigi, 2004; Mason *et al.*, 2006). Genes *Sprouty* são expressos nos molares e incisivos em desenvolvimento de camundongos, assim como no diastema (Klein *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2008). Camundongos *Spry2-null* e *Spry4-null* desenvolvem um dente similar ao pré-molar no diastema (Klein *et al.*, 2006). Todavia, dados do estudo de Moustakas *et al.* (2011) não corroboram com informações acerca da supressão dentária por *Spry2* e

Spry4, uma vez que esses genes foram localizados no epitélio e no mesênquima de todas as classes dentárias de *Monodelphis domestica*. Por isso, esses autores sugerem que *Spry2* e *Spry4* podem não levar à formação de diastema ou supressão do pré-molar, necessariamente, e podem, na espécie estudada, ser importantes para a manutenção da dentição heterodonte. Também é sugerido que *R-spondina2*, da família de ativadores de Wnt, pode regular o desenvolvimento do dente no diastema através de FGF e SHH, com formação de dentes extranumerários no diastema de camundongos *R-spondina 2^{-/-}* (Kawasaki *et al.*, 2014).

Um dos mecanismos da perda de dentes na evolução é a falha da substituição dentária. Em casos em que a dentição primária não aparece, os germes dentários podem ter seu desenvolvimento interrompido em uma variedade de estágios (Stock, 2001). O diastema de roedores apresenta um caso no qual a perda de dentes específicos ocorreu por mais de um mecanismo. Na maxila inferior do camundongo de laboratório e de ratazanas, não há traços de iniciação dentária no diastema, mas na maxila superior, rudimentos de dente diastemal progredem até o estágio de botão antes de terem o desenvolvimento interrompido (Keränen *et al.*, 1999). A maioria dos camundongos *knockout* com efeitos na dentição apresentam detenção no desenvolvimento dentário na fase de espessamento epitelial ou no estágio de botão (Jernvall & Thesleff, 2000). Experimentos de recombinação tecidual em anfíbios (Ten Cate, 1995) e pássaros (Kollar & Fisher, 1980; Kollar & Mina, 1991) sugerem que toda a dentição pode ser perdida por uma falha nas interações epitélio-mesenquimais (Stock, 2001).

Vias de sinalização começaram a ser analisadas em outras espécies de vertebrados (répteis, aves, cão e primatas), além de ratos e camundongos, com o objetivo de entender as bases genéticas da evolução de números e de formas de dentes, os quais são ótimos alvos para estudos evolucionários, porque seu bom registro fóssil permite a análise de mecanismos de desenvolvimento que produziram mudanças evolucionárias conhecidas (Jernvall & Thesleff, 2000).

Os metatérios – marsupiais – compreendem um dos três maiores grupos de mamíferos modernos e representam o grupo externo mais próximo dos mamíferos eutérios – placentários –, e esses dois grupos divergiram há 180 milhões de anos (de Barros *et al.*, 2013). As espécies brasileiras *Didelphis sp* são consideradas um excelente modelo para estudos experimentais reprodutivos de marsupiais brasileiros (Whitten, 1966; Gonçalves *et al.*, 2009; de Barros *et al.*, 2013).

Os *Didelphis albiventris* (apud Lund, 1840), também chamado de gambá-de-orelha-branca, são marsupiais solitários e são principalmente terrestres, mas também são escaladores (Cerqueira & Tribe, 2007; Oliveira-Santos *et al.*, 2008; Smith, 2007; de Almeida *et al.*, 2008). Esses animais são noturnos e crepusculares: eles se tornam ativos diretamente após o pôr do sol e permanecem ativos durante toda a noite (Oliveira-Santos *et al.*, 2008; Smith, 2007; de Almeida *et al.*, 2008). Durante o dia, o gambá-de-orelha-branca permanece abrigado, frequentemente em buracos, palmeiras ou sob bromélias, podendo, ainda, ficar em ninhos abandonados de outras espécies ou em troncos ocos de árvores forrados com grama, pelos ou penas (Cerqueira & Tribe, 2007; Oliveira-Santos *et al.*, 2008; Smith, 2007; de Almeida *et al.*, 2008). Essa espécie de gambá encontra-se largamente distribuída, incluindo Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina, Bolívia, Equador, Peru e Colômbia (Costa *et al.*, 2008; Gardner, 2005; Sousa *et al.*, 2012; Wilson & Reeder, 2005). No Brasil, é encontrado em todas as regiões (Bertassoli *et al.*, 2013; Cáceres, 2000; Fonseca, 2003; Fonseca & Alves, 2006; Gardner, 2005; Mançanares *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 1998; Sousa *et al.*, 2012; van Nievelt & Smith, 2005). De acordo com Mascarenhas (1980), e confirmado por Rigueira *et al.* (1987), as fêmeas apresentam estro nos meses de julho, outubro e novembro, enquanto o anestro ocorre nos meses de fevereiro a junho. O período de acasalamento ocorre entre julho e janeiro (Nogueira, 1987) e o início da estação reprodutiva parece estar relacionado com a quantidade de precipitação pluviométrica (Cerqueira, 1982). Não há informações específicas sobre os sistemas de acasalamento dos gambás-de-orelha-branca; no entanto, os membros da família Didelphidae são geralmente considerados polígamos (Fernandes *et al.*, 2010; O'Connell, 2006). Os machos competem pelas fêmeas reprodutivas, comunicando-se com uma série de sons tipo clique (Fernandes *et al.*, 2010; O'Connell, 2006). Os didelfídeos não apresentam rituais de acasalamento nem pares de ligação (Fernandes *et al.*, 2010; O'Connell, 2006). O *D. albiventris* é onívoro e grandemente generalista na alimentação, com dieta variando sazonalmente e sendo primariamente composta por insetos, pássaros, ovos, pequenos mamíferos, frutas, sementes, folhas e, menos frequentemente, répteis, anfíbios e moluscos (Aguiar *et al.*, 2004; Aragona & Marinho-Filho, 2009; Mançanares *et al.*, 2012).

Como os demais marsupiais, o gambá *D. albiventris* é caracterizado por um período de gestação intrauterina muito curto, de apenas 13 dias (Rigueira *et al.* 1987; Talice & Lagomarsino, 1959), com a organogênese verdadeira iniciando-se nos últimos 3,5 dias de gestação (Krause & Cutts, 1986). Os jovens nascem com grande imaturidade, em estado altricial, devendo alcançar a área de mama ou bolsa, reconhecer o mamilo, anexar à mama e mamar sem

assistência materna. Esses jovens ficam 90 dias aderidos à mama, e periodicamente despreendem-se dela, mas continuam seu desenvolvimento enquanto são nutridos por lactação (Smith, 2006), permitindo sua manipulação e coleta sem intervenção cirúrgica (**Figura 8**).



FIGURA 8. Neonatos de dois dias na bolsa marsupial de fêmea de *Didelphis albiventris*.

O estado semiembrionário do neonato instalado na bolsa marsupial materna permite a observação de sua organogênese (Jurgelski Junior, 1974; Bertassoli *et al.*, 2013). Assim, é possível coletar os neonatos sem o sacrifício da fêmea, corroborando as tendências de preservação de espécies e os princípios da ética em experimentação animal.

O *D. albiventris* tem sido considerado um modelo para estudos comparativos da odontogênese devido ao seu padrão de dentição mais próximo ao da humana, quando comparado aos roedores. Ao contrário destes, marsupiais possuem, ainda, uma dentição complexa e heterodonte, podendo ser úteis para a compreensão da mecânica da diferenciação dentária (Smith, 2006). Esse padrão marsupial de substituição dentária é único, e as posições do incisivo, canino, primeiro e segundo pré-molar possuem apenas uma única geração funcional (van Nievelt & Smith, 2005).

O gambá adulto apresenta, na maxila, cinco pares de incisivos, um par de caninos, três pares de pré-molares e quatro pares de molares. Já na mandíbula, possui quatro pares de incisivos, um par de caninos, três pares de pré-molares e quatro pares de molares (Fonseca & Alves, 2006; **Figura 9**).

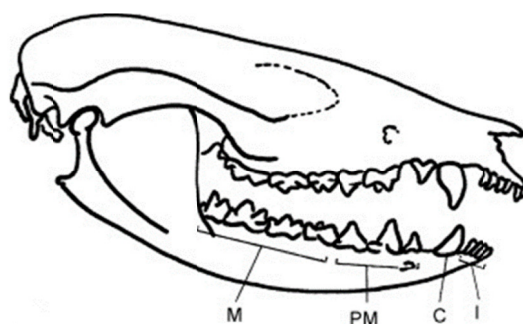


FIGURA 9. Desenho esquemático mostrando o padrão dentário de *Didelphis albiventris*. I: incisivos; C: canino; PM: pré-molares; M: molares. Adaptado de Christian Beier, disponível em <http://christianbeier.blogspot.com.br>, acesso em dezembro de 2012.

Alguns estudos da odontogênese em *D. albiventris* já foram realizados (Torres *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2008). No momento do nascimento, chamado estágio “pós-natal-zero” (P0), quando os neonatos deixam o útero e migram para o marsúpio, os primeiros molares são encontrados em estágio de lâmina dentária, com a condensação do ectomesênquima ao redor do espessamento epitelial. O estágio de botão, em molares, ocorre entre P2 e P4 (Torres *et al.*, 2006), dois e quatro dias dos neonatos no marsúpio, respectivamente, quando o epitélio dentário externo do órgão dentário origina a lâmina dentária secundária, a qual sofre degeneração nessa mesma fase de botão. Portanto, a lâmina dentária secundária seria remanescente de condição primitiva na qual ocorria dentição secundária. Não há vestígios de dentição decídua no referido gambá; logo, a primeira dentição prevalece como dentição permanente (Fonseca & Alves, 2006), como já relatado para outros marsupiais (van Nievelt & Smith, 2005). O estágio de capuz em molares foi observado entre P4 e P8 (quatro e oito dias no marsúpio, respectivamente, Torres *et al.*, 2006). Em P5 (cinco dias no marsúpio), nos molares, os elementos formadores do dente são evidentes e o nó do esmalte primário está completamente formado (Torres *et al.*, 2006).

Estudo prévio da nossa equipe (Torres *et al.*, 2006) sobre a participação do *FGF9* na odontogênese do gambá *D. albiventris* mostrou que, apesar da alta conservação estrutural da molécula nas várias espécies animais, sua função pode ser distinta entre o gambá e os roedores. Em rato, o *FGF9* atua tanto na iniciação dentária quanto na morfogênese; já em gambá, só houve expressão dessa molécula durante a iniciação dentária. Em outro estudo, *BMP4* apresentou um padrão de expressão semelhante ao descrito para roedores no início do desenvolvimento dentário (Torres *et al.*, 2008). Esses dados apontam para a necessidade de um aprofundamento dos estudos comparativos sobre a interação epitélio-mesenquimal reguladora da

odontogênese em modelos biológicos com dentição completa, a fim de subsidiar a implementação do gambá como modelo de estudo. A constatação de uma via de sinalização odontogênica mais próxima à de humanos e a possibilidade de acesso aos neonatos sem o sacrifício das fêmeas prenhes pode atrair a atenção dos pesquisadores para esse modelo marsupial e tornar o *D. albiventris* uma referência importante para tais estudos.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Analisar o padrão de a expressão de FGF2, FGF3 e FGF4 durante o desenvolvimento dentário de molares de *D. albiventris*, a fim de promover a caracterização temporal e espacial destas moléculas sinalizadoras, envolvidas na interação epitélio-mesenquimal que regula os estágios iniciais da odontogênese, contribuindo para implementar o modelo em estudos de Biologia do Desenvolvimento.

3.2- Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente as fases do desenvolvimento dos germes de molares (grupo dentário amplamente estudado em roedores, permitindo comparações) nos estágios de lâmina dentária, botão, capuz e campânula, em *D. albiventris* nas idades de 0, 2, 4, 5, 8, 10 e 14 dias pós-natal, por coloração em HE;
- Determinar o padrão de expressão de FGF2, FGF3 e FGF4 (importantes fatores mitogênicos e para a morfogênese do dente) durante a odontogênese dos molares de *D. albiventris* nos estágios de lâmina dentária, botão, capuz e campânula, por imunohistoquímica, a fim de caracterizar o local e o momento da expressão dessas moléculas sinalizadoras;
- Clonar e sequenciar fragmentos de RNA mensageiro de *FGF3* e *FGF4* de *D. albiventris*, para permitir a caracterização do padrão de expressão dessas moléculas, pelo método de hibridização *in situ*. Uma vez que *FGF2* de *D. albiventris* foi previamente sequenciado, tal molécula não foi incluída na análise por biologia molecular.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Coleta de amostras de neonatos de *D. albiventris*

O modelo biológico avaliado nos experimentos foi o gambá *D. albiventris* (Didelphidae, Marsupialia). Todos os procedimentos propostos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, conforme protocolo número 220/08. Do mesmo modo, a captura dos animais silvestres na mata da Estação Ecológica da UFMG, bem como sua manutenção e manejo nas dependências do Departamento de Morfologia, foram autorizados pelo Ministério do Meio Ambiente, segundo protocolo nº 27354-2/Sistema de Autorização (**Anexo 1**) e Informação em Biodiversidade – SISBIO (Documento atualizado em 09/09/2012; **Anexo 2**).

Para a obtenção dos neonatos, fêmeas *D. albiventris* prenhes foram capturadas na mata da Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) durante o período reprodutivo da espécie – junho a agosto e segunda quinzena de outubro a dezembro. Armadilhas de ferro contendo pedaços de frutas, óleo de fígado de bacalhau e pasta de amendoim foram colocadas na mata da Estação Ecológica (19° 52' 32.1204" S e 43° 58' 23.4768" O) no período da tarde e recolhidas no início da manhã do dia seguinte, em conformidade com o hábito noturno da espécie. Foi observada a ocorrência ou não de filhotes no interior da bolsa marsupial de cada fêmea capturada. Fêmeas capturadas com neonatos no marsúpio tiveram os filhotes coletados, caso estivessem dentro da faixa de peso/tamanho de interesse, sendo a idade estimada por uma tabela que cruza dados de tamanho e peso dos neonatos (**Quadro 1**).

Quadro 1. Valor médio dos pesos e comprimentos dos espécimes de *D. albiventris* coletados nas idades estudadas, de 0 a 100 dias. CR: crista occipital/inserção da cauda; SR: rostro/inserção da cauda; N: número de amostras. Fonte: Fonseca, 1996.

idade	0 dia	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias	8 dias	9 dias	10 dias	14 dias
N	15	1	2	3	2	2	2	3	3	2	5	1
peso (g)	0,229 ±0,16	0,16	0,26 ±0,01	0,281 ±7,40	0,361 ±8,5	0,37 ±0,06	0,465 ±0,05	0,628 ±0,04	0,607 ±0,59	0,665 ±0,04	0,777 ±0,75	1,08
SR (mm)	14,0± 1,46	15,0	16,0	16,833 ±0,23	19,5 ±0,5	18,75 ±0,75	20,25 ±0,25	23,33 ±0,94	23,33 ±0,94	22,25 ±0,25	26,3 ±1,16	29,5
CR (mm)	10,61 ±0,88	11,6	12,4 ±0,1	12,33 ±1,16	13,4 ±0,0	14,45 ±0,65	14,65 ±0,35	16,33 ±0,75	16,85 ±0,6	16,9 ±0,3	18,425 ±1,30	21,3

idade	20 dias	30 dias	40 dias	50 dias	60 dias	65 dias	67 dias	70 dias	80 dias	90 dias	100 dias
N	4	6	3	2	3	2	2	3	2	3	1
peso (g)	1,89 ±0,17	3,799 ±0,46	6,570 ±0,72	11,339 ±0,58	21,02 ±2,49	29,46 ±1,34	37,15 ±1,8	54,39 ±9,18	116,38 ±20,28	182,0 ±92,49	291,0
SR (mm)	35,62 ±2,38	46,33 ±2,37	58,33 ±0,47	68,75 ±0,25	90,66 ±6,94	100,5 ±2,5	106,5 ±1,5	119,0 ±5,09	167,5 ±7,5	192,66 ±12,28	233,0
CR (mm)	29,1 ±1,21	35,27 ±1,51	45,13 ±2,20	56,65 ±2,75	67,9 ±4,47	76,15 ±0,45	81,0	90,2 ±6,02	121,35 ±3,35	145,6 ±18,56	170,3

Segundo o estudo de Oliveira *et al.* (1998), pudemos obter outra tabela indicativa de idade e tamanho para fins comparativos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Valor do comprimento crista-occipital/inserção da cauda (CR) para amostras de *D. albiventris* estudadas. Fonte: Oliveira, 1998.

Idade (dias)	CR (mm)
1	10,5
2-3	12,0
3-4	13,0
6-8	15,5-16,0
9-14	18,0-21,0
16-20	25,0-28,0
26-40	33,0-43,0
41-53	45,0-58,0
55-73	60,0-100,0

Em caso de inexistência de filhotes na bolsa marsupial, as fêmeas permaneceram sob observação em biotério próprio durante os 13 dias seguintes à data da captura, período de tempo que corresponde à duração do processo de gestação intrauterina nessa espécie. Durante o período de observação, as fêmeas foram mantidas no biotério de animais silvestres do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, com os cuidados e medidas de biossegurança, e receberam, aproximadamente, 180 g de ração balanceada por dia (Jurgelski Junior, 1974), frutas variadas e água *ad libitum*.

A presença de neonatos e/ou muco e sangue sobre uma folha de papel disposta abaixo das gaiolas foi adotada como indício do nascimento dos filhotes e indicou a necessidade de avaliar a presença de neonatos no marsúpio. Para a avaliação, a fêmea foi imobilizada por sua região cervical, membros posteriores e cauda. Para a retirada dos neonatos das papilas mamárias, foram realizados movimentos delicados e simultâneos de rotação e tração para o rompimento do tecido epitelial contínuo entre os lábios do filhote e a papila mamária da fêmea. A fêmea foi identificada e devolvida ao seu habitat natural, no mesmo local de sua captura.

Neste estudo foram utilizados:

- Dois neonatos, independente de sexo, em cada uma das idades de 0 (P0), 2 (P2), 4 (P4), 5 (P5), 8 (P8), 10 (P10) e 14 (P14) dias, para as análises morfológicas macroscópicas e histológicas;
- Dois neonatos em idade de dois dias (uma vez que os FGFs são expressos amplamente no início do desenvolvimento), independente de sexo, para a extração de RNA total e clonagem dos fragmentos do RNAm de FGF3 e FGF4;
- Três neonatos em cada uma das idades de 0, 2, 4, 5, 8, 10 e 14 dias (para as análises de imunohistoquímica) e três neonatos de 2, 8, 10 e 14 dias (para análises de hibridização *in situ*), independente de sexo, para a caracterização da expressão de FGF2 (apenas para imunohistoquímica), FGF3 e FGF4 durante a odontogênese. As idades dos neonatos selecionadas baseiam-se nas fases de desenvolvimento dos germes dentários de interesse – lâmina dentária, início de botão, final de botão, início de capuz, final de capuz, início de campânula e meados de campânula, respectivamente (**Tabela 2**). As análises propostas neste item foram realizadas em, no mínimo, três indivíduos/idade/método.

Tabela 2. Fases do germe dentário do primeiro molar do *Didelphis albiventris* de 0 a 60 dias. Fonte: Palma, 1997.

Idade	Nº de filhotes utilizados	Fase do desenvolvimento dentário
0 dia	4	lâmina dentária
2 dias	3	botão
4 dias	3	final do botão
8 dias	2	capuz
10 dias	3	campânula
14 dias	2	final de campânula
20 dias	2	formação de coroa
25 dias	1	formação de coroa
30 dias	1	formação de coroa
40 dias	1	formação de coroa
50 dias	1	formação de coroa
60 dias	1	formação de coroa

Após a coleta, os neonatos foram sacrificados por decapitação. Em seguida, foram utilizados para extração de RNA total ou processados para obtenção de cortes histológicos.

4.2- Inclusão e cortes histológicos

Após a decapitação, as cabeças e troncos (usados como controle de marcação das moléculas em tecidos em desenvolvimento) dos filhotes foram fixados em paraformaldeído (PFA) 4% tamponado pH 7,4, por 48 h, a 4 °C. Em seguida, todos os espécimes foram desidratados através de série crescente de banhos de álcool etílico, clarificados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos foram serialmente seccionados em micrótomo MRS3500 (Histo-Line Laboratories) no plano frontal (para cabeças) e no plano sagital (para troncos) numa espessura de 5 µm e 10 µm. As seções de 5 µm foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para a caracterização histológica e para a seleção de seções representativas a serem usadas nos procedimentos de imunohistoquímica e hibridização *in situ* (HIS), para a qual foram utilizadas seções de 10 µm. Para compor o PFA e os etanóis hidratados utilizados destinados ao processamento de peças para HIS foi utilizada água tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC), composto que inativa enzimas RNases.

4.3- Método histológico

Após secagem das lâminas com cortes histológicos de 5 µm em estufa, a 37 °C por 24 h, foi realizada a coloração. As seções foram desparafinizadas por 30 min em banhos de xilol e por 15 min em cada um dos outros dois banhos de xilol subsequentes. Posteriormente, as seções foram hidratadas em uma série de banhos de etanol de 2 min cada, com concentração decrescente (três banhos de etanol 100%, um de 90%, um de 80% e um de 70%), seguidas por hidratação de 20 min sob filete de água corrente. Os cortes foram mergulhados durante 40 s em Hematoxilina de Harris e, em seguida, lavados por 20 min sob filete de água corrente. Subsequentemente, as lâminas foram mergulhadas por 1 min e 20 s em Eosina e, em seguida, lavadas em três banhos rápidos de água. As amostras foram desidratadas em banhos de 1 min cada, em uma série de concentrações crescentes de etanol (um banho de 70%, um de 80%, um de 90%, um de 95% e três de 100%). Por fim, as seções histológicas foram submetidas à diafanização em xilol – dois banhos por 2 min cada e um banho por 10 min. As lâminas foram montadas com meio de montagem Entellan (Merck) e secas em estufa a 37 °C, *overnight*.

4.4- Método Imunohistoquímico

O método da imunoperoxidase objetivou o estudo da expressão de FGF2, FGF3 e FGF4 durante o desenvolvimento dentário dos molares de gambá, quando os órgãos dentários apresentam características morfológicas típicas das fases de lâmina dentária, início de botão, final de botão, início de capuz, final de capuz, início de campânula e meados de campânula.

Uma vez que os fatores de crescimento fibroblásticos possuem uma estrutura altamente conservada entre as espécies (estudo realizado utilizando o *software online* de alinhamento de múltiplas sequências PRALINE, disponível em <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>), foram selecionados anticorpos que reconhecem fragmentos conservados da proteína.

Como não há anticorpos comerciais disponíveis para *D. albiventris*, foi necessário realizar um estudo inicial para verificar o grau de similaridade entre as sequências de proteínas de FGF2, FGF3 e FGF4 descritas para humanos (*Homo sapiens*), camundongos (*Mus musculus*), com relação às sequências disponíveis para as espécies mais próximas de *D. albiventris*, o gambá catita (*Monodelphis domestica*) e, quando disponível, para o diabo-da-Tasmânia (*Sarcophilus harrisii*, **Figuras 10 a 12**). As sequências de aminoácidos foram obtidas no

GenBank e o *software* PRALINE foi utilizado para permitir o alinhamento dessas sequências. Entre os anticorpos disponíveis comercialmente, foram selecionados aqueles que poderiam ser utilizados para um maior número de espécies, especialmente para ratos, camundongos e humanos. Nesta busca, foram identificados os seguintes anticorpos, todos da marca Santa Cruz Biotechnology: anti-FGF2 (*rabbit polyclonal IgG*, sc-79), que reconhece a região interna da proteína (próximo aos aminoácidos 30-80 da proteína humana); anti-FGF3 (*goat polyclonal IgG*, sc-33963), que reconhece a região interna da proteína (próximo aos aminoácidos 80-130 da proteína humana); e anti-FGF4 (*goat polyclonal IgG*, sc-1361), que reconhece a região C-terminal da proteína (próximo aos aminoácidos 170-220 da proteína humana).

O alinhamento das sequências disponíveis para FGF2 mostrou uma alta conservação/similaridade em toda a sequência da proteína, entre todas as espécies utilizadas (**Figura 10**). A comparação entre as sequências de FGF3 para as mesmas espécies mostrou uma alta similaridade/conservação apenas na porção central da proteína, sendo a porção C-terminal a mais problemática (**Figura 11**). O mesmo foi observado para o alinhamento das sequências para FGF4, com as porções central e parte da C-terminal bastante conservadas (**Figura 12**). Dessa forma foi possível observar uma correlação entre as regiões reconhecidas pelos anticorpos em outras espécies (humanos e camundongos) e espécies próximas de *D. albiventris* (gambá e diabo-da-tasmânia). Portanto, os alinhamentos sugeriram que os anticorpos policlonais desenvolvidos pela empresa Santa Cruz Biotchnology apresentavam grandes chances de reconhecer as respectivas proteínas também no gambá *D. albiventris*.

Unconserved 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conserved

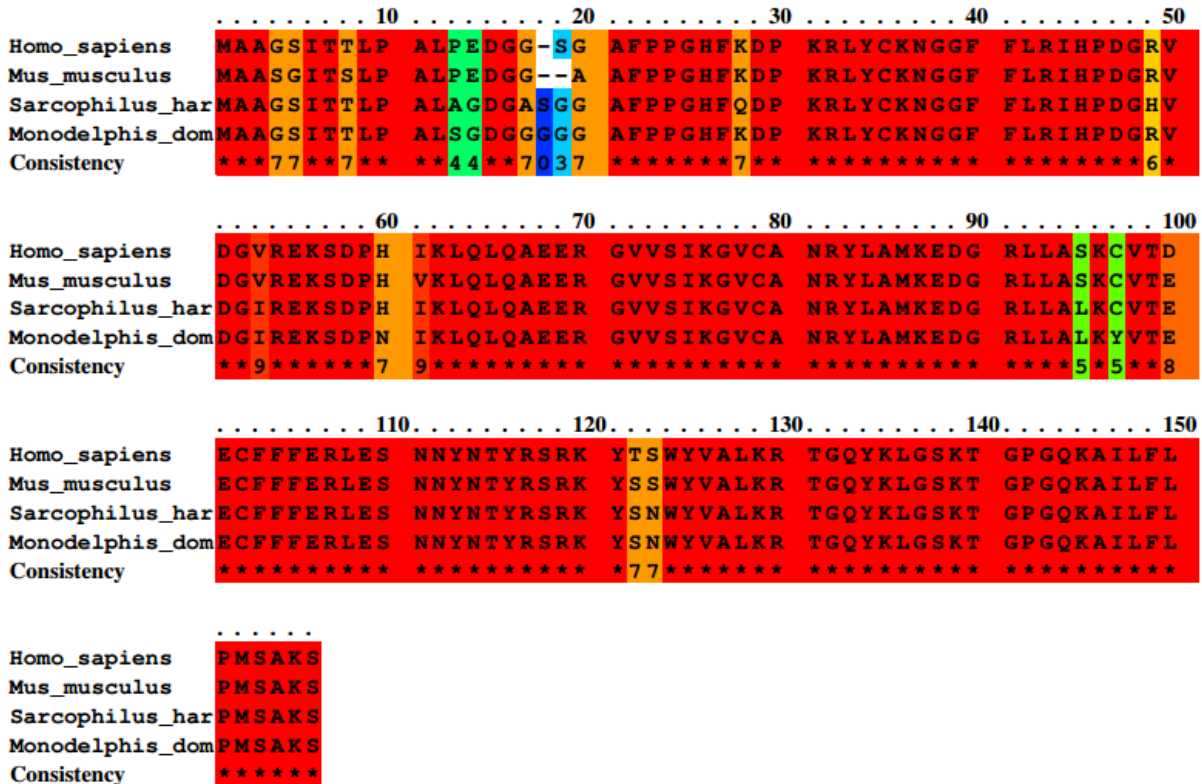


FIGURA 10. Alinhamento das seqüências de aminoácidos disponíveis para FGF2 para espécies diferentes: *Homo sapiens* (gi_153285461_re), *Sarcophilus harrisii* (o marsupial diabo-da-Tasmânia; gi_395541778_re), *Mus musculus* (gi_122743_sp_P1) e *Monodelphis domestica* (o marsupial catita ou cuíca-do-rabo-curto; gi_1345991_sp_P). O consenso entre essas seqüências está mostrado em “Consistency”. O nível de conservação entre os aminoácidos está representado em uma escala que atribui valores e cores: de azul (0) para menos conservados a vermelho (10) para mais conservados. (*) Atribuição de valor igual a10 para o consenso. PRALINE está disponível em <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>.

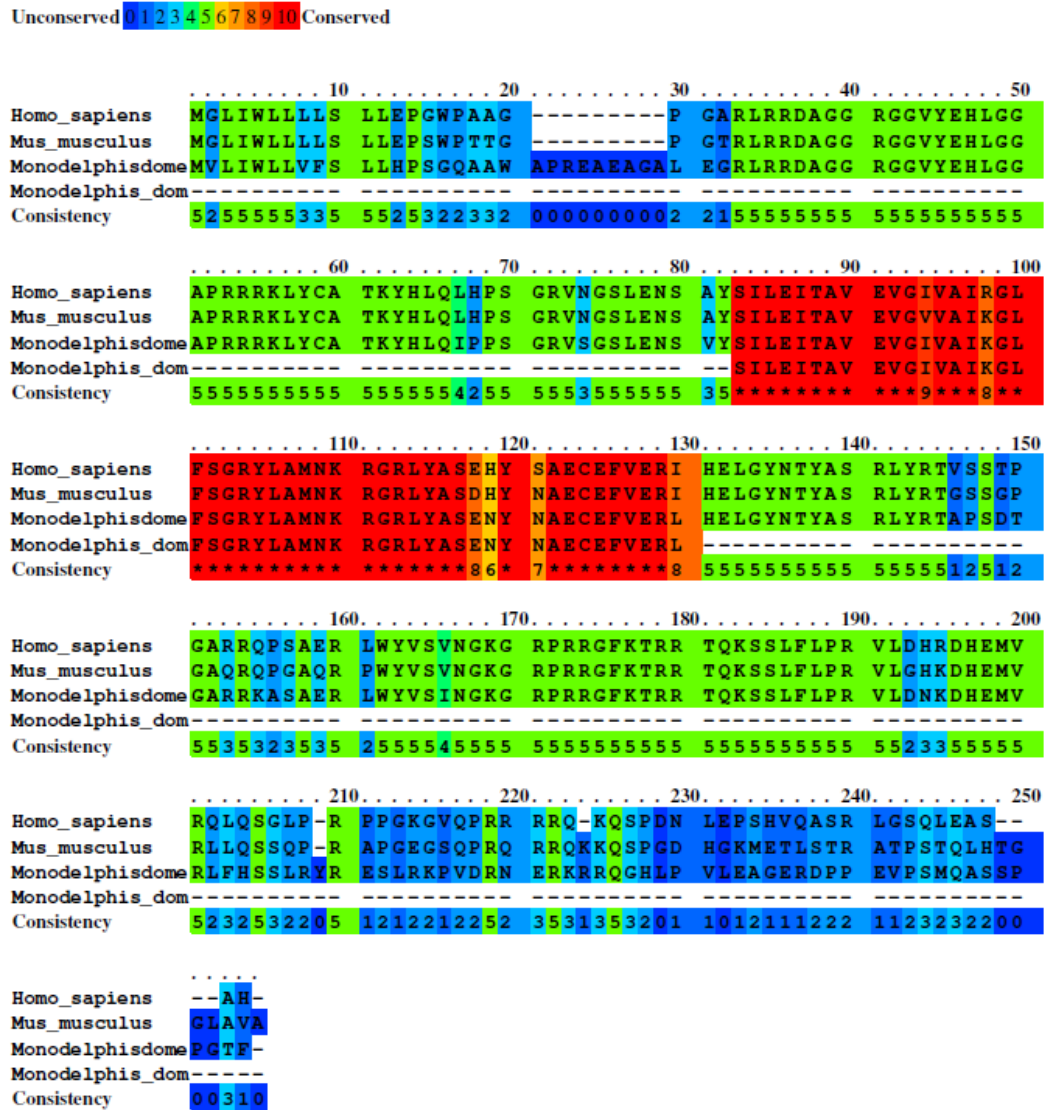


FIGURA 11. Alinhamento das seqüências de aminoácidos disponíveis para FGF3 para espécies diferentes: *Homo sapiens* (gi_122748_sp_P1), *Mus musculus* (gi_110816469_sp) e *Monodelphis domestica* (o marsupial catita ou cúica-do-rabo-curto; gi_126333763_re – seqüência predita – e gi_312861895_gb – seqüência parcial). O consenso entre essas seqüências está mostrado em “Consistency”. O nível de conservação entre os aminoácidos está representado em uma escala que atribui valores e cores: de azul (0) para menos conservados a vermelho (10) para mais conservados. (*) Atribuição de valor igual a10 para o consenso. PRALINE está disponível em <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>.

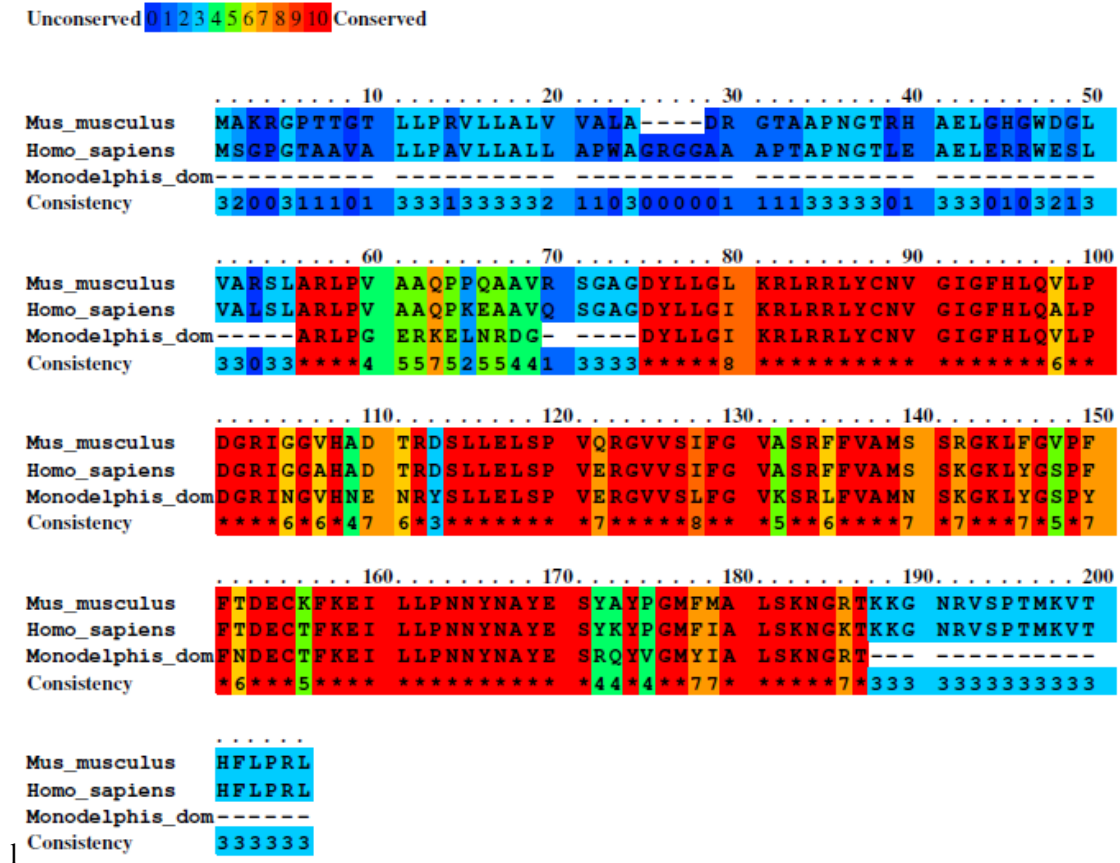


FIGURA 12. Alinhamento das seqüências de aminoácidos disponíveis para FGF4 para espécies diferentes: *Mus musculus* (gi_408360101_sp), *Homo sapiens* (gi_122750_sp_P0), e *Monodelphis domestica* (o marsupial catita ou cuíca-do-rabo-curto; gi_312861903_gb – seqüência predita). O consenso entre essas seqüências está mostrado em “Consistency”. O nível de conservação entre os aminoácidos está representado em uma escala que atribui valores e cores: de azul (0) para menos conservados a vermelho (10) para mais conservados. (*) Atribuição de valor igual a10 para o consenso. PRALINE está disponível em <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>.

As lâminas contendo as secções de *D. albiventris* foram desparafinizadas em xilol em dois banhos de 60 min e 15 min, respectivamente, à temperatura ambiente (TA). Após desparafinização, os cortes foram hidratados em uma série de banhos com concentração decrescente de etanol (duas vezes em 100%, uma em 95% e uma em 80%), por 5 min cada, seguidos por cinco banhos rápidos em água deionizada. Subseqüentemente, foi realizada a neutralização da peroxidase endógena por meio de dois banhos de peróxido de hidrogênio a 10%, por 15 min cada, seguidos por cinco banhos rápidos em água deionizada e três banhos de 5 min cada em Tris-HCl 20 mM (pH 7,40). Posteriormente, realizou-se a incubação em solução de BSA 2% e Tween 20 0,1% por 30 min, em câmara úmida escura à TA, a fim de bloquear possíveis li-

gações inespecíficas. Os anticorpos primários para FGF2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-79), FGF3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-33963) e FGF4 (Santa Cruz Biotechnology, sc-1361) foram diluídos em Tris-HCl nas proporções 1:400, 1:50 e 1:50, respectivamente, e pipetados sobre todos os cortes, exceto sobre os controles negativos, os quais foram embebidos apenas em Tris-HCl. A incubação ocorreu por 18 h, em câmara úmida escura, a 4 °C. Após a incubação, os cortes foram lavados em três banhos de 5 min cada de Tris-HCl 20 mM (pH 7,40) e incubados por 30 min, à TA, com anticorpo secundário biotinizado (LSAB+System-HRP, Dako, Glostrup, Denmark, K0690). Subsequentemente, os cortes foram lavados em três banhos de 5 min cada com Tris-HCl 20 mM (pH 7,40) e incubados por 30 min em câmara úmida escura, à TA, com estreptavidina-biotina conjugado à peroxidase (LSAB+System-HRP, Dako, Glostrup, Denmark, K0690). Por fim, as seções foram lavadas em três banhos de Tris-HCl 20 mM (pH7,40), por 5 min cada, e submetidos à revelação pela adição do Kit DAB cromógeno líquido (1 mL de *buffer*:1mL de cromógeno, Dako, K3468) até que se visualizasse a reação. O bloqueio da revelação foi realizado pela imersão das lâminas em Tris-HCl por cerca de 1 min, seguindo-se cinco banhos rápidos em água deionizada. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris, por 15 s, seguida por lavagem dos cortes em 10 banhos rápidos de água deionizada. As secções histológicas foram desidratadas em uma série de banhos com concentração crescente em etanol. Em sequência, foi realizada a diafanização das seções histológicas por dois banhos em xilol, com 10 min cada. Por fim, foi efetuada a montagem das lâminas com o uso de Entellan (Merck) e secagem das mesmas por um período *overnight*, em estufa a 37 °C.

4.5- Clonagem e sequenciamento de FGF3 e FGF4 de *D. albiventris*

Após a decapitação, duas amostras de neonatos em P2 foram colocadas em um cadinho de porcelana e maceradas com auxílio de um pistilo e nitrogênio líquido. Posteriormente, foram homogeneizadas em TRIzol Reagent® (Invitrogen), na proporção de 1 mL de TRIzol para cada 100 mg de tecido. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de tecido macerado em TRIzol, a fim de separar o RNA total dos restos celulares, e o tubo foi incubado à TA por 3 min. Após centrifugação a 10000 x g, a 4 °C por 15 min, a fase aquosa superior foi transferida para tubo limpo, devidamente identificado. O RNA total foi então precipitado pela adição de 0,5 mL de álcool isopropílico e, após um período de incubação de 10 min à TA, o material foi novamente centrifugado a 10000 x g a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de álcool etílico 75% (diluído em água DEPC),

seguinte-se centrifugação a 10000 x g a 4 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi seco em bloco aquecedor por 5 min e ressuscitado em 20 µL de água DEPC. Após a ressuspensão, o material foi incubado em bloco aquecedor por 10 min a 55 °C. A pureza e a concentração do RNA total foram avaliadas por meio de dosagem espectrofotométrica em *NanoDrop® ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer* e eletroforese em gel de agarose 1 %.

Cerca de 1 µg de RNA total foi convertido em cDNA a partir da cauda poli(A) presente nos RNAm, seguindo instruções dos fabricantes do *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas). À esta quantidade de RNA total foi adicionado 0,5 µM de oligo (dT18) e imediatamente incubados a 65 °C por 5 min para desnaturação, seguida por incubação em gelo por 5 min. A esse tubo, adicionou-se 5X Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl), dNTPs (10 mM) e a enzima RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl), totalizando um volume final de 20 µL. A síntese ocorreu por incubação a 42 °C por 60 min. A reação foi interrompida pela incubação do tubo a 70 °C por 5 min.

Oligonucleotídeos foram desenhados para permitir a amplificação de fragmentos de FGF3 e FGF4 de *D. albiventris* (**Tabela 3**). FGF2 já havia sido clonado e sequenciado pelo grupo anteriormente (Torres *et al.*, 2007, dados não publicados) e por isso foi excluído da análise molecular do presente trabalho. Estes iniciadores foram obtidos com base nas sequências já descritas para *Monodelphis domestica* (espécie mais próxima de *Didelphis* com o genoma sequenciado), disponíveis no *GenBank* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando o *software* Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

A eficiência na síntese do cDNA foi avaliada por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos para β-actina.

Tabela 3. Oligonucleotídeos desenhados para amplificar FGF3 e FGF4 de *D. albiventris*.

Gene	Acesso no <i>GenBank</i> ou <i>Ensembl</i>	Ta (°C)	<i>Amplicon</i> (pb)	Sequência do oligo
FGF3	ENSMODT00000005172 ENSMODT00000044398	55	583 ^[1]	F-5'ATGGTCCTGATCTGGCTCCT3'
			635 ^[2]	R1-5'TATTATCCAGGACTCGGGGC3'
			707 ^[3]	R2-5'CCTCCCGGCAGCGCCAGCC3'
				R3-5'CTGGTGCTGTGTGTTGGCTC3'
FGF4	GI 312861902	50	314	F-5'AACAGGGACGGGGACTATCT3' R-5'ACATACTGCCGGGACTCGTA3'

β -actina	GI 612037354	55	421	F-5'CCCTGAAGTACCCCATTTGAA3' R-5'CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA3'
-----------------	--------------	----	-----	---

Ta: temperatura de anelamento dos *primers*. Sequências depositadas no *GenBank* (NCBI) são identificadas por GI e as do Ensembl, por ENS. 1: *Amplicon* obtido com utilização dos *primers* F e R1. 2: *Amplicon* obtido com utilização dos *primers* F e R2. 3: *Amplicon* obtido com utilização dos *primers* F e R3.

A PCR foi realizada na presença de 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 4 mM de MgCl₂ e 0,05 U/ μ L de *Taq*DNA Polymerase (PCR Master Mix 2X, Thermo Scientific). Em termociclador, a reação passou por desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55° C por 30 s, e extensão a 72 °C por 1 min; a extensão final foi realizada a 72 °C por 5 min. O produto amplificado foi confirmado em eletroforese em gel de agarose 1%.

A RT-PCR foi realizada para amplificar cerca de 50 ng de cDNA na presença de 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 4 mM de MgCl₂ e 0,05 U/ μ L de *Taq*DNA Polymerase (PCR Master Mix 2X, Thermo Scientific). Em termociclador, a reação passou por desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 50° C (para FGF4) ou 55 °C (para FGF3) por 30 s, e extensão a 72 °C por 1 min; a extensão final foi realizada a 72 °C por 5 min. O produto amplificado foi confirmado em eletroforese em gel de agarose 1%.

Uma amostra do fragmento amplificado foi imediatamente utilizada em uma reação de ligação em *pGEM-T Easy Vector System I Kit* (Promega), em volume final de 10 μ L, pela adição de 3 U de enzima T4 DNA ligase, 50 ng de vetor pGEM[®]-T Easy, 5 μ L de tampão de ligação 2x (2X Rapid Ligation Buffer. 60 mM Tris HCl pH 7,8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% polyethylene glycol), e o produto da PCR na proporção equimolar de 3:1. Essa reação foi incubada por 2 h à temperatura ambiente.

Após este período de incubação, cerca de 2 μ L da reação de ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes (*E. coli*, TOP10), por choque térmico (90 s a 42 °C seguido por 2 min em gelo). As bactérias transformadas foram cultivadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) contendo ampicilina (100 μ g/mL) para obtenção de colônias bacterianas transformadas. As colônias positivas (clones) foram inoculadas em LB com antibiótico por 16 h a

37 °C. O DNA plasmidial foi purificado com *GeneJet Plasmid Miniprep Kit*, por método baseado na lise alcalina (Fermentas).

O sucesso da clonagem foi confirmado por digestão com *EcoRI*, processo que remove o inserto clonado dentro do vetor. Clones positivos foram sequenciados em ABI 3700 (Applied Biosystems) a partir dos iniciadores T7 e SP6, para a determinar a sequência de *FGF3* e *FGF4* de *D. albiventris* (ainda inédita nos bancos de dados); e também para determinar a orientação da clonagem, para permitir a síntese da sonda de RNA antisenso. As sequências obtidas foram comparadas em nível nucleotídico e proteico às sequências depositadas no banco de dados *GenBank* do NCBI, utilizando-se os algoritmos BLAST (Altschul *et al.*, 1997), disponíveis em <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Os *softwares* BioEdit versão 7.1.3.0 e MultAlin, disponível em <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>, foram usados para alinhar as sequências nucleotídica e proteica obtidas.

4.6- Síntese da sonda de RNA antisenso e hibridização *in situ*

Os fragmentos clonados foram utilizados como molde na síntese de sondas de RNA antisenso. Para isso, cerca de 100 ng de DNA plasmidial contendo os fragmentos clonados foram amplificados por PCR, contendo 0,2 mM de cada iniciador universal M13 e 1 mM de dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP e dTTP). Água *nuclease-free* foi utilizada para que o volume total fosse de 50 µL. Em termociclador, a reação passou por 1 ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 1 min; 5 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg, anelamento a 65 °C por 15 seg, e extensão a 72 °C por 2 min; seguiram-se 25 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg, anelamento a 50 °C por 15 seg, e extensão a 72 °C por 4 min; a extensão final foi realizada a 72 °C por 6 min. O produto amplificado foi confirmado em eletroforese em gel de agarose 1%. Essa estratégia de obter o fragmento de interesse por PCR assegura que o sítio de ligação para a RNA polimerase específica para a obtenção do antisenso esteja próxima ao produto da PCR. Depois de confirmar a amplificação em agarose 1%, o produto da PCR foi purificado em colunas *Quiaquick PCR Purification Kit* (Quiagen), seguindo protocolo descrito pelos fabricantes, e estocadas em freezer -20 °C.

Cerca de 1 µg de produto amplificado e purificado foi utilizado como molde na síntese da sonda de RNA antisenso, na presença de 3 U de SP6 RNA polimerase; 10 µL tampão de transcrição, 2,5 mM DTT; 2 µL dioxigenina (DIG-UTP, Roche); 40 U de *RNase inhibitor* em um volume final de reação de 40 µL. A transcrição *in vitro* foi confirmada em gel de agarose

1% e o DNA molde foi removido da reação por tratamento com 5 U de DNaseI por 15 min a 37 °C, e a sonda purificada em colunas *ProbeQuant G-50 Micro Columns* (Amersham), segundo instruções do fabricante. Após purificação, as sondas foram imediatamente misturadas ao tampão de hibridização (50 % formamida, 5x SSC pH 4,5, 2 % SDS, 2 % Boehringer's blocking reagent, 250 µg/mL tRNA, 100 µg/mL Heparin) e estocadas a -20 °C. Para obtenção de uma sonda senso, usada como controle negativo, fez-se uso da polimerase T7, juntamente como os demais procedimentos supracitados.

Após desparafinização, hidratação em séries de álcool e lavagem em PBS, as seções de neonatos de gambá foram pré-tratadas com Proteinase K (10 µg/mL, Sigma Aldrich), a fim de aumentar a acessibilidade aos ácidos nucléicos. Tanto para imunohistoquímica quanto para HIS, foram utilizadas seções de tronco, com o objetivo de avaliar a expressão do FGF4 em outros tecidos, a fim de servir de controle positivo, uma vez que foi a primeira vez que essas técnicas foram utilizadas para FGF4 em uma nova espécie-modelo. Ou seja, a presença de FGF4 em outros tecidos, que não os dentários, puderam validar e atestar a fidedignidade dos resultados. Seguiu-se a incubação em glicina 0,2% e a lavagem em PBS. As seções foram pós-fixadas com paraformaldeído 4% (PFA 4%) e novamente lavadas em PBS. A pré-hibridização foi realizada com tampão de hibridização [formamida 50%, 5x SSC pH 4,5, 1% SDS, 500 µg/mL tRNA (125 mg/mL), 200 µg/mL (25 mg/mL), 50 µg/mL heparina (10 mg/mL)] em banho-maria, a 55 °C, por 1 h. Ainda em banho-maria e a 55 °C ocorreram a incubação com sonda, em período *overnight*. No dia seguinte, os cortes foram lavados em SSC 1x pH 4,5, seguida de Solução X (formamida 50%, SSC 2x, SDS 1%, H₂O_{DEPC}), ainda a 55 °C, seguida de lavagens em PBT (PBS com Tween 20) e em MABT (ácido maleico 0,2 M, NaCl 0,3 M, NaOH 0,4 M, H₂O_{DEPC}) a TA. O corte foi incubado por 1 h com BBR (Boehringer Blocking Reagent)/MABT 2% e por 2 h, à temperatura ambiente, com BBR/MABT 2% acrescido de anticorpo anti-DIG-AP (Roche), na diluição de 1:2000. Para a detecção, foram realizados banhos em MABT, NTMT (NaCl 5 M, Tris pH 9,5, MgCl₂ 2 M, Tween 20, Levamisole 1 M, H₂O_{DEPC}), NTMT (NaCl 5 M, Tris pH 9,5, MgCl₂ 2 M, Tween 20, Levamisole 1 M, H₂O_{DEPC}) acrescido de NBT (*nitro blue tetrazolium*)/Bcip (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (2,5 µL/mL). A interrupção da revelação foi realizada com banhos de NTMT, PBS e PFA 4%. As lâminas foram montadas em glicerol 80% em PBS.

4.7- Microscopia e Documentação

A análise das lâminas resultantes dos métodos histológico, imunohistoquímico e de hibridização *in situ* e a captura digital das imagens foram realizadas no fotomicroscópio BX-41 Olympus, acoplado ao sistema de captura Q-Color 3/Olympus.

Para a análise de morfologia macroscópica, os neonatos foram fotografados em estereomicroscópio Leica EZ4 HD, utilizando o *software* LAS EZ versão 3.0.0.

5- RESULTADOS

5.1- Análise da morfologia macroscópica dos neonatos em diferentes idades

Segundo Cutts *et al.* (1978), a medida de comprimento SR (rosto/inserção da cauda) é um método seguro para estimar a idade de gambás jovens, porque há um aumento uniforme no comprimento corporal do neonato na bolsa durante as primeiras 10 semanas de vida pós-natal, independente do sexo e do tamanho ou número de ninhadas (Oliveira *et al.*, 1998). Os neonatos de idades conhecidas de 0, 2, 5, 8, 10 e 14 dias coletados foram pesados, medidos e, ainda vivos, fotografados em estereomicroscópio (**Figuras 13 a 15, Tabela 4**). Neonatos de 4 dias foram coletados, mas não foi possível fotografá-los em estereomicroscópio nem fazer medições.

A análise da morfologia dos neonatos permite a observação de membros anteriores bem desenvolvidos, em detrimento dos posteriores. O detalhe do membro anterior de um neonato de 0 dia permite a observação de garras (**Figura 14**), utilizadas para que o animal escale e alcance o marsúpio após deixar o útero materno.

Os dados de peso e comprimento dos neonatos do presente estudo corroboram com os achados de Fonseca (1996; ver Quadro 1). As maiores discrepâncias, ainda que pequenas, ocorrerem para P0 e P2 possivelmente devido ao número amostral. Como nem todas as amostras foram pesadas e medidas, o número amostral da tabela não corresponde ao número realmente utilizado nos experimentos.

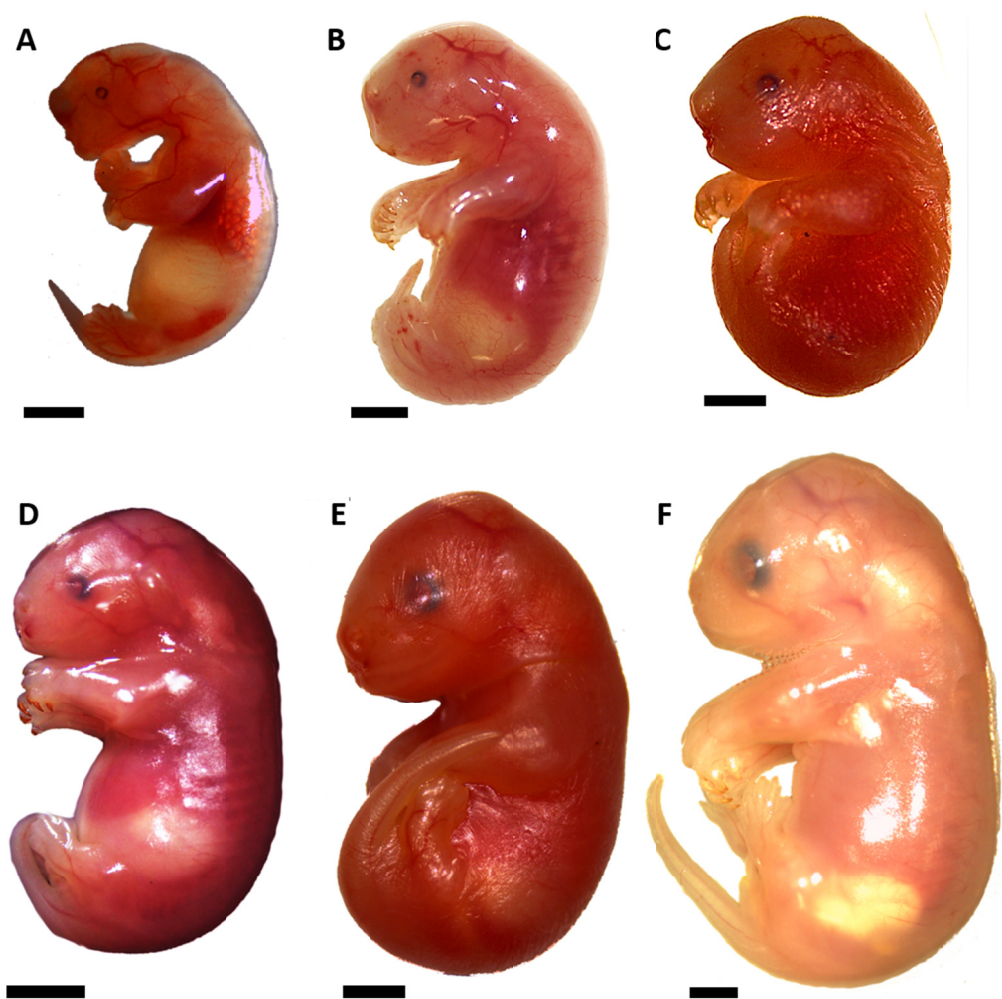


FIGURA 13. Fotografias ao estereomicroscópio, mostrando, comparativamente, diferentes idades pós-natais do gambá *D. albiventris*: 0 dia (A), 2 dias (B), 5 dias (C), 8 dias (D), 10 dias (E) e 14 dias (F). Barra: 2 mm.

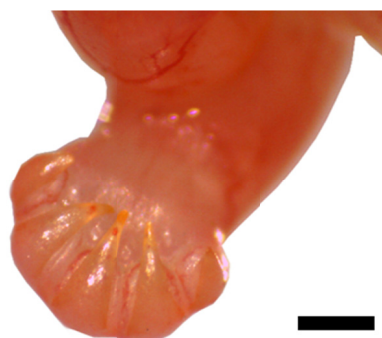


FIGURA 14. Fotografia ao estereomicroscópio, mostrando um dos membros anteriores de neonato de 0 dia de gambá *D. albiventris*, evidenciando a presença de garras. Barra: 0,5 mm.

Tabela 4. Valores médios de pesos e medidas do comprimento crista-occipital/inserção da cauda (CR) e do comprimento rostro/inserção da cauda (SR) para amostras de *D. albiventris* das idades pós-natais 0, 2, 5, 8, 10 e 14 dias.

Idade (dias)	Número de amostras	Peso (g)	CR (mm)	SR (mm)
0	3	0,122	11	14,667
2	8	0,195	10,875	16,375
5	3	0,387	15,667	20,333
8	7	0,620	17,571	22,857
10	8	0,701	17,000	26,000
14	7	1,118	21,000	35,429

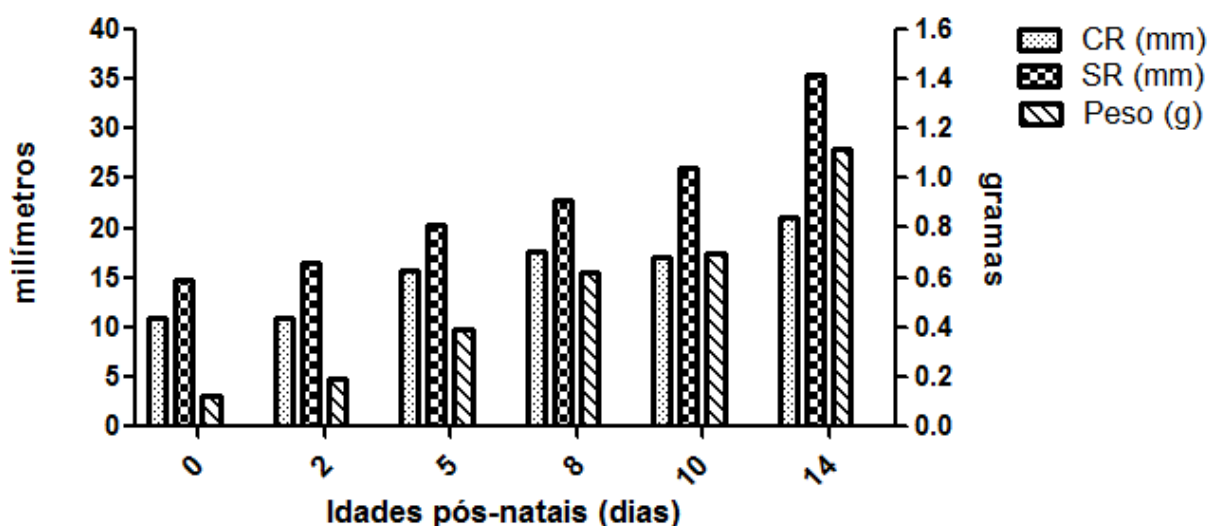


FIGURA 15. Valores médios de pesos e medidas do comprimento crista-occipital/inserção da cauda (CR) e do comprimento rostro/inserção da cauda (SR) para amostras de *D. albiventris* em P0, P2, P5, P8, P10 e P14. Os comprimentos CR e SR, em milímetros, podem ser observados no eixo vertical à esquerda, e o peso, em gramas, no da direita.

5.2- Caracterização histológica

As imagens obtidas, pela fotodocumentação à microscopia de luz, de lâminas histológicas coradas em HE permitiram identificar as estruturas típicas de um germe dentário, tais como epitélio do germe, epitélios interno e externo do germe, retículo estrelado, condensação

do ectomesênquima adjacente ao germe dentário/papila dentária, folículo dentário, estrato intermediário e nó do esmalte, nas fases de lâmina dentária, botão, capuz e campânula (**Figura 16**).

Os germes molares dos gambás *D. albiventris* em P0 foram encontrados na fase de lâmina dentária. Foi possível observar a proliferação do epitélio oral em direção ao ectomesênquima (composto pelo mesênquima e células derivadas da crista neural), com a visualização do limite da membrana basal (**Figura 16A e B**).

Em P2 (**Figura 16C e D**) e P4 (**Figura 16E e F**), os germes dos dentes molares do gambá foram encontrados na fase inicial e final de botão, respectivamente. Nesta fase, há o desenvolvimento do epitélio no ectomesênquima e ocorre uma condensação de células ectomesenquimais – células derivadas da crista neural – em torno do botão.

O estágio inicial e final de capuz foi observado nos neonatos de gambá entre P5 (**Figura 16G e H**) e P8 (**Figura 16I e J**); respectivamente. Em P5, os elementos formativos do dente (como o órgão dentário, a papila dentária e o folículo dentário) foram todos evidentes, e o nó do esmalte estava completamente formado. Nesse estágio, a histogênese epitelial torna-se mais complexa, diferenciando-se em epitélio externo e interno do dente, retículo estrelado e nó do esmalte.

Molares no estágio inicial de campânula foram encontrados em P10 (**Figura 16K e L**) e em meados do estágio de campânula em P14 (**Figura 16M e N**), respectivamente, com todos os elementos que já estavam presentes em P5 e P8. Em P10 e P14 foi possível notar, adicionalmente, a presença de uma lâmina dentária secundária vestigial (**Figura 16K e M**, representada pelo algarismo 7), a qual sofrerá degeneração na fase final de campânula. Foi possível observar que o retículo estrelado aumentou seu volume emitindo prolongamentos mais distantes (**Figura 16M e N**). As células do epitélio externo do órgão do esmalte foram observadas como cúbicas, enquanto as do epitélio interno, como cilíndricas baixas. Foi possível observar ainda poucas camadas de células pavimentosas que constituem o estrato intermediário (entre o epitélio interno e o retículo estrelado). Na papila dentária, células externas em contato com a membrana basal assumem uma forma colunar, enquanto as células centrais tomam uma aparência indiferenciada e ficam cercadas por numerosos vasos sanguíneos.

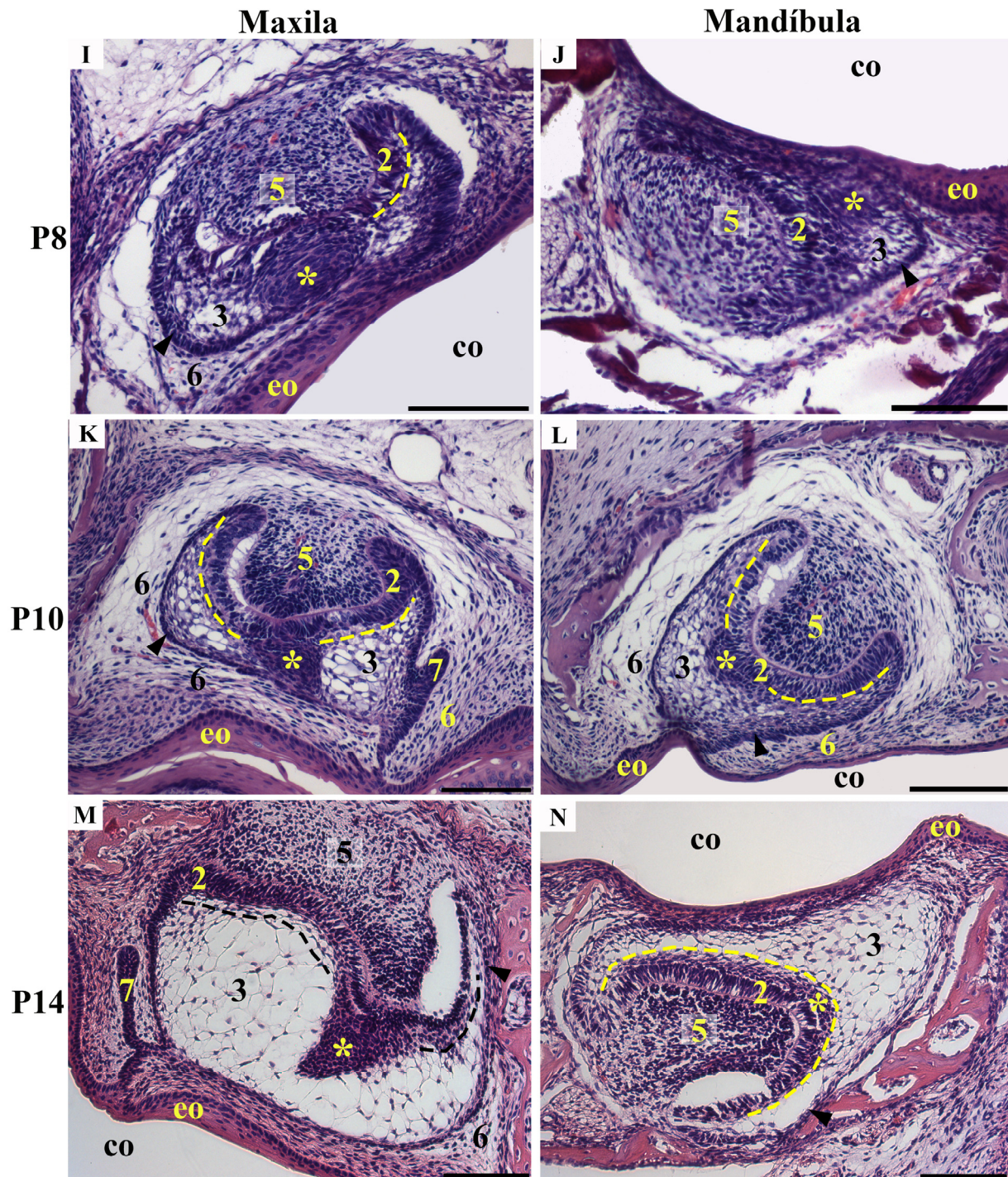


FIGURA 16. Fotomicrografias de amostras de neonatos de gambá coradas em HE. Germes dentários em maxilas (à esquerda) e mandíbulas (à direita) de neonatos de gambás encontram-se nas fases de lâmina dentária em P0 (A e B), início de botão em P2 (C e D), final de botão em P4 (E e F), início de capuz em P5 (G e H), final de capuz em P8 (I e J), início de campânula em P10 (K e L) e meados de campânula P14 (M e N). eo = epitélio oral; co = cavidade oral; li = língua; cabeça de seta = epitélio dentário externo; * = nó do esmalte; 1 = epitélio dentário; 2 = epitélio dentário interno; 3 = retículo estrelado; 4 = proliferação do ectomesênquima; 5 = papila dentária; 6 = folículo dentário; 7 = lâmina

dentária secundária vestigial; linha pontilhada: estrato intermediário; seta: membrana basal. Barras: 50 μm (A-B) e 100 μm (D-J).

5.3- Imunohistoquímica

O método imunohistoquímico foi utilizado para caracterizar o local e o momento de expressão de FGF2 (**Figura 17**), FGF3 (**Figura 18**) e FGF4 (**Figura 19**) durante os estágios do desenvolvimento dos germes de molares do gambá *D. albiventris*, tanto da maxila quanto da mandíbula.

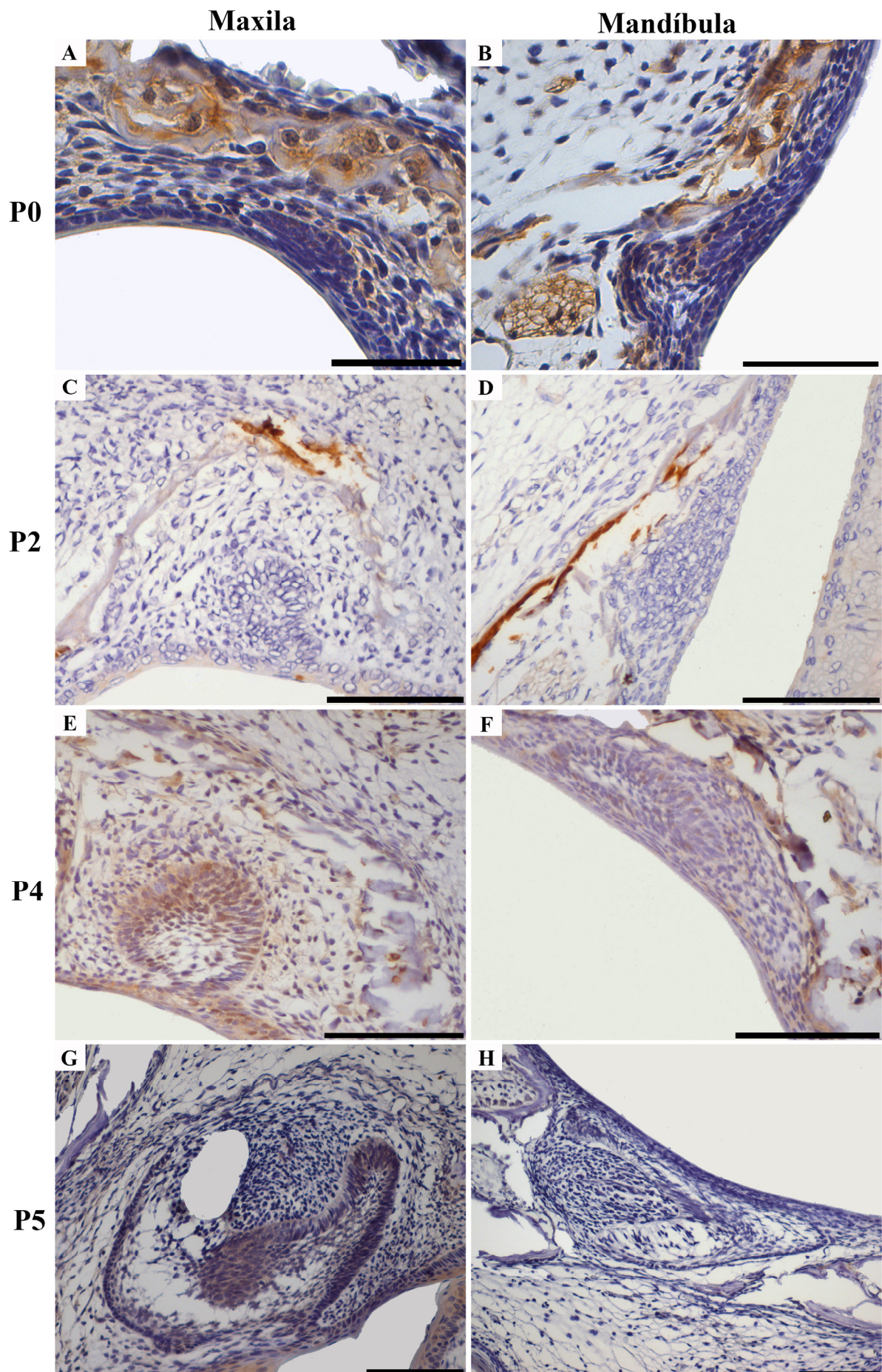
5.3.1- FGF2

Em P0, foi observada marcação no epitélio oral e na condensação do ectomesênquima, tanto na maxila (**Figura 17A**) quanto na mandíbula (**Figura 17B**). Em P2, não ocorreu marcação no germe dentário (**Figura 17C e D**). Em P4, na maxila (**Figura 17E**), foi observada marcação no epitélio dentário, epitélio oral, condensação do ectomesênquima e folículo dentário. Já na mandíbula (**Figura 17F**), a marcação é presente, fracamente, no epitélio dentário, condensação do ectomesênquima, folículo dentário e no epitélio oral. Em P5, a maxila (**Figura 17G**) apresenta-se positivamente marcada no nó do esmalte, retículo estrelado, folículo dentário, epitélios interno e externo do germe, estrato intermediário e epitélio oral, enquanto nenhuma marcação foi detectada na mandíbula (**Figura 17H**). Em P8 (**Figura 17I e J**), no final do estágio de capuz, encontram-se marcados os epitélios interno e externo, o folículo dentário, a papila dentária e o epitélio oral. Na maxila, ainda, o FGF2 foi imunolocalizado no nó do esmalte e estrato intermediário. No início da fase de campânula, em P10 (**Figura 17K e L**), há marcação positiva em todos os elementos do germe dentário: nó do esmalte, papila dentária, folículo dentário, epitélio interno e externo, lâmina dentária secundária, retículo estrelado e estrato intermediário, além do epitélio oral. Em meados da fase de campânula, em P14 (**Figura 17M e N**), observou-se marcação no retículo estrelado, folículo dentário, nó do esmalte, epitélios dentários interno e externo, lâmina dentária secundária, estrato intermediário e epitélio oral. Na mandíbula, adicionalmente, há marcação na papila dentária. Esses resultados estão resumidos na **Tabela 5**.

Tabela 5. Imunolocalização de FGF2 em várias estruturas dentárias nos sete estágios odontogênicos estudados: lâmina dentária, botão inicial, botão final, capuz inicial, capuz tardio, campânula inicial e meados de campânula.

	Lâmina dentária	Botão inicial	Botão tardio	Capuz inicial	Capuz tardio	Campânula inicial	Campânula meados
Epitélio oral	+		+	+	+	+	+
Condensação do ectomesênquima	+		+				
Epitélio dentário			+				
Folículo dentário			+	+	+	+	+
Papila dentária					+	+	+
Retículo estrelado				+		+	+
Nó do esmalte				+	+	+	+
Epitélio dentário interno				+	+	+	+
Epitélio dentário externo				+	+	+	+
Lâmina dentária secundária						+	+
Estrato intermediário				+	+	+	+

(+) Imunomarcção positiva para FGF2.



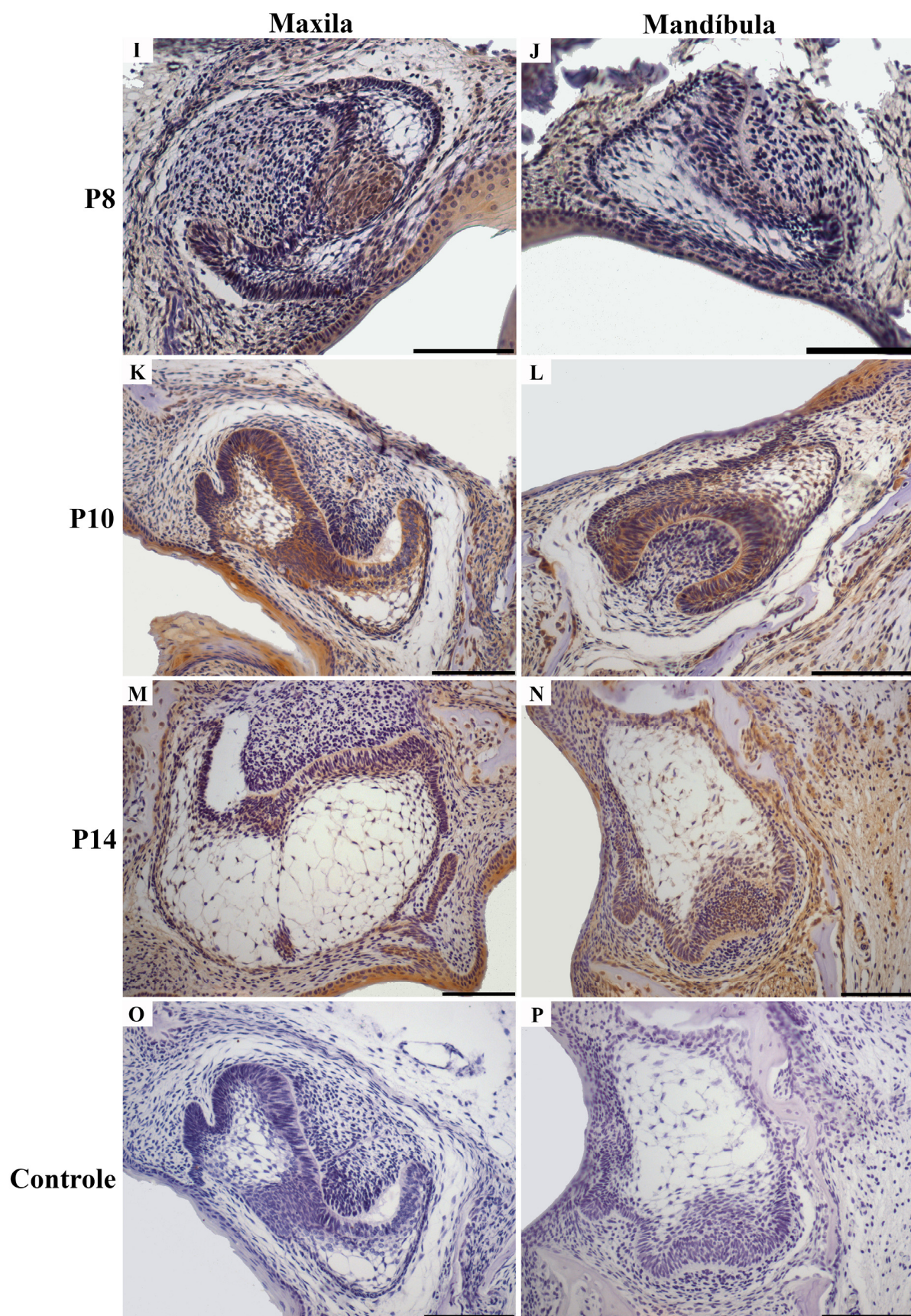


FIGURA 17. Imunolocalização de FGF2 em germes dentários de neonatos de gambá. Os germes dentários encontram-se nas fases de lâmina dentária em P0 (A e B), início de botão em P2 (C e D), final de botão em P4 (E e F), início de capuz em P5 (G e H), final de capuz em P8 (I e J), início de campânula em P10 (K e L) e meados de campânula P14 (M e N). (O e P) Controles negativos. Imagens obtidas ao microscópio óptico. Barras: 50 μm (A-B) e 100 μm (C-P).

5.3.2- FGF3

Em P0 (**Figura 18A e B**), FGF3 foi detectado no epitélio oral, no epitélio dentário e na condensação do ectomesênquima. As mesmas estruturas foram positivas nos germes de neonatos em P2 (**Figura 18C e D**). Em P4 (**Figura 18E e F**), FGF3 não foi detectado em níveis significativos, resultado confirmado em triplicatas biológicas. Em P5 (**Figura 18G e H**), FGF3 pode ser novamente detectado no epitélio oral, nó do esmalte, folículo dentário, epitélio dentário interno e externo, e retículo estrelado, além de uma fraca marcação na papila dentária nos germes da maxila. Em P8, todos os elementos dos germes dentários encontraram-se positivamente marcados (**Figura 18I e J**): nó do esmalte, papila dentária, folículo dentário, epitélio dentário interno e externo, retículo estrelado e estrato intermediário, além do epitélio oral. Em P10, FGF3 foi detectado em todos os elementos dos germes dentários (**Figura 18K e L**). Em P14, na maxila (**Figura 18M**), FGF3 foi detectado fracamente em todas as estruturas dentárias, enquanto na mandíbula (**Figura 18N**), no entanto, nenhum sinal para FGF3 pode ser detectado. Esses resultados estão resumidos na **Tabela 6**.

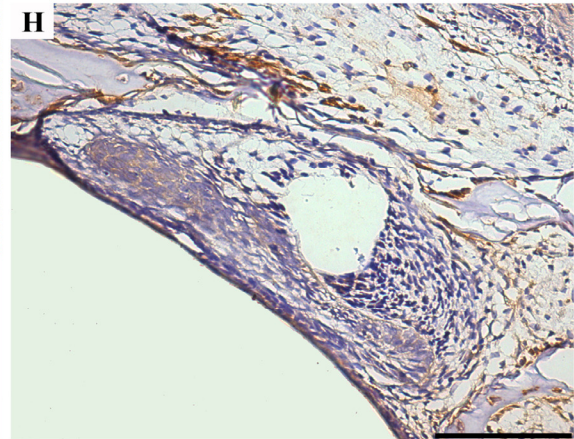
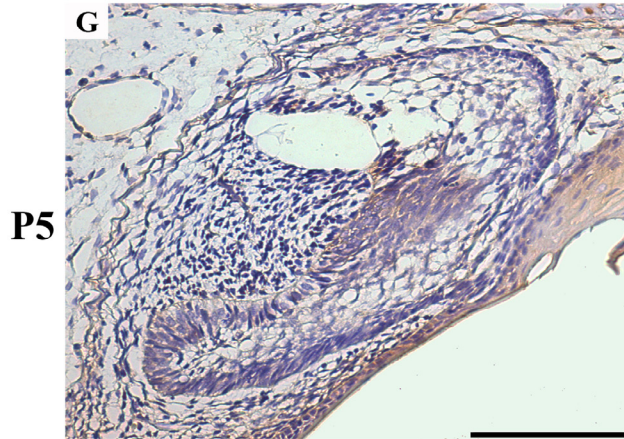
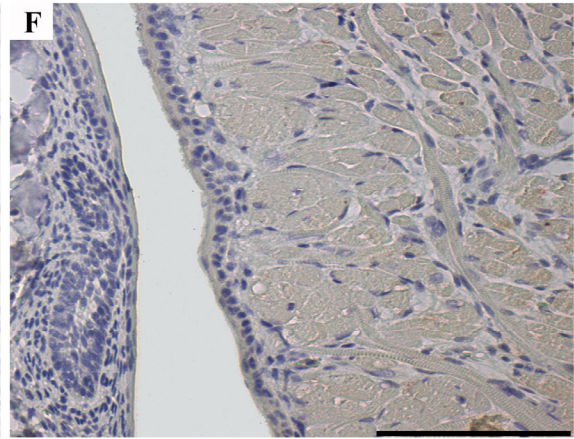
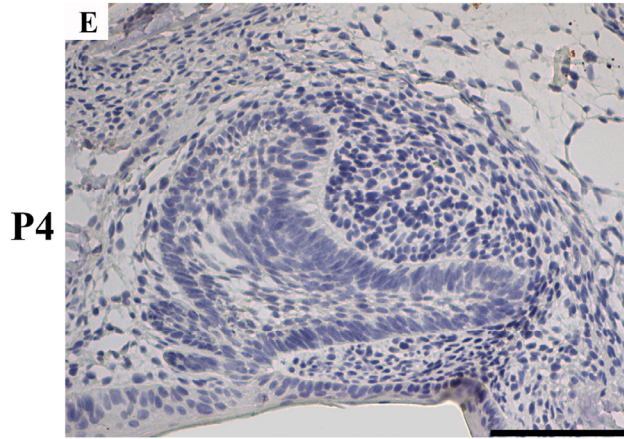
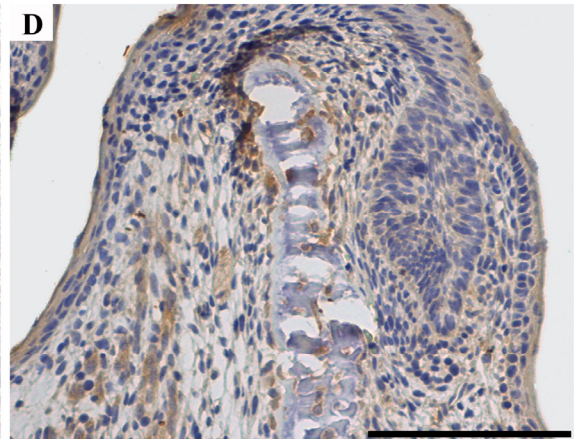
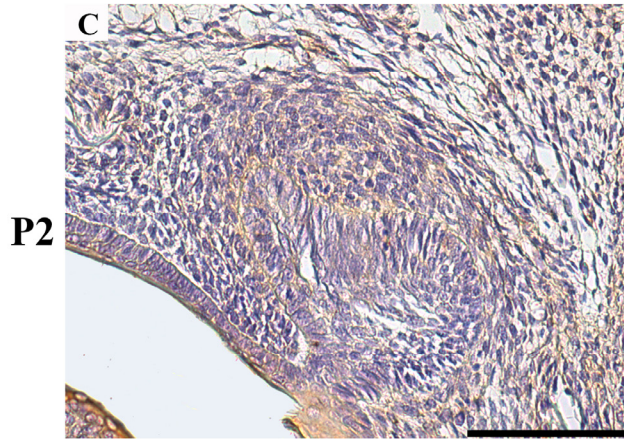
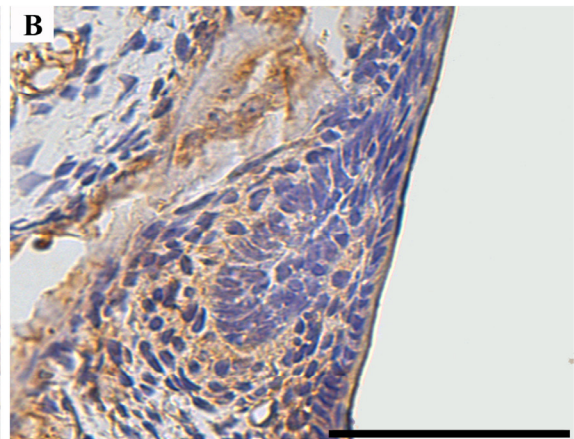
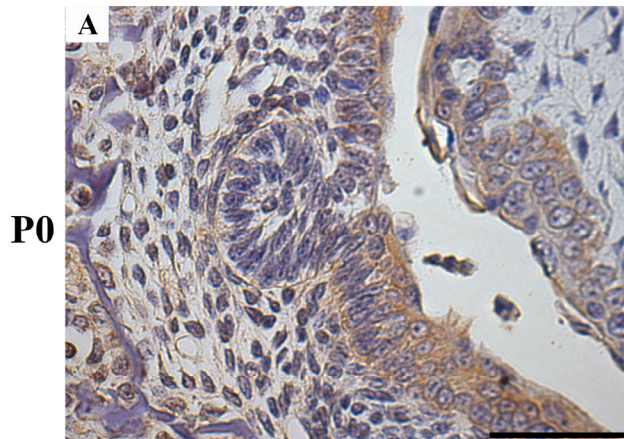
Tabela 6. Imunolocalização de FGF3 em várias estruturas dentárias nos sete estágios odontogênicos estudados: lâmina dentária, botão inicial, botão final, capuz inicial, capuz tardio, campânula inicial e meados de campânula.

	Lâmina dentária	Botão inicial	Botão tardio	Capuz inicial	Capuz tardio	Campânula inicial	Campânula meados
Epitélio oral	+	+		+		+	+
Condensação do ectomesênquima	+	+					
Epitélio dentário	+	+					
Folículo dentário				+	+	+	+
Papila dentária				+	+	+	+
Retículo estrelado				+	+	+	+
Nó do esmalte				+	+	+	+
Epitélio dentário interno				+	+	+	+
Epitélio dentário externo				+	+	+	+
Lâmina dentária secundária						+	+
Estrato intermediário					+	+	+

(+) Imunomarcção positiva para FGF3.

Maxila

Mandibula



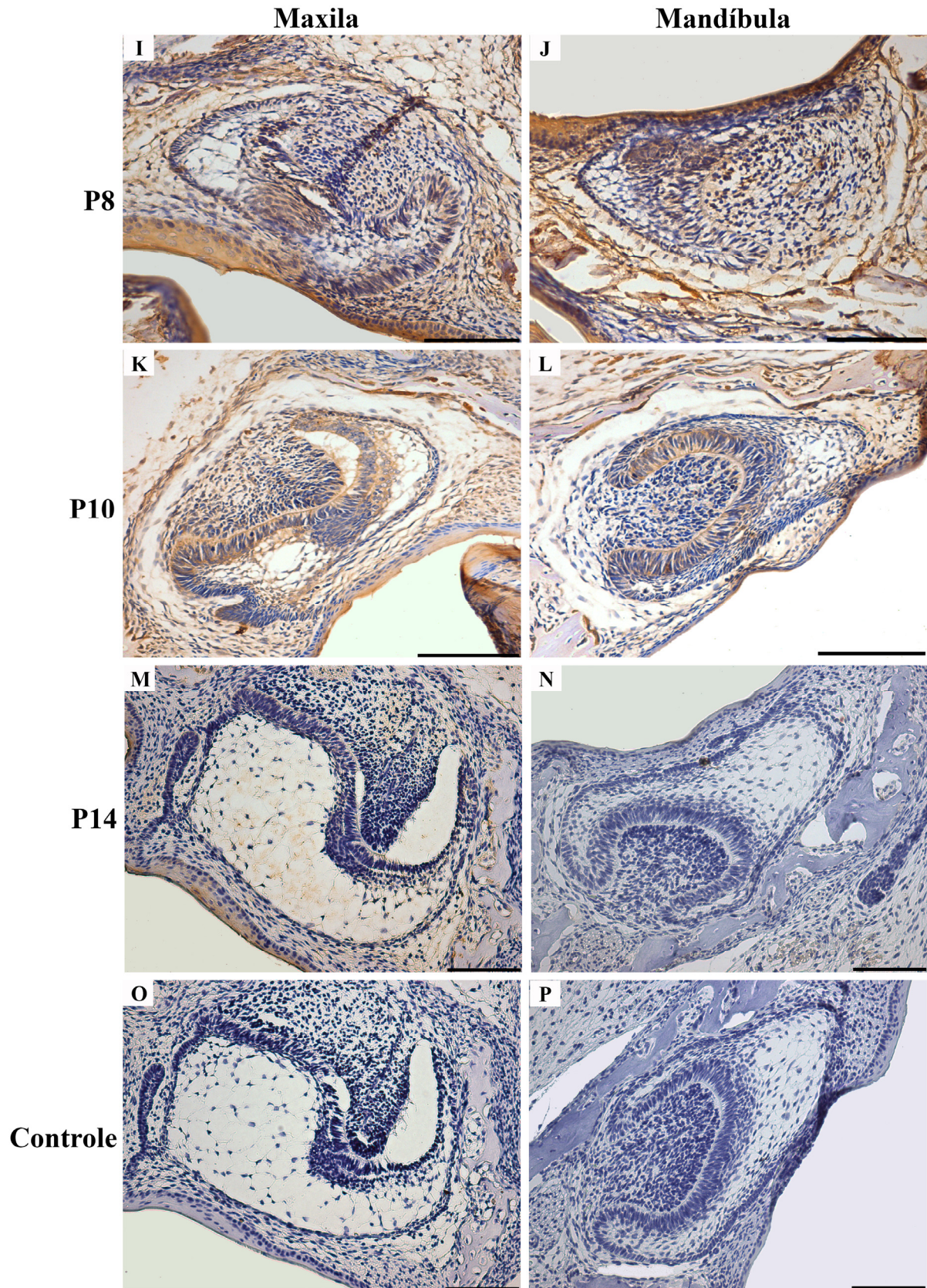


FIGURA 18. Imunolocalização de FGF3 em germes dentários de neonatos de gambá. Os germes dentários encontram-se nas fases de lâmina dentária em P0 (A e B), início de botão em P2 (C e D), final de botão em P4 (E e F), início de capuz em P5 (G e H), final de capuz em P8 (I e J), início de campâ-

nula em P10 (K e L) e meados de campânula P14 (M e N). (O e P) Controles negativos. Imagens obtidas ao microscópio óptico. Barras: 50 μm (A-B) e 100 μm (C-P).

5.3.4- FGF4

Em P0 (**Figura 19A e B**), foi observada marcação no epitélio oral, epitélio dentário e condensação do ectomesênquima. Em P2 (**Figura 19C e D**), foi observada marcação no epitélio oral e condensação do ectomesênquima, mas apenas na mandíbula o epitélio do germe também estava marcado. Em P4 (**Figura 19E e F**), foi observada marcação no epitélio oral, condensação do ectomesênquima e folículo dentário; porém, o epitélio do germe apresentou-se marcado apenas na mandíbula. Em P5, na maxila (**Figura 19G**), observa-se marcação no nó do esmalte, folículo dentário, retículo estrelado, epitélio dentário externo e epitélio oral. Já na mandíbula (**Figura 19H**), há pouca marcação no epitélio oral, retículo estrelado e em parte do folículo dentário. Em P8 (**Figura 19I e J**), FGF4 foi imunolocalizado no epitélio oral, epitélios dentários interno e externo, folículo dentário, retículo estrelado, papila dentária e nó do esmalte; embora na mandíbula não tenha ocorrido marcação no epitélio dentário externo. Em P10 (**Figura 19K e L**), o epitélio oral, o folículo dentário, o nó do esmalte e a papila dentária encontram-se positivamente marcados, apesar de apenas a maxila apresentar os epitélios dentários interno e externo, o retículo estrelado e o estrato intermediário também marcados. Em P14 (**Figura 19M e N**), observou-se marcação no epitélio oral, nó do esmalte, epitélios dentários interno e externo, folículo dentário, retículo estrelado, lâmina dentária secundária; adicionalmente, a papila dentária está marcada apenas na mandíbula e, na maxila, o estrato intermediário com fraca marcação. Esses resultados estão resumidos na **Tabela 7**.

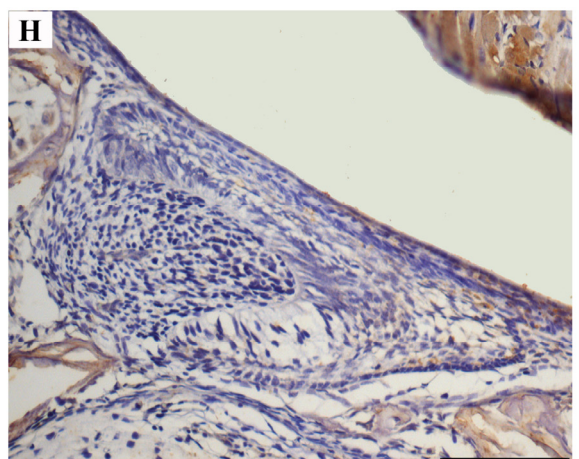
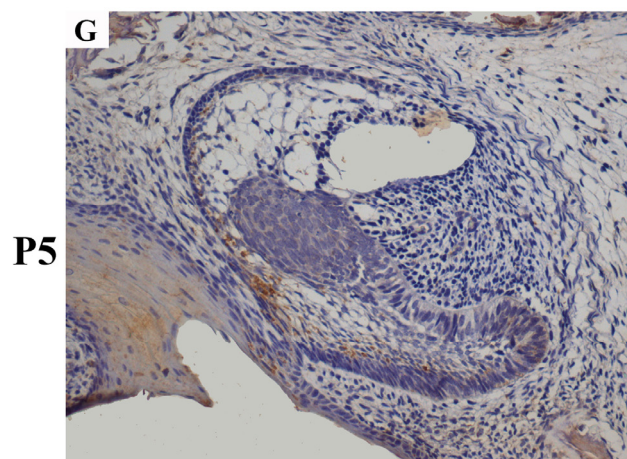
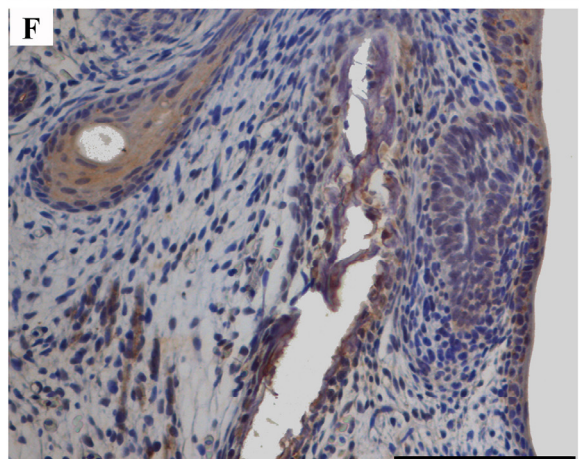
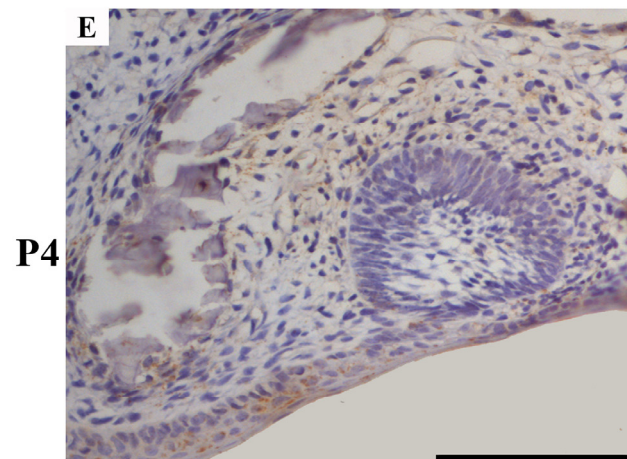
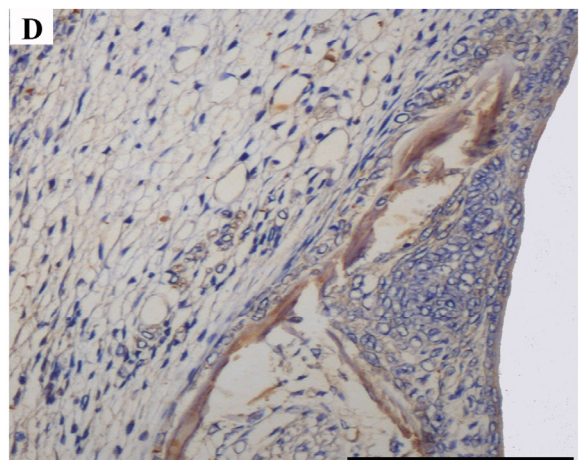
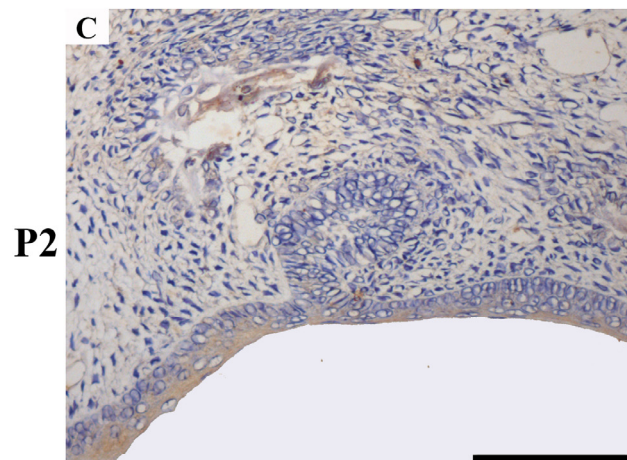
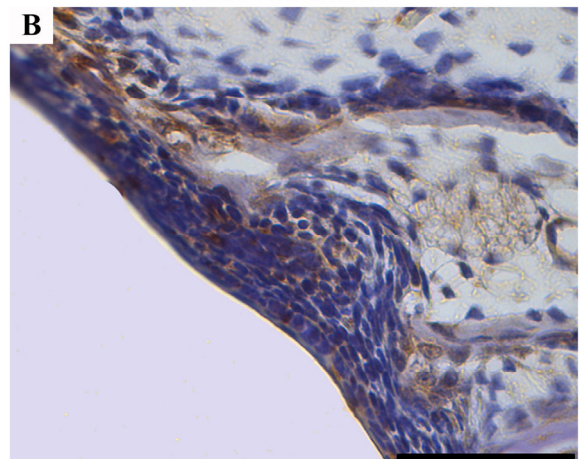
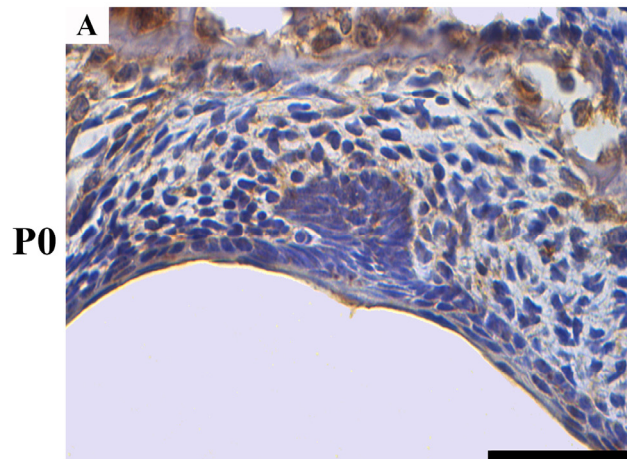
Tabela 7. Imunolocalização de FGF4 em várias estruturas dentárias nos sete estágios odontogênicos estudados: lâmina dentária, botão inicial, botão final, capuz inicial, capuz tardio, campânula inicial e meados de campânula.

	Lâmina dentária	Botão inicial	Botão tardio	Capuz inicial	Capuz tardio	Campânula inicial	Campânula meados
Epitélio oral	+	+	+	+	+	+	+
Condensação do ectomesênquima	+	+	+				
Epitélio dentário	+	+	+				
Folículo dentário			+	+	+	+	+
Papila dentária					+	+	+
Retículo estrelado			+	+	+	+	+
Nó do esmalte				+	+	+	+
Epitélio dentário interno					+	+	+
Epitélio dentário externo				+	+	+	+
Lâmina dentária secundária							+
Estrato intermediário						+	+

(+) Imunomarcção positiva para FGF4.

Maxila

Mandíbula



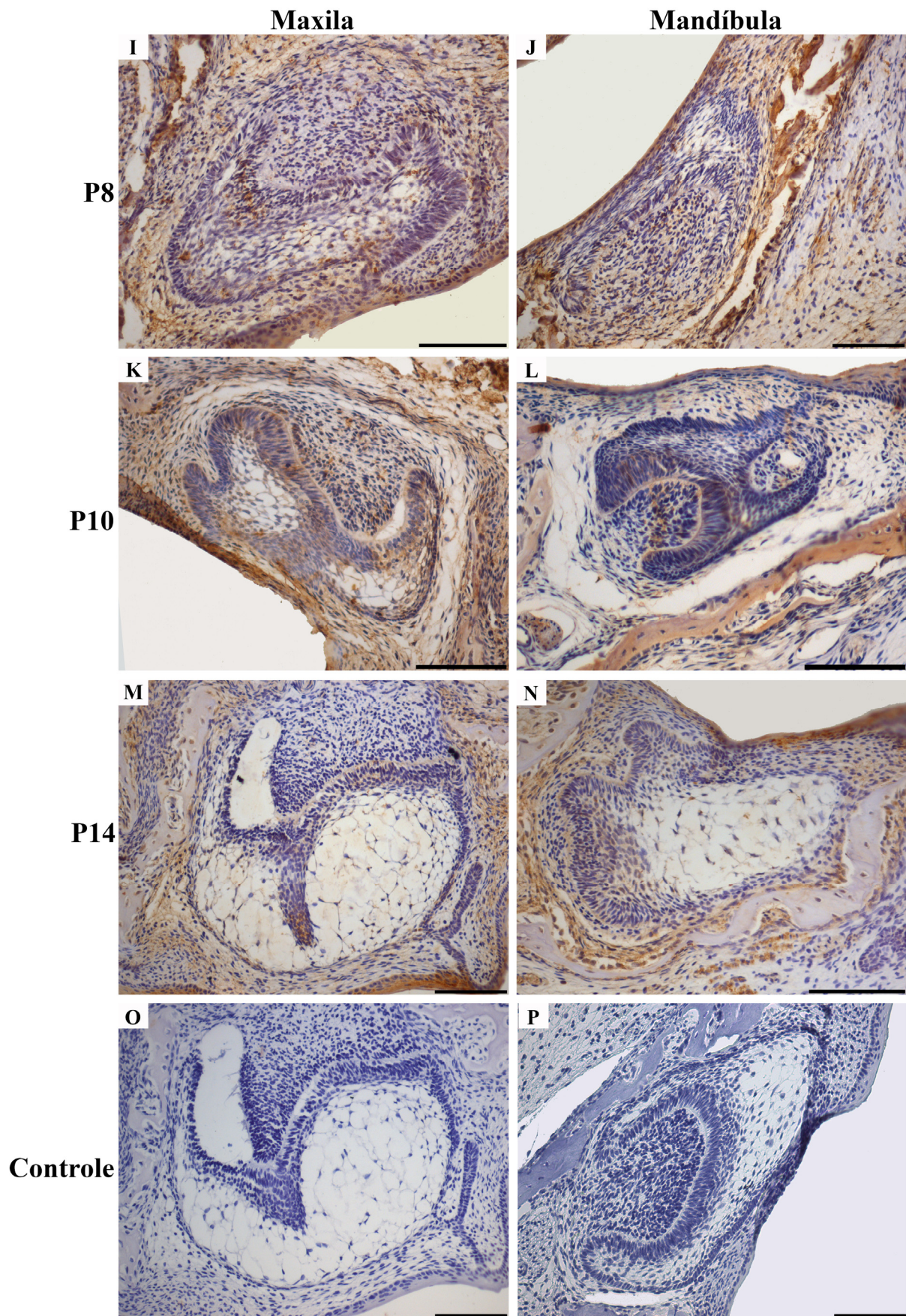


FIGURA 19. Imunolocalização de FGF4 em germes dentários de neonatos de gambá. Os germes dentários encontram-se nas fases de lâmina dentária em P0 (A e B), início de botão em P2 (C e D), final

de botão em P4 (E e F), início de capuz em P5 (G e H), final de capuz em P8 (I e J), início de campânula em P10 (K e L) e meados de campânula P14 (M e N). (O e P) Controles negativos. Imagens obtidas ao microscópio óptico. Barras: 50 μm (A-B) e 100 μm (C-P).

5.4- Clonagem e sequenciamento de FGF3 e FGF4 de *D. albiventris*

Mesmo com as tecnologias mais modernas de sequenciamento de próxima geração disponibilizadas nos últimos anos e com o aumento do interesse no uso como modelo animal, o gambá *D. albiventris* ainda não teve seu genoma (DNA) e/ou transcriptoma (RNAm) completamente sequenciado. A ausência da informação de sequência específica dessa espécie limita o uso deste animal como modelo, especialmente nos estudos que envolvem os mecanismos moleculares reguladores da odontogênese. Foi por esta razão que se decidiu clonar e sequenciar FGF3 e FGF4 expressos em *D. albiventris*. Mais uma vez, FGF2 não foi alvo dos métodos moleculares deste trabalho, porque já havia sido sequenciado anteriormente e sua sequência disponibilizada no *GenBank* (GI:119524025).

5.4.1- FGF3 e FGF4

Para o desenho dos oligonucleotídeos, as sequências de FGF3 e FGF4 de algumas espécies foram alinhadas para fins comparativos (**Figura 20**). A sequência de *Monodelphis domestica* foi escolhida por ser uma espécie mais próxima de *Didelphis albiventris* (Cardillo *et al.*, 2004).

5.4.2- Desenho dos pares de oligonucleotídeos

Como não há informação molecular espécie-específica, o desenho dos pares de oligonucleotídeos exige a tarefa preliminar de busca por sequências que possam ser utilizadas como molde nos bancos de dados (*GenBank* e *Ensembl*). A partir do alinhamento obtido com as sequências de FGF3 disponíveis para camundongo (*Mus musculus*), rato (*Rattus norvegicus*), galinha (*Gallus gallus*) e gambá (*Monodelphis domestica*) foi possível observar a dificuldade em se obter regiões consenso com no mínimo 20 pb, necessário para o desenho do oligo (**Figura 20**). A mesma dificuldade foi encontrada para FGF4, de interesse deste estudo (**Figura 21**). Como os alinhamentos não contribuíram para a identificação de regiões consenso para o desenho dos oligonucleotídeos, os mesmos foram então obtidos com base apenas na sequência disponível para a espécie mais próxima, *M. domestica*.

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
MusmusculusFGF4 GCAGGGGATATCCCGCCACCTGCTGCTCCCTATTGCTCTCCCTACTAGGCTGTGGCCAGCCTACCCGACTCAGCCGCGAGCTGACTCAGCAGCCGCGCGGGCCGGGATGGCGAAGCG
RattusnorvegicusFGF4 ATGGCGAGCG
GallusgallusFGF4
Monodelphisdomestica G6CCGGCTCCGGGGAGAGGAGG
Consensusatggcgaaacg

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
MusmusculusFGF4 CCGCCGACACAGGAGCCTGCTGCCAAGGCTGCTGCTCCCTGCTGCTGCTGGGACAGGAGGACCGCCGACCCAGCAGGACCGGACAGCAGGATGGGACAGGCTGGGAGCG
RattusnorvegicusFGF4 CCGCCGACACAGGAGCCTGCTGCCAAGGCTGCTGCTCCCTGCTGCTGCTGGGACAGGAGGACCGCCGACCCAGCAGGACCGGACAGCAGGATGGGACAGGCTGGGAGCG
GallusgallusFGF4 CCGCCGACACAGGAGCCTGCTGCCAAGGCTGCTGCTCCCTGCTGCTGCTGGGACAGGAGGACCGCCGACCCAGCAGGACCGGACAGCAGGATGGGACAGGCTGGGAGCG
Monodelphisdomestica AG
Consensus cggccgaccacagggagcgtgctgcccgggctcctgctgcccctggtggtgcccctggcgaccgaggggaccgcccaccacagggcagcggcagcgc...gaattggggcagggctgggagcgc...ctg

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
MusmusculusFGF4 GTGCCCCGCTCGTGGACGCTGCTGCCGTTGCTGCTGCTGCTGGGACAGGAGGACCGCCGACCCAGCAGGACCGGACAGCAGGATGGGACAGGCTGGGAGCG
RattusnorvegicusFGF4 GTGCCCCGCTCGTGGACGCTGCTGCCGTTGCTGCTGCTGCTGGGACAGGAGGACCGCCGACCCAGCAGGACCGGACAGCAGGATGGGACAGGCTGGGAGCG
GallusgallusFGF4 GTGCCCCGCTCGTGGACGCTGCTGCCGTTGCTGCTGCTGCTGGGACAGGAGGACCGCCGACCCAGCAGGACCGGACAGCAGGATGGGACAGGCTGGGAGCG
Monodelphisdomestica
Consensus gtgcccctcgtcgtggcagcctgcccggg.....agccccgacggcgcgc...cggcagcggcaggggagcgtgctggcctcraaaggctgctggcctctctacgacgctggcctcggat

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520
MusmusculusFGF4 TCACCTTCAGGCTCAGCCGACGCGCATCGTGGTGTGC-ACGAGCAGGAGGACGCTCTCTGGAGCTCTCCGGTGCAGCAGGCGTGGGAGCATCTCGGAGTGGCCAGCCGCTTCTTCG
RattusnorvegicusFGF4 TCACCTTCAGGCTCAGCCGACGCGCATCGTGGTGTGC-ACGAGCAGGAGGACGCTCTCTGGAGCTCTCCGGTGCAGCAGGCGTGGGAGCATCTCGGAGTGGCCAGCCGCTTCTTCG
GallusgallusFGF4 TCACCTTCAGGCTCAGCCGACGCGCATCGTGGTGTGC-ACGAGCAGGAGGACGCTCTCTGGAGCTCTCCGGTGCAGCAGGCGTGGGAGCATCTCGGAGTGGCCAGCCGCTTCTTCG
Monodelphisdomestica
Consensus TCACCTTCAGGCTCAGCCGACGCGCATCGTGGTGTGC-ACGAGCAGGAGGACGCTCTCTGGAGCTCTCCGGTGCAGCAGGCGTGGGAGCATCTCGGAGTGGCCAGCCGCTTCTTCG

521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650
MusmusculusFGF4 TGGCATGAGCAGCAGGCGGACGCTCTCGGTGTGCTTTCTTACGAGCAGGAGTAAATTCARAGAACTCTTCCGACACACTACACGCTACGATCTTACGCGTACCCGGTATGTCATGGC
RattusnorvegicusFGF4 TGGCATGAGCAGCAGGCGGACGCTCTCGGTGTGCTTTCTTACGAGCAGGAGTAAATTCARAGAACTCTTCCGACACACTACACGCTACGATCTTACGCGTACCCGGTATGTCATGGC
GallusgallusFGF4 TGGCATGAGCAGCAGGCGGACGCTCTCGGTGTGCTTTCTTACGAGCAGGAGTAAATTCARAGAACTCTTCCGACACACTACACGCTACGATCTTACGCGTACCCGGTATGTCATGGC
Monodelphisdomestica
Consensus TGGCATGAGCAGCAGGCGGACGCTCTCGGTGTGCTTTCTTACGAGCAGGAGTAAATTCARAGAACTCTTCCGACACACTACACGCTACGATCTTACGCGTACCCGGTATGTCATGGC

651 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780
MusmusculusFGF4 CCTCAGTARAGACGCGGACACAGGAGGCGGACGAGTGTGCGCTACCATGAGGATACCCGCTCTCTCTAGACTGTGACCTCCGGAGCCCTGCTCAGCTCGGAGCAGCAGCTACCCCTCAGG
RattusnorvegicusFGF4 CCTCAGTARAGACGCGGACACAGGAGGCGGACGAGTGTGCGCTACCATGAGGATACCCGCTCTCTCTAGACTGTGACCTCCGGAGCCCTGCTCAGCTCGGAGCAGCAGCTACCCCTCAGG
GallusgallusFGF4 CCTCAGTARAGACGCGGACACAGGAGGCGGACGAGTGTGCGCTACCATGAGGATACCCGCTCTCTCTAGACTGTGACCTCCGGAGCCCTGCTCAGCTCGGAGCAGCAGCTACCCCTCAGG
Monodelphisdomestica
Consensus CCTCAGTARAGACGCGGACACAGGAGGCGGACGAGTGTGCGCTACCATGAGGATACCCGCTCTCTCTAGACTGTGACCTCCGGAGCCCTGCTCAGCTCGGAGCAGCAGCTACCCCTCAGG

781 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910
MusmusculusFGF4 AGGAGCATTTCTCTGATGGAGATTTGTCARAAARACTGCTTAGATATTTAATATTTAATATGATATATGAGGCCAATATTTATATTTATGATTTCTCATTTCCGGGGGGGGGA
RattusnorvegicusFGF4
GallusgallusFGF4
Monodelphisdomestica
Consensus

911 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
MusmusculusFGF4 TATGACCAARAGACAAACAAATTCAGCTCAGACCTCTTGGAAAGCGGACGACTCTTCTTCCATCAAGATATGGGTGTGATGCTGTTCATGTGCTCTAARACTTGGTGCATCAGT
RattusnorvegicusFGF4
GallusgallusFGF4
Monodelphisdomestica
Consensus

1041 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
MusmusculusFGF4 TTCAGGGTGCCTGGCTGTACTGGAAGGCTGCTGGGACCTTGAGGACGAGGAGGACCTTGAGGCTTCCGATCGGAGCATCTGCGCTGCGCCCTCTGCTCTTGGTATGAGCC
RattusnorvegicusFGF4
GallusgallusFGF4
Monodelphisdomestica
Consensus

1171 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
MusmusculusFGF4 CTGTGCGATGGTTACTCCAGGGACAGAGTCTCCGCTCTGTTTTAGATCTCCAGAGCTGATCTTGACCTCTTGAGTCAATCATCTTGGACCTACCGGATAGGAGCCCTTAGACAC
RattusnorvegicusFGF4
GallusgallusFGF4
Monodelphisdomestica
Consensus

1301 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430
MusmusculusFGF4 TTTAARACTCTGTTGCCATTTTGGACTGGCCACAGGCGCTGTTGTTAGGACCTGGACTTGTCTTCTGGAGGAGACTAGGATGGACAGAGGGTGTGCTGCTGCCACACTCAAA
RattusnorvegicusFGF4
GallusgallusFGF4
Monodelphisdomestica
Consensus

1431 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
MusmusculusFGF4 CTCTGGGGATGAAATCTGTTTGTGATAGGATGATTTGTTGGATATACAAATGATTTTGCAGAACTCAACTGAGAAACAGGCTTCCCTGATATGGGAGCTTGTGCTGACACCTCATAT
RattusnorvegicusFGF4
GallusgallusFGF4
Monodelphisdomestica
Consensus

1561 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690
MusmusculusFGF4 TTAGGGTGAAGTGCCTTTCCACCCAGGCGCTTATGAGGAGGACTGAGGAGGCTCGAATTCGGTGTGCTGCCAGGTTGAGGAAATCTATCCCATCTACTCAGAGTCTTGAGCCCTGG
RattusnorvegicusFGF4
GallusgallusFGF4
Monodelphisdomestica
Consensus

1691 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
MusmusculusFGF4 TGACTAGCTGGAGGCTGCTGGGTGCATGCTGCTCTTCCACATGTGATCTGGACCTTGTACGCTTCCAGCTATCTTACCCATGATTTACTTTTGTAGAGGGTATCTGGTGA
RattusnorvegicusFGF4
GallusgallusFGF4
Monodelphisdomestica
Consensus

1821 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950
MusmusculusFGF4 TATGCAGCCAGCTGTGGAGTGCATATATGTCACCAAGTCAGTACCTTATATTTTCTTATATATTTACGATGTACCCCTGTCACTGAGACCAATGAGAGGAGGGTGGTGGCAT
RattusnorvegicusFGF4
GallusgallusFGF4
Monodelphisdomestica
Consensus

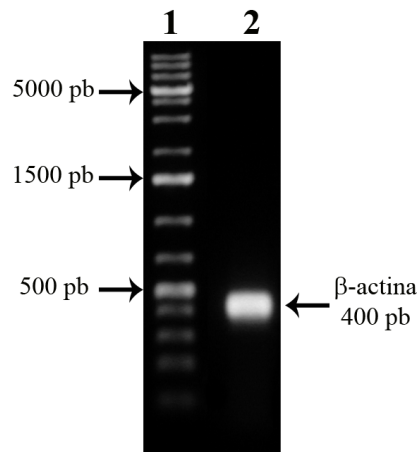


FIGURA 22. Resultado da RT-PCR para detectar a expressão de um gene constitutivo (β -actina) nas amostras de cDNA de *D. albiventris* em idade P2. Pode-se observar uma banda de cerca de 400 pb para a β -actina, coerente com o amplicon de 421 pb previsto. (1) Padrão 1kb; (2) β -actina.

5.4.4- RT-PCR para FGF3 e FGF4

Após confirmado o sucesso na síntese, a mesma amostra de cDNA foi utilizada em RT-PCR utilizando-se os pares de oligonucleotídeos desenhados para amplificar os transcritos de interesse (FGF3 e FGF4). FGF4 amplificou um fragmento no tamanho esperado (350 pb; **Figura 23**). Não foi possível, no entanto, amplificar fragmentos de FGF3, mesmo após alterar inúmeros parâmetros da PCR. Outros pares de oligos foram desenhados, mas nenhum permitiu a amplificação de qualquer fragmento, sugerindo que *D. albiventris* apresenta uma sequência de FGF3 bastante dissimilar em relação às sequências para esse transcrito disponíveis nos bancos de dados para *M. domestica*.

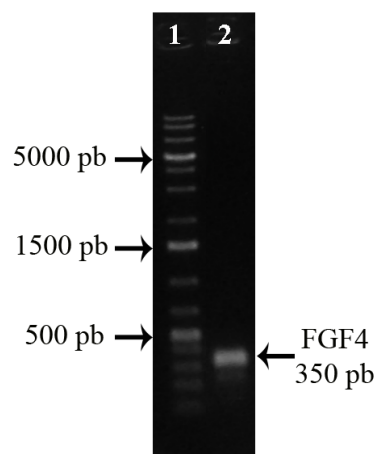


FIGURA 23. Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% confirmando resultado de RT-PCR para FGF4, evidenciando a presença de banda de cerca de 350 pb. (1) Padrão 1kb; (2) FGF4.

5.4.5- Clonagem dos insertos amplificados

Uma amostra do fragmento amplificado foi imediatamente utilizada em uma reação de ligação em *pGEM-T Easy Vector System I Kit* (Promega), que foi posteriormente utilizada para transformar bactérias quimiocompetentes *E. coli* (TOP10). Os DNA plasmidial foi purificado das bactérias utilizando-se o *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas). O sucesso das extrações do DNA plasmidial foi confirmado por eletroforese (**Figura 24A**). Após confirmação da extração, uma alíquota do DNA plasmidial foi utilizada em uma reação de digestão com a enzima *EcoRI*, que cliva o vetor exatamente nos pontos de inserção do fragmento clonado, liberando-o e permitindo, dessa forma, confirmar o sucesso da clonagem (**Figuras 24B**).

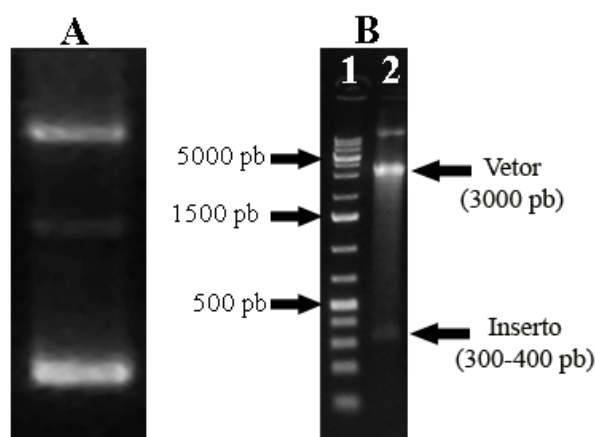


FIGURA 24. Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a extração de DNA plasmidial (A) e digestão por *EcoRI* para clonagem de FGF4 (B). (A) Resultado para a extração de DNA plasmidial. (B) Digestão do DNA plasmidial, liberando o inserto de FGF4 (2), com bandas de aproximadamente 300-400 pb (inserto) e 3000 pb (vetor); (1) padrão 1kb.

5.4.6- Sequenciamento de análise das sequências

Clones positivos foram sequenciados em ABI 3700 (Applied Biosystems) a partir dos iniciadores T7 e SP6, para a determinar as sequências de bases de *FGF4* de *D. albiventris*; e também para determinar a orientação da clonagem. As sequências obtidas foram então comparadas com as sequências depositadas no *GenBank*, utilizando-se o programa BLASTN e os *softwares* BioEdit versão 7.1.3.0 e MultAlin. Por estas análises, a clonagem de FGF4 de *D. albiventris* foi confirmada (**Figura 25**). A sequência obtida para *D. albiventris* revelou uma similaridade de 97% com a sequência de *M.domestica*. A duas sequências também foram

alinhas para permitir a identificação das bases correspondentes (**Figura 26**). Este resultado permitiu revelar mais uma sequência e RNAm para esta espécie, um novo modelo biológico.

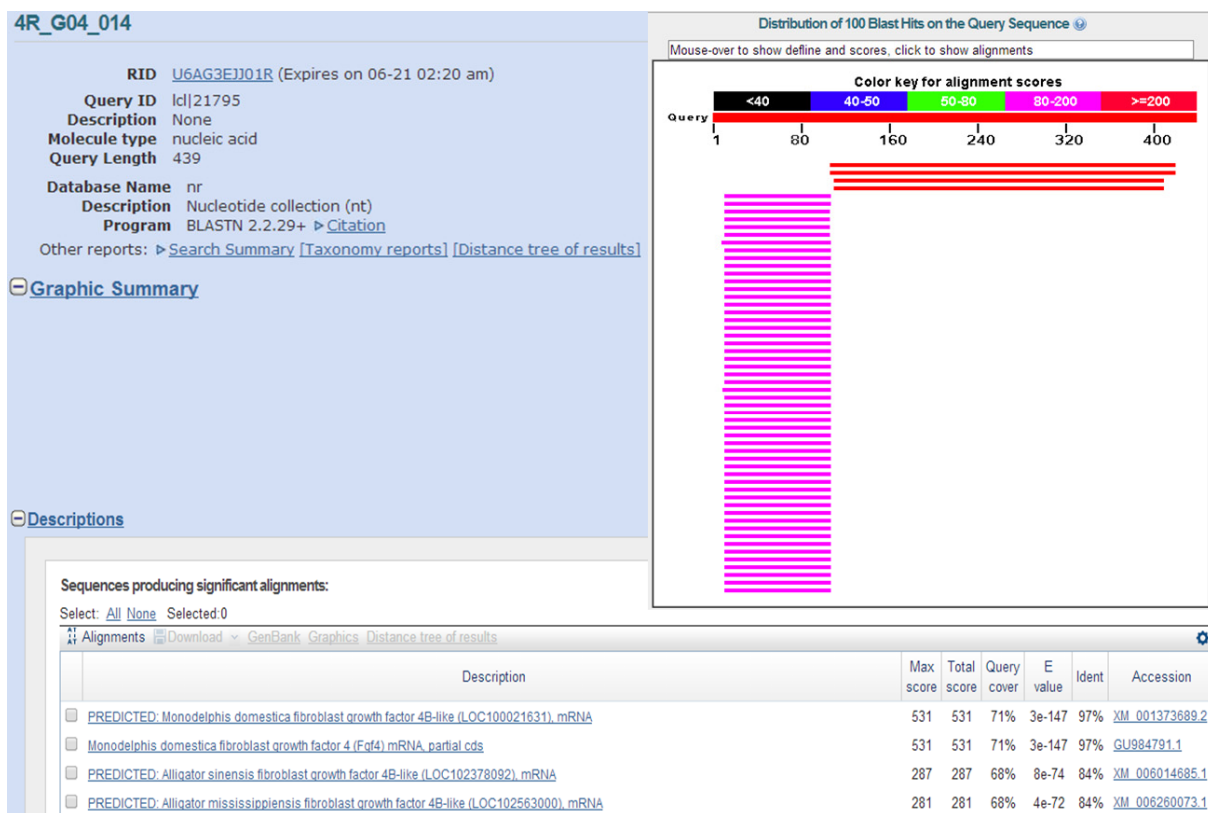


FIGURA 25. Análise nucleotídica para o resultado de sequenciamento de FGF4 contra o banco de dados do *GenBank*, do NCBI, utilizando algoritmos do BLAST. A maior similaridade de sequências encontrada é para FGF4 de *M. domestica*. Os dados revelam identidade de 97% e cobertura de 71% entre a sequência de *D. albiventris* e a de *M. domestica*.

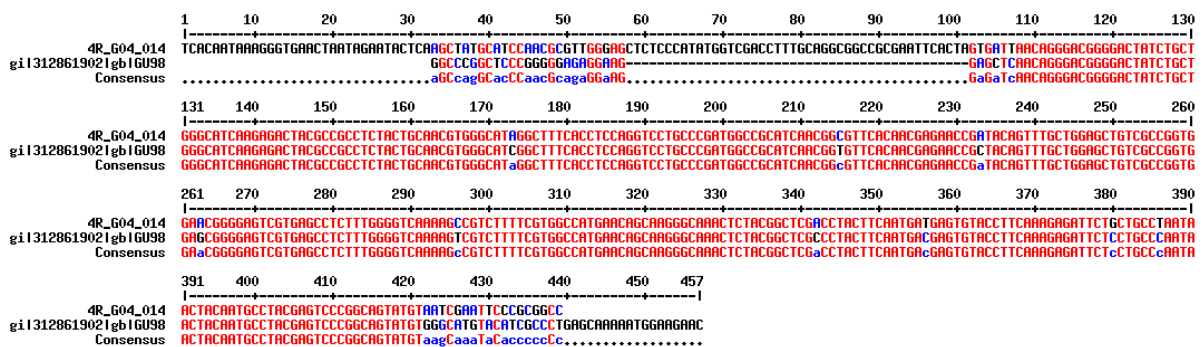


FIGURA 26. Alinhamento nucleotídico para o resultado de sequenciamento de FGF4 de *D. albiventris* e de *M. domestica*, utilizando o software online *MultAlin*. 4R_G04_014: resultado do sequenciamento para FGF4; gi|312861902|gb|GU98: sequência de RNAm de FGF4 de *M. domestica*, sob registro GI 312861902. Os dados revelam identidade de 97% e cobertura de 71% entre a sequência de *D. albiventris* e a de *M. domestica*.

5.5- Hibridização *in situ*

Hibridização *in situ* é um método que permite a análise da expressão gênica pela detecção do respectivo RNA mensageiro-alvo no tecido, pela hibridização deste com uma molécula de RNA antisenso marcada (conhecida como sonda). Este método foi utilizado para permitir a caracterização espaço-temporal da expressão de *FGF4* durante a odontogênese de *D. albiventris*, o único clone confirmado neste trabalho.

Para isso, uma sonda de RNA antisenso foi sintetizada *in vitro*, a fim de permitir a localização do RNAm (senso) no tecido-alvo – cortes histológicos seriados do crânio de neonatos de *D. albiventris*. A síntese *in vitro* de uma sonda antisenso é dependente da orientação da clonagem do fragmento de PCR no vetor utilizado – neste caso, o *pGEM-T Easy Vector* (Figura 27A). A orientação da clonagem foi determinada pelo resultado do sequenciamento do clone (Figura 28), observando-se a posição da sequência-alvo (de *D. albiventris*, identificada como “query” no resultado da análise do BLAST) com relação à sequência do banco de dados (“subject”). Dessa forma foi possível determinar que, no caso do clone obtido, sondas antisenso poderiam ser sintetizadas a partir do promotor SP6 para a RNA polimerase.

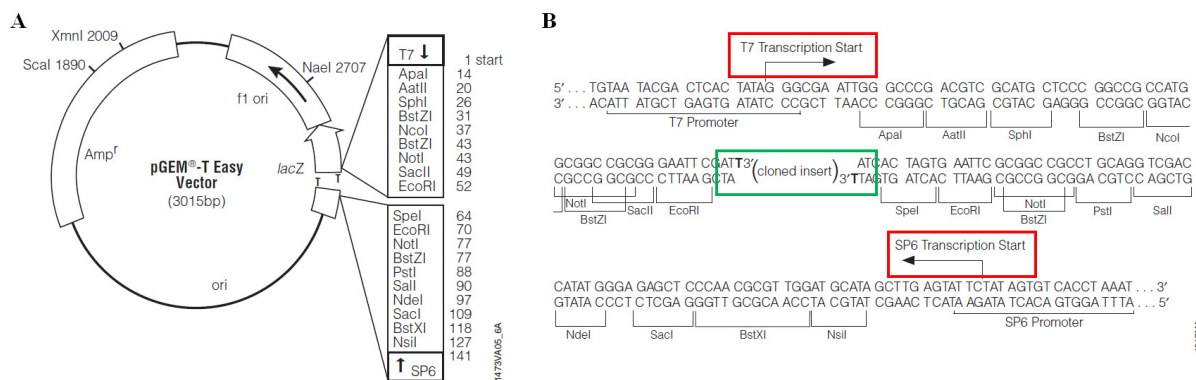


FIGURA 27. Orientação da clonagem do fragmento de PCR no vetor *pGEM-T Easy*. (A) Mapa e sequências de referência para o vetor. (B) Promotores T7 e SP6 e múltiplas sequências de clonagem do vetor, com a fita superior correspondendo ao RNA sintetizado pela T7 RNA polimerase (retângulo vermelho superior) e a inferior (retângulo vermelho superior), pela SP6 RNA polimerase. O vetor foi linearizado na base 60 com *EcoRV* e uma timina foi adicionada a ambas extremidades 3', mostrado na imagem como T em negrito. O inserto possui adenina em sua extremidade, adicionada pela *Taq* DNA Polymerase, possibilitando sua ligação ao sítio de inserção no vetor (retângulo verde).

PREDICTED: Monodelphis domestica fibroblast growth factor 4B-like (LOC100021631), mRNA
 Sequence ID: [reflXM_001373689.2](#) Length: 2746 Number of Matches: 1

Range 1: 256 to 569 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
531 bits(287)	3e-147	305/314(97%)	0/314(0%)	Plus/Plus
Query 108	AACAGGGACGGGGACTATCTGCTGGGCATCAAGAGACTACGCCGCCTCTACTGCAACGTTG			167
Sbjct 256	AACAGGGACGGGGACTATCTGCTGGGCATCAAGAGACTACGCCGCCTCTACTGCAACGTTG			315
Query 168	GGCATAGGCTTTACCTCCAGGTCCTGCCCGATGGCCGCATCAACGGCGTTTACAACGAG			227
Sbjct 316	GGCATCGGCTTTACCTCCAGGTCCTGCCCGATGGCCGCATCAACGGGTGTTACAACGAG			375
Query 228	AACCGATAAGTTTGTGGAGCTGTCGCCGGTGGAAACGGGGAGTCGTGAGCCTCTTTGGG			287
Sbjct 376	AACCGCTACAGTTTGTGGAGCTGTCGCCGGTGGAGCGGGGAGTCGTGAGCCTCTTTGGG			435
Query 288	GTCAAAAAGCCGTCCTTTTCGTGGCCATGAACAGCAAGGGCAAACCTCTACGGCTCGACCTAC			347
Sbjct 436	GTCAAAAAGTCGTCCTTTTCGTGGCCATGAACAGCAAGGGCAAACCTCTACGGCTCGCCCTAC			495
Query 348	TTCAATGATGAGTGTACCTTCAAAGAGATTCTGCTGCCTAATAACTACAATGCCTACGAG			407
Sbjct 496	TTCAATGACGAGTGTACCTTCAAAGAGATTCTCCTGCCAATAACTACAATGCCTACGAG			555
Query 408	TCCCGGCAGTAIGT			421
Sbjct 556	TCCCGGCAGTAIGT			569

Monodelphis domestica fibroblast growth factor 4 (Fgf4) mRNA, partial cds
 Sequence ID: [gb|GU984791.1](#) Length: 381 Number of Matches: 1

Range 1: 32 to 345 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
531 bits(287)	3e-147	305/314(97%)	0/314(0%)	Plus/Plus
Query 108	AACAGGGACGGGGACTATCTGCTGGGCATCAAGAGACTACGCCGCCTCTACTGCAACGTTG			167
Sbjct 32	AACAGGGACGGGGACTATCTGCTGGGCATCAAGAGACTACGCCGCCTCTACTGCAACGTTG			91
Query 168	GGCATAGGCTTTACCTCCAGGTCCTGCCCGATGGCCGCATCAACGGCGTTTACAACGAG			227
Sbjct 92	GGCATCGGCTTTACCTCCAGGTCCTGCCCGATGGCCGCATCAACGGGTGTTACAACGAG			151
Query 228	AACCGATAAGTTTGTGGAGCTGTCGCCGGTGGAAACGGGGAGTCGTGAGCCTCTTTGGG			287
Sbjct 152	AACCGCTACAGTTTGTGGAGCTGTCGCCGGTGGAGCGGGGAGTCGTGAGCCTCTTTGGG			211
Query 288	GTCAAAAAGCCGTCCTTTTCGTGGCCATGAACAGCAAGGGCAAACCTCTACGGCTCGACCTAC			347
Sbjct 212	GTCAAAAAGTCGTCCTTTTCGTGGCCATGAACAGCAAGGGCAAACCTCTACGGCTCGCCCTAC			271
Query 348	TTCAATGATGAGTGTACCTTCAAAGAGATTCTGCTGCCTAATAACTACAATGCCTACGAG			407
Sbjct 272	TTCAATGACGAGTGTACCTTCAAAGAGATTCTCCTGCCAATAACTACAATGCCTACGAG			331
Query 408	TCCCGGCAGTAIGT			421
Sbjct 332	TCCCGGCAGTAIGT			345

FIGURA 28. Resultado do BLASTN mostrando o *query* e o *subject* para o sequenciamento de FGF4 de *D. albiventris*. A posição da sequência-alvo de *D. albiventris* (*query*) é a mesma da sequência do banco de dados (*sbjct*), uma vez que *query* e *subject* se alinham no mesmo sentido, percebido pela numeração crescente da contagem de nucleotídeos. Por isso, foi possível determinar que sondas anti-senso poderiam ser sintetizadas a partir do promotor SP6 para a RNA polimerase.

Após confirmação da orientação da clonagem e definição da RNA polimerase capaz de gerar RNAs antisense, seguiu-se com a síntese das sondas. O DNA plasmidial foi utilizado como molde em uma PCR, utilizando-se o par de oligos universal M13, para gerar um fragmento linear, contendo nas extremidades os sítios promotores para as RNAs polimerases (T7 e SP6). O sucesso da amplificação foi confirmada por eletroforese (**Figura 29A**). Após confirmação, foi realizada a transcrição *in vitro* a partir do sítio promotor SP6 (**Figura 29B**). Uma sonda também foi sintetizada a partir do promotor T7, para produzir uma sonda senso para ser utilizada como controle da reação de hibridização (**Figura 29B**).

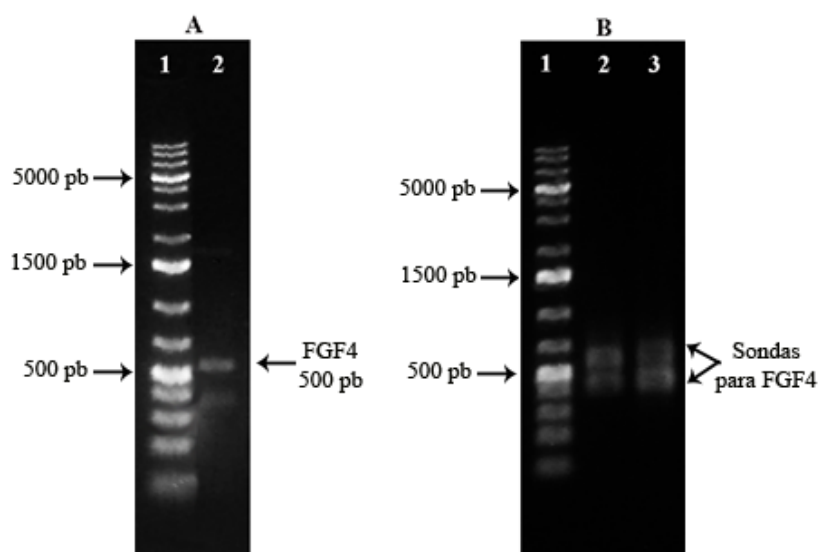
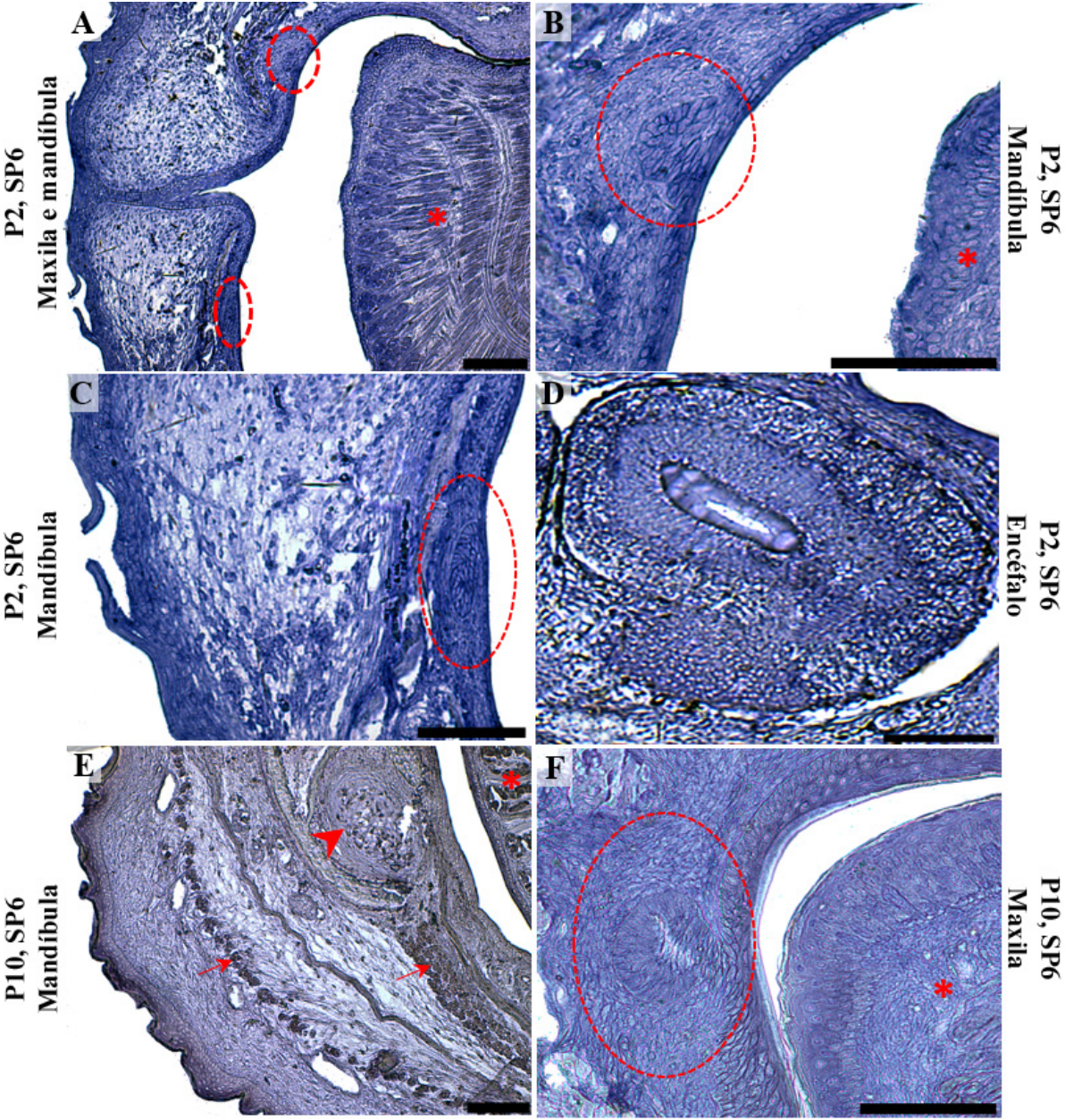


FIGURA 29. Resultado da amplificação de um fragmento molde de FGF4 contendo os sítios promotores nas extremidades e da síntese das sondas antisense e senso de FGF4. (A) Resultado da PCR que utilizou o DNA plasmidial como molde e o par de oligos universal M13, gerando um fragmento linear de aproximadamente 500 pb (2), que contém os sítios promotores para as RNAs polimerases nas extremidades. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando síntese de sondas SP6 (2) e T7 (3) para FGF4. (1) Padrão 1kb.

Os resultados da hibridização *in situ* utilizando as sondas sintetizadas revelaram uma marcação muito homogênea para FGF4 nos tecidos analisados, resultado esperado por se tratar de um fator de crescimento com funções em diversos tecidos durante o desenvolvimento. Mesmo sem grandes destaques, foi possível detectar FGF4 no tecido conjuntivo, tanto na região da cabeça quanto no corpo de neonatos nas idades de P2, P8, P10 e P14 (**Figuras 30 e 31**). FGF4 foi ainda identificado na musculatura esquelética (P2, P8, P10 e P14, cabeças e corpos), cartilagem (P2, P10 e P14, cabeças e corpos), epitélio (P2, P8, P10 e P14, cabeças e corpos), fígado (P2, P8, P10 e P14), tecido nervoso (encéfalo de P2, medula espinhal em P14). Nos germes dentários (P2, P8, P10 e P14), observa-se expressão no epitélio dentário,

retículo estrelado, condensação do ectomesênquima/papila dentária, folículo dentário e nó do esmalte.



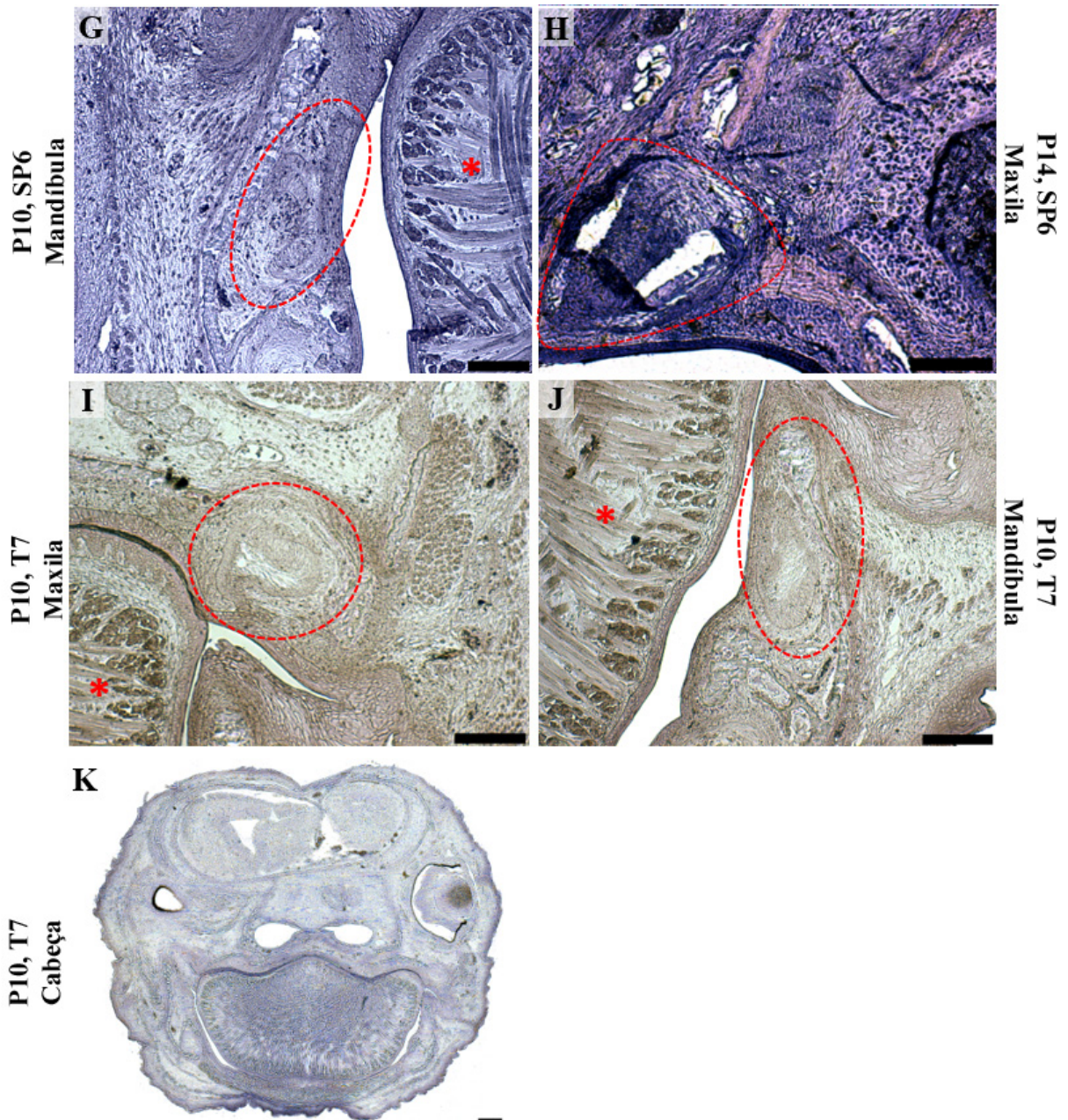


FIGURA 30. Hibridização *in situ* com sonda FGF4 em seções transversais de cabeças de *D. albiventris*. Em coloração roxa, pode-se observar marcação generalizada nos tecidos da cabeça, incluindo os germes dentários, músculos esqueléticos, tecido conjuntivo, epitélios e cartilagens. (A-G) Sonda anti-senso. (H-J) Controle com sonda senso. (A) Panorama da maxila e mandíbula em P2, com localização dos germes dentários (círculos pontilhados); barra: 150 μ m. (B) Germe dentário da maxila em P2 (círculo pontilhado); barra: 100 μ m. (C) Germe dentário da mandíbula em P2 (círculo pontilhado); barra: 100 μ m. (D) Detalhe de vesículas encefálicas em P2; barra: 150 μ m. (E) Mandíbula em P10, podendo-se observar a cartilagem de Meckel (cabeça de seta) e musculatura esquelética (setas); barra: 150 μ m. (F) Germe dentário da maxila em P10 (círculo pontilhado); barra: 100 μ m. (G) Germe dentário da mandíbula em P10 (círculo pontilhado); barra: 150 μ m. (H) Germe dentário da maxila em P14 (círculo pontilhado); barra: 150 μ m. (I) Germe dentário da maxila em P10 (círculo pontilhado); controle; barra:

300 μm . (J) Germe dentário da mandíbula em P10 (círculo pontilhado); controle; barra: 150 μm . (K) Visão da cabeça em P10; controle; barra: 150 μm . (*) Língua.

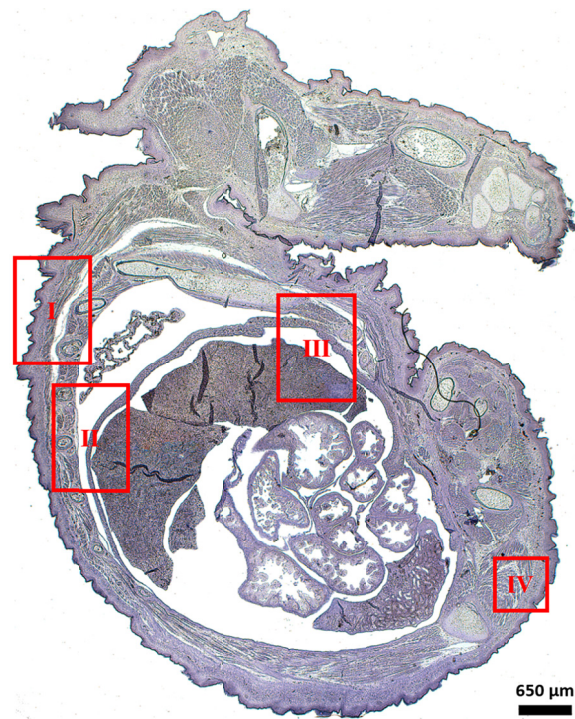


FIGURA 31. Visão geral do tronco de um neonato de *D. albiventris*, mostrando as regiões selecionadas para análise de expressão de *FGF4* por hibridização *in situ*. As regiões foram selecionadas para análise de (I) medula espinhal; (II) fígado, diafragma e coluna vertebral; (III) fígado e diafragma; e (IV) musculatura esquelética, tecido conjuntivo e epitélio. Barra: 650 μm .

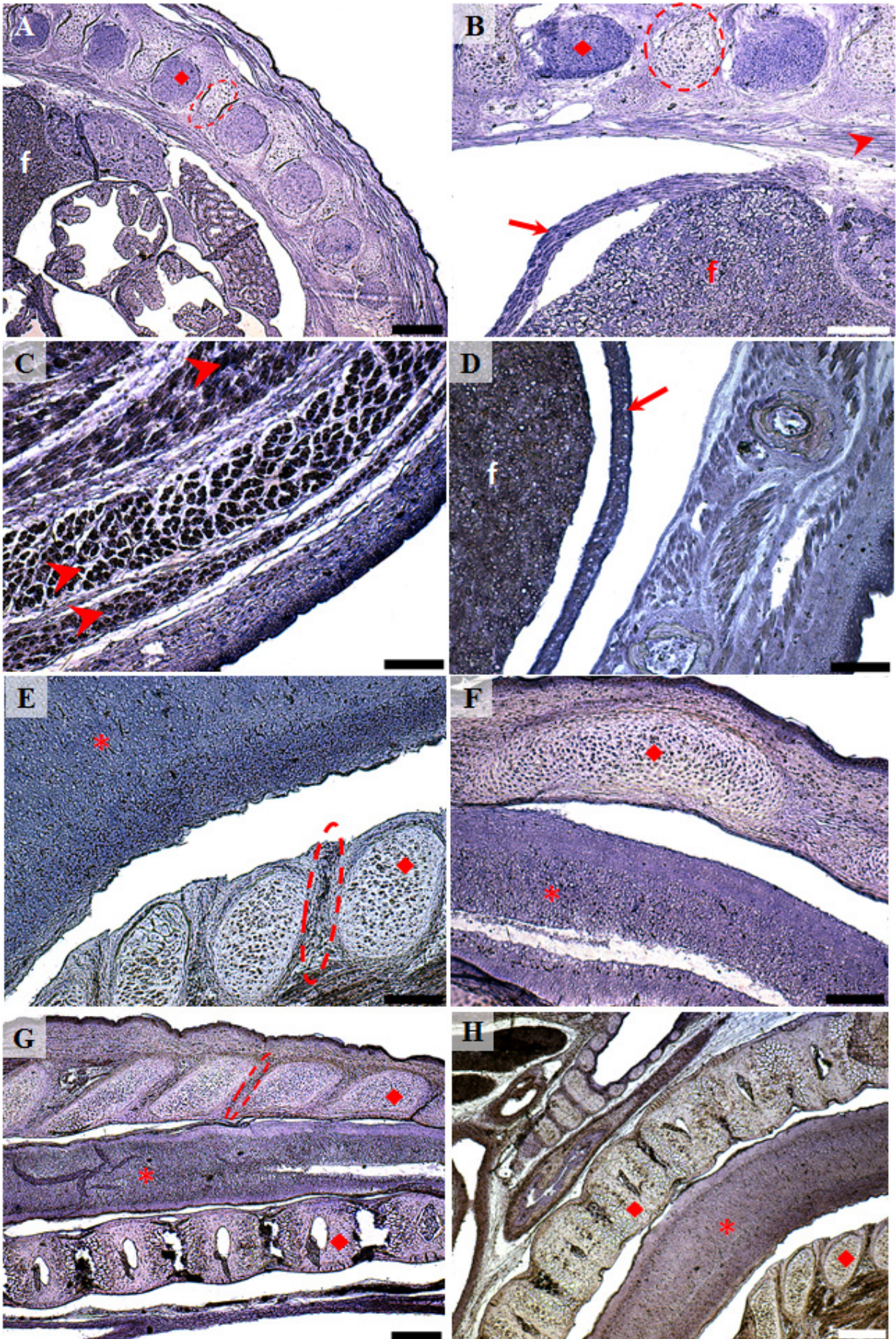


FIGURA 32. Hibridização *in situ* com sonda FGF4 em seções longitudinais de corpos de *D. albiventris*, utilizando sonda antisense. Em coloração roxa, pode-se observar marcação no tecido nervoso (*), cartilagem em ossificação endocondral (◆; vértebras em formação), fibrocartilagem (círculos pontilhados; discos intervertebrais em formação), tecido conjuntivo, diafragma (setas), músculo esquelético (cabeças de seta), fígado (f) e epitélio. (A) Detalhe do corpo em P2, evidenciando marcação na cartilagem em processo de ossificação endocondral na coluna vertebral (que formará a vértebra, localizada entre os futuros discos intervertebrais); barra: 650 μ m. (B) Detalhe do corpo em P2, evidenciando marcação na cartilagem da vértebra em formação, na musculatura esquelética, no diafragma e no fígado; barra: 150 μ m. (C) Detalhe do corpo em P8, evidenciando marcação na musculatura esquelética; barra: 150 μ m. (D) Detalhe do corpo em P10, evidenciando marcação no diafragma, fígado, epitélio e tecido conjuntivo; barra: 150 μ m. (E-F) Detalhe da região dorsal do corpo em P14, evidenciando marcação no tecido nervoso (medula espinhal) e cartilagem da coluna vertebral; barra: 150 μ m. (G-H) Detalhe do corpo em P14, evidenciando marcação no tecido nervoso (medula espinhal) e cartilagem da coluna vertebral; barra: 300 μ m.

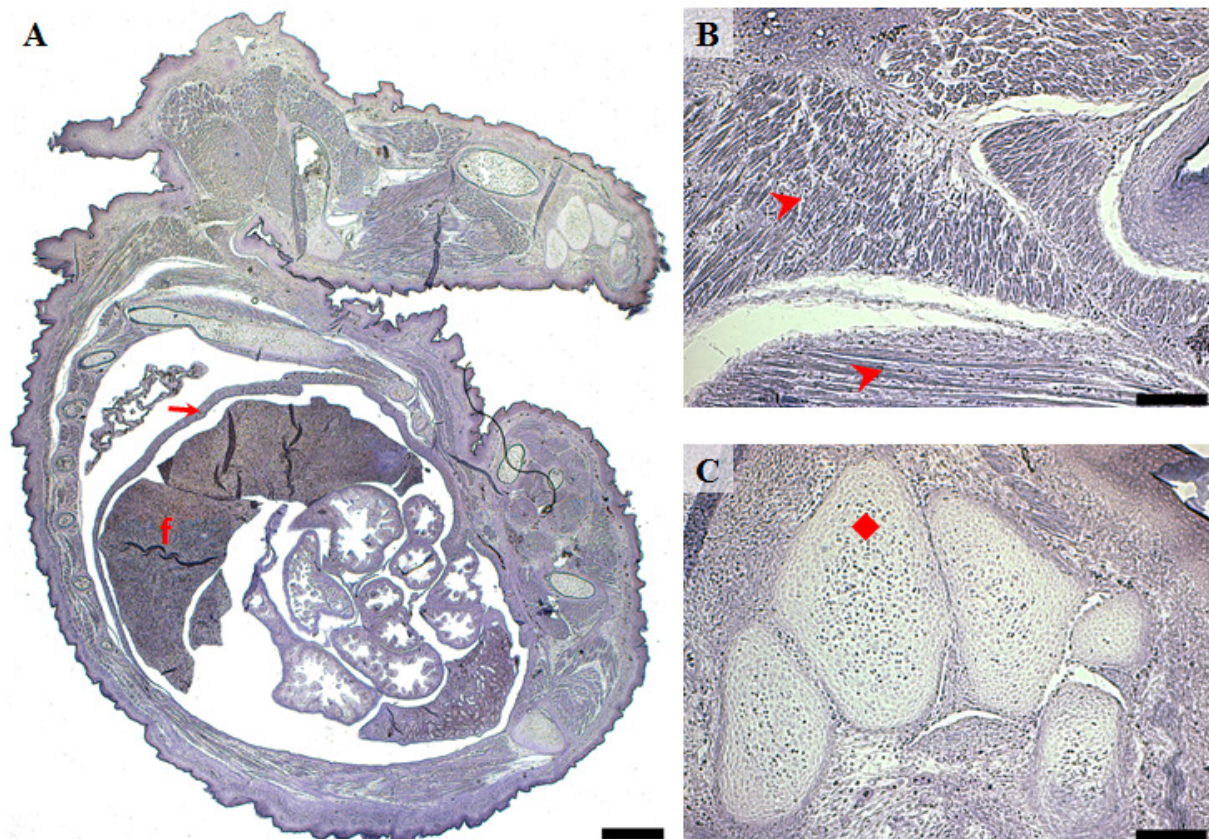


FIGURA 33. Hibridização *in situ* em seções longitudinais de corpos de *D. albiventris* em P10, utilizando sonda senso, como controle. São destacados o diafragma (seta), fígado (f), cartilagem (◆) e musculatura esquelética (cabeças de seta). (A) Visão geral do corpo; barra: 650 μ m. (B) Detalhe do

corpo, evidenciando a musculatura esquelética; barra: 150 μm . (C) Detalhe do corpo, destacando a cartilagem; barra: 150 μm .

A **Figura 34** compara seções submetidas a técnicas para identificar o RNAm de *FGF4* e a proteína FGF4. Em P2, o germe dentário apresenta sobreposição de marcação no epitélio oral, na condensação do ectomesênquima e no epitélio dentário. Em P10, a sobreposição ocorre no epitélio oral, epitélio dentário, folículo dentário, papila dentária e retículo estrelado, embora não tenha sido possível observar outras estruturas na amostra submetida à hibridização *in situ* devido à posição desfavorável da seção. O germe dentário em P14 apresenta sobreposição de marcação em todas as estruturas dentárias, exceto pela papila dentária, que não se apresenta marcada na imunohistoquímica. No tronco, em P14, podemos observar semelhança entre as marcações: musculatura esquelética, medula espinhal, tecido conjuntivo, epitélio, regiões do intestino.

Hibridização *in situ*

Imunohistoquímica

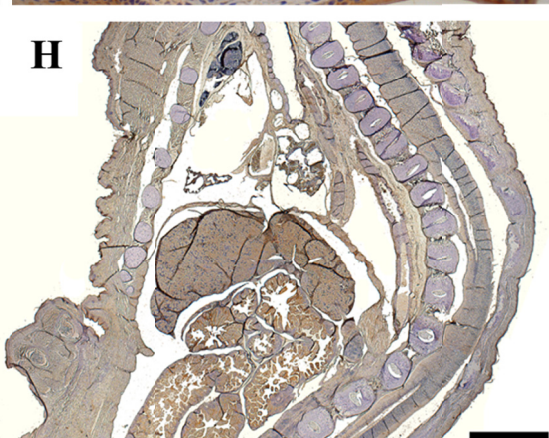
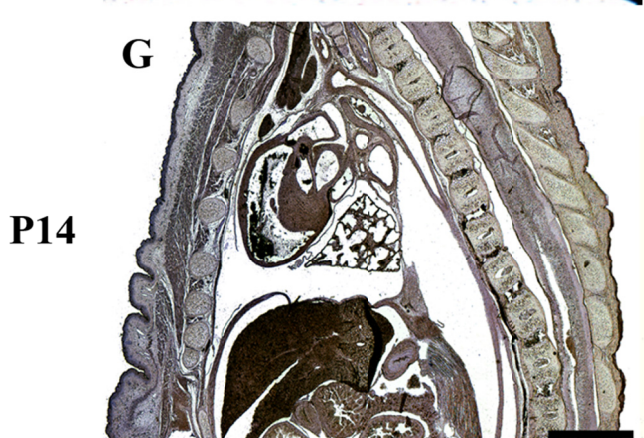
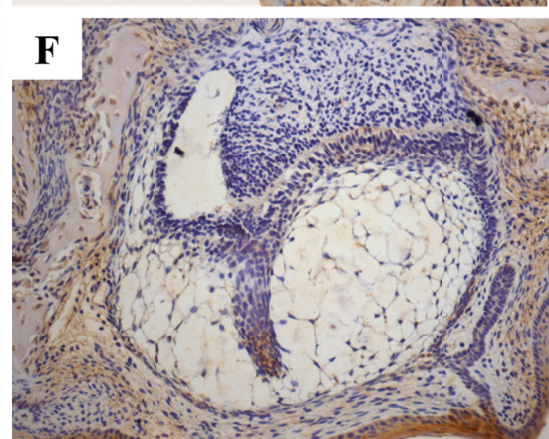
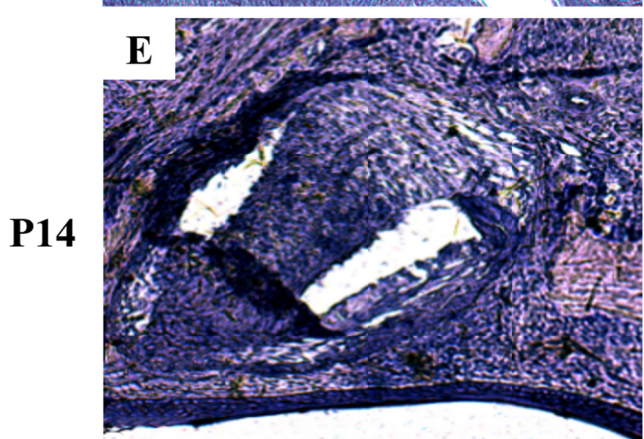
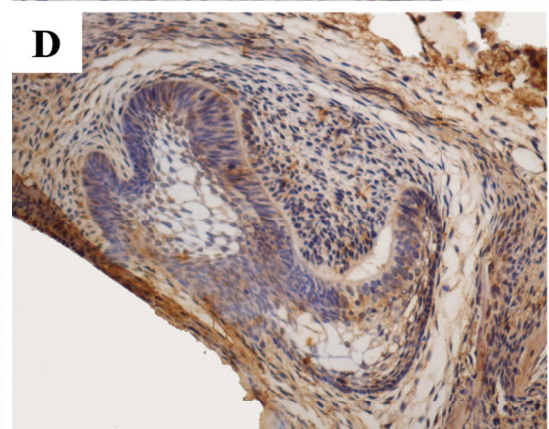
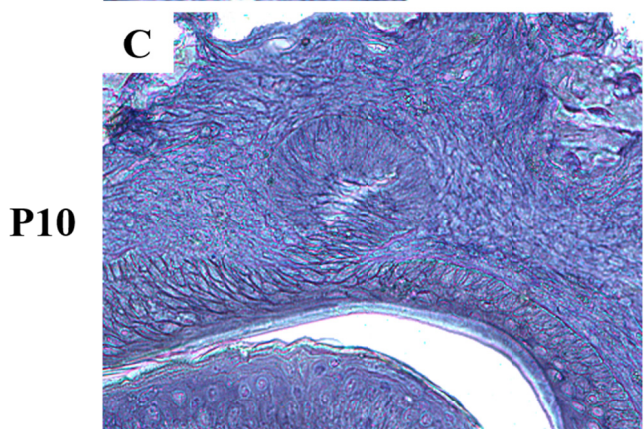
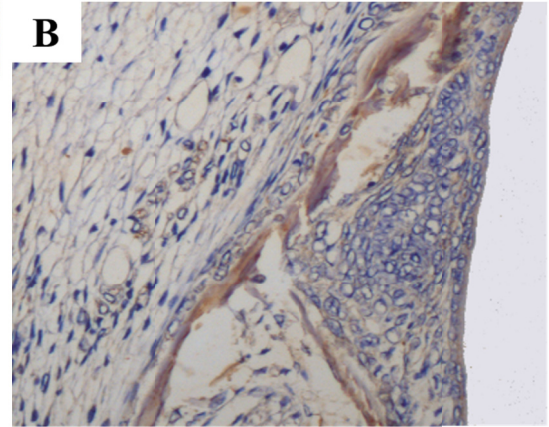
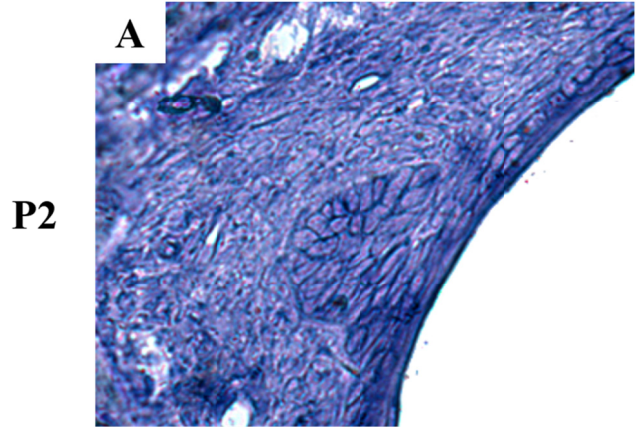


FIGURA 34. Comparação de seções longitudinais de corpos de *D. albiventris* em P14 submetidas a hibridização *in situ* com sonda antisense (A) e imunoperoxidase (B), a fim de localizar o RNAm de *FGF4* e proteína FGF4, respectivamente. (A) Barra: 1200 μm . (B) Barra: 1300 μm .

6- DISCUSSÃO

Os mecanismos moleculares que levam à formação dos dentes durante o desenvolvimento há muito vem sendo investigados, a fim de fornecer alvos que permitam a recuperação (nos casos de perdas) ou a neoformação (nos casos de agenesia) dessa estrutura que é fundamental para a fonação, mastigação e bem-estar humano. Na maioria dos estudos de desenvolvimento e organogênese, roedores tem sido os animais modelo de preferência para a compreensão da odontogênese. No entanto, os roedores possuem apenas dois grupos dentários, incisivos e molares, com características muito diferentes, especialmente os incisivos, que são bastante especializados, e os molares, os quais não apresentam esmalte nas pontas das cúspides. Essas características limitam consideravelmente a extrapolação de dados para humanos (Fuenzalida *et al.*, 2000; Jernvall & Thesleff, 2000). Os marsupiais, por outro lado, possuem dentição completa e heterodonte; portanto, mais similar à encontrada em humanos. Entre os marsupiais encontrados no Brasil, o *D. albiventris*, popularmente conhecido como gambá-de-orelha-branca, é o mais comum. Além disso, são animais dóceis, de fácil captura, manipulação e manutenção em biotérios. A maior vantagem desse animal está justamente no seu uso como modelo em estudos de odontogênese, uma vez que esse processo ocorre quando os neonatos estão já no marsúpio, fora do corpo da mãe. Dessa forma, a coleta das amostras pode ser feita sem a necessidade do sacrifício da mãe, o que vai ao encontro das normas mais modernas em experimentação animal.

Para que seja possível lançar o animal como modelo no estudo da odontogênese, é fundamental que o padrão de formação morfológico e molecular sejam investigados. Sendo assim, este trabalho (1) caracterizou histologicamente o desenvolvimento dos dentes desse animal; e (2) utilizou FGF2, FGF3 e FGF4, fatores reconhecidamente envolvidos com o processo de odontogênese, para verificar se seu local e momento de expressão estavam conservados no marsupial *D. albiventris*, um gambá com dentição completa e heterodonte. Este estudo buscou, de forma geral, gerar ferramentas moleculares capazes de reforçar a posição do gambá-de-orelha-branca como modelo animal para estudos da organogênese, em especial, da odontogênese.

6.1- Morfologia dentária de *D. albiventris* comparada com outros mamíferos

Os resultados de histologia obtidos em relação ao desenvolvimento dos dentes de *D. albiventris* confirmaram que esses animais possuem todas as estruturas características dos germes dentários, já relatadas em roedores: epitélio dentário, epitélios dentários interno e externo, retículo estrelado, condensação do ectomesênquima/papila dentária, folículo dentário, estrato intermediário e nó do esmalte, nas fases de lâmina dentária, início de botão, final de botão, início de capuz, final de capuz, início de campânula e meados de campânula.

Com relação aos estágios de formação dos dentes, Torres *et al.* (2006) já haviam caracterizado o desenvolvimento de molares de *D. albiventris* até a fase de campânula. De acordo com esses dados, em P0, os primeiros molares foram encontrados no estágio de lâmina dentária com uma condensação do mesênquima ao redor do espessamento epitelial. O estágio de botão ocorreu entre P2 e P4 e o estágio de capuz foi observado entre P4 e P8. O presente estudo corroborou com tais observações e contribuiu ainda para adicionar as características dos dentes em P10 e P14 desses animais. Os molares no estágio inicial de campânula foram encontrados em P10 e em meados do estágio de campânula em P14, respectivamente, com todos os elementos anteriormente observados em P5 e P8. Dessa forma, este trabalho confirmou o estabelecimento das características morfológicas das fases iniciais da odontogênese em *D. albiventris*.

Como a maioria das informações histológicas e moleculares disponíveis para a compreensão da formação dos dentes foi obtida em roedores e humanos, este trabalho também procurou comparar as características morfológicas obtidas para *D. albiventris* com as informações disponíveis para outras espécies de mamíferos, especialmente o marsupial (*Monodelphis domestica*), roedores (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*) e humanos (*Homo sapiens*) (**Tabela 8**).

Tabela 8. Comparação dos estágios da odontogênese entre as espécies. Idade de juvenis de diferentes espécies (*Didelphis albiventris*, *Monodelphis domestica*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens*) em estágios da odontogênese (lâmina dentária, botão, capuz e campânula).

	<i>Didelphis albiventris</i>	<i>Monodelphis domestica</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Homo sapiens</i>	
Lâmina dentária	P0	E31 ^[1]	E11.5 ^[3]	E12-13.5 ^[4]	S6 ^[6]	
Botão	P2-4		E13.5 ^[3]	E15 ^[4]	S7-10 ^[6]	
Capuz	P5-8	P5 ^[1,2]	E14.5-15.5 ^[3]	E17-20 ^[5]	S10 ^[6]	
Campânula	P10-14		E16.5-18.5 ^[3]	P0-7 ^[5]	S14 ^[7]	
<i>Didelphis albiventris</i>						
Lâmina dentária	Botão inicial	Botão tardio	Capuz inicial	Capuz tardio	Campânula inicial	Campânula - meados
P0	P2	P4	P5	P8	P10	P14

E: dia embrionário. P: dia pós-natal. S: semanas de gestação.

¹Moustakas *et al.*, 2011. ²van Nievelt and Smith, 2005. ³Heymann *et al.*, 2001. ⁴Kriangkrai *et al.*, 2006. ⁵Mistry *et al.*, 2001. ⁶Zhang *et al.*, 2005. ⁷Hu *et al.*, 2013.

O estágio de lâmina dentária nos gambás foi observado no P0, estágio observado em camundongos com 11.5 dias de desenvolvimento embrionário (E11.5; Gaete *et al.*, 2004); e na sexta semana de vida intrauterina em embriões humanos (Pearson, 1977). O potencial indutivo da formação do dente reside no futuro epitélio dentário, o qual invagina para formar o botão dentário no mesênquima subjacente, que prolifera e condensa (Bei & Maas, 1998). A mudança no potencial odontogênico do epitélio dentário para o mesênquima dentário ocorre em E12.5 em camundongos (Bei & Maas, 1998). No gambá, o estágio de botão foi observado entre P2 e P4; enquanto que no camundongo esse estágio em molares ocorre entre E12.5 e E13.5 (Kettunen & Thesleff, 1998). A morfologia do estágio de botão observado em *D. albiventris* revelou dois tipos celulares característicos dessa fase: (1) células epiteliais, na periferia, de forma alongada, cúbica ou cilíndrica; enquanto as (2) células internas são pequenas, arredondadas e poligonais (Katchburian & Arana, 2012). As células do mesênquima dentário que condensaram ao redor do botão formaram a papila dentária próxima ao folículo dentário que circunda o epitélio (Gaete *et al.*, 2004). As estruturas correspondentes às observadas em camundongo estão presentes no gambá.

O estágio de capuz é observado entre P5 e P8 no gambá, como também relatado por Torres *et al.* (2006). Em camundongo, esse estágio ocorre entre E14.5 e E15.5 (Thesleff & Sahlberg, 1996). O botão dentário de tamanho aumentado é observado em E14.5, marcando a transição do estágio de botão para o de capuz com a formação do órgão do esmalte. Em P5, os elementos formativos do dente, como o órgão dentário, a papila dentária e o folículo dentário foram todos evidentes, e o nó do esmalte – sugerido como responsável pela forma da coroa do dente e sinalizador para a formação da cúspide – foi encontrado completamente formado. Nesse estágio, a histogênese epitelial torna-se mais complexa, diferenciando-se em epitélio externo e interno do dente, retículo estrelado e nó do esmalte. As estruturas correspondentes às observadas em camundongo estão presentes no gambá, assim como também observado por Torres *et al.* (2006). A fase final de capuz, P8 no gambá, é equivalente em camundongos a E15.5, quando há crescimento do germe em comprimento e largura, juntamente com o dobramento do epitélio.

Molares no estágio inicial de campânula foram encontrados em P10 e em meados do estágio de campânula em P14, com todos os elementos que já estavam presentes em P5 e P8. Em camundongos, essa fase da formação dos dentes é encontrada entre os estágios E16.5 e E17.5. Em E16.5, a separação entre as células centrais do órgão do esmalte aumenta, em camundongos, idade que equivale a P10 em gambás. Em E17.5 em camundongo, as células do epitélio dentário externo são mais cúbicas, enquanto as células do epitélio dentário interno apresentam uma forma alongada com um material intracelular claro (Gaete *et al.*, 2004). Os espaços intercelulares do retículo estrelado aumentam e um estrato intermediário aparece entre o retículo estrelado e o epitélio dentário interno (Gaete *et al.*, 2004). No início da fase de campânula, a forma da coroa do dente começa a ser perceptível. O epitélio dentário interno dobra-se nos locais das pontas das futuras cúspides do dente e os nós do esmalte secundários tornam-se perceptíveis; em *D. albiventris*, não foram observados, possivelmente devido às posições desfavoráveis nas quais os germes dentários estavam quando seccionados. O retículo estrelado torna-se diferenciado, as células lisas do epitélio dentário externo permanecem unidas ao epitélio oral através de uma ponte epitelial e os espaços do folículo dentário aumentam. Na ponta das principais cúspides, as células do epitélio dentário interno são mais altas e mais finas e seu núcleo é polarizado, consistente com sua diferenciação em ameloblastos pré-secretores. Na papila dentária, células externas em contato com a membrana basal assumem uma forma colunar, enquanto as células centrais tomam uma aparência indiferenciada e ficam cercadas por numerosos vasos sanguíneos (Gaete *et al.*, 2004). Em

P14, as mesmas características relatadas para E17.5 foram observadas. Em P10 e P14 é possível notar, adicionalmente, a presença de uma lâmina dentária secundária vestigial, a qual sofrerá degeneração na fase final de campânula. Essa lâmina vestigial já foi observada em incisivos e caninos de *D. albiventris* por Fonseca & Alves (2006). Segundo esses autores, o espessamento do epitélio oral (lâmina dentária primária) origina incisivos funcionais e caninos em *D. albiventris*. Todos os incisivos mostraram lâmina dentária secundária, com surgimento em diferentes estágios e que começaram a degenerar após fase de botão. Portanto, a primeira dentição prevalece como dentição permanente (Fonseca & Alves, 2006). A presença de lâmina dentária vestigial em P14 do gambá observada neste trabalho é característica da fase de meados de campânula, uma vez que essa lâmina ainda não atingiu o estágio de botão (Fonseca & Alves, 2006), sugerindo uma diferença em relação ao estudo de Palma (1997), no qual a fase de final de campânula foi descrita em P14.

6.2- Padrão de expressão de marcadores da odontogênese

6.2.1- FGF2

Os resultados mostraram diferenças temporais no padrão de expressão de FGF2 em alguns estágios do desenvolvimento dos dentes, entre *D. albiventris* e *M. musculus*.

Em P0, FGF2 foi detectado no epitélio oral e na condensação do ectomesênquima, tanto na maxila quanto na mandíbula; estes dados contrastam parcialmente com achados em camundongos que, na mesma fase, mostrou expressão de FGF2 no epitélio dentário, membrana basal e mesênquima dentário, mas não no epitélio oral (Cam *et al.*, 1992). Em P2, não ocorreu marcação no germe dentário. Em P4, na maxila, foi observada marcação no epitélio dentário, epitélio oral, condensação do ectomesênquima, folículo dentário e retículo estrelado. Já na mandíbula, uma marcação fraca foi observada no epitélio dentário, folículo dentário e no epitélio oral. Em camundongos, a fase de botão apresentou marcação para FGF2 na membrana basal dentária, mesênquima dentário e retículo estrelado (Cam *et al.*, 1992).

Em P5, a maxila apresentou-se positivamente marcada no nó do esmalte, folículo dentário, epitélios interno e externo do germe, retículo estrelado, estrato intermediário e epitélio oral. Por outro lado, o germe dentário da mandíbula apresentou-se negativo. Em P8, encontraram-se marcados os epitélios interno e externo, o folículo dentário, a papila dentária e o epitélio oral, tanto na maxila quanto na mandíbula. Na maxila, ainda, FGF2 foi imunolocalizado

no nó do esmalte e estrato intermediário. Em camundongos, na fase de capuz, a expressão foi detectada no mesênquima peridentário, na membrana basal dentária limítrofe com o epitélio dentário externo e com o epitélio oral, no mesênquima dentário, no epitélio oral e no retículo estrelado (Cam *et al.*, 1992). Em P10, houve marcação positiva em todos os elementos do germe dentário. Em P14, observou-se marcação no retículo estrelado, folículo dentário, nó do esmalte, epitélios dentários interno e externo, estrato intermediário, lâmina dentária secundária e epitélio oral. Na mandíbula, adicionalmente, houve marcação na papila dentária. Molares de camundongos na fase de campânula apresentam marcação para FGF2 no mesênquima oral, no folículo dentário, no retículo estrelado e nas células mesenquimais da papila dentária (Cam *et al.*, 1992). Na fase de campânula tardia, quando há diferenciação, a expressão de FGF2 em camundongos, ocorreu no retículo estrelado, papila dentária e folículo dentário (Cam *et al.*, 1992).

A comparação do padrão de expressão de FGF2 entre *D. albiventris* e *M. musculus* revelou, de forma geral, que mais estruturas dentárias do gambá apresentaram expressão de FGF2, quando comparado aos mesmos estágios do camundongo. Esse resultado sugere um papel mais amplo para esse fator de crescimento na formação dos dentes do gambá, provavelmente associado à proliferação e indução da diferenciação dos tipos celulares. A expressão progressiva de FGF2 desde os estágios iniciais até o estágio de campânula já foi sugerida como um indicativo da participação dessa molécula nesses eventos da odontogênese (Casasco, 1996; Ruch, 1990; Russo *et al.*, 1998).

6.2.2- FGF3

Os resultados também mostraram diferenças temporais no padrão de expressão de FGF3 entre *D. albiventris* e *M. musculus*, assim como ocorreu para FGF2.

Era esperado que FGF3 fosse imunolocalizado no mesênquima dentário, papila dentária e nó do esmalte, desde o estágio de botão até o de campânula (Bei & Mass, 1998; Harada *et al.*, 1999; Kettunen *et al.*, 2000; Kettunen & Thesleff, 1998; Pispá *et al.*, 1999; Thesleff *et al.*, 1990; Thesleff & Vaahtokari, 1992; Wilkinson *et al.*, 1989).

Em P0, foi observada marcação no epitélio oral, epitélio dentário e condensação do ectomesênquima, enquanto FGF3 não foi localizado na fase de lâmina dentária em camundongos. Em P2, foi observada marcação no epitélio oral, epitélio dentário, retículo estrelado e

condensação do ectomesênquima. Em P4, não houve marcação. Já para molares de camundongos em fase de botão, os dados apontam para uma fraca expressão no epitélio e no mesênquima condensado adjacente (Kettunen *et al.*, 2000; Kettunen & Thesleff, 1998; Thesleff & Vaahokari, 1992). Houve, portanto, certa similaridade na diminuição da expressão de FGF3 entre o gambá e camundongos na fase de botão, sugerindo uma menor importância para esse fator nessa fase.

Em P5, foi observada marcação em diversas estruturas, estágio em que FGF3 foi imunolocalizado apenas no nó do esmalte e na papila dentária de camundongos (Kettunen *et al.*, 2000; Kettunen & Thesleff, 1998). Em P8 e P10, todos os elementos do germe dentário encontraram-se positivamente marcados, mas somente o estrato intermediário apresentou-se marcado na mandíbula em P10. Durante o estágio de capuz de camundongos, FGF3 é intensamente expresso nas células mesenquimais da papila dentária em incisivos e molares (Bei & Mass, 1998; Harada *et al.*, 1999; Kettunen *et al.*, 2000; Pispá *et al.*, 1999; Thesleff *et al.*, 1990; Wilkinson *et al.*, 1989) e no nó do esmalte (Kettunen *et al.*, 2000; Kettunen & Thesleff, 1998). Nos primeiros molares na fase de capuz de *M. domestica*, FGF3 (RNAm) foi detectado apenas no mesênquima e nó do esmalte (Moustakas *et al.*, 2011). Comparado a *M. domestica* e a camundongos, *D. albiventris* apresentou sobreposição nesses dois sítios de expressão de FGF3, embora tenha sido detectado também em um maior número de estruturas dentárias.

Em P14, na maxila, observou-se marcação em várias estruturas, mas nenhuma marcação foi vista na mandíbula. Durante o estágio de campânula em camundongos, FGF3 foi intensamente detectado nas células mesenquimais da papila dentária em incisivos e molares (Bei & Mass, 1998; Harada *et al.*, 1999; Kettunen *et al.*, 2000; Pispá *et al.*, 1999; Thesleff *et al.*, 1990; Wilkinson *et al.*, 1989). Sua expressão também ocorre no nó do esmalte primário, enquanto que nenhum transcrito é observado nos nós do esmalte secundários que aparecem nas extremidades de futuras cúspides do estágio de campânula (Bei & Mass, 1998; Harada *et al.*, 1999; Kettunen *et al.*, 2000; Thesleff *et al.*, 1990; Wilkinson *et al.*, 1989). Na fase de campânula, FGF3 foi detectado nos odontoblastos em diferenciação de camundongos (Kettunen *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007), sugerindo uma colocalização com o que foi observado em gambás. Entretanto, odontoblastos secretando matriz pré-dentina não expressam FGF3, que também pode ser um importante regulador da proliferação celular epitelial durante a morfogênese do dente (Kettunen *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007). A subregulação de FGF3 pode

ser necessária para a maturação de odontoblastos e/ou cessação da proliferação celular epitelial e subsequente diferenciação terminal de ameloblastos (Kettunen *et al.*, 2000).

De maneira geral, comparada a dados disponíveis para camundongos, a imunoposição de FGF3 em *D. albiventris* difere por ser mais intensa em algumas estruturas dentárias, em maior diversidade de estruturas dentárias e em mais estágios da odontogênese. Em gambás, como em camundongos, FGF3 pode ser um regulador da morfogênese do dente, já que é imunolocalizado no nó do esmalte.

6.2.3- FGF4

Trabalhos anteriores demonstraram que FGF4 é imunolocalizado no nó do esmalte nos estágios de capuz e campânula do dente em desenvolvimento do gambá (Jernvall *et al.*, 1994; Kettunen *et al.*, 1998; Kettunen & Thesleff, 1998; Niswander & Martin, 1992; Pispa *et al.*, 1999). No estágio de capuz, FGF4 foi associado à proliferação de células do mesênquima da papila dentária, e do epitélio dentário. Nos estágios de capuz e campânula, a expressão no nó do esmalte (primário e secundário) e do órgão do esmalte sugeriu a possível regulação do desenvolvimento da forma do dente (Jernvall *et al.*, 1994; Kettunen & Thesleff, 1998).

Em P0, foi observada marcação de FGF4 no epitélio oral, epitélio dentário e condensação do ectomesênquima, similarmente ao que foi encontrado em camundongos em E13.5 (Nadiri *et al.*, 2004). Em P2, foi observada marcação no epitélio oral e condensação do ectomesênquima; entretanto, apenas na mandíbula o epitélio dentário também estava marcado. Em camundongos, da fase de botão à fase de campânula, FGF4 foi associado à membrana basal, exceto pelas células adjacentes à membrana basal do nó do esmalte primário em E14.5 e E15.5 (Nadiri *et al.*, 2004), além de estar presente no epitélio dentário (Kettunen & Thesleff, 1998). Em P4, foi observada marcação no epitélio oral, condensação do ectomesênquima e folículo dentário, embora o epitélio dentário e o retículo estrelado estivessem marcados apenas na mandíbula. O padrão observado no gambá foi semelhante ao relatado em camundongos em E13.5 (Kettunen & Thesleff, 1998; Nadiri *et al.*, 2004).

Em *D. albiventris* em P5 e em camundongos em E14.5-15.5, FGF4 foi imunolocalizado no epitélio dentário externo, nó do esmalte, folículo dentário e retículo estrelado, além do mesênquima e papila dentária em camundongos (Nadiri *et al.*, 2004). Em P8, FGF4 foi imunolocalizado no epitélio oral, epitélios dentários interno e externo, folículo dentário, retículo

estrelado, papila dentária e nó do esmalte. Em molares de camundongos em E14.5-15.5 foi demonstrado que FGF4 atua como parte de uma cascata de sinalização no nó do esmalte (Vaahtokari *et al.*, 1996). Nesses animais, FGF4 estava presente principalmente no epitélio dentário – mais intensamente no epitélio dentário externo que no interno – e sua quantidade relativa diminuiu de E14.5 para E15.5 (Nadiri *et al.*, 2004). Após E15.5, uma fraca marcação para FGF4 no mesênquima progressivamente desapareceu quando o desenvolvimento do dente progrediu (Nadiri *et al.*, 2004). Portanto, assim como nos molares de camundongos, é possível sugerir o mesmo papel de FGF4 na cascata de sinalização no nó do esmalte (Vaahtokari *et al.*, 1996), também em gambás.

Em P10, o epitélio oral, folículo dentário, papila dentária, nó do esmalte e estrato intermediário, na maxila; e o nó do esmalte, epitélios interno e externo e retículo estrelado, na mandíbula, estavam positivamente marcados para FGF4, mostrando imunomarcações em locais alternados. Em camundongos em E15.5 a E17.5, foi observado um aumento expressivo da imunomarcação de FGF4 no órgão do esmalte (Nadiri *et al.*, 2004), assim como também observado para o gambá. Reciprocamente, foi observada uma diminuição na marcação no mesênquima, exceto nas pontas das cúspides (Nadiri *et al.*, 2004). Essa localização está de acordo com o possível papel do FGF4 no crescimento do dente e na formação da cúspide (Jernvall & Thesleff, 2000). Durante a transição entre os estágios de capuz e campânula, o tamanho do molar aumenta significativamente, muito provavelmente em função da ação de FGF4 (Lesot *et al.*, 1999; Nadiri *et al.*, 2004). Em E17.5 de camundongos, foi observada uma marcação muito forte no epitélio dentário interno e no estrato intermediário; mas a marcação para FGF4 foi detectada como fraca nas pontas das cúspides (Nadiri *et al.*, 2004). Devido à similaridade de localização de FGF4 em gambá e camundongo, os resultados desse trabalho sugerem a conservação do papel biológico dessa molécula no crescimento do dente e na formação da cúspide.

Em P14, foi observada forte marcação de FGF4 no epitélio oral, epitélio dentário externo, epitélio dentário interno, estrato intermediário, retículo estrelado e lâmina dentária secundária, ao contrário do que foi observado em camundongos nos estágios correspondentes (E17.5 - 19.5), nos quais a quantidade relativa de FGF4 diminuiu e a imunomarcação para FGF4 foi fraca em todos os tecidos dentários nesses estágios (Nadiri *et al.*, 2004). A diminuição de FGF4 em E19.5, exceto no estrato intermediário, pode corresponder à retirada do ciclo celular por mais odontoblastos e pelos primeiros ameloblastos (Nadiri *et al.*, 2004).

De maneira geral, assim como observado para FGF2 e FGF3, tendo em vista dados para camundongos, a imunopressão de FGF4 em *D. albiventris* foi similar, diferindo por ser mais intensa em algumas estruturas dentárias, em maior diversidade de estruturas dentárias e em mais estágios da odontogênese. Em gambás, como em camundongos, FGF4 pode ser um regulador da morfogênese do dente, já que é imunolocalizado no nó do esmalte.

6.3- Sobreposição da expressão de FGF2, FGF3 e FGF4 na odontogênese do gambá

As três moléculas discutidas neste estudo sobrepõem-se em algumas estruturas dentárias, em alguns estágios (**Tabela 9**), principalmente no órgão do esmalte, dos estágios de capuz a campânula. Isso sugere que, em *D. albiventris*, FGF2, FGF3 e FGF4 estão na mesma cascata molecular e atuam na morfogênese do dente e no centro de sinalização dentária – o nó do esmalte – de maneira redundante ou sinérgica.

Tabela 9. Sobreposição de imunomarcção positiva para FGF2, FGF3 e FGF4 durante estágios da odontogênese. A sobreposição ocorre principalmente nos estágios de capuz e campânula, localizada no órgão do esmalte.

	Lâmina dentária	Botão inicial	Botão tardio	Capuz inicial	Capuz tardio	Campânula inicial	Campânula meados
Epitélio oral	+			+		+	+
Condensação do ectomesênquima	+						
Epitélio dentário							
Folículo dentário				+	+	+	+
Papila dentária					+	+	+
Retículo estrelado				+		+	+
Nó do esmalte				+	+	+	+
Epitélio dentário interno					+	+	+
Epitélio dentário externo				+	+	+	+
Lâmina dentária secundária							+
Estrato intermediário						+	+

(+) Sobreposição de imunomarcção positiva para FGF2, FGF3 e FGF4.

Os resultados de imunohistoquímica também evidenciaram diferenças na expressão de FGF2, FGF3 e FGF4 entre a maxila e a mandíbula, em uma mesma idade pós-natal. Os resultados negativos para a localização da proteína podem indicar uma expressão temporal e de padrão dinâmico. A diferença de expressão entre germes da maxila e da mandíbula pode ser explicada pelo desenvolvimento céfalo-caudal, com maior desenvolvimento na região anterior em relação à região posterior, que é mais atrasada (Smith, 2006). Esse padrão diferenciado entre o desenvolvimento da maxila e da mandíbula também ocorre na formação de dentes humanos, nos quais a diferenciação odontogênica se inicia nos incisivos maxilares na 15ª semana de gestação e na 16ª semana nos mandibulares, seguidos pelos caninos, primeiros pré-molares primários e segundos pré-molares primários em um intervalo de uma semana, sequencialmente (Hu *et al.*, 2014).

6.4- Resumo da comparação entre os sítios de expressão de FGF2, FGF3 e FGF4 na odontogênese de modelos animais diferentes.

Poucas semelhanças foram observadas entre o padrão de expressão de FGF2 e FGF3 entre o gambá e o camundongo (Tabelas 10 a 12). Estes resultados sugerem que essas moléculas exercem maior papel no desenvolvimento dentário do gambá em relação ao camundongo. Tendo esses dados em vista, este trabalho sugere que a cascata de sinalização deve ser melhor estudada no *D. albiventris*, para compreender o papel de cada molécula na formação dos dentes.

Tabela 10. Comparação entre marcação para FGF2 em germes dentários de *D. albiventris* e de *M. musculus* durante estágios da odontogênese.

Estágios	<i>Didelphis albiventris</i>	<i>Mus musculus</i>	Estruturas comuns
Lâmina dentária	Epitélio oral, condensação do ectomesênquima	Epitélio dentário, membrana basal, condensação do ectomesênquima	Condensação do ectomesênquima
Botão inicial	Negativo	Membrana basal dentária, condensação do ectomesênquima, retículo estrelado	-
Botão final	Epitélio dentário, epitélio oral, condensação do ectomesênquima, folículo dentário, retículo estrelado	Membrana basal dentária, condensação do ectomesênquima, retículo estrelado	Retículo estrelado, condensação do ectomesênquima

Capuz inicial	Nó do esmalte, folículo dentário, retículo estrelado, epitélio dentário interno, epitélio dentário externo, estrato intermediário, epitélio oral	Mesênquima peridentário, membrana basal dentária limítrofe com o epitélio dentário externo e com o epitélio oral, papila dentária, epitélio oral, retículo estrelado	Epitélio oral, retículo estrelado
Capuz final	Epitélio dentário interno, epitélio dentário externo, folículo dentário, papila dentária, epitélio oral, nó do esmalte, estrato intermediário	Mesênquima peridentário, membrana basal dentária limítrofe com o epitélio dentário externo e com o epitélio oral, papila dentária, epitélio oral, retículo estrelado	Epitélio oral, papila dentária
Campânula inicial	Nó do esmalte, papila dentária, folículo dentário, epitélio interno, epitélio dentário externo, retículo estrelado, lâmina dentária secundária, estrato intermediário, epitélio oral	Mesênquima oral, folículo dentário, retículo estrelado, células mesenquimais da papila dentária	Papila dentária, retículo estrelado, folículo dentário
Campânula – meados	Retículo estrelado, folículo dentário, nó do esmalte, epitélio dentários interno, epitélio dentário externo, lâmina dentária secundária, epitélio oral, papila dentária, estrato intermediário	Mesênquima oral, folículo dentário, retículo estrelado, células mesenquimais da papila dentária	Papila dentária, retículo estrelado, folículo dentário

Tabela 11. Comparação entre marcação para FGF3 em germes dentários de *D. albiventris* e de *M. musculus* durante estágios da odontogênese.

Estágios	<i>Didelphis albiventris</i>	<i>Mus musculus</i>	Estruturas comuns
Lâmina dentária	Epitélio oral, epitélio dentário, condensação do ectomesênquima	Não localizado	-
Botão inicial	Epitélio oral, epitélio dentário, retículo estrelado, condensação do ectomesênquima	Epitélio dentário, condensação do ectomesênquima	Epitélio dentário, condensação do ectomesênquima
Botão final	Negativo	Epitélio dentário, condensação do ectomesênquima	-

Capuz inicial	Epitélio oral, nó do esmalte, folículo dentário, epitélio dentário interno, epitélio dentário externo, retículo estrelado, papila dentária	Nó do esmalte, papila dentária	Nó do esmalte, papila dentária
Capuz final	Epitélio oral, nó do esmalte, papila dentária, folículo dentário, epitélio dentário interno, epitélio dentário externo, retículo estrelado, estrato intermediário	Nó do esmalte, papila dentária	Nó do esmalte, papila dentária
Campânula inicial	Epitélio oral, nó do esmalte, papila dentária, folículo dentário, epitélio dentário interno, epitélio dentário externo, retículo estrelado, estrato intermediário, lâmina dentária secundária	Papila dentária, nó do esmalte primário	Papila dentária, nó do esmalte
Campânula – meados	Epitélio oral, retículo estrelado, folículo dentário, papila dentária, nó do esmalte, epitélio dentário interno, epitélio dentário externo	Papila dentária, nó do esmalte primário	Papila dentária, nó do esmalte

Tabela 12. Comparação entre marcação para FGF4 em germes dentários de *D. albiventris* e de *M. musculus* durante estágios da odontogênese.

Estágios	<i>Didelphis albiventris</i>	<i>Mus musculus</i>	Estruturas comuns
Lâmina dentária	Epitélio oral, epitélio dentário, condensação do ectomesênquima	Epitélio oral, epitélio dentário, condensação do ectomesênquima	Epitélio oral, epitélio dentário, condensação do ectomesênquima
Botão inicial	Epitélio oral, condensação do ectomesênquima, epitélio dentário	Membrana basal, epitélio dentário	Epitélio dentário
Botão final	Epitélio oral, condensação do ectomesênquima, folículo dentário, epitélio dentário, retículo estrelado	Epitélio oral, epitélio dentário, mesênquima dentário, junção epitélio-mesênquimal, membrana basal	Epitélio oral, epitélio dentário, condensação do ectomesênquima

Capuz inicial	Epitélio dentário externo, nó do esmalte, folículo dentário, retículo estrelado	Epitélio dentário externo, estrato intermediário, nó do esmalte, folículo dentário, retículo estrelado, mesênquima, papila dentária, membrana basal	Epitélio dentário externo, nó do esmalte, folículo dentário, retículo estrelado
Capuz final	Epitélio oral, epitélio dentário interno, epitélio dentário externo, folículo dentário, retículo estrelado, papila dentária, nó do esmalte	Nó do esmalte, epitélio dentário externo, epitélio dentário interno, papila dentária, membrana basal	Nó do esmalte, epitélio dentário externo, epitélio dentário interno, papila dentária
Campânula inicial	Epitélio oral, folículo dentário, papila dentária, nó do esmalte, epitélio dentário interno, epitélio dentário externo, retículo estrelado, estrato intermediário	Epitélio dentário interno, epitélio dentário externo, estrato intermediário, retículo estrelado, papila dentária, membrana basal	Epitélio dentário interno, epitélio dentário externo, estrato intermediário, retículo estrelado, papila dentária
Campânula – meados	Epitélio oral, epitélio dentário externo, epitélio dentário interno, estrato intermediário, retículo estrelado, lâmina dentária secundária, nó do esmalte	Epitélio oral, epitélio dentário externo, epitélio dentário interno, estrato intermediário, retículo estrelado, nó do esmalte, membrana basal	Epitélio oral, epitélio dentário externo, epitélio dentário interno, estrato intermediário, retículo estrelado, nó do esmalte

Tabela 13. Localização de FGF3 e FGF4 em germes dentários de molares de mamíferos durante estágios da odontogênese, segundo revisão de Li *et al.* (2014).

Fases da odontogênese	FGF3	FGF4
Lâmina dentária	-	-
Botão	Epitélio dentário, ectomesênquima condensado	Epitélio dentário
Capuz	Nó do esmalte, papila dentária	Nó do esmalte
Campânula	Papila dentária	Nós do esmalte secundários

6.5- Clonagem e sequenciamento de FGF4 de *D. albiventris*

Mesmo conseguindo resultados satisfatórios utilizando ferramentas desenvolvidas para outras espécies, a informação molecular espécie-específica ainda é importante por

ampliar o espectro de análises possíveis, incluindo a manipulação *in vivo*. Trabalhos desenvolvidos anteriormente foram capazes de clonar fragmentos de *D. albiventris* com base na informação disponível para *M. domestica* (Moreira *et al.*, 2009, dados não publicados; Torres *et al.*, 2006, 2007, 2008). Os alinhamentos de sequências de espécies distantes mostraram que não foi possível identificar regiões consenso para o desenho de oligos para FGF3 e FGF4 (ver **Figuras 20 e 21**). Uma vez que havia sido possível clonar *FGF8* de *D. albiventris* em um trabalho anterior (Moreira *et al.*, 2009, dados não publicados; registrado no *GenBank* sob registro GI:169732570), utilizando apenas a sequência de *M. domestica* como molde, optou-se então por obter os oligos desse trabalho pelo mesmo método.

As variações em nível de sequência de nucleotídeos dos transcritos de interesse entre *M. domestica* (conhecida) e *D. albiventris* (alvo) foram os prováveis fatores limitantes no sucesso da clonagem de *FGF3* nesse trabalho. Também é possível que haja algum erro na sequência depositada no banco de dados para *M. domestica*, uma vez que é uma sequência de RNAm parcial e dita “predita”, significando que foi definida com base em programas de bioinformática para a montagem de genomas. Dos vários oligos obtidos para amplificar *FGF3*, desenhados com base na sequência de *M. domestica*, nenhum foi capaz de amplificar qualquer fragmento.

6.6- Padrão de expressão de *FGF4* durante o desenvolvimento de *D. albiventris*

6.6.1- Padrão de expressão de FGF4 no tronco de neonatos do gambá D. albiventris

Cortes seriados das cabeças e troncos dos neonatos de gambá nas mesmas idades foram utilizados para determinar o padrão de expressão de *FGF4* durante o desenvolvimento dos dentes de *D. albiventris*. Os troncos foram especificamente utilizados como controles positivos dos resultados das hibridizações, uma vez que a função biológica de *FGF4* já foi descrita para diversos tecidos e estágios do desenvolvimento embrionário (Aberg *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 1994; Jernvall *et al.*, 1994; Keränen *et al.*, 1998; Kettunen & Thesleff, 1998; Kratochwil *et al.*; 2002; Moustakas *et al.*, 2011; Niswander & Martin, 1993; Niswander *et al.*, 1993; Vaahtokari *et al.*, 1996; Wellstein *et al.*, 1991; Yoshida *et al.*, 1994).

Para todas as idades testadas, os resultados mostram marcação para *FGF4* no tecido conjuntivo, musculatura esquelética, epitélio, fígado e germes dentários (ver **Figuras 30 e 31**). Em troncos de animais em P2 e P14, *FGF4* foi detectado na cartilagem e no tecido ner-

voso, enquanto em P10, apenas a cartilagem mostrou expressão de *FGF4*. Em P2, *FGF4* foi detectado na cartilagem que formará a coluna vertebral. Assim como em camundongos, *FGF4* também pode estar associado ao crescimento dos membros em *D. albiventris*, pela estimulação da proliferação de células mesenquimais (Jernvall *et al.*, 1994; Niswander & Martin, 1993; Niswander *et al.*, 1993). De maneira geral, a expressão de *FGF4* foi bastante ampla, sem grandes destaques entre tecidos e idades observados. Isto se deve possivelmente ao amplo papel mitogênico do *FGF4* em tecidos diferentes e à sua propriedade de ser difusível entre as células.

6.6.2- Padrão de expressão de *FGF4* nos germes dentários de neonatos do gambá *D. albiventris*

No modelo animal adotado neste estudo, *FGF4* foi localizado em todas as estruturas dentárias de amostras em P2, P10 e P14, utilizadas nas hibridizações *in situ*. Outros estudos de HIS para a expressão de *FGF4* em molares e incisivos de camundongos não detectaram sua expressão durante a iniciação dentária (Jernvall *et al.*, 1994; Kettunen & Thesleff, 1998). No estágio de botão, expressão de *FGF4* foi detectada no epitélio dentário (Kettunen & Thesleff, 1998); e no estágio de capuz, *FGF4* foi encontrado no nó do esmalte (Aberg *et al.*, 2004; Jernvall *et al.*, 1994; Kettunen & Thesleff, 1998). A expressão de *FGF4* foi perdida no nó do esmalte em camundongos mutantes nulos para *Lef1* (Kratochwil *et al.*, 2002). Além disso, a expressão de *FGF4* foi um alvo direto e positivamente regulado por *Lef1* (Kratochwil *et al.*, 2002). *Beads* de *FGF4* foram capazes de induzir a expressão de *FGF3* em mesênquima dentário cultivado *in vitro* (Kratochwil *et al.*, 2002), sugerindo uma associação biológica entre esses fatores de crescimento. Na fase de campânula, *FGF4* foi detectado no epitélio dentário interno, nos nós do esmalte secundários (Jernvall *et al.*, 1994; Vaahtokari *et al.*, 1996).

Em ratas, a expressão de *FGF4* foi identificada no epitélio dentário nos estágios de iniciação e botão, no epitélio oral no estágio de botão, no nó do esmalte no estágio de capuz e no epitélio dentário interno no estágio de campânula (Keränen *et al.*, 1998). *FGF4* também foi localizado no nó do esmalte de molares, pré-molares, caninos e incisivos em estágio de capuz de *M. domestica*, além de estar presente no nó do esmalte secundário de molares dessa espécie (Moustakas *et al.*, 2011).

Em relação a camundongos, ratazanas e *M. domestica*, a expressão de *FGF4* em *D. albiventris* foi detectada em um maior número de estruturas dentárias marcadas em fase de botão e campânula.

6.6.3- Comparação da localização de transcritos e proteína de *FGF4* durante o desenvolvimento de *D. albiventris*

Comparando seções de germes dentários em P2, houve sobreposição de marcação para a proteína e para o RNAm de *FGF4* no epitélio oral e condensação do ectomesênquima, na maxila e na mandíbula. Por outro lado, o epitélio dentário apresentou-se marcado em ambas as técnicas apenas na mandíbula. Tal comparação para germes dentários pode ser feita em P10, com evidência de sobreposição de marcação para *FGF4* no epitélio oral, epitélio dentário, folículo dentário e papila dentária para maxila e mandíbula, mas no retículo estrelado apenas na maxila. As demais estruturas dentárias em P10 não puderam ser observadas nas seções submetidas à hibridização *in situ*. Tais resultados podem evidenciar o papel mitogênico do *FGF4* durante o desenvolvimento do dente e que o *pool* de expressão gênica atende à grande demanda de proteína observada nessas mesmas fases.

A comparação de seções de troncos em P14 submetidas a hibridização *in situ* e imunoperoxidase demonstrou semelhanças entre as marcações nos seguintes tecidos: musculatura esquelética, medula espinhal, tecido conjuntivo, epitélio, regiões do intestino (ver **Figura 33**).

O mesmo ocorreu ao compararmos os germes dentários maxilares em P14 (apenas na papila dentária o *FGF4* não foi imunolocalizado). Isso pode significar que, nessa idade, todo o RNAm é traduzido em proteína, com expressão proteica nos mesmos tecidos de expressão gênica, possivelmente pela grande demanda gerada pelo rápido crescimento, exigindo aumento de mitose e histodiferenciação no germe dentário. O epitélio dentário interno, o nó do esmalte e o folículo dentário apresentaram maior intensidade de marcação para *FGF4* em relação a outros tecidos dentários em P14, o que pode explicar que o *pool* gênico de *FGF4* no germe, após traduzido, encaminha-se para os tecidos dentários de maior demanda nessa fase, provendo meios para a futura diferenciação celular para produção de dentina e esmalte, e menor demanda para formação de polpa. A papila dentária em P14 mostrou-se imunomarcada para *FGF2* e *FGF3*, os quais podem desempenhar o papel mitogênico que *FGF4* não desempenha nesse estágio e local.

7- CONCLUSÃO

A maior parte de estudos moleculares e genéticos do desenvolvimento dentário foi focada em roedores, principalmente no camundongo *Mus musculus*, o qual possui uma dentição bastante uniforme, apresentando apenas incisivos e molares. Por outro lado, a maioria dos mamíferos possui uma dentição mais heterodonte, na qual há muitos tipos distintos de dentes.

Mais especificamente, foi possível concluir a partir deste trabalho:

- 1- Histologicamente, não há distinções entre os estágios do desenvolvimento de molares de *D. albiventris* e outros animais-modelo, especialmente roedores;
- 2- Anticorpos comerciais desenvolvidos para outras espécies (*Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*) podem ser utilizados no gambá;
- 3- FGF2, FGF3 e FGF4 são expressos em mais estruturas dentárias quando comparado com roedores, indicando uma função mais ampla desses fatores de crescimento do desenvolvimento dos dentes de gambá;
- 4- A sobreposição de imunomarcção para FGF2, FGF3 e FGF4 ocorre principalmente nos estágios de capuz e campânula, localizados no órgão do esmalte;
- 5- O desenvolvimento de ferramentas moleculares específicas para *D. albiventris* é limitado pela ausência de informações de genoma e transcriptoma espécie-específico;
- 6- A hibridização *in situ* mostrou um padrão amplo de expressão de *FGF4* em diversos tecidos e idades, possivelmente atribuído ao seu papel mitogênico e à sua difusibilidade no meio intersticial;
- 7- As diferenças na expressão das moléculas FGF2, FGF3 e FGF4 entre *D. albiventris* e roedores apontam para a necessidade de um aprofundamento dos estudos comparativos sobre a interação epitélio-mesenquimal reguladora da odontogênese em modelos biológicos com dentição completa, a fim de subsidiar a implementação do gambá como modelo de estudo;
- 8- A constatação de uma via de sinalização odontogênica mais próxima à de humanos pode atrair a atenção dos pesquisadores para esse modelo marsupial e tornar o *D. albiventris* uma referência importante para Biologia do Desenvolvimento, uma vez que esse animal

possui desenvolvimento dentário durante o período de lactação, migra para o marsúpio em estado semiembrionário, tem médio porte e não exige sacrifício da genitora para acesso aos filhotes.

8- REFERÊNCIAS

- Aberg T, Wang XP, Kim JH, Yamashiro T, Bei M, Rice R, Ryoo HM, Thesleff I. Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. *Dev Biol.* 2004; 270(1):76-93.
- Aguiar MS, Ferigolo J, Rossi JL Jr, Gioso MA. Atrição dental em *Didelphis albiventris* e *D. marsupialis* (Marsupialia, Didelphimorphia, Didelphidae) do Sul do Brasil. *Cienc Rural.* 2004, 34: 1127-1132.
- Almeida AJ, Torquetti CG, Talamoni SA. Use of space by neotropical marsupial *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia: Didelphidae) in an urban forest fragment. *Revista Brasileira de Zoologia.* 2008; 25(2), 214-219.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(17):3389-402.
- Alvarez Y, Alonso MT, Vendrell V, Zelarayan LC, Chamero P, Theil T, Bösl MR, Kato S, Maconochie M, Riethmacher D, Schimmang T. Requirements for FGF3 and FGF10 during inner ear formation. *Development.* 2003; 130(25):6329-38.
- Antoine M, Daum M, Köhl R, Blecken V, Close MJ, Peters G, Kiefer P. NH₂-terminal cleavage of xenopus fibroblast growth factor 3 is necessary for optimal biological activity and receptor binding. *Cell Growth Differ.* 2000; 11(11):593-605.
- Aragona M, Marinho-Filho J. História natural e biologia reprodutiva de marsupiais no Pantanal, Mato Grosso, Brasil. *Zoologia.* 2009; 26:220–230.
- Bailly K, Soulet F, Leroy D, Amalric F, Bouche G. Uncoupling of cell proliferation and differentiation activities of basic fibroblast growth factor. *FASEB J.* 2000; 14(2): 333-44.
- Baker CV, Bronner-Fraser M. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol.* 2001; 232(1):1-61.
- Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res.* 1992; 59:115-65.

Bei M, Kratochwil K, Maas RL. BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of Msx1 in tooth development. *Development*. 2000; 127(21):4711-8.

Bei M, Maas R. FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development*. 1998; 125(21):4325-33.

Bertassoli BM, Santos AC, Oliveira FD, Oliveira DM, Assis-Neto AC, Carvalho AF. Morfologia da laringe e traqueia de gambás (*Didelphis sp.*). *Ciência Animal Brasileira*. 2013; 14(2), 222-229.

Bonnet H, Filhol O, Truchet I, Brethenou P, Cochet C, Amalric F, Bouche G. Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory beta subunit of CK2 and directly stimulates CK2 activity toward nucleolin. *J Biol Chem*. 1996; 271(40):24781-7.

Böttcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev*. 2005; 26(1):63-77.

Butler, PM, The ontogeny of molar pattern. *Biological Reviews*. 1956; 31: 30–69.

Cam Y, Neumann MR, Oliver L, Raulais D, Janet T, Ruch JV. Immunolocalization of acidic and basic fibroblast growth factors during mouse odontogenesis. *Int J Dev Biol*. 1992; 36(3):381-9. Erratum in: *Int J Dev Biol* 1992; 36(4): following 599.

Cardillo M, Bininda-Emonds RP, Boakes E, Purvis A. A species-level phylogenetic supertree of marsupials. *Journal of Zoology*. 2004; 264:11–31.

Casasco A. Application of immunocytochemistry for detection of proliferating cell populations during tooth development. *Anat Rec*. 1996; 245(2):162-73.

Celikoglu M, Kazanci F, Miloglu O, Oztek O, Kamak H, Ceylan I. Frequency and characteristics of tooth agenesis among an orthodontic patient population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010; 15(5):e797-801.

Celli G, LaRochelle WJ, Mackem S, Sharp R, Merlino G. Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. *EMBO J*. 1998; 17(6):1642-55.

Cerqueira, R. South American landscapes and their mammals. In Mares MA, Genoways HH. *Mammalian Biology in South America. The Pymatuning Symposia in Ecology*. University of Pittsburg. 1982; 6:53-75.

Cerqueira R, Tribe CJ. Genus *Didelphis*. In: Gardner AL, *Mammals of South America marsupials, xenarthrans, shrews and bats*, Vol. 1. Chicago: The University of Chicago Press. 2007; 17-25.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000; 127(8):1671-9.

Chang Z, Meyer K, Rapraeger AC, Friedl A. Differential ability of heparan sulfate proteoglycans to assemble the fibroblast growth factor receptor complex in situ. *FASEB J*. 2000; 14(1):137-44.

Chen Y, Bei M, Woo I, Satokata I, Maas R. *Msx1* controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development*. 1996; 122(10):3035-44.

Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikel Y, Ruch JV. Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int J Dev Biol*. 1999; 43(3):261-7.

Costa M, Danesi R, Agen C, Di Paolo A, Basolo F, Del Bianchi S, Del Tacca M. MCF-10A cells infected with the int-2 oncogene induce angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane and in the rat mesentery. *Cancer Res*. 1994; 54(1):9-11.

Costa L, Astua de Moraes D, Brito D, Soriano P, Lew D, Delgado C. 2008. *Didelphis albiventris*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Acessado em 10 de Dezembro de 2013.

Cronauer MV, Schulz WA, Seifert HH, Ackermann R, Burchardt M. Fibroblast growth factors and their receptors in urological cancers: basic research and clinical implications. *Eur Urol*. 2003; 43(3):309-19.

Cutts JH, Krause WJ, Leeson CR. General observations on the growth and development of the young pouch opossum, *Didelphis virginiana*. *Biol Neonate*. 1978; 33(5-6):264-72.

De Barros MA, Panattoni Martins JF, Samoto VY, Oliveira VC, Gonçalves N, Mançaneres CA, Vidane A, Carvalho AF, Ambrósio CE, Miglino MA. Marsupial morphology of reproduction: South America opossum male model. *Microsc Res Tech*. 2013; 76(4):388-97.

Delli-Bovi P, Curatola AM, Kern FG, Greco A, Ittmann M, Basilico C. An oncogene isolated by transfection of Kaposi's sarcoma DNA encodes a growth factor that is a member of the FGF family. *Cell*. 1987; 50(5):729-37.

De Moerlooze L, Spencer-Dene B, Revest JM, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development*. 2000; 127(3):483-92.

De Oliveira CA, Nogueira JC, Mahecha GA. Sequential order of appearance of ossification centers in the opossum *Didelphis albiventris* (Didelphidae) skeleton during development in the marsupium. *Ann Anat*. 1998; 180(2):113-21.

Dickson C, Deed R, Dixon M, Peters G. The structure and function of the int-2 oncogene. *Prog Growth Factor Res*. 1989; 1(3):123-32.

Dickson C, Smith R, Brookes S, Peters G. Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: proviral activation of a cellular gene in the common integration region int-2. *Cell*. 1984; 37(2):529-36.

Dono R. Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284(4):R867-81.

Drucker BJ, Goldfarb M. Murine FGF-4 gene expression is spatially restricted within embryonic skeletal muscle and other tissues. *Mech Dev*. 1993; 40(3):155-63

Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; 16(2):139-49.

Farré J, Roura S, Prat-Vidal C, Soler-Botija C, Llach A, Molina CE, Hove-Madsen L, Cairó JJ, Gòdia F, Bragós R, Cinca J, Bayes-Genis A. FGF-4 increases in vitro expansion rate of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Growth Factors*. 2007; 25(2):71-6.

Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science*. 1995; 267(5195):246-9.

Fernandes F, Cruz L, Martins E, Reis S. Growth and home range size of the gracille mouse opossum *Gracilinanus microtarsus* (Marsupialia: Didelphidae) in Brazilian cerrado. *Journal of Tropical Ecology*. 2010; 26:2:185-192.

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

Fonseca, CT. Estudo histológico do desenvolvimento dentário do *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) - Didelphidae Marsupialia. 1996. 101 fl. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.

Fonseca CT, Alves JB. Dental development of *Didelphis albiventris* (Marsupialia): I - incisors and canines. *Brazilian Journal of Biology*. 2006; 66(1a):53-60.

Fonseca LEA. Adaptações de *Didelphis albiventris* Lund. para o ambiente urbano. 2003. 16 fl. Monografia – Centro Universitário de Brasília. Faculdade de Ciência da Saúde.

Fuller-Pace F, Peters G, Dickson C. Cell transformation by kFGF requires secretion but not glycosylation. *J Cell Biol*. 1991; 115(2):547-55.

Gaete M, Lobos N, Torres-Quintana MA. Mouse tooth development time sequence determination for the ICR/Jcl strain. *J Oral Sci*. 2004; 46(3):135-41.

Galzie Z, Kinsella AR, Smith JA. Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem Cell Biol*. 1997; 75(6):669-85.

Gardner AL. Order Didelphimorphia. In: Wilson, DE, Reeder, DM. (Eds.) *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3^a ed. Baltimore: John Hopkins University Press. 2005; 3-18.

Goldfarb M. Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; 16(2):215-20.

Gonçalves NJN, Mançanares CAF, Miglino MA, Samoto VY, Martins DS, Ambrosio CE, Ferraz RH, Carvalho AF. Morphological aspects of genital female of the opossum (*Didelphis sp.*). Braz J Vet Res Anim Sci. 2009; 46:332-338.

Gospodarowicz, D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. Nature. 1974; 249:123-127.

Gospodarowicz D, Moran J. Effect of a fibroblast growth factor, insulin, dexamethasone, and serum on the morphology of BALB/c 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974; 71(12):4648-52.

Gospodarowicz D, Weseman J, Moran J. Presence in brain of a mitogenic agent promoting proliferation of myoblasts in low density culture. Nature. 1975; 256:216–219.

Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. J Cell Biol. 1999; 147(1):105-20.

Heymann R, Kallenbach S, Alonso S, Carroll P, Mitsiadis TA. Dynamic expression patterns of the new protocadherin families CNRs and Pcdh-gamma during mouse odontogenesis: comparison with reelin expression. Mech Dev. 2001; 106(1-2):181-4.

Hu X, Xu S, Lin C, Zhang L, Chen Y, Zhang Y. Precise chronology of differentiation of developing human primary dentition. Histochem Cell Biol. 2014;141(2):221-7.

Hu X, Zhang S, Chen G, Lin C, Huang Z, Chen Y, Zhang Y. Expression of SHH signaling molecules in the developing human primary dentition. BMC Dev Biol. 2013;13:11.

Imai H, Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Eto K. Contribution of early-emigrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of mandibular molar teeth in rat embryos. Dev Biol. 1996; 176(2):151-65.

Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. Trends Genet. 2004; 20(11):563-9.

Itoh N, Ornitz DM. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. Dev Dyn. 2008; 237(1):18-27.

Jernvall J. Mammalian molar cusp patterns: developmental mechanisms of diversity. *Acta Zool Fenn.* 1995; 198:1-61.

Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol.* 1994; 38(3):463-9.

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

Jurgelski W Jr. The opossum (*Didelphis virginiana* Kerr) as a biomedical model. I. Research perspective, husbandry, and laboratory technics. *Lab Anim Sci.* 1974; 24(2):376-403.

Kapadia H, Mues G, D'Souza R. Genes affecting tooth morphogenesis. *Orthod Craniofac Res.* 2007 Aug;10(3):105-13. Review. Erratum in: *Orthod Craniofac Res.* 2007; 10(4):236. Corrected and republished in: *Orthod Craniofac Res.* 2007; 10(4):237-44.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral.* 3^oed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, Cap 6, 2012, 105-128.

Kawasaki M, Porntaveetus T, Kawasaki K, Oommen S, Otsuka-Tanaka Y, Hishinuma M, Nomoto T, Maeda T, Takubo K, Suda T, Sharpe PT, Ohazama A. R-spondins/Lgrs expression in tooth development. *Dev Dyn.* 2014; 243(6):844-51.

Keränen SV, Aberg T, Kettunen P, Thesleff I, Jernvall J. Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Dev Genes Evol.* 1998; 208(9):477-86.

Keränen SV, Kettunen P, Aberg T, Thesleff I, Jernvall J. Gene expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Dev Genes Evol.* 1999; 209(8):495-506.

Kettunen P, Karavanova I, Thesleff I. Responsiveness of developing dental tissues to fibroblast growth factors: expression of splicing alternatives of FGFR1, -2, -3, and of FGFR4; and stimulation of cell proliferation by FGF-2, -4, -8, and -9. *Dev Genet.* 1998; 22(4):374-85.

Kettunen P, Laurikkala J, Itäranta P, Vainio S, Itoh N, Thesleff I. Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Dev Dyn.* 2000; 219(3):322-32.

Kettunen P, Thesleff I. Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn.* 1998; 211(3):256-68.

Kim HJ, Bar-Sagi D. Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(6):441-50.

Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res.* 1989; 1(4):207-35.

Klein OD, Minowada G, Peterková R, Kangas A, Yu BD, Lesot H, Peterka M, Jernvall J, Martin GR. Sprouty genes control diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling. *Dev Cell.* 2006; 11(2):181-90.

Klein OD, Lyons DB, Balooch G, Marshall GW, Basson MA, Peterka M, Boran T, Peterková R, Martin GR. An FGF signaling loop sustains the generation of differentiated progeny from stem cells in mouse incisors. *Development.* 2008; 135(2):377-85.

Kriangkrai R, Iseki S, Eto K, Chareonvit S. Dual odontogenic origins develop at the early stage of rat maxillary incisor development. *Anat Embryol (Berl).* 2006; 211(2):101-8.

Kollar EJ, Fisher C. Tooth induction in chick epithelium: expression of quiescent genes for enamel synthesis. *Science.* 1980; 207(4434):993-5.

Kollar EJ, Mina M. Role of the early epithelium in the patterning of the teeth and Meckel's cartilage. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1991; 11(4):223-8.

Konishi H, Ochiya T, Yasuda Y, Sakamoto H, Muto T, Sugimura T, Terada M. HST-1/FGF-4 stimulates proliferation of megakaryocyte progenitors synergistically and promotes megakaryocyte maturation. *Oncogene.* 1996; 13(1):9-19.

Köntges G, Lumsden A. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development.* 1996; 122(10):3229-42.

Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in *Lef1(-/-)* mice. *Genes Dev.* 2002; 16(24):3173-85.

Krause WJ, Cutts JH. Scanning electron microscopic observations on developing opossum embryos: days 9 through 12. *Anat Anz.* 1986; 161(1):11-21.

Kumano G, Smith WC. The nodal target gene *Xmenf* is a component of an FGF-independent pathway of ventral mesoderm induction in *Xenopus*. *Mech Dev.* 2002; 118(1-2):45-56.

Landin MA, Shabestari M, Babaie E, Reseland JE, Osmundsen H. Gene Expression Profiling during Murine Tooth Development. *Front Genet.* 2012; 3:139.

Lesot H, Peterková R, Schmitt R, Meyer JM, Viriot L, Vonesch JL, Senger B, Peterka M, Ruch JV. Initial features of the inner dental epithelium histo-morphogenesis in the first lower molar in mouse. *Int J Dev Biol.* 1999; 43(3):245-54.

Li CY, Prochazka J, Goodwin AF, Klein OD. Fibroblast growth factor signaling in mammalian tooth development. *Odontology.* 2014; 102(1):1-13.

Liu M, Zhao S, Wang XP. YAP overexpression affects tooth morphogenesis and enamel knot patterning. *J Dent Res.* 2014; 93(5):469-74.

Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development.* 1988; 103 Suppl:155-69.

Malta MCC, Luppi MM. Marsupialia - Didelphidia (Gambá, Cuíca). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. (Eds.). *Tratado de Animais Selvagens*. Editora Roca, São Paulo. 2007;340-357.

Mandler M, Neubüser A. FGF signaling is necessary for the specification of the odontogenic mesenchyme. *Dev Biol.* 2001; 240(2):548-59.

Mançaneres CA, Santos AC, Piemonte MV, Vasconcelos BG, Carvalho AF, Miglino MA, Ambrósio CE, Assis Neto AC. Macroscopic and microscopic analysis of the tongue of the common opossum (*Didelphis marsupialis*). *Microsc Res Tech.* 2012; 75(10):1329-33.

Mansour SL, Goddard JM, Capecchi MR. Mice homozygous for a targeted disruption of the proto-oncogene int-2 have developmental defects in the tail and inner ear. *Development*. 1993; 117(1):13-28.

Mansukhani A, Moscatelli D, Talarico D, Levytska V, Basilico C. A murine fibroblast growth factor (FGF) receptor expressed in CHO cells is activated by basic FGF and Kaposi FGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(11):4378-82.

Mascarenhas AEAS. Histologia e inervação do sistema genital feminino na fase de anestro no gambá *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) - Didelphidae - Marsupialia. 1980. Tese de Mestrado, Depto. de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.

Mason I. Cell signalling. Do adhesion molecules signal via FGF receptors? *Curr Biol*. 1994; 4(12):1158-61.

Mason JM, Morrison DJ, Basson MA, Licht JD. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol*. 2006; 16(1):45-54.

Maves L, Jackman W, Kimmel CB. FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development*. 2002; 129(16):3825-37

Mayshar Y, Rom E, Chumakov I, Kronman A, Yayon A, Benvenisty N. Fibroblast growth factor 4 and its novel splice isoform have opposing effects on the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*. 2008; 26(3):767-74.

Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol*. 1992; 151(1):81-93.

Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol*. 1987; 32(2):123-7.

Mistry D, Altini M, Coleman HG, Ali H, Maiorano E. The spatial and temporal expression of calretinin in developing rat molars (*Rattus norvegicus*). *Arch Oral Biol*. 2001; 46(10):973-81.

Mohammadi M, Olsen SK, Goetz R. A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an à la carte menu of heparan sulfate motifs. *Curr Opin Struct Biol.* 2005; 15(5):506-16.

Moulton JD, Yan YL. Using Morpholinos to control gene expression. *Curr Protoc Mol Biol.* 2008 Jul;Chapter 26:Unit 26.8.

Moustakas JE, Smith KK, Hlusko LJ. Evolution and development of the mammalian dentition: insights from the marsupial *Monodelphis domestica*. *Dev Dyn.* 2011; 240(1):232-9.

Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Haikel Y, Lesot H. Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52(1):103-12.

Niswander L, Martin GR. Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development.* 1992; 114(3):755-68.

Niswander L, Martin GR. FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature.* 1993; 361(6407):68-71.

Niswander L, Tickle C, Vogel A, Booth I, Martin GR. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell.* 1993; 75(3):579-87.

Nogueira JC. Aspectos anatômicos e biometria do sistema genital masculino do gambá durante o ciclo anual. In: XXXIX Reuniao anual SBPC, Brasília: Ciência e Cultura - Suplemento. 1987; 828-829.

Noramly S, Grainger RM. Determination of the embryonic inner ear. *J Neurobiol.* 2002; 53(2):100-28.

O'Connell M. American Opossums. In: MacDonald D, Norris S, editors. *The Encyclopedia of Mammals*, Vol. 1. London: The Brown Reference Group. 2006; 808-813.

Ogawa T, Kapadia H, Feng JQ, Raghov R, Peters H, D'Souza RN. Functional consequences of interactions between Pax9 and Msx1 genes in normal and abnormal tooth development. *J Biol Chem.* 2006; 281(27):18363-9.

Oliveira CA, Nogueira JC, Mahecha GA. Sequential order of appearance of ossification centers in the opossum *Didelphis albiventris* (Didelphidae) skeleton during development in the marsupium. *Ann Anat.* 1998 Apr;180(2):113-21.

Oliveira-Santos LGR, Tortato MA, Graipel ME. Activity pattern of Atlantic Forest small arboreal mammals as revealed by camera traps. *Journal of Tropical Ecology.* 2008; 24:563-567.

Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays.* 2000; 22(2):108-12.

Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001; 2(3).

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem.* 1996; 271(25):15292-7.

Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, Givol D, Lonai P. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol.* 1993; 158(2):475-86.

Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 12;95(10):5672-7.

Palma MB. Expressão de resíduos de açúcares durante a morfogênese dentária em gambás *Didelphis albiventris*. 1997. 121 fl. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.

Pauley S, Wright TJ, Pirvola U, Ornitz D, Beisel K, Fritsch B. Expression and function of FGF10 in mammalian inner ear development. *Dev Dyn.* 2003; 227(2):203-15.

Pearson AA. The early innervation of the developing deciduous teeth. *J Anat.* 1977; 123(Pt 3):563-77.

Peterková R, Peterka M, Viriot L, Lesot H. Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connect Tissue Res.* 2002; 43(2-3):120-8.

Peters H, Balling R. Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet.* 1999; 15(2):59-65.

- Peters H, Neubüser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* 1998; 12(17):2735-47.
- Pirvola U, Spencer-Dene B, Xing-Qun L, Kettunen P, Thesleff I, Fritsch B, Dickson C, Ylikoski J. FGF/FGFR-2(IIIb) signaling is essential for inner ear morphogenesis. *J Neurosci.* 2000; 20(16):6125-34.
- Pispa J, Jung HS, Jernvall J, Kettunen P, Mustonen T, Tabata MJ, Kere J, Thesleff I. Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Dev Biol.* 1999; 216(2):521-34.
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer.* 2000 Sep;7(3):165-97.
- Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol.* 1989; 109(1):1-6.
- Rigueira SE, Valle CMC, Varejão JBM, Albuquerque PV, Nogueira JC. Algumas observações sobre o ciclo reprodutivo anual de fêmeas do gambá *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) (Marsupialia, Didelphidae) em populações naturais no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia.* 1987; 4(2):129-137.
- Rinkwitz S, Bober E, Baker R. Development of the vertebrate inner ear. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 942:1-14.
- Ruch JV. Patterned distribution of differentiating dental cells: facts and hypotheses. *J Biol Buccale.* 1990; 18(2):91-8.
- Ruch JV. Tooth crown morphogenesis and cytodifferentiations: candid questions and critical comments. *Connect Tissue Res.* 1995; 32(1-4):1-8.
- Ruch JV, Lesot H, Peterková R, Peterka M. Evolving rodent dentition. *Bioessays.* 1997; 19(11):1041.
- Russo LG, Maharajan P, Maharajan V. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) in mouse tooth morphogenesis. *Growth Factors.* 1998; 15(2):125-33.

Sakamoto H, Mori M, Taira M, Yoshida T, Matsukawa S, Shimizu K, Sekiguchi M, Terada M, Sugimura T. Transforming gene from human stomach cancers and a noncancerous portion of stomach mucosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83(11):3997-4001.

Sanches VQA, Gomes MMA, Passos FC, Graciolli G, Ribas ACA. Home-range and space use by *Didelphis albiventris* (Lund 1840) (Marsupialia, Didelphidae) in Mutum Island, Paraná river, Brazil. *Biota Neotrop*. 2012; 12(4):000-000.

Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*. 1994; 6(4):348-56.

Smallwood PM, Munoz-Sanjuan I, Tong P, Macke JP, Hendry SH, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(18):9850-7.

Smith KK. Craniofacial development in marsupial mammals: developmental origins of evolutionary change. *Dev Dyn*. 2006; 235(5):1181-93.

Smith P. White-eared opossum *Didelphis albiventris*. *Fauna Paraguay Handbook of the Mammals of Paraguay*, 2007;1:1-19. <<http://www.fauparaguay.com/mam1Didelphisalbiventris.pdf>>. Acessado em 07 de Maio de 2013.

So F, Daley TD, Jackson L, Wysocki GP. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factors FGF-1 and FGF-2, and receptors FGFR2 and FGFR3 in the epithelium of human odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med*. 2001; 30(7):428-33.

Sousa LC, Gontijo CM, Lacorte GA, Meireles SN, Silva AP, Fonseca CG. Molecular characterization of an opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) population in an urban fragment of the Brazilian Atlantic rainforest and support to species barcode identification. *Genet Mol Res*. 2012;11(3):2487-96.

Stock DW. The genetic basis of modularity in the development and evolution of the vertebrate dentition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356(1414):1633-53.

Taira M, Yoshida T, Miyagawa K, Sakamoto H, Terada M, Sugimura T. cDNA sequence of human transforming gene hst and identification of the coding sequence required for transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(9):2980-4.

Talice RV, Lagomarsino JC. Comportamiento sexual e nacimientos en cautividad de la "comadreja overa": *Didelphis azarae*. *Congresso Sudamericano de Zoologia*. 1959; 5(6):81-96.

Tekin M, Hişmi BO, Fitoz S, Ozdağ H, Cengiz FB, Sirmaci A, Aslan I, Inceoğlu B, Yüksel-Konuk EB, Yılmaz ST, Yasun O, Akar N. Homozygous mutations in fibroblast growth factor 3 are associated with a new form of syndromic deafness characterized by inner ear agenesis, microtia, and microdontia. *Am J Hum Genet*. 2007; 80(2):338-44.

Ten Cate AR. The experimental investigation of odontogenesis. *Int J Dev Biol*. 1995; 39(1):5-11.

Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 9):1647-8.

Thesleff I, Hurmerinta K. Tissue interactions in tooth development. *Differentiation*. 1981;18(1-3):75-88.

Thesleff I, Keränen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv Dent Res*. 2001;15:14-8.

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

Thesleff I, Nieminen P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8(6):844-50.

Thesleff I, Sahlberg C. Growth factors as inductive signals regulating tooth morphogenesis. *Cell Dev Biol*. 1996;7(2):185-193.

Thesleff I, Vaahtokari A. The role of growth factors in determination and differentiation of the odontoblastic cell lineage. *Proc Finn Dent Soc*. 1992;88 Suppl 1:357-68.

Thisse B, Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol.* 2005; 287(2):390-402. Erratum in: *Dev Biol.* 2006;295(1):294.

Torres CB, Goes VS, Goes AM, Pacífico LG, Silva GA, Junior NL, Alves JB. Fibroblast growth factor 9: cloning and immunolocalisation during tooth development in *Didelphis albiventris*. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(4):263-72.

Torres CB, Alves JB, Silva GA, Goes VS, Nakao LY, Goes AM. Role of BMP-4 during tooth development in a model with complete dentition. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(1):2-8.

Trumpp A, Depew MJ, Rubenstein JLR, Bishop JM, Martin GR. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes Dev* 1999,13:3136-3148.

Tsuboi T, Mizutani S, Nakano M, Hirukawa K, Togari A. Fgf-2 regulates enamel and dentine formation in mouse tooth germ. *Calcif Tissue Int.* 2003;73(5):496-501.

Tucker AS, Sharpe PT. Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. *J Dent Res.* 1999;78(4):826-34.

Turescova J, Aberg T, Sahlberg C, Ruch J.-V, Thesleff I, Peterkova R. Expression of the *Msx-1*, *Msx-2*, *Bmp-2* and *Bmp-4* genes in the transitory tooth germs in the diastema region of the mouse. *Int. J. Dev. Biol.* 1995, 39:459–468.

Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(2):116-29.

Vahtokari A, Aberg T, Thesleff I. Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development.* 1996; 122(1):121-9.

Van Nievelt AFH, Smith KK. To replace or not to replace: the significance of reduced functional tooth replacement in marsupial and placental mammals. *Paleobiology.* 2005; 31:324-346.

Vieira AR, D'Souza RN, Mues G, Deeley K, Hsin HY, Kuchler EC, Meira R, Patir A, Tan-nure PN, Lips A, Costa MC, Granjeiro JM, Seymen F, Modesto A. Candidate gene studies in hypodontia suggest role for FGF3. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2013; 14(6):405-10.

Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray JC. MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *J Dent Res*. 2004; 83(9):723-7.

Wang XP, Suomalainen M, Felszeghy S, Zelarayan LC, Alonso MT, Plikus MV, Maas RL, Chuong CM, Schimmang T, Thesleff I. An integrated gene regulatory network controls stem cell proliferation in teeth. *PLoS Biol*. 2007; 5(6):e159.

Wellstein A, Zugmaier G, Califano JA 3rd, Kern F, Paik S, Lippman ME. Tumor growth dependent on Kaposi's sarcoma-derived fibroblast growth factor inhibited by pentosan polysulfate. *J Natl Cancer Inst*. 1991; 15;83(10):716-20.

Westall FC, Lennon VA, Gospodarowicz D. Brain-derived fibroblast growth factor: identity with a fragment of the basic protein of myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75(10):4675-8.

Whitten WK. Pheromones and mammalian reproduction. *Adv Reprod Physiol*. 1966,1:155-177.

Wilkinson DG, Bhatt S, McMahon AP. Expression pattern of the FGF-related proto-oncogene *int-2* suggests multiple roles in fetal development. *Development*. 1989; 105(1):131-6.

Wilson DE, Reeder DAM. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, Vol. 1, 3^a ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 2005.

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. 1991; 64(4):841-8.

Yoshida T, Ishimaru K, Sakamoto H, Yokota J, Hirohashi S, Igarashi K, Sudo K, Terada M. Angiogenic activity of the recombinant hst-1 protein. *Cancer Lett*. 1994;83(1-2):261-8.

Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res*. 2005; 15(5):301-16.

Zhou M, Sutliff RL, Paul RJ, Lorenz JN, Hoying JB, Haudenschild CC, Yin M, Coffin JD, Kong L, Kranias EG, Luo W, Boivin GP, Duffy JJ, Pawlowski SA, Doetschman T. Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat Med.* 1998 Feb;4(2):201-7.

9- ANEXOS

9.1- Anexo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 220/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Clonagem, sequenciamento e imunolocalização de moléculas sinalizadoras da odontogênese no gambá *Didelphis albiventris*: um mamífero com dentição completa**", que tem como responsável(is) **Gerluz Aparecida Borges Silva**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **26/ 11/2008**.

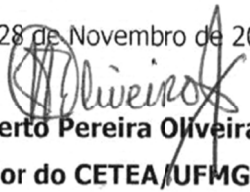
Este certificado expira-se em **26/ 11/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 220/2008**, related to the project entitled "**Cloning, sequencing and immunolocalization of signaling molecules of odontogenesis in opossum *Didelphis albiventris*: a mammal with complete dentition**", under the supervisors of **Gerluz Aparecida Borges Silva**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 26, 2008**.

This certificate expires in **November 26, 2013**.

Belo Horizonte, 28 de Novembro de 2008.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

9.2- Anexo 2



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27354-2	Data da Emissão: 09/09/2012 20:03	Data para Revalidação*: 09/10/2013
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Gerluzia Aparecida Borges Silva	CPF: 685.499.226-15
Título do Projeto: CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E IMUNOLocalização DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS DA ODONTOGÊNESE NO GAMBÁ <i>Didelphis albiventris</i> : UM MAMÍFERO COM DENTIÇÃO COMPLETA.	
Nome da Instituição: Instituto de Ciências Biológicas/UFMG	CNPJ: 17.217.985/0013-48

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura de fêmeas de <i>D. albiventris</i> prenhes para coleta de embriões	07/2011	10/2011
2	Processamento de amostras de embriões - Métodos de biologia molecular	07/2011	06/2012
3	Processamento de amostras de embriões para histologia e imunohistoquímica	07/2011	06/2012
4	2ª Captura (se não conseguirmos todos os embriões na 1ª captura) de fêmeas prenhes de <i>D. albiventris</i>	07/2012	10/2012
5	Processamento (biologia molec, histologia e imunohistoquímica) dos embriões coletados em 2012	07/2012	12/2012

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que específica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Francisco de Assis Pinheiro Cotrim	tecnico	025.877.396-08	m6381302 ssp-mg-MG	Brasileira
2	Erika Cristina Jorge	professor pesquisador	261.370.228-11	25521816-3 SSP-SP	Brasileira
3	Cristiane Aparecida de Sousa	pesquisador	075.194.176-03	m9 168187 ssp-mg-MG	Brasileira
4	Íria Gabriela Dias dos Santos	Aluna de Iniciação Científica - pesquisadora	015.338.906-09	MG14271948 IIPC-MG	Brasileira
5	Guilherme Alberto Loureiro Leandro	Pesquisador	924.721.256-15	m6098276 ssp-mg-MG	Brasileira
6	ALFREDO MIRANDA DE GOES	Professor Pesquisador	084.342.205-04	000000000 SSP-MG	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 99931611



Página 1/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27354-2	Data da Emissão: 09/09/2012 20:03	Data para Revalidação*: 09/10/2013
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Gerluzia Aparecida Borges Silva	CPF: 665.499.226-15
Título do Projeto: CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E IMUNOCLOCALIZAÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS DA ODONTOGÊNESE NO GAMBÁ <i>Didelphis albiventris</i> : UM MAMÍFERO COM DENTIÇÃO COMPLETA.	
Nome da Instituição : Instituto de Ciências Biológicas/UFMG	CNPJ: 17.217.985/0013-48

7

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BELO HORIZONTE	MG	Estação Ecológica - Mata da Univ. Federal de Minas Gerais	Fora de UC Federal
2	BELO HORIZONTE	MG	Instituto de Ciências Biológicas da UFMG	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Didelphis</i> , <i>Didelphis albiventris</i>
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Didelphis albiventris</i> (*Qtde: 6), <i>Didelphis</i> (*Qtde: 6)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	<i>Didelphis albiventris</i> , <i>Dicelphis</i>

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
---	---	---

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Instituto de Ciências Biológicas/UFMG	Instituto de Pesquisa - ICB/UFMG

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 99931611



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27354-2	Data da Emissão: 09/09/2012 20:03	Data para Revalidação*: 09/10/2013
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Gerluzia Aparecida Borges Silva	CPF: 665.499.226-15
Título do Projeto: CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E IMUNOCLOCALIZAÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS DA ODONTOGÊNESE NO GAMBÁ <i>Didelphis albiventris</i> : UM MAMÍFERO COM DENTIÇÃO COMPLETA.	
Nome da Instituição : Instituto de Ciências Biológicas/UFMG	CNPJ: 17.217.985/0013-48

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 99931611



Página 3/3