

JULIANA CRISTINA PEIXOTO CONCEIÇÃO

Estudo histológico e imunohistoquímico da degeneração da região central da cartilagem de Meckel na mandíbula em desenvolvimento de ratos

São Paulo

2021

JULIANA CRISTINA PEIXOTO CONCEIÇÃO

Estudo histológico e imunohistoquímico da degeneração da região central da cartilagem de Meckel na mandíbula em desenvolvimento de ratos

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biologia Oral) para obter o título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Víctor Elias Arana Chavez

São Paulo

2021

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Conceição, Juliana Cristina Peixoto.

Estudo histológico e imunohistoquímico da degeneração da região central da cartilagem de Meckel na mandíbula em desenvolvimento de ratos / Juliana Cristina Peixoto Conceição; orientador Víctor Elias Arana-Chavez. -- São Paulo, 2021.

75 p. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão corrigida.

1. Cartilagem. 2. Mandíbula. 3. Osteopontina. 4. Osteoclasto. I. Arana Chavez, Victor Elias. II. Título.

Conceição JCP. Estudo histológico e imunohistoquímico da degeneração da região central da cartilagem de Meckel na mandíbula em desenvolvimento de ratos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 23/11/ 2021

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a) Claudio Aparecido Casatti

Instituição: Universidade Estadual Paulista (UNESP – Araçatuba) Julgamento: APROVADA

Prof(a). Dr(a) Liriane Baratella Evêncio

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Julgamento: APROVADA

Prof(a). Dr(a) Paula Dechichi

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU) Julgamento: APROVADA

Ao meu protetor e zeloso guardador, meu Deus por ter me permitido galgar esse caminho e interceder por mim em todos os momentos. A certeza de poder contar com Ele, é a minha força para tudo e qualquer coisa.

Aos meus pais por sempre acreditarem, confiarem e apostarem em mim e nas minhas capacidades. O apoio e a fonte de amor inesgotável são o meu combustível para sempre persistir.

Ao meu irmão por todo o apoio e ajuda para que este sonho se tornasse alcançável.

Aos meus amigos, Jair e Luanna não só por dividirem a mesma casa, mas também por dividirem todas as aflições, medos e muitas alegrias. Essa união me fortaleceu diariamente.

Às minhas amigas Samar e Letícia que estiveram ao meu lado e me incentivaram em todo o caminho percorrido.

À família Luna que se tornou um complemento da minha família e poder tê-los fazendo parte da minha história e vida é um grande acalento para o meu coração.

Aos meus amigos de graduação que cresceram profissionalmente e pessoalmente comigo e sempre me apoiaram e aconselharam na busca por fazer as melhores escolhas.

Às minhas amigas de colégio e da minha terra natal por quem tenho muita consideração e nunca soltaram a minha mão mesmo com toda a distância física que existiu entre nós.

AGRADECIMENTOS

A minha professora de graduação e orientadora de iniciação científica (PIBIC) Liriane Baratella-Evêncio por ter me dado conselhos e alicerce para que essa nova caminhada pudesse ser iniciada.

A minha casa e berço acadêmico, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por ter consolidado em mim toda a minha base de formação para que novos desafios pudessem ser enfrentados.

Ao meu orientador Prof. Victor Elias Arana-Chavez por me conceder a incrível oportunidade de adentrar nesse mundo científico e acadêmico e compartilhar seu admirável e potente acervo de conhecimento. Além de sua paciência, disponibilidade e confiança para a execução desse trabalho.

A Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) por abrir as portas para mim e permitir que eu tivesse acesso aos melhores recursos de pesquisa e ensino do país.

Aos professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral e do programa de Odontologia por compartilharem generosamente seus saberes conquistados e dedicadamente exercerem a docência.

Ao saudoso e estimado Prof. Jarbas Arruda Bauer do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP) com quem tive o imenso prazer de conviver e aprender. Me sinto honrada e privilegiada de ter conhecido esse grande mestre, além de poder ter tido a sua presença em minha banca de qualificação do mestrado.

Aos técnicos do laboratório de Biologia Oral, Elis Chinen e Douglas por toda a assistência e paciência em ensinar e auxiliar nos experimentos, assim como no cuidado e manuseio dos animais no biotério.

As secretárias do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, Rosa Nogueira (Rosinha) e Elidamar (Eli) por todo acolhimento, recepção e carinho, desde a minha chegada até as fases finais.

As amigadas que conquistei nessa jornada de pós-graduação, Bruna, Mylena, Isa e Mari por contribuírem para que muitos momentos se tornassem leves durante as aulas, idas ao bandeirão e os trajetos de ir e vir compartilhados.

Aos companheiros de laboratório, Taís, Lorraine, Simone, Claudia, Andressa, Marlus, Kareen, Hector, Giovanna e Fernanda por dividirem generosamente suas experiências, ajudarem a contornar e vencer as dificuldades de uma rotina em laboratório e compartilharem agradáveis dias regados a um bom café e boas trocas.

A bibliotecária Glauci por todo o apoio, auxílio e carinho nessa etapa final de conclusão da dissertação do mestrado.

Ao CnPq pelo fundamental suporte financeiro durante o período de execução da pesquisa.

**"Se enxerguei mais longe, foi porque me
apoei em ombros de gigantes"**

(Isaac Newton)

RESUMO

Conceição JCP. Estudo histológico e imunohistoquímico da degeneração da região central da cartilagem de Meckel na mandíbula em desenvolvimento de ratos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021. Versão corrigida.

A cartilagem de Meckel é uma estrutura transitória embrionária presente durante os estágios iniciais da formação da mandíbula, localizada em toda sua extensão e dividida em três porções, anterior, intermediária e posterior. O enfoque deste trabalho foi direcionado à elucidação do destino final da porção intermediária por meio de um estudo temporal sequenciado. Por isso, foi investigado a presença de células de reabsorção e a presença de fibras colágenas, bem como da proteína óssea osteopontina (OPN) na cartilagem de Meckel na região do germe do 1º molar inferior e no seu entorno. Foram utilizados fetos de ratos Wistar em períodos gestacionais pré-estabelecidos, G18 a G21 (grupos de dias intrauterinos), bem como P0 e P1 (recém-nascidos) para remoção das cabeças. Em sequência, os espécimes foram fixados em solução de formaldeído 4% + glutaraldeído 0,1% com tampão fosfato 0,1M, descalcificados em EDTA 4,13%, desidratados em concentrações crescentes de etanol e incluídos em parafina. As amostras foram coradas em hematoxilina e eosina (HE) e tricrômico de Mallory para análise histológica. Adicionalmente, os grupos G19 a P0 foram submetidos à reação histoquímica de TRAP para determinação da presença de células clásticas. Além disso, os grupos G21 e P0 (dia do nascimento) passaram por reações de imunomarcção para análise da expressão de OPN. Foi observado a degeneração gradual da cartilagem com a observação de mudanças estruturais, a justaposição de células clásticas na superfície da cartilagem por reação histoquímica TRAP a partir do G21, o aparecimento de colágeno tipo I nas fases terminais da degeneração, assim como a marcação positiva para a osteopontina na superfície de G21 e em todo o remanescente da cartilagem de Meckel no grupo P0. O estudo apontou um processo de degeneração da cartilagem com evidências de formação de matriz mineralizada de natureza óssea, a qual foi reabsorvida por células clásticas, sugerindo a ossificação da porção intermediária da cartilagem de Meckel.

Palavras chave: Cartilagem. Mandíbula. Osteopontina. Osteoclasto.

ABSTRACT

Conceição JCP. Histological and immunohistochemical study of the degeneration of the central region of Meckel's cartilage in the developing mandible of rats [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021. Versão corrigida.

Meckel's cartilage is an embryonic transitional structure present during the early stages of mandible formation, located throughout its length and divided into three portions, anterior, intermediate, and posterior. The focus of this study was directed to elucidate the final destination of the intermediate portion through of a sequenced temporal study. Therefore, the presence of resorption cells and the presence of collagen fibers, as well as the bone protein osteopontin (OPN) in Meckel's cartilage and around the germ region of the mandibular 1st molar, were investigated. Wistar rat fetuses at pre-established gestational periods, G18 to G21 (intrauterine day groups), as well as P0 and P1 (newborns), were used for head removal. The specimens were then fixed in a 4% formaldehyde + 0.1% glutaraldehyde solution with 0.1M phosphate buffer, decalcified in 4.13% EDTA, dehydrated in increasing concentrations of ethanol, and embedded in paraffin. The samples were stained in hematoxylin and eosin (HE) and Mallory's trichrome for histological analysis. Additionally, the G19 to P0 groups were subjected to TRAP histochemical reaction to determine the presence of clastic cells. In addition, groups G21, and P0 (day of birth) underwent immunolabeling reactions for analysis of OPN expression. Gradual cartilage degeneration was observed with the observation of structural changes, the juxtaposition of clastic cells on the cartilage surface by TRAP histochemical reaction starting from G21, the appearance of type I collagen in the terminal stages of degeneration, as well as positive labeling for osteopontin on the surface of G21 and on the entire remnant of Meckel's cartilage in the P0 group. The study pointed to a process of cartilage disintegration with evidence of bone mineral matrix formation, which was resorbed by clastic cells, suggesting ossification of the middle portion of Meckel's cartilage.

Key words: Cartilage. Jaw. Osteopontin. Osteoclast.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Representação da área objeto de estudo. Cartilagem de Meckel (amarelo); Germe do incisivo e molar (verde); Mandíbula (cinza)..... 40
- Figura 4.2 - Esquema da técnica do esfregaço. Cotonete é inserido na vagina do animal para coleta e coloração 41
- Figura 4.3 - Espermatozóides visualizados no esfregaço vaginal sob microscopia de luz 42
- Figura 5.1 - G18 (18 dias intrauterino). **a:** vista panorâmica de hemimandíbula, mostrando germe dentário em fase de capuz (GD), língua (L), regiões de ossificação (O) e cartilagem de Meckel (CM); **b:** cartilagem de Meckel com aspecto típico de cartilagem hialina; **c:** osso recém formado ao redor da cartilagem com presença de células clásticas (setas); **d:** região de trabeculado ósseo no entorno da cartilagem intensamente corada em azul pelo tricrômico de Mallory. Aumentos originais: **a:** 40x; **b:** 200x; **c:** 400x; **d:** 200x..... 48
- Figura 5.2 - G19 (19 dias intrauterino). **a:** vista panorâmica de hemimandíbula, mostrando germe dentário em fase de capuz (GD), língua (L), trabeculado ósseo (O) e cartilagem de Meckel (CM); **b:** cartilagem de Meckel mostrando o aspecto normal de uma cartilagem hialina; **c:** matriz do trabeculado ósseo no entorno da cartilagem intensamente corada em azul pelo tricrômico de Mallory; **d:** células clásticas TRAP-positivas nas superfícies ósseas (setas). Aumentos originais: **a:** 100x; **b:** 200x; **c:** 200x; **d:** 200x..... 49
- Figura 5.3 - G20 (20 dias intrauterino). **a:** hemimandíbula visualizando germe dentário em fase de campânula (GD), língua (L), osso (O) e cartilagem de Meckel (CM); **b:** cartilagem de Meckel com aspecto normal de cartilagem hialina; **c:** matriz do trabeculado ósseo corada intensamente pelo tricrômico de Mallory e leve coloração no pericôndrio da cartilagem (cabeça de seta); **d:** células clásticas TRAP-positivas nas superfícies ósseas (setas); Aumentos originais: **a:** 100x; **b:** 200x; **c:** 200x; **d:** 200x 52
- Figura 5.4 - G21 (21 dias intrauterino). **a:** cartilagem de Meckel com alteração de coloração na matriz extracelular da superfície (cabeça de seta); **b:** matriz do trabeculado ósseo corada intensamente pelo tricrômico de Mallory e coloração mais forte no pericôndrio da cartilagem (cabeça de seta); **c:** células clásticas TRAP-positivas na superfície da cartilagem de Meckel (setas), melhor observadas no detalhe em maior aumento. **d:** imunomarcagem intensa para osteopontina (OPN), em marrom, na matriz do trabeculado ósseo e marcação sutil na superfície (cabeça de seta) da cartilagem de Meckel; Aumentos originais: **a:** 200x; **b:** 200x; **c:** 400x; **d:** 200x 54

Figura 5.5 Imunomarcção positiva para osteopontina (OPN), em marrom, apenas na região de trabeculado ósseo que circunda as cartilagens nasais (asteriscos). Observar que as cartilagens, inclusive seu pericôndrio, aparecem livres de imunomarcção..... 55

Figura 5.6 - P0 (dia do nascimento). **a:** hemimandíbula visualizando germe dentário em fase de coroa (GD), língua (L), osso (O) e cartilagem de Meckel (CM); **b:** cartilagem de Meckel com superfície (cabeça de seta) irregular e alteração de coloração; **c:** células clásticas TRAP-positivas na superfície da cartilagem de Meckel (setas) **d:** imunomarcção positiva para osteopontina (OPN), em marrom, na matriz extracelular do remanescente da CM (seta fina) e no trabeculado ósseo circundante; Aumentos originais: **a:** 40x; **b:** 200x; **c:** 400x; **d:** 400x..... 57

Figura 5.7 - P1 (um dia após o nascimento). **a:** hemimandíbula visualizando germe dentário em fase de coroa (GD), língua (L), osso (O), músculo (M) e cartilagem de Meckel (CM); **b:** remanescente da cartilagem de Meckel em espécime corado pela hematoxilina e eosina em meio ao trabeculado ósseo (setas) da mandíbula. Aumentos originais: **a:** 40x; **b:** 400x..... 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Beclin1	proteína marcadora de autofagia
BMP	proteína morfogenética óssea
BSP	sialoproteína óssea
CD44	receptor de ácido hialurônico
D1	primeiro dia de gestação
DMP-1	fosfoproteína de matriz dentinária 1
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
G18	18 dias intrauterino
G19	19 dias intrauterino
G20	20 dias intrauterino
G21	21 dias intrauterino
Hsp	proteína de choque térmico
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IL-3	interleucina 3
LC3	proteínas ligadas aos microtúbulos de cadeia leve 3
M-CFS	fator estimulante de colônia de macrófagos
MMP	metaloproteinase
OPG	osteoprotegerina
OPN	osteopontina
OSX	osterix
P0	dia do nascimento
P1	um dia pós nascimento
pH	concentração de íon hidrogênio
PTH	paratormônio
RANK	receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANK-L	ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
SIBLING	família de glicoproteínas ligantes de integrina
SPP1	fosfoproteína secretada 1
TRAP	fosfatase ácida tartarato resistente
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

g	gramas
°C	graus Celsius
M	molaridade
μm	micrometro
ml	mililitros
mg	miligrama
N	grupo químico amina
MgCl	cloreto de magnésio
μM	micromolar
x	multiplicador

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	CARTILAGEM HIALINA	26
2.2	CARTILAGEM DE MECKEL	28
2.3	PORÇÃO INTERMEDIÁRIA DA CARTILAGEM DE MECKEL	30
2.4	PROTEÍNAS NÃO COLÁGENAS ÓSSEAS: A OSTEOPONTINA	33
2.5	OSTEOCLASTOS	35
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	MANUSEIO DOS ANIMAIS	39
4.2	OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES	40
4.3	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E MICROSCOPIA DE LUZ	43
4.4	HISTOQUÍMICA TRAP	44
4.5	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA OSTEOPONTINA (OPN)	44
5	RESULTADOS	47
5.1	G18 - 18 DIAS INTRAUTERINO	47
5.2	G19 - 19 DIAS INTRAUTERINO	49
5.3	G20 - 20 DIAS INTRAUTERINO	51
5.4	G21 - 21 DIAS INTRAUTERINO	53
5.5	P0 - DIA DO NASCIMENTO	56
5.6	P1 - UM DIA APÓS O NASCIMENTO	58
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS	75

1 INTRODUÇÃO

A cartilagem de Meckel é uma estrutura embrionária encontrada durante o desenvolvimento da mandíbula. Apresenta-se como um cilindro alongado de cartilagem hialina, estendendo-se por cada hemimandíbula em formação. Apesar de ser uma estrutura transitória, a cartilagem é fundamental para o desenvolvimento ao servir de suporte durante o processo de ossificação da mandíbula (Ramaesh; Bard, 2003; Amano et al., 2010; Svandova et al., 2020).

A origem da cartilagem de Meckel ocorre a partir das células derivadas da crista neural do primeiro arco faríngeo que se condensam próximo à região de desenvolvimento do germe dentário do primeiro molar inferior (Ito et al., 2002). Essas células se diferenciam em condrócitos que posteriormente se organizam para adquirir o formato de bastonete característico da cartilagem. Nesse período, pontos de ossificação intramembranosa surgem também ao entorno do germe do primeiro molar inferior. Apesar de ter sido sugerido, a possibilidade de indução entre a cartilagem de Meckel e o início da ossificação intramembranosa (Frommer; Margolies, 1971), não existem evidências conclusivas a respeito disso.

A contribuição da cartilagem de Meckel para o desenvolvimento de novas estruturas é atribuído aos diferentes destinos resultantes de cada uma das suas porções. Estando a porção mais anterior relacionada à formação da sínfise mandibular por ossificação endocondral, a intermediária, que é comumente subdividida na literatura em região anterior e posterior, esta última contribuindo com a formação dos ligamentos anterior do martelo e eseno mandibular; já a porção mais posterior passa por ossificação endocondral para formar os ossículos do ouvido médio, martelo e bigorna (Ito et al., 2002; Shimo et al., 2004; Amin; Tucker, 2006; Anthwal et al., 2013).

A porção intermediária da cartilagem de Meckel corresponde à maior parte da estrutura e existem lacunas na compreensão da destinação final desta região. O desaparecimento deste segmento no rato, ocorre no período pós-natal, enquanto as outras regiões da cartilagem formam novas estruturas. Por conta disso, existem algumas correntes que tentam explicar os meios que levam à degeneração dessa

região da cartilagem de Meckel (Svandova et al., 2020). Ainda é indefinido se o processo de degeneração ocorre por mecanismos de morte celular ou por ossificação, auxiliando na formação da mandíbula. Para fins de estudo, é útil existir uma delimitação ainda mais específica de suas partes. Sendo assim, foi ponto de interesse deste trabalho, a avaliação direcionada à porção correspondente à presença do germe do 1º molar inferior.

A falta de esclarecimentos definitivos na literatura a respeito do destino final da região intermediária da cartilagem de Meckel abre espaço para que novos estudos sejam realizados com o objetivo de encontrar evidências que possam apontar para a ossificação ou degeneração do remanescente dessa estrutura por outros mecanismos.

O estudo sequenciado do período de desenvolvimento e degeneração da cartilagem de Meckel e a análise por métodos histológicos e imunohistoquímicos mostrou-se como um caminho promissor para o entendimento das mudanças que ocorrem durante as fases terminais da porção intermediária da cartilagem de Meckel. Assim como, o papel da proteína osteopontina como marcador ósseo, é uma ferramenta importante para caracterização da presença de tecido ósseo, devido à sua ausência na matriz cartilaginosa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A cartilagem de Meckel foi primeiramente descrita há 200 anos atrás por um anatomista e cirurgião obstetra alemão chamado Johann Friedrich Meckel em sua obra *Handbuch der menschlichen Anatomie*, sendo batizada com esse nome por seus seguidores e em homenagem ao cientista. A primeira descrição da estrutura apresentava-se como um apêndice cartilaginoso em formato cônico, muito alongado, estendendo-se da parte posterior à anterior da mandíbula, onde se afunila e não se ossifica Meckel¹(1820, apud Svandova et al., 2020; Amano et al., 2010).

Consiste em uma estrutura oriunda de células do primeiro arco faríngeo, localizada na região inferior que contribuirá e servirá de suporte para a formação da futura mandíbula, desenvolvendo um papel fundamental no desenvolvimento e evolução desse osso em vertebrados (Svandova et al., 2020).

Os órgãos e tecidos dos corpos dos vertebrados podem ter origem a partir dos três folículos embrionários fundamentais: ectoderma, mesoderma e endoderma. Assim como os ossos do crânio, dentina, polpa dental, cimento e periodonto, a cartilagem de Meckel é ectomesenquimal, derivada das células da crista neural que migram em direção ao primeiro arco faríngeo, diferentemente dos outros tecidos de conexão, ossos e cartilagem do corpo que possuem origem através do mesoderma. (Nanci, 2008) Um estudo realizado por meio de um sistema transgênico com a análise sob a expressão do transgene *Wnt1* evidenciou a contribuição das células da crista neural na diferenciação e formação da papila dentária, odontoblastos, polpa, cimento, ligamento periodontal, mandíbula e condrócitos da cartilagem de Meckel (Chai et al., 2000).

Estabelecida como duas hastes de cartilagem de hialina que atravessam a face lateral da mandíbula no período embrionário. A cartilagem de Meckel está presente durante a formação da mandíbula, iniciando desde os estágios intermediários fetais até os estágios pós-natais iniciais. Em aves e répteis, essa estrutura permanece sem sofrer ossificação e servindo de alicerce para o osso da mandíbula que a envolve, já em mamíferos, essa cartilagem sofre degeneração e não

Meckel J F. *Handbuch der menschlichen Anatomie*. Berlin: Lehre und Geschichte des Foetud. 1820. IV

permanece em idade adulta (Wyganowska-Świątkowska; Przysańska, 2011; Anthwal et al. 2013).

Em humanos, as mudanças que ocorrem na cartilagem de Meckel ocorrem paralelamente ao desenvolvimento dos músculos. Músculos como milo-hióideo, genioglosso e gênio hioideo começam a aparecer e se anexam a cartilagem de Meckel, seguidos igualmente pelo músculo masseter. Diferentemente do que ocorre em ratos, na região mais anterior, há remanescentes da cartilagem de Meckel que permanecem como nódulos na superfície dorsal da sínfise mandibular e não há ossificação e fusão dessas extremidades ventrais da cartilagem (Rodríguez-Vázquez et al., 1997; Wyganowska-Świątkowska; Przysańska, 2011).

Defeitos no desenvolvimento da cartilagem de Meckel e mutações em genes que atuam nesse processo desencadeiam má formações relacionadas a formação do osso da mandíbula, por exemplo, agnatia, micrognatia ou hipoplasia mandibular. Esses defeitos mandibulares levam a problemas adicionais e secundários que repercutem em obstrução das vias aéreas e dificuldade de alimentação. Assim, o desenvolvimento normal e regular da cartilagem de Meckel é de extrema importância na determinação de fenótipos (Biosse Duplan et al., 2016; Manocha et al., 2019; Svandova et al., 2020).

A totalidade da cartilagem de Meckel no rato pode ser dividida para fins de estudos e observações. De acordo com os destinos finais, existem três porções: a porção anterior, intermediária, posterior (Shimo et al., 2004; Svandova et al., 2020). Além das subdivisões em regiões anterior e posterior, adicionalmente a porção intermediária pode ser subdivida em uma região central, correspondente à área do germe do 1º molar inferior.

2.1 CARTILAGEM HIALINA

A cartilagem hialina é o tipo de tecido cartilaginoso mais encontrado no corpo humano. Em embriões, é o primeiro arcabouço que posteriormente será substituído por tecido ósseo, já em adultos pode ser encontrado na região de fossas nasais, traqueia, brônquios e recobrimdo articulações dos ossos longos. Apresenta o aspecto

branco-azulada e translúcida (Junqueira; Carneiro, 2008; Arana-Chavez; Bradaschia, 2012).

A matriz da cartilagem hialina é composta por cerca de 70% a 80% por água, consiste em um gel de proteoglicanos hidratados reforçado por uma rede de fibrilas de colágeno tipo II que ocupam cerca de 40% da composição total, associadas com ácido hialurônico, proteoglicanos e glicoproteínas, sendo a glicoproteína condronectina um dos componentes principais, pois tem a capacidade de se ligar à condrocitos, fibrilas de colágeno tipo II e glicosaminoglicanos. Esses componentes conferem a característica de rigidez à matriz. (Junqueira; Carneiro, 2008; Becerra et al. 2010; Arana-Chavez; Bradaschia 2012).

As cartilagens são envolvidas por um pericôndrio rico em tecido conjuntivo denso que contribui para a reposição de condrocitos que ajuda no crescimento. Dentro dele, estão localizados vasos sanguíneos e linfáticos que são responsáveis pela nutrição e via de eliminação de metabólitos (Junqueira; Carneiro, 2008).

As células da cartilagem são denominadas de condrocitos; quando localizadas na região central são arredondadas, já na região de periferia, próximo ao pericôndrio, são denominadas condroblastos, os quais têm formato alongado que lembra a morfologia dos fibroblastos (Junqueira; Carneiro, 2008).

Em circunstâncias de hipertrofia dos condrocitos, a matriz extracelular da cartilagem passa por mudanças que alteram a sua composição. A síntese de colágeno tipo II é reduzida e a síntese de colágeno não fibrilar tipo X é iniciada. Além disso, condrocitos hipertróficos passam a secretar metaloproteinase 13 (MMP-13) que é capaz de degradar colágeno tipo II (Mackie et al., 2011).

A cartilagem de Meckel caracteriza-se por ser uma cartilagem hialina típica, onde os condrocitos encontram-se imersos em uma matriz fundamentada em colágeno tipo II e proliferam-se acompanhando seu crescimento. É margeada por um pericôndrio que permite um crescimento adicional por meio da diferenciação e proliferação dos condrocitos localizados nessa posição (Amano et al., 2010). Bem como, possui também em sua matriz proteoglicanos típicos como agrecan, decorin, biglican e lumican, com distribuição espaço temporal e quantitativa variada, o que deve permitir a consolidação de propriedades mecânicas características da cartilagem (Ababneh; Al-Khateeb, 2009). Adicionalmente à sua composição, foi identificada

também a presença da fosfoproteína extracelular de matriz como integrante do grupo de proteínas de matriz, estando relacionada e com expressão aumentada nas camadas de condrócitos hipertróficos, sugerindo envolvimento em um possível processo da mineralização da cartilagem (Shibata et al., 2013).

2.2 CARTILAGEM DE MECKEL

O desenvolvimento da cartilagem de Meckel ocorre bilateralmente, a partir da região mediana do processo mandibular em que o mesênquima passa por condensação e diferenciação em pré condrócitos. Esse processo segue, de modo que a cartilagem se expande para a frente e alonga-se vento medial até formar a barra cartilaginosa em forma de “V” que posteriormente funde-se na sua porção mais anterior, formando uma estrutura de terminologia conhecida como processo rostral. Enquanto isso, na extremidade oposta, a cartilagem cresce para trás e para fora, formando um processo de gancho que culminará nos primórdios do osso martelo e bigorna do ouvido (Bhaskar et al., 1953; Amano et al., 2010).

Os estágios iniciais de desenvolvimento da cartilagem de Meckel, o que em roedores, correspondente ao período E10 – E11, caracteriza-se por células mesenquimais condensadas sem secreção de matriz cartilaginosa. A partir do dia E13, são encontrados pré condroblastos pequenos, arredondados e fortemente compactados. A medida que a diferenciação avança, os condroblastos adquirem um arranjo mais frouxo e organizam-se na estrutura lacunar de cartilagem embebida por matriz extracelular rica em colágeno tipo II (Frommer; Margolies, 1971; Svandova et al., 2020).

A cartilagem cresce seguindo uma orientação simultânea no sentido anterior e posterior, alongando-se concomitantemente e tendo um crescimento aposicional. Esse crescimento da cartilagem de Meckel deve ocorrer em sentido antero-posterior por meio da diferenciação e condensação gradual do mesênquima em condroblastos na região de extremidades das hastas cartilaginosas, enquanto o alargamento em orientação transversal para determinação de sua espessura é decorrente das diferentes velocidades de proliferação dos condroblastos, sendo os imaturos mais

ativos e os maduros com redução progressiva do poder proliferativo (Ramaesh; Bard, 2003; Kaucka et al., 2017).

A sinalização parácrina está envolvida na regulação da proliferação condrocítica. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) derivado das células da crista neural, estabiliza a rede vascular da mandíbula e permite que fatores derivados dos vasos sanguíneos organizem a morfogênese da cartilagem de Meckel, gerenciando a expansão normal da mandíbula. Bem como também, o fator de crescimento de insulina (IGF) foi identificado como contribuinte no crescimento da cartilagem durante o desenvolvimento embrionário (Wiszniak et al., 2015; Marchant et al., 2020).

O desenvolvimento da cartilagem continua e sua porção mais anterior e ventral culmina na formação da sínfise mandibular, havendo fusão das vertentes anteriores de ambos os lados da cartilagem em roedores. Na região mais proximal e posterior, a cartilagem de Meckel se curva lateralmente findando na formação dos ossículos do ouvido (Bhaskar et al., 1953; Radlanski; Renz, 2003).

Depois da sua maturação e estabelecimento, a partir de E15, condrócitos adjacentes aos centros de ossificação da mandíbula começam a apresentar hipertrofia e na sequência passam a expressar colágeno tipo X na região intermediária, assim como há a expressão de fosfatase alcalina no pericôndrio (Granstrom et al., 1988; Ishizeki et al., 1999). Em E16 inicia-se calcificação nessa área com a subsequente invasão por capilares. Em E18, a matriz calcificada está em ativo processo de reabsorção com a massiva entrada de osteoclastos/condroclastos e osteoblastos, células provenientes de precursores da medula óssea carregadas por vasos sanguíneos invasores (Ishizeki et al., 1999).

No período de nascimento, o desenvolvimento do incisivo inferior é visível e o tecido ósseo, resultante de ossificação intramembranosa, responsável pela formação do corpo da mandíbula naquela região, substitui a cartilagem de Meckel, não existindo mais o reconhecimento da estrutura. A degeneração da região anterior da porção intermediária da cartilagem acompanha o sentido dos incisivos em direção a região de molar (Ishizeki et al., 1999; Amano et al., 2010).

A degeneração da região anterior da porção intermediária da cartilagem de Meckel é acompanhada por alguns eventos semelhantes aos que ocorrem dentro do

processo de ossificação endocondral. O fenômeno de ossificação pericondral é determinado pela formação de uma camada de matriz mineralizada ao redor do molde cartilaginoso, caracterizando o surgimento de um colar ósseo. Esse colar ósseo impede a passagem de nutrientes para o centro da cartilagem, levando a hipertrofia dos condrócitos centrais que interrompem a secreção de colágeno tipo II e iniciam a síntese de colágeno tipo X (Arana-Chavez; Bradaschia, 2012). Além disso, há a excreção de metaloproteinases que contribuem para a degradação de componentes da matriz extracelular da cartilagem, bem como começam a apresentar a presença de atividade de fosfatase alcalina (Adams; Shapiro, 2002).

A porção intermediária sofre degeneração e desaparece no período pós-natal. A região anterior da porção intermediária está alinhada com a ossificação da mandíbula ao seu redor e passa pelo processo de invasão das células ósseas. Já a porção posterior da mesma, não se relaciona com a formação da mandíbula, mas sim com a formação do ligamento eseno mandibular através da transformação fenotípica dos condrócitos em fibroblastos (Amano et al., 2010; Ishizeki et al., 2001).

2.3 PORÇÃO INTERMEDIÁRIA DA CARTILAGEM DE MECKEL

A porção intermediária da cartilagem de Meckel é frequentemente subdivida em duas regiões, anterior e posterior, sendo a anterior alvo de duas vertentes hipotéticas a respeito de seu destino final. Existem evidências que apontam para uma contribuição na ossificação da mandíbula e outras que direcionam para uma degeneração da mesma por mecanismos de mortes celular (Svandova et al., 2020).

A degeneração da região anterior do segmento intermediário da cartilagem de Meckel em suas etapas finais demonstra uma aproximação do tecido ósseo mandibular intramembranoso recém-formado nas redondezas com o pericôndrio da cartilagem. Além disso, o recrutamento e acercamento de células clásticas é reconhecido nesse momento (Frommer; Margolies, 1971; Amano et al., 2010).

A transição de condrócitos maduros para condrócitos com hipertrofia da cartilagem de Meckel no período intermediário do desenvolvimento intrauterino é

evidenciado pela expressão de colágeno tipo X e componentes relacionados com a ossificação endocondral como, metalproteinase 9 (MMP-9), osteopontina (OPN) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que foram expressos em condrócitos pós hipertróficos durante E18 em embriões de ratos (Shimo et al., 2004).

A degradação e remodelação da matriz de cartilagens pode ser atribuída ao papel das metaloproteinases, uma família de proteínas relacionadas com a degradação de componentes de matriz extracelular. Os subtipos dessas proteínas dizem respeito ao substrato alvo de ação e a cascata de ativação entre elas determina a forma da reestruturação e mudança. Assim como ocorre na ossificação endocondral, essa classe de proteínas promove os processos proteolíticos e altera a composição da cartilagem, contribuindo para a reabsorção e morte celular dos condrócitos. Entretanto, o padrão de expressão das metaloproteinases encontrado na cartilagem de Meckel apresenta diferenças do previsto na ossificação endocondral, podendo sugerir uma modificação no perfil de acionamento das mesmas (Vu; Werb, 2000; Sakakura et al., 2007).

O sistema de sinalização RANK/RANK-L/OPG regula positivamente e negativamente a ativação e diferenciação das células clásticas responsáveis pelo processo de reabsorção de tecidos mineralizados (Arana-Chavez; Bradaschia, 2012). A molécula ligante RANK-L foi detectada em uma série de tecidos, inclusive em osteoblastos e condrócitos pré hipertróficos e hipertróficos localizados em cartilagens de ossos longos (Kartsogiannis et al., 1999). A identificação do padrão de expressão dos componentes desse sistema regulatório foi determinado na cartilagem de Meckel de camundongos no período embrionário de E14-E16 na região correspondente à altura do germe do incisivo. A expressão dessas moléculas esteve fortemente evidenciada nos sítios de reabsorção e em condrócitos hipertróficos (Sakakura et al., 2005).

A expressão de proteínas ósseas características nos condrócitos da cartilagem de Meckel foi observada em estudos, especialmente em períodos correspondentes ao momento de degeneração da cartilagem. Proteínas como, osteocalcina, osteonectina, osteopontina e proteína morfogenética óssea apresentaram marcações por reações de imuno-histoquímica e fluorescência. Além da capacidade de maquinaria interna celular dos condrócitos que são capazes de sintetizar colágeno tipo II em determinado momento do desenvolvimento, colágeno

tipo X durante a hipertrofia e colágeno tipo I. A detecção de matriz calcificada por coloração de Von Kossa evidenciou pontos de mineralização, principalmente em áreas de início de reabsorção (Harada; Ishizeki, 1998; Ishizeki et al., 1999; Ishizeki et al., 2009; Ishizeki, 2012; Wang et al., 2013).

As células da cartilagem de Meckel podem sofrer morte celular. A apoptose é um mecanismo essencial para o desaparecimento e adaptação de tecidos. Na ossificação endocondral, é bem estabelecido o papel da indução de morte celular por apoptose, quando alterações no microambiente por meio de mudanças nas concentrações de íons, peptídeos e glicanos estimulam a apoptose dos condrócitos (Shapiro et al., 2005). Entretanto, estudos em condrócitos da cartilagem de Meckel tem demonstrado que poucos condrócitos durante as fases de período embrionário tardio, sofrem apoptose através do método de detecção TUNEL. Células apoptóticas positivas foram identificadas na região lateral do pericôndrio no período de maturação da cartilagem, antes do início da degeneração. Assim, a apoptose não influencia o processo de degeneração da cartilagem, devendo contribuir durante as fases de diferenciação dos condroblastos no pericôndrio e/ou remoção de células que possam atrapalhar o crescimento lateral da cartilagem (Harada; Ishizeki, 1998; Amano et al., 2010).

Em estudo realizado por Shimada et al. (2003), foi identificado na cartilagem de Meckel, a expressão da proteína de choque térmico Hsp, conhecida por sua atuação como fator protetor e anti apoptótico diante de situações de estresse biológico, apresentando um perfil diferente de marcação do que é expresso em cartilagens que passam por ossificação endocondral e de outras partes do corpo. Na cartilagem de Meckel, a Hsp é expressa na fase de desenvolvimento com os condrócitos imaturos e em estado proliferação, enquanto que nas outras cartilagens é manifestada já na maturidade em condrócitos hipertróficos.

Outro mecanismo de morte celular pode estar envolvido na degeneração da região anterior da porção intermediária da cartilagem de Meckel. A autofagia é um mecanismo que diz respeito ao processo de degradação dos compartimentos internos celulares através de lisossomos que eliminam organelas danificadas ou funcionalmente inviáveis (Glick et al., 2010). Durante a fase correspondente ao período de degeneração da região central da cartilagem de Meckel, os marcadores

autofágicos Beclin1 e LC3 foram imuno localizados, principalmente, em áreas de condrócitos pré hipertróficos e hipertróficos (Yang et al., 2012).

A autofagia pode estar relacionada com a sobrevivência normal da cartilagem. Amostras de cartilagem de pacientes com osteoartrite foram analisadas e comparadas na presença do marcador Beclin1, havendo uma diminuição nos níveis em relação aos grupos controles. Quando submetidas a uma super expressão de Beclin1, houve um aumento da viabilidade celular e redução da apoptose nas amostras patológicas comparadas com os grupos que não receberam o tratamento com a proteína (Song et al., 2017).

2.4 PROTEÍNAS NÃO COLÁGENAS ÓSSEAS: A OSTEOPONTINA

A proteína osteopontina foi primeiramente reportada em 1979 por Senger, pertence à família de glicoproteínas ligantes de integrina (SIBLING) que incluem também componentes como sialoproteína óssea (BSP) e fosfoproteína de matriz dentinária 1 (DMP1). É decodificada pelo gene SPP1 que é mapeado através do cromossomo 4. É uma molécula solúvel de matriz extracelular e possui uma sequência aspartato-glicina-arginina que é reconhecida por seu potencial adesivo, sendo expressa em superfícies celulares com integrina (Oldberg et al., 1986; Fisher et al., 2001; Si et al., 2020).

A osteopontina (OPN) é uma proteína não colágena óssea com capacidade adesiva, secretada nos momentos de mineralização do tecido ósseo. Se acumula na região de interface célula-matriz e matriz-matriz, conhecida como linha cementante, e pode ser definida como um elemento de composição característico desse tecido (Arana-Chavez; Bradaschia, 2012; Barbosa, 2013).

A associação da osteopontina com o processo de biomineralização está relacionada com a ação regulatória na formação e crescimento dos cristais de hidroxiapatita por meio de regiões em sua estrutura com a habilidade de se ligar aos cristais. Dessa maneira, estudos tem demonstrado aumento de densidade dos tecidos mineralizados, a partir de amostras oriundas de ratos transgênicos com supressão da expressão de osteopontina, fortalecendo e reafirmando o papel dessa proteína no

controle da mineralização. Um desequilíbrio nesse sistema pode desencadear alterações fenotípicas no tecido ósseo (Boskey et al., 2002; McKee; Nanci, 1996; Holm et al., 2014; Foster et al., 2018).

A expressão da osteopontina pode ser identificada em tecidos mineralizados como osso, dentina e cimento, além de estar presente em condições patológicas de calcificação como aterosclerose, osteoporose e cálculos renais. Alterações nos níveis de osteopontina podem promover uma desregulação no equilíbrio da manutenção e renovação óssea, assim como estímulo para o surgimento de calcificações anormais e ectópicas (McKee; Nanci, 1996; Si et al., 2020).

A osteopontina é principalmente secretada pelos osteoblastos, mas pode ser também sintetizada por células progenitoras de osteogênese, células hematopoiéticas da medula óssea e indiferenciadas. Adicionando a isso, não pode ser encontrada em cartilagens mineralizadas, devido os condrócitos não secretarem essa proteína.

Em um contexto de altos níveis de íons cálcio no meio, resultantes da reabsorção óssea mediada por osteoclastos, células indiferenciadas são estimuladas para proliferarem e promoverem a mineralização da matriz através do aumento da expressão e secreção da osteopontina. Além disso, diante de condições de processos inflamatórios, ocorre um aumento da expressão de osteopontina que incita a expressão de proteínas integrinas nas células indiferenciadas, promovendo a migração dessas células através da ligação com as proteínas receptoras (Zou et al., 2011; Lee et al., 2018; Si et al., 2020).

A atuação dos osteoclastos é influenciada pela osteopontina, devido a interação com receptores de integrina e CD44 presentes na membrana dessas células que auxilia na ancoragem a superfície óssea, migração e motilidade. A ausência de osteopontina desencadeou osteoclastos com motilidade limitada e com redução da capacidade reabsortiva em estudo *in vitro*, quando houve a adição de OPN exógena, os clastos apresentaram retorno da motilidade normal e aumento da expressão do receptor CD44. Além disso, aumento da expressão de osteopontina induziu o aumento da expressão de RANKL e a atividade osteoclástica nas superfícies de osso alveolar (Chellaiah; Hruska, 2002; Chellaiah et al., 2003; Walker et al., 2010). Foi demonstrado a presença da osteopontina em lacunas de reabsorção, sugerindo a secreção dessa proteína também por parte dos osteoclastos (Luukkonen et al., 2019).

A propriedade adesiva da osteopontina tem grande importância no que diz respeito à construção de uma matriz óssea mineralizada e seu alto poder de afinidade de ligação com colágeno tipo I, atribuindo a essa proteína papéis especializados e direcionados no processo de mineralização (Bernards et al., 2008).

2.5 OSTEOCLASTOS

Os osteoclastos são células multinucleadas que possuem intensa capacidade reabsortiva. A ação dessas células pode resultar em extensas degradações de tecidos mineralizados. Tem como características principais a intensa habilidade em migrar para superfície óssea, poder de acidificação do meio para ser reabsorvido e internalização por endocitose dos produtos de degradação da matriz (Bruzzaniti; Baron 2006; Plotkin; Bruzzaniti, 2019).

Após a fixação no substrato que será reabsorvido, os osteoclastos mudam sua morfologia para uma maior adaptação à superfície, se tornando células polarizadas, permitindo assim a formação de dois domínios estruturais internos: zona clara e borda em escova. A zona clara é uma área rica em actina, envolve a região de borda em escova e tem a maquinaria que fixa o osteoclasto à matriz por meio de proteínas integrina, já a borda em escova é um domínio de invaginações da membrana celular, onde ocorre o bombeamento de íons e enzimas hidrolíticas para o tecido que será reabsorvido (Bruzzaniti; Baron, 2006)

A origem dos osteoclastos ocorre a partir de células mielóides hematopoiéticas que estimuladas por fatores como RANKL, fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) e interleucina-3 (IL-3) levam a proliferação, diferenciação e fusão dessas células. Esses fatores são secretados por células da medula óssea e osteoblastos. A regulação da expressão do ligante RANKL sob os osteoblastos e células indiferenciadas, é feita por meio da ação da vitamina D, do hormônio PTH, por prostaglandinas e por M-CSF, além da proteína solúvel osteoprotegerina (OPG) que se liga ao RANKL impedindo sua ligação e ativação dos osteoclastos (Bruzzaniti; Baron, 2006; Arana-Chavez; Bradaschia, 2012).

Os osteoclastos fazem parte da manutenção da homeostase óssea e em sincronia com os osteoblastos conduzem a remodelação óssea. Uma instabilidade na harmonia desse sistema, pode provocar o surgimento de patologias ósseas. Esse sistema é regulado por fatores como hormônios, proteínas, moléculas de matriz celular e interações com outros tipos celulares (Zhao et al., 2021).

A remodelação óssea é resultado de uma sincronia e influência mútua entre osteoblastos e osteoclastos. Da mesma forma que os osteoblastos podem interferir na ativação e diferenciação osteoclástica, os osteoclastos podem estimular a formação óssea através da liberação de fatores localizados no interior de matrizes ósseas durante o processo de reabsorção e também por meio da ação de fatores derivados dos próprios osteoclastos, conhecidos como clastoquinas (Teti, 2013; Sims; Martin 2014).

O processo de reabsorção da cartilagem hipertrófica pelos osteoclastos é diferente do que ocorre na reabsorção óssea, pois o primeiro ocorre de maneira independente do funcionamento da borda em escova com a acidificação do meio para dissolução de minerais, já o segundo é dependente, de maneira que a atividade da zona clara com a liberação de vesículas ácidas é essencial para a reabsorção do osso (Touaitahuata et al., 2014).

Um estudo realizado por Lofvall et al. (2018) em meio de cultura com amostras de três compartimentos de articulação bovina, osso subcondral, cartilagem articular e osso cortical, mostrou a capacidade de degradação dos osteoclastos diante dos diferentes componentes da articulação, evidenciando que essas células podem reabsorver cartilagem articular e cartilagem calcificada, independente do mecanismo de acidificação, sugerindo que o desempenho da função do osteoclasto ocorre mediante o substrato de ação através da participação dos seus diferentes processos internos envolvidos na reabsorção.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo sequenciado sobre o processo de degeneração da região central da porção intermediária da cartilagem de Meckel de fetos de ratos durante períodos intrauterinos (G18 a G21) e períodos neonatais (P0 e P1) por meio de análise histológica, histoquímica e imuno-histoquímica.

Assim, este trabalho investigou os seguintes aspectos relacionados à extinção da cartilagem de Meckel:

- Avaliação morfológica da cartilagem de Meckel com ênfase na organização estrutural das suas células e da matriz, bem como das células de reabsorção ao seu redor;
- Avaliação da presença de fibras de colágeno tipo I por meio do tricrômico de Mallory na cartilagem e no osso em formação ao seu redor;
- Análise histoquímica da presença das células clásticas (TRAP positivas) na cartilagem e adjacências;
- Determinação imuno-histoquímica da presença da proteína osteopontina (OPN) no período de degeneração da porção intermediária da cartilagem de Meckel.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo registrado com o número de protocolo 12/2021 foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), atestando a concordância com os preceitos da Lei nº 11.794 do Decreto nº 6.899 e com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). (Anexo A)

4.1 MANUSEIO DOS ANIMAIS

Para este estudo da cartilagem de Meckel em desenvolvimento, foram utilizados fetos de ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), obtidos a partir de animais oriundos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), pesavam em torno de 200-300g e tinham idade de 60 dias de vida. Foram mantidos no Biotério do Laboratório de Biologia Oral (LBO) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) sob condições controladas de temperatura (21-23°C), ciclos alternados de luz (12h claro/12h escuro) e livre acesso a água e ração.

Neste estudo, foram utilizados 8 fêmeas e 3 machos que foram colocados para o acasalamento através do compartilhamento desses animais em gaiolas iguais. Os fetos obtidos para esse estudo correspondem a idades de períodos intrauterinos e neonatais. De maneira que pudessem ser divididos e selecionados nas idades 18 dias, 19 dias, 20 dias, 21 dias, dia do nascimento e 1 dia pós-natal.

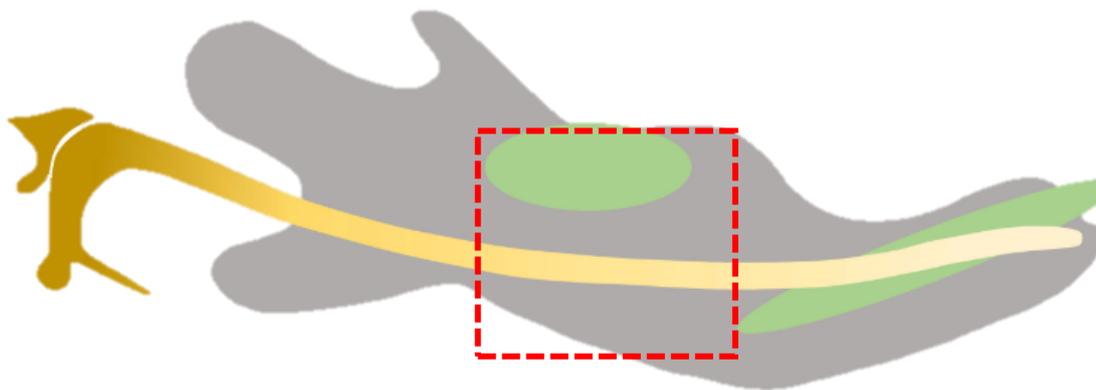
Para investigação da cartilagem de Meckel, o modelo animal em roedores é o mais comumente utilizado e as idades foram determinadas levando em consideração o aparecimento dos primeiros sinais de ossificação na região e degeneração da cartilagem por meio da observação de outros estudos anteriormente realizados (Ishizeki et al., 1999; Yang et al., 2012).

Esquemáticamente é possível dividir os grupos, de acordo com os períodos gestacionais. Para cada grupo, foram utilizados uma ou duas ninhadas de fetos, tendo em vista, a variação do número de fetos encontrados em cada ninhada, podendo ser encontrados em média de três a doze embriões por prole. O número final utilizado para cada grupo foi no mínimo 6 animais.

- G18 (18º dia gestacional)
- G19 (19º dia gestacional)
- G20 (20º dia gestacional)
- G21 (21º dia gestacional)
- P0 (dia do nascimento)
- P1 (1º dia pós nascimento)

A região alvo da cartilagem de Meckel para ser avaliada foi determinada, a partir da divisão de sua totalidade. Assim, foi estabelecido a altura do germe do primeiro molar inferior como determinante para o trecho da região intermediária da cartilagem a ser investigada.

Figura 4.1 - Representação da área objeto de estudo. Cartilagem de Meckel (amarelo); Germes do incisivo e molares (verde); Mandíbula (cinza)



Fonte: Svandova et al. (2020)

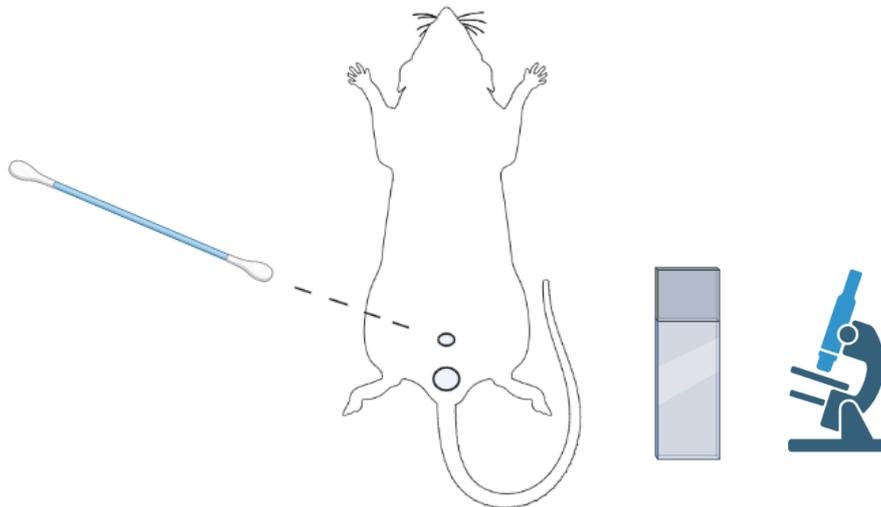
4.2 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES

Os animais foram agrupados em uma mesma gaiola na proporção de 2:1 de fêmeas e machos no fim da tarde (16h-17h). Na manhã seguinte, entre 8h e 9h, foi

realizado o esfregaço nas fêmeas para verificação, sob microscopia de luz, da presença ou ausência de espermatozoides, comprovando e fornecendo segurança para a contagem dos dias de gestação.

O esfregaço foi realizado, segundo protocolo e coloração (Shorr, 1940), as fêmeas foram colocadas em posição dorsal para que fosse introduzido um swab convencional na vagina das ratas e realizando movimentos leves e circulares foram capturadas camadas da mucosa vaginal do animal. Por meio do atrito do swab com a lâmina de vidro, a secreção coletada foi inserida e posteriormente fixada para coloração.

Figura 4.2 - Esquema da técnica do esfregaço. Cotonete é inserido na vagina do animal para coleta e coloração



Fonte: A autora.

A análise do esfregaço foi feita por microscopia de luz e observado se havia a presença das células reprodutoras masculinas, conhecidas como espermatozoides. A presença dessas células foi o fator determinante para conclusão de que haveria fecundação. Quando determinado o esfregaço como positivo, iniciava-se a contagem dos dias de gestação, sendo o D-1 correspondente a esse dia.

Figura 4.3 - Espermatozoides visualizados no esfregaço vaginal sob microscopia de luz



Fonte: A autora.

Para os grupos gestacionais intrauterinos, de acordo com os seus dias correspondentes, foi realizado a cirurgia para remoção dos fetos. Nos dias estabelecidos (18d, 19d, 20d, 21d), as ratas gestantes foram anestesiadas por via intramuscular pela associação de 1,5 ml/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan) com 1,5 ml/Kg de cloridrato de ketamina (Dopalen). Foi realizado a tricotomia da área correspondente a região de abdômen, seguido da divulsão dos tecidos e incisão na região inferior abdominal para obter acesso ao cordão uterino em que estão localizados os embriões. Após a remoção dos fetos, as ratas foram eutanasiadas por sobredosagem anestésica.

Uma vez, os embriões expostos, foi realizada a decapitação das cabeças, sendo submersas em um *beaker* contendo solução fixadora no volume de 40ml. A solução fixadora foi composta de formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído) + glutaraldeído a 0,1% em tampão fosfato 0,1M e pH entre 7,2 - 7,4. Nos grupos neonatais, os filhotes tiveram suas cabeças decapitadas e imediatamente imersas no fixador.

O *beaker* com os espécimes em solução fixadora foi colocado em um recipiente, estando rodeado por gelo picado para inserção em um forno microondas Pelco 3440 (Ted Pella, Redding, CA, USA) que operou em potência de 100% em três ciclos de 5 minutos cada e com temperatura máxima de 37° (Massa; Arana-Chavez, 2000). Após o término dos ciclos no microondas, os espécimes foram transferidos para um agitador em temperatura ambiente por 4 horas e deixados overnight a 4°C.

4.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E MICROSCOPIA DE LUZ

Após fixação dos espécimes, foram realizadas lavagens em 6 ciclos de 10 minutos cada com tampão fosfato 0,05M pH 7,2 para serem imersos em solução de EDTA a 4,13% para descalcificação. O período de permanência na solução variou conforme idade dos grupos amostrais. Para os grupos gestacionais, esse tempo correspondeu ao intervalo de 2 a 3 dias e para os neonatais 7 a 10 dias.

O término da descalcificação foi sucedido de uma nova lavagem com tampão fosfato 0,05M pH 7,2 por aproximadamente 1 hora e entre esses dois procedimentos, os espécimes sofreram clivagem com cortes realizados a fim de selecionar a região restrita a área de altura do primeiro molar inferior.

O material foi desidratado passando por uma sequência crescente de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast (Sigma, St Louis, USA) através do sistema LEICA EG 1160. Após inclusão, as amostras foram emblocadas e submetidas à microtomia.

Os cortes foram feitos com navalhas em micrótomo Microm HM 360 na medida de 4,5 µm e posicionados em lâminas lapidadas para microscopia. Posteriormente, foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e tricromico de Mallory. Então, as lâminas foram montadas com lamínulas, utilizando Entellan para serem realizadas as análises histológicas e morfológicas da cartilagem de Meckel.

As imagens histológicas foram obtidas por meio de um microscópio Olympus BX-60 acoplado ao sistema de captura e análise de imagens Cell F (Olympus, Tokyo, Japan).

4.4 HISTOQUÍMICA TRAP

Os cortes foram submetidos à histoquímica TRAP para identificação da presença de células clásticas. Esses cortes foram encaminhados para estufa por 1 hora para serem desparafinizados, passaram por submersão em xilol e hidratados com água destilada por 5 minutos cada. Foram incubados no meio de Burstone que é preparado por meio da dissolução de 4 mg de “naphtol AS-BI phosphate substrate” em 0,25 ml de N,N-dimetil-formamida com adição de 25 mL de tampão de acetato 0,2M pH 5,0, 35 mg de Fast Red Violet LB ou Fast Garner GBC e 2 gotas de MgCl a 10%. Na sequência, foram colocados em uma jarra Coplin, 25 mL de solução para ser filtrada, aquecida a 37°C e ser adicionado com D (-) ácido tartárico 50 mM.

As lâminas foram incubadas por um período de 3 horas, lavadas em água corrente por 30 minutos e encaminhadas para secagem em temperatura ambiente por 2 dias. Então, as lâminas foram contra coradas com solução de hematoxilina de Harris a 3% por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente por 2 minutos, desidratados em concentrações crescentes de etanol, passando por etanol/xilol e diafanização em xilol.

A montagem das lâminas foi feita com lamínula sob o uso de Entellan para serem observadas em microscópio de luz Olympus BX-60.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA OSTEOPONTINA (OPN)

Lâminas dos grupos G21 e P0 foram destinadas à imunomarcção para OPN. Cortes de 4,5 µm foram previamente coletados sobre lâminas de vidro silanizadas (Perfecta, São Paulo, Brasil), desparafinizados em estufa na temperatura de 60°C por 15 minutos, imersos em xilol por 15 minutos também em temperatura de 60°C e banhados novamente por xilol em temperatura ambiente por 15 minutos. Os cortes foram imersos em etanol/xilol, hidratados em soluções de concentrações decrescentes de etanol, três imersões em álcool absoluto, uma em 95%, 90% e 80% de 3 minutos cada.

A solução combinada de álcool absoluto e hidróxido de sódio a 10% por 5 minutos deu sequência no protocolo para a remoção de componente do fixador, seguido de um banho em água destilada durante 5 minutos. Para o bloqueio da peroxidase, foi realizado dois banhos de 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 30% com metanol na proporção de 1:1. Os cortes passaram por duas lavagens em água destilada e em seguida imersos em dois banhos de solução Tris pH 7,4 por 2 minutos cada.

A incubação dos cortes foi realizada com o anticorpo primário anti-OPN monoclonal de rato (sc – 21742, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) na concentração de 1:1000 e duração de 3 horas. Após o período de incubação, os cortes foram imersos em solução Tris com dois banhos sequenciais de 5 minutos cada. Posteriormente, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário do sistema HRP (Dako EnVision + Dual Link System – HRP, Dako North America, CA, USA) por 30 minutos em ambiente escuro e câmara úmida. Então, os cortes passaram por dois banhos de solução Tris por 5 minutos cada.

Para revelação, foi realizada incubação com o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Dako, Carpinteria, CA, USA) por 10 minutos, de acordo com as orientações do fabricante. Foram realizados dois banhos em solução Tris de 5 minutos cada. Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Mayer previamente filtrada por 5 minutos.

Os cortes passaram por lavagem em água corrente por 5 minutos, foram desidratados em passagens por soluções de etanol de 70%, 75% e 80%. Seguindo para concentrações crescentes de etanol de 85%, 90%, 95%, e 100% por 3 minutos em cada imersão, finalizando com diafanização em xilol por 3 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas em Entellan (EMS, Hatfield, PA, USA) e examinadas em microscópio de luz Olympus BX-60.

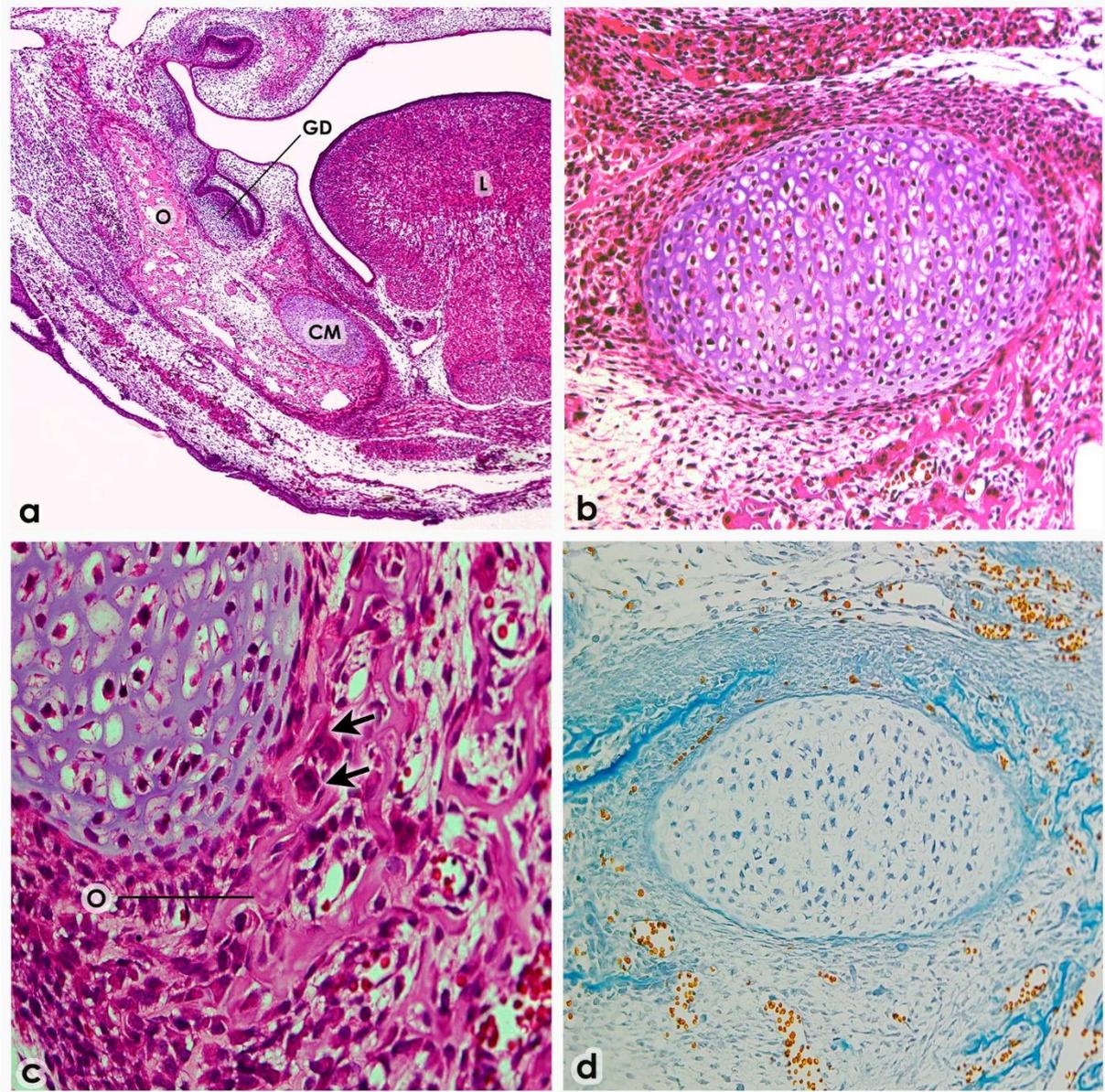
5 RESULTADOS

5.1 G18 – 18 DIAS INTRAUTERINO

Os espécimes do grupo de 18 dias gestacional apresentaram a cartilagem de Meckel localizada abaixo do germe do 1º molar inferior em fase de capuz, lateralmente à língua e, em seu entorno, com vários pontos de ossificação intramembranosa referentes ao corpo da mandíbula em formação (Figura 5.1 **a**). A cartilagem de Meckel encontrou-se com aspecto típico de cartilagem hialina com condrócitos regulares imersos em uma matriz extracelular característica em um arranjo arredondado e bem delimitada por um pericôndrio uniforme (Figura 5.1 **b**). A coloração da matriz cartilaginosa foi clara, portanto diferente da característica acidófila da matriz óssea.

O trabeculado ósseo correspondente a formação da mandíbula encontrou-se espaçado ao redor da cartilagem com células ósseas ativas, como osteoblastos e osteoclastos. Entre tabiques ósseos e a cartilagem esteve presente uma região de ectomesênquima (Figura 5.1 **c**). A partir da coloração de Mallory, foi possível visualizar de maneira mais precisa a região ocupada pela cartilagem e pelo trabeculado ósseo, cuja matriz que contém abundante colágeno do tipo I foi corada intensamente em azul (Figura 5.1 **d**).

Figura 5.1 - G18 (18 dias intrauterino). **a**: vista panorâmica de hemimandíbula, mostrando germe dentário em fase de capuz (GD), língua (L), regiões de ossificação (O) e cartilagem de Meckel (CM); **b**: cartilagem de Meckel com aspecto típico de cartilagem hialina; **c**: osso recém formado ao redor da cartilagem com presença de células clásticas (setas); **d**: região de trabeculado ósseo no entorno da cartilagem intensamente corada em azul pelo tricrômico de Mallory. Aumentos originais: **a**: 40x; **b**: 200x; **c**: 400x; **d**: 200x



Fonte: A autora.

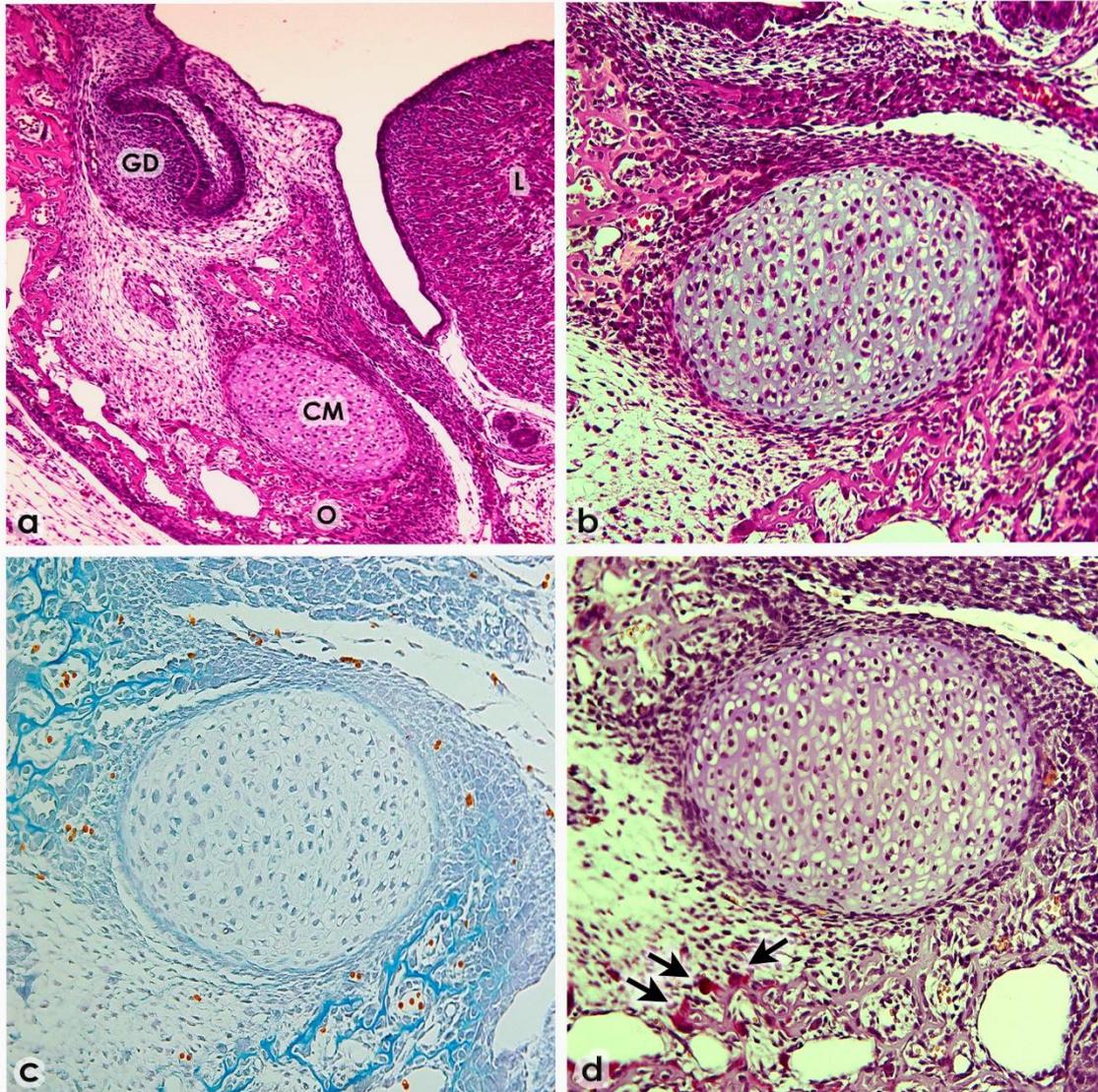
5.2 G19 - 19 DIAS INTRAUTERINO

A cartilagem de Meckel, neste período, encontrou-se semelhante ao grupo anterior de 18 dias. Nesta fase, a ossificação da mandíbula também esteve mais adiantada, sendo possível observar o germe dentário em fase de capuz avançado, localizado superiormente a cartilagem (Figura 5.2 **a, b**). A morfologia da cartilagem foi similar ao grupo gestacional de 18 dias com condrócitos uniformes e envolvidos por uma matriz de cartilagem hialina (Figura 5.2 **b**).

A proximidade do osso em formação com a cartilagem não apresentou diferenças em relação ao grupo de 18 dias (Figura 5.1 **b, c**; Figura 5.2 **b, c**), enquanto esta permanecia com o mesmo aspecto em relação à integridade de sua estrutura e matriz extracelular.

As células clásticas localizaram-se nas superfícies de trabeculado ósseo em formação, dispostas ao redor da cartilagem; sua presença restringiu-se às regiões de osso, sem relação com a cartilagem de Meckel (Figura 5.2 **d**).

Figura 5.2 - G19 (19 dias intrauterino). **a**: vista panorâmica de hemimandíbula, mostrando germe dentário em fase de capuz (GD), língua (L), trabeculado ósseo (O) e cartilagem de Meckel (CM); **b**: cartilagem de Meckel mostrando o aspecto normal de uma cartilagem hialina; **c**: matriz do trabeculado ósseo no entorno da cartilagem intensamente corada em azul pelo tricrômico de Mallory; **d**: células clásticas TRAP-positivas nas superfícies ósseas (setas). Aumentos originais: **a**: 100x; **b**: 200x; **c**: 200x; **d**: 200x



Fonte: A autora.

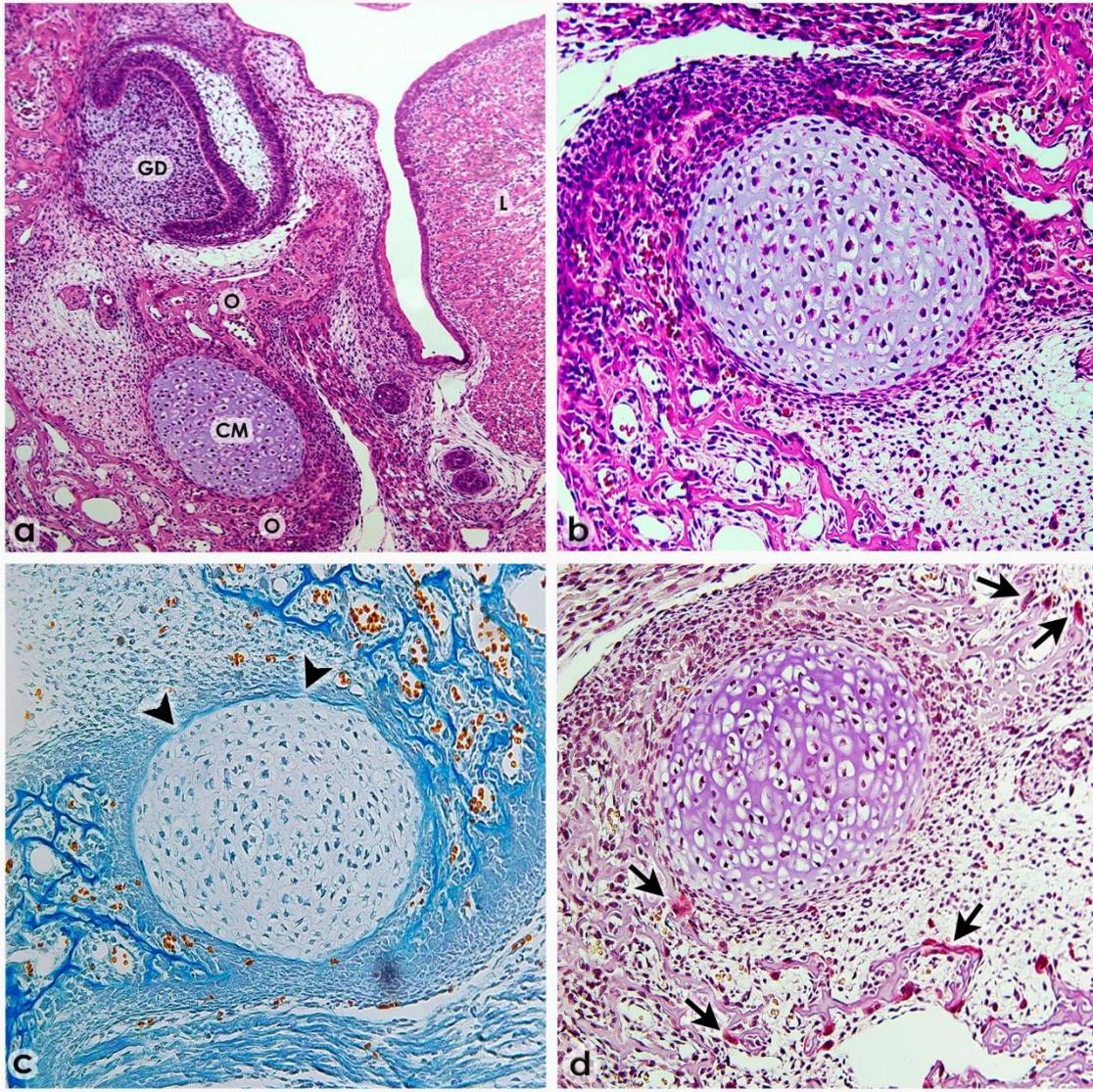
5.3 G20 - 20 DIAS INTRAUTERINO

Neste período gestacional, o germe dentário do 1º molar esteve na fase de câmpanula. A cartilagem de Meckel foi localizada em região lingual, próxima à correspondente tábua óssea em formação (Figura 5.3 **a, b**) e apresentou sinais de discreta redução de tamanho (Figura 5.3 **b**).

A morfologia da cartilagem apresentou padrão semelhante às outras cartilagens hialinas, em relação à sua matriz extracelular e à integridade do pericôndrio (Figura 5.3 **b**). Entretanto, os condrócitos centrais apresentaram sinais iniciais de hipertrofia celular, diferenciando-se do aspecto visto nos grupos anteriores (Figura 5.3 **d**).

A existência da aproximação entre o trabeculado ósseo e a cartilagem de Meckel começou a ser visualizada, tendo em vista o aprofundamento do aspecto encapsulado da cartilagem pelo osso (Figura 5.3 **b, c**). A presença dos osteoclastos acompanhou a dispersão e avanço dos tabiques ósseos, estando localizados nas superfícies ósseas (Figura 5.3 **d**).

Figura 5.3 - G20 (20 dias intrauterino). **a:** hemimandíbula visualizando germe dentário em fase de campânula (GD), língua (L), osso (O) e cartilagem de Meckel (CM); **b:** cartilagem de Meckel com aspecto normal de cartilagem hialina; **c:** matriz do trabeculado ósseo corada intensamente pelo tricrômico de Mallory e leve coloração no pericôndrio da cartilagem (cabeça de seta); **d:** células clásticas TRAP-positivas nas superfícies ósseas (setas); Aumentos originais: **a:** 100x; **b:** 200x; **c:** 200x; **d:** 200x



Fonte: A autora.

5.4 G21 - 21 DIAS INTRAUTERINO

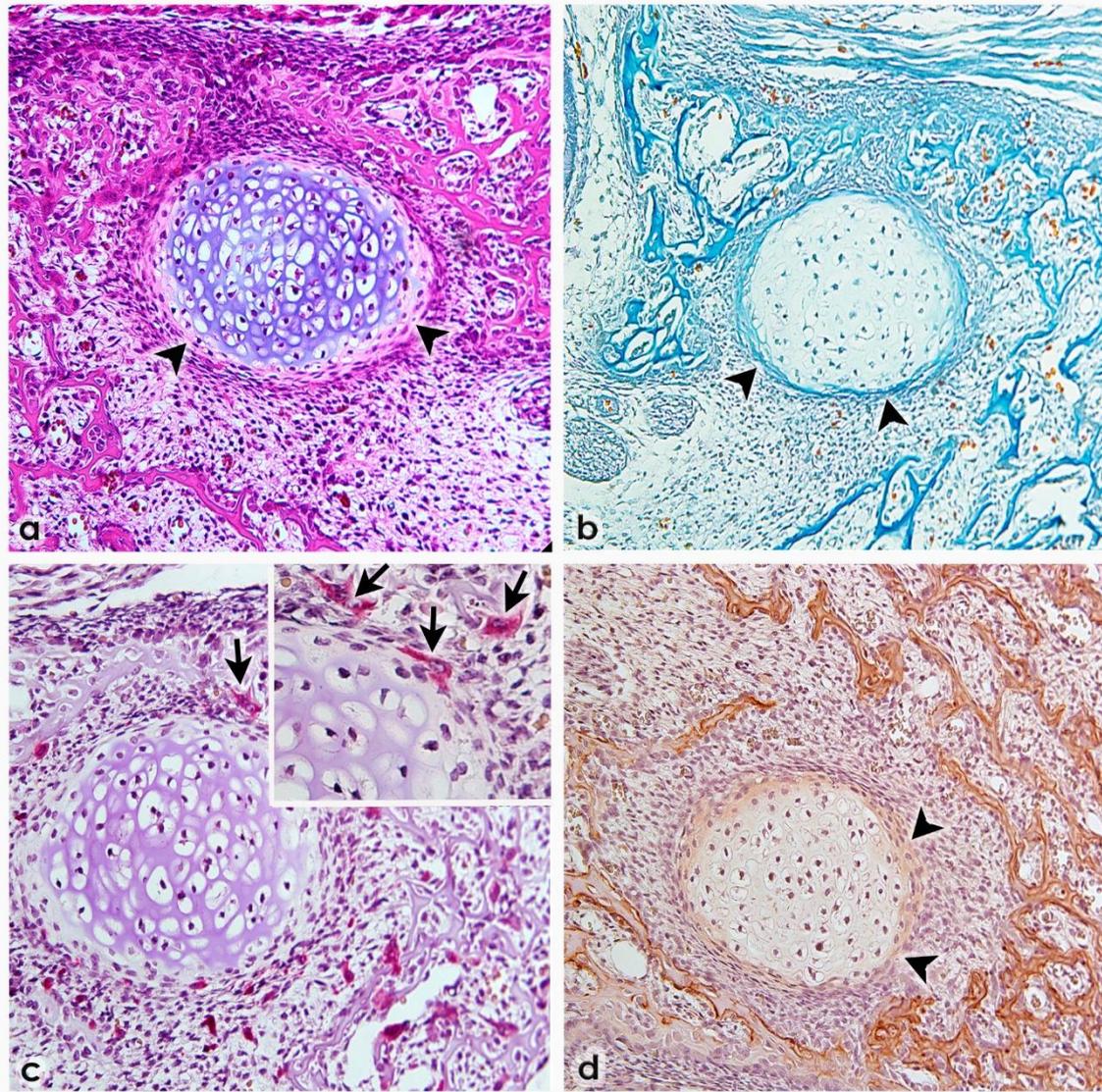
O aspecto da cartilagem de Meckel revelou a mudança de coloração da sua matriz extracelular, além da redução de tamanho mais significativa em comparação aos períodos anteriores (Figura 5.4 **a**). A região superficial da cartilagem apresentou coloração de matriz diferente da região central, assim como com uma marcação forte e evidente para o tricrômico de Mallory, sugestivo de composição por colágeno tipo I nessa região (Figura 5.4 **a, b**).

Os condrócitos apresentaram maior hipertrofia, caracterizada pelo alargamento evidente de seus corpos celulares, bem como maior espaçamento entre eles dentro da matriz extracelular (Figura 5.4 **a, c**). A região central da cartilagem de Meckel manteve a coloração característica de cartilagem hialina, mais basófila, em detrimento da região periférica, mais acidófila (Figura 5.4 **a**).

A proximidade do osso com a cartilagem foi evidente nesta fase, de modo que houve contato entre as estruturas (Figura 5.4 **b**). As células clásticas agora foram observadas na superfície da cartilagem (Figura 5.4 **c**).

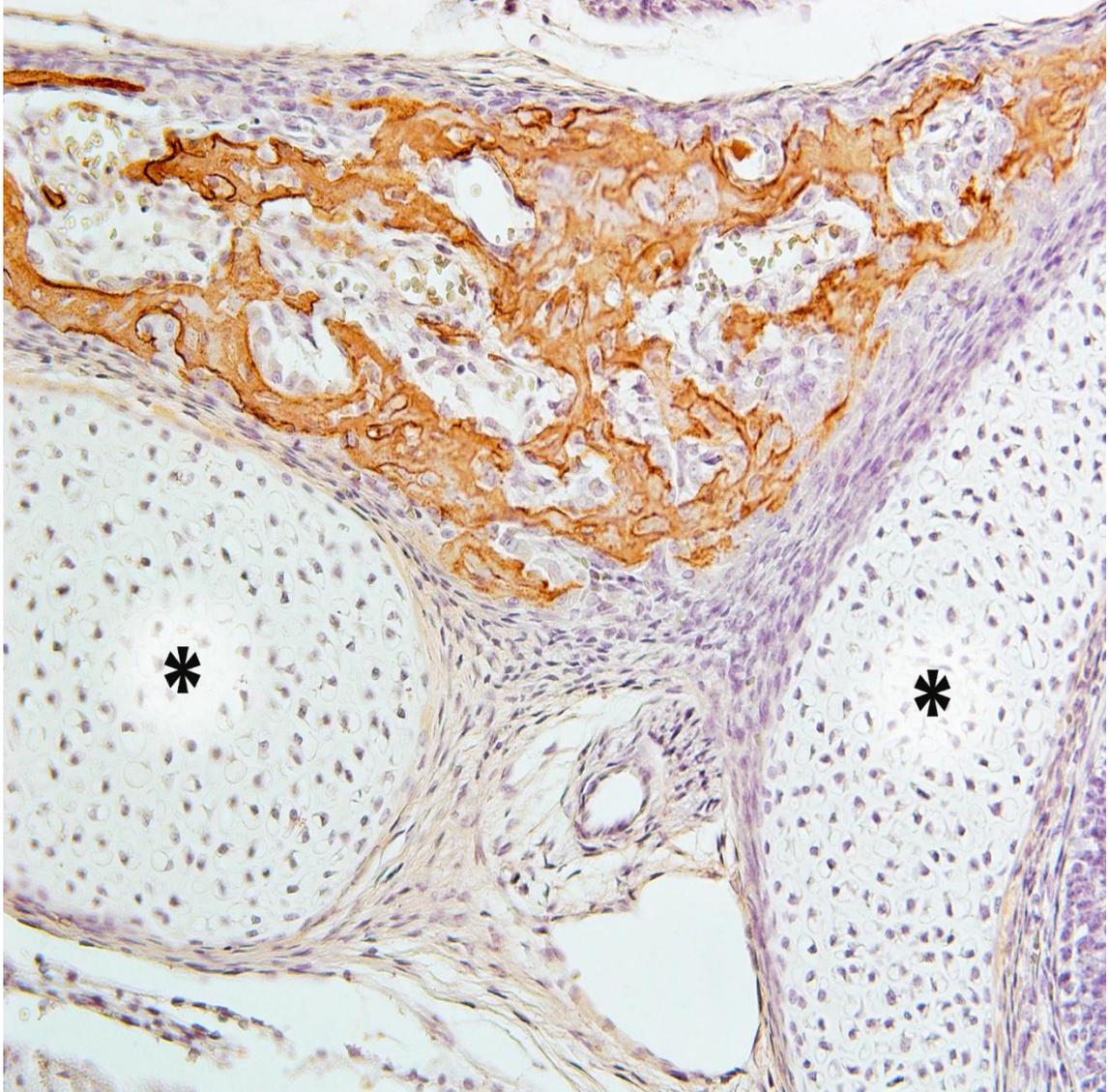
A imunomarcação por osteopontina foi forte e evidente nas regiões de matriz óssea no entorno da cartilagem de Meckel. Na região superficial da cartilagem de Meckel houve marcação discreta e sutil dessa proteína (Figura 5.4 **d**). Quando analisadas as cartilagens nasais dos mesmos cortes, para comparação, estas não apresentaram marcação para osteopontina, diferentemente do trabeculado ósseo adjacente (Figura 5.5).

Figura 5.4 - G21 (21 dias intrauterino). **a**: cartilagem de Meckel com alteração de coloração na matriz extracelular da superfície (cabeça de seta); **b**: matriz do trabeculado ósseo corada intensamente pelo tricrômico de Mallory e coloração mais forte no pericôndrio da cartilagem (cabeça de seta); **c**: células clásticas TRAP-positivas na superfície da cartilagem de Meckel (setas), melhor observadas no detalhe em maior aumento. **d**: imunomarcção intensa para osteopontina (OPN), em marrom, na matriz do trabeculado ósseo e marcação sutil na superfície (cabeça de seta) da cartilagem de Meckel; Aumentos originais: **a**: 200x; **b**: 200x; **c**: 400x; **d**: 200x



Fonte: A autora.

Figura 5.5 - Imunomarcção positiva para osteopontina (OPN), em marrom, apenas na região de trabeculado ósseo que circunda as cartilagens nasais (asteriscos). Observar que as cartilagens, inclusive seu pericôndrio, aparecem livres de imunomarcção



Fonte: A autora.

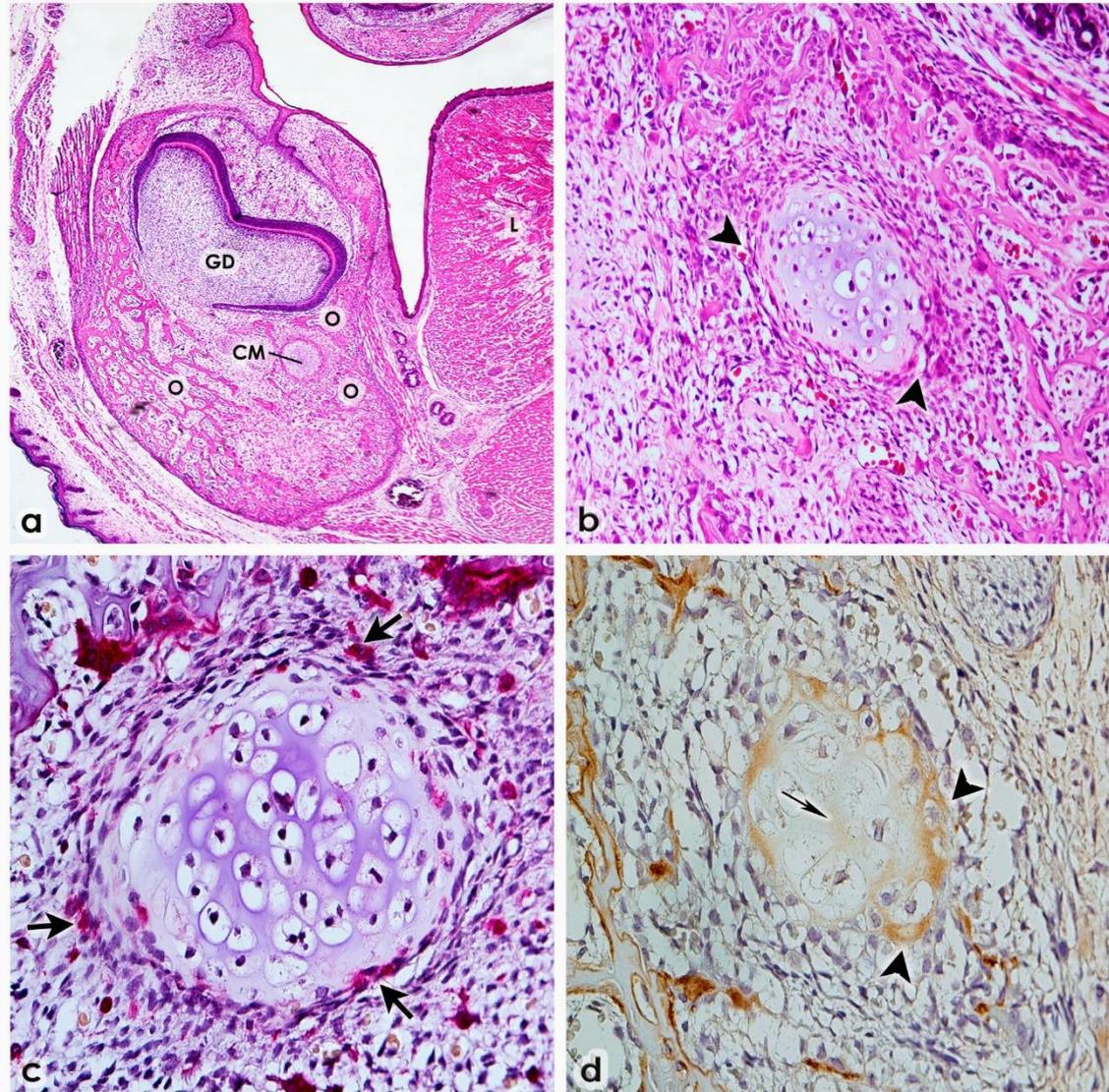
5.5 P0 - DIA DO NASCIMENTO

Neste período do desenvolvimento, a área de entorno da cartilagem de Meckel apresentou formação óssea abrangente com tabiques ósseos mais desenvolvidos e dispersos por toda a área de futura mandíbula. O germe dentário do 1º molar estava em fase de coroa com desenvolvimento dos tecidos dentários esmalte e dentina (Figura 5.6 **a**). A cartilagem de Meckel apresentou tamanho bastante reduzido em relação aos grupos anteriores. A alteração de cor das margens da cartilagem permanece em evidência (Figura 5.6 **b**) Os condrócitos remanescentes da cartilagem de Meckel apresentaram severa hipertrofia celular (Figura 5.6 **b**).

A superfície da cartilagem apresentou irregularidades e traços de descontinuidade. Além disso, foram evidentes células clásticas TRAP-positivas nessa superfície irregular da cartilagem (Figura 5.6 **b**). Não há mais limites entre o remanescente da cartilagem e o tecido mesenquimal adjacente (Figura 5.6 **b, c**).

A proteína osteopontina marcou positivamente o resquício da cartilagem de Meckel, com um padrão difuso por toda a região de matriz do remanescente cartilaginoso, além de estar presente no trabeculado ósseo dos arredores (Figura 5.6 **d**).

Figura 5.6 - P0 (dia do nascimento). **a**: hemimandíbula visualizando germe dentário em fase de coroa (GD), língua (L), osso (O) e cartilagem de Meckel (CM); **b**: cartilagem de Meckel com superfície (cabeça de seta) irregular e alteração de coloração; **c**: células clásticas TRAP-positivas na superfície da cartilagem de Meckel (setas) **d**: imunomarcacão positiva para osteopontina (OPN), em marrom, na matriz extracelular do remanescente da CM (seta fina) e no trabeculado ósseo circundante; Aumentos originais: **a**: 40x; **b**: 200x; **c**: 400x; **d**: 400x



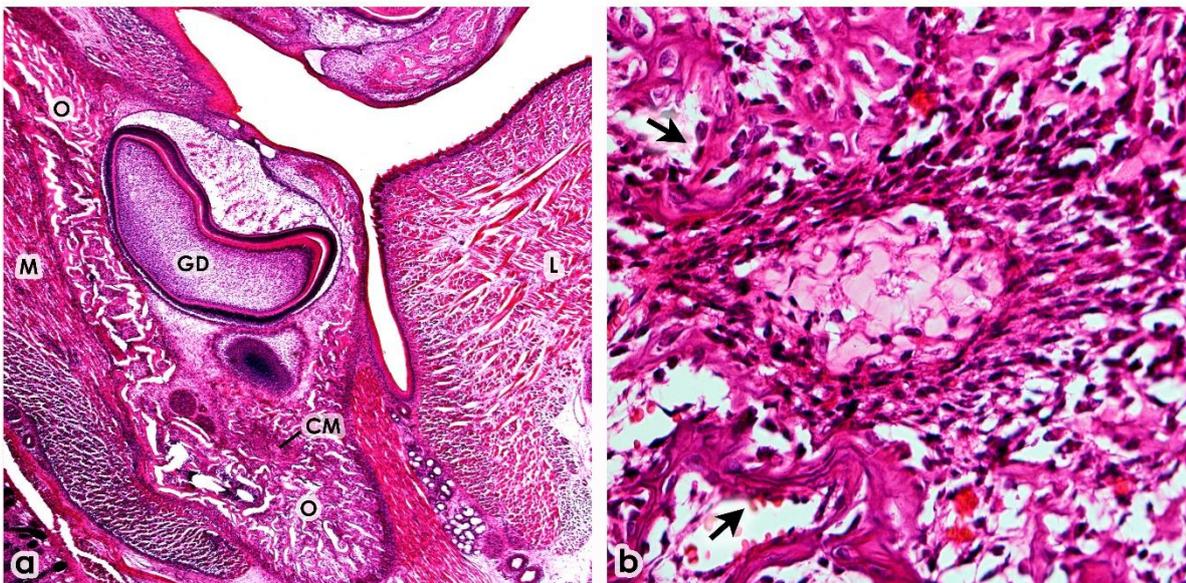
Fonte: A autora.

5.6 P1 – UM DIA APÓS O NASCIMENTO

O desenvolvimento do trabeculado ósseo da mandíbula esteve bem avançado. O germe dentário esteve em amplo desenvolvimento da fase de coroa e tecido muscular estava em anexo à mandíbula nessa idade pós-natal do rato (Figura 5.7 a).

Nessa fase, foi notório o fim da degeneração da cartilagem de Meckel. Apenas em alguns espécimes foi possível a identificação de um pequeno aglomerado de condrócitos em meio a uma matriz com aparência desorganizada. A coloração dessas pequenas áreas apresentou um tom rosa claro (Figura 5.7 b), semelhante àquele visto nas margens da cartilagem dos grupos de 21 dias gestacional e dia do nascimento (Figura 5.4 a; Figura 5.6 b).

Figura 5.7 - P1 (um dia após o nascimento). **a**: hemimandíbula visualizando germe dentário em fase de coroa (GD), língua (L), osso (O), músculo (M) e cartilagem de Meckel (CM); **b**: remanescente da cartilagem de Meckel em espécime corado pela hematoxilina e eosina em meio ao trabeculado ósseo (setas) da mandíbula. Aumentos originais: **a**: 40x; **b**: 400x



Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

Os achados deste estudo morfológico da formação da mandíbula do rato durante períodos gestacionais e neonatais mostraram a gradativa mudança estrutural da porção intermediária da cartilagem de Meckel até sua degeneração final. A marcação positiva para a proteína osteopontina e a presença de células clásticas nos períodos de degeneração sugerem a possibilidade de existência de matriz óssea na superfície da cartilagem, em estágios terminais.

Está bem estabelecida a contribuição tanto da extremidade anterior da cartilagem de Meckel para a formação da sínfise mandibular, como para a formação dos ossículos do ouvido médio (martelo e bigorna) oriundos da sua porção mais caudal; além disso, o aparecimento dos ligamentos anterior do martelo e ligamento esfenomandibular são provenientes do segmento posterior da região intermediária da cartilagem de Meckel, nos limites com a porção caudal (Rodríguez-Vázquez et al., 1997; Ishizeki et al., 1999; Amin; Tucker 2006; Svandova et al., 2020) . Em contrapartida, os eventos que levam ao desaparecimento da porção intermediária da cartilagem de Meckel seguem imprecisos.

Diferentemente de outros anteriormente realizados, este estudo buscou a análise de uma região específica e bem delimitada da porção intermediária da cartilagem de Meckel, aquela subjacente ao germe do primeiro molar do rato, assim como a avaliação por diferentes períodos de desenvolvimento, até seu desaparecimento. Nesse sentido, o estudo da cartilagem permitiu a percepção de alterações que remetem à ossificação desta estrutura cartilaginosa; entretanto, não há a reprodução fiel dos eventos da ossificação endocondral, processo responsável por originar, na mandíbula, as regiões da sínfise e do côndilo.

A ossificação endocondral tem como fator determinante a hipertrofia dos condrócitos, seguido da liberação de colágeno tipo X e fatores angiogênicos (VEGF) que estimulam, enquanto a matriz cartilaginosa mineraliza, o surgimento de vasos e conseqüentemente uma nova formação óssea que irá gradativamente substituir o molde cartilaginoso, nessa fase, já calcificado. Esse processo ocorre em sentido centrífugo, de modo que as primeiras alterações ocorrem na região central da

cartilagem em direção ao pericôndrio (Arana-Chavez; Bradaschia, 2012; Galea et al., 2021). Dessa maneira, há a formação de um centro de ossificação primária neste ponto central da cartilagem (Chan et al., 2021). Na cartilagem de Meckel, foi possível observar que alterações ocorrem em outro sentido, havendo modificação na matriz extracelular localizada na superfície da cartilagem, bem como redução de seu tamanho por possível reabsorção osteoclástica nessa área, talvez em associação com a degradação de componentes da matriz da cartilagem hialina.

A formação do colar ósseo na superfície da cartilagem a ser substituída na ossificação endocondral caracteriza uma importante etapa desse processo. As células do pericôndrio se diferenciam em osteoblastos que passam a secretar matriz óssea para formar esse colar (Long; Ornitz 2013), evento denominado ossificação pericondral (Riminucci et al., 1998). Os presentes achados referentes à cartilagem de Meckel, não trazem sinais relacionados à ocorrência deste evento, diferenciando-se do padrão da ossificação endocondral.

O método de marcação por reação histoquímica para a enzima TRAP utilizado neste trabalho, mostrou a presença de células multinucleadas em regiões de trabeculado ósseo e possibilitou a visualização da proximidade dessas células com a cartilagem de Meckel e, em fases avançadas, aderidas à sua superfície, sugerindo a participação ativa na degradação desta porção; entretanto, não é possível realizar associações com o germe dentário do primeiro molar em desenvolvimento, como a encontrada no estudo realizado por Sakakura et al. (2005) que detectou intensa e difusa expressão do sistema RANK-L/OPG na porção anterior da região intermediária da cartilagem de Meckel, na altura e em proximidade com o desenvolvimento do incisivo.

A localização das células clásticas na superfície da cartilagem de Meckel no período referente a sua degeneração, evidencia uma divergência do padrão encontrado na ossificação endocondral. Mostrando que a ação reabsortiva está restrita às margens da cartilagem, resultando em uma gradativa e significativa redução do tamanho da estrutura por meio do avanço desse processo de reabsorção. Em contrapartida, durante a ossificação endocondral os clastos reabsorvem matriz calcificada localizada no interior do molde cartilaginoso, adotando o sentido inverso do que foi observado neste estudo.

Os osteoclastos exercem papéis chaves em três processos fundamentais da biologia óssea: osteogênese, modelação óssea durante o crescimento e remodelação óssea na fase adulta (Ikeda; Takeshita, 2015). Assim, a presença de osteoclastos está associada ao processo de reabsorção de tecidos mineralizados. São células especializadas em função reabsortiva, fixam-se em superfícies mineralizadas e bombeiam íons e enzimas hidrolíticas para dissolução do tecido por meio da ativação de sua maquinaria interna. Além da habilidade em reabsorção, contribuem com a formação óssea através da comunicação com osteoblastos, estimulando o recrutamento dessas células por meio da secreção de fatores, conhecidos como clastoquinas (Teti, 2013; Sims; Martin, 2014; Plotkin; Bruzzaniti, 2019).

A reabsorção de diferentes estruturas que contém níveis variados de teor de mineral é exercida de maneira adaptativa pelos osteoclastos. Sendo essas células capazes de reabsorver substratos diferentes por meio de seu amplo potencial funcional, já que vários mecanismos celulares estão envolvidos em sua função reabsortiva. Estruturas mineralizadas como cartilagem hipertrófica, cartilagem articular e junção osteocondral podem ser reabsorvidas independentemente da modificação do meio por acidificação (Touaitahuata et al., 2014; Löfvall et al., 2018).

A mudança do aspecto de coloração da cartilagem de Meckel pela técnica de Mallory foi observada durante as fases terminais. Nesse momento, a superfície da cartilagem passou a corar-se mais intensamente em azul, sugerindo a presença de colágeno tipo I nessa região. Uma vez que, o colágeno tipo I é um dos principais componentes de matrizes mineralizadas como a óssea, esse achado é complementar à marcação da proteína osteopontina nesse período de degeneração da cartilagem de Meckel.

Neste estudo, a imunodeteccção de osteopontina mostrou sua expressão nas fases de degeneração da cartilagem de Meckel. No grupo de 21 dias intrauterino, a marcação limitou-se à área de superfície da cartilagem, enquanto que no grupo referente ao dia do nascimento houve expansão dessa marcação para a região central. Essas observações sugerem o avanço da mineralização por toda a extensão do remanescente cartilaginosa. É possível que a mineralização ocorra simultaneamente e seja responsável pelo processo que culmine com o desaparecimento desta porção da cartilagem de Meckel.

O papel da osteopontina na construção de matrizes mineralizadas, a existência de colágeno tipo I como constituinte dessas matrizes e, principalmente, a presença de células clásticas que necessitam de um substrato mineralizado para executarem sua função reabsortiva são fatores que viabilizam a ideia de que ocorra mineralização da porção intermediária da cartilagem de Meckel, porém, não mineralização de uma matriz cartilaginosa, mas de uma matriz de natureza óssea.

A expansão da marcação de osteopontina encontrada no grupo correspondente ao dia do nascimento para o interior da região de matriz entre os condrócitos remanescentes sugere que essas células possam participar da secreção de um novo tipo de matriz, especificamente óssea, expondo uma possível mudança fenotípica dos condrócitos finais.

A possibilidade de que os condrócitos hipertróficos da cartilagem de Meckel apresentem comportamento osteogênico em determinado momento do desenvolvimento, especialmente quando ocorre o processo de degeneração da cartilagem, pode contribuir e estar relacionada com o desaparecimento da cartilagem de Meckel.

A orientação do processo de mineralização que possivelmente leva à extinção da porção intermediária da cartilagem de Meckel pode ser atribuída à mudança fenotípica dos condrócitos da cartilagem. Por meio das observações deste trabalho, sugere-se que condrócitos das regiões superficiais possam se diferenciar em células semelhantes a osteoblastos e passem a secretar material típico de matriz óssea. O desenvolvimento do processo de diferenciação provavelmente ocorre em sentido centrípeto, havendo uma transdiferenciação sequenciada de condrócitos, de acordo com a posição dessas células dentro da cartilagem, aquelas expostas à superfície seriam mais suscetíveis a sofrer transdiferenciação.

A transdiferenciação de condrócitos hipertróficos em osteoblastos tem sido apontada por alguns estudos como uma possibilidade para a formação óssea durante a ossificação endocondral e para o reparo de fraturas. O aparecimento de proteínas ósseas características, como osteopontina, osteonectina e BMP 2 foi identificado através de experimentos com transplante de condrócitos da cartilagem de Meckel para baços de ratos isogênicos, bem como a formação de matriz mineralizada e surgimento de colágeno tipo I (Ishizeki et al., 2009; Ishizeki, 2012; Wang et al., 2013). Por meio

do estudo de mapeamento de linhagens, a identificação dessa possibilidade ocorreu por meio da determinação da expressão de marcadores ósseos e de diferenciação de osteoblastos, como colágeno tipo I e osterix (OSX) (Yang et al., 2014a, 2014b; Zhou et al., 2014; Aghajanian; Mohan 2018). Essas evidências direcionam para uma nova compreensão em que os condrócitos hipertróficos podem sobreviver e se tornar osteoblastos, contribuindo para a formação de matriz óssea.

A soma dos achados deste trabalho sugere que o desaparecimento da porção intermediária da cartilagem de Meckel possa estar relacionado com a ossificação do corpo da mandíbula. O provável resultado da mineralização deste segmento da cartilagem de Meckel é o seu completo desaparecimento. O processo de ossificação relacionado a ocorrência desse evento aparenta ter características particulares que o diferenciam dos outros já bem estabelecidos, a ossificação endocondral e intramembranosa e até da ossificação pericondral.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo da porção intermediária da cartilagem de Meckel permitem concluir que:

A matriz cartilaginosa da superfície é substituída por uma matriz mineralizada de natureza óssea, contendo fibras colágenas tipo I e osteopontina durante os períodos de degeneração da cartilagem de Meckel. A presença dessa proteína avança da superfície para o interior, entre os remanescentes dos condrócitos, sugerindo a expansão de matriz óssea por todo o remanescente da cartilagem. A presença de células clásticas na superfície da cartilagem de Meckel durante as fases terminais de degeneração evidenciam a existência de matriz mineralizada na região, contribuindo para o desaparecimento dessa estrutura.

REFERÊNCIAS²

Ababneh KT, Al-Khateeb TH. Immunolocalization of proteoglycans in Meckel's cartilage of the rat. *Open Dent J.* 2009 Aug; 22;3:177-83. doi: 10.2174/1874210600903010177.

Adams CS, Shapiro IM. The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(6):465-73. doi: 10.1177/154411130201300604.

Aghajanian P, Mohan S. The art of building bone: emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification. *Bone Res.* 2018 Jun; 14;6:19. doi: 10.1038/s41413-018-0021-z.

Amano O, Doi T, Yamada T, Sasaki A, Sakiyama K, Kanegae H, Kindaichi K. Meckel's Cartilage : Discovery, Embryology and Evolution —Overview of the Specificity of Meckel's Cartilage. *J. Oral Biosci.* 2010 Feb; 52(2): 125-35. doi: 10.1016/s1349-0079(10)80041-6.

Amin S, Tucker AS. Joint formation in the middle ear: lessons from the mouse and guinea pig. *Dev Dyn.* 2006 May; 235(5):1326-33. doi: 10.1002/dvdy.20666.

Anthwal N, Joshi L, Tucker AS. Evolution of the mammalian middle ear and jaw: adaptations and novel structures. *J Anat.* 2013 Jan; 222(1):147-60. doi: 10.1111/j.1469-7580.2012.01526.x.

Arana-Chavez VE, Bradaschia V. *Biologia celular e tecidual para odontologia: moléculas, células e tecidos.* 1 ed . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

Barbosa AC da S. Estudo das proteínas ósseas não colágenas no processo de reparação óssea alveolar em ratos idosos [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2013. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-21112013-103224/pt-br.php>.

Becerra J, Andrades JA, Guerado E, Zamora-Navas P, López-Puertas JM, Reddi AH. Articular cartilage: structure and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Dec; 16(6):617-27. doi: 10.1089/ten.TEB.2010.0191.

² De acordo com estilo Vancouver.

Bhaskar SN, Weinmann JP, Schour I. Role of Meckel's cartilage in the development and growth of the rat mandible. *J Dent Res.* 1953 Jun; 32(3):398-410. doi: 10.1177/00220345530320031401.

Bernards MT, Qin C, Ratner BD, Jiang S. Adhesion of MC3T3-E1 cells to bone sialoprotein and bone osteopontin specifically bound to collagen I. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Sep; 86(3):779-87. doi: 10.1002/jbm.a.31650.

Biosse Duplan M, Komla-Ebri D, Heuzé Y, Estibals V, Gaudas E, Kaci N, Benoist-Lasselin C, Zerah M, Kramer I, Kneissel M, Porta DG, Di Rocco F, Legeai-Mallet L. Meckel's and condylar cartilages anomalies in achondroplasia result in defective development and growth of the mandible. *Hum Mol Genet.* 2016 Jul; 15;25(14):2997-3010. doi: 10.1093/hmg/ddw153.

Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int.* 2002 Aug; 71(2):145-54. doi: 10.1007/s00223-001-1121-z.

Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006 Jun; 7(1-2):123-39. doi: 10.1007/s11154-006-9009-x.

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 Apr; 127(8):1671-9.

Chan WCW, Tan Z, To MKT, Chan D. Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021 May; 21;22(11):5445. doi: 10.3390/ijms22115445.

Chellaiah MA, Hruska KA. The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int.* 2003 Mar; 72(3):197-205. doi: 10.1007/s00223-002-1025-6.

Chellaiah MA, Kizer N, Biswas R, Alvarez U, Strauss-Schoenberger J, Rifas L, Rittling SR, Denhardt DT, Hruska KA. Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell.* 2003 Jan; 14(1):173-89. doi: 10.1091/mbc.e02-06-0354.

Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jan 19; 280(2):460-5. doi: 10.1006/bbrc.2000.4146.

Foster BL, Ao M, Salmon CR, Chavez MB, Kolli TN, Tran AB, Chu EY, Kantovitz KR, Yadav M, Narisawa S, Millán JL, Nociti FH Jr, Somerman MJ. Osteopontin regulates dentin and alveolar bone development and mineralization. *Bone*. 2018 Feb; 107:196-207. doi: 10.1016/j.bone.2017.

Frommer J, Margolies MR. Contribution of Meckel's cartilage to ossification of the mandible in mice. *J Dent Res*. 1971 Sep-Oct; 50(5):1260-7. doi: 10.1177/00220345710500052801.

Galea GL, Zein MR, Allen S, Francis-West P. Making and shaping endochondral and intramembranous bones. *Dev Dyn*. 2021 Mar; 250(3):414-49. doi: 10.1002/dvdy.278.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010 May; 221(1):3-12. doi: 10.1002/path.2697.

Granström G, Zellin G, Magnusson BC, Mångs H. Enzyme histochemical analysis of Meckel's cartilage. *J Anat*. 1988 Oct; 160:101-8.

Harada Y, Ishizeki K. Evidence for transformation of chondrocytes and site-specific resorption during the degradation of Meckel's cartilage. *Anat Embryol (Berl)*. 1998 Jun; 197(6):439-50. doi: 10.1007/s004290050155.

Holm E, Gleberzon JS, Liao Y, Sørensen ES, Beier F, Hunter GK, Goldberg HA. Osteopontin mediates mineralization and not osteogenic cell development in vitro. *Biochem J*. 2014 Dec; 464(3):355-64. doi: 10.1042/BJ20140702.

Ikeda K, Takeshita S. The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis. *J Biochem*. 2016 Jan; 159(1):1-8. doi: 10.1093/jb/mvv112.

Ishizeki K. Imaging analysis of osteogenic transformation of Meckel's chondrocytes from green fluorescent protein-transgenic mice during intrasplenic transplantation. *Acta Histochem*. 2012 Oct; 114(6):608-19. doi: 10.1016/j.acthis.2011.11.008.

Ishizeki K, Kagiya T, Fujiwara N, Otsu K, Harada H. Expression of osteogenic proteins during the intrasplenic transplantation of Meckel's chondrocytes: A histochemical and immunohistochemical study. *Arch Histol Cytol*. 2009 Mar; 72(1):1-12. doi: 10.1679/aohc.72.1.

Ishizeki K, Saito H, Shinagawa T, Fujiwara N, Nawa T. Histochemical and immunohistochemical analysis of the mechanism of calcification of Meckel's cartilage during mandible development in rodents. *J Anat.* 1999 Feb; 194 (Pt 2)(Pt 2):265-77. doi: 10.1046/j.1469-7580.1999.19420265.x.

Ishizeki K, Takahashi N, Nawa T. Formation of the sphenomandibular ligament by Meckel's cartilage in the mouse: possible involvement of epidermal growth factor as revealed by studies in vivo and in vitro. *Cell Tissue Res.* 2001 Apr; 304(1):67-80. doi: 10.1007/s004410100354.

Ito Y, Bringas P Jr, Mogharei A, Zhao J, Deng C, Chai Y. Receptor-regulated and inhibitory Smads are critical in regulating transforming growth factor beta-mediated Meckel's cartilage development. *Dev Dyn.* 2002 May; 224(1):69-78. doi: 10.1002/dvdy.10088.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, Niforas P, Ng KW, Martin TJ, Gillespie MT. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone.* 1999 Nov; 25(5):525-34. doi: 10.1016/s8756-3282(99)00214-8.

Kaucka M, Zikmund T, Tesarova M, Gyllborg D, Hellander A, Jaros J, Kaiser J, Petersen J, Szarowska B, Newton PT, Dyachuk V, Li L, Qian H, Johansson AS, Mishina Y, Currie JD, Tanaka EM, Erickson A, Dudley A, Brismar H, Southam P, Coen E, Chen M, Weinstein LS, Hampl A, Arenas E, Chagin AS, Fried K, Adameyko I. Oriented clonal cell dynamics enables accurate growth and shaping of vertebrate cartilage. *Elife.* 2017 Apr; 17;6:e25902. doi: 10.7554/eLife.25902. PMID: 28414273.

Lee MN, Hwang HS, Oh SH, Roshanzadeh A, Kim JW, Song JH, Kim ES, Koh JT. Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression. *Exp Mol Med.* 2018 Nov; 5;50(11):1-16. doi: 10.1038/s12276-018-0170-6.

Löfvall H, Newbould H, Karsdal MA, Dziegiel MH, Richter J, Henriksen K, Thudium CS. Osteoclasts degrade bone and cartilage knee joint compartments through different resorption processes. *Arthritis Res Ther.* 2018 Apr; 10;20(1):67. doi: 10.1186/s13075-018-1564-5.

Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Jan 1;5(1):a008334. doi: 10.1101/cshperspect.a008334.

Luukkonen J, Hilli M, Nakamura M, Ritamo I, Valmu L, Kauppinen K, Tuukkanen J, Lehenkari P. Osteoclasts secrete osteopontin into resorption lacunae during bone resorption. *Histochem Cell Biol.* 2019 Jun; 151(6):475-87. doi: 10.1007/s00418-019-01770-y.

Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol.* 2011 Nov; 211(2):109-21. doi: 10.1530/JOE-11-0048.

Manocha S, Farokhnia N, Khosropanah S, Bertol JW, Santiago J Junior, Fakhouri WD. Systematic review of hormonal and genetic factors involved in the nonsyndromic disorders of the lower jaw. *Dev Dyn.* 2019 Feb; 248(2):162-172. doi: 10.1002/dvdy.8.

Marchant C, Anderson P, Schwarz Q, Wiszniak S. Vessel-derived angiocrine IGF1 promotes Meckel's cartilage proliferation to drive jaw growth during embryogenesis. *Development.* 2020 Jun; 11;147(11):dev190488. doi: 10.1242/dev.190488.

Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci.* 2000 Feb; 108(1):74-7.

McKee MD, Nanci A. Osteopontin: An Interfacial Extracellular Matrix Protein in Mineralized . *Connective Tissue Research.* 1996 March; 22; 35(1-4): 197-205. doi: 10.3109/03008209609029192.

Nanci A. *Ten Cate: histologia oral.* 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Dec; 83(23):8819-23. doi: 10.1073/pnas.83.23.8819.

Plotkin LI, Bruzzaniti A. Molecular signaling in bone cells: Regulation of cell differentiation and survival. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2019; 116:237-281. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.002.

Ramaesh T, Bard JB. The growth and morphogenesis of the early mouse mandible: a quantitative analysis. *J Anat.* 2003 Aug; 203(2):213-22. doi: 10.1046/j.1469-7580.2003.00210.x.

Radlanski RJ, Renz H, Klarkowski MC. Prenatal development of the human mandible. 3D reconstructions, morphometry and bone remodelling pattern, sizes 12-117 mm CRL. *Anat Embryol (Berl).* 2003 Oct; 207(3):221-32. doi: 10.1007/s00429-003-0343-4.

Riminucci M, Bradbeer JN, Corsi A, Gentili C, Descalzi F, Cancedda R, Bianco P. Vis-à-vis cells and the priming of bone formation. *J Bone Miner Res.* 1998 Dec; 13(12):1852-61. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.12.1852

Rodríguez-Vázquez JF, Mérida-Velasco JR, Mérida-Velasco JA, Sánchez-Montesinos I, Espín-Ferra J, Jiménez-Collado J. Development of Meckel's cartilage in the symphyseal region in man. *Anat Rec.* 1997 Oct; 249(2):249-54. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199710)249:2<249::AID-AR12>3.0.CO;2-O

Sakakura Y, Hosokawa Y, Tsuruga E, Irie K, Yajima T. In situ localization of gelatinolytic activity during development and resorption of Meckel's cartilage in mice. *Eur J Oral Sci.* 2007 Jun; 115(3):212-23. doi: 10.1111/j.1600-0722.2007.00447.

Sakakura Y, Tsuruga E, Irie K, Hosokawa Y, Nakamura H, Yajima T. Immunolocalization of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in Meckel's cartilage compared with developing endochondral bones in mice. *J Anat.* 2005 Oct; 207(4):325-37.

Shapiro IM, Adams CS, Freeman T, Srinivas V. Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2005 Dec; 75(4):330-9. doi: 10.1002/bdrc.20057.

Shibata S, Sakamoto Y, Baba O, Qin C, Murakami G, Cho BH. An immunohistochemical study of matrix proteins in the craniofacial cartilage in midterm human fetuses. *Eur J Histochem.* 2013 Dec; 257(4):e39. doi: 10.4081/ejh.2013.e39.

Shimada M, Yamamoto M, Wakayama T, Iseki S, Amano O. Different expression of 25-kDa heat-shock protein (Hsp25) in Meckel's cartilage compared with other cartilages in the mouse. *Anat Embryol (Berl).* 2003 Feb; 206(3):163-73. doi: 10.1007/s00429-002-0297-y.

Shimo T, Kanyama M, Wu C, Sugito H, Billings PC, Abrams WR, Rosenbloom J, Iwamoto M, Pacifici M, Koyama E. Expression and roles of connective tissue growth factor in Meckel's cartilage development. *Dev Dyn*. 2004 Sep; 231(1):136-47. doi: 10.1002/dvdy.20109.

Shorr E. A new technic for staining vaginal smears. *Science*. 1940 Mar; 29;91(2361):321-2. doi: 10.1126/science.91.2361.321.

Si J, Wang C, Zhang D, Wang B, Zhou Y. Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. *Med Sci Monit*. 2020 Jan; 30;26:e919159. doi: 10.12659/MSM.919159.

Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep*. 2014 Jan; 8;3:481. doi: 10.1038/bonekey.2013.215.

Song B, Song H, Wang W, Wang H, Peng H, Cui J, Wang R, Huang H, Wang W, Wang L. Beclin 1 overexpression inhibits chondrocyte apoptosis and downregulates extracellular matrix metabolism in osteoarthritis. *Mol Med Rep*. 2017 Oct; 16(4):3958-3964. doi: 10.3892/mmr.2017.7064.

Svandova E, Anthwal N, Tucker AS, Matalova E. Diverse Fate of an Enigmatic Structure: 200 Years of Meckel's Cartilage. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Aug; 28;8:821. doi: 10.3389/fcell.2020.00821.

Teti A. Mechanisms of osteoclast-dependent bone formation. *Bonekey Rep*. 2013 Dec; 4;2:449. doi: 10.1038/bonekey.2013.183.

Touaitahuata H, Cres G, de Rossi S, Vives V, Blangy A. The mineral dissolution function of osteoclasts is dispensable for hypertrophic cartilage degradation during long bone development and growth. *Dev Biol*. 2014 Sep; 1;393(1):57-70. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.06.020.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. 2000 Sep; 1;14(17):2123-33. doi: 10.1101/gad.815400.

Walker CG, Dangaria S, Ito Y, Luan X, Diekwisch TG. Osteopontin is required for unloading-induced osteoclast recruitment and modulation of RANKL expression during tooth drift-associated bone remodeling, but not for super-eruption. *Bone*. 2010 Dec; 47(6):1020-9. doi: 10.1016/j.bone.2010.08.025.

Wang Y, Zheng Y, Chen D, Chen Y. Enhanced BMP signaling prevents degeneration and leads to endochondral ossification of Meckel's cartilage in mice. *Dev Biol.* 2013 Sep; 15;381(2):301-11. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.07.016.

Wiszniak S, Mackenzie FE, Anderson P, Kabbara S, Ruhrberg C, Schwarz Q. Neural crest cell-derived VEGF promotes embryonic jaw extension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 May; 12;112(19):6086-91. doi: 10.1073/pnas.1419368112.

Wyganowska-Świątkowska M, Przysańska A. The Meckel's cartilage in human embryonic and early fetal periods. *Anat Sci Int.* 2011 Jun; 86(2):98-107. doi: 10.1007/s12565-010-0093-3.

Yang G, Zhu L, Hou N, Lan Y, Wu XM, Zhou B, Teng Y, Yang X. Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell Res.* 2014 Oct; 24(10):1266-9. doi: 10.1038/cr.2014.111.

Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014b Aug 19; 111(33):12097-102. doi: 10.1073/pnas.1302703111.

Yang RT, Zhang C, Liu Y, Zhou HH, Li ZB. Autophagy prior to chondrocyte cell death during the degeneration of Meckel's cartilage. *Anat Rec (Hoboken).* 2012 May; 295(5):734-41. doi: 10.1002/ar.22433.

Zou C, Song G, Luo Q, Yuan L, Yang L. Mesenchymal stem cells require integrin $\beta 1$ for directed migration induced by osteopontin in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2011 Mar; 47(3):241-50. doi: 10.1007/s11626-010-9377-0.

Zhao X, Patil S, Xu F, Lin X, Qian A. Role of Biomolecules in Osteoclasts and Their Therapeutic Potential for Osteoporosis. *Biomolecules.* 2021 May; 17;11(5):747. doi: 10.3390/biom11050747.

Zhou X, von der Mark K, Henry S, Norton W, Adams H, de Crombrughe B. Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet.* 2014 Dec; 4;10(12):e1004820. doi: 10.1371/journal.pgen.1004820.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Fundada em 1900

"Em constante busca da excelência"
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

 Comissão de Ética no Uso de Animais
 Tel. (11) 3091 7842
 ceuaf@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: "Estudo histológico e imunohistoquímico da degeneração da região central da cartilagem de Meckel na mandíbula em desenvolvimento de ratos", registrada com o nº 12/2021, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da FOUSP. colaboradoras: Juliana Cristina Peixoto Conceição e Elisângela Chinen, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 02/08/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2021 a 31/07/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico - Wistar
Nº de animais	10
Peso/Idade	250-300 g
Sexo	M e F
Origem	Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

São Paulo, 25 de agosto de 2021.

 Profa. Associada Dra. Sílvia Vanessa Lourenço
 Coordenadora do CEUA-FOUSP