

## Αντι-BMP4 μονοκλωνικό αντίσωμα καθυστερεί την οστεογένεση στην κάτω γνάθο και επηρεάζει τη διαφοροποίηση των οδοντινοβλαστών

Δέσποινα Σ. Κουσουλάκου,<sup>1</sup> Λουκάς Χ. Μαργαρίτης,<sup>2</sup> Σταύρος Λ. Κουσουλάκος<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Βιολόγος, Οδοντίατρος, Υποψηφία Διδάκτωρ, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

<sup>2</sup>Καθηγητής Βιολογίας Κυττάρου, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

<sup>3</sup>Αναπληρωτής Καθηγητής Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

## Anti-BMP4 monoclonal antibody delays mandibular osteogenesis and affects odontoblast differentiation

Despina S. Koussoulakou,<sup>1</sup> Loukas H. Margaritis,<sup>2</sup> Stauros L. Koussoulakos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Biologist, Dentist, Doctorate degree candidate, Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.

<sup>2</sup>Professor of Cellular Biology, Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.

<sup>3</sup>Associate Professor of Developmental Biology, Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.

### ΔΟΜΗΜΕΝΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**ΣΚΟΠΟΣ:** Να εκτιμηθεί η επίδραση του μορφογενετικού παράγοντα BMP4 στην οστεογένεση των φατνίων και στη διαφοροποίηση των οδοντινοβλαστών, με προοπτική μελλοντικής εφαρμογής των αποτελεσμάτων σε κλινικό επίπεδο.

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ:** Στατικής ομάδος.

**ΧΡΟΝΟΣ ΚΑΙ ΤΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ:** Η εργασία αυτή αποτελεί τμήμα της διδακτορικής διατριβής που εκπονεί η πρώτη των συγγραφέων στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η προσέγγιση στον στόχο επιτυγχάνεται με ένεση αντι-BMP4 σε έγκυα ποντίκια και μελέτη των επιπτώσεων στα νεογέννητα άτομα.

**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:** Κάθε ομάδα πειραματοζώων περιελάμβανε 20 άτομα. Η πειραματική ομάδα εγκύων, λευκών ποντικών (*Mus musculus*) υπέστη επίδραση μονοκλωνικού αντι-BMP4 αντισώματος κατά την 9η ημέρα εγκυμοσύνης. Τα αποτελέσματα εκτιμώνται, (α) μακροσκοπικά, (β) σε στερεοσκόπιο, ύστερα από διπλή ιστοχημική χρώση χόνδρου/οστίτη ιστού, και με φωτονική μικροσκοπία ύστερα από (γ) ιστολογική χρώση (Domagk) τομών παραφίνης, και (δ) ανοσοϊστοχημεία.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Η *in vivo* χορήγηση ορισμένων

### STRUCTURED ABSTRACT

**AIM:** To assess the effect of BMP4 morphogenetic factor on alveolar osteogenesis and odontoblast differentiation, aiming at future clinical implementation of results.

**STUDY DESIGN:** Static Group.

**TIME AND PLACE OF STUDY:** This study is part of the doctoral thesis of the first author at the Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece. Research involves injection of anti-BMP4 in pregnant mice and study of effects in newborn subjects.

**MATERIAL AND METHODS:** Each experimental group comprised 20 subjects. The experimental group of pregnant white mice (*Mus musculus*), was subjected to the effect of monoclonal antibody anti-BMP4 during the 9th gestational day. Results were evaluated, (a) macroscopically, (b) stereoscopically, following double histochemical staining of cartilage/osseous tissue, and with photon microscopy following (c) histological staining (Domagk) of paraffin sections, and (d) immunohistochemistry.

**RESULTS:** *In vivo* administration of a certain quantity of monoclonal anti-BMP4 antibody does not seem to affect the general development of the mature organ-

ποσότητας μονοκλωνικού, αντι-BMP4 αντισώματος φαίνεται να μην επηρεάζει την εν γένει αναπτυξιακή πορεία στο επίπεδο του ώριμου οργανισμού. Ωστόσο, στο επίπεδο των οδόντων διαπιστώνεται παροδική παρέμβαση στη φυσιολογική πορεία διαφοροποίησης των οδοντινοβλαστών και στην παραγωγή προοδοντίνης, ενώ η καθυστέρηση της οστεοποίησης συμπεριλαμβάνει και τα φατνία.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Η ελεγχόμενη, πειραματική χορήγηση του αντι-BMP4 φαίνεται να είναι ασφαλής για τον οργανισμό, αλλά και ελπιδοφόρος προς σκοπούμενη, κατευθυνόμενη διαφοροποίηση των οδοντινοβλαστών.

**Λέξεις κλειδιά:** Αδαμαντίνη, BMP4, οδοντινοβλάστες, οδοντογένεση, φατνία  
Ελλ Όρθοδ Επιθ 2006;9:35-45.  
Παρελήφθη: 26.06.2005 – Έγινε δεκτή: 13.10.2005

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οργανογένεση των γνάθων και των οδόντων ρυθμίζεται από πολλούς ενδογενείς παράγοντες, ιδίως της υπεροικογένειας TGF-β (transforming growth factor – αυξητικός παράγων μετασχηματισμού) (Koussoulakou και συν., 2001; ten Berge και συν., 2001). Η πολυπλοκότητα των μηχανισμών που ελέγχουν και ρυθμίζουν την οδοντογένεση συνεπάγεται ορισμένες φορές τον αποσυντονισμό της αναπτυξιακής πορείας και την εμφάνιση γναθικών και οδοντικών δυσπλασιών. Οι δυσπλασίες αυτές έχουν ως σύνηθες αποτέλεσμα την απουσία ορθής σύγκλισης των οδόντων, γεγονός που επιφέρει τέτοιες κοσμητικές και παθολογικές επιπτώσεις στον φέροντα οργανισμό ώστε να είναι απαραίτητη η ορθοδοντική ή/και η γναθοχειρουργική επέμβαση (Georgiakaki και συν., 2003). Αρκετές φορές, το αίτιο της απουσίας οδοντικής σύγκλισης είναι η απουσία συμμετρίας και συνεπώς και συναρμογής μεταξύ άνω και κάτω γνάθων (Mossey, 1999).

Η υπεροικογένεια TGF-β συμπεριλαμβάνει πληθώρα μορφογενετικών/αυξητικών παραγόντων που δρουν κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Μέλη της υπεροικογένειας αυτής είναι και οι οστεομορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs, bone morphogenetic proteins). Μέχρι σήμερα είναι γνωστοί 16 ισότυποι BMPs, οι οποίοι, αν και αρχικά ανιχνεύθηκαν από οστεοεπαγωγικές δραστηριότητες, απεδείχθη ότι διαδραματίζουν πρωτεύοντες ρόλους καθ όλη την εμβρυϊκή ανάπτυξη των οργανισμών και την οντογένεση πολλών

ism. However, at the dental level, there is transitory interference with the normal course of odontoblast differentiation and the production of pre-dentin, whereas delay in ossification also includes the alveoli.  
**CONCLUSIONS:** Controlled, experimental anti-BMP4 administration seems to be both safe for the organism and promising for intended, guided odontoblast differentiation

**Key words:** Enamel, BMP4, odontoblasts, odontogenesis, alveoli

Hell Orthod Rev 2006;9:35-45.

Received: 26.06.2005 – Accepted: 13.10.2005

## INTRODUCTION

Organogenesis of jaws and teeth is regulated by many intrinsic factors, especially of the TGF-β superfamily (transforming growth factors) (Koussoulakou et al., 2001; ten Berge et al., 2001). Occasionally, the complexity of mechanisms controlling and regulating odontogenesis entails aberration of the developmental course and occurrence of gnathic and dental dysplasias. These dysplasias usually result in lack of correct dental occlusion, which has both cosmetic and pathological consequences for the bearer, so much so that orthodontics or/and orthognathic surgery become necessary (Georgiakaki et al., 2003). Often, the cause of the malocclusion is absence of symmetry and, consequently, absence of maxillomandibular intercuspatation (Mossey, 1999).

The TGF-β superfamily includes many morphogenetic/growth factors active during fetal development. Osteomorphogenetic proteins (BMPs, bone morphogenetic proteins) belong to this superfamily. To date, 16 BMP isotypes have become known; these isotypes, although initially traced from osteoinductive activities, have been shown to play a major role throughout fetal development and organogenesis (Tziafas et al., 2001; Trimmer et al., 2002; Koussoulakos, 2004). BMP activities during embryogenesis are revealed through gene targeting of certain sequences. In most embryonic models, BMP action is regulated by various factors, as well as by specific types of BMP antagonists (Grotenwold and Ruther, 2002; Wang et al., 2004); interactions with BMP4 inhibitors play a decisive role in mandibular formation (Stottmann et al., 2001; Wang et al., 2004). Furthermore, BMP4 plays an important role in the differentiation of

οργάνων (Tziafas και συν., 2001; Trimmer και συν., 2002; Koussoulakos, 2004). Οι δραστηριότητες των BMPs κατά την εμβρυογένεση αναδεικνύονται με γονιδιακή στόχευση (knock out ή gene targeting) ειδικών αλληλοειδών. Στα περισσότερα εμβρυϊκά μοντέλα η δράση των διαφόρων BMPs ρυθμίζεται από ποικίλους παράγοντες καθώς και από συγκεκριμένους τύπους ανταγωνιστών τους (Grotenwold και Ruther, 2002; Wang και συν., 2004) ενώ οι αλληλεπιδράσεις με αναστολείς της BMP4 είναι καθοριστικές για τον σχηματισμό της κάτω γνάθου (Stottmann και συν., 2001; Wang και συν., 2004). Ακόμη, η BMP4 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση τόσο των οδοντινοβλαστών όσο και των αδαμαντινοβλαστών κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Tabata και συν., 2002; Wang και συν., 2004), ενώ επάγει τη δημιουργία οδοντινοβλαστών από μεσεγχειματικά κύτταρα του οδοντικού πολφού, γεγονός που μπορεί να τύχει κλινικής εφαρμογής σε θεραπευτική αγωγή του πολφού (Tucker και συν. 1998; Iohara και συν., 2004; Goldberg και Smith, 2004). Οι ώριμοι οδοντινοβλάστες ευρίσκονται διατεταγμένοι σε μια μονοκυττάρια στιβάδα στα όρια της πολφικής κοιλότητας. Οι λειτουργικώς δραστήριοι οδοντινοβλάστες είναι επιμήκη, κυλινδρικά, πολυμήκτα κύτταρα, των οποίων το ένα άκρο είναι στραμμένο προς την προ-οδοντίνη και διαθέτει επιμήκη αποφυάδα που «εγκλιείται» εντός του οδοντινικού σωληνίσκου και η οποία διασχίζει την προ-οδοντινική ζώνη και την εφαιλωμένη οδοντίνη (Linde και Goldberg, 1993). Κύριος ρόλος των οδοντινοβλαστών είναι η σύνθεση και έκκριση κολληγονούχων και μη, πρωτεϊνών και πληροφοριακών μορίων (Cassidy και συν., 1997). Μετά το πέρας της σύνθεσης της πρωτογενούς οδοντίνης, οι οδοντινοβλάστες μεταπίπτουν σε εφησυχάζουσα κατάσταση, όμως εξακολουθούν να συνθέτουν δευτερογενή οδοντίνη, αλλά με πολύ βραδύτερο ρυθμό. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες, π.χ. τερηδόνα, διάτρηση, τραύμα κ.λπ., οι εφησυχάζοντες οδοντινοβλάστες αυξάνουν εκ νέου τη συνθετική ικανότητά τους και εκκρίνουν τριτογενή οδοντίνη προς προστασία του πολφού (Ten Cate, 1994).

Το κατ'εξοχήν προστατευτικό στρώμα του οδόντος είναι η εξωτερική αδαμαντίνη, η οποία όμως φθείρεται υπό την επίδραση ποικίλων παραγόντων, η δε φθορά της αδαμαντίνης είναι η δεύτερη σε συχνότητα παθολογική κατάσταση του ανθρώπου μετά το κοινό κρυολόγημα. Η προοδευτική καταστροφή ενός οδόντος μπορεί να διακοπεί ή να επιβραδυνθεί σημαντικά με έμφραξη, η οποία όμως

both odontoblasts and ameloblasts during fetal development (Tabata et al., 2002; Wang et al., 2004), while it induces odontoblast formation from mesenchymal cells of the dental pulp, a finding that may be clinically useful in pulpal treatment (Tucker et al., 1998; Iohara et al., 2004; Goldberg and Smith, 2004).

Mature odontoblasts are arranged in a single-cell layer on the borders of the pulp cavity. Functionally active odontoblasts are longitudinal, cylindrical, polarized cells whose one end is turned to the pre-dentin and has a longitudinal ending "confined" within the dentinal tubule, which crosses the pre-dentinal zone and mineralized dentin (Linde and Goldberg, 1993). The major role of odontoblasts is synthesis and secretion of collagenous and non-collagenous proteins and signal molecules (Cassidy et al., 1997). Following completion of primary dentin synthesis, odontoblasts come to a rest state; however, they continue to synthesize secondary dentin, although at a much lower rate. Nevertheless, it has been found that under specific conditions, e.g. caries, perforation, trauma etc., resting odontoblasts increase once more their synthesizing activity and secrete tertiary dentin for pulp protection (Ten Cate, 1994).

The major protective dental layer is the external enamel, which, however, decays under the influence of various factors. Enamel decay is the second most frequent pathological human condition after the common cold. Gradual dental destruction may be interrupted or significantly slowed down by dental fillings, which, however, are often painful, while several of the pharmaceutical, vaso-constrictive agents (e.g. adrenaline) used are not always safe. Recent studies further support the important observation that odontoblasts are capable of expressing even amelogenin-producing genes (Papagerakis et al., 2003; Nagano et al., 2003; Wang et al., 2004). Since ameloblasts undergo apoptosis before tooth eruption, enamel regeneration is considered impossible. Today, the evolution of molecular biology offers the possibility to hope for odontoblast-guided enamel synthesis in the future (a rather distant goal, for the time being) and proper enamel deposition over the existing dentin. The possibilities for clinical applications of a preventive and therapeutic nature are largely based on fully illuminating all developmental procedures and identifying all factors involved in jaw morphogenesis and odontogenesis (Mao and Nah, 2004). The aim of this study was to analyze the action of a BMP4 inhibitor on mandibular

συχνά είναι επώδυνη, ενώ ορισμένα από τα χρησιμοποιούμενα φαρμακευτικά, αγγειοσυσταλτικά σκευάσματα (π.χ. αδρεναλίνη) δεν είναι πάντα ακίνδυνα. Πρόσφατες μελέτες ενισχύουν τη σημαντική παρατήρηση ότι, οι οδοντινοβλάστες είναι σε θέση να εκφράσουν ακόμη και γονίδια παραγωγής αμειλογενίνης (Paragerakis και συν., 2003; Nagano και συν., 2003; Wang και συν., 2004). Αφού οι αδαμαντινοβλάστες υφίστανται απόπτωση πριν από την έκφυση του οδόντος θεωρείται αδύνατη η επαναδημιουργία της αδαμαντίνης. Σήμερα, η πρόοδος της μοριακής βιολογίας μας επιτρέπει να ελπίζουμε σε έναν (προς το παρόν αρκετά μακρινό) στόχο, δηλαδή στην κατευθυνόμενη σύνθεση αδαμαντίνης από τους οδοντινοβλάστες και στη σωστή τοποθέτηση αυτής επί της υπάρχουσας οδοντίνης. Οι πιθανότητες για κλινικές εφαρμογές της πρόληψης και της θεραπείας βασίζονται εν πολλοίς στην πλήρη διαφώτιση των αναπτυξιακών διαδικασιών και στην ταυτοποίηση των παραγόντων που εμπλέκονται στη μορφογένεση των γνάθων και στην οδοντογένεση (Mao και Nah, 2004). Ο εγγύτερος στόχος της παρούσης ερευνητικής εργασίας ήταν η ανάλυση της δράσης αναστολέως της BMP4 επί της οστεογένεσης της κάτω γνάθου και της οργανογένεσης των οδόντων, σε ζωικά μοντέλα θηλαστικών.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Προς επίτευξη του στόχου, προτιμήθηκε η πειραματική σχεδίαση στατικής ομάδας. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις ισότιμες ομάδες (i, ii, iii και iv, περίπου ίδια ηλικία και βάρος ζώων) λευκών, θηλυκών ποντικών (είδος *Mus musculus*, στέλεχος Balb/c, προμήθεια από το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ) οι οποίοι ευρίσκοντο περίπου στην 9η ημέρα εγκυμοσύνης [αναπτυξιακό στάδιο TS13, (Theiler, 1989)]. Για λόγους αξιοπιστίας, μελετήθηκαν 20 άτομα από κάθε ομάδα. Σε κάθε ζώο των ομάδων (i), (ii) και (iii) ενέθηκε ενδοκοιλιακά διάλυμα 50 μg μονοκλωνικού αντισώματος αντι-BMP4 (mouse monoclonal antibody, κλώνος 3H2, Novocastra), στη δε ομάδα (iv) ενίονται 100 μl του διαλύτου (φυσιολογικός ορός). Όλες οι επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των Federal Animal Welfare Regulations. Αμέσως μετά τη γέννησή τους τα νεογνά της ομάδας (i) παραμένουν με τη μητέρα τους μέχρι να περατωθεί η έκφυση όλων των οδόντων. Τα νεογνά των ομάδων (ii) και (iii) ναρκώνονται αμέσως και μονιμοποιούνται, τα μεν (ii) εντός αλκοόλης 95%, τα δε

osteogenesis and tooth organogenesis in mammal animal models.

## MATERIALS AND METHODS

A static group experimental design was preferred. Four equal groups (i, ii, iii and iv, of approximately similar animal age and weight) of white, female mice were used (species *Mus musculus*, strain Balb/c, provided by the Greek Pasteur Institute), all of them being at the 9th gestational day [developmental stage TS13, (Theiler, 1989)]. For validity purposes, 20 subjects of each group were studied. Every animal in groups (i), (ii) and (iii) was given an intra-ventral injection of a 50 μg anti-BMP4 monoclonal antibody solution (mouse monoclonal antibody, clone 3H2, Novocastra); group (iv) was injected with 100 μl of solvent (normal saline). All procedures were performed according to the guidelines of Federal Animal Welfare Regulations. Immediately after birth, group (i) newborns remained with their mother until all their teeth had erupted. Group (ii) and (iii) newborns were anesthetized immediately and specimens were fixed: group (ii) in 95% alcohol and group (iii) in 5% aqueous formaldehyde solution. Similar procedures were also followed for group (iv) newborns. Results were analyzed with, (a) macroscopic examination, in order to investigate external, morphogenetic anomalies (group i, ii and iii off-spring), (b) double, histochemical staining (Alcian blue for cartilage, Alizarin red S for osseous tissue, Gavaia et al., 2000) of intact embryos and clearing (in glycerine) in order to reveal craniofacial skeletal elements (group ii off-spring), (c) Domagk histological staining (Romeis, 1948) of paraffin sections (group iii off-spring) and (d) immunohistochemical DAB staining (group iii off-spring).

## RESULTS

### Dental development

Murine teeth are symmetrically positioned in both jaws, following the same pattern per quadrant, that is, one central, anterior incisor and three molars (1I-diastrama-3M). Incisors (I) always have open roots (hypso-donts, they grow throughout life) and enamel is found on their anterior surface only. Molars (M) do not keep developing (brachydonts). Mice do not possess lateral incisors, canines and premolars. Thus, an edentulous area called

(iii) εντός υδατικού διαλύματος φορμαλδεΐδης 5%. Σχετικές διαδικασίες ακολουθήθηκαν και για νεογνά της ομάδας (iv). Τα αποτελέσματα αναλήθηκαν με, (α) μακροσκοπική εξέταση, προς διακρίβωση εξωτερικών, μορφογενετικών ανωμαλιών (απόγονοι ομάδων i, ii και iii), (β) διπλή, ιστοχημική χρώση (Alcian blue για τον χόνδρο, Alizarin red S, για τον οστίτη ιστό, Gavaia και συν., 2000) ολοκλήρων εμβρύων και διαφανοποίηση (σε γλυκερίνη) προς αποκάλυψη των κρανιοπροσωπικών σκελετικών στοιχείων (απόγονοι ομάδος ii), (γ) ιστολογική χρώση Domagk (Romeis, 1948) τομών παραφίνης (απόγονοι ομάδος iii) και (δ) ανοσοϊστοχημική χρώση DAB (απόγονοι ομάδος iii).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Ανάπτυξη οδόντων

Οι οδόντες των ποντικών εδράζονται συμμετρικά στην άνω και στην κάτω γνάθο, με ίδιο πρότυπο τεταρτημορίου, έναν κεντρικό, πρόσθιο τομέα και τρεις γομφίους (1I-διάστημα-3M). Οι τομείς (I) είναι πάντα ανοικτοί στη ρίζα (υψόδοντες, αυξάνουν συνεχώς καθ όλη τη διάρκεια της ζωής), έχουν δε αδαμαντίνη μόνο στην πρόσθια επιφάνεια. Οι γομφίοι (M) δεν αναπτύσσονται συνεχώς (βραχύδοντες). Επειδή στα ποντίκια δεν υπάρχουν πλευρικοί τομείς, κυνόδοντες και προγόμφιοι, μεταξύ τομέων και γομφίων υπάρχει νωδός χώρος ο οποίος καλείται διάστημα.

Οι γνάθοι προέρχονται από το πρώτο βραγχιακό τόξο, το οποίο, στο ποντίκι δημιουργεί κατά την 8η ημέρα κύησης (TS 12) το προσωπορινικό έπαρμα, τις συζυγείς άνω γναθικές προεξοχές και τις συζυγείς κάτω γναθικές προεξοχές. Οι προεξοχές αυτές συντήκονται, με πρώτες τις κάτω γναθικές, και έτσι σχηματίζεται η κάτω γνάθος. Η κάτω γνάθος ανήκει στο σπληανοκρανίο I και δημιουργείται με χονδρογενή οστεογένεση από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Στην ανάπτυξη της κάτω γνάθου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ο χόνδρος Meckel και υμενογενή οστά που δημιουργούνται γύρω του (Lee και συν., 2001) (Εικ. 1).

### Μακροσκοπικά ευρήματα

Εξωτερική εξέταση των ανατομικών στοιχείων και της συμπεριφοράς των απογόνων της ομάδας (i) (ένεση αντι-BMP4, εκτρέφονται μέχρις πλήρους έκφυσης των οδόντων) δεν αποκάλυψε διαφορές σε σύγκριση με μάρτυ-

diastema exists between incisors and molars.

In mice, jaws derive from the first brachial arch which, during the 8th gestational day (TS 12), forms the nasofacial eminence and the bilateral maxillary and mandibular gnathic processes. These processes are fused, beginning with the mandibular ones, thus forming the mandible. The mandible belongs to viscerocranium I and is formed through cartilagenous osteogenesis from neural crest cells. Meckel's cartilage and membranous bones formed around it, also play an important role in mandibular development (Lee et al., 2001) (Fig. 1).

### Macroscopic findings

External examination of the anatomical elements and behavior of group (i) off-spring (anti-BMP4 injection, bred until full tooth eruption) did not show any differences compared to controls. Form and distribution of the dental cusps of mandibular molars were studied more extensively and no deviation from the normal pattern was noticed (Lyngstadaas et al., 1998).

### Clearing of embryos

Certain members of group (ii) [fixed in 95% alcohol] undergo detailed stereoscopic study of their external features, as well as inspection of the internal anatomy of the most apparent organic systems. Double staining of osseous tissue and cartilage reveals that the blue color prevails in more anatomical sites as compared to the control group (group iv), a fact, which suggests ossification delay. Chondrogenesis of the alveoli is prolonged, especially in the mandible (Fig. 2).

### Histological staining

Paraffin section staining using the Domagk method shows that anti-BMP4 antibody injection in a female mouse during the 9th gestational day delays (at least until labor day) the differentiation and stratification of pre-odontoblasts and the secretion of pre-dentin (Fig. 3B); pre-dentin, on the other hand, is well formed by the already differentiated odontoblasts in normal subjects (Fig. 3A).

### Immunohistochemistry

Expression and distribution of BMP4 protein to anatomi-

ρες. Η μορφή και η κατανομή των οδοντικών φυμάτων των γομφίων της κάτω γνάθου μελετήθηκε εκτενέστερα χωρίς να σημειωθούν αποκλίσεις από το φυσιολογικό πρότυπο (Lyngstadaas και συν., 1998).

### Διαφανοποίηση εμβρύων

Ορισμένα νεογνά της ομάδας (ii) [μονιμοποίηση εντός 95% αηκοόλης] υφίστανται λεπτομερή στερεοσκοπική μελέτη των εξωτερικών χαρακτηριστικών τους, καθώς και επιθεώρηση της εσωτερικής ανατομίας των πλέον εμφανών οργανικών συστημάτων. Η διπλή χρώση οστίτη ιστού και χόνδρου αποκαλύπτει επικράτηση της γαλιάζιας από χρωσης σε περισσότερες ανατομικές θέσεις σε σχέση με τον μάρτυρα (ομάδα iv), κατάσταση που υποδηλώνει καθυστέρηση στην οστεοποίηση. Ιδίως στην κάτω γνάθο, εκδηλώνεται παράταση της χονδρογένεσης προς τα φατνία (Εικ. 2).

### Ιστολογική χρώση

Χρώση ιστολογικών τομών παραφίνης με τη μέθοδο Domagk δείχνει ότι, ένεση αντι-BMP4 αντισώματος σε θηλυκό ποντίκι κατά την 9η ημέρα εγκυμοσύνης καθυστερεί στα έμβρυα (τουλάχιστον μέχρι την ημέρα τοκετού) τη διαφοροποίηση και στρωμάτωση των προ-οδοντινοβλαστών και την έκκριση προ-οδοντίνης (Εικ. 3B), ενώ στο ίδιο χρονικό διάστημα στο φυσιολογικό άτομο η προ-οδοντίνη έχει καλώς σχηματισθεί από τους ήδη διαφοροποιημένους οδοντινοβλάστες (Εικ. 3A).

### Ανοσοϊστοχημεία

Η έκφραση και η κατανομή της πρωτεΐνης BMP4 σε ανατομικά στοιχεία της επιλογής μας (οδοντικό πέταλο, γνάθοι, οδοντικά βλαστήματα) δείχνει συγκεκριμένο πρότυπο στο όριο μεταξύ επιθηλίου και μεσοδέρματος/μεσεγχύματος (Εικ. 4). Η φαινομένη απουσία ανοσοϊστοχημικής χρώσης της BMP4 από τις εικόνες 4B και 4Δ ίσως οφείλεται σε περιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου, αφού η φυσιολογική μορφογένεση προϋποθέτει και την παρουσία BMP4.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### Ανάπτυξη οδόντων

Η οργανογένεση των οδόντων ξεκινά με μια σειρά διαδο-

cal elements of our choice (dental arch, jaws, dental buds) follows a specific pattern at the border between epithelium and mesoderm/mesenchyme (Fig. 4). The apparent absence of BMP4 immunohistochemical staining in figures 4B and 4Δ may be due to limitations of method sensitivity, since normal morphogenesis requires the presence of BMP4.

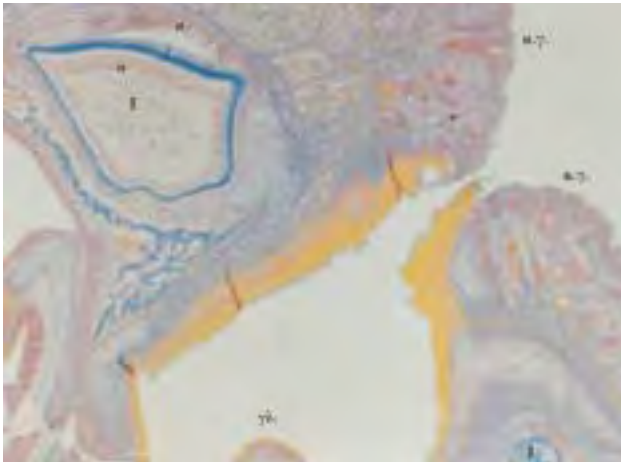
## DISCUSSION

### Dental development

Dental organogenesis begins with a series of successive, alternate interactions between oral epithelium and ectomesenchymal cells that have migrated from the neural crest and are located "under" the oral epithelium (Koussoulakou et al., 2001). The primary information for tooth formation is most probably transmitted through signals (e.g. FGF8) sent by the epithelium to the underlying ectomesenchyme (Grigoriou et al., 1998). Moreover, proteins BMP4 and SHH (sonic hedgehog) are also expressed at the epithelium. It seems that *Fgf8* gene expression at the epithelium induces the expression of *Pax9* at the ectomesenchyme. Consequently, simultaneous action of proteins FGF8 and BMP4 limits the expression of *Pax9* only to mesenchymal areas where teeth will be formed (Peters and Balling, 1999). In more advanced developmental odontogenesis stages, ectomesenchymal cells become differentiated as pre-odontoblasts. The latter, after several mitoses, undergo final differentiation and are transformed into cylindrical, post-mitotic odontoblasts that synthesize pre-dentin; at the same time, epithelial cells are differentiated to ameloblasts that are responsible for enamel formation. These epithelial-mesenchymal interactions have been well investigated in combination with regulatory mechanisms, growth factors, molecules of the extra-cellular matrix and cell adhesion molecules (Thesleff and Sharpe, 1997; Colbourne, 1999) (Fig. 3).

### Macroscopic findings

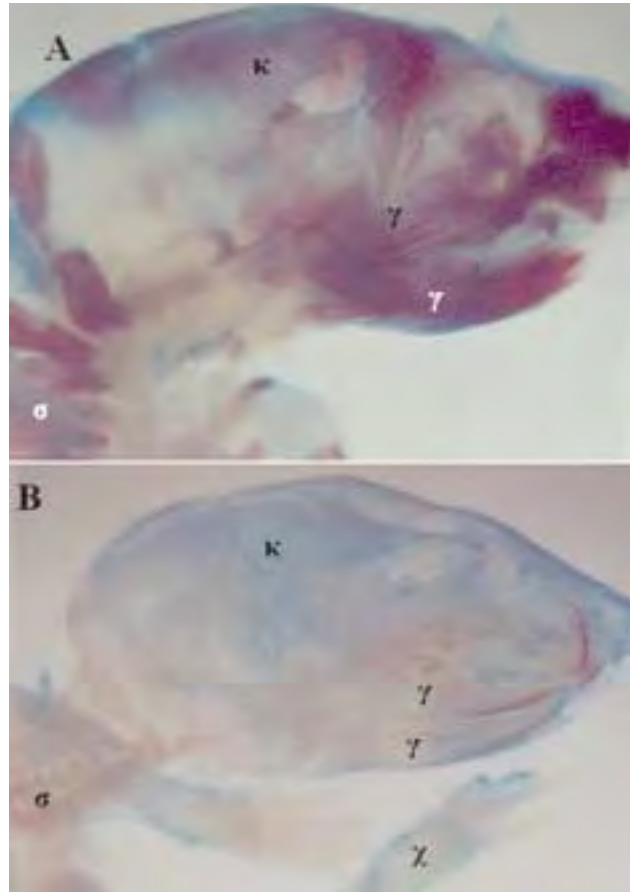
The presence of appropriate BMP4 quantities in specific fetal sites at the right time is considered absolutely necessary for the normal course of development (Ohazama et al., 2005). However, BMP4 action is also regulated by numerous intrinsic antagonists (Stottmann et al., 2001).



**Εικόνα 1.** Παρα-οβεηλιαία τομή στην περιοχή των «χειλιών» νεογέννητου ποντικού [Χ40]. Έχει επιλεγεί θέση που συμπεριλαμβάνει (για λόγους ανατομικής αναγνώρισης) τμήμα των τομέων (I) της άνω (α.γ.) και της κάτω (κ.γ.) γνάθου. γλ = γλώσσα. Στους τομείς του ποντικού υπάρχει αδαμαντίνη μόνο στο πρόσθιο τμήμα της μύλης, εξ ου και η παρουσία (α) στρώματος αδαμαντινοβλάστων. ο = οδοντινοβλάστες. Προ της έκφυσης των οδόντων οι αδαμαντινοβλάστες αποπίπτουν. Η φθορά της αδαμαντίνης είναι φυσιολογικά ανεπανόρθωτη και εκθέτει το δόντι σε διαβρωτικούς παράγοντες. Η οδοντινοβλαστική αποφυάδα κάθε οδοντινοβλάστης φθάνει μέχρι το όριο οδοντίνης/αδαμαντίνης (υπόλευκη στρώση μεταξύ οδοντινοβλάστων και αδαμαντίνης). Η σύγχρονη μοριακή βιολογία αποβλέπει στη δραστηριοποίηση του στρώματος των οδοντινοβλάστων προς σύνθεση, σωστή έκκριση και εναπόθεση αδαμαντίνης επί της υπάρχουσας οδοντίνης.

**Figure 1.** Para-sagittal section at the “lip” area of newborn mouse [X40]. The selected site includes (for purposes of anatomical identification) part of the incisors (I) of the maxilla (a.g.) and mandible (k.g.). γλ = tongue. In murine incisors, enamel is found only at the anterior part of the crown, which explains the presence of an ameloblast layer (a). ο = odontoblasts. Before tooth eruption ameloblasts undergo apoptosis. Enamel wear is irreversible physiologically and subjects the tooth to corrosive factors. The ending of each odontoblast reaches the dentin/enamel border (whitish layer between odontoblasts and enamel). Modern molecular biology aims at activating the odontoblast layer toward synthesis, proper secretion and enamel deposition over the existing dentin.

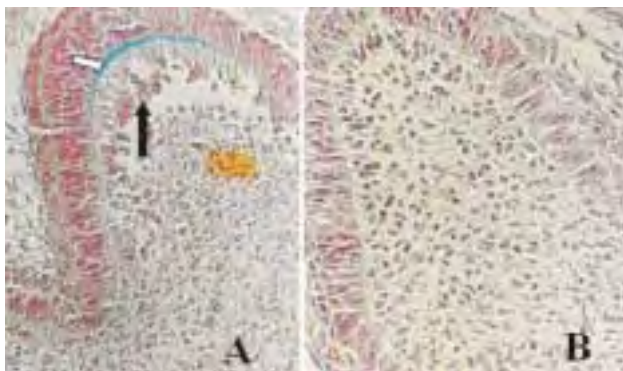
κικών, εναρτηασομένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του στοματικού επιθηλίου και των εκτομεσεγχυματικών κυττάρων, τα οποία έχουν μεταναστεύσει από τη νευρική ακροδοφία και εγκατασταθεί «κάτω» από το στοματικό επιθήλιο (Koussoulakou και συν., 2001). Η πρωταρχική πληροφορία για τη δημιουργία ενός οδόντος δίδεται πιθανότατα με σήματα (π.χ., FGF8) τα οποία αποστέλλει το επιθήλιο προς το υποκείμενο εκτομεσεγχυμα (Grigoriou και συν., 1998). Ακόμη, στο επιθήλιο εκφράζονται και οι πρωτεΐνες BMP4 και SHH (sonic hedgehog). Φαίνεται ότι η



**Εικόνα 2.** (Α) Διαφανοποιημένο κρανίο νεογέννητου ποντικού-μάρτυρα. Παρατηρούμε ότι κατά τη γέννηση το κρανίο (κ) και οι γνάθοι (γ) είναι σχεδόν πλήρως οστεοποιημένα (κόκκινη ιστοχημική χρώση Alizarin red S). (Β) Στο πειραματικό αυτό ζώο φαίνεται η καθυστέρηση στην οστεοποίηση (γαλάζια χρώση, Alcian blue), ενώ ίχνη ενασβεσίωσης εμφανίζονται στις γνάθους. σ = σπόνδυλοι, χ = αυτοπόδιο προσθίου άκρου.

**Figure 2.** (A) Cleared cranium of newborn control mouse. We observe that, at birth, the cranium (κ) and jaws (γ) are almost totally ossified (red histochemical staining Alizarin red S). (B) Delay in ossification is observed in this experimental animal (blue staining, Alcian blue), whereas mineralization traces are found in the jaws. σ = vertebrae, χ = forelimb autopodium.

In this study, an extrinsic BMP4 inhibitor/antagonist was administered but macroscopic findings, at the level of this study, did not reveal any changes of the normal phenotype. This may suggest that the specific quantity and way of *in vivo* antibody administration does not entail any risk for the newborns and may be considered safe. The most probable explanation for this observation is that normal phenotype may be due to the relative efficiency of non-bound BMP4 (Liu et al., 2005), to BMP4 replacement (“degeneration”) by other BMP’s (e.g.



**Εικόνα 3.** Βλαστήματα γομφίων νεογέννητων ποντικών. (Α) Από μάρτυρα (δηλαδή, η μητέρα τους ενέθηκε με φυσιολογικό ορό). Το μαύρο βέλος δείχνει τη μονόστιβη στρώση των οδοντινοβλαστών, ενώ η προοδοντίνη (γαλάζιο στρώμα) καταδεικνύεται από το λευκό βέλος. (Β) Εάν σε ποντίκια ενεθούν κατά την 9η ημέρα εγκυμοσύνης (χρόνος μετανάστευσης κυττάρων νευρικής ακρολοφίας – πρόγονοι οδοντινοβλαστών – και σχηματισμός 1ου φαρυγγικού τόξου) ποσότητα αντι-BMP4 αντισώματος, τότε η διαφοροποίηση των οδοντινοβλαστών στα έμβρυα καθυστερεί σημαντικά και δεν εμφανίζεται προ-οδοντίνη (τουλάχιστον μέχρι τη γέννηση).

**Figure 3.** Molar buds in newborn mice. (A) From control mouse (that is, the mother was injected with normal saline). The black arrow shows the single-cell layer of odontoblasts and pre-dentin (blue layer) is shown by the white arrow. (B) If a quantity of anti-BMP4 antibody is injected in mice during the 9th gestational day (time of neural crest cell migration – odontoblast predecessors – formation of 1st pharyngeal arch), then odontoblast differentiation in embryos is significantly delayed and no pre-dentin is observed (at least until birth).

έκφραση του γονιδίου *Fgf8* στο επιθήλιο επάγει την έκφραση του γονιδίου *Pax9* στο εκτομεσέγχυμα, ενώ η έκφραση του *Bmp4* στο επιθήλιο καταστέλλει την έκφραση του *Pax9* στο εκτομεσέγχυμα. Συνεπώς, η ταυτόχρονη, δράση των πρωτεϊνών FGF8 και BMP4 περιορίζει την έκφραση του *Pax9* μόνο σε περιοχές του μεσεγχύματος που θα δημιουργηθούν δόντια (Peters και Balling, 1999). Σε πλέον προχωρημένα αναπτυξιακά στάδια της οδοντογένεσης, εκτομεσεγχυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς προ-οδοντινοβλάστες. Αυτοί, ύστερα από ορισμένες μπιωτικές διαιρέσεις, υφίστανται τελική διαφοροποίηση και μετατρέπονται σε κυλινδρικούς, μεταμπιωτικούς οδοντινοβλάστες οι οποίοι συνθέτουν την προ-οδοντίνη, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται προς αδαμαντινοβλάστες, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό της αδαμαντίνης. Αυτές οι επιθηλιομεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις έχουν διερευνηθεί ικανοποιητικά σε συνδυασμό με ρυθμιστικούς μηχανισμούς, αυξητικούς παράγοντες, μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και μόρια

BMP2, Dassule and McMahon, 1998), to the complexity of the regulatory network (Wang et al., 2004), etc. Furthermore, absence of any change in molar anatomy may suggest that the pattern of proliferation and apoptosis of enamel knot cells is not significantly affected (Jernvall et al., 1998).

### Clearing of embryos

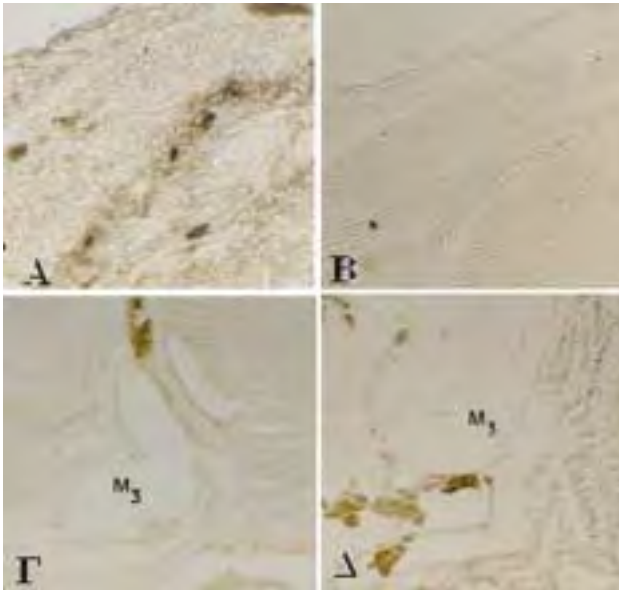
Delay in osteogenesis observed in this study is in full agreement with the results of other studies (Bennet et al., 1995) related to direct involvement of BMP4 and its antagonists in the developmental processes of neurulation, chondrogenesis and head formation (Meech et al., 2005). Since a quantity of BMP4 antagonist is introduced in the pregnant animal, limitation of BMP4 allows the expression of growth and survival factors (e.g. FGF8), thus delaying the death of chondrocytes and their replacement by osteoblasts (Suzuki et al., 2005).

### Histological staining

It is known that differentiation of pre-odontoblasts is induced by the ameloblast layer (Thesleff and Vaahokari, 1992), which, as shown in figure 3B, is well formed. Furthermore, thickening of the basal membrane separating pre-ameloblasts from pre-odontoblasts is essential. Consequently, in order to fully understand the role of BMP4 in odontoblast differentiation and apply this knowledge clinically, further studies on the temporospatial expression of BMP4 are necessary. In this case too, lack of deviation from the normal pattern supports indications about the safety of anti-BMP4 use.

### Immunohistochemistry

The apparent absence of colored sediment in the experimental animals (Fig. 4B and 4D) as opposed to its presence in the controls (Fig. 4A and 4F) could, at first glance, be interpreted as absence of BMP4 protein. However, since immunohistochemical staining, in general, is not a very sensitive method and subjects develop a normal phenotype, we are led to conclude that the residual BMP4 quantity suffices for morphogenetic action, but is inadequate for immunohistochemical tracing.



**Εικόνα 4.** Παρα-οβεληϊαίες τομές [X400] κάτω γνάθου νεογέννητων ποντικών περιλαμβάνουσες επιθήλιο και στρώμα (Α και Β) και τρίτο γομφίο (Γ και Δ). (Α) Στα φυσιολογικά άτομα (Α, Γ) αναδεικνύεται η παρουσία και η κατανομή (μαύρες αποθέσεις) της BMP-4, όπως αποκαλύπτεται από την ειδική σύνδεση αντι-BMP4 αντισώματος και χρώση DAB, τόσο στο όριο μεταξύ οδοντικού επιθηλίου και μεσεγχύματος (Α), όσο και στα έσω και έξω αδαμαντινικά επιθήλια (Γ). Σε νεογέννητα, των οποίων η μητέρα εδέχθη κατά την 9η ημέρα κατάλληλη ποσότητα αντι-BMP4 αντισώματος δεν παρατηρούνται σκουρόχρωμες αποθέσεις ούτε στο οδοντικό έλασμα (Β) ούτε στον  $M_3$  (Δ), γεγονός που ίσως σημαίνει απουσία ή/και μη ανιχνεύσιμη ποσότητα BMP4. Ωστόσο, όπως προκύπτει από την εξέταση αντιστοίχων του (Δ) ποντικών, τα δόντια αναπτύσσονται φυσιολογικά.

**Figure 4.** Para-sagittal mandibular sections [X400] of newborn mice including epithelium and stroma (A and B) and third molar (Γ and Δ). (A) In normal subjects (A, Γ), the presence and distribution (black deposit) of BMP4 are prominent. The latter is revealed by the special linking between anti-BMP4 antibody and DAB staining, on the border between dental epithelium and mesenchyme (A), as well as at the inner and outer enamel epithelia (Γ). In newborns whose mother was injected with an appropriate quantity of anti-BMP4 antibody during the 9th gestational day, no dark deposits are observed either on the dental lamina (B) or on  $M_3$  (Δ), a fact possibly suggesting absence of or/and non-traceable BMP4 quantity. However, examination of the corresponding to (Δ) mice shows that teeth are developing normally.

κυτταρικής πρόσφυσης (Thesleff και Sharpe, 1997; Colbourne, 1999) (Εικ. 3).

### Μακροσκοπικά ευρήματα

Η παρουσία καταλλήλων ποσοτήτων της BMP4 σε συγκεκριμένες θέσεις ενός εμβρύου και στον κατάλληλο χρόνο θεωρείται εντελώς απαραίτητη για τη φυσιολογική πορεία

### CONCLUSIONS

Since the number of subjects in each group was more than adequate (more than 20 subjects/experiment) and results were identical, one may conclude rather reliably, at this level of investigation, that (a) anti-BMP4 antibody administration in pregnant mice is safe for the fetuses and, (b) the presence of this antibody during the specific period of fetal development affects the developmental course of odontoblasts.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Special Research Account of the National and Kapodistrian University of Athens (70/4/5709, S.L.K.) and by the State Scholarships Foundation (D.S.K.) of Greece.

### References

- Bennet JH, Hunt P, Thorogood P. Bone morphogenetic protein-2 and -4 expression during murine orofacial development. *Arch Oral Biol* 1995;40:847-54.
- ten Berge D, Brouwer A, Korving J, Reijnen MJ, van Raaij EJ, Verbeek F, Gaffield W, Meijlink F. Prx1 and Prx2 are upstream regulators of sonic hedgehog and control cell proliferation during mandibular arch morphogenesis. *Development* 2001;128:2929-38.
- Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol* 1997;42:219-23.
- ten Cate JM. In situ models, physico-chemical aspects. *Adv Dent Res* 1994;8:125-33.
- Colbourne MT. The genetic control of early odontogenesis. *Br J Orthod* 1999;26:21-8.
- Dassule HR, McMahon AP. Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol* 1998;202:215-27.
- Gavaia PJ, Sarasquete C, Cancela ML. Detection of mineralized structures in early stages of development of marine Teleostei using a modified alcian blue-alizarin red double staining technique for bone and cartilage. *Biotech Histochem* 2000;75:79-84.
- Georgiakaki I, Papadopoulos MA, Ioannidou-Marathiotou I. Evaluation of orthodontic treatment outcome of Angle Class II, division 1 malocclusion by means of the ICON index. *Hellenic Orthodontic Review* 2003;6:113-28.
- Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:13-27.
- Grigoriou M, Tucker AS, Sharpe PT, Pachnis V. Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development* 1998;125:2063-74.
- Grotenwold L, Ruther U. Bmp, Fgf and Wnt signalling in pro-

του αναπτυξιακού προγράμματος (Ohazama και συν., 2005). Ωστόσο, η δράση της BMP4 ρυθμίζεται και από πολλούς ενδογενείς ανταγωνιστές (Stottmann και συν., 2001). Στην παρούσα εργασία χορηγήθηκε εξωγενής αναστολέας/ανταγωνιστής της BMP4, τα δε μακροσκοπικά ευρήματα, στο επίπεδο της μελέτης, δεν αποκάλυψαν μεταβολές του φυσιολογικού φαινοτύπου. Αυτό ίσως σημαίνει ότι η συγκεκριμένη ποσότητα και τρόπος *in vivo* χορήγησης του αντισώματος δεν υποκρύπτει κινδύνους για τα νεογνά και δύναται να θεωρηθεί ασφαλής. Η πιθανότερη ερμηνεία της παρατήρησης είναι ότι ίσως ότι ο φυσιολογικός φαινότυπος να οφείλεται σε σχετική επάρκεια της μη δεσμευμένης BMP4 (Liu και συν., 2005), στην υποκατάστασή της BMP4 («εκφυλισμός») από άλλες BMPs, (π.χ. BMP2, Dassule και McMahon, 1998), στην πολυπλοκότητα του ρυθμιστικού δικτύου (Wang και συν., 2004), κ.α. Ακόμη, η μη μεταβολή του αναγλύφου των γομφίων ίσως υποδηλώνει ότι δεν επηρεάζεται σημαντικά το πρότυπο πολυπλοκότητας και απόπτωσης των κυττάρων των αδαμαντινικών κόμβων (Jernvall et al., 1998).

### Διαφανοποίηση εμβρύων

Η καθυστέρηση στην οστεογένεση που διαπιστώθηκε στην παρούσα εργασία ευρίσκεται σε πλήρη αρμονία με αποτελέσματα άλλων μελετών (Bennet et al., 1995) περί άμεσης εμπλοκής της BMP4 και των ανταγωνιστών της στις αναπτυξιακές διεργασίες της νευριδίωσης, της χονδρογένεσης και του σχηματισμού κεφαλής (Meech και συν., 2005). Αφού στο έγκυο ζώο εισάγεται ποσότητα ανταγωνιστού της BMP4, τότε, ο περιορισμός της BMP4 επιτρέπει την έκφραση παραγόντων αυξητικών και επιβίωσης (π.χ. FGF8), οπότε καθυστερεί ο θάνατος των χονδροκυττάρων και η αντικατάσταση αυτών από οστεοβλάστες (Suzuki και συν., 2005).

### Ιστολογική χρώση

Είναι γνωστό ότι η διαφοροποίηση των προ-οδοντινοβλάστων επάγεται από τη στρώση των αδαμαντινοβλάστων (Thesleff και Vaahtokari, 1992) η οποία, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3B, είναι καλώς σχηματισμένη. Ακόμη, απαραίτητη είναι η πάχυνση της βασικής μεμβράνης που διαχωρίζει τους προ-αδαμαντινοβλάστες από τους προ-οδοντινοβλάστες. Συνεπώς, προς πλήρη κατανόηση του ρόλου της BMP4 στη διαφοροποίηση των οδοντινοβλά-

grammed cell death and chondrogenesis during vertebrate limb development: the role of Dickkopf-1. *Int J Dev Biol* 2002;46:943-47.

Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res* 2004;83:590-95.

Jernvall J, Berg T, Kattunen P, Keränen S, Thesleff I. The life history of an embryonic signaling center: BMR-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 1998;125:161-69.

Koussoulakou D, Margaritis LH, Koussoulakos S. Human teeth: From fracture to regeneration. *Greek J OrMaxFac Surg* 2001;16:105-14.

Koussoulakos S. Vertebrate limb development: From Harrison's limb disk transplantations to targeted disruption of Hox genes. *Anat Embryol* 2004;209:93-105.

Lee SK, Kim YS, Oh HS, Yang KH, Kim EC, Chu JG. Prenatal development of the human mandible. *Anat Rec* 2001;263:314-25.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:679-728.

Liu W, Selever J, Murali D, Sun X, Brugger SM, Ma L, Schwarz RJ, Maxson R, Furuta Y, Martin JF. Threshold-specific requirements for BMP4 in mandibular development. *Dev Biol* 2005;283:282-93

Lyngstadaas SP, Mitchen CB, Risnes S. Crown morphology, enamel distribution and enamel structure in mouse molars. *Anat Rec* 1998;250:268-80.

Mao JJ, Nah HD. Growth and development: hereditary and mechanical modulations. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;125:676-89.

Meech R, Edelman DB, Jones FS, Makarenkova HP. The homeobox transcription factor Barx2 regulates chondrogenesis during limb development. *Development* 2005;132:2135-46.

Mossey PA. The heritability of malocclusion: part 2. The influence of genetics in malocclusion. *Br J Orthod* 1999;26:195-203.

Nagano T, Oida S, Ando A, Gomi K, Arai T, Fukae M. Relative levels of mRNA encoding enamel proteins in enamel organ epithelia and odontoblasts. *J Dent Res* 2003;82:982-6.

Ohazama A, Tucker A, Sharpe PT. Organized tooth-specific cellular differentiation stimulated by BMP4. *J Dent Res* 2005;84:603-6.

Papagerakis P, MacDougall M, Hotton D, Bailleut-Forestier I, Oboeuf M, Berdal A. Expression of amelogenin in odontoblasts. *Bone* 2003;32:228-40.

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

Romeis B. *Mikroskopische Technik*. München: Leibniz Verlag, 1948.

Stottmann RW, Anderson RM, Klingsmith J. The BMP antagonists Chordin and Noggin have essential but redundant roles in mouse mandibular outgrowth. *Dev Biol*. 2001;240:457-73.

Suzuki S, Nagano T, Yamakoshi Y, Gomi K, Arai T, Fukae M, Katagiri T, Oida S. Enamel Matrix Derivative Gel Stimulates Signal Transduction of BMP and TGF- $\beta$ . *J Dent Res* 2005;84:510-4.

Tabata MJ, Fujii JG, Ohmori T, Abe M, Wakisaka S, Iwamoto M, Kurisu K. Bone morphogenetic protein 4 is involved in cusp formation in molar tooth germ of mice. *Eur J Oral Sci* 2002;110:114-20.

Theiler K. *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development*. New York: Springer, 1989.

στών και στην εφαρμογή αυτής της γνώσης σε κλινικό επίπεδο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες επί της χωρο-χρονικής έκφρασης του BMP4. Και σε αυτή την περίπτωση, η απουσία αποκλίσεων εκ του φυσιολογικού προτύπου ενισχύει τις ενδείξεις περί ασφαλούς χρήσης του αντι-BMP4.

### Ανοσοϊστοχημεία

Η φαινομένη απουσία του εγχρώμου ιζήματος στα πειραματικά ζώα (Εικ. 4B και 4Δ) από τις θέσεις παρουσίας του στους μάρτυρες (Εικ. 4A και 4Γ) θα μπορούσε σε μια πρώτη εκτίμηση να εκληφθεί ως απουσία της πρωτεΐνης BMP4. Ωστόσο, επειδή η ανοσοϊστοχημική χρώση εν γένει δεν είναι εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος, τα δε άτομα αναπτύσσουν φυσιολογικό φαινότυπο, οφείλουμε να συμπεράνουμε ότι παραμένει ποσότητα BMP4 ικανή προς μορφογενετική δράση, ανεπαρκής δε προς ανοσοϊστοχημική ανίχνευση.

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Επειδή ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν ανά ομάδα ήταν ήλιαν επαρκής (περισσότερα από 20 άτομα/πείραμα), τα δε αποτελέσματα ήταν ταυτόσημα, μπορούμε, σε αυτό το επίπεδο διερεύνησης, να συμπεράνουμε με αρκετό βαθμό αξιοπιστίας ότι, (α) η χορήγηση αντι-BMP4 αντισώματος σε έγκυα ποντίκια είναι ασφαλής για τα έμβρυα και, (β) η παρουσία αυτού του αντισώματος κατά τη συγκεκριμένη περίοδο εμβρυϊκής ανάπτυξης επηρεάζει την αναπτυξιακή πορεία των οδοντοβλαστών.

### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαρασμό Κονδυλίων Έρευνας του ΕΚΠΑ (70/4/5709, Σ.Λ.Κ.) και από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Δ.Σ.Κ.).

### Διεύθυνση για ανάπτυξη:

Δέσποινα Σ. Κουσουλάκου  
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής  
Τμήμα Βιολογίας  
Ε & Κ. Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Πανεπιστημιόπολη  
157 84 Αθήνα

E-mail: skoussou@biol.uoa.gr

Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 1997;67:111-23.

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

Trimmer JR, Wang C, Niswander L. BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. *Development* 2002;129:2459-72.

Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* 1998;82:1136-8.

Tziafas D, Belibasakis G., Veis A., Papadimitriou S. Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principles. *Adv Dent Res* 2001;15:96-100.

Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Dev Cell* 2004;7:719-30.

### Reprint requests to:

Despina S. Koussoulakou  
Department of Cell Biology and Biophysics  
Faculty of Biology  
N. & K. University of Athens  
University Campus  
15784 Athens  
Greece

E-mail: skoussou@biol.uoa.gr