

ZENAIDE SILVEIRA DE CASTRO

AMELOBLASTOS SECRETORES: SECREÇÃO, ABSORÇÃO E REUTILIZAÇÃO DE AMELOGENINA MARCADA COM ^3H -PROLINA, VISUALIZADAS ATRAVÉS DE RADIOAUTOGRAFIA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Guilherme Blumen

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Bucodental (Área de Histologia e Embriologia), Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas-(UNICAMP), para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

PIRACICABA - SP

1987

UNICAMP
BIBLIOTECA

Aos meus pais, OSWALDO e ILKA, que na fortaleza moral do verdadeiro lar são exemplos vivos de nobreza, dedicação e amor à família;

Aos meus irmãos

ISLEI TEREZINHA

OSWALDO

VITÓRIA

VALÉRIA CRISTINA, pela torcida;

Ao meu esposo, JOSÉ HONÓRIO, pelo carinho e compreensão nos momentos mais difíceis, "O conhecimento real não é construção de alguns dias. É obra do tempo";

Ao meu querido filho MARCELO,

ofereço carinhosamente este trabalho.

Ao Doutor *GUILHERME BLUMEN*, Professor Titular de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pela alta capacidade profissional demonstrada durante o curso, pela orientação caracterizada de verdadeiro cunho científico e pela presença e dedicação constantes, sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS FERRAZ CORRÊA, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, no período de 1981 a 1982, pela atenção;
- ao Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, no período de 1983 a 1985, pelo apoio;
- ao Prof. Dr. GUILHERME BLUMEN, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, a partir de 1985, pela atenção;
- ã FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) pelo auxílio concedido ao Prof. Dr. Guilherme Blumen, processo odontologia 82/0726-1 e processo Médicas 77/1479;
- ao PROGRAMA INSTITUCIONAL DE CAPACITAÇÃO DOCENTE (PICD), pela bolsa concedida durante parte da realização deste trabalho;
- ã Profª MARIA APARECIDA ALVIM DE SOUZA, Gerente da Divisão de Pós-Graduação (PROPEP) da Universidade Federal de Uberlândia, e ao Prof. REGINALDO ALVES MAMEDE, Vice-Diretor do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, pela gentileza com que sempre nos orientou durante o curso;
- aos Professores do Depto. de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, o nosso profundo agradecimento pelo apoio recebido durante todo o período do curso, em especial a Profª Drª TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELLO, pela amizade e dedicação nos momentos mais difíceis, e ao Prof. Dr. JOSÉ MERZEL, pela atenção e sugestões apresentadas no decorrer do presente trabalho;

à UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, pela liberação de minhas funções docentes para a realização do curso;

aos colegas Professores do Setor de Histologia e Embriologia, do Depto. de Ciências Fundamentais para a Saúde, do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, nosso profundo agradecimento pelo apoio recebido quando assumiram minhas funções docentes, sem o que este curso não teria condições de ser concluído;

ao Prof. Dr. VIRGÍLIO FRANCO DO NASCIMENTO FILHO (CENA - Centro de Energia Nuclear na Agricultura - ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP - Universidade de São Paulo) pelas contagens cintilográficas;

a Profª Drª SÔNIA VIEIRA, do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela gentileza com que sempre nos distinguiu na orientação da parte estatística;

ao Prof. Dr. JOSÉ CORTES FILHO (homenagem póstura), ex-Diretor do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, pelo esforço empenhado na liberação de minhas funções docentes;

ao Prof. ROBERTO CARDOSO LEMOS, Chefe do Depto. de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, na ocasião de meu ingresso no Curso de Pós-Graduação, pelo incentivo;

aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, em especial à MARIA LUIZA OZORES POLACOW e MARIA DO CARMO PANHOZA TSE, pela amizade e carinho demonstrados;

aos funcionários do Depto. de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, IVO DE PAULA TOLEDO, MESSIAS SALVADOR DE LIMA, IVANI ODAS DEMÉTRIO, ELIENE APARECIDA O. NARVAES, MARIA APARECIDA S. VARELLA e MARIA APARECIDA NALIN, pela colaboração e apoio;

aos colegas funcionários do Setor de Histologia e Embriologia do Departamento de Ciências Fundamentais para a Saúde, da Universidade Federal de Uberlândia, pelo incentivo e, em particular ao Técnico em Microscopia Eletrônica, *HÉLGIO HEINISCH WERNECK*, pela colaboração na preparação dos blocos para cortes semifinos;

às Senhoras *SUELI DUARTE DE OLIVEIRA SOLIANI* e *IVANY DO CARMO GUIDOLIN GEROLA*, bibliotecárias da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela revisão bibliográfica;

à Sra. *MARIA APARECIDA NALIN*, Secretária do Depto. de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelos serviços datilográficos;

à Sra. *MARIA APARECIDA BLUMEN*, esposa do Prof. Dr. Guilherme Blumen, pela amizade demonstrada;

à Sra. *GISELDA FIORAVANTI RAMBALDO*, pela amizade com que sempre nos distinguiu;

aos amigos que me incentivaram e a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

ÍNDICE

	PÁG.
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	5
RESULTADOS	9
DISCUSSÃO	26
RESUMO E CONCLUSÕES	36
SUMMARY	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

INTRODUÇÃO

A formação do esmalte requer alto grau de interação celular que ocorre no órgão do esmalte. Este processo é geralmente dividido em duas etapas: a formação propriamente dita ou secreção da matriz do esmalte e sua subsequente maturação. A maioria dos trabalhos sobre amelogênese, tem sido realizada em dentes de crescimento contínuo de roedores, porque nestes as duas fases estão relacionadas a estruturas topograficamente distintas que perduram por toda a vida do animal.

A secreção do esmalte envolve a biossíntese de matriz orgânica composta de glicoproteínas, glicosaminoglicanas, grande parte de água e 25 a 30% de sais minerais (STACK, 1954; SEYER & GLIMCHER, 1969; WEINSTOCK, 1972; EMBERY, 1974; SLAVKIN et al., 1976; BLUMEN & MERZEL, 1976). Os ameloblastos secretores são as células responsáveis por esta etapa da amelogênese.

A maturação do esmalte consiste na redução do conteúdo protéico, que de 20% no esmalte jovem passa a 0,3% no esmalte totalmente maduro e calcificado, na remoção de água e no aumento de sais de Ca (DEAKINS, 1942; MARSLAND, 1952; STACK, 1954). No decurso da amelogênese os ameloblastos apresentam uma modulação morfo-funcional e passam de células tipicamente com funções de biossíntese e secreção, para células típicas de absorção e transporte (KALLENBACK, 1968, 1980; REITH, 1970; JOSEPHSEN e FEJERSKOV, 1977; SMITH, 1979; SASAKI et al., 1984). A estas células são atribuídas a remoção da matéria orgânica e água (WASSERMANN, 1944; MARSLAND, 1952; REITH, 1961; REITH & COTTY, 1967; SMITH, 1979).

Estudando radioautograficamente a incorporação de ^3H -Prolina ou ^{35}S -Sulfato de sódio em molares de cobaia, BLUMEN e MERZEL (1972, 1973, 1976) verificaram um decréscimo daqueles precursores no esmalte jovem no seu trânsito pela região de secreção do órgão do esmalte e, portanto, quando ainda relacionados aos ameloblastos secretores. A primeira vista estes resultados sugeriram que uma das etapas do processo de maturação, qual seja, a remoção de material orgânico, poderia estar relacionada também aos ameloblastos secretores. Entretanto, os mencionados autores não puderam observar nenhuma reincorporação de ma

terial orgânico marcado nos ameloblastos durante sua etapa secretora, o que poderia comprovar sua participação no citado processo, como também não foi detectada nenhuma diminuição de material radioativo na zona de transição, ou reincorporação pelos ameloblastos presentes nesta zona, ou na de maturação.

Estudos bioquímicos mostraram que a(s) proteína(s) do esmalte jovem sofre(m) uma degradação e é(são) desdobrada(s) em polipeptídeos de baixo peso molecular (SEYER & GLIMCHER, 1971, 1977; SEYER & VINCENT, 1972; FUKAE et al., 1972; FUKAE & SHIMIZU, 1974; GÜENTER et al., 1975; GLIMCHER et al., 1977; ROBINSON & KIRKHAN, 1984).

Raciocinando que a não detecção da citada reincorporação por parte dos ameloblastos poderia ser devida à remoção daqueles polipeptídeos pelos procedimentos histológicos, particularmente pelo uso de fixadores e descalcificadores (BATTISTONE & BURNETT, 1956; PIEZ, 1962; DROZ & WARSHAWSKY, 1963), BLUMEN (1979) e BLUMEN & MERZEL (1982) utilizaram incisivos de camundongos recém-nascidos injetados com ^3H -Prolina, cujos dentes até a idade de 5 ou 7 dias, podem ser cortados num criótomo sem prévia fixação química e descalcificação. Confirmou-se a perda de proteína(s) marcada(s) com prolina na matriz enquanto esta estava ainda relacionada com ameloblastos secretores (48 h após a injeção) e detectou-se um segundo pico de reação radioativa nos ameloblastos secretores 72 h após a injeção, e na matriz 96 h após, sugerindo provavelmente a reabsorção e reutilização do material protéico marcado. Contudo ficaram vários aspectos a serem esclarecidos e que poderão comprovar os resultados relatados e que constituem o objetivo deste trabalho:

1) Embora FUKAE & SHIMIZU (1974), SEYER & GLIMCHER (1977), SASAKY & SHIMOKAWA (1979), SASAKI et al. (1987) tivessem mostrado que alguma perda de material protéico possa ocorrer no esmalte jovem, GLIMCHER et al. (1977) e ROBINSON et al. (1977, 1979) mostraram claramente que a perda maior ocorre na altura do limite opaco (que delimita macroscopicamente o esmalte jovem do maduro). Este limite deve corresponder aproximadamente à zona de transição entre o esmalte jovem e o completamente maduro (sendo que este último é removido por ação de descalcificadores), segundo LEBLOND & WARSHAWSKY (1979) que também relataram que a perda significativa de material protéico ocorre a partir desta zona de transição. BLUMEN & MERZEL (1982),

aventaram a hipótese que a remoção detectada poderia não ser a que ocorre na maturação propriamente dita mas sim, um processo de "turnover" de material protéico no esmalte jovem e que estaria eventualmente relacionada com a calcificação deste tecido (GLICK, 1979);

2) Para poder obter cortes por congelação sem fixação e descalcificação, BLUMEN & MERZEL (1982) usaram incisivos de animais recém nascidos. Os autores verificaram em cortes de parafina, que estes dentes até as 48 h de vida apresentaram o órgão do esmalte contendo apenas a zona de secreção do esmalte interno. De 48 a 96 h são acrescentadas zonas de esmalte externo e de transição pós-secretora (onde provavelmente estaria o limite opaco). A partir daí já teríamos o esmalte completamente maduro e removível pela descalcificação. Assim, se ocorre transferência de material radioativo na zona de secreção é possível que o que sobrou ao atingir a zona de transição seja muito pouco para ser detectado. Isto talvez explique a discrepância entre os resultados radioautográficos de BLUMEN & MERZEL (1982) e os trabalhos bioquímicos;

3) O trabalho de BLUMEN & MERZEL (1982) nos experimentos com ^3H -Timidina e ^3H -Prolina foi limitado ao uso de um animal por tempo, o que tornou os resultados menos seguros;

4) Não se pode excluir a possibilidade do segundo pico radioativo verificado por BLUMEN & MERZEL (1982) nos ameloblastos e matriz ter sido devido a um fenômeno metabólico geral. Para tanto deveriam ter realizado uma análise de depuração sanguínea do composto radioativo no período experimental.

Assim, neste estudo pretende-se:

a) Repetir a experiência realizada por BLUMEN & MERZEL (1982) com Prolina e Timidina tritiadas, em um maior número de animais;

b) Utilizarmos experimentos com os radiotraçadores dentes incisivos inferiores nos diferentes intervalos de tempo, provenientes da mesma mandíbula;

c) Usar cortes transversais obtidos de uma hemimandíbula com ambos os traçadores radioativos obtidos com o criótomo;

d) Usar cortes longitudinais de 1 μ m de espessura, incluídos em resina epoxi, fixados mas não descalcificados da outra hemimandíbula para estudo comparativo com ambos os compostos radioativos;

e) Analisar a depuração sanguínea de ^3H -Prolina durante o período experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta e oito camundongos (Mus musculus, albinus) com até 12 horas após o nascimento foram utilizados para a determinação da taxa de migração diária dos ameloblastos, e para o estudo da biossíntese, secreção, remoção e reutilização de material protéico da matriz do esmalte jovem.

1) DETERMINAÇÃO DA TAXA DE MIGRAÇÃO DIÁRIA DOS AMELOBLASTOS

Vinte e um animais pesando em média 1,5 g foram injetados por via intraperitoneal, com uma dose única de 1 μ Ci/g de peso de ^3H -Timidina, (A.E. 5 Ci/mmol - Amersham, USA), e sacrificados em grupos de 2 a 4 animais, nos intervalos de 1, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h após a injeção.

Os animais foram sacrificados por decapitação, as mandíbulas removidas, separadas em hemimandíbulas e seus tecidos moles cuidadosamente retirados sob lupa estereoscópica, em pequeno aumento.

As hemimandíbulas direitas, sem prévia fixação e descalcificação, foram incluídas pela porção incisal dentro de cápsulas de gelatina contendo Tissue Teck II (Lab. Teck Products, Naperville, Illinois, USA), e, rapidamente congeladas no próprio criôtomó a -27°C . Cortes seriados de 6 μm de espessura, no sentido transversal em relação ao longo eixo do dente, foram obtidos no criôtomó (Damon/IEC Division) a -27°C , e colhidos em lâminas histológicas previamente gelatinadas(*).

As hemimandíbulas esquerdas foram divididas, entre o 1 $^{\circ}$ e 2 $^{\circ}$ molares, em duas frações, fixadas em glutaraldeído a 2,5% em solução tampão fosfato pH 7,4 (**) durante 6 horas, a 4 $^{\circ}\text{C}$, lavadas no mesmo tampão, pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato pH 7,4 (WARSHAWSKY & MOORE, 1967);

* Gelatina 5,0 g
Alumen de cromo 0,5 g
Água destilada q.s.p. 1000 ml

**Tampão fosfato pH 7,4: Mistura de 6 partes da Solução A mais 4 partes da Solução B.

Sol.A - 34,85g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / q.s.p. 1000 ml H_2O destilada

Sol.B - 14,64g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ / q.s.p. 1000 ml H_2O destilada

após, os espécimens foram desidratados em concentrações crescentes de acetona, infiltrados, segundo a técnica de LUFT (1961), e incluídos em Poly Bed 812 modificado(*), no sentido longitudinal, pela face vestibular, e mantidos em estufa a 60°C por 72 h. Cortes longitudinais de 1 µm de espessura foram obtidos no ultramicrotomo Porter Blum MT2 - B e coletados em lâminas histológicas previamente gelatinadas.

Os preparados obtidos de ambas as hemimandíbulas foram cobertos com emulsão Ilford K5 (KOPRIWA & LEBLOND, 1962). Após exposição a 4°C em caixas à prova de luz, por 30 dias (cortes obtidos no criótomo) ou 60 dias (cortes obtidos no ultramicrotomo) os preparados foram revelados (D19B-Kodak), fixados (hipossulfito de sódio a 24%), corados respectivamente com: Hematoxilina durante 20 minutos e Azul de Toluidina a 1% a frio, por 25 minutos e montados.

Em ambas as hemimandíbulas foi medida a distância entre o núcleo do ameloblasto marcado com ³H-Timidina, localizado em posição mais incisal, e a alça apical do órgão odontogênico, em cada intervalo de tempo.

2) BIOSÍNTESE, SECREÇÃO, REMOÇÃO E REUTILIZAÇÃO DE MATERIAL PROTÉICO DA MATRIZ DO ESMALTE JOVEM

Vinte e sete animais pesando em média 1,4g foram injetados, por via intraperitoneal, com uma dose única de 5 µCi/g de peso de L-Prolina 2, 3, 4, 5 - ³H(n) (A.E. - 120 Ci/mmol - Amersham, USA), e sacrificados em grupos de 3 a 4 animais, 4, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h após a administração do composto radioativo.

As hemimandíbulas direitas foram preparadas como descrito no item anterior e incluídas pela face apical do incisivo.

Cortes transversais de 6 µm de espessura das hemimandíbulas direitas, a partir do início de secreção do esmalte jovem, foram obtidos no criótomo a -27°C ao longo de todo o den-

* Poly bed 812 modificado, quanto às proporções para este experimento:

- 5 ml Poly bed 812
- 1 ml DDSA
- 4 ml NMA
- 0,2 ml DMP30 (3 a 4 gotas)

te, sendo que a distância que separou cada corte do outro incisalmente, foi determinada pela taxa de migração dos ameloblastos.

As hemimandíbulas esquerdas foram divididas em três frações, no sentido transversal, fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato pH 7,4 durante 24 h, lavadas com o mesmo tampão e processadas como descrito para o experimento do item anterior.

Cortes transversais coletados em lâminas histológicas previamente gelatinadas e cortes longitudinais em lâminas não gelatinadas foram, então, radioautografados (KOPRIWA & LEBLOND, 1962).

Após exposição, respectivamente, de 20 e 37 dias, os preparados foram revelados (D19B-Kodak), fixados (hipossulfito de sódio a 24%), corados com H.E. e Azul de Toluidina a 1% a frio, e montados.

A análise quantitativa, representada pela contagem total de grãos de AgBr (brometo de prata), foi realizada em regiões pré determinadas, de acordo com a taxa diária de migração dos ameloblastos, utilizando-se uma ocular Zeiss KPL 8X e uma objetiva 100X com imersão a óleo: nos ameloblastos e matriz do esmalte, situados na parte central da região labial dos cortes transversais dos incisivos direitos (não fixados e não descalcificados, obtidos no criótomo), e ao longo do órgão do esmalte da região labial dos cortes longitudinais dos incisivos esquerdos (fixados, não descalcificados, incluídos em Polybed 812 e obtidos no ultramicrotomo).

Nos ameloblastos, o total de grãos de Ag reduzida menos o "Background" foi contado em uma área de 100 μ m de largura, por uma extensão situada entre uma linha imaginária que passa pelo limite dos ameloblastos com o estrato intermédio, e outra linha no limite apical dos ameloblastos com a matriz do esmalte.

Na matriz do esmalte adjacente, foi contada uma área equivalente, com extensão partindo da linha demarcada da posição apical dos ameloblastos com esta matriz, até o limite com a dentina.

Levando-se em consideração a taxa diária de crescimento do dente, cada área medida foi equivalente a uma região, num total de nove regiões, em direção incisal.

3) DEPURAÇÃO DO COMPOSTO RADIOATIVO NO PLASMA SANGUÍNEO

No momento da decapitação dos animais destinados ao estudo mencionado no ítem anterior, foi coletado sangue em tubos capilares heparinizados e preservados a 4°C.

O volume de plasma (20 µl) de cada animal foi diluído em 5 ml de uma mistura de líquido cintilador(*), e contados durante 10 minutos em um cintilador líquido BECKMAN-LS 230.

Das contagens de cada intervalo de tempo, descontado o "Background", foi obtida uma média de contagem por minuto (C.P.M.).

* Mistura de líquido cintilador:

- Tolueno - 670 ml
- PPO - 4,0 g
- Dimetil POPOP - 0,1 g
- TRITON X100 - 330 ml

RESULTADOS

I - DETERMINAÇÃO DA TAXA DE MIGRAÇÃO DIÁRIA DOS AMELOBLASTOS

Para determinar a taxa de migração diária dos ameloblastos desde o compartimento proliferativo e ao longo do órgão do esmalte em direção incisal, na região labial dos incisivos inferiores dos camundongos recém-nascidos e injetados com ^3H -Timidina, foram utilizados os seguintes procedimentos:

Nos cortes dos incisivos direitos obtidos no criôto-mo, a cada intervalo de tempo a partir da 1ª hora após a injeção de ^3H -Timidina, foi calculada a distância percorrida pelo ameloblasto de núcleo marcado, o mais distante, da alça apical até sua posição mais incisal no órgão do esmalte, através do produto do número do corte onde a célula estava presente, pela espessura dos mesmos (6 μm), e os resultados constam da Tabela I.

Nos cortes obtidos dos incisivos esquerdos incluídos em Poly bed 812, foi utilizada uma câmara clara Zeiss adaptada ao M.O. Zeiss, através da qual, cada corte contido na lâmina histológica era projetado e reproduzido em papel sulfite, com uma dimensão 1.000x maior. Em cada intervalo de tempo foi medido no papel, o espaço em cm., percorrido pelo ameloblasto com núcleo marcado, o mais distante, da alça apical até sua posição mais incisal no órgão do esmalte, e posteriormente transformados em μm . Os resultados constam da Tabela I.

Com os dados obtidos em ambos os procedimentos, que constam da Tabela I, foi ajustada uma reta de regressão linear simples, calculada pelo método dos mínimos quadrados de modelo $\underline{Y} = \underline{a} + \underline{b}x$, onde:

\underline{Y} representa o espaço total percorrido pelo ameloblasto com núcleo marcado, o mais distante da alça apical à porção mais incisal, no tempo x ;

\underline{x} representa o intervalo de tempo entre a administração do composto radioativo e o tempo de sacrifício do animal;

\underline{a} é o coeficiente linear da regressão linear simples e representa o espaço inicial percorrido pelo ameloblasto com núcleo marcado;

\underline{b} é o coeficiente angular da regressão linear simples e representa a velocidade de migração, que se supõe para efei-

tos práticos, ser constante.

A reta de regressão linear simples para os incisivos inferiores direitos foi: $\hat{Y} = 517,5 + 21,39x$, e a inclinação da reta que estima a velocidade média por hora foi igual à $21,39 \mu\text{m/h}$, equivalente a $513,36 \mu\text{m/dia}$ (Fig. I A).

Para os incisivos inferiores esquerdos a reta de regressão linear simples foi: $\hat{Y} = 818,62 + 25,43x$, onde a taxa média de migração por hora foi igual à $25,43 \mu\text{m/h}$, equivalente a $610,32 \mu\text{m/dia}$ (Fig. I B).

II - OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS

As observações morfológicas foram realizadas nos incisivos incluídos em Poly bed 812, seguindo a descrição e classificação das zonas de amelogênese no rato (WARSHAWSKY & SMITH, 1974).

Deste modo, o órgão do esmalte presente na região labial do incisivo, já ao nascer, mostrou as zonas de pré-secreção, secreção e pós-secreção.

Para melhor avaliação dos dados obtidos da incorporação de ^3H -Prolina, efetuamos uma medida de cada região, em μm , nos diferentes intervalos de tempo, a partir do ponto mais incisal da região de ameloblastos faceando a dentina, onde os mesmos apresentam em seus ápices, glóbulos escuros, ponto inicial de secreção de esmalte interno (E.I.).

Desde que utilizamos animais de pesos aproximados, realizamos estas medidas relativas em apenas um animal por tempo e os resultados que servirão para futuras interpretações da incorporação de ^3H -Prolina, constam das Figuras 3 B e 11 B.

III - BIOSÍNTESE, SECREÇÃO, REMOÇÃO E REUTILIZAÇÃO DE MATERIAL PROTÉICO DA MATRIZ DO ESMALTE JOVEM

INCISIVOS DIREITOS:

Nas Tabelas II e III constam as médias do número total de grãos de prata reduzida sobre ameloblastos e matriz do esmalte, nas regiões de I a IX, distantes $513,36 \mu\text{m}$ uma da outra, obtidos correlacionando-se a reação radioativa medida pe-

la contagem de grãos de Ag, com a migração dos ameloblastos e matriz adjacente dos incisivos inferiores direitos (criótomo), dos animais sacrificados nos diferentes intervalos de tempo após a injeção de ^3H -Prolina. Com os dados das Tabelas II e III construímos os gráficos das Figuras 2 e 3A.

Sobre os ameloblastos (Fig. 2), a concentração de grãos de prata atingiu um máximo às 4 h, nas regiões I, II e III, decaindo após 24 h; um segundo pico de reação foi observado às 48 h nas regiões III, IV e V respectivamente, decaindo nos tempos subsequentes.

A reação radioautográfica sobre a matriz do esmalte (Fig. 3A), apresentou-se mais intensa às 24 e 48 h nas regiões IV, decaindo respectivamente nos tempos subsequentes; um segundo pico de reação ocorreu respectivamente às 72 e 96 h após, nas regiões VI, para novamente decair nos tempos posteriores.

Estas mesmas variações das reações radioativas são mostradas nas Figuras 4 a 9.

INCISIVOS ESQUERDOS:

Nas Tabelas IV e V constam as médias do número total de grãos de prata reduzida sobre ameloblastos e matriz do esmalte, nas regiões de I a IX, distantes 610,32 μm uma da outra, dos incisivos inferiores esquerdos incluídos em Poly bed 812, dos animais sacrificados nos diferentes intervalos de tempo após a injeção de ^3H -Prolina.

Correlacionando a reação radioativa com a migração diária dos ameloblastos no órgão do esmalte, construímos os gráficos das Figuras 10 e 11-A.

Sobre os ameloblastos (Fig. X), houve um pico de reação radioativa às 4 ou 48 h, dependendo da região observada, decaindo nos tempos subsequentes.

Sobre a matriz do esmalte (Fig. 11-A), o número total de grãos de prata atingiu um máximo de reação, de acordo com a região observada, em 24 a 72 h, permanecendo por algum tempo num "plateau", para depois decair.

As figuras de 12 a 17 mostram a reação radioautográfica sobre os ameloblastos e matriz do esmalte, desde a região II (4 h) até a região VII (120 h) após a injeção do precursor radioativo.

IV - DEPURAÇÃO DO COMPOSTO RADIOATIVO NO PLASMA SANGUÍNEO:

No gráfico da Fig. 18 podemos verificar que a radioatividade medida, atinge um máximo no início do experimento, para nos tempos seguintes, decair.

TABELA I - Distância média em μm percorrida pelos ameloblastos com núcleo marcado, da alça apical do órgão odontogênico para a porção incisal, em dentes incisivos inferiores direito (criotomo) e esquerdo (Poly bed 812) respectivamente, sacrificados em vários intervalos de tempo após uma dose única de ^3H -Timidina.

TEMPO (horas)	(DIREITO-CRIOTOMO)		(ESQUERDO/POLY BED 812)	
	ESPAÇO PERCORRIDO (média em μm)		ESPAÇO PERCORRIDO (média em μm)	
1	598	(3)	816	(3)
24	938	(3)	1.220	(3)
48	1.444	(3)	2.185	(2)
72	2.266	(3)	2.740	(3)
96	2.568	(4)	3.446	(3)
120	2.976	(2)	3.855	(2)
144	3.634	(3)	4.310	(3)

() número de animais marcados

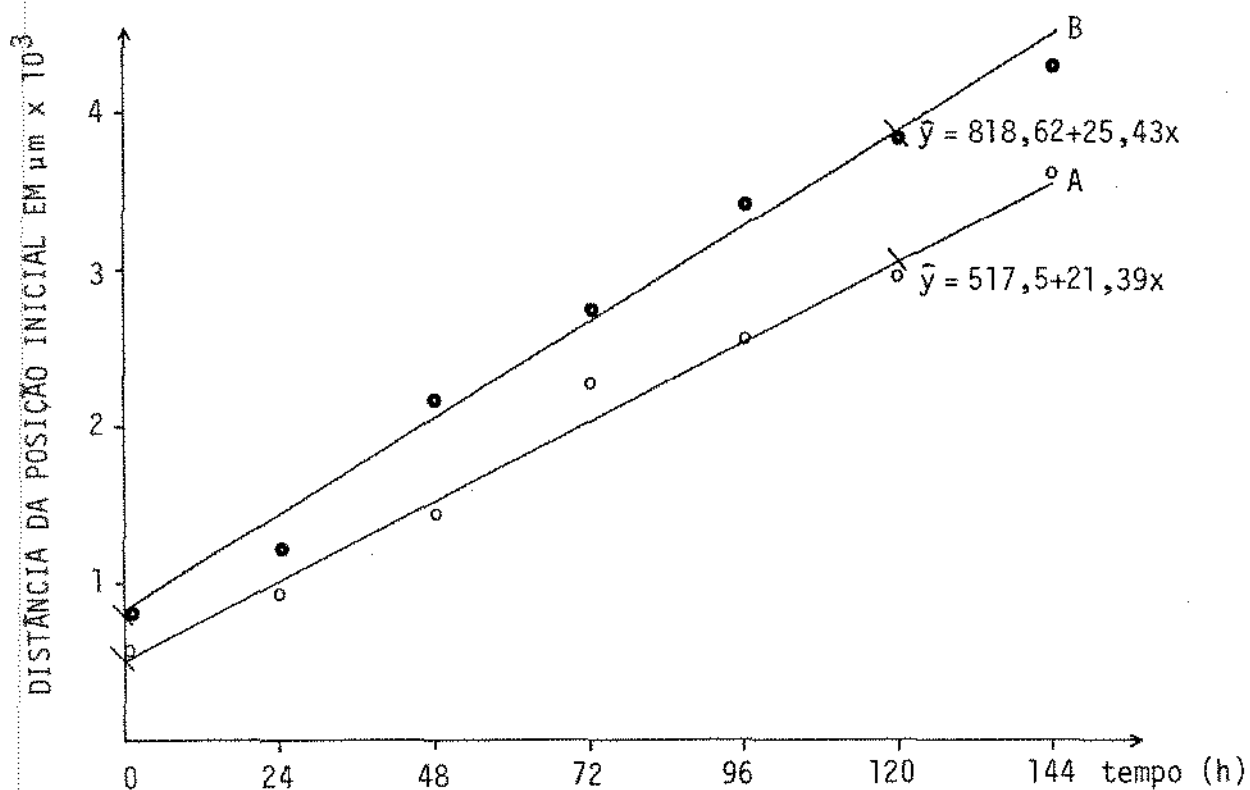


FIGURA 1

Traçando-se a distância do ameloblasto marcado (com ^3H -Timidina) mais avançado vs tempo (Tabela I) as retas de regressão linear do material cortado em criótomo (A) e material incluído em Poly bed (B), foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados. As respectivas inclinações fornecem a taxa de migração em $\mu\text{m}/\text{h}$.

TABELA II - Média do número de grãos de prata reduzida sobre ameloblastos nas varias regioes do orgao do esmalte dos incisivos inferiores direitos de camundongos, cortados no criôtomato, sacrificados em diversos intervalos de tempo, após uma injeção única de ^3H -prolina.

TEMPO	REGIÕES								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
10min	139,6± 49,8	192,6± 46,3	323,3± 59,2	280,0± 29,6					
4h	643,0±104,7	703,3±130,9	817,6± 91,8	628,0±164,0					
24h	323,6± 74,9	520,3± 86,8	675,0± 68,0	488,0± 70,9					
48h	502,0±102,2	586,0±149,9	724,7±175,2	816,7±126,9	731,5±54,4	250,3±10,3			
72h	265,6± 47,8	478,0±145,7	584,3± 71,8	556,6± 77,7	420,6±72,9	333,0± 0,0	473,0*		
96h	128,0± 40,5	202,3± 21,1	355,6± 20,5	525,6± 4,1	459,6±63,1	396,3±37,6	254,2±70,9		
120h	192,3± 42,5	173,0± 28,2	173,6± 25,9	230,3± 35,0	265,6±28,6	385,0±56,3	174,3±47,1	209,5±74,5	165,3±15,1
144h	91,0± 26,7	94,0± 15,2	122,0± 19,6	158,6± 31,8	155,6±25,7	226,6±15,1	106,3±27,4	153,3±23,4	81,5± 4,5

* Contagem realizada em apenas um animal

± Erro padrão

FIGURA 2 - Grãos de prata sobre ameloblastos de incisivos inferiores direitos de camundongo em vários intervalos de tempo após injeção de uma única dose de ^3H -Prolina. As curvas representam os diferentes dados da Tabela 2, levando-se em consideração a migração dos ameloblastos devido ao crescimento do dente. A região de início de cada curva está indicada e os próximos pontos correspondem às regiões subsequentes, de acordo com a taxa de migração. Ameloblastos mostram uma forte reação 4 h após a administração do composto radioativo, intensidade esta que decai às 24 h e aumenta novamente às 48 h para decrescer nos intervalos de tempos posteriores.

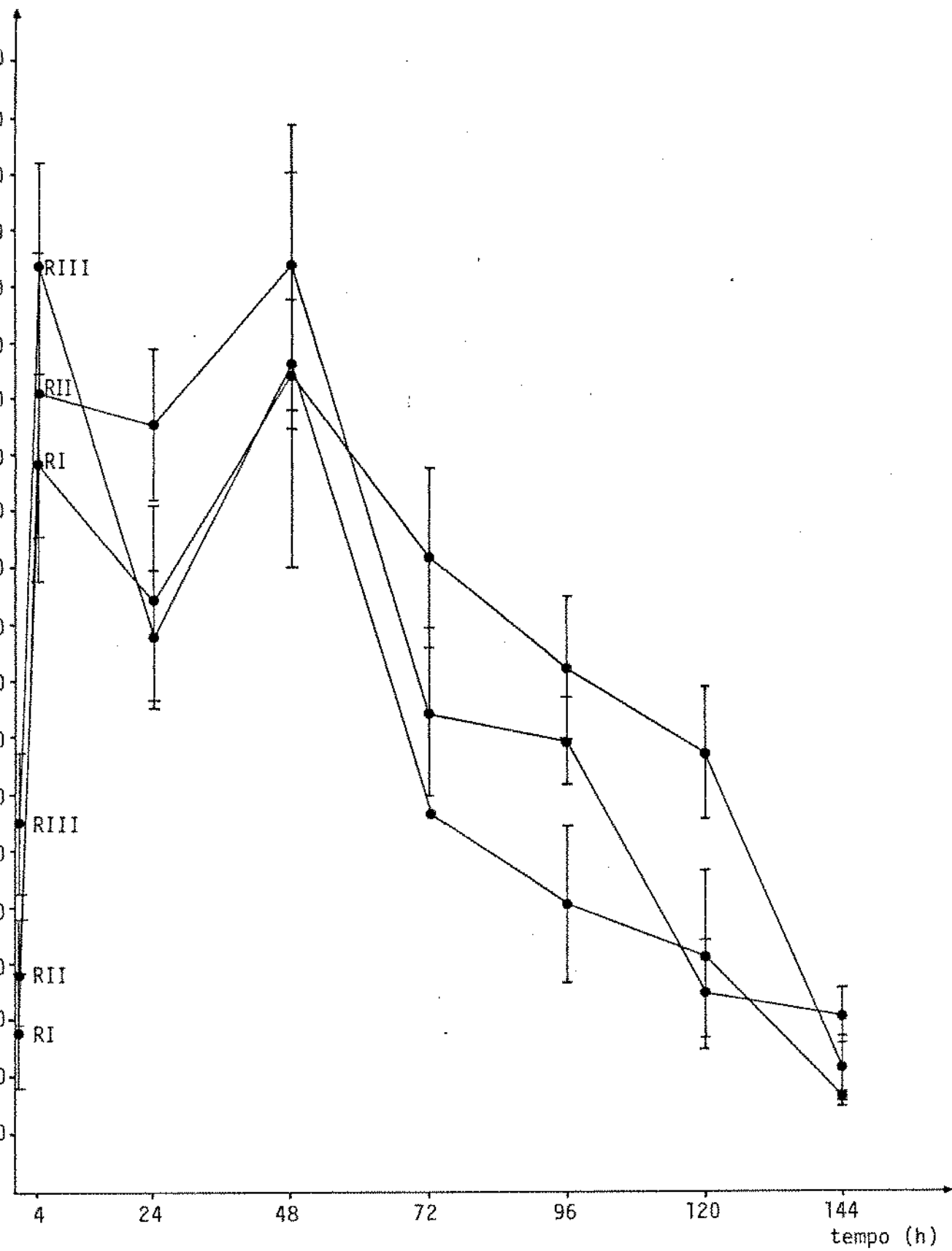


FIGURA 2

TABELA III- Média do número de grãos de prata reduzida sobre matriz do esmalte nas várias regiões do órgão do esmalte dos incisivos inferiores direitos de camundongos, cortados no criôto, sacrificados em diversos intervalos de tempo, após uma injeção única de ^3H -prolina.

TEMPO	REGIÕES								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
10min	**	**	**						
4h	-	169,5± 7,5	625,5±374,6	147,0*					
24h	-	178,6±51,2	521,0±153,4	1218,0±431,2					
48h	-	144,7±62,1	209,0± 69,0	565,5±158,6	429,7±39,6	197,3±63,0			
72h	-	110,3±63,4	164,6± 93,2	218,3± 56,8	305,6±60,8	800,5±34,5	584,0*		
96h	-	29,6± 8,7	49,3± 13,6	140,6± 19,8	348,6±62,0	654,0±80,0	493,3±175,0		
120h	-	19,6± 4,4	27,3± 2,0	90,3± 23,5	123,0±20,3	297,6±46,7	453,6± 40,2	397,0±18,0	82,3±28,3
144h	-	15,6± 3,8	18,3± 2,3	40,3± 5,7	63,6±15,2	191,6±42,3	185,6± 45,8	248,6±55,8	107,0±40,0

* Contagem realizada em apenas um animal.

** Não existe radioatividade na matriz ao 10 min.

- Contagem impraticável no criôto.

± Erro padrão.

FIGURA 3A - Grãos de prata sobre a matriz do esmalte de incisivos inferiores direitos de camundongo, em vários intervalos de tempo após a injeção de uma única dose de ^3H -Prolina. As curvas representam os dados da Tabela 3, levando-se em consideração a migração da matriz do esmalte devido ao crescimento do dente. A região inicial de cada curva está indicada e os próximos pontos correspondem às regiões subsequentes de acordo com a taxa de migração. Correspondentemente aos ameloblastos, a radioatividade mostra picos sobre o esmalte as 24, 48, 72 e 96 h sugerindo que o material marcado é removido dele para ser recolocado novamente, enquanto as estruturas estão relacionadas à zona secretora da amelogênese.

FIGURA 3B - Representa em μm a extensão dos dentes incisivos direitos, subdivididas em regiões, nos diferentes intervalos de tempo.

A associação realizada com as curvas construídas na Figura 3A, resultante de médias de contagem de grãos de prata na matriz da região labial de animais injetados com ^3H -Prolina, e cortados em criotomo em diferentes intervalos de tempo, mostram na Fig. 3B, o início de cada contagem nas regiões II às 4 h ●, II às 24 h ■ e III às 4 h ○, e o Δ indica os picos de reações presentes sempre nas zonas secretoras.

LEGENDA: EI-Região de secreção do esmalte interno
EE-Região de secreção do esmalte externo
T -Região pós-secretora de transição
M -Região pós-secretora (esmalte maduro)
R -Região de ameloblastos reduzidos

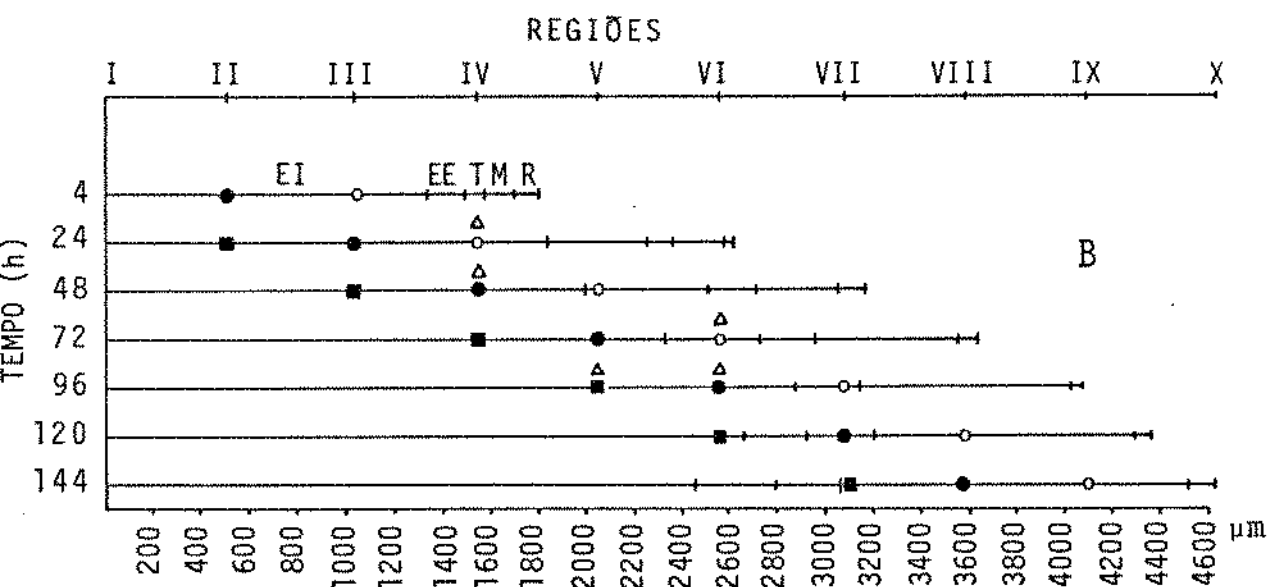
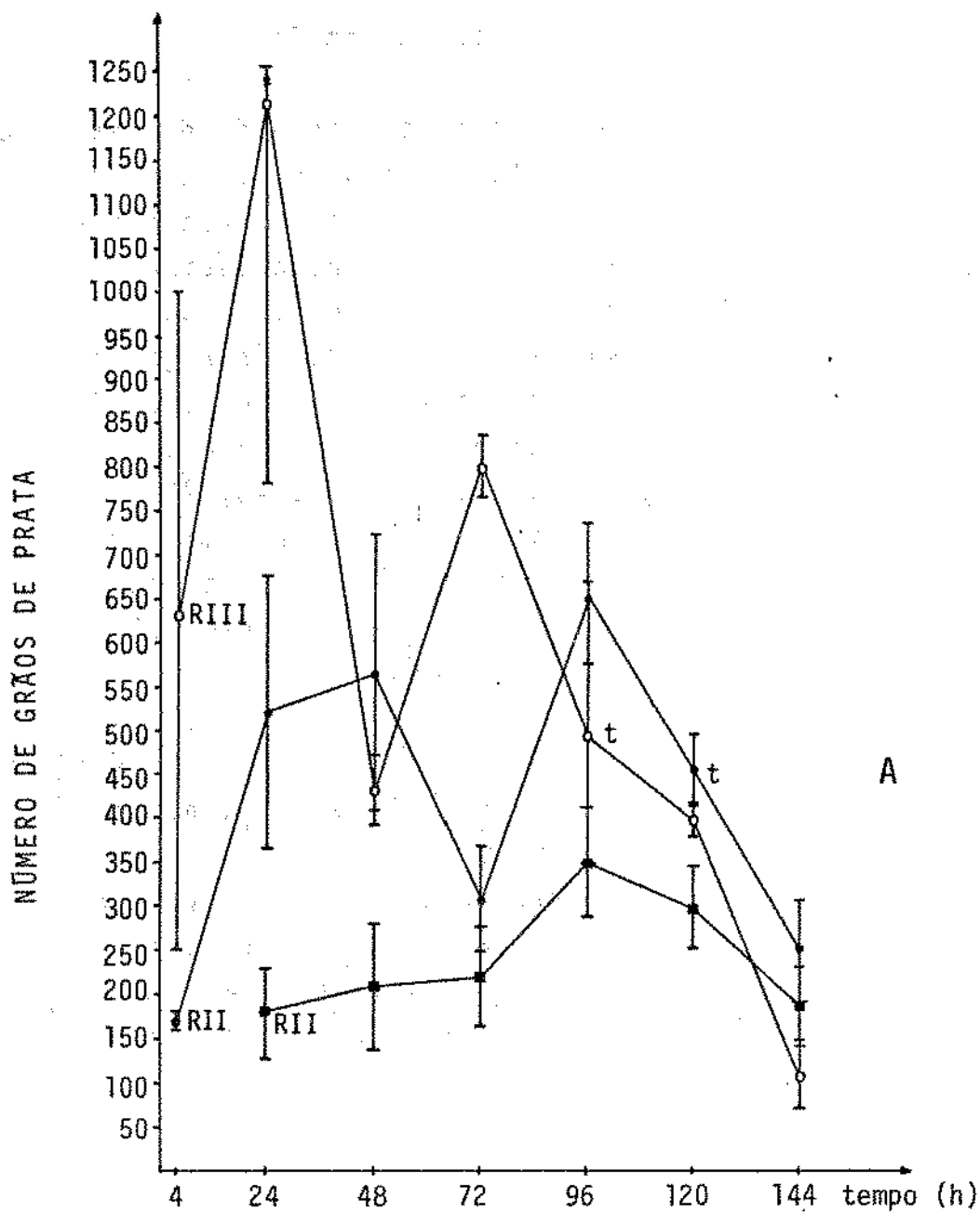


FIGURA 3

FIGURAS 4 a 9: Radioautogramas de incisivos inferiores direitos de camundongos mostrando ameloblastos (A) e matriz do esmalte (E), em diferentes intervalos de tempo após uma única dose de ^3H -Prolina.

Em virtude da dificuldade de obter-se ameloblastos e matriz do esmalte adjacente no foco ao mesmo tempo em objetiva de imersão a óleo 100x, provavelmente devido aos cortes terem sido obtidos em criótomo, as estruturas contendo ameloblastos e/ou matriz do esmalte, foram fotografadas separadamente.

A figura 4 mostra grãos de prata reduzida, 4 h após injeção de ^3H -Prolina, localizado na célula principalmente sobre a região supra nuclear. Quando as células migram da região II (Fig. 4) para a III, 24 h após, houve um decréscimo dos grãos de prata reduzida (Fig. 5). As células que se encontravam na região II as 4 h (Fig. 4) mostraram às 48 h, na região IV (Fig. 6) uma forte reação no citoplasma.

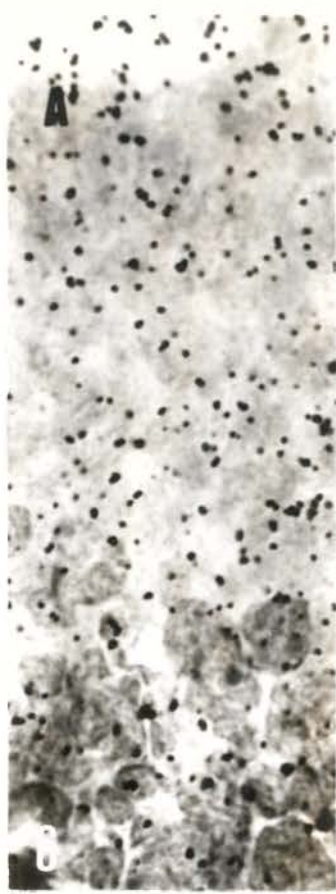
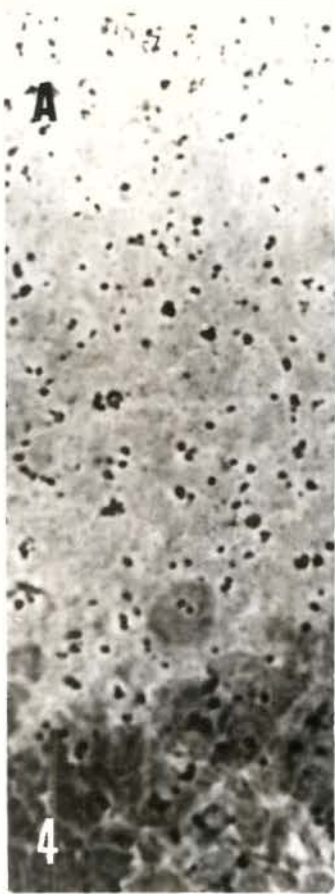
Sobre o esmalte da região IV (Fig. 7) a reação radioativa foi intensa 24 h após a injeção do composto radioativo, decaindo às 48 h quando se encontrava na região V (Fig. 8). O esmalte que se encontrava na região IV (Fig. 7) as 24 h, encontrou-se na região VI às 72 h (Fig. 9) com um aumento de radioatividade, em relação à região anterior.

H.E. 2.000x.

Reg. II - 4 h

Reg. III - 24 h

Reg. IV - 48 h



Reg. IV - 24 h

Reg. V - 48 h

Reg. VI - 72 h

TABELA IV - Média do número de grãos de prata reduzida sobre ameloblastos nas várias regiões do órgão do esmalte dos incisivos inferiores esquerdos, incluídos em Poly bed 812, de camundongos sacrificados em diferentes intervalos de tempo, após uma única injeção de ^3H -prolina.

TEMPO	REGIÕES								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
4h	255,0±31,0	137,5±35,5	130,5±13,5						
24h	163,0±48,0	158,5±12,5	116,0±11,0	136,0± 6,0					
48h	255,5±41,5	199,5±41,5	162,5±17,5	133,0*	70,0*				
72h	133,5±22,5	179,0±49,0	166,0± 5,0	117,5± 0,5	94,0±24,0	66,0*			
96h	88,0*	106,0*	174,0*	156,0*	103,0*	61,0*			
120h	48,5± 8,5	48,5± 9,5	64,5±25,5	94,0±29,0	94,0±51,0	65,0±21,0	24,5±15,5		
144h	43,5± 8,5	40,0± 8,0	29,5± 7,5	33,0± 3,0	62,5±28,5	39,5±24,5	16,5± 3,5	7,0±4,0	3,0*

* Contagem realizada em apenas um animal.

± Erro padrão

FIGURA 10 - Grãos de prata sobre ameloblastos de incisivos inferiores esquerdos de camundongo (incluídos em Poly bed), em vários intervalos de tempo após injeção de uma única dose de ^3H -Prolina. As curvas representam os dados da Tabela IV levando-se em consideração a migração dos ameloblastos devido ao crescimento do dente. A região de início de cada curva está indicada e os próximos pontos correspondem às regiões subsequentes, de acordo com a taxa de migração. Sobre os ameloblastos houve um pico de reação radioativa às 4 ou 48 h, dependendo da região observada, decaindo nos tempos subsequentes. *Contagem realizada em apenas um animal.

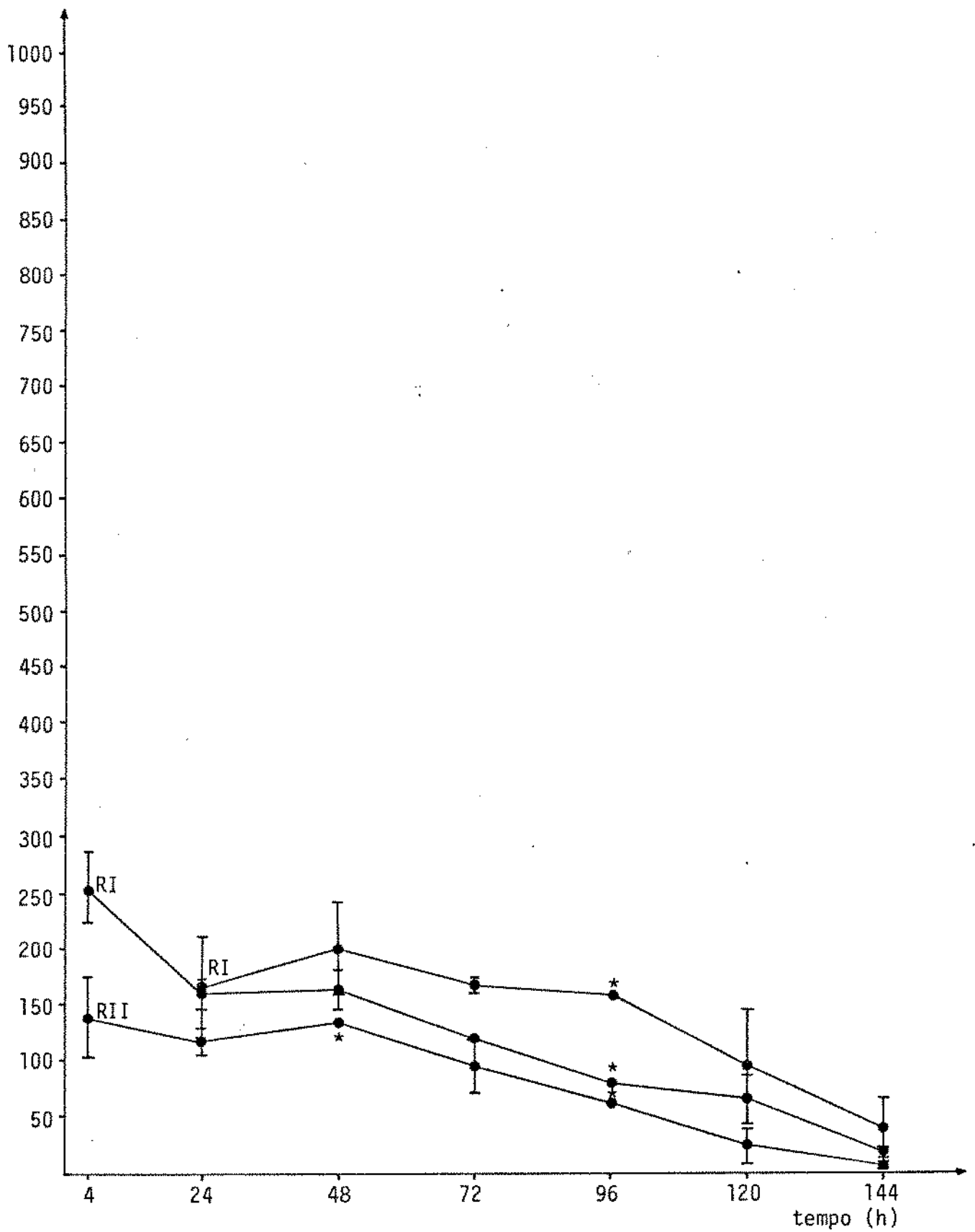


FIGURA 10

TABELA V - Média do número de grãos de prata reduzida sobre matriz do esmalte nas várias regiões do órgão do esmalte dos incisivos inferiores esquerdos incluídos em Poly bed 812, de camundongos sacrificados em diferentes intervalos de tempo, após uma única injeção de ^3H -prolina.

TEMPO	REGIÕES								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
4h	120,0± 9,0	441,0±89,0	1116,5±200,5						
24h	17,5±10,5	303,5±65,5	1190,0± 30,0	1352,5± 51,5					
48h	15,0± 1,0	164,0±30,0	539,5± 97,5	1207,0*	1215,0*				
72h	9,5± 1,5	60,5±17,5	295,5± 20,5	569,5±227,5	1065,0±254,0	1076,0*			
96h	1,0*	37,0*	193,0*	318,0*	486,0*	665,0*			
120h	4,0± 2,0	27,0±16,0	70,5± 44,5	124,5± 91,5	306,0±203,0	382,0±291,0	39,5±3,5		
144h	1,5± 1,5	8,5± 5,5	11,5± 3,5	16,0± 9,0	28,0± 14,0	22,0*	24,5±3,5	15,5±12,5	5,0

* Contagem realizada em apenas um animal

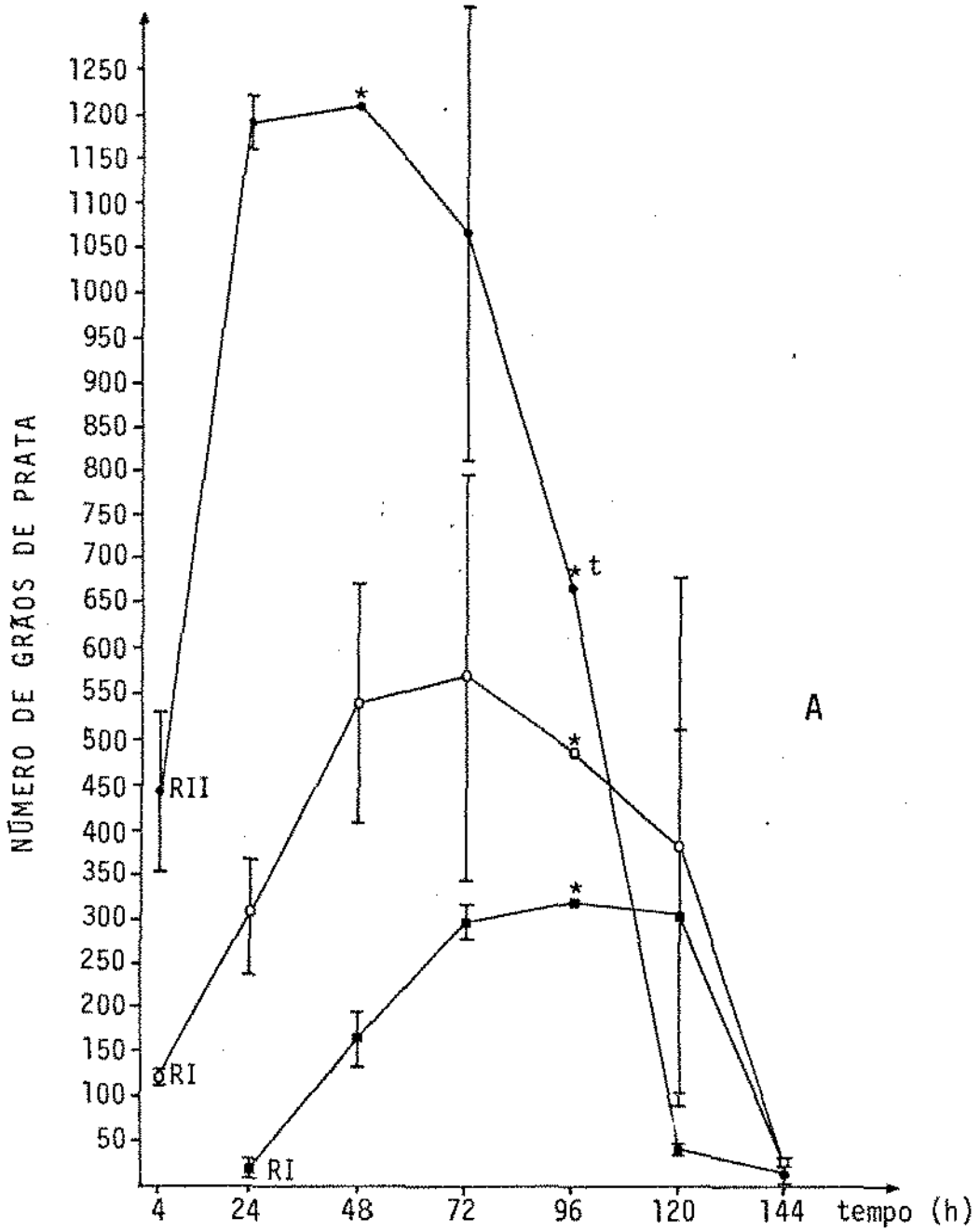
± Erro padrão

FIGURA 11-A - Grãos de prata sobre a matriz do esmalte de incisivos inferiores esquerdos de camundongo (incluídos em Poly bed), em vários intervalos de tempo após a injeção de uma única dose de ^3H -Prolina. As curvas representam os dados da Tabela V, levando-se em consideração a migração da matriz do esmalte devido ao crescimento do dente. A região inicial de cada curva está indicada e os próximos pontos correspondem às regiões subsequentes, de acordo com a taxa de migração. Sobre a matriz do esmalte, o número total de grãos de prata atingiu um máximo de reação, de acordo com a região observada, em 24 a 72 h, permanecendo por algum tempo num "plateau", para depois decair.

*Contagem realizada em apenas um animal.

FIGURA 11-B - Representa em μm a extensão dos dentes incisivos esquerdos (incluídos em Poly bed), subdivididas em regiões, nos diferentes intervalos de tempo. A associação realizada com as curvas construídas na Fig. 11-A, resultante de médias de contagem de grãos de prata na matriz do esmalte, de animais injetados com ^3H -Prolina, e sacrificados em diferentes intervalos de tempo, mostram na Fig. 11-B o início de cada contagem nas regiões I às 4 h \circ , I às 24 h \blacksquare e II às 4 h \bullet , e o \triangle indica os picos de reações presentes nas zonas secretoras.

LEGENDA: EI - Região de secreção do esmalte interno
EE - Região de secreção do esmalte externo
T - Região pós-secretora de transição
M - Região pós-secretora (esmalte maduro)
R - Região de ameloblastos reduzidos



A

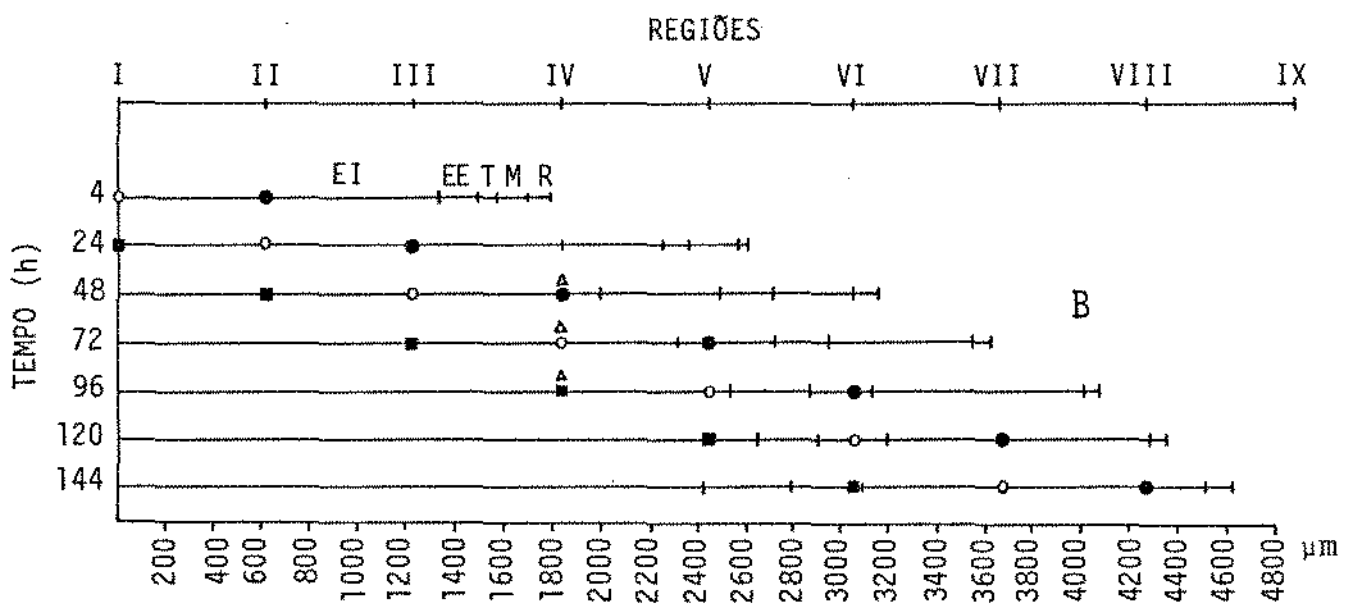


FIGURA 11

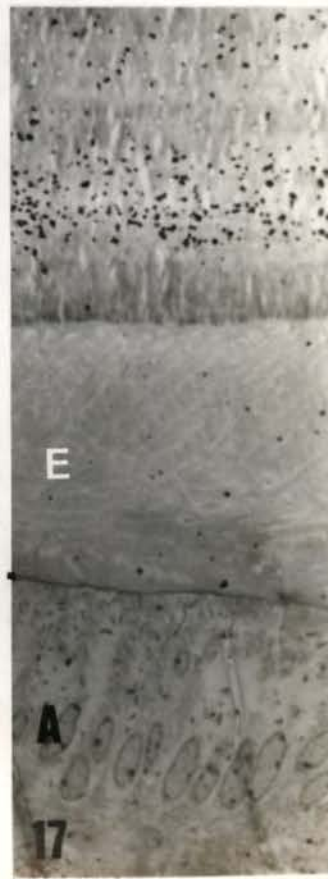
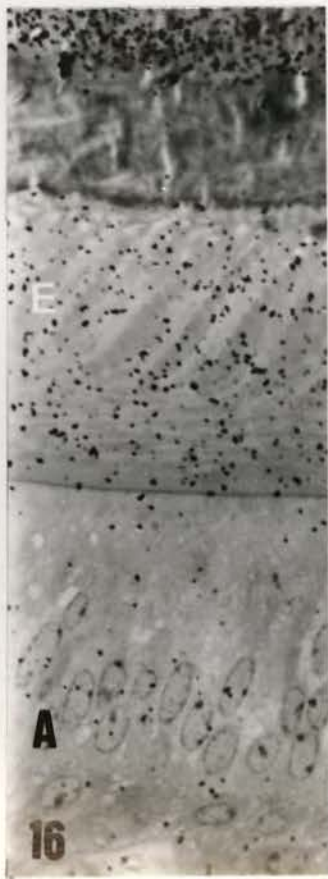
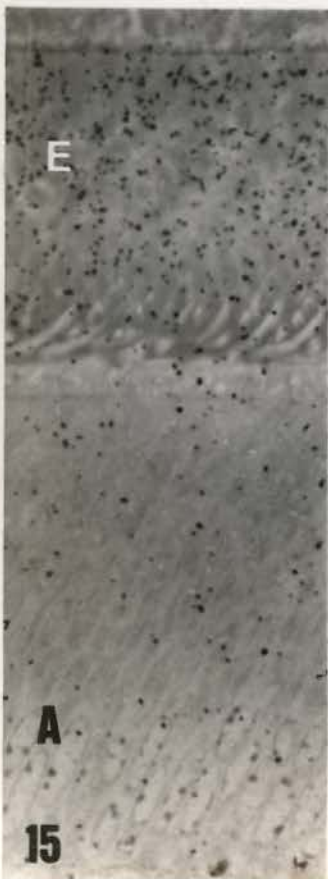
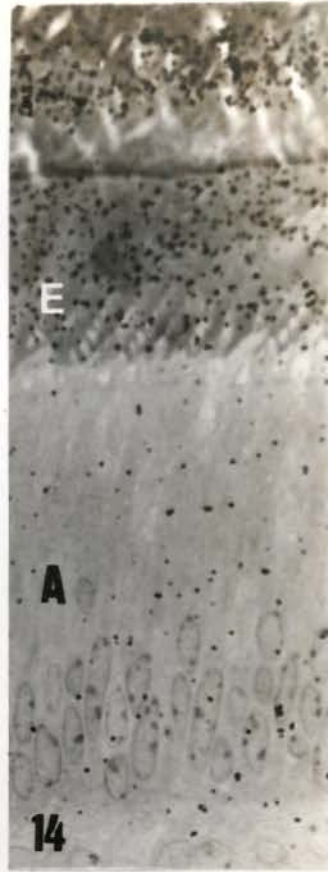
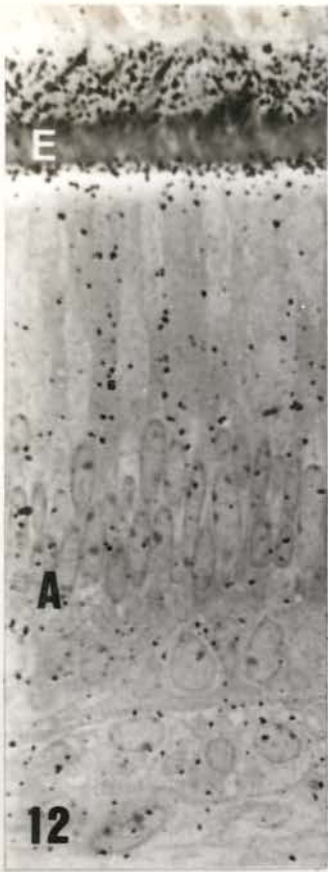
FIGURAS 12 a 17: Radioautogramas mostrando grãos de prata sobre ameloblastos (A) e matriz de esmalte (E) dos incisivos esquerdos, incluídos em Poly bed 812, de animais injetados com uma única dose de ^3H -Prolina e sacrificados em diferentes intervalos de tempo.

Os radioautogramas mostram a sequência da região II as 4 h após a injeção (Fig. 12) e a cada intervalo de 24 h onde os ameloblastos e respectiva matriz transitaram respectivamente pelas regiões III (24 h), IV (48 h), V (72 h), VI (96 h) e VII (120 h). Nota-se nas fotos de 12 a 15 ameloblastos presentes na região secretora (região de esmalte interno) e nas fotos 16 e 17 regiões pós-secretoras. Os grãos de prata não mostram alterações tanto nos ameloblastos como na matriz até 96 h, decaindo as 120 h. Azul de toluidina x 1.300x.

Reg. II - 4 h

Reg. III - 24 h

Reg. IV - 48 h



Reg. V - 72 h

Reg. VI - 96 h

Reg. VII - 120 h

FIGURA 18 - Distribuição da radioatividade no plasma sanguíneo nos vários intervalos de tempo seguido da administração intraperitoneal de ^3H -Prolina em camundongos recém nascidos. Foram utilizados 3 a 4 animais por tempo para as determinações da radioatividade, nos diferentes intervalos de tempo.

CPM = média de contagem por minuto.

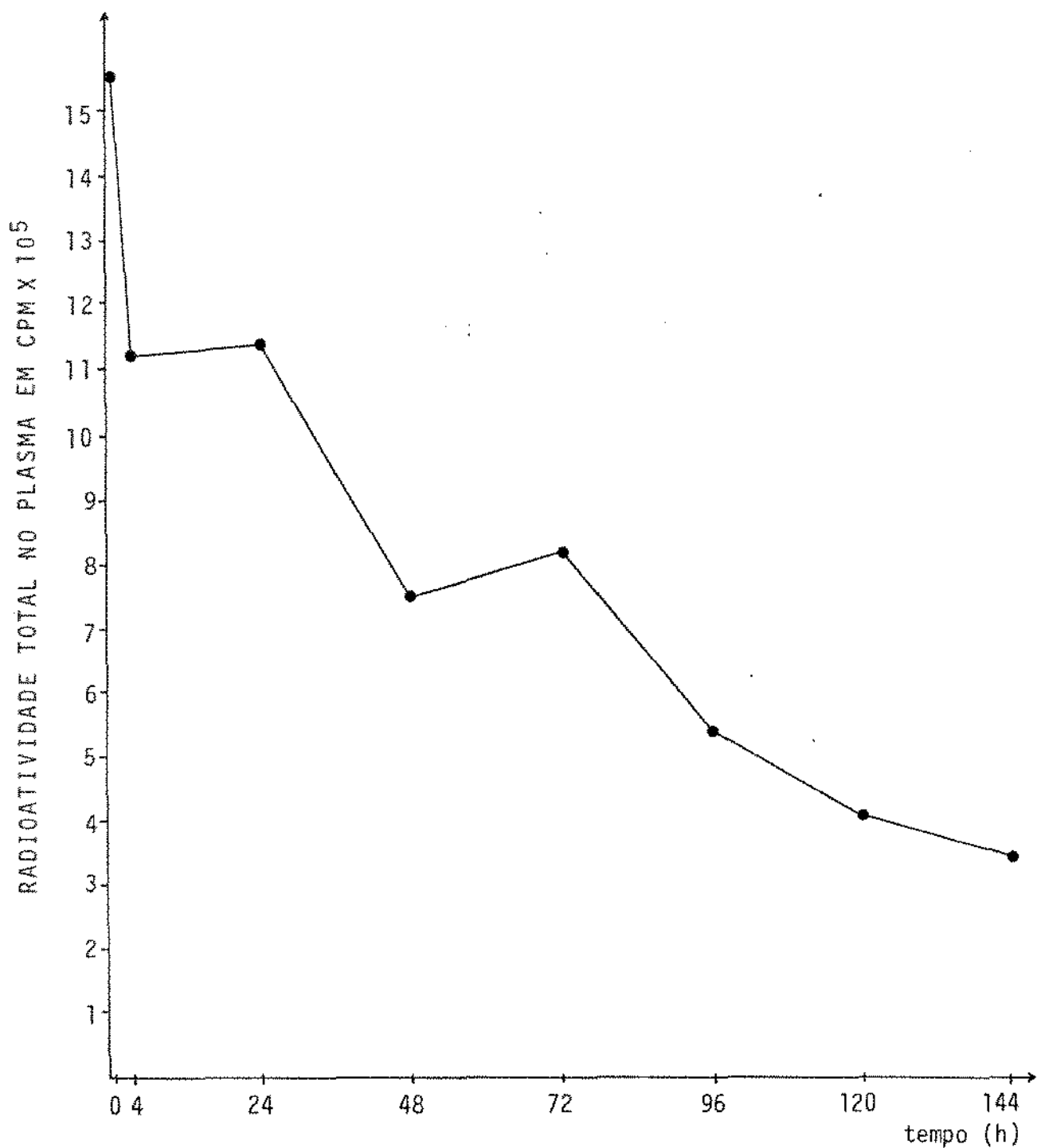


Fig. 18

DISCUSSÃO

A matriz orgânica do esmalte imaturo, ácido insolúvel, elaborada pelos ameloblastos durante a etapa secretora de seu ciclo vital, sofre transformações que a tornam madura e ácido solúvel (MARSLAND, 1952). Durante o mencionado processo, ocorrem mudanças seletivas na composição de aminoácidos (EASTOE, 1963; GLIMCHER, 1977; ROBINSON et al., 1979). Assim, a matriz imatura composta de Amelogenina (EASTOE, 1965), proteína(s) hidrofóbica(s) rica(s) em prolina, histidina, ácido glutâmico e leucina de aproximadamente 20-30 kilodaltons, transforma-se em matriz do esmalte maduro, composta de Enamelin (MECHANIC, 1971), proteína(s) hidrofílica(s), glicosilada(s) de aproximadamente 40-70 kilodaltons (TERMINE et al., 1980), com predominância de glicina, serina, ácido aspártico e ácido glutâmico.

Durante estas transformações, perda protéica, água e aumento concomitante de sais de Ca tem sido demonstrados (DEAKINS, 1942; MARSLAND, 1952; STACK, 1954). Por outro lado, BURGESS & MACLAREN (1965), GLIMCHER et al. (1977), FUKAE & SHIMIZU (1974), SEYER & GLIMCHER (1977), SASAKY & SHIMOKAWA (1979), ROBINSON et al. (1982) verificaram que a perda de componentes protéicos da amelogenina, durante o processo de maturação, é precoce, ocorrendo já na matriz imatura, insolúvel em EDTA. Ao mesmo tempo, GLIMCHER et al. (1977), verificaram que, nos estágios intermediários da amelogênese entre a porção mais imatura e a porção mais madura da matriz orgânica do esmalte, ocorre uma mistura de proteínas com características de ambas, ou seja, de matriz imatura e madura.

Embora perda de radioatividade da matriz orgânica, precedendo um aumento de sais de Ca, durante o processo de formação do esmalte fossem mostrados, em cortes histológicos, no passado por diversos autores usando compostos radioativos e radioautografias (LEBLOND et al., 1955, BÉLANGER, 1955; KENNEDY & KENNEDY, 1957; KUMAMOTO & LEBLOND, 1958; HWANG et al., 1962, 1963; COSTACURTA, 1964; GREULICH & SLAVKIN, 1965; COTTON & HEFFERREN, 1966; REITH & COTTY, 1967), a hipótese da possível participação dos ameloblastos secretores na remoção de material orgânico desta matriz durante o citado processo de amelogênese, foi aventada por BLUMEN & MERZEL (1972, 1973, 1976). Nestes estudos, utilizando molares de cobaia, dentes de crescimento con

tínuo, previamente injetados com ^3H -Prolina ou ^{35}S -Sulfato de Sódio como precursores da matriz orgânica do esmalte, fixados, descalcificados e radioautografados, quantificaram os dados sobre este fenômeno. Por correlação da taxa de crescimento diário do dente calculado usando ^3H -Timidina, com a secreção destas substâncias encontradas na matriz, eles sugeriram, então, que os ameloblastos secretores participariam do processo de maturação, removendo material orgânico da matriz imatura.

Estudos bioquímicos demonstraram que a amelogenina sofre degradação resultando pequenos polipeptídeos (SEYER, 1972; SEYER & GLIMCHER, 1971, 1977; SEYER & VINCENT, 1972; FUKAE et al., 1972; FUKAE & SHIMIZU, 1974; GÜENTER et al., 1975; ROBINSON et al., 1979; SASAKI & SHIMOKAWA, 1979; ROBINSON & KIRKHAN, 1984). Esta quebra, segundo KATCHBURIAN & HOLT (1969), SEYER & GLIMCHER (1977), estaria relacionada aos enzimas hidrolíticos encontrados no sistema lisosomal dos ameloblastos secretores os quais poderiam atuar tanto no meio intra como no extra celular, degradando proteínas em polipeptídeos de baixo peso molecular o que, provavelmente, as tornaria solúveis à ação de agentes químicos usados rotineiramente em procedimentos histológicos.

Embora admitindo o fato de que a perda de radioatividade de estaria relacionada à reabsorção pelos ameloblastos secretores, BLUMEN & MERZEL (1972, 1973, 1976) não puderam visualizar este processo de remoção a nível histológico, pois, como foi mencionado, os espécimens utilizados foram previamente submetidos à fixação e descalcificação, os quais atuam sobre a radioatividade tecidual (que em última análise, nestes estudos, reflete a presença de componentes orgânicos) removendo parte da mesma (BATTISTONE & BURNETT, 1956; PIEZ, 1962), DROZ & WARSHAWSKY, 1963).

BLUMEN (1979) e mais recentemente BLUMEN & MERZEL (1982), contornaram o problema do uso de espécimens previamente submetidos à ação de agentes químicos de fixação e descalcificação usando dentes incisivos de animais recém-nascidos previamente injetados com ^3H -Prolina e ^3H -Timidina e cortados no criótomo sem os mencionados tratamentos químicos. Por procedimentos semelhantes aos já descritos por BLUMEN & MERZEL (1972, 1973, 1976), verificaram, com efeito, que correlacionando a velocidade de migração dos ameloblastos com a incorporação de ^3H -Prolina os ameloblastos secretores participam do processo de amelogênese, não só secretando componentes orgânicos da amelogenina, mas removen

do parte dos mesmos. Esta afirmação se deveu a presença de um segundo aumento de radioatividade celular, o que não ocorreu nos espécimens tratados com agentes químicos. Contudo algumas críticas podem ser feitas àqueles estudos, como por exemplo, a amostragem insuficiente de animais com os compostos radioativos empregados, e possibilidade do aumento da radioatividade verificado nos ameloblastos correspondente ao segundo pico reativo, ser devida a ^3H -Prolina retida no organismo e não a um fenômeno local.

No presente estudo radioautográfico, usando Timidina tritiada como radiotraçador dos núcleos celulares, mostramos que a taxa média do trânsito dos ameloblastos da região apical para a região incisal foi, de respectivamente $513,36 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ para os dentes cortados com o criótomo e $610,32 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ para os dentes incluídos em Poly bed 812. A análise estatística destes dados mostrou que estas velocidades não se equivalem, pois o valor de t calculado, 2,45, é significativa a nível de 5%. Então os valores dos coeficientes angulares das retas de regressão são estatisticamente diferentes, razão pela qual respeitamos o valor de cada velocidade obtida em cada um dos seus respectivos experimentos; portanto, apesar destes resultados serem diferentes e provenientes de dentes que receberam o precursor radioativo ao nascimento e o ameloblasto com núcleo marcado, o mais incisal no seu trânsito migratório ser observado enquanto durou o experimento (144 h), eles confirmam os estudos de BLUMEN & MERZEL (1982) e são similares aos encontrados por HILLER et al. (1975), ROBINSON et al. (1979) em incisivos provenientes de ratos pesando de 150 a 250 g.

No estudo para o cálculo da taxa de migração diária do bloco ameloblasto-matriz e da biossíntese e reutilização de compostos orgânicos durante a formação da matriz jovem do esmalte, foram utilizados incisivos inferiores dos lados direito e esquerdo da mesma mandíbula obtidos de um maior número de animais, nos diferentes intervalos de tempo após a administração dos compostos radioativos. O incisivo inferior direito, sem prévia fixação química ou descalcificação, foi utilizado para obter cortes com o criótomo, e o esquerdo, para obter cortes semifinos sem o uso de descalcificador, mas após fixação com glutaraldeído, nos animais injetados com ^3H -Timidina e paraformoldeído, nos animais injetados com ^3H -Prolina e inclusão em Poly bed 812 e que serviram para comparação. A finalidade de se es-

tudar comparativamente ambas as técnicas entre os espécimens preparados de dentes oriundos do mesmo animal, foi o de proporcionar um melhor controle, minimizando ao máximo, possíveis variações individuais, o que não foi feito por BLUMEN (1979) e BLUMEN & MERZEL (1982). A utilização de cortes semifinos de material incluído em Poly bed 812 nos permitiu uma melhor observação morfológica das zonas de amelogênese descrita por WARSHAWSKY & SMITH (1974) em incisivos de ratos. Assim, pode-se verificar ao contrário do que foi descrito por BLUMEN (1979) e BLUMEN & MERZEL (1982) os quais usaram espécimens incluídos em parafina, que todas as zonas de amelogênese já estão presentes quando do nascimento. Realizamos medidas de cada região durante o período em que durou o experimento (6 dias) e observamos que a região secretora compreendendo a secreção do esmalte interno e externo, aumentou em 1296,9 μm (2.789,9 - 1.492,9); a de transição 211,1 (286,5 - 75,4) e a de maturação propriamente dita, 1508,0 μm (1719 - 211,1) (Vide Fig. 3B e 11B). Conforme pudemos observar, a região que apresentou maior extensão foi a de secreção enquanto a de maturação em relação àquela é praticamente 1000 μm menor. Ainda dentro da metodologia empregada usamos ^3H -Prolina como precursor da matriz orgânica do esmalte, pelo fato de estudos bioquímicos mostrarem predominância deste aminoácido na matriz imatura do esmalte (EASTOE, 1963; GLIMCHER et al., 1977; ROBINSON et al., 1979) e como foi usado aminoácido como precursor, naqueles dentes previamente fixados e que serviram como controle, optou-se pela fixação com paraformaldeído no estudo da biossíntese e reutilização de material orgânico da matriz, pois este fixador segundo PETER & ASHLEY (1967) liga-se em menores quantidades com aminoácidos livres fixando a sua quase totalidade quando incorporados às proteínas, quando comparado ao glutaraldeído. Este último, ainda segundo PETER & ASHLEY (1967), fixa praticamente a totalidade de aminoácidos na forma livre e não ligados às proteínas. Deste modo, este procedimento eliminou a possibilidade de aparecer grãos de AgBr em nossos radioautogramas devidos à presença de aminoácidos livres fixados como tal, fato este que conduziria fatalmente a uma grande margem de erro na quantificação dos radioautogramas.

Comparando os dados radioautográficos do presente experimento, obtidos com dentes fixados e incluídos em Poly bed 812 (Tabs. IV e V - Figs. 10 e 11A) àqueles dos espécimens cor-

tados no criótomo (Tabs. II e III e Figs. 2 e 3A) pode-se verificar, com efeito, a influência da ação do agente fixador sobre a radioatividade presente nos ameloblastos e matriz imatura do esmalte. Esta ação, mostrada pelo segundo pico de radioatividade observado somente no material não tratado por agentes químicos de fixação e descalcificação confirmou os trabalhos de BATTISTONE & BURNETT (1956), PIEZ (1962) e DROZ & WARSHAWSKY (1963), relativos a influência que os mencionados agentes químicos, empregados rotineiramente durante o processamento histológico, exercem removendo parte da radioatividade tecidual, qual seja, o de componentes orgânicos.

Analisando-se os radioautogramas, primeiramente, dos espécimens fixados e incluídos em Poly bed 812, pode-se observar que a radioatividade, medida pelo número total de grãos de Ag, após apresentar nos ameloblastos presentes nas regiões I e II às 4 h um pico máximo de intensidade radioativa, refletindo a biossíntese de material exportável, como já amplamente descrito na literatura, mostrou um decréscimo gradual e contínuo desta radioatividade nos demais intervalos de tempo após a administração do composto radioativo, permanecendo, no entanto durante este decréscimo e no tempo de duração do experimento, ainda uma quantidade baixa de grãos de Ag. Esta pequena quantidade de radiação que permaneceu nas células constitui segundo descrito por Carneiro (1959) e Warshawsky et al. (1963) as proteínas de constituição ou pode também refletir uma incorporação e metabolização celular enquanto existir material radioativo disponível, pois quando a radioatividade plasmática é medida em cintiladores, nunca atinge ao longo do tempo de duração do experimento, o ponto zero (WARSHAWSKY, 1987 - informações pessoais). Na matriz do esmalte, a intensidade radioativa após atingir um pico entre 24 e 72 h nas regiões II e III, permaneceu ligeiramente estável, para decair nos tempos posteriores da duração do experimento (Fig. 11A). Este decréscimo verificado na matriz do esmalte imaturo, levando-se em consideração a taxa diária de migração do bloco ameloblastos-matriz, em direção incisal, significou que uma certa quantidade de matriz orgânica, particularmente de amelogenina rica em prolina foi perdida e que esta perda ocorreu na maior parte ainda na região de secreção e portanto relacionada aos ameloblastos que ainda estão secretando componente da matriz orgânica do esmalte (Fig. 11-A), confirmando os trabalhos de Blumen & Merzel (1972, 1973, 1976). As

sim nossos resultados mostram que este decréscimo ocorreu antes que a perda maciça de componentes orgânicos da matriz do esmalte, descrita existir entre o esmalte translúcido e o esmalte opaco, ou seja, do limite opaco (HILLER, 1975) ocorra, confirmando os trabalhos de ROBINSON et al (1978, 1982). Este limite corresponde aproximadamente ao estágio de amelogênese onde os ameloblastos sofrem mudanças morfológicas. Assim, apresentam estrutura semelhante a borda estriada com canais tubulares subjacentes preenchidos com material eletrôn denso, similar em aparência à matriz do esmalte (SMITH, 1979) e que ao nível de microscopia óptica corresponde a região de transição descrita por WASSERMANN (1944); MARSLAND (1952); LEBLOND & WARSHAWSKY (1979). Neste local, segundo BLUMEN & MERZEL (1972, 1973, 1976) os ameloblastos embora com mudanças em suas características morfológicas, apresentam ainda, alguma atividade secretora de componentes exportáveis para a matriz, atividade esta confirmada por WARSHAWSKY (1979).

Analisando-se agora os dados radioautográficos relativos aos espécimens cortados no criótomo, verificamos a presença de um pico de intensidade radioativa nos ameloblastos que transitavam pelas regiões I, II e III, 4 h após a administração do composto radioativo. Este pico foi indicativo da biossíntese de material orgânico precursor de componentes exportáveis da matriz jovem do esmalte, o que foi confirmado pelo decréscimo na reação radioautográfica celular 24 h após (Tab. II-Fig. 5). Estes dados, no aspecto funcional, foram semelhantes aos obtidos com material fixado e incluído em Poly bed 812. Contudo, um segundo pico de intensidade radioativa, em direção incisal, foi observado somente quando analisamos os espécimens cortados com o criótomo. Este segundo pico apareceu nos ameloblastos que se encontravam nas regiões III, IV e V 48 h após, células estas que ocuparam as 4 h respectivamente as regiões I, II e III, portanto enquanto ainda transitavam pela região onde se processou a secreção de componentes da amelogenina rica em prolina. A radioatividade nos ameloblastos continuou a decair após, permanecendo, no entanto, baixa até o final da duração do experimento quando então as mesmas passaram a ocupar a zona de transição entre o esmalte imaturo e o maduro.

A matriz do esmalte adjacente aos ameloblastos mostrou um pico máximo de intensidade radioautográfica entre 24-48 h após a administração de ^3H -Prolina quando presente na re-

gião IV refletindo a exportação realizada pelos ameloblastos secretores, de proteína(s) rica(s) em prolina constituintes da amelogenina. Após este pico, houve um decréscimo de radioatividade ainda relacionada aos ameloblastos secretores no tempo de 48-72 h após a injeção do composto radioativo. Ao contrário do material fixado, um outro pico radioativo foi observado nas regiões VI 72-96 h após, quando a matriz imatura migrou em direção incisal, relacionando-se contudo ainda à zona de secreção (Fig. 3 A e B). Nos tempos subsequentes, à semelhança com o grupo de espécimens fixados, houve um decréscimo de radioatividade. Neste grupo, o decréscimo de radioatividade verificado atinge ao final do experimento, a zona de transição e de esmalte maduro relacionando-se também aos ameloblastos pós-secretores. Em relação a estas células, nenhum pico de reação radioautográfica indicativo de uma possível reabsorção foi observado, confirmando os trabalhos de BLUMEN (1979) e BLUMEN & MERZEL (1972, 1973, 1976, 1982).

Desde que neste grupo experimental eliminamos o uso de agentes químicos de fixação e descalcificação, podemos afirmar que o segundo pico radioativo observado nos ameloblastos que se encontravam ainda em trânsito pela zona de secreção (Figs. 2 e 6), realmente configurou uma reincorporação de material orgânico por parte destas células, confirmando, deste modo, os trabalhos anteriores de BLUMEN (1979) e BLUMEN & MERZEL (1982).

Com o intuito de evitar especulações sobre a possibilidade deste segundo aumento de radioatividade verificado nos ameloblastos secretores, ser uma reincorporação proveniente de ³H-Prolina retida no organismo dos animais usados (ROBINSON et al., 1982), no presente estudo realizamos a depuração plasmática deste composto radioativo, o que comprovou que a mencionada reincorporação celular foi realmente devida a um fenômeno de âmbito local, pois nenhum pico de intensidade radioativa que pudesse indicar origem sistêmica foi detectado. O material orgânico reincorporado pelos ameloblastos que transitaram pela região secretora são então reutilizados para nova síntese e exportados para a matriz orgânica do esmalte, o que neste estudo foi visualizado pelo segundo pico de intensidade radioativa encontrado na matriz imatura configurando, segundo BLUMEN & MERZEL (1982) um "turnover" local. Este processo que engloba síntese-secreção-reincorporação e nova secreção formando uma espé

cie de "onda" indicou ainda que a matriz imatura do esmalte apresenta certa labilidade (BLUMEN & MERZEL, 1976).

Embora não contradizendo o trabalho radioautográfico de LEBLOND & WARSHAWSKY (1979) que mostra que a perda de material orgânico da matriz ocorre próximo da região onde esta é perdida do corte pela ação do EDTA, ou seja, na região do esmalte em maturação incluindo o limite opaco, pois nossos resultados indicam que após o segundo pico reativo encontrado na matriz, parte da perda de material orgânico ocorre quando em trânsito pela região de transição e maturação, enquanto a outra parte de material perdido ocorre de forma precoce, na região de secreção de componentes protéicos da amelogenina, portanto relacionada aos ameloblastos secretores.

Pressupondo-se que a região de transição entre esmalte imaturo e esmalte maduro corresponda ao limite opaco descrito por HILLER et al. (1975) e confirmado por GLIMCHER et al. (1977), ROBINSON et al. (1977, 1979) e corresponda também: 1) aproximadamente a região de maturação descrita por SMITH (1979) onde os ameloblastos apresentam borda estriada e uma forte atividade de fosfatase ácida e naftilamidase similar aos osteoclastos; 2) onde ocorre ainda a perda maciça de proteínas; nossos resultados evidenciaram que uma parte da mencionada perda de componentes protéicos lãbeis da amelogenina, sua reincorporação por parte dos ameloblastos e reutilização como material exportável, ocorreu antes que aquele limite tenha sido alcançado, corroborando as evidências bioquímicas de FUKAE & SHIMIZU (1974), SEYER & GLIMCHER (1977), SASAKY & SHIMOKAWA (1979). O restante da perda de componentes do material orgânico da amelogenina configurando a perda maciça descrita por FUKAE & SHIMIZU, (1974); HILLER et al., (1975); ROBINSON et al., (1977); GLIMCHER et al., (1977), deve ocorrer provavelmente na região correspondente ao limite opaco o que, segundo nossos resultados com o criótomo, configurou o decréscimo a partir do segundo pico radioativo na matriz.

Estudos morfológicos a nível ultraestrutural favorecem a interpretação de nossos resultados. Assim, no sentido de reforçá-los, REITH (1967) observou microvilosidades nos ameloblastos secretores projetando-se para o material granular da matriz. Vesículas encapadas e corpos multivesiculares foram também observados por REITH (1967) e SMITH (1979), e mais recentemente por SCHIAVINATO et al. (1983) e NANCY & WARSHAWSKY (1984).

SCHIAVINATO et al. (1983) e NANCY & WARSHAWSKY (1984) também verificaram a presença de grânulos associados aos processos ameloblásticos, os quais poderiam estar relacionados à endocitose.

Estas descrições são altamente sugestivas de uma ativa incorporação associada ao sistema lisosomal, que degradaria material orgânico. No entanto, o mecanismo intrínseco da remoção de material da amelogenina rica em prolina durante o processo de amelogênese não é ainda conhecido. Várias hipóteses podem ser mencionadas: de acordo com REITH (1967) as vesículas encapadas associadas à membrana celular estão engajadas no processo de pinocitose e que a presença de microvilos no "front" de mineralização é consistente com uma atividade absorptiva. As vesículas de pinocitose e corpos multivesiculares são altamente sugestivos de uma ativa incorporação e degradação local de material no interior dos processos ameloblásticos (SMITH, 1979). Baseados na característica da composição de aminoácidos da proteína do esmalte imaturo EASTOE, (1966) e GLIMCHER et al., (1977) sugerem que a remoção pode ser resultado de uma autodespolimerização devido a dependência de suas propriedades físico-químicas, provavelmente por causa do alto conteúdo de prolina (25%) ou degradação peptídica. KATCHBURIAN & HOLT (1969) encontraram numerosos lisosomas no citoplasma dos ameloblastos secretores responsáveis pela elaboração de enzimas relacionadas a degradação de material extracelular. SASAKY & SHIMOKAWA (1979) mostraram que extratos celulares apresentam atividade proteolítica que hidrolizam as principais frações das proteínas do esmalte em tamanhos dializáveis. Estes achados foram confirmados por MOE & BIRKEDAL-HANSEN (1979) os quais encontraram atividades proteolítica no esmalte imaturo.

Baseado no que foi discutido, a radioatividade encontrada nos ameloblastos e que correspondeu ao segundo pico de reação radioautográfica nos espécimens cortados com criótomo, portanto enquanto em trânsito pela região de secreção, sugere ser o resultado de remoção de peptídeos de baixo peso molecular resultante da degradação de componentes da amelogenina rica em prolina, após a matriz ter sido depositada no esmalte imaturo. No citoplasma estes polipeptídeos sofreriam então ação de enzimas lisosomais formando substâncias orgânicas mais simples, que retornariam para o meio extra celular da zona de secreção configurado pelo segundo pico encontrado na matriz

dos espécimens cortados com criôtomos, para ser perdida posteriormente no estágio de maturação mais adiantado conforme demonstraram os estudos bioquímicos já mencionados neste trabalho.

Tudo leva a crer que este "turnover" seletivo da matriz na zona de secreção da amelogenese confirmando os trabalhos de BLUMEN & MERZEL (1982) permitiria o crescimento de cristais dos componentes minerais do esmalte jovem (GLICK, 1979).

No presente trabalho, nenhuma reação radioautográfica indicativa de remoção celular de material orgânico na zona de maturação foi observada, confirmando deste modo os estudos de BLUMEN (1979) e BLUMEN & MERZEL (1972, 1973, 1976, 1982).

RESUMO E CONCLUSÕES

Dois grupos de camundongos com até 12 h após o nascimento foram sacrificados nos intervalos de 1 a 144 h. O primeiro grupo (21 animais pesando em média 1,5 g), após a injeção de uma dose única de 1 $\mu\text{Ci/g}$ de peso corporal de ^3H -Timidina, e o segundo (27 animais, pesando em média 1,4 g), após a administração de uma dose única de 5 $\mu\text{Ci/g}$ de peso corporal de ^3H -Prolina.

Em ambos os experimentos as hemimandíbulas direitas não fixadas, não descalcificadas, contendo o dente incisivo foram incluídas em cápsulas de gelatina, congeladas e cortadas transversalmente no criótomo com a espessura de 6 μm , enquanto as esquerdas foram divididas em 2 ou 3 frações, fixadas em glutaraldeído (para o material injetado com ^3H -Timidina) e paraformaldeído (para o material injetado com ^3H -Prolina), incluídas em Poly bed 812 e seccionadas longitudinalmente num ultramicrotomo, com a espessura de 1 μm .

Os cortes foram radioautografados, revelados e corados.

Os espécimens injetados com ^3H -Timidina foram destinados à obtenção da taxa de migração diária dos ameloblastos no órgão do esmalte. Foram obtidos dois valores, apesar dos espécimens pertencerem aos mesmos animais, o que se justifica pelas técnicas diferentes empregadas:

- a) material não fixado, congelado = 513,36 $\mu\text{m}/\text{dia}$
- b) material fixado e incluído em Poly bed 812 = 610,32 $\mu\text{m}/\text{dia}$.

Os espécimens injetados com ^3H -Prolina foram utilizados para a análise, através da radioautografia, de parte dos fenômenos metabólicos que ocorrem nos ameloblastos correlacionados com a matriz adjacente, nas regiões pré determinadas pelas taxas de migração diária dos ameloblastos ao longo do dente.

Estudo da radioatividade do material injetado com ^3H -Prolina:

- a) fixado em paraformaldeído, não descalcificado, incluído em Poly bed 812 e cortado longitudinalmente:

A contagem dos grãos de prata de cada região dos dentes, separadas por intervalos de 610,32 μm , mostrou sobre os ameloblastos (Fig. 10) um pico de reação radioativa 4 ou 48 h, dependendo da região observada, decaindo nos tempos subsequentes.

tes. Sobre a matriz do esmalte (Fig. 11-A) o número total de grãos de prata atingiu um máximo de reação, de acordo com a região observada, após 24 a 72 h, para depois decair.

b) Material não fixado, não descalcificado, congelado e cortado transversalmente:

A análise quantitativa dos grãos de prata de cada região dos dentes, separados por intervalos de 513,36 μ m, mostrou sobre os ameloblastos (Fig. 3) uma concentração máxima de grãos de prata às 4 h, decaindo às 24 h; um segundo pico de reação radioativa às 48 h, decaindo após. A matriz apresentou um pico às 24 e 48 h, decaindo nos tempos subsequentes, um segundo pico ocorreu às 72 e 96 h, decaindo após.

Comparando-se os dois resultados e a análise da depuração da ^3H -Prolina do plasma sanguíneo, chegou-se às seguintes conclusões:

a) A análise da depuração do plasma sanguíneo não mostrou nenhuma retenção de ^3H -Prolina no organismo, sugerindo que sua reincorporação pelos ameloblastos secretores foi um fenômeno local;

b) A comparação entre os resultados das contagens de grãos de prata nos espécimens injetados com ^3H -Prolina sugere que: o decréscimo da radioatividade da matriz do esmalte, simultâneo com um pico nos ameloblastos às 48 h, seguido de decréscimo nos ameloblastos, e picos simultâneos na matriz às 72 e 96 h, no material não fixado, indica uma reabsorção e reutilização de material protéico por parte das células, quando ainda transitam pela região secretora, enquanto a ausência dos segundos picos nos ameloblastos e matriz do material fixado, pelo fato de ambos (material fixado e não fixado) pertencerem aos mesmos animais, é explicado pela remoção dos polipeptídeos de baixo peso molecular, pelos agentes químicos fixadores utilizados no processamento da inclusão dos incisivos em Poly bed 812.

UNITERMOS: Ameloblastos, Amelogênese, Matriz do Esmalte, Odontogênese, Radioautografia.

SUMMARY

- 38 -

Two groups of mice 12 hrs old were sacrificed from 1 to 144 hours after the injection of ^3H -Thymidine or ^3H -Proline. One group of 21 animals, each weighing on average 1,5 g. were injected with a single dose of 1 $\mu\text{Ci/g}$ body weight of ^3H -Thymidine and the other group of 27 animals each weighing on average 1,4 g. received a single dose of 5 $\mu\text{Ci/g}$ body weight of ^3H -Proline.

The unfixed and undecalcified right half mandibles, containing one incisor tooth were embedded in Tissue-Teck II using gelatin capsules and were immediately frozen. Transverse sections, 6 μm in thickness, were cut on a cryotome at -27°C beginning at the incisal tip or at the odontogenic organ of the tooth. The fixed and undecalcified left half mandibles were embedded in Poly bed 812 and cut to obtain longitudinal sections of 1 μm thickness. Radioautography was carried out using a coating technique with Ilford K5 - emulsion.

The incisor tooth was divided in to 100 μm wide regions separated from each other by 610 μm . These measurements were obtained from animals previously injected with ^3H -Thymidine. The silver grain count showed a series of peaks in the ameloblasts. Each corresponded to time of injection (4 or 48 hours). Grain count decreased after each peak. Over the enamel matrix the silver grain count, depending on the region analysed, reached a maximum radioactivity at 24 to 72 hours after injection and decreased thereafter. The silver grain count of each 100 μm wide region (each region was 513 μm from the adjacent one) showed a maximum autoradiographic reaction in regions I, II and III over the ameloblasts 4 hours after the injection and decreased after 24 hours. The grain count increased again at 48 hrs in the regions III, IV and V respectively and finally decreased at later time intervals. The enamel matrix showed peaks of radioactivity at 24 and 48 hours in region IV decreasing thereafter. Peaks of radioactivity were also observed at 72 and 96 hours in region VI, again decreasing thereafter.

Comparing both tooth unfixed and undecalcified, with tooth fixed and undecalcified and considering the clearance of ^3H -Proline from the blood we concluded that, as the blood clearance analysis did not show any peak 4 hrs following injection, there did not seem to be a general systemic effect. However, consideration of the kinetics of ^3H -Proline uptake suggests that,

there may be a reabsorption and reutilization of proline and perhaps other amino-acids by the ameloblasts during the secretory stage. This is explained by the decrease of radioactivity in the enamel matrix and the simultaneous increase of silver grains over the ameloblasts at 48 hours, followed by the decrease in radioactivity in these cells and simultaneous peaks in the matrix at 72 and 96 hours in unfixed material. These kinetics were not observed in the fixed and undecalcified material.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BATTISTONE, G.C. & BURNETT, G.W. Studies of the composition of teeth. V. Variations in the amino acid composition of dentin and enamel. J. dent. Res., 35: 263-72, 1956.
02. BÉLANGER, L.F. Autoradiographic detection of radiosulfate incorporation by the growing enamel of rats and hamsters. J. dent. Res., 34: 20-7, 1955.
03. BLUMEN, G. Preliminary autohistoradiographic studies about the possible participation of the secretory ameloblasts during the enamel maturation. Cell. molec. Biol., 24: 143-50, 1979.
04. _____ & MERZEL, J. The decrease in the concentration of organic material in the course of formation of enamel matrix. Experientia, 28: 545-8, 1972.
05. _____ & _____. Aspectos da formação e maturação da matriz orgânica do esmalte em molares de cobaia (Cavia porcellus, L.) estudados radioautograficamente. Anais Acad. bras. Ciênc., 45: 165-87, 1973.
06. _____ & _____. The loss of sulphated glycosaminoglycans during amelogenesis as revealed by autoradiography after injection of ³⁵S-sodium sulphate.: Archs oral Biol. 21: 513-21, 1976.
07. _____ & _____. New evidences for the role of secretory ameloblasts in the removal of proline labelled proteins from young enamel as visualized by autoradiography. J. Biol. Buccale, 10: 73-83, 1982.
08. BURGESS, R.C. & MACLAREN, C.M. Proteins in developing bovine enamel. In: STACK, M.V. & FEARNHEAD, R.M., eds. Tooth enamel: its composition, properties and fundamentals structure. Bristol, John Wright, 1965. p. 74.
09. CARNEIRO, J. Estudo radioautográfico sobre a síntese protei

- ca. Incorporação de Leucina, Metionina e Glicina radioativas (H^3) em tecidos de camundongos. Recife, 1959. 54 p. [Tese (Livre Docência)-Fac. Med. Univ. Recife].
10. COSTACURTA, L. Autoradiography of incorporated Leucine- 3H in enamel matrix and enamel organ of the upper incisor of the rat. Nucl.-Med., 4: 186-92, 1964.
 11. COTTON, W.R. & HEFFERREN, S.M. An autoradiographic study of tryptophane- 3H incorporation into rat enamel and dentine matrices. Archs oral Biol., 11: 1027-37, 1966.
 12. DEAKINS, M. Changes in the ash, water and organic content of pig enamel during calcification. J. dent. Res., 21: 429-35, 1942.
 13. DROZ, B. & WARSHAWSKY, H. Reliability of the radioautographic technique for the detection of newly synthesized protein. J. Histochem. Cytochem., 11: 426-35, 1963.
 14. EASTOE, J.E. The amino acid composition of proteins from the oral tissues. II. The matrix protein in dentin and enamel from developing human deciduous teeth. Archs oral Biol., 8: 633-52, 1963.
 15. _____. The chemical composition of bone and tooth. Adv. Fluor. Res. dent. caries prev., 3: 5-17, 1965.
 16. _____. The changing nature of developing dental enamel. Br. dent. J., 121(10): 451-4, 1966.
 17. EMBERY, G. The isolation of chondroitin 4-(^{35}S) sulphate from the molar teeth of young rats receiving sodium (^{35}S) sulphate. Calcif. Tissue Res., 14: 59-65, 1974.
 18. FUKAE, M. & SHIMIZU, M. Studies on the proteins of developing bovine enamel. Archs oral Biol., 19: 381-6, 1974.
 19. FUKAE, M. et alii. Studies on the biosynthesis of enamel proteins of rat by utilization of 3H -Proline. J. dent. Res., 51: 1298, 1972. [Abstract].

20. GLICK, P.L. Patterns of enamel maturation. J. dent. Res., 58: 883-5, 1979.
21. GLIMCHER, M.J.; BRICKLEY-PARSONS, D.; LEVINE, P.T. Studies of enamel protein during maturation. Calcif. Tissue Res., 24: 259-70, 1977.
22. GREULICH, R.C. & SLAVKIN, H.C. Amino acid utilization in the synthesis of enamel and dentin matrices as visualized by radioautography. New York, Academic, 1965. 199-214 p. v.4.
23. GUENTER, H. et alii. Enamel proteins: identification of epithelial-specific differentiation products. In: SLAVKIN, H.C. & GREULICH, R.C., eds. Extra cellular matrix influences on gene expression. New York, Academic, 387-98, 1975.
24. HILLER, C.R.; ROBINSON, C.; WEATHERELL, J.A. Variations in the composition of developing rat incisor enamel. Calcif. Tiss. Res., 18: 1-12, 1975.
25. HWANG, W.S.S.; TONNA, A.E.; CRONKITE, E.P. Localization and distribution of tritiated histidine in growing mouse incisor. Nature, 193: 896, 1962.
26. _____; _____; _____. An autoradiographic study of the mouse incisor tritiated histidine. Archs oral Biol., 8: 377-85, 1963.
27. JOSEPHSEN, K. & FEJERSKOV, O. Ameloblast modulation in the maturation zone of the rat incisor enamel organ. A light and electron microscopic study. J. Anat., 124: 45-70, 1977.
28. KALLENBACK, E. Fine structure of rat incisor ameloblasts during enamel maturation. J. Ultrastruct. Res., 22: 90-119, 1968.
29. _____. Access of horseradish peroxidase (HRP) to the extracellular spaces of the maturation zone of the rat

- incisor enamel organ. Tissue Cell, 12: 165-74, 1980.
30. KATCHBURIAN, E. & HOLT, S.J. Role of lysosomes in amelogenesis. Nature, 223: 1367-8, 1969.
 31. KENNEDY, J.S. & KENNEDY, G.D.C. Sulfate mucopolysaccharides in rodent teeth. J. Anat., 91: 398-408, 1957.
 32. KOPRIWA, B.M. & LEBLOND, C.P. Improvements in the coating technique of radioautography. J. Histochem. Cytochem., 10: 269-78, 1962.
 33. KUMAMOTO, Y. & LEBLOND, C.P. Visualization of C¹⁴ in tooth matrix after administration of labeled hexoses. J. dent. Res., 37: 147-61, 1958.
 34. LEBLOND, C.P.; BÉLANGER, L.F.; GREULICH, R.C. Formation of bones and teeth as visualized by radioautography. Ann. N.Y. Acad. Sci., 60: 629-59, 1955.
 35. _____ & WARSHAWSKY, H. Dynamics of enamel formation on the rat incisor tooth. J. dent. Res., 58: 950-79, 1979.
 36. LUFT, J.H. Improvements in epoxy-resin embedding. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9: 409, 1961.
 37. MARSLAND, E.A. A histological investigation of amelogenesis in rats. Part II. Maturation. Br. dent. J., 92: 109-19, 1952.
 38. MECHANIC, G. The multicomponent re-equilibrating protein system of bovine embryonic enamelin (dental enamel protein): chromatography in deaggregating solvents. In: FEARNHEAD, R.W. & STACK, M.V., eds. Tooth enamel II. Bristol, John Wright & Sons, 1971. p. 88-94.
 39. MOE, D. & BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic activity in developing bovine enamel. J. dent. Res., 58: 1012-3, 1979.
 40. NANJI, A. & WARSHAWSKY, H. Characterization of putative secretory sites on ameloblasts of the rat incisor. Am. J.

Anat., 171: 163-89, 1984.

41. PETERS, T. & ASHLEY, C.A. An artifact in radioautography due to binding of free amino acids to tissue by fixatives. J. Cell Biol., 33: 53, 1967.
42. PIEZ, K.A. Chemistry of the protein matrix enamel. In: BUTCHER, E.O. & SOGNAES, F.R., eds. Fundamentals of keratinization. Washington, American Association for Advancement of Science, 1962. chapt. 11, 173-84.
43. REITH, E.J. The ultrastructure of ameloblasts during matrix formation and maturation of enamel. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9: 825-40, 1961.
44. _____. The early stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. J. Ultrastruct. Res., 17: 503-26, 1967.
45. _____. The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. J. Ultrastruct. Res., 30: 111-51, 1970.
46. _____ & COTTY, V.F. The absorptive activity of ameloblasts during the maturation of enamel. Anat. Rec., 157: 577-87, 1967.
47. ROBINSON, C.; LOWE, N.R.; WEATHERELL, A. Changes in amino-acid composition of developing rat incisor enamel. Calcif. Tiss. Res., 23: 19-31, 1977.
48. _____ et alii. Four chemically distinct stages in developing enamel from bovine incisor teeth. Caries Res., 12: 1-11, 1978.
49. _____ et alii. Matrix and mineral changes in developing enamel. J. dent. Res., 58: 871-82, 1979.
50. _____ et alii. Enamel proteins: from secretion to maturation. J. dent. Res., 61: 1490-5, 1982.

51. ROBINSON, C. & KIRKHAM, J. Enamel matrix components. Alterations during development and possible interation with the mineral phase. In: FEARNHEAD, R.W. & SUGAS, S., eds. Tooth enamel IV. Amsterdam, Elsevier, 1984. p. 261-5.
52. SASAKY, S. & SHIMOKAWA, H. Enamel proteins: Biosynthesis and chemistry. J. dent. Res., 58: 765-72, 1979.
53. SASAKI, T.; DEBARI, K.; GARANT, P.R. Ameloblast modulation and changes in the Ca, P, and S content of developing enamel matrix as revealed by SEM-EDX. J. dent. Res., 66: 778-86, 1987.
54. _____ et alii. Absorptive and digestive functions of maturation ameloblasts in rat incisors. In: FEARNHEAD, R.W. & SUGA, S., eds. Tooth enamel IV. Amsterdam, Elsevier, 1984. p. 266-70.
55. SCHIAVINATO, C.R.; BLUMEN, G.; TOSELLO, D.O. Observações ultra-estruturais do processo ameloblastico e sua relação com a matriz do esmalte, em molares de cobaia (Cavia porcellus, L.). Ciênc. Cult., S. Paulo, 35: 620-5, 1983.
56. SEYER, J. Evolution of mineralizing tissues. In: SLAVKIN, H.C., ed. The comparative molecular biology of extracellular matrices. New York, Academic Press, 1972. p.273.
57. _____ & GLIMCHER, M.J. The content and nature of the carbohydrate components of the organic matrix of embryonic bovine enamel. Biochem. Biophys. Acta, 184: 509-22, 1969.
58. _____ & _____. The isolation of phosphorylated polypeptide components of the organic matrix of embryonic bovine enamel. Biochem. Biophys. Acta, 236: 279-91, 1971.
59. _____ & _____. Evidence for the presence of numerous protein components in immature bovine dental enamel. Calcif. Tissue Res., 24: 253-7, 1977.
60. _____ & VINCENT, E. Evolution of mineralizing tissues.

In: SLAVKIN, H.C., ed. The comparative molecular biology of extracellular matrices. New York, Academic, 1972. p. 276-89.

61. SLAVKIN, H.C.; NINO, W.; BRINGAS Jr., P. The biosynthesis and secretion of precursor enamel protein by ameloblasts as visualized by autoradiography after tryptophan administration. Anat. Rec., 185: 289-312, 1976.
62. SMITH, C.E. Ameloblasts: Secretory and resorptive functions. J. dent. Res., 58: 695-706, 1979.
63. STACK, M.V. Organic constituents of enamel. J. Am. dent. Ass., 48: 297-366, 1954.
64. TERMINE, J.D. et alii. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. J. biol. chem., 255: 9760-8, 1980.
65. WARSHAWSKY, H. [Comunicação pessoal]. Maio, 1987.
66. _____. Radioautographic studies on amelogenesis. J. Biol. Buccale, 7: 105-26, 1979.
67. _____; LEBLOND, C.P.; DROZ, B. Synthesis and migration of proteins in the cells of exocrine pancreas as revealed by specific activity determination from radioautography. J. Cell Biol., 16: 1-23, 1963.
68. _____ & MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. J. Histochem. Cytochem., 15: 542-9, 1967.
69. _____ & SMITH, C.E. Morphological classification of rat incisor ameloblasts. Anat. Rec., 179: 423-46, 1974.
70. WASSERMANN, F. Analysis of the enamel formation in the continuously growing teeth of normal and vitamin C deficient guinea pig. J. dent. Res., 23: 463-509, 1944.

71. WEINSTOCK, A. Matrix development in mineralizing tissues as shown by radioautography: formation of enamel and dentin. In: SLAVKIN, H.C., ed. Developmental aspects of oral biology. New York, Academic, 1972. Chapt. 10, p. 201-42.