

MARIA APARECIDA CARMONA ROSA KERBAUY  
Cirurgiã Dentista

EFEITO DA SIALOADENECTOMIA SÔBRE A INCORPORAÇÃO  
DE <sup>3</sup>H-PROLINA NAS CÉLULAS E MATRIZ DO ESMALTE  
JOVEM E DENTINA DE INCISIVOS DE CAMUNDONGOS,  
ESTUDADOS ATRAVÉS DE RADIOAUTOGRAFIA

Orientadora: Profa. Dra. TEREZA DE LOURDES S. BARRICHELLO

*Este exemplar foi  
devidamente verificado  
conforme resolução CERP/036/83  
Piracicaba, 6 de fevereiro 1987  
Tereza Lourenço Barrichello*

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da  
Universidade Estadual de Campi-  
nas, para obtenção do Grau de  
Mestre em Odontologia, Área de  
Biologia e Patologia Buco-Dental.

PIRACICABA  
1986

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, ADELINA e CARLOS

Aos meus filhos, SIMONE e FERNANDO

Ao WARLEY

Carinhosamente dedico este trabalho.

À Dr<sup>a</sup> TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELLO, Professora Assistente Doutora do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pela constante dedicação e amizade com que orientou a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Doutor *GUILHERME BLUMEN*, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pela cordialidade com que sempre atendeu aos alunos;
- ao Professor Doutor *JOSÉ MERZEL*, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pelas sábias sugestões e revisão final do texto;
- ao Professor Doutor *ROBERTO DOMINGOS ANDREUCCI*, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, mestre e orientador, que nos possibilitou o ingresso no curso de pós-graduação;
- a Professora Doutora *SONIA VIEIRA*, da Disciplina de Bioestatística do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pela orientação prestada na análise estatística;
- ao PROGRAMA INSTITUCIONAL DE CAPACITAÇÃO DOCENTE (PICD), pela bolsa a nós concedida;
- ã FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - (FAPESP) - Processo Biológicas 79/0951-2, pelo auxílio financeiro recebido;
- aos funcionários do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), principalmente às Senhoras *IVANY ODAS DEMÉTRIO*, *MARIA APARECIDA NALIN* e *MARIA APARECIDA SANTIAGO VARELLA*, pelo tratamento cordial e carinhoso dispensado a todos;
- ã Sra. *SUELI DUARTE DE OLIVEIRA SOLTANI*, Secretária dos Cur-

sos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela revisão da bibliografia;

aos caros colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo companheirismo e incentivos recebidos;

a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

# Í N D I C E

INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAL E MÉTODOS .....	5
RESULTADOS .....	10
DISCUSSÃO .....	22
RESUMO .....	28
SUMMARY .....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32

## INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

As glândulas salivares como prováveis órgãos endócrinos têm sido estudadas por numerosos pesquisadores, sendo que OGATA et alii (1944) foi o primeiro a isolar um princípio biologicamente ativo do homogenado de parótidas de bovinos, o qual foi posteriormente cristalizado por ITO & MIZUTANI (1952) recebendo o nome de Parotin. Este composto age de forma generalizada sobre tecidos conjuntivos ativando o seu desenvolvimento e aumentando sua vascularização (FLEMING, 1959, 1962; TEIXEIRA et alii, 1976). Age também sobre tecidos mineralizados acelerando seu crescimento bem como sua calcificação (MARUYAMA, 1950; SATO, 1953; ITO, 1954; SIERVE & DAL MASO, 1962).

Ao lado de trabalhos que mostraram o efeito da administração de extrato de glândulas salivares, ou de parotin a animais, estudos foram realizados mostrando a influência da remoção dessas glândulas sobre vários tecidos e órgãos. No que diz respeito aos tecidos mineralizados, SASAKI (1953) mostrou que os teores de Ca, Mg e P em cinzas de ossos e de dentes de ratos sialoadenectomizados são bem menores do que quando comparados com os controles. Reforçando esses resultados e mostrando que o hiposialodenismo interfere no fenômeno de calcificação, SIERVE & DAL MASO (1962) verificaram que houve um retardo na calcificação e vascularização do esqueleto da cabeça, maxila e em dentes. LIMA (1975) verificou que ratos sialoadenectomizados apresentaram retardo no irrompimento dos molares assim como menor velocidade de crescimento e cal-



cificação dos incisivos. OGATA (1955) trabalhou com ratos sialoadenectomizados e observou alterações histológicas degenerativas na cartilagem epifisária, acompanhada de hipocalcificação; na zona de ossificação observou pontos de osteoporose; nos tecidos dentais, principalmente os ameloblastos secretores e odontoblastos apresentaram atrofia, degeneração hidrópica, picnose, hipoplasia generalizada do esmalte, da dentina e do osso alveolar; tecido pulpar atrófico e muitas vezes fibroso. Mais tarde, MORANO (1976) também observou alterações morfológicas nos ameloblastos e odontoblastos de molares de ratos cujas glândulas salivares foram removidas aos nove dias de vida, assim como a influência da sialoadenectomia materna, realizada antes da fecundação, sobre a estrutura dental dos filhotes. Com exceção deste, os trabalhos acima citados apresentavam, além dos grupos controle e sialoadenectomizado, um grupo experimental sialoadenectomizado com administração de parotín, sendo que neste grupo os animais mostravam sempre uma recuperação das alterações observadas naqueles cujas glândulas haviam sido removidas. Esse resultado levou muitos autores, principalmente os da escola japonesa, a atribuir ao parotín uma função hormonal. Contudo, esses resultados são controversos porque QUINTARELLI et alii (1960) não observaram quaisquer alterações nos ossos, dentes e membranas periodontais de camundongos injetados com parotín quando comparados com o grupo controle. Também ÁVILA LIMA et alii (1983) estudando a morfologia das células dos órgãos odontogênico e do esmalte de incisivos de camundongos sialoadenectomizados, não observaram qualquer alteração estrutural a nível de microscopia óptica, mesmo considerando que estes autores se utilizaram de técnicas de fixação e microtomia mais acuradas para observação da

morfologia celular.

Podemos observar que além dessa controvérsia de resultados, a literatura não apresenta relato de trabalhos sobre a influência da remoção das glândulas salivares sobre a síntese de proteínas em estruturas do órgão dental, motivo pelo qual nos propusemos realizar esse estudo, através de processo radioautográfico, em ameloblastos, odontoblastos e suas respectivas matrizes orgânicas de incisivos de camundongos sialectomizados e injetados com  $^3\text{H}$ -prolina.

## MATERIAL E MÉTODOS

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 16 camundongos *M. musculus albinus*, machos, com 35 dias de idade, pesando em média 25 g, distribuídos em dois grupos:

GRUPO SIALOADENECTOMIZADO: constituído por 8 animais cujas glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sub-linguais) foram extirpadas cirurgicamente.

GRUPO CONTROLE: constituído por 8 animais cujas glândulas salivares maiores foram apenas expostas e levemente manipuladas.

O procedimento cirúrgico realizado nos camundongos, de ambos os grupos, previamente anestesiados por inalação de éter sulfúrico, constou de: tricotomia, assepsia da região cervical com merthiolate, incisão transversal logo abaixo do bordo inferior da mandíbula, divulsão da pele, rebatimento dos retalhos, extirpação ou manipulação das glândulas salivares maiores e sutura da ferida com fio de algodão.

Em seguida os animais foram recolocados em gaiolas com água e ração\* "ad libitum", e novamente pesados no quinto e no décimo quinto dias após a cirurgia (Tabela 1), quando então receberam, por via intraperitoneal, uma dose única de 2,5  $\mu\text{Ci/g}$  de peso de L-[3,4- $^3\text{H}$ ] prolina (A.E.60 Ci/mmol)\*\*. Os animais foram sacrificados aos pares, aos 30 minutos, 2 horas, 12 horas e 24 horas após a administração do composto

---

\* Ração balanceada Ceres, Piracicaba.

\*\*Searle Amershan

radioativo, e fixados por perfusão intracardíaca usando-se solução de p-formoldeído a 4%, pH 7,3, a 37°C, durante 30 minutos (WARSHAWSKY e MOORE, 1967). As mandíbulas foram retiradas, seus tecidos moles cuidadosamente removidos, separadas em hemi-mandíbulas, e colocadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, pH 7,5, durante 2 horas a 4°C.

TABELA 1 - Médias do peso corporal dos camundongos controles e sialoadenectomizados obtidos antes e quinze dias após a cirurgia.

GRUPOS	PESO (g)	
	INICIAL	FINAL
SIALOADENECTOMIZADO	25,4±0,1249	29,4±0,5881
CONTROLE	25,0±0,1637	30,5±0,9258

Após lavagem em solução tampão fosfato, pH 7,4, as peças foram desmineralizadas com solução de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) a 4,13%, pH 7,4 (WARSHAWSKY e MOORE, 1967), por 26 dias, a 4°C, com trocas da solução em dias alternados, tempo em que as peças apresentaram-se flexíveis e os dentes incisivos não ofereceram resistência ao corte com lâmina de barbear nova.

Cada hemi-mandíbula foi então cortada transversalmente em duas partes, ao nível da face distal do 2º molar, sendo utilizada somente sua parte posterior, a qual aloja a porção do incisivo em estudo, ou seja, a que contém os ameloblastos secretores, odontoblastos adjacentes e suas respecti

vas matrizes orgânicas.

Em seguida, as peças foram pós-fixadas em tetróxido de ôsmio 1%, pH 7,4, durante duas horas à temperatura ambiente, desidratadas em soluções de concentrações crescentes de acetona e incluídas em resina Poly Bed 812 segundo técnica de LUFT (1961), utilizando as seguintes proporções:

- 50 ml de Poly Bed 812 Embedding média
- 10 ml de DDSA - Dodeceny succinic Anhydride
- 40 ml de NMA - Nadic Methyl Anhydride

A mistura foi espatulada levemente, para não formar bolhas, durante 15 minutos e acrescida de 2% de DMP-30, voltando a ser espatulada por mais 30 minutos.

Cortes longitudinais na direção vestíbulo-lingual dos incisivos de cada animal, com 1  $\mu$ m de espessura, foram obtidos com navalhas de vidro em ultra-micrótomo Porter-Blum MT2 e radioautografados pela técnica "Dipping" (KOPRIWA e LEBLOND, 1962), usando-se emulsão Ilford K-5. Após exposição de 75 dias, à temperatura de 4°C, os preparados foram revelados durante 4 minutos, com revelador D19B da Kodak, lavados em água destilada, fixados em hipossulfito de sódio a 24% durante 10 minutos, corados com azul de toluidina 1% durante 30 minutos e montados.

As estruturas histológicas foram observadas em microscópio óptico Zeiss e as contagens dos grãos de Ag reduzida foram feitas utilizando-se uma ocular KPL 8X, contendo um retículo tipo Wipple, onde cada quadrado medido, no sistema óptico usado, corresponde a uma área de 10  $\mu$ m x 10  $\mu$ m.

A contagem dos grãos de Ag foi feita numa área de 100  $\mu$ m de comprimento por toda a altura das células e suas respectivas matrizes na porção mais incisal da região secre-

tora dos ameloblastos, ou seja, imediatamente antes da região de transição onde essas células sofrem brusca redução da sua altura. O mesmo foi feito para os odontoblastos adjacentes localizados na mesma direção dos ameloblastos citados.

O resultado foi expresso pela média do nº de grãos/100  $\mu\text{m}^2$  de área e seus respectivos erros padrões.

Para analisar os resultados obtidos para os animais do grupo sialoadenectomizado em relação aos do grupo controle procedeu-se a análise de variância segundo dois critérios de classificação, onde os blocos são relativos aos intervalos de tempo e os tratamentos são os dois grupos experimentais. Os valores de F calculados foram comparados com a tabela para F com margem de erro de 5% (VIEIRA, 1981).

RESULTADOS



## RESULTADOS

### I. - INCORPORAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE $^3\text{H}$ -PROLINA NOS AMELOBLASTOS SECRETORES E RESPECTIVA MATRIZ ORGÂNICA DO ESMALTE

#### GRUPO CONTROLE

A análise da distribuição dos grãos de Ag reduzida nos ameloblastos e matriz orgânica do esmalte mostrou que, aos trinta minutos após a administração do aminoácido radioativo, a marcação localizou-se quase que totalmente sobre os ameloblastos, com poucos grãos na matriz próxima ao ápice das células (Tabela 2 e Figura 3); duas horas após a injeção ocorreu uma diminuição do número de grãos de Ag reduzida sobre os ameloblastos, com aumento dos mesmos na matriz junto aos processos de Tomes (Figura 4); às doze horas a quantidade de grãos tanto nos ameloblastos quanto na matriz permaneceu quase inalterada (Figura 5); posteriormente, no tempo de 24 horas, houve uma diminuição sensível nos dois compartimentos (Tabela 2 e Figura 6). A marcação radioativa nestes dois últimos intervalos de tempo, pareceu difundir-se por toda a espessura da matriz adamantina, até o limite amelodentinário. As médias do número de grãos de Ag reduzida por unidade de área, e sua distribuição percentual entre os ameloblastos e matriz podem ser vistas na tabela 2.

#### GRUPO SIALOADENECTOMIZADO

Os animais do grupo sialoadenectomizado apresentaram, em todos os intervalos de tempo, número significan

temente maior de grãos de prata sobre os ameloblastos e matriz do que os correspondentes do grupo controle (Figuras 1, 7, 8, 9 e 10). Entretanto a distribuição percentual dos grãos de Ag nos dois compartimentos (célula e matriz) foi semelhante em ambos os grupos em todos os tempos (Tabela 2).

## II - INCORPORAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE $^3\text{H}$ -PROLINA NOS ODONTOBLASTOS E RESPECTIVA MATRIZ DA PRÉ-DENTINA E DENTINA

### GRUPO CONTROLE

A análise da distribuição dos grãos de Ag reduzida nos odontoblastos e matriz dentinária mostrou que: aos trinta minutos, após a injeção do aminoácido radioativo, houve maior quantidade de marcação sobre os odontoblastos em relação à sua matriz (Tabela 3; Figura 11); às duas horas após a injeção ocorreu uma diminuição da radioatividade nos odontoblastos com um aumento na pré-dentina (Figura 12); às doze horas houve uma ligeira diminuição do número de grãos de Ag nos odontoblastos com um pequeno aumento na matriz (Figura 13); e às 24 horas ocorreu uma diminuição do número de grãos de Ag, tanto nos odontoblastos como na pré-dentina e dentina (Figura 14). As médias do número de grãos de Ag reduzida por unidade de área e sua distribuição percentual entre odontoblastos, pré-dentina e dentina podem ser vistas na tabela 3 e figura 2.

### GRUPO SIALOADENECTOMIZADO

Os animais do grupo sialoadenectomizado apresentaram, em todos os intervalos de tempo analisados, uma

distribuição da marcação radioativa semelhante à descrita para o grupo controle, isto é, a radioatividade foi diminuindo no compartimento celular para aumentar na pré-dentina e dentina, até o tempo de 12 horas; às 24 horas além de diminuir nos odontoblastos ocorreu também uma diminuição do número de grãos na pré-dentina e dentina semelhante à descrita para o grupo controle. Entretanto, também aqui a quantidade de grãos foi sempre significativamente maior no grupo sialoadenectomizado do que o controle (Tabela 3; Figuras 2, 15, 16, 17 e 18).

TABELA 2 - Número e porcentagem de grãos de prata por 100  $\mu\text{m}^2$ , nos ameloblastos secretores e sua matriz, de animais sialoa denectomizados e controles injetados com  $^3\text{H}$ -prolina.

TEMPO (HORAS)	ESTRUTURA	SIALOADENECTOMIZADO		CONTROLE	
		Nº	%	Nº	%
0,5	Ameloblastos	1,95 $\pm$ 0,35	60	1,35 $\pm$ 0,05	52,9
	Esmalte	1,30 $\pm$ 0,20	40	1,20 $\pm$ 0,10	47,6
	TOTAL	3,25		2,55	
2,0	Ameloblastos	1,75 $\pm$ 0,25	40,7	0,90*	30,0
	Esmalte	2,55 $\pm$ 0,25	59,3	2,10*	70,0
	TOTAL	4,30		3,00	
12,0	Ameloblastos	0,95 $\pm$ 0,15	20,1	0,90 $\pm$ 0,00	29,5
	Esmalte	3,55 $\pm$ 0,05	78,9	2,15 $\pm$ 0,35	70,5
	TOTAL	4,50		3,05	
24,0	Ameloblastos	1,05 $\pm$ 0,15	26,6	0,40*	23,5
	Esmalte	2,90 $\pm$ 0,20	73,4	1,30*	76,5
	TOTAL	3,95		1,70	

1) Cada valor representa a média da contagem em 3 cortes por animal  $\pm$  erro padrão; \*apenas 1 animal analisado.

2)  $p < 0,5$  para diferença do nº de grãos de Ag em cada tempo, entre os grupos.

TABELA 3 - Número e porcentagem de grãos de prata por 100  $\mu\text{m}^2$ , nos odontoblastos, pré-dentina e dentina, de animais sialoa denectomizados e controles injetados com  $^3\text{H}$ -prolina.

TEMPO (HORAS)	ESTRUTURA	SIALOADENECTOMIZADO		CONTROLE	
		Nº	%	Nº	%
0,5	Odontoblastos	3,15 $\pm$ 0,25	66,3	2,05 $\pm$ 0,05	62,5
	Pré-dentina e dentina	1,60 $\pm$ 0,30	33,7	1,25 $\pm$ 0,05	37,9
	TOTAL	4,75		3,30	
2,0	Odontoblastos	2,10 $\pm$ 0,00	45,6	1,40 $\pm$ 0,45	42,4
	Pré-dentina e dentina	2,50 $\pm$ 0,20	54,3	1,90 $\pm$ 0,50	57,6
	TOTAL	4,60		3,30	
12,0	Odontoblastos	1,60 $\pm$ 0,00	35,9	1,00 $\pm$ 0,10	33,3
	Pré-dentina e dentina	2,85 $\pm$ 0,05	64,0	2,00 $\pm$ 0,30	66,7
	TOTAL	4,45		3,00	
24,0	Odontoblastos	1,55 $\pm$ 0,05	40,3	0,50*	21,7
	Pré-dentina e dentina	2,30 $\pm$ 0,00	59,7	1,80*	78,3
	TOTAL	3,85		2,30	

1) Cada valor representa a média da contagem em 3 cortes por animal  $\pm$  erro padrão; \*apenas 1 animal analisado.

2)  $p < 0,5$  para diferença do nº de grãos de Ag em cada tempo, entre os grupos.

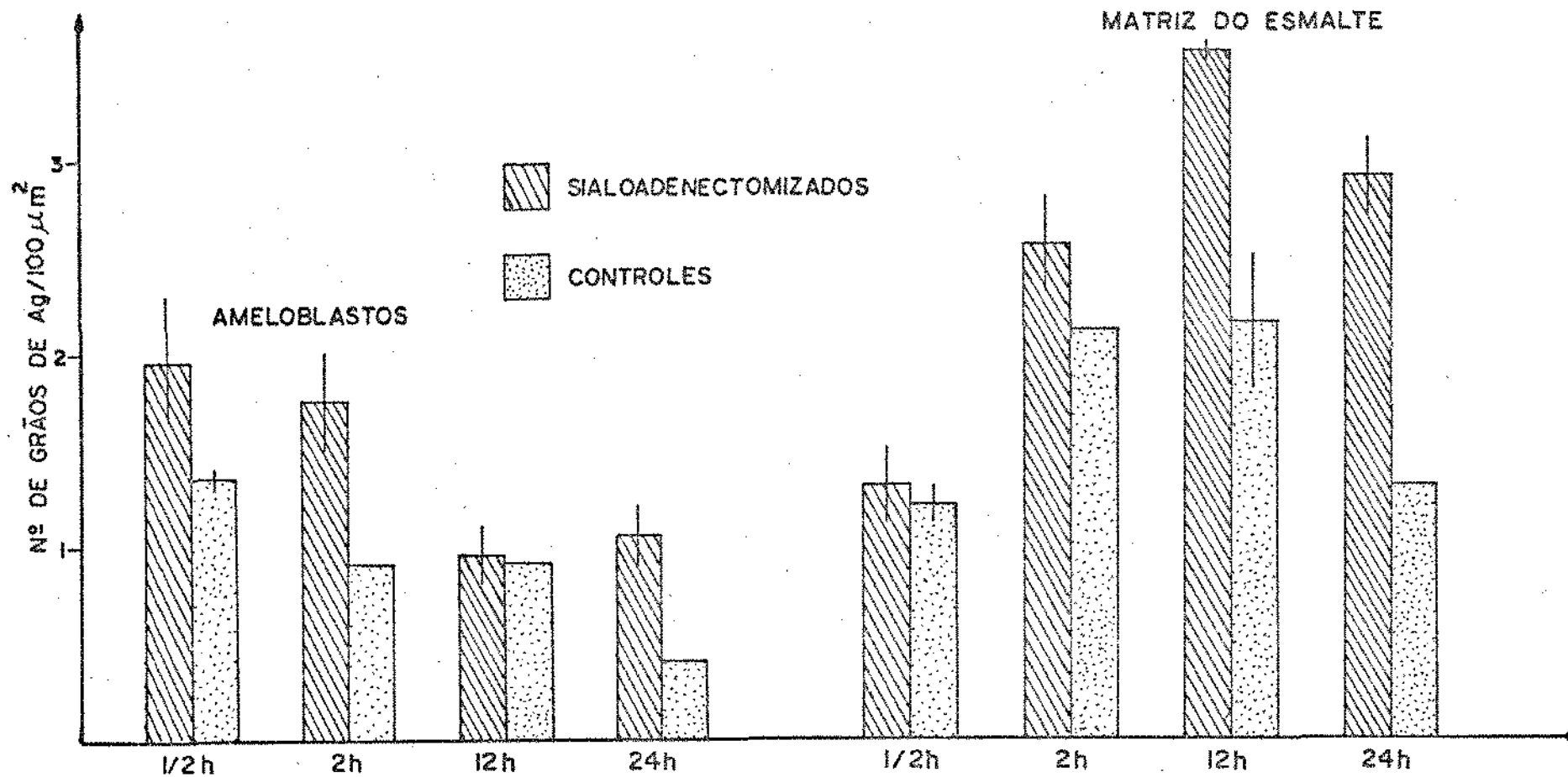


FIG.1- CONCENTRAÇÃO DE GRÃOS DE PRATA REDUZIDA EM AMELOBLASTOS E MATRIZ DO ESMALTE DA REGIÃO SECRETORA DE INCISIVOS INFERIORES DE ANIMAIS SIALOADENECTOMIZADOS E CONTROLES, NOS DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE <sup>3</sup>H-PROLINA.

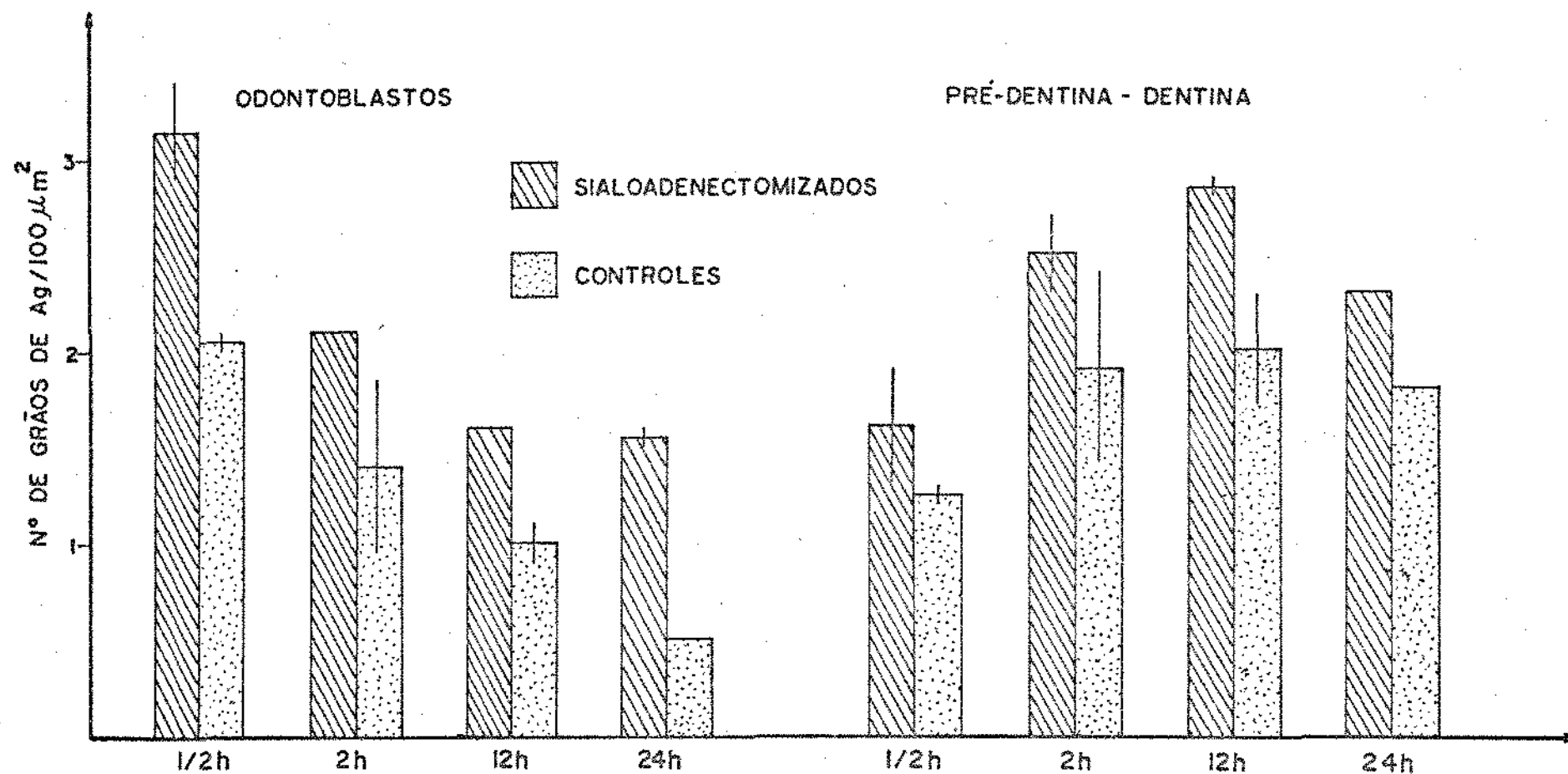


FIG.2-CONCENTRAÇÃO DE GRÃOS DE PRATA REDUZIDA EM ODONTOBLASTOS E SUA MATRIZ, DE INCISIVOS DE CAMUNDONGOS SIALOADENECTOMIZADOS E CONTROLES, NOS DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE  $^3\text{H}$ -PROLINA.

ABREVIATURAS

A - AMELOBLASTOS

D - DENTINA

EM - MATRIZ DO ESMALTE

EI - ESTRATO INTERMÉDIO

O - ODONTOBLASTOS

PD - PRÉ-DENTINA

PRANCHA I (FIGS. 3-10)

Radioautogramas de ameloblastos (A), da zona secretora e matriz do esmalte (EM), de incisivos inferiores de camundongos sialoadenectomizados e controles sacrificados em vários intervalos de tempo após injeção de  $^3\text{H}$ -prolina. Azul de Toluidina.  $\pm 600\text{X}$ .

FIGURAS 3 a 6:

Animais controles, 30 minutos, 2 horas, 12 e 24 horas após injeção de  $^3\text{H}$ -prolina, respectivamente. Observar que inicialmente os grãos de prata estão presentes em maior quantidade na célula, migrando em seguida para a matriz onde se difundem.

FIGURAS 7 a 10:

Animais sialoadenectomizados 30 minutos, 2 horas, 12 e 24 horas após injeção de  $^3\text{H}$ -prolina, respectivamente. Observar que a localização dos grãos de prata nos compartimentos intra e extracelulares, nos diferentes intervalos de tempo, é semelhante à descrita acima, entretanto a concentração desses grãos foi maior tanto nas células como na matriz quando comparadas, tempo a tempo, com a dos animais controles.





PRANCHA II (FIGS. 11 - 18)

Radioautogramas de odontoblastos (O), prē-dentina (pD) e matriz orgânica da dentina (D) de incisivos inferiores de camundongos controles e sialoadenectomizados, sacrificados em vários intervalos de tempo apōs injeção de  $^3\text{H}$ -prolina. Azul de Toluidina.  $\pm 600\text{X}$ .

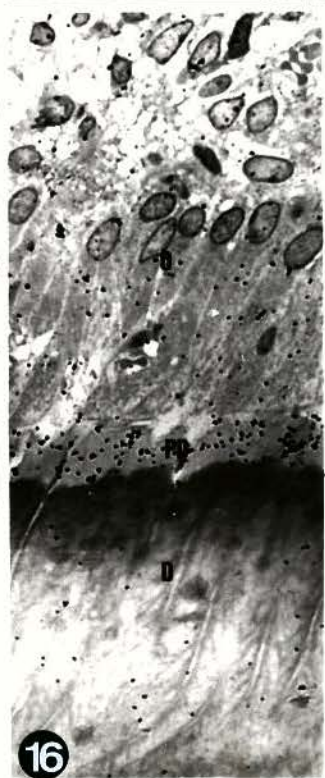
FIGURAS 11 a 14:

Animais controles de 30 minutos, 2 horas, 12 e 24 horas apōs a injeção de  $^3\text{H}$ -prolina, respectivamente. A reação radioativa inicialmente estā mais intensa nos odontoblastos, migrando, em seguida para a prē-dentina e limite prē-dentina-dentina.

FIGURAS 15 a 18:

Animais sialoadenectomizados de 30 minutos, 2 horas, 12 e 24 horas apōs a injeção de  $^3\text{H}$ -prolina, respectivamente. Observar que a localização dos grãos de prata nos compartimentos intra e extracelulares, nos diferentes intervalos de tempo, ē semelhante ā descrita acima, entretanto a concentração desses grãos foi maior tanto nas cēlulas como na matriz quando comparadas, tempo a tempo, com a dos animais controles.





DISCUSSÃO

## DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que a incorporação de  $^3\text{H}$ -prolina nos ameloblastos, odontoblastos e respectivas matrizes orgânicas, tanto nos animais sialoadnectomizados como nos controles, nos diferentes intervalos de tempo estudados, seguiu o padrão já descrito pela literatura, à exceção do tempo de 24 horas após a administração do composto radioativo, que mostrou um decréscimo do número de grãos de prata reduzida. Entretanto, acreditamos que a comparação das concentrações de grãos, tanto no grupo experimental como no controle, não possa ser feita entre tempos, uma vez que a contagem dos grãos foi feita numa região fixa (porção mais incisal da zona secretora), não levando em consideração a migração das células e respectivas matrizes, que ocorre em dentes de crescimento contínuo, como é o caso dos incisivos de camundongos. Portanto as células que estavam na citada região de contagem aos trinta minutos não são as mesmas ali encontradas duas horas, doze e vinte e quatro horas após.

Como a proposição deste trabalho é verificar se existem diferenças na incorporação de  $^3\text{H}$ -prolina nas células e matrizes estudadas entre animais dos grupos sialoadnectomizado e controle, a comparação da quantificação de grãos de prata deve ser feita entre os grupos para cada intervalo de tempo. Assim sendo, os resultados mostraram que o nº de grãos de prata por unidade de área ( $100 \mu\text{m}^2$ ) tanto nas células em estudo como em suas respectivas matrizes orgânicas foi significativamente maior em todos os intervalos de

tempo analisados, nos animais que tiveram suas glândulas salivares maiores removidas. Considerando que toda  $^3\text{H}$ -prolina presente no tecido encontra-se integrando moléculas proteicas (WARSHAWSKY et alii, 1963) pode-se deduzir que uma maior marcação radioautográfica refletiu um maior teor de proteínas.

Assim, nossos resultados permitem a análise de duas hipóteses: a primeira de que a síntese proteica estaria aumentada nos animais sialoadenectomizados, e a outra de que estaria havendo um decréscimo na velocidade de degradação das proteínas da matriz do esmalte (SEYER e GLIMCHER, 1971; SEYER, 1972; SEYER e VINCENT, 1972; FUKAE et alii, 1972; FUKAE e SHIMIZU, 1974; GUENTER et alii, 1975); e da pré-dentina (HIRSCHMAN e DZIEWIATKOWSKY, 1966; SUNDSTRÖM, 1971; BAYLINK et alii, 1972). Considerando a primeira hipótese ocorre então a seguinte pergunta: uma maior atividade na síntese proteica seria um fenômeno de ordem local ou esse processo estaria ocorrendo de forma generalizada em todo o organismo?

Quanto à possibilidade de estar havendo uma alteração localizada nas células em estudo, OGATA (1955) em um trabalho de revisão cita que a sialoadenectomia provocou, em ratos, alterações morfológicas na estrutura dos dentes. Segundo este autor, no órgão do esmalte dos incisivos, as alterações foram mais acentuadas nos ameloblastos secretores que apresentaram vacuolização, picnose e localização anormal do núcleo; dentina e cemento. MORANO (1976) também observou alterações morfológicas nos ameloblastos e odontoblastos de molares de ratos recém-nascidos sialoadenectomizados assim como nos filhotes de mães cujas glândulas salivares haviam sido removidas durante a prenhez. Contudo, podemos afirmar que,

ao nível de microscopia óptica, não pudemos constatar qualquer alteração nos tecidos dentais dos animais sialoadenectomizados quando comparados aos controles, confirmando os resultados obtidos por ÁVILA LIMA et alii (1983) que estudou a morfologia das células do órgão do esmalte de incisivos de camundongos sialoadenectomizados. Talvez essa controvérsia de resultados possa até ser explicada pela técnica histológica mais precisa utilizada por aquele autor e repetida por nós neste trabalho. Possíveis alterações ultraestruturais teriam de ser observadas a nível de microscopia eletrônica.

Quanto à outra possibilidade aventada do processo de síntese estar aumentado de forma generalizada em todo o organismo, não dispomos na literatura de trabalhos similares para podermos comparar os nossos resultados, portanto considerações serão feitas baseadas em dados obtidos de experimentos indiretamente relacionados ao por nós desenvolvido. GODLJOWSKY & CALANDRA (1960) realizaram sialoadenectomia das glândulas submandibulares e sublinguais de cães e constataram que a sensibilidade à insulina assim como a utilização de glicose nesses animais aumentaram. Os autores concluíram que essas glândulas, principalmente as submandibulares, elaboram um princípio ativo SII (submandibulary insulin inhibitor) que inibe a ação da insulina. Em outras palavras, com a remoção das submandibulares o fator SII estaria ausente e a insulina teria sua ação potencializada. Como se sabe "a insulina atua de forma generalizada sobre a membrana citoplasmática das células alvo causando-lhes alteração de permeabilidade que leva a um aumento da entrada não só de glicose mas também de aminoácidos, lipídeos, K<sup>+</sup> seguido por um aumento da biossíntese de citoplasma e de produtos de armazenamento"

(LENINGHER, 1984). Pelo exposto, tem-se que uma atividade celular maior da síntese proteica nos animais sialoadenectomizados seria deste modo justificável. Entretanto para uma afirmação conclusiva de que a biossíntese proteica estaria aumentada seria necessária a realização de um experimento com administração de  $^3\text{H}$ -prolina e sacrifício dos animais em tempos curtos, tais como 2 a 5 minutos, quando o aminoácido estaria ainda sendo incorporado ao nível de retículo endoplasmático rugoso (WARSHAWSKY, 1963; WARSHAWSKY e LEBLOND, 1963; WEINSTOCK e LEBLOND, 1974).

Outro aspecto a ser considerado é que as glândulas salivares maiores são órgãos onde ocorre intensa síntese de proteínas tanto de secreção exócrina como endócrina como: fator de crescimento nervoso (COHEN, 1960), fator de crescimento epidermal (COHEN et alii, 1962), fator de crescimento das células mesenquimais (ATTARDI et alii, 1967) e outros. No presente estudo, desde que a quantidade do composto radioativo injetado/g de peso do animal foi igual para os grupos controle e sialoadenectomizado, é de se esperar que nestes animais que tiveram suas glândulas removidas, o teor de  $^3\text{H}$ -prolina disponível para síntese é relativamente maior. Assim sendo, o resultado que obtivemos está de certa forma coerente com o esperado uma vez que, a um processo de síntese possivelmente aumentado, houve um "pool" maior de  $^3\text{H}$ -prolina disponível nos animais sialoadenectomizados.

A segunda hipótese sugerida de que estaria havendo um retardo na velocidade de degradação das proteínas da matriz com um conseqüente acúmulo delas, encontra apoio em estudos desenvolvidos por alguns autores, cujos resultados tentaremos correlacionar para explicar a hipótese acima.



Tem sido demonstrado que as glândulas salivares apresentam uma interrelação com outras glândulas de secreção interna. Por exemplo, NUNES (1970) mostrou que as glândulas tireóides sofreram regressão, apresentando um quadro histológico de hipotireoidismo, doze dias após a remoção das glândulas submandibulares de camundongos. Esses dados são coerentes com os resultados obtidos por BOWMAN (1960) e BOWMAN et alii (1962) que verificaram ser mais baixo o metabolismo basal de ratos submetidos a sialoadenectomia. Por outro lado, trabalhos realizados em tecido conjuntivo de pele, mostraram que animais submetidos a um quadro de hipotireoidismo apresentaram: a) quantidade de colágeno aumentada devido ao decréscimo na "degradação" do colágeno, dado constatado pela diminuição de excreção de prolina pela urina (FINK et alii, 1967); b) aumento no teor de ácido hialurônico também devido à não degradação desse composto (SCHILLER, 1963; e c) a degradação das proteínas teciduais, de modo geral retardada (WEINER & INGBAR, 1978). Essa hipótese, assim como outras, necessitam de confirmação experimental que deverão constituir temas para continuidade de nossas pesquisas.

RESUMO

## RESUMO

Estudaram-se os efeitos da remoção das glândulas salivares maiores sobre a incorporação de  $^3\text{H}$ -prolina pelos ameloblastos e odontoblastos de incisivos de camundongos. Animais sialoadenectomizados e controles receberam, por via intraperitoneal, uma dose única de 2,5  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -prolina/g de peso corporal, e sacrificados, aos pares, 30 min., 2 h, 12 h e 24 h após, por perfusão intracardíaca com p-formol deido a 4%, pH 7,3. Cortes de 1  $\mu\text{m}$  obtidos dos incisivos inferiores incluídos em polybed foram radioautografados.

A concentração de grãos de prata reduzida / 100  $\mu\text{m}^2$  sobre ameloblastos secretores, odontoblastos, assim como em suas respectivas matrizes, mostrou-se sempre maior nos animais sialoadenectomizados, nos diferentes intervalos de tempo. Entretanto, a distribuição percentual dos grãos de prata nos compartimentos intra e extracelulares foi sempre semelhante nos dois grupos.

Duas hipóteses foram aventadas para explicar o acúmulo de proteína(s) marcadas nos decíduos dentais dos animais sialoadenectomizados: a) uma atividade biossintética aumentada, devido a falta do fator submandibular inibidor da insulina (SII) e assim potencializando a ação da insulina, associado à disponibilidade de um "pool" maior de  $^3\text{H}$ -prolina nesses animais; b) uma diminuição da degradação proteica devida ao eventual hipotireoidismo, descrito na literatura, que ocorre em animais sialoadenectomizados.

SUMMARY

## SUMMARY

The effects of removing the major salivary glands on the uptake of  $^3\text{H}$ -proline by ameloblasts and odontoblasts of mice incisors were studied. Sialoadenectomized and controls animals received, intraperitoneally, a single dose of 2.5  $\mu\text{Ci/g}$  of body weight of  $^3\text{H}$ -proline and sacrificed 30 min., 2 h, 12 h and 24 h after by perfusion with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer at pH 7.3. 1  $\mu\text{m}$  thick sections from lower incisors embedded in Poly-Bed were radioautographed.

The concentration of the reduced silver grains / 100  $\mu\text{m}^2$  on secretory ameloblasts and odontoblasts, as well as young enamel and dentine, was always higher, at each time interval, in the sialoadenectomized animals. However, the percentual distribution of the silver grains on the intracellular and extracellular compartments was always similar in both groups.

Two hypothesis were suggested to explain the increased concentration labeled of proteins observed in the forming dental tissues of the sialoadenectomized animals: a) an increase of protein biosynthesis, due the lack of the submaxillary insulin inhibitor and so insulin inhibitor and so potentiating the action of insulin, associate with a bigger pool of  $^3\text{H}$ -proline in such animals; b) a decrease in protein breakdown due to hypothyroidism which, as described in literature, eventually occurs in sialoadenectomized animals.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTARDI, D.C.; SCHLESINGER, M.J.; SCHELESINGER, S. Submaxillary gland of mouse: properties of a purified protein affecting muscle tissue in vitro. Science, 156: 1253-5, 1967.

ÁVILA LIMA, S.; BARRICHELLO, T.L.S.; BLUMEN, G. Estudo morfológico das células do órgão odontogênico e do esmalte de incisivo inferior de camundongos sialoadenectomizados. Ciênc. Cult., 35: 815-22, 1983.

BAYLINK, D.; WERGENDAL, J.; THOMPSON, E. Loss of protein polysaccharides at sites where bone mineralization is initiated. J. Histochem. Cytochem., 20: 279-92, 1972.

BOWMAN, R. Basal metabolic rates of salivariadenectomized, salivary-duct-ligated and control rats. J. dent. Res., Jul.-Aug.: 706, 1960.

\_\_\_\_\_ ; MUHLER; SHAFER. Comparison of basal metabolic rates in rats subjected to salivariadenectomy or salivary duct ligation. Oral Surg., Nov.: 385-8, 1962.

COHEN, S. Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocitotoxic antiserum. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 46: 306-11, 1960.

\_\_\_\_\_ et alii. Isolation of a mouse sub maxillary gland

protein incisor eruption and eyelid opening in newborn animal. J. biol. Chem., 237(5): 1552-62, 1962.

FINK, C.W.; FERGUSON, J.L.; SMILEY, J.D. Effect of hiperthyroidism and hipothyroidism on collagen metabolism. J. Lab. clin. Med., 69: 950-9, 1967.

FLEMING, H.S. Parotin and growth centers of femurs and incisors in mice. J. dent. Res., 38: 374-85, 1959.

FLEMING, H.S. The effect of salivary gland extracts on tooth development. p.195-200. (Apresentado ao Orca Congress , 9., Paris, 1962).

FUKAE, M. et alii. Studies on the biosynthesis of enamel proteins of rat by utilization of <sup>3</sup>H-proline. J. dent. Res., 51: 1298, 1972. (Abstract).

\_\_\_\_\_ & SHIMIZU, M. Studies on the proteins of developing bovine enamel. Archs oral Biol., 19: 381-6, 1974.

GODLOWSKY, Z. & CALANDRA, J.C. Salivary glands as endocrine organs. J. appl. Physiol., 15: 101-5, 1960.

GUENTER, H. et alii. Enamel proteins: identification of epithelial specific differentiation products. In: SLAVKIN, H.C.; GREULICH, R.C., eds. Extra celular matrix influences on gene expression. New York, Academic, 1975. p.387-98.



- HIRSCHMAN, A. & DZIEWIATKOWSKY, O.D. Proteinpolysaccharides loss during endochondral ossification: Immunochemical evidence. Science, 154: 393-5, 1966.
- ITO, Y. Biochemical studies on salivary gland hormone. Endocr. Jap., 1: 1-50, 1954.
- \_\_\_\_\_ & MIZUTANI, A. Studies on the salivary gland hormone. XIII- Purification of parotin, the pH 5,4 precipitate from bovine parotid glands by fractional precipitation with rodicen sulfate. J. Pharm. Soc. Japan., 72: 239-48, 1952. Apud Endocr. Jap., 1: 1-50, 1954.
- KOPRIWA, B.M. & LEBLOND. Improvements in the coating technique of radioautography. J. Histochem. Cytochem., 10:269-78, 1962.
- LEHNINGER, A.L. Biochemistry: the molecular basis of cell structure and function. 2.ed. New York, Worth, 1976. p.821.
- LIMA, J.E.O. Influência das glândulas salivares no irrompimento, crescimento e calcificação dos dentes incisivos e molares de ratos. Bauru, 1975. [Tese(mestrado)-FOB-USP].
- LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. biophys. biochem. Cytol., 9: 409-14, 1961.
- MARUYAMA, M. Chemical studies on the substance which is

- contaminated in the parotid gland and influences upon the calcium content of the blood. J. Biochem., 37: 1, 1950. Apud ORCA CONGRESS, 9., Paris, 1962. Proceedings. Oxford, Pergamon, 1963. p.195-200.
- MORANO JUNIOR, M. Efeitos da extirpação bilateral das glândulas salivares sub-mandibulares e sub-linguais nos ameloblastos e odontoblastos de molares de ratos jovens. Piracicaba, 1976. [Tese(doutorado)-FOP-UNICAMP].
- NUNES, J.M.S. Effect of removal of submaxillary glands on the thyroid glands. J. dent. Res., 49: 454, 1970.
- OGATA, A. et alii. Chemical and pathological studies on the isolation of salivary hormone. Igaku-to-Seibutsugaku, 5: 253-7, 1944. Apud Endocr. jap., 2: 247-61, 1955.
- OGATA, T. The internal secretion of salivary gland. Endocr. jap., 2: 247-61, 1955.
- QUINTARELLI, G.; GORDON, R.B.; CHAUNCEY, H.H. The effect of parotid gland extract on the hard and soft tissues of growing mice. Oral Surg., Oral Med., Oral Pathology, 13: 875-7, 1960.
- SASAKI, T. Chondrodystrophia foetalis. Acta Paediat., 57: 584, 1953. Apud Annls N.Y. Acad. Sci., 85: 228-310, 1960.
- SATO, T. Effects of parotid gland extract upon calcification of dentin of rabbit. Gunma J. med. Sci., 2: 183-5, 1953.

SCHILLER, S. Mucopolysaccharides in relation to growth and thyroid hormones. J. chron. Dis., 16: 291-304, 1963.

SEYER, J. Evolution of mineralizing tissues. In: SLAVKIN, H.C. The comparative molecular biology of extracellular matrices. New York, Academic, 1972. p.273.

\_\_\_\_\_ & GLIMCHER, M.J. The isolation of phosphorylated polypeptide components of the organic matrix of embryonic bovine enamel. Biochem. Biophys. Acta, 236: 279-91, 1971.

\_\_\_\_\_ & VINCENT, E. Evolution of mineralizing tissues. In: SLAVKIN, H.C. The comparative molecular biology of extracellular matrices. New York, Academic, 1972. p.276-89.

SIERVE, R. & DAL MASO, L. La parotina: ormone delle ghiandole salivari. Riv. ital. Stomat., 17: 255-9, 1962. Apud Dent. Abstr., 8: 173, 1963.

SUNDSTRÖM, B. New aspects on the utilization of inorganic sulphate during dentin formation. Histochemie, 26: 61-6, 1971.

TEIXEIRA, D.; VIZIOLI, M.R.; GUIMARÃES, A. Effects of sialoadenectomy and parotin hormone on the development of rat sponge-induced granulation tissue. Acta anat., 94: 22-9, 1976.

VIEIRA, S. Introdução a bioestatística. Rio de Janeiro, -

Campus, 1981. 294p.

WARSHAWSKY, H. Synthesis and migration of enamel matrix protein as studied by radioautography. Mac Gill dent. Rev., 26(2): 24-8, 1963.

\_\_\_\_\_ ; LEBLOND, C.P.; DROZ, B. Synthesis and migration of proteins in the cells of the exocrine pancreas as revealed by specific activity determination from radioautographs. J. Cell. Biol., 16: 1-23, 1963.

\_\_\_\_\_ & MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. J. Histochem. Cytochem., 15: 542-9, 1967.

WEINSTOCK, M. & LEBLOND, C.P. Formation of collagen. Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol., 33(5): 1205-18, 1974.

WERNER, S.C. & INGBAR, S.H. The thyroid a fundamental and clinical text. Maryland, Harper C. Row, 1978. p.873-5.