

CELIA REGINA SCHIAVINATO

ULTRACITOARQUITETURA DOS AMELOBLASTOS DE MOLARES
DE COBAIA (Cavia porcellus, L.) DURANTE AS VÁRIAS
FASES DO SEU CICLO VITAL

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia e Patologia Buco-Dental da
Faculdade de Odontologia de Piraci
caba da Universidade Estadual de Cam
pinas, para obtenção do Grau de Mes
tre em Histologia e Embriologia.

P I R A C I C A B A

1 9 7 9

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

aos meus pais Evaristo e Magdalena que, além de serem a própria razão da minha existência, não têm medido esforços para torná-la muito agradável e produtiva com as suas demonstrações de carinho, dedicação e trabalho. A eles devo o que de positivo possa ter em minha personalidade.

aos meus irmãos Antônio Silvío, Ivone e Antonio Jorge pela ternura com que me cercam,

aos meus sobrinhos Gustavo e Leandro, pela alegria que acrescentaram à nossa vida em família,

... dedico este trabalho.

... ao Professor Doutor

GUILHERME BLUMEN

o nosso sincero agradecimento pela oportunidade, pelos conhecimentos, transmitidos com inteligência e dedicação, contribuindo de forma decisiva, para a nossa iniciação científica.

A G R A D E C I M E N T O S

- ... ao Professor Doutor Antônio Carlos Neder, atual Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas e ao Professor Doutor José Merzel, Diretor à época em que iniciamos o curso.
- ... ao Professor Doutor Antônio Carlos Ferraz Corrêa, Chefe do Departamento de Biologia e Patologia Buco-Dental e Coordenador dos Cursos de Pós-graduação da F.O.P.-UNICAMP.
- ... ao Sr. Paulo do Amaral, Técnico em Histologia; à Sra. Ingra Maria Vitti Filetti e ao Sr. Messias Salvador de Lima, Técnicos em Microtomia para Microscopia Eletrônica, com quem aprendi algumas técnicas básicas para obtenção de cortes para M.O. e M.E.
- ... ao C.D. José Américo de Oliveira, colega de curso, pelo auxílio em relação à técnica cirúrgica.
- ... ao Dr. Cássio Odinei Garcia Munhoz, Professor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela sua ajuda e apoio constantes e por ter se encarregado da nossa orientação durante a permanência do Dr. Guilherme Blumen nos Estados Unidos.
- ... ao CNPq pela Bolsa de Estudos a nós outorgada
- ... ao Prof. Dr. Antônio Sesso, Professor Adjunto do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da U.S.P., por colocar seu laboratório à disposição e, ao Sr. Hélio Corrêa, por realizar a primeira série completa de cortes ultra-finos.
- ... à C.D. Darcy de Oliveira Tosello, do Departamento de Biologia e Patologia Buco-Dental, pelas outras séries de cortes ultra-finos, negativos e fotografias.
- ... ao C.D. José Ranali, Coordenador do "Centro de Recursos da Aprendizagem" (CRA) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, por ter colocado o CRA à nossa disposição.

- ... ao Sr. José Vitti e Diógenes Banzatto, pelos excelentes trabalhos de montagem e reprodução fotográficas.
- ... ao Prof. Algemiro Coelho Ramos, pela revisão do vernáculo.
- ... ao Sr. Ulysses de Oliveira Martins, pelos excelentes serviços datilográficos.
- ... à Sra. Ivany do Carmo Guidolin Gerola, Bibliotecária da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelo valioso auxílio na elaboração das referências bibliográficas.
- ... ao Sr. Sebastião Rodrigues de Barros, pelos serviços de encadernação.
- ... a todos os meus professores que pacientemente me prepararam para atingir esta etapa.
- ... a todos os meus colegas de curso que, com suas demonstrações diárias de amizade, estímulo e carinho, tornaram esta experiência muito interessante e agradável.
- ... a todos quantos direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Í N D I C E

INTRODUÇÃO	Pag. 01
MATERIAL E MÉTODOS	Pag. 02
RESULTADOS	Pag. 05
DISCUSSÃO	Pag. 77
RESUMO E CONCLUSÕES	Pag. 106
BIBLIOGRAFIA	Pag. 112

INTRODUÇÃO

Nessas décadas que se seguiram aos trabalhos pioneiros de dente a nível ultraestrutural (Boyle e col, 1946; Nylen e Scott, 1958, 1960), os mais variados aspectos da odontogênese têm sido explorado ao Microscópio Eletrônico (M.E.).

Dentes de crescimento contínuo tem se mostrado um modelo biológico bastante útil para as tentativas de elucidação de diversos fenômenos do campo da Biologia Celular, v. g., proliferação (Hwang e col. 1966), interação de células heterotípicas (Slavkin e col. 1969a, 1969b, 1975; Katchburian e Burgess, 1977), diferenciação (Croissant e col., 1975), bem como biossíntese (Matthiessen e von Büllow, 1969; Leblond e Warshawsky, 1979; Blumen, 1970, 1977, 1979) e secreção de matriz extracelular e mineralização (Matthiessen e von Büllow, 1969; Leblond e Warshawsky, 1979), dentre outros.

Estes dentes apresentam a vantagem de permitirem, num único corte longitudinal, o estudo das diferentes etapas da odontogênese, a qual inclui a amelogênese.

O conjunto de estruturas de origem ectodérmica responsáveis pela formação do esmalte é denominado órgão do esmalte. De todos os tipos de células que o formam, as que têm função mais claramente estabelecida são os ameloblastos aos quais se atribui a elaboração da matriz orgânica durante o processo de amelogênese.

Molares de cobaia, dentes que também apresentam crescimento contínuo, têm sido relativamente pouco estudados. Sobre eles foram feitos estudos embriológicos e morfológicos a nível de microscópio óptico (Santoné, 1933, 1934; Harman e Smith, 1936; Parvis e Roncoroni, 1950; Hunt, 1959). Em relação aos ameloblastos fizeram-se estudos histofisiológicos (Wassermann, 1944) e radioautográficos (Hunt e Paynter, 1963; Blumen, 1970, 1977, 1979; Blumen e Merzel, 1972, 1973, 1976). À exceção do trabalho de Boyle e col. (1946), sobre esmalte humano e de cobaia, não encontramos, na literatura, nenhum outro trabalho a nível ultraestrutural, quer das estruturas de tais dentes, quer dos ameloblastos, em particular, de modo que elegemos os molares de cobaia para estudarmos seus ameloblastos nas diferentes etapas do seu ciclo vital.

MATERIAL E MÉTODOS

Para maior clareza sobre a continuidade do procedimento utilizado achamos preferível descrever o aparato usado para a fixação por perfusão no começo deste capítulo.

Uma agulha de 30 x 8 mm, reduzida a 1 cm de comprimento, foi conectada, através de um tubo de Venopack, a uma garrafa de volume igual a 1 litro contendo soro fisiológico heparinizado a 1 ml/1000, aquecido a 40°C e, em seguida, a outra contendo solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato neutro (pH 7,0 a 7,4) preparado segundo Warshawsky e Moore (1967), aquecida à mesma temperatura.

O conjunto preparado para a perfusão foi montado de tal modo que os frascos, contendo quaisquer dos líquidos, ficam cerca de 1 m acima da área de operação. Com isso pretendia-se que os líquidos penetrassem no animal por gravidade e por pressão negativa, causada pelo batimento cardíaco, mas sem provocar lesões celulares.

Cobaias com dois dias de vida e cerca de 80 g de massa foram anestesiadas com éter sulfúrico, após o que o tórax foi cuidadosa e rapidamente aberto, a fim de expor o coração.

A agulha foi, então, introduzida no ventrículo esquerdo através de uma delicada fenda feita com tesoura. O comprimento da agulha usada evitava que ela fosse além do ventrículo e com o diâmetro de sua luz conseguia-se um fluxo relativamente fácil de qualquer das duas soluções. Para evitar que a agulha fosse empurrada para fora do ventrículo foi enrolada fita adesiva logo após a região em bisel, dando-se-lhe a configuração de fuso.

Cuidando-se para que o animal se mantivesse anestesiado, porém vivo, o maior tempo possível, a perfusão foi realizada através do ventrículo esquerdo, com uma pequena incisão na aurícula direita para que o fluido percorresse os vasos sanguíneos de modo contínuo.

O processo foi iniciado com o soro fisiológico heparinizado (por aproximadamente 10 minutos) para remoção total do sangue, a fim de facilitar a posterior fixação com glutaraldeído (cuja enérgica ação provoca a quase imediata parada cardíaca e a fixação de todas as células, a sua passagem), por 20 a

30 minutos.

As mandíbulas foram retiradas, separadas em hemi-mandíbulas e imersas na mesma solução de glutaraldeído, para uma pós-fixação, durante 4 horas.

Em seguida as peças foram retiradas do fixador e amarradas em bolsas de gaze que foram suspensas em EDTA dissódico-(ácido etileno diamino tetracético) a 4,13% (Warshawsky e Moore, 1967).

A descalcificação das estruturas mineralizadas do dente, nesta solução a 4°C, realizada com trocas diárias do líquido, requereu de 28 a 32 dias para os molares de cobaia utilizados neste experimento. O grau de desmineralização era testado no incisivo, através de cortes, realizados periodicamente a partir do 15º dia, com uma lâmina de barbear nova. Considerava-se que a desmineralização estava completa quando o dente não oferecia resistência ao corte.

Após a desmineralização o material foi lavado, por 48 horas em tampão fosfato isotônico a 4°C, com mudanças do líquido a cada 12 horas.

Em seguida o segundo molar de cada hemi-mandíbula foi separado (dentro do seu suporte de osso alveolar), cortado longitudinalmente no sentido mesio-distal sob o pequeno aumento de uma lupa estereoscópica, usando-se, para isso, uma lâmina de barbear nova e tomando-se o devido cuidado para não se lesionar os tecidos, por pressão.

As peças reduzidas e lavadas foram pós-fixadas com solução a 1% de tetróxido de ósmio a 4°C, por 4 horas.

Desidratação por acetona em soluções de concentrações crescentes (por 1/2 a 2 h em cada solução), infiltração e inclusão em Epon foram feitas como descrito por Luft (1961), exceto que os tempos máximos de cada estágio do procedimento histológico foram quadruplicados e que o Epon foi preparado com base em tabela especial que leva em conta o cálculo das porcentagens exatas de anidrido e resina por peso, isto é, a proporção molar anidrido-epoxi (Burke e Geiselman, 1971).

Cortes semi-finos, corados com Azur II serviram para a delimitação das áreas, de acordo com Blumen (1970). Áreas selecionadas, particularmente do órgão do esmalte localizado no lado mesial ou distal, foram depois aparadas em direção longitudinal.

Em seguida, com auxílio de um ultramicrotomo Porter-Blum MT₂ foram obtidos cortes ultrafinos (ouro-pálido ou prata da escala Sorvall de cores de interferência) das áreas selecionadas, apanhados em telas de cobre de 200 a 300 "mesh" e corados com soluções saturadas de acetato de uranila seguida da de citrato de chumbo, por trinta e quinze minutos respectivamente. As telas foram, a seguir, lavadas em água destilada, examinadas em microscópio eletrônico modelo EM₁₀ da Zeiss e fotografadas.

RESULTADOS

Em estudos de anatomia comparada observa-se que a natureza sabiamente tende a conservar estruturas biológicas bem sucedidas. Os dentes de crescimento contínuo de roedores e la gomorfos parecem contar entre estas estruturas e talvez seja este o motivo porque os nossos resultados são, em sua maioria, muito semelhantes e comparáveis, portanto, aos obtidos para o mesmo material (molares) ou similares (outros tipos de dentes) de outros animais.

Na introdução deste capítulo de resultados - achamos oportunos alguns esclarecimentos a respeito dos critérios que adotamos para seleção dos compartimentos, nomenclatura, localização de organelas celulares, etc.

Quanto às células responsáveis pela produção da matriz do esmalte

O órgão do esmalte é constituído por vários tipos de células dentre as quais estudaremos os ameloblastos. Conquanto alguns estudiosos afirmem, com razão, que estas células, no começo do compartimento embrionário, são células derivadas do ectoderma, indistinguíveis das demais do epitélio externo e que posteriormente se arranjam como células do epitélio interno, na curvatura cervical e só então passam a ameloblastos, para facilidade de estudo, uma vez que este trabalho é excessivamente prolífero em nomes, adotaremos apenas o nome ameloblastos embrionários para as células do compartimento mais apical do órgão do esmalte. Este critério se justifica porque o nosso estudo desta zona concentra-se sobre as células oclusalmente colocadas, em relação à curvatura cervical.

Não destituídos de razão, outros tantos pesquisadores defendem a nomenclatura amelocitos para as células totalmente diferenciadas o que a tornaria utilizável, neste trabalho, para as células em estágio secretor e pós-secretor. Ainda por comodidade, no entanto, e para facilitar a consulta de eventuais leitores leigos, adotaremos os nomes ameloblastos secretores e ameloblastos pós-secretores.

Em resumo: os ameloblastos recebem vários nomes tais como epitélio interno, pré-ameloblastos, ameloblastos, ameloci

tos secretores, amelocitos reduzidos, etc. Como esses nomes to dos referem-se à mesma célula em diferentes estágios de seu ci clo vital resolvemos adotar a designação geral de ameloblastos, acompanhada de adjetivo referente ao seu estágio funcional. As sim nos referiremos a ameloblastos embrionários, ameloblastos em diferenciação, ameloblastos secretores e ameloblastos pós-secretores.

Quanto à localização de estruturas intrameloblásticas

Polaridade efetiva só a possuem as células secretoras, mas para evitar, nos outros compartimentos, a exaustiva repeti ção das expressões "voltada para o estrato intermédio" ou "vol tada para os odontoblastos" usadas freqüentemente no comparti mento embrionário, adotaremos, para a região entre o núcleo e o estrato intermédio, a denominação "infra-nuclear"; "nuclear" para a região ao redor do núcleo e "supra-nuclear" para o cito plasma restante.

Quanto às células vizinhas

No compartimento embrionário as células responsáveis pela síntese da dentina são praticamente indistinguíveis das demais células da papila dental de que apenas a camada externa de células diferenciar-se-á em odontoblastos. Para facilidade usaremos para tais células o nome odontoblastos desde o princi pio.

Por outro lado, no final do compartimento embrionário, início do de diferenciação, as células papilares em contacto com os ameloblastos formam uma camada de células achatadas ou cuboidais conhecida como estrato intermédio. Conquanto este ar ranjo ainda não esteja estabelecido no começo do compartimento embrionário e se desorganize um pouco no pós-secretor, por con veniência chamaremos sempre de estrato intermédio a esta cama da de células.

Orientação relativa ao dente como um todo

Chamaremos apical qualquer posição próxima à curvatu ra cervical e oclusal a qualquer que se aproxime da gengiva.

Quanto aos "inserts"

Este recurso de fotografia é usado comumente para mos trar ampliações de determinadas estruturas. Em nosso trabalho,

porém, correspondem a detalhes da mesma região, freqüentemente com o mesmo aumento.

Quanto às legendas

Dada a universalidade de algumas siglas inglesas de abreviaturas de legendas para estruturas biológicas resolvemos generalizar o uso do inglês para esta parte do trabalho. Tal atitude tem em vista também as possíveis publicações futuras em revistas especializadas.

COMPARTIMENTO EMBRIONÁRIO

Arranjados em diferentes alturas e com poucas estruturas juncionais, os ameloblastos, inicialmente baixos, tendem a se alongarem à medida que se aproximam da zona de diferenciação (Fig. 2 a 4).

As freqüentes figuras de mitose permitem-nos considerar, morfologicamente, dois tipos de ameloblastos, neste compartimento: ameloblastos interfásicos (Fig. 2 a 8 e 10) e ameloblastos mitóticos (Fig. 3 e 4).

Ameloblastos interfásicos

O núcleo, ligeiramente alongado na maioria dos cortes, ocupa grande parte do volume celular e se localiza centralmente (Fig. 2 e 3). Está limitado por u'a membrana com estrutura trilaminar.

Em quaisquer núcleos interfásicos, a maior parte do volume é preenchido por um material que aparece como um grânulo grosseiro.

Além desse material, notam-se regiões heterocromáticas adjacentes à lâmina interna da membrana nuclear. Em alguns núcleos não se observa nucléolo (Fig. 3), mas na maioria deles pode-se observar um (Fig. 3) e, às vezes, dois (Fig. 3 e 4).

Particularmente entre essas regiões heterocromáticas são notáveis muitos poros na membrana nuclear (Fig. 2 a 4 e 6) e à frente deles, no lado voltado para o citoplasma, muitas vezes são notadas estruturas densas, aproximadamente esféricas.

Ribossomas livres são muito abundantes por todo o citoplasma, porém são raros aqueles associados à face externa do retículo endoplasmático, de tal modo que os perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) quase não aparecem (Fig. 2 a 4).

Um pouco poucas estruturas eletrôn-densas, semelhantes a ribossomas, aparecem ligadas à capa externa da membrana nuclear (Fig. 3 e 4).

O complexo de Golgi, não muito desenvolvido, em geral dispõe-se longitudinalmente na estreita faixa de citoplasma lateral ao núcleo (Fig. 4).

Mitocôndrias, de formas variadas e relativamente pou

co abundantes, distribuem-se por todo o citoplasma (Fig. 2 a 8 e 10), notando-se, às vezes, ligeiro acúmulo dessas organelas na face voltada para o estrato intermédio (Fig. 3) e, mais raramente, na voltada para as células da papila dental, futuros odontoblastos (Fig. 5).

A região de contato entre os ameloblastos e as células do estrato intermédio exhibe conformações diferentes à medida que caminhamos para o sentido oclusal. Assim, mais próximo à curvatura cervical, as membranas são lisas (Fig. 2); conforme se dirigem para a zona de diferenciação vão se enriquecendo com microvilosidades (comparar Fig. 2 e 3 com a Fig. 9), enquanto que os ameloblastos vão exibindo um abaulamento progressivo dessa região, que assume o aspecto de um bulbo (Fig. 3).

Quanto ao contacto entre um ameloblasto e outro observa-se que alguns ameloblastos aparecem muito juntos enquanto outros estão separados por espaços intercelulares relativamente grandes para onde, muitas vezes, projetam-se microvilosidades (Fig. 4).

Estruturas juncionais, do tipo desmossomas, aparecem nas paredes laterais dos ameloblastos (Fig. 4 e 6) e entre estes e as células do estrato intermédio (Fig. 3); no limite com a lâmina basal, o que aparece são hemidesmossomas (Fig. 5, 8 e 10).

Em alguns locais a membrana de um ameloblasto imbrica-se com a do vizinho, numa estrutura semelhante a um bulbo (Fig. 10).

A primeira trama terminal que aparece é aquela voltada para o estrato intermédio. Constitui-se de um conjunto de fibrilas entrelaçadas no citoplasma que parecem dirigir-se para uma região da membrana lateral que lembra o complexo de junção descrito como "zonula adherens" (ZA). Além dela, isto é, entre a trama terminal e o estrato intermédio é que a membrana ameloblástica sofre o abaulamento (Fig. 3). No compartimento embrionário já se observam uns raros e incipientes ensaios de trama terminal, no citoplasma voltado para a lâmina basal (Fig. 5).

Em alguns locais, no espaço extracelular entre ameloblastos adjacentes, acumula-se um material eletrôn-denso de textura grosseira (Fig. 6).

No citoplasma entre o núcleo e a membrana voltada pa

ra a lâmina basal são notáveis alguns feixes de tonofilamentos (Fig. 10), algumas fibrilas que têm a mesma eletrondensidade da lâmina basal que, na zona embrionária mantêm-se intacta, mesmo nos locais onde a membrana ameloblástica descreve ondulações ou pequenas projeções (Fig. 5 a 8 e 10).

Por outro lado, projeções de células da papila dental já adentram o espaço entre elas e os ameloblastos. Esse espaço contém, ainda, um material amorfo ou, poder-se-ia dizer, finamente granulado junto de fibrilas de diversos aspectos quais sejam: lisas (F_3 da Fig. 6) estriadas com cadeias laterais (F_1 da Fig. 6). Finalmente notam-se vesículas semelhantes às vesículas encapadas (Fig. 5) e perfis geralmente arredondados das células da papila, cortados obliqua ou transversalmente, aproximando-se da lâmina basal sem, contudo, tocá-la.

Ameloblastos em mitose

Nos ameloblastos que estavam em estágio avançado de divisão, em metáfase por exemplo, eram bastante evidentes os cromossomas; havia um aumento da largura das células e, no citoplasma observa-se às vezes, uma disposição de microtúbulos que lembra parte do fuso mitótico como é descrito tradicionalmente.

COMPARTIMENTO DE DIFERENCIAÇÃO

Os ameloblastos encontrados neste compartimento mostram uma certa polaridade que se acentua à medida que se caminha para a porção oclusal do dente.

Não se observam, neste compartimento, as figuras de mitose tão comuns no embrionário de tal modo que se têm apenas ameloblastos interfásicos em estágio mais adiantado de diferenciação, ou menos.

Região "Infranuclear"

Em relação às células tipicamente embrionárias, diminui um pouco a quantidade de ribossomas livres, conquanto ainda não fossem muito freqüentes os associados a membrana formando RER, nesta altura da célula ameloblástica (Fig. 9)

As mitocôndrias formavam aglomerados mais ou menos numerosos nesta região (Fig. 9).

A barra terminal infranuclear tem o seu característi

co aspecto de trama citoplasmática fibrosa relacionada a estruturas com aspecto de "ZA" das membranas laterais (Fig. 9).

Na porção abaulada do ameloblasto, entre a barra terminal e a membrana ameloblástica voltada para o estrato intermediário, vêem-se apenas ribossomas livres, raros corpos eletrondensos, além de algumas vesículas encapadas, a maioria das quais relacionadas à membrana (Fig. 9).

Região "Nuclear"

Morfologicamente esta região não difere da correspondente, nos ameloblastos interfásicos, do compartimento anteriormente descrito, a não ser pela tendência de o núcleo ocupar uma posição cada vez mais basal, numa célula que tem o seu volume "supra-nuclear" paulatinamente aumentado (Fig. 9 e 15).

Em algumas micrografias (Fig. 14) nota-se a continuidade entre a lâmina externa da membrana e o RER.

Região "Supra-nuclear"

O citoplasma apresenta-se, já, bastante rico em estruturas tais como uma grande quantidade de ribossomas livres (Fig. 11 a 13 e 15), além de alguns perfis de RER nos ameloblastos em estágio avançado de diferenciação (Fig. 15). Material de textura granular acumula-se, às vezes, nas cisternas do RER (Fig. 15).

Fibrilas ou filamentos (Fig. 11 a 13 e 15), feixes de tonofilamentos (Fig. 13) e microtúbulos (Fig. 11 a 13) formam uma espécie de citoesqueleto ameloblástico.

A trama terminal "supra-nuclear", que não aparecia a não ser incipientemente em algumas células do compartimento embrionário, desenvolve-se paulatinamente à medida que a diferenciação evolui. Assim, em ameloblastos menos diferenciados (Fig. 11 e 12), aparece como uma massa fibrosa difusa que não aparenta estar ligada à membrana celular lateral, ou, então, como uma estrutura cônica fibrosa (Fig. 11 e 13). Nas micrografias de ameloblastos em estágio mais adiantado de diferenciação ela adquire aquele seu característico aspecto de trama citoplasmática que parece relacionar-se com uma região da membrana celular com características de "ZA" (Fig. 15).

Em algumas células, microtúbulos e feixes de microfili

brilas e a trama terminal "supranuclear" interpenetram-se (Fig. 11 a 13). Grânulos densos simples ou em cadeia podem ser vistos tanto ao nível (Fig. 12) como acima (Fig. 15) ou abaixo (Fig. 12 e 13) da trama terminal. Além dos grânulos alongados (Fig. 12) são visíveis aglomerados de vesículas encapadas (Fig. 12), corpos multivesiculados (Fig. 15) e outras estruturas de aspecto granular ou vesicular menos característicos (Fig. 11 e 15), acima da trama citoplasmática "supranuclear".

No citoplasma entre o núcleo e a trama terminal "supranuclear" notam-se, às vezes, aglomerados de mitocôndrias (Fig. 15). Material de textura fina aparece em algumas vesículas no citoplasma supranuclear de ameloblastos bastante diferenciados (Fig. 13).

Característica marcante desta região é o desenvolvimento crescente das projeções da membrana celular apical, verdadeiros processos ameloblásticos (futuros processos de Tomes), os quais rompem a lâmina basal (Fig. 11 e 12) que finalmente desaparece (Fig. 13 e 15).

Os processos celulares oriundos dos ameloblastos e odontoblastos encaminham-se para o espaço que separa estes dois estratos celulares, chegando a aproximarem-se até a uma distância mínima visível de 250Å (Fig. 11). No espaço limítrofe entre as camadas de ameloblastos e odontoblastos há um aumento na quantidade de fibras, tanto mais notável quanto mais caminhamos para oclusal (comparar Fig. 10 com Fig. 15), aparecendo, ainda, dois novos componentes: um material de textura fina, e fibras com aparência semelhante à das colágenas (CO), em pequena quantidade na parte média (Fig. 15) e mais numerosas no terço oclusal (Fig. 13) do compartimento.

CONTACTOS CELULARES

Os ameloblastos em diferenciação aparentam estar mais próximos uma vez que não há muitos e nem grandes espaços intercelulares (Fig. 11 a 15). Algumas vezes projetam-se microvilosidades nos espaços existentes (Fig. 13).

Em alguns desses espaços notam-se material de textura fina (Fig. 13) ou grosseira (Fig. 15). Vesículas com material de textura fina (Fig. 13) ligam-se, às vezes, através de canais, à membrana lateral ou à apical (voltada para a matriz).

Desmossomas são mais comuns na porção de membrana voltada para o estrato intermédio. Estruturas semelhantes a hemidesmossomas aparecem em toda a lâmina interna da membrana ameloblástica "supranuclear". "Zonulas aderentes" (ZA) aparecem bem desenvolvidas nas membranas laterais, tanto "infra" como "supranuclearmente".

COMPARTIMENTO SECRETOR

Os ameloblastos secretores aparecem como células altas, estreitas e marcadamente polarizadas. O desenvolvimento das estruturas internas dos ameloblastos descreve uma curva ascendente até aproximadamente os dois terços apicais deste compartimento, onde atinge um pico para decair num estágio adiantado (aproximadamente no último décimo) de secreção. Isto parece ocorrer em maior ou menor grau para todas as estruturas da célula.

Região "Infranuclear"

Uma trama citoplasmática mais ou menos aparente, constituída por um agregado de filamentos muito finos, irregularmente densa, parece estar relacionada com estruturas da membrana lateral semelhantes a "ZA" (Fig. 16 a 19). O conjunto trama terminal mais "ZA" forma, nessa região, a barra terminal basal ou infranuclear que permite a delimitação de dois "compartimentos": um "mitocondrial" e um "bulbar". O bulbo resulta do abaulamento da membrana celular voltada para o estrato intermédio, abaulamento este que se acentua até uma certa altura (comparar Fig. 16 com 19A e 19B) e involuiu no fim deste compartimento (Fig. 17).

No "compartimento bulbar" notam-se muitos ribossomas livres (Fig. 16 a 19B), feixes de tonofibrilas (Fig. 19), raras mitocôndrias (Fig. 18B), além de vesículas encapadas que foram vistas abrindo-se, às vezes, para o espaço extracelular em relação com o estrato intermédio (Fig. 17, 18B e 19B); outras vezes elas apareciam apenas próximas à membrana, porém dentro da região bulbar (Fig. 16, 17 e 19 A e B).

O "mitocondrial", além do grande número de mitocôndrias intimamente agrupados (Fig. 16 a 19), apresenta segmen

tos curtos de RER (Fig. 18_A e 18_B) dentro dos quais observa-se, às vezes, um material eletrôn-denso (Fig. 16); só muito raramente este material aparece em estágio avançado de secreção (Fig. 19_B).

Microtúbulos e tonofibrilas aparecem mais ou menos axialmente por todo o citoplasma. Lateralmente, logo abaixo da membrana ameloblástica, em toda a extensão da célula, nota-se, em algumas micrografias (Fig. 18_A, 18_B e 19_B), um extenso feixe de fibrilas que se estende em direção à região supranuclear.

No espaço intercelular entre os ameloblastos e o estrato intermédio subjacente é comum uma interdigitação imperfeita de microvilosidades que se originam de ambos os tipos de células. Dado que o imbricamento não é perfeito, notam-se espaços relativamente grandes entre esses dois estratos celulares (Fig. 17 e 19_B). Às vezes são notáveis vesículas e material amorfo nestes espaços (Fig. 18_B).

Muitos desmossomas (Fig. 17, 18_B e 19_B) e algumas figuras que lembram "zonula ocludens" ("ZO") foram notados entre ameloblastos e estrato intermédio (Fig. 18_B e 19_B). Não se observam muitos desmossomas laterais no limite interameloblástico, ou seja, ao longo do corpo das células.

Região Nuclear

Nesta região o núcleo preenche quase toda a largura da célula, deixando apenas uma estreita faixa de citoplasma que contém RER, fibrilas e microtúbulos (Fig. 18_A e 19_A). O espaço extracelular é reduzido e uns poucos desmossomas foram observados (Fig. 16 e 19).

A heterocromatina tende a formar grandes agregados periféricos; é principalmente entre eles que se observam os poros na carioteca (Fig. 16 a 19_B).

Na face da carioteca voltada para o citoplasma podem-se notar ribossomas que lhe estão associados, além de estruturas densas aproximadamente esféricas, à frente dos poros (Fig. 16, 18_A, 18_B e 19) e estruturas semelhantes a bolhas (Fig. 18_A).

Região Supranuclear

Como vimos, é a que se estende desde o polo distal do

núcleo até a barra terminal distal.

Embora os ribossomas livres ainda sejam numerosos, os ameloblastos cortados longitudinalmente exibem longos perfis de RER com disposição mais ou menos paralela ao longo-eixo da célula (Fig. 21, 23, 25, 30 e 31); todavia ocupa uma região mais lateral logo acima do núcleo porque o centro da célula é ocupado principalmente pelo complexo de Golgi (Fig. 21 a 23).

Nos ameloblastos cortados transversalmente os perfis de RER mostravam dois padrões: perfis correndo longitudinalmente, paralelos ao longo-eixo e arranjos com tendência a se encurvarem (Fig. 29). Sobre as membranas da maior parte dos perfis de RE havia ribossomas irregularmente distribuídos (Fig. 21 a 32). Devido a isso, em porções do RER cortadas transversalmente, muitas vezes tinha-se estrutura semelhante a polirribossomas (Fig. 26 e 29).

O conteúdo das cisternas do RER é um material granular, cuja densidade é maior que a do hialoplasma (Fig. 29).

O complexo de Golgi, centralmente localizado, é uma longa estrutura tubular (em cortes orientados longitudinalmente) (Fig. 21 a 23) ou em forma de "U" (em cortes orientados em direção transversal) (Fig. 29). A parede tubular é descontínua e formada por um certo número de pilhas (Fig. 29), cada qual com cerca de seis sáculos achatados de membranas do complexo de Golgi (Fig. 29).

O conteúdo dos sáculos tem densidade baixa a qual aumenta ligeiramente de fora para dentro da pilha tornando-se bastante alta nas extremidades alargadas de alguns sáculos (Fig. 22).

Além dos sáculos notam-se grânulos e vesículas na região do complexo de Golgi, tais como: a) vesículas esféricas encapadas que aparecem no centro do complexo de Golgi; em sua periferia estas vesículas apresentavam pontos densos, aparentemente equidistantes, salientes das vesículas, associados com um material floculento, b) grânulos de conteúdo denso que são uma das estruturas mais características da região do complexo de Golgi. São aproximadamente esféricos, possuem um núcleo muito denso rodeado por um espaço claro de largura aparentemente uniforme que está delimitado por uma membrana. As extremidades dos sáculos do complexo de Golgi, quando estão preenchidas por material denso, freqüentemente aparecem seme

lhantes a esses grânulos (Fig. 22). Tais grânulos são mais frequentes no aparelho tubular de Golgi e nos processos de Tomes (que serão descritos mais adiante), aparecendo só raramente em outras partes, c) grânulos semelhantes a estes, porém maiores (3900 a 6200Å) podem aparecer próximos ao complexo de Golgi, porém nunca os vimos no interior dele (Fig. 29).

Algumas vezes se encontra, próxima ao complexo de Golgi, uma estrutura que lembra a descrita para centríolo (Fig. 20). Frequentemente aparecem aí perfis de retículo endoplasmático (RE) a cujas membranas estão associados ribossomas. São comuns, também, estruturas do tipo polirribossomas livres além de corpos multivesiculados de fundo claro (MVB₁) ou de fundo escuro (MVB₂) (Fig. 20 a 29).

Muitas vezes, em bordos angulares (notadamente em cortes bem transversais), longas extensões citoplasmáticas insinuam-se entre as membranas de duas células vizinhas. No interior dessas extensões parece haver filamentos orientados na direção do longo-eixo da expansão (Fig. 30).

Processo Ameloblástico

Atinge, no compartimento secretor, o seu desenvolvimento máximo; a ele, os especialistas, se referem, a maior parte das vezes, como processo de Tomes.

Estende-se distalmente à barra terminal supranuclear (bem desenvolvida como se observa na Fig. 31) e apresenta duas regiões distintas: proximal - desde a barra terminal até a altura em que, no espaço extracelular, aparecem os depósitos mais proximais de matriz extracelular, ou seja, é a porção do processo de Tomes em que a membrana de um processo é adjacente à do vizinho; distal - é a porção do processo ameloblástico que se projeta na matriz do esmalte. As membranas dos processos vizinhos ficam distantes entre si pela matriz do esmalte que se lhes interpõe e esta porção do processo exhibe o seu característico formato cônico.

O conteúdo do processo de Tomes inclui várias estruturas. Assim, em cortes longitudinais, nenhum perfil de RER pode ser visto distalmente à trama celular supra-nuclear (Fig. 31 a 34).

Em todo ele, mas principalmente na região distal apa

recem grânulos densos esféricos ou ovais (Fig. 31 a 34) nos quais muitas vezes é visível um pequeno espaço entre a membrana e o conteúdo. São semelhantes àqueles da região do complexo de Golgi (comparar Fig. 34 com 20-22 e 29). Não pudemos obter nenhuma evidência morfológica do material desses grânulos sendo extruído da célula.

Vesículas encapadas são outra estrutura freqüente, tanto no centro como na periferia dos processos ameloblásticos e abrem-se, às vezes, para o meio extracelular. Outras vezes as vesículas encapadas parecem estar ligadas à membrana celular por um pequeno tubo ou colo (Fig. 31 a 34).

Mais raramente são observados feixes de filamentos (Fig. 33) e corpos multivesiculados claros (MVB₁ das Fig. 32 e 33) e escuros (MVB₂ da Fig. 33), nos processos ameloblásticos.

A matriz extracelular agora aparece mais homogênea e disposta num arranjo de aspecto estriado (Fig. 31 a 34).

COMPARTIMENTO PÓS-SECRETOR

Os ameloblastos pós-secretores vão paulatinamente diminuindo de tamanho, involução esta que já se iniciara no dé cimo mais oclusal do o compartimento anterior. A maioria das estruturas internas sofre uma redução na quantidade ou no tamanho. Isso não impede, no entanto, o aparecimento de estruturas e conformações novas na algumas células deste compartimen to.

Região "Infranuclear"

Ribossomas aparecem livres ou associados à membrana de RE. Diminui a quantidade de RER (comparar Fig. 35 com 36_B e 43).

O abaulamento, na membrana voltada para o estrato in termédio, diminui sensível e progressivamente (comparar Fig. 35 com 36_B e 43).

A barra terminal nesta região não apresenta mais sua estrutura típica, no sentido de que não há uma trama citoplasmática aparente na região basal. Deste modo, onde é visível, a barra terminal fica reduzida praticamente à "ZA" (Fig. 35 e 36_B). Em alguns locais ela parece não existir (Fig. 43).

Um grupo de mitocôndrias, que diminui ligeiramente à medida que se caminha para a oclusal, localiza-se na região "infranuclear" (Fig. 35, 36_B e 43).

Nos ameloblastos do compartimento de transição, entre os de secreção e pós-secreção, notam-se estruturas bem desenvolvidas contendo em seu interior fragmentos celulares em estágio mais ou menos adiantado de decomposição. Tais estruturas são conhecidas como vacúolos autofágicos.

Estruturas semelhantes são visíveis também nas células do estrato intermédio, nesta posição.

Os espaços interameloblásticos e entre os ameloblastos e o estrato intermédio vão se acentuando. Microvilosidades aparecem nesses espaços e a quantidade de estruturas juncionais entre as células diminui. Vêem-se alguns desmossomas entre os ameloblastos e células do estrato intermédio (Fig. 43).

Alguns ameloblastos em transição apresentam um acúmulo de grânulos (Fig. 36_B).

"Região Nuclear"

Morfologicamente os núcleos aparentam uma progressiva redução de volume a tal ponto que, em algumas células, sua altura é apenas ligeiramente maior que a largura (Fig. 35).

Entre o núcleo e a membrana notam-se alguns mitocôndrias (Fig. 35, 36_B, 41 e 45), raros perfis de RER (Fig. 35, 36_B e 45), feixes de tonofilamentos (Fig. 43), corpos densos (Fig. 38, 43, 45 e 46_B) além de vesículas de aspectos variados: vesículas encapadas ("CV" da Fig. 41) aparentemente vazias ("E" da Fig. 44), ou, às vezes, com espécies de vesículas menores, em seu interior (Fig. 41 e 45), outras vezes, com um material fibroso denso deslocado para um lado (Fig. 38) e, finalmente, vesículas encapadas com material flocoso sobre a parte externa de sua membrana (Fig. 39).

Em micrografias de cortes transversais, à altura do núcleo, as sinuosidades existentes nas membranas laterais acentuam-se nos locais em que três células estabelecem contacto (Fig. 46_B).

Região "Supra-Nuclear"

Os ribossomas ainda aparecem, com bastante frequência

em todo o compartimento pós-secretor, e também, na região "supra-nuclear" deste. O RER sofre uma grande redução em relação ao do ameloblasto no compartimento secretor.

O complexo de Golgi também sofre uma gradativa involução, aparecendo como estrutura cada vez menos desenvolvida a tal ponto que se reduz a uma estreita pilha de sáculos extremamente achatados nas micrografias de ameloblastos de secções mais oclusais (Fig. 37_B, 39, 41, 45). Em algumas ele aparece em dois locais na mesma célula (Fig. 39). Próximo à região do complexo de Golgi vêem-se: corpos densos (Fig. 37_B, 39, 41, 44 e 45), corpos multivesiculados de dois tipos, ou seja, com matriz escura (Fig. 37_B) ou clara (Fig. 41) e vesículas encapadas com material floculento na parte externa da membrana (Fig. 39, 41 e 45).

Caminhando-se em sentido mais distal, ainda na região supra-nuclear, notam-se, além das estruturas já mencionadas, vesículas aparentemente vazias, às vezes apenas com vesículas menores presas a espessamentos da membrana envolvente (Fig. 46_B), vacúolos autofágicos (Fig. 46_B), vesículas com um grande espaço claro entre a membrana e o conteúdo de aspecto variável (Fig. 46_A), e vesículas de diversos tipos que convençamos identificar como V₁, V₂, V₃, V₄ (Fig. 38).

Feixes de tonofilamentos (Fig. 40) e microtúbulos (Fig. 42) também são visíveis nesta região.

Uma quantidade bastante expressiva de mitocôndrias acumula-se em toda a região "supra-nuclear".

Logo no início do compartimento pós-secretor a membrana voltada para a matriz do esmalte sofre invaginações, numa estrutura semelhante a um labirinto que se convencionou chamar "labirinto apical" o qual atinge um máximo de complexidade e depois involui (comparar as Fig. 36_A, 37_A, 38, 40, 42, 44, 45, e 46).

Na figura 42, nota-se um material de aparência muito semelhante ao da matriz remanescente do esmalte que dá a impressão de estar no interior dos túbulos resultantes de invaginação da membrana, quando não dentro do ameloblasto.

Entre as estruturas características deste "labirinto apical" constam, ainda, como que fileiras de corpos com um material granular fino, envolto por dupla membrana ainda não descritos na literatura, conquanto vários pesquisadores já tenham assinalado a sua presença (Fig. 42 a 45).

ABREVIATURAS USADAS NAS MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS

- AP - projeção ou processo ameloblástico
- AL - labirinto apical
- ART - artefato
- AV - vacúolo autofágico
- BC - bulbo celular
- BL - lâmina basal
- CE - citoesqueleto
- CM - membrana celular
- CO - fibra colágena
- CP - processo celular
- CT - centríolo
- CTM - material de textura grosseira
- CV - vesícula encapada
- D - desmossoma
- DAB - ameloblasto escuro
- DB - corpo denso
- DM - material denso
- E - vesícula cujo interior aparenta predominância de vazio
- EG - grânulo alongado
- EGC - cadeia de grânulos alongados
- EM - matriz do esmalte
- F₁ - fibra tipo 1
- F₂ - fibra tipo 2
- F₃ - fibra tipo 3
- FLJ - estrutura juncional com aparência de junção pentaestrati
ficada
- FTM - material de textura fina
- FR - ribossomas livres
- GAB - ameloblasto granular
- GC - complexo de Golgi
- H - hemidesmossoma
- IAB - ameloblasto interfásico
- ICS - espaço intercelular
- IG - estrutura semelhante a grânulo no interior da cisterna
do RER (grânulo intracisternal)
- IGC - porção (sáculo) mais interna (o) do complexo de Golgi
- IM - (material intracisternal) material acumulado no interior
da cisterna do RER

- IM* - invaginação da membrana
- L₁ - corpúsculo com aspecto semelhante ao de lisossoma em es
tágio funcional precoce
- L₃ - corpúsculo com aspecto semelhante ao de lisossoma em es
tágio funcional adiantado
- LF - fragmentos pequenos
- M - mitocôndrias
- MAB - ameloblastos em mitose
- MT - microtúbulo
- MV - microvilosidade
- MVB₁ - corpo multivesiculado do tipo 1: de conteúdo mais claro
- MVB₂ - corpo multivesiculado do tipo 2: de conteúdo mais denso
- N - núcleo
- NE - envoltório nuclear
- NP - poro nuclear
- NU - nucléolo
- OGC - porção (sáculo) mais externa (o) do complexo de Golgi
- OP - processo odontoblástico
- PD - pré-dentina
- RER - retículo endoplasmático rugoso
- S₁, S₂, ..., S₆ - sáculos do complexo de Golgi
- SG - grânulo de secreção; "SG" - estruturas semelhantes a grã
nulos de secreção numa região pós-secretora
- SI - estrato intermédio
- SM - material finamente granulado
- SSF - feixe subsuperficial de fibrilas
- TF - feixe de tonofibrilas ou tonofilamentos
- TW - trama terminal
- V₁ - vesícula do tipo 1: envolta por u'a membrana densa, con
teúdo mais claro e com um pequeno "núcleo" denso
- V₂ - vesícula do tipo 2: formada por um material claro onde
se vêem pequenos pontos escuros e um "núcleo" denso
- V₃ - vesícula do tipo 3: conteúdo relativamente homogêneo
- V₄ - vesícula do tipo 4: de conteúdo denso, aparentemente gra
nulado, com uma espécie de contorno mais escuro, logo
abaixo da membrana
- ZA - "zonula adherens"
- ZO - "zonula ocludens"

FIGURA 1 - Representação esquemática do órgão do esmalte de mo-
lar de cobaia dividido em compartimentos morfofun-
cionais conforme se pode observar ao M. O. (segundo
Blumen, 1970)

ZONA "A" - COMPARTIMENTO EMBRIONÁRIO

Estende-se desde o ponto de união das células do epi-
télcio interno (ou ameloblastos) com as do epitélio externo, até
a região em que as primeiras projeções dos ameloblastos rompem
a lâmina basal. Aqui as figuras de mitose são relativamente fre-
qüentes.

ZONA "B" - COMPARTIMENTO DE DIFERENCIAÇÃO

Do limite oclusal do compartimento anterior até que
se complete a polarização das estruturas intrameloblásticas. Na
extremidade formativa dos ameloblastos oclusais desta zona há
depósitos consideráveis de matriz de esmalte, exteriormente co-
locados em relação aos processos ameloblásticos.

ZONA "C" - COMPARTIMENTO DE SECREÇÃO

Constituída de células oclusalmente localizadas ao com-
partimento de diferenciação. Os ameloblastos secretores caracte-
rizam-se por apresentarem as estruturas celulares no apogeu
do seu desenvolvimento. Os ameloblastos, dos dois terços apicais
do compartimento secretor, são relacionados com a produção de
esmalte interno e aqueles do terço oclusal do compartimento,
que correspondem a células em processo de involução, com a pro-
dução do esmalte externo.

ZONA DE TRANSIÇÃO

Compreende umas poucas células do limite oclusal do
compartimento de secreção e do apical do de pós-secreção. Carac-
teriza-se pelo aparecimento de um "material globular", bem evi-
dente nas células do estrato intermédio e um pouco menos eviden-
te nos ameloblastos.

ZONAS "D", "E" e "F" - COMPARTIMENTO PÓS-SECRETOR

Este compartimento corresponde à parte mais oclusal do
dente e estas zonas estão relacionadas a estágios cada vez mais
adiantados de pós-secreção. A matriz orgânica do esmalte apare-
ce diminuída na zona "B" e a redução contínua deste material
conduz, na zona "F", a um desaparecimento, quase completo, dele.
Quando os dentes são submetidos a agentes descalcificadores ,

ela é arrastada pelas soluções empregadas no processamento ci
tológico.

Ao M. O. notam-se, com freqüência, mormente nas duas
últimas zonas, estruturas conhecidas como pérolas de cimento
(tecido conjuntivo invadindo a camada de ameloblastos). Não
achamos, ao M. E., uma estrutura correspondente a elas.

FIGURA 1 - ABREVIATURAS USADAS:

- A - ameloblasto
- AB - osso alveolar
- CP - pérolas de cimento
- D - dentina
- IE - esmalte imaturo
- O - odontoblasto
- P - polpa dentária
- SA - ameloblasto reduzido (pós-secretor)
- SI - estrato intermédio
- TE - esmalte de transição
- ZA - zona "A": compartimento embrionário
- ZB - zona "B": compartimento de diferenciação
- ZC - zona "C": compartimento de secreção
- ZD - Zona "D" }
ZE - zona "E" } compartimento de pós-secreção
ZF - zona "F" }

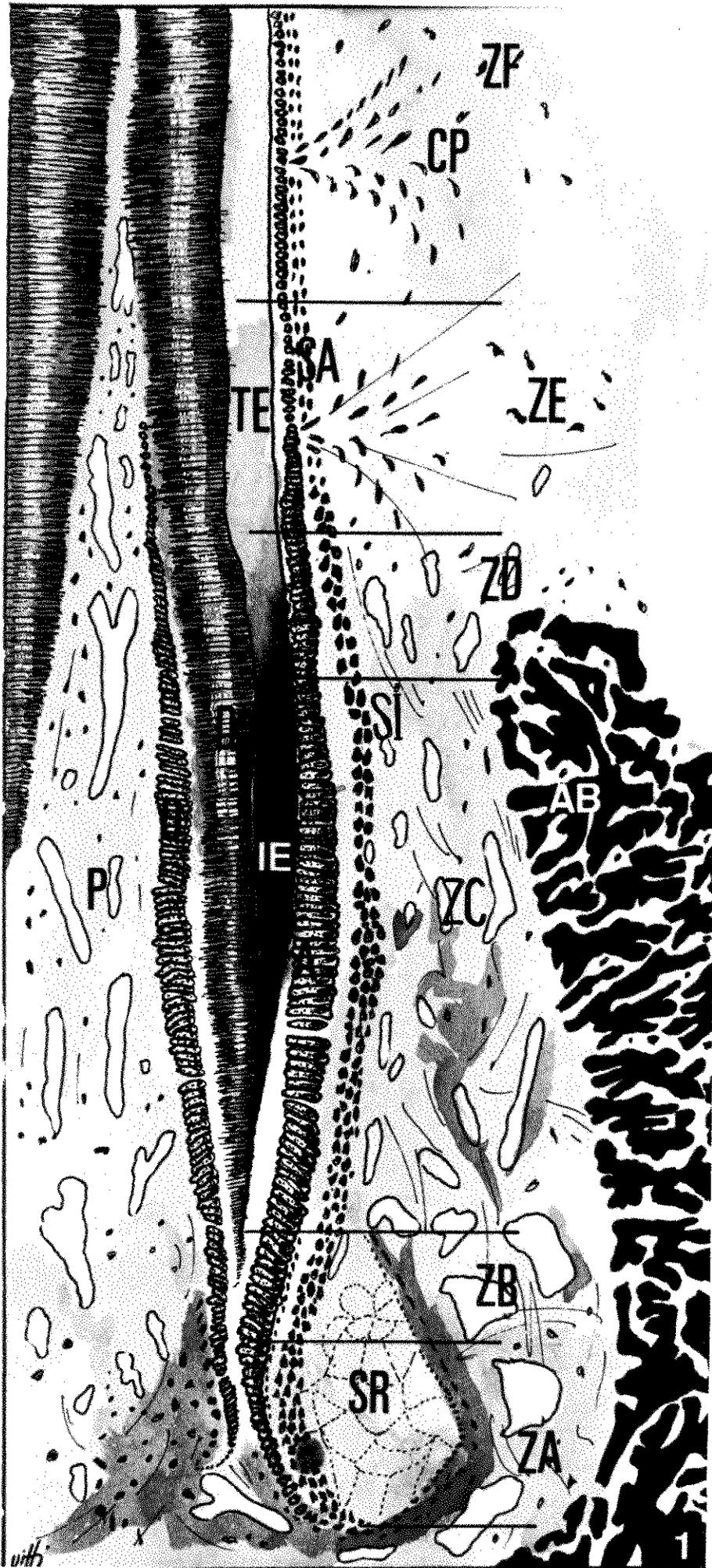


FIGURA 2 - Ameloblastos do compartimento embrionário próximos à curvatura cervical. Nota-se, neste "insert", que a superfície do ameloblasto voltada para o estrato intermédio é plana e que a trama terminal "infra-nuclear", é ainda bastante incipiente, nas células em que é visível (4 000 X)

FIGURA 3 - Ameloblastos do compartimento embrionário. Nesta micrografia as células mais jovens estão na parte inferior direita. Notam-se ameloblastos, morfologicamente, em dois estágios funcionais: os interfásicos (IAB) e os em mitose (MAB). Nos ameloblastos aparentemente em mitose, as organelas citoplasmáticas não são visíveis. No núcleo evidencia-se o material cromossômico e no citoplasma pode-se observar, às vezes, estrutura de microtúbulos (MT) que lembra o fuso mitótico. Nos interfásicos notam-se: núcleo (N), alongado ou arredondado, com um material granulado em seu interior; geralmente próximos à membrana há acúmulos de material denso que poderiam representar nucléolo ou regiões heterocromáticas (cromocentros). Na membrana nuclear notam-se poros (NP). No citoplasma desses ameloblastos interfásicos notam-se: perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER), dentro de cujas cisternas acumula-se, às vezes, um material finamente granular (IM), mitocôndrias (M) todos distribuídos aparentemente sem orientação preferencial. Na extremidade "infra-nuclear" observa-se o desenvolvimento crescente da trama terminal (TW), bem como do abaulamento da membrana ameloblástica (BC). Notam-se, ainda, desmossomas (D), "zonula adherens" (ZA) ou espaços intercelulares (ICS) em diversos pontos do limite intercelular. Por último, na membrana ameloblástica voltada para o estrato intermédio (SI), vêem-se muitas vesículas encapadas (CV). ART-artefato. (4 800 X)

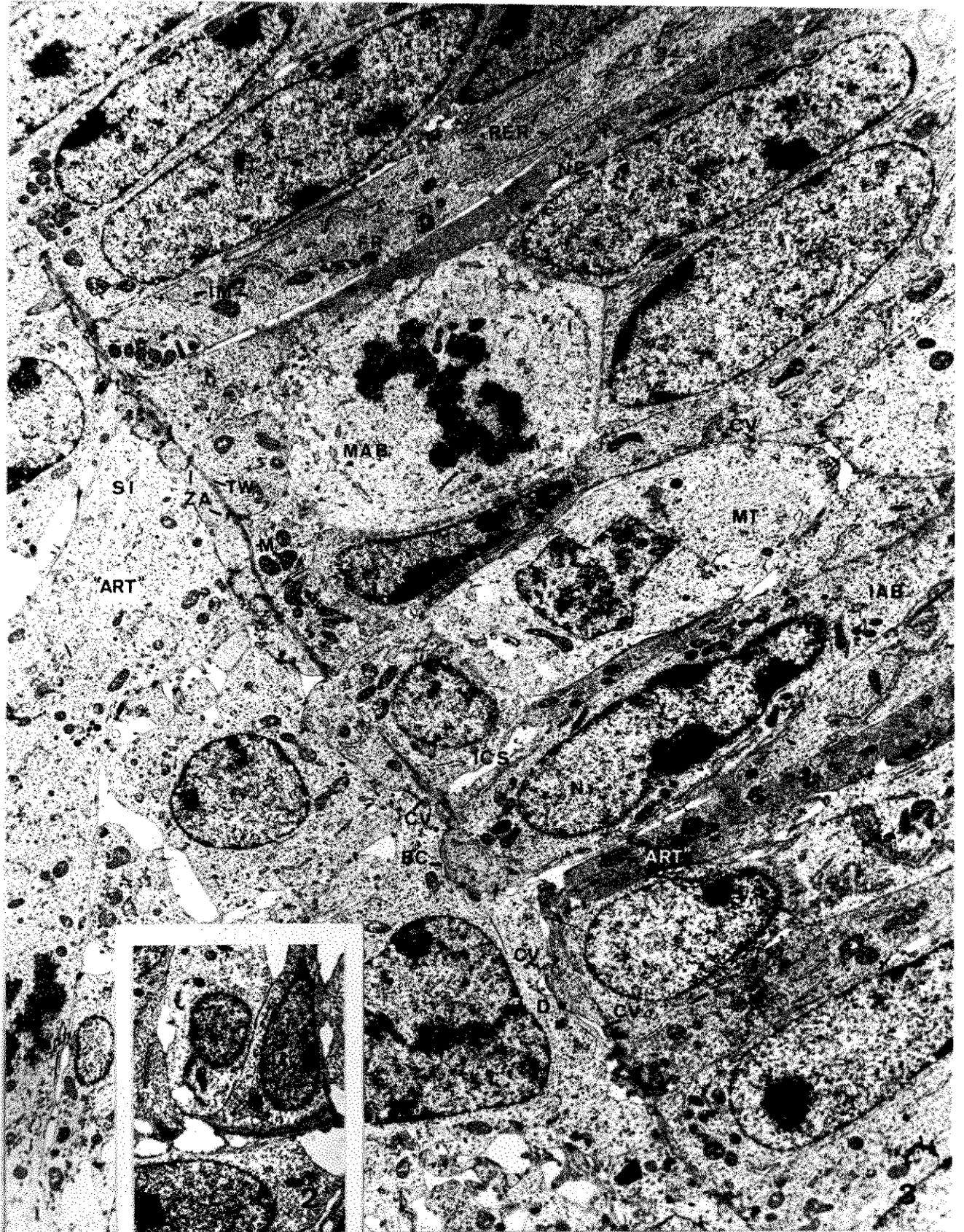
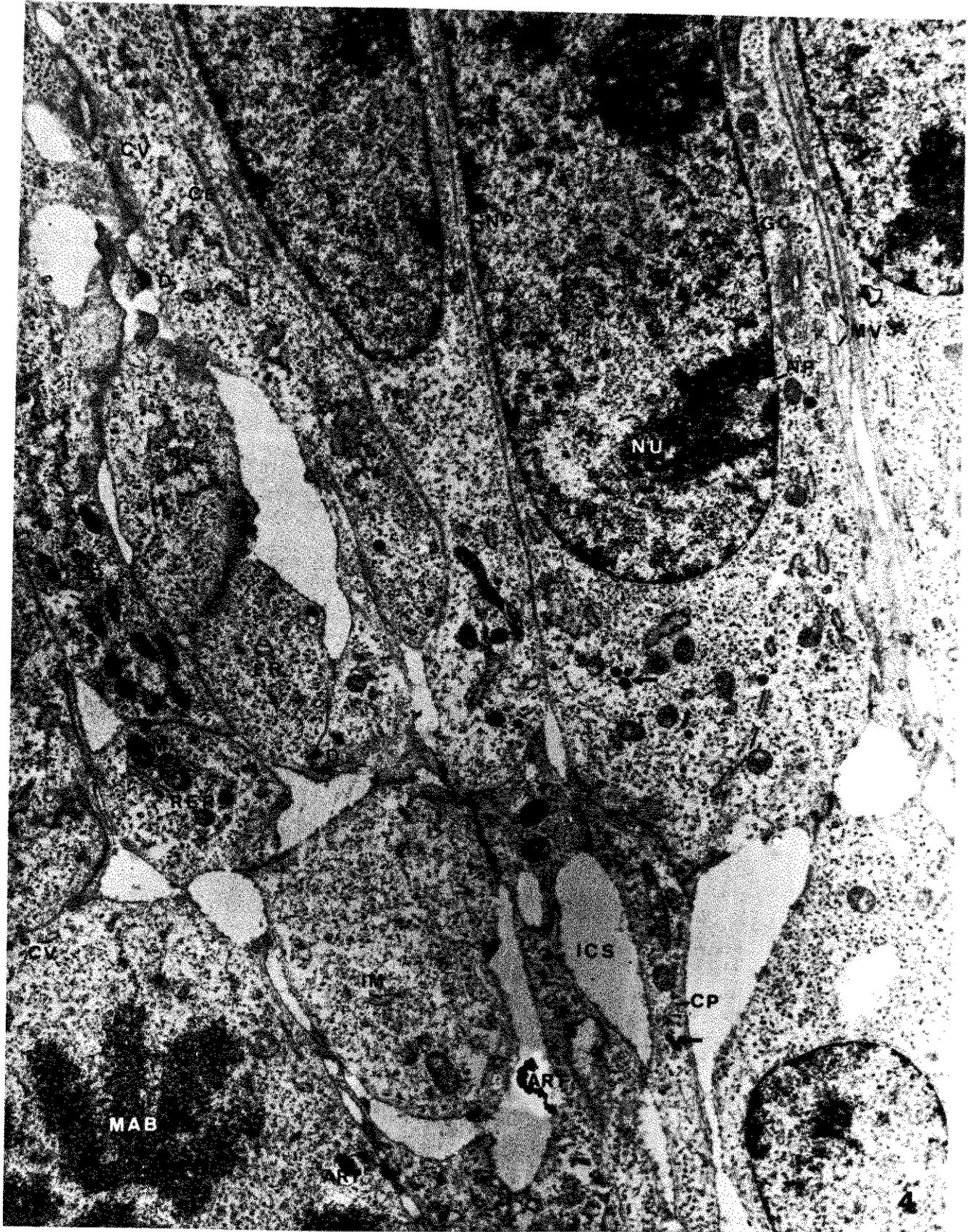


FIGURA 4 - Ameloblastos do compartimento embrionário. No vértice inferior esquerdo da fotografia nota-se um ameloblasto morfologicamente em mitose (MAB). As demais células aparentam as características comuns a ameloblastos embrionários interfásicos (IAB), quais sejam: mitocôndrias (M) espalhados por todo o citoplasma, muitos ribossomas livres (FR), poucos perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER), e o complexo de Golgi (GC) que aqui aparece lateralmente disposto em relação ao núcleo (N), aglomerados de estruturas arredondadas de conteúdo denso, semelhantes a grânulos ou vesículas (setas horizontais ←), conjuntos de fibrilas e/ou microtúbulos formando uma espécie de citoesqueleto (CE). Próximos à membrana, ou ligadas a ela, notam-se vesículas encapadas (CV). Entre os ameloblastos, ou entre os prolongamentos (CP) de um e o corpo celular de outro, notam-se desmosomas (D) e/ou espaços intercelulares (ICS) mais ou menos pronunciados; microvilosidades (MV). No núcleo podem-se notar estruturas densas, morfologicamente semelhantes a nucléolo (NU), e poros nucleares (NP) abrindo-se na carioteca. ART - artefato. (10 000 X)



FIGURAS 5 a 8 - Ameloblastos embrionários focalizados na face voltada para os odontoblastos.

FIGURA 5 - No citoplasma dos ameloblastos, morfologicamente interfásicos (IAB), nota-se um ensaio de desenvolvimento da trama terminal "supranuclear" (TW) e de "zonula adherens" (ZA), além de pequenos aglomerados de estruturas arredondadas de densidade variável, semelhantes a grânulos e vesículas (*); Mitocôndrias (M). A membrana ameloblástica apresenta regiões densas semelhantes a hemidesmosomas (H) e projeções - (AP) que provocam uma ondulação na membrana predominantemente plana. Acompanhando esta face da membrana ameloblástica, em todos os seus contornos, de maneira contínua, nota-se a lâmina basal (BL). No espaço entre os ameloblastos e odontoblastos notam-se fibras ramificadas com um eixo mais denso de onde partem fibrilas curtas e finas (F_1) e prolongamentos odontoblásticos (OP) cortados transversalmente (dentro dos quais se notam corpúsculos esféricos densos, RER e um material finamente granular), além de outras estruturas menos características. (10500X)

FIGURA 6 - Além dos caracteres gerais, descritos na fotografia anterior (Figura 5), notam-se: no espaço intercelular um material denso que, em micrografias com aumento maior, mostra uma textura grosseira (CTM) e, no espaço entre os dois estratos celulares, um granulado como o de fibras cortadas transversalmente e fibras dispostas no sentido longitudinal, diferentes de F_1 . Algumas tinham um aspecto tracejado com partes claras e escuras entremeadas (F_2) e outras apareciam muito finas (F_3). ART - artefato; CV - vesícula encapada; FR - ribossomas livres; CE - citoesqueleto; D - desmossoma; ICS - espaço intercelular. (5 700 X)

FIGURA 7 - Notam-se uma espécie de citoesqueleto (CE) de fibrilas e um aglomerado de estruturas semelhantes a vesículas e grânulos (*), além de mitocôndrias (M) e ribossomas livres (FR), característicos dessas células; BL - lâmina basal; ICS - espaço intercelular. (15 000 X)

FIGURA 8 - Na porção esquerda da fotografia, há um odontoblasto onde se nota o núcleo com uma estrutura densa que lembra nucléolo (NU). Além das estruturas já mencionadas nas Figuras 5, 6 e 7 chamamos a atenção, aqui, para os aglomerados de grânulos e vesículas (*), próximas à membrana e a mitocôndrias (M); FR - ribossomas livres; H - hemidesmosomas; BL - lâmina basal; ART - artefato. (6 000 X)

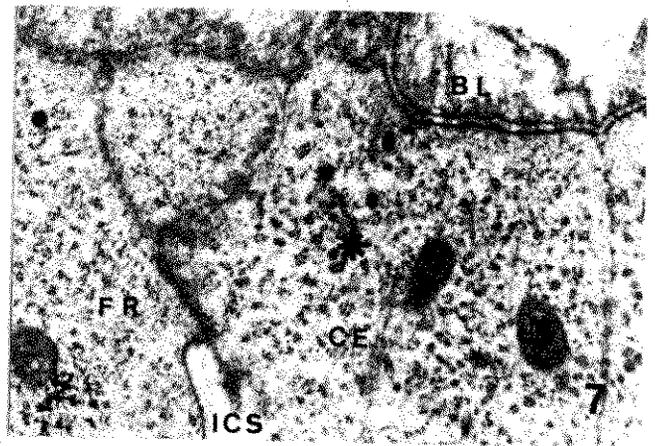
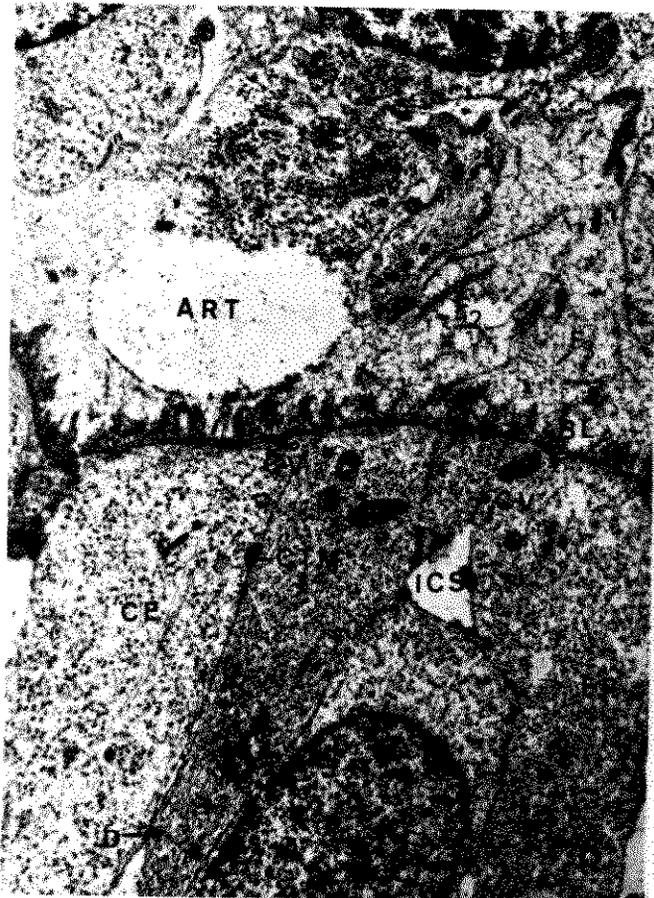


FIGURA 9 - Região "infranuclear" de ameloblastos em diferenciação no limite com o estrato intermédio. Os ameloblastos dispõem-se no triângulo cujos catetos são os lados superior e direito da fotografia e possuem características de células em interfase. No limite com as células do estrato intermédio (SI), os ameloblastos apresentam um bulbo celular (BC) que exibe uma complexidade crescente graças a microvilosidades (MV) e vesículas encapadas (CV). Aumenta também o número de estruturas juncionais visíveis, tais como desmosomas (D) e "zonulas aderentes" (ZA). Uma trama terminal "infranuclear" (TW), bem desenvolvida, separa, nesta região, um compartimento bulbar e um mitocondrial. Neste último, além das mitocôndrias (M) que vão tendendo a se acumularem "abaixo" do núcleo aparecem ribossomas livres (FR) e uns poucos perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER). Na membrana nuclear notam-se poros (NP). (10 000 X)

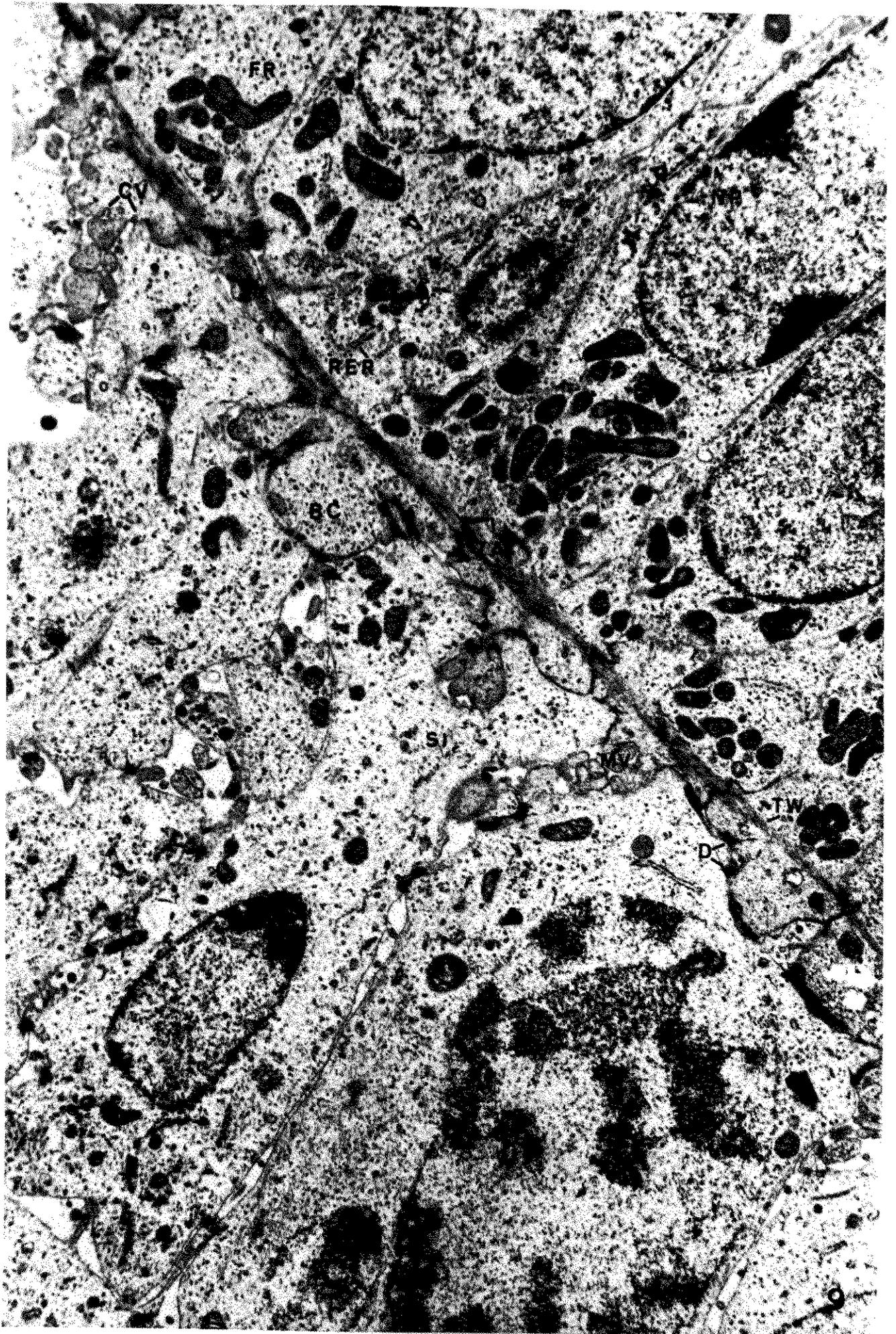


FIGURA 10 - Região "supranuclear" de ameloblastos embrionários da porção mais oclusal do compartimento. Os processos odontoblásticos (OP), que se projetam em direção aos ameloblastos, distam, às vezes, apenas cerca de 1000Å da lâmina basal (BL). Esta aparece interrompida por uma projeção ameloblástica (AP) no lado esquerdo da fotografia, que focaliza uma célula no limite com o compartimento de diferenciação. A porção "supra-nuclear" dos ameloblastos é relativamente rica em ribossomas livres (FR), mas apresenta poucos mitocôndrias (M), H- hemidesmossomas. No limite entre os ameloblastos notam-se vesículas encapadas (CV) intracelulares, próximas à membrana lateral, ou ligadas à ela, além de junções firmes do tipo bulbo (→), resultantes da projeção, fungiforme, de uma célula para dentro da vizinha. No ameloblasto, à esquerda da fotografia, observa-se a interrupção da lâmina basal, que consideramos um dos indícios morfológicos de início de diferenciação (20000X)

FIGURA 11 - Parte distal da região "supra-nuclear" dos ameloblastos em diferenciação. (porção mais oclusal que a da Figura 10). Nota-se, aqui, a crescente descontinuidade da lâmina basal (BL) rompida pelas projeções dos ameloblastos (AP). No interior do ameloblasto notam-se, ainda, muitos ribossomas livres (FR), além de microtúbulos (MT) que interrompem, por vezes, o arranjo fibrilar da trama terminal "supra-nuclear" (TW), um pouco mais desenvolvida que nas células do compartimento embrionário, fato que também se observa em relação à "zonula adherens" (ZA). Os ameloblastos têm aparência morfológica de células interfásicas (IAB), quando vistas por inteiro. H- hemidesmossomas. Os prolongamentos odontoblásticos (OP), às vezes, aparecem próximos à lâmina basal (BL), ou, outras vezes, próximos a projeções dos ameloblastos (AP). A menor distância que pudemos distinguir nesta fotografia, entre os OP e os ameloblastos foi de 250Å. (40 000 X)

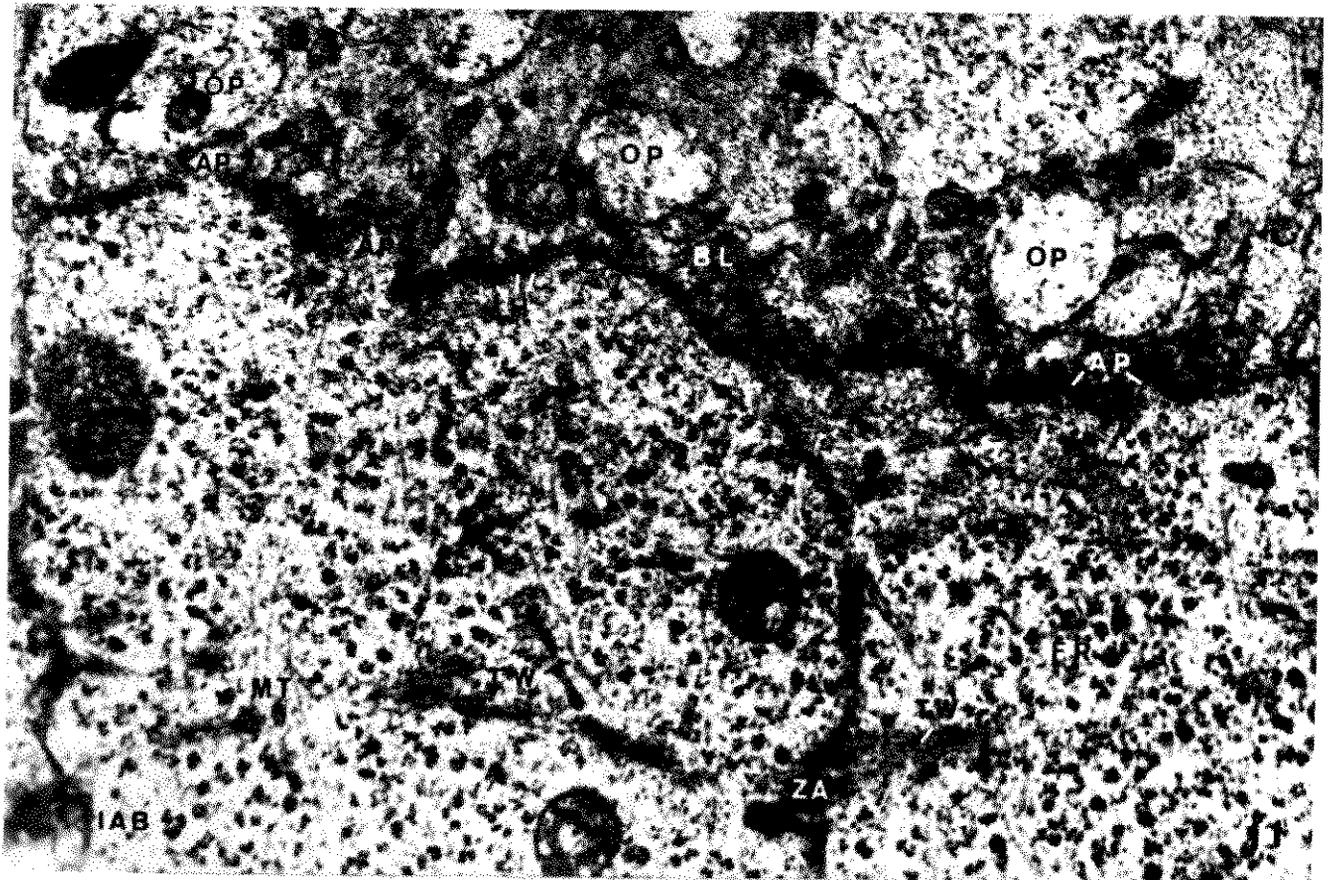
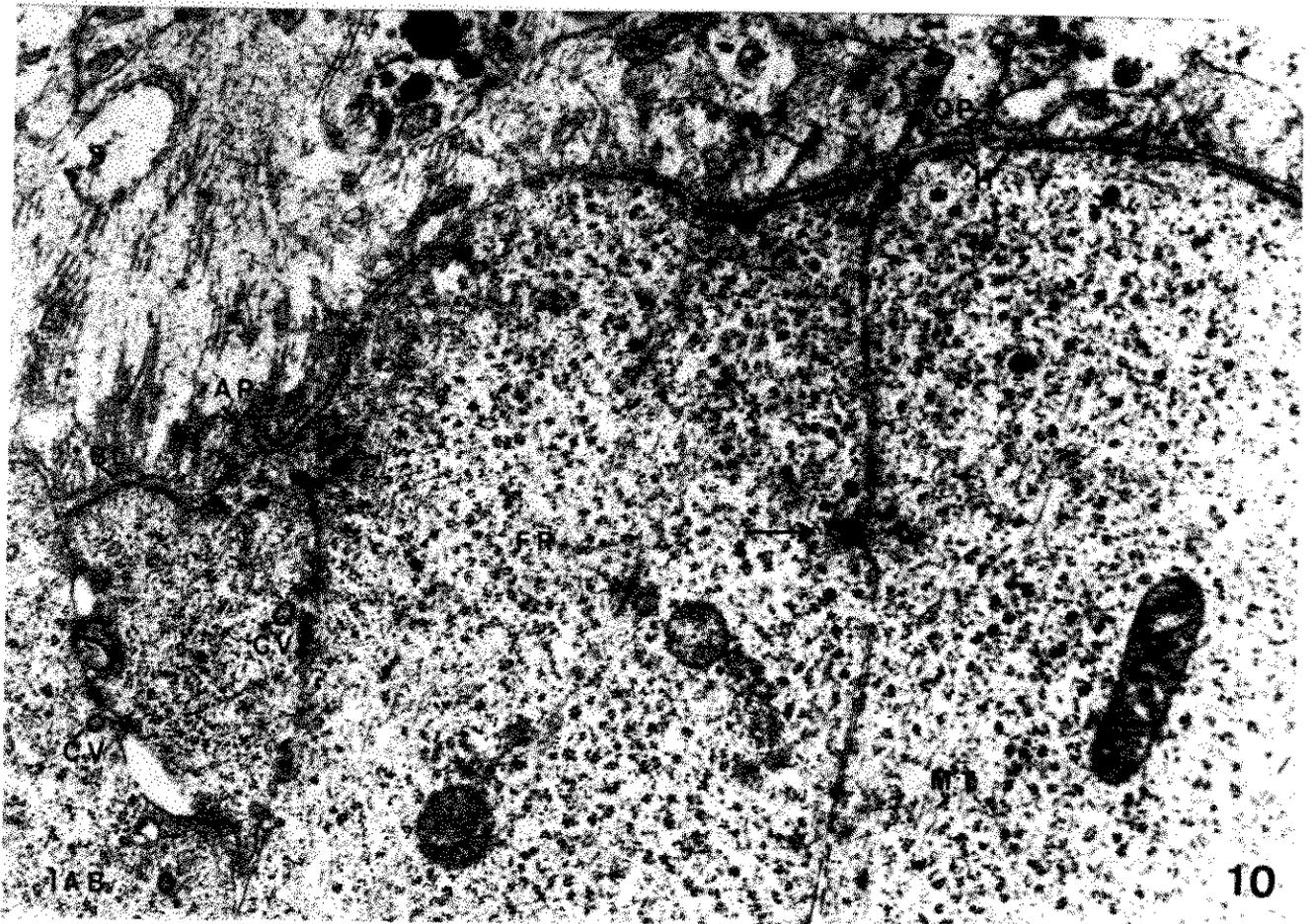


FIGURA 12 - Parte distal da região "supranuclear" de ameloblastos em diferenciação. (mais oclusais que os da Figura 11). Em virtude das projeções ameloblásticas (AP) mais desenvolvidas, a lâmina basal (BL) praticamente desaparece, nesta altura do compartimento. No interior dos ameloblastos aparecem microtúbulos (MT), uma trama terminal "supranuclear" (TW), pouco desenvolvida, e, entre ela e a membrana mais distal, uma estrutura semelhante a mitocôndrias (M). Também são notáveis vesículas encapadas (CV) e grânulos densos alongados, isolados (EG) ou em cadeias (EGC). A matriz extracelular não mudou substancialmente de aspecto em relação à do compartimento embrionário. OP - prolongamento odontoblástico. (40 000 X)

FIGURA 13 - Porção distal da região "supranuclear" de ameloblastos do compartimento de diferenciação. (mais oclusais que os da Figura 12). Notável é a modificação da matriz extracelular pelo aparecimento da pré dentina (PD) composta de fibrilas que exibem uma periodicidade que lembra a de fibrilas colágenas entre as quais se nota, próximo aos ameloblastos, um material denso de textura fina (FTM). Este material pode ser visto também dentro do ameloblasto, em estruturas aparentemente isoladas, ou dentro de outras que mostram uma ligação com o espaço extracelular. No interior do ameloblasto aumenta muito a quantidade de microtúbulos (MT) e tonofibrilas que por vezes aparecem reunidas em feixes (TF) dispostos longitudinal ou transversalmente (como se pode observar no ameloblasto, à esquerda, na fotografia). Uma trama de material fibrilar (TW) aparece no citoplasma e parece dirigir-se para estruturas juncionais, na membrana lateral, com aparência de "zonulas aderentes" (ZA). (16 000 X)

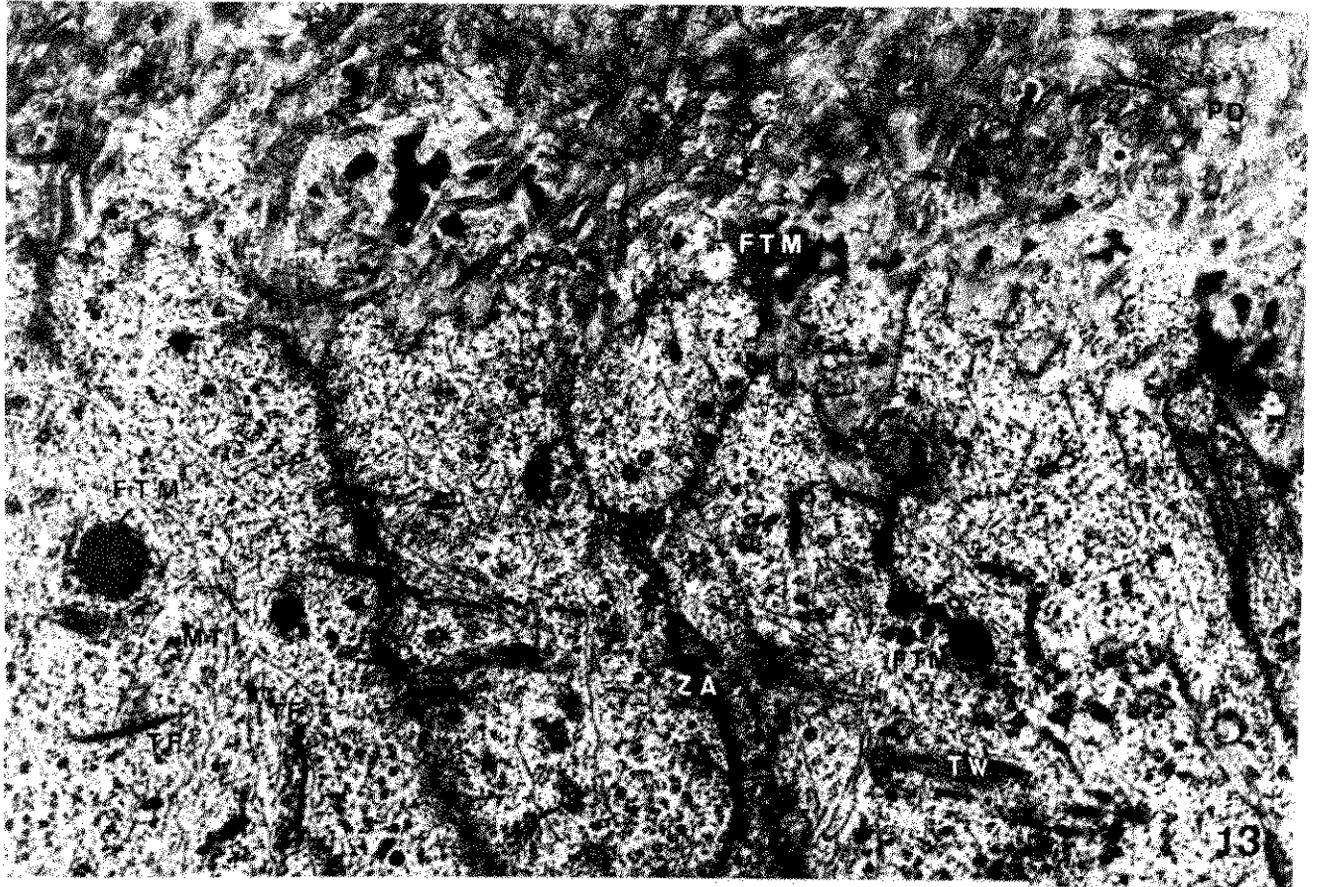
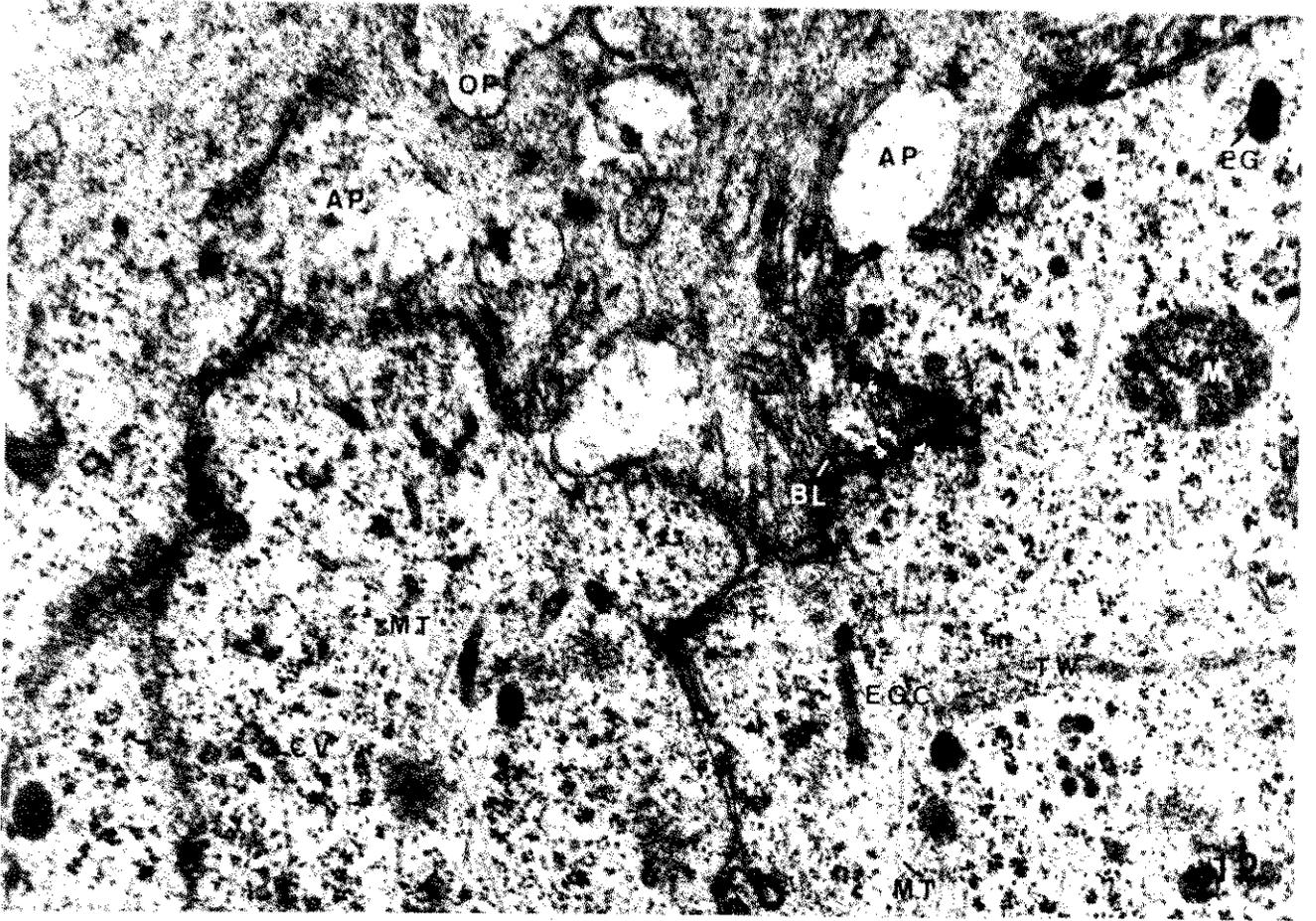


FIGURA 14 - "Insert" - Corte transversal de ameloblastos em diferenciação focalizando uma região de continuidade entre a lâmina externa do envoltório nuclear e o retículo endoplasmático rugoso (RER). No núcleo (N) nota-se uma estrutura densa que pode corresponder ao nucléolo (NU). As outras porções densas do núcleo parecem corresponder a cromocentros. No espaço interameloblástico vemos acúmulos de material finamente granuloso (SM). (7 500 X)

FIGURA 15 - Região "supranuclear" de ameloblastos em diferenciação. (mais apicais que os da Figura 13). No espaço entre os ameloblastos e odontoblastos nota-se pré-dentina (PD) depositada, sendo que mais próximo aos ameloblastos aparece depositado um material fibroso semelhante a colágeno (CO) e um material de textura fina (FTM). No interior dos ameloblastos uma trama terminal "supranuclear" (TW) desenvolvida separa esta região em dois compartimentos. No colocado "acima" da trama terminal, os processos ameloblásticos (AP) são mais desenvolvidos e, em seu interior, observam-se grânulos, vesículas e corpos multivesiculados com conteúdo denso (MVB₂). O compartimento entre a trama terminal e o núcleo apresenta acúmulos de mitocôndrias (M), muitos ribossomas livres (FR) alguns perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER), mais numerosos que no compartimento embrionário, em cujas cisternas freqüentemente se acumula um material finamente granuloso (IM), e um citoesqueleto (CE). No espaço interameloblástico notamos, em alguns lugares, um material de textura grosseira (CTM) (20 000 X).

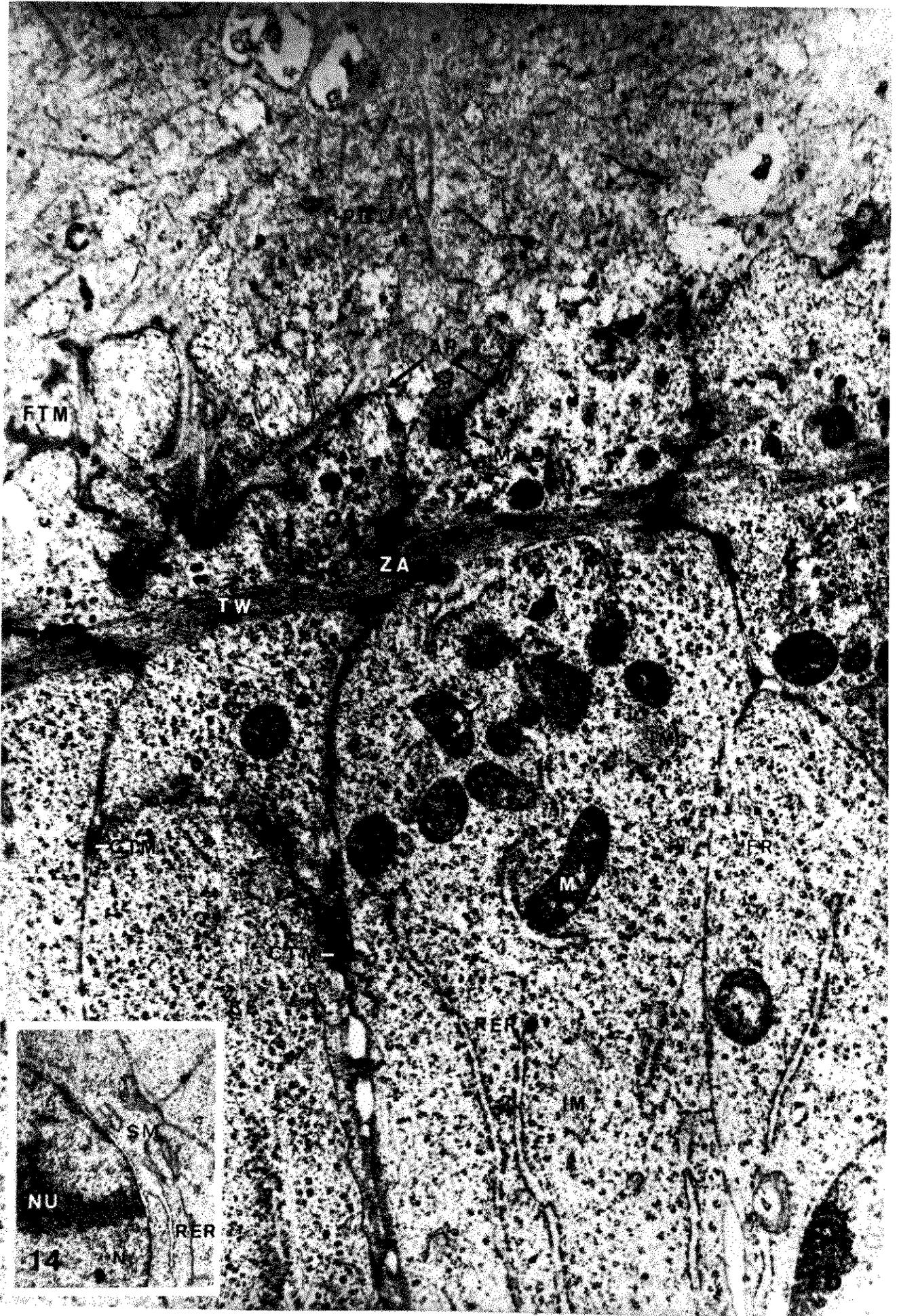
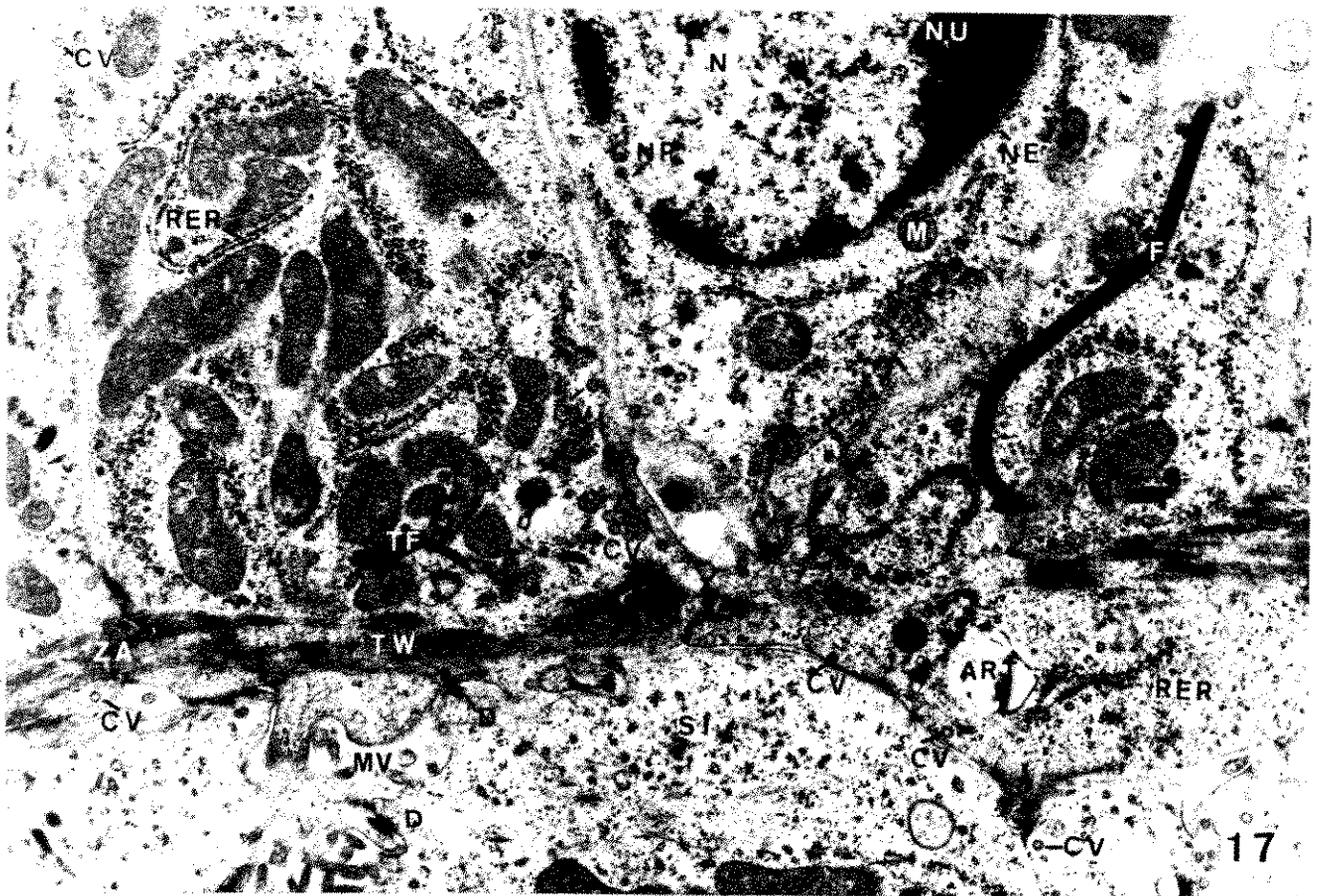
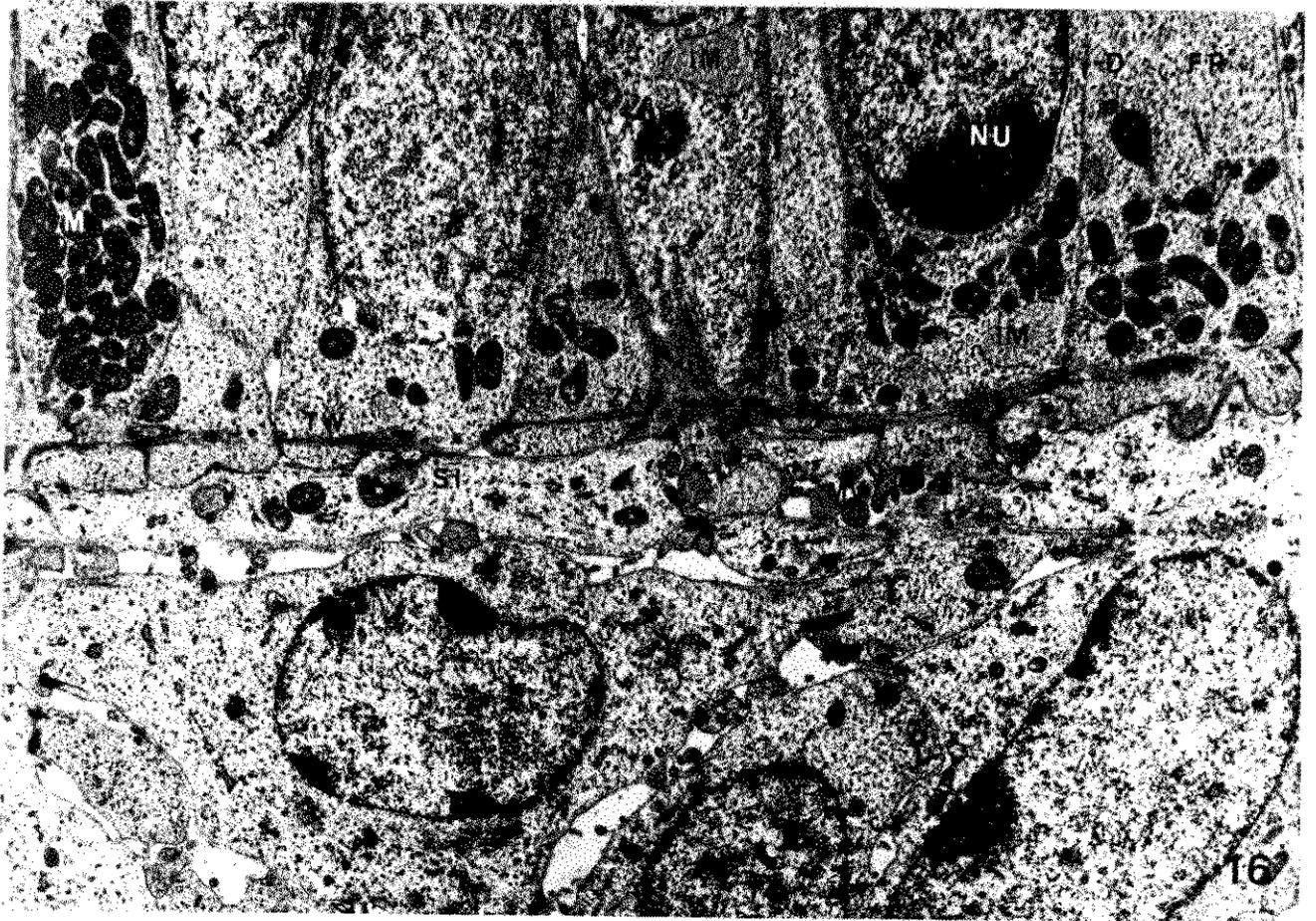


FIGURA 16 - Região infranuclear de ameloblastos secretores da parte mais apical do compartimento. (correspondem a células secretoras de esmalte interno). Entre o núcleo (N) e a trama terminal "infranuclear" (TW) acumula-se, em algumas células, uma grande quantidade de mitocôndrias (M). Na altura deste "compartimento mitocondrial" ainda é grande a quantidade de ribossomas livres (FR) e relativamente pequena a de perfis de retículo endoplasmático rugoso que freqüentemente aparece com um material acumulado em suas cisternas (IM). Na membrana lateral notam-se dois tipos de estruturas juncionais: os desmossomas (D) e as "zonulas aderentes" (ZA). A membrana ameloblástica voltada para o estrato intermédio apresenta ondulações e microvilosidades (MV). O estrato intermédio (SI) exhibe um início de achatamento em suas células, que começam a arranjar-se numa camada sob a extremidade não formativa dos ameloblastos. O núcleo, de alguns ameloblastos, mostra uma região mais escura, na qual se distingue uma estrutura semelhante ao nucléolo (NU) (8 000 X)

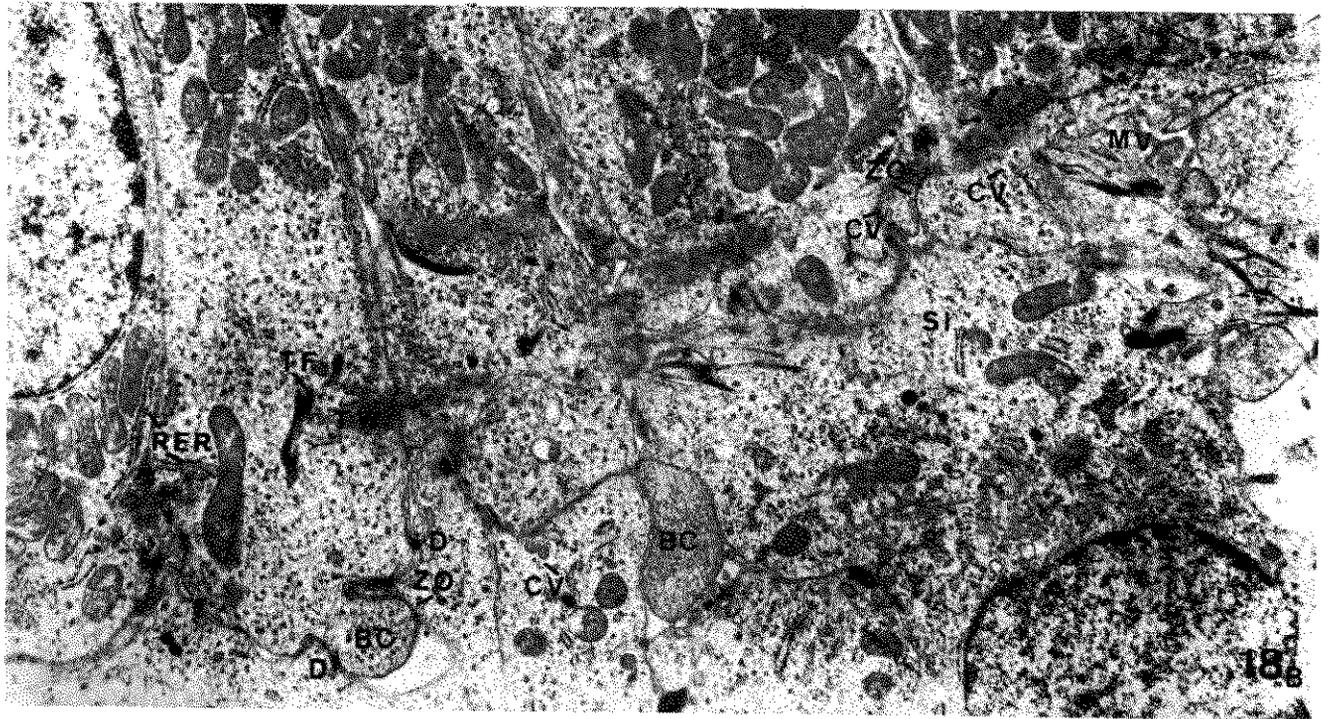
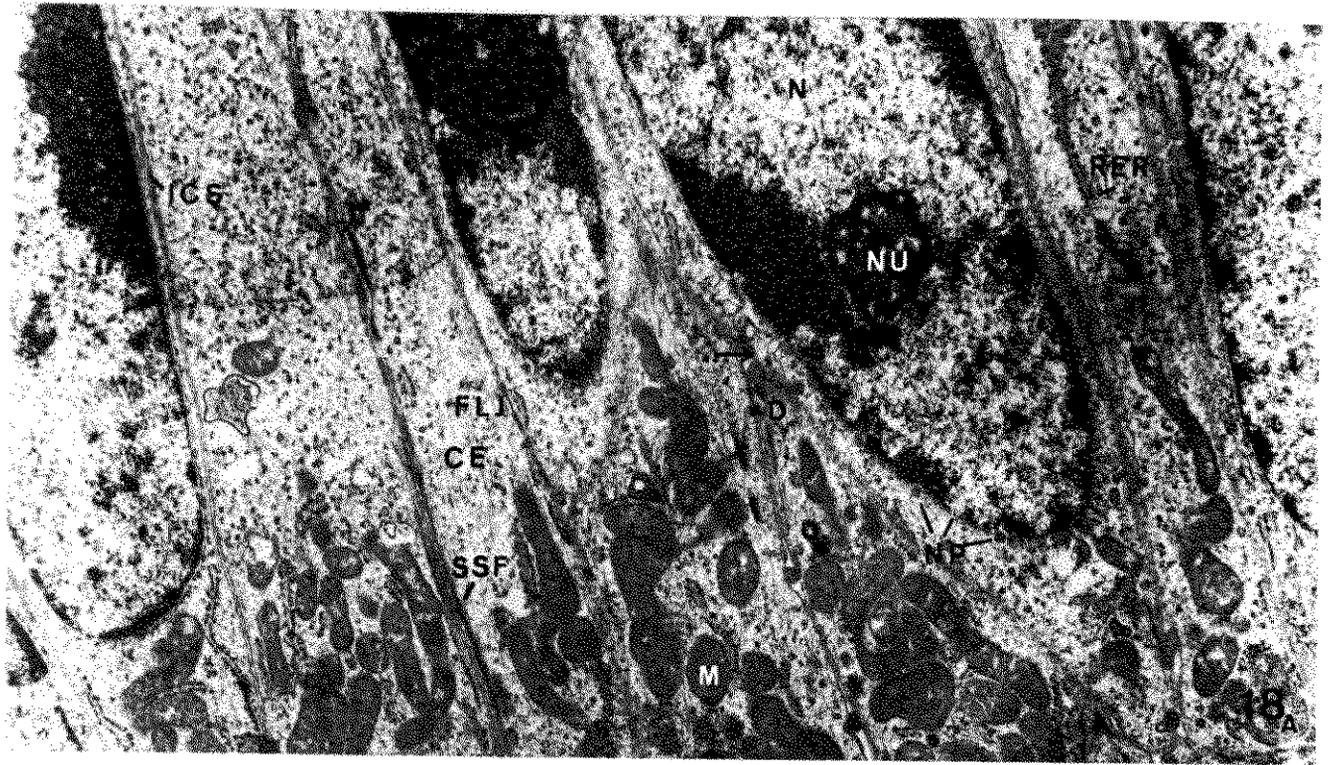
FIGURA 17 - Região infranuclear de ameloblastos secretores da parte mais oclusal do compartimento. (correspondente a células secretoras do esmalte externo). A aparência desta região é bastante semelhante à da foto anterior, porém a falta de estruturas naquela, era devida à sua incipiência, enquanto aqui, é devida a uma involução. O "compartimento mitocondrial", ainda com numerosos mitocôndrias (M), apresenta alguns perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) e muitas vesículas encapadas (CV) próximas ou ligadas à membrana ameloblástica. A trama terminal infranuclear (TW) apresenta-se ora mais ora menos densa, o que lhe dá um aspecto tracejado. O bulbo celular voltado para o estrato intermédio (SI) aparenta menor complexidade. Grossos feixes de tonofibrilas (TF) aparecem nesta região. Lateralmente observamos desmossomas (D) e "zonula adherens" (ZA). No núcleo (N) podemos distinguir: nucléolo (NU), poro nuclear (NP) e o envoltório nuclear (NE). ART-artefato. (14500 X)



FIGURAS 18A e 18B - Região infranuclear e parte da nuclear do terço apical do compartimento secretor. (células se cretoras de esmalte interno.

FIGURA 18A - Nota-se um espaço intercelular (ICS) muito reduzi do, entre os ameloblastos. Desmossomas (D) e (FLJ) estru turas semelhantes a junções pentaestratificadas, apa rentemente contribuem para manter estas células jún tas. A forma dos ameloblastos parece ser garantida pelo citoesqueleto (CE) e feixes de fibrilas logo abaixo da membrana lateral (SSF). O núcleo (N) apre senta regiões densas, provavelmente heterocromáticas mas em alguns deles destaca-se uma estrutura morfo logicamente semelhante ao nucléolo. A membrana nu clear apresenta poros (NP) à frente dos quais apare cem, às vezes, estruturas densas esféricas, outras ve zes, estruturas semelhantes a bolhas (→). Os mi tocôndrias (M) aparecem principalmente em situação infranuclear e, há pouco retículo endoplasmático ru goso (RER), nesta região. (9 600 X)

FIGURA 18B - Esta fotografia, que é uma continuação da supe rior, mostra perfis de retículo endoplasmático rugo so (RER), mitocôndrias (M) e feixe de tonofibrilas (TF) atravessando a trama terminal (TW) infranucle ar. Abaixo desta, o bulbo celular (BC) adquire con formações interessantes. No "compartimento bulbar", (abaixo da TW) aparecem microvilosidades (MV), "zonu la ocludens" (ZO), desmossomas (D), vesículas enca padas (CV) e outras estruturas, um pouco menos ca racterísticas, que conferem uma complexidade cres cente a esta região dos ameloblastos. (9 600 X)



FIGURAS 19A e 19B - Região infranuclear e parte da nuclear de ameloblastos do início do terço médio do compartimento secretor. (correspondem a células secretoras de esmalte interno).

FIGURA 19A - Em alguns núcleos (N) pode-se distinguir uma estrutura com aparência de nucléolo (NU), além de poros nucleares (NP) visíveis também em núcleos cortados tangencialmente. Ao lado do núcleo aparecem um citoesqueleto (CE), perfis de retículo endoplasmático rugoso que, às vezes, acumula em suas cisternas um material semelhante ao dos grânulos de secreção (IG). Infranuclearmente uma trama terminal (TW) bem desenvolvida separa uma região rica em mitocôndrias (M), próxima ao núcleo e, distalmente a ele, um bulbo celular complexo com feixe de tonofibrilas (TF) e vesículas encapadas (CV) ligadas à membrana ou não. (6 200 X)

FIGURA 19B - Abaixo do núcleo (N) aparecem mitocôndrias (M) em alguns ameloblastos, enquanto em outros nota-se um retículo endoplasmático rugoso (RER) relativamente bem desenvolvido em cujas cisternas freqüentemente se acumula um material semelhante ao dos grânulos (IG). Logo abaixo da membrana, de alguns ameloblastos, pode-se notar um extenso feixe de tonofibrilas (SSF). "Zonulas aciludentes" (ZO), desmossomas (D) e "zonulas adherentes" (ZA) parecem contribuir para manter os ameloblastos juntos, enquanto microvilosidades (MV) e vesículas encapadas (CV) tornam mais complexo o bulbo celular (BC) dos ameloblastos que estão em relação com células do estrato intermédio (SI). (6 200 X)

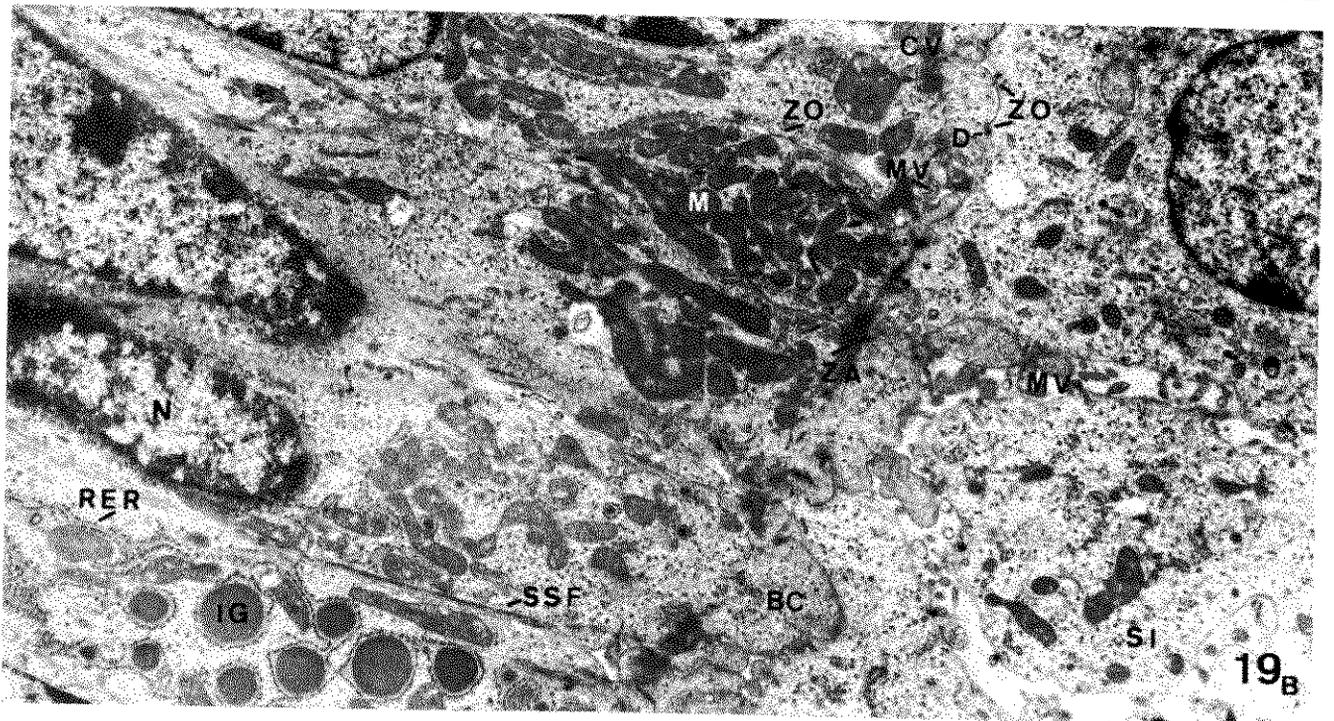
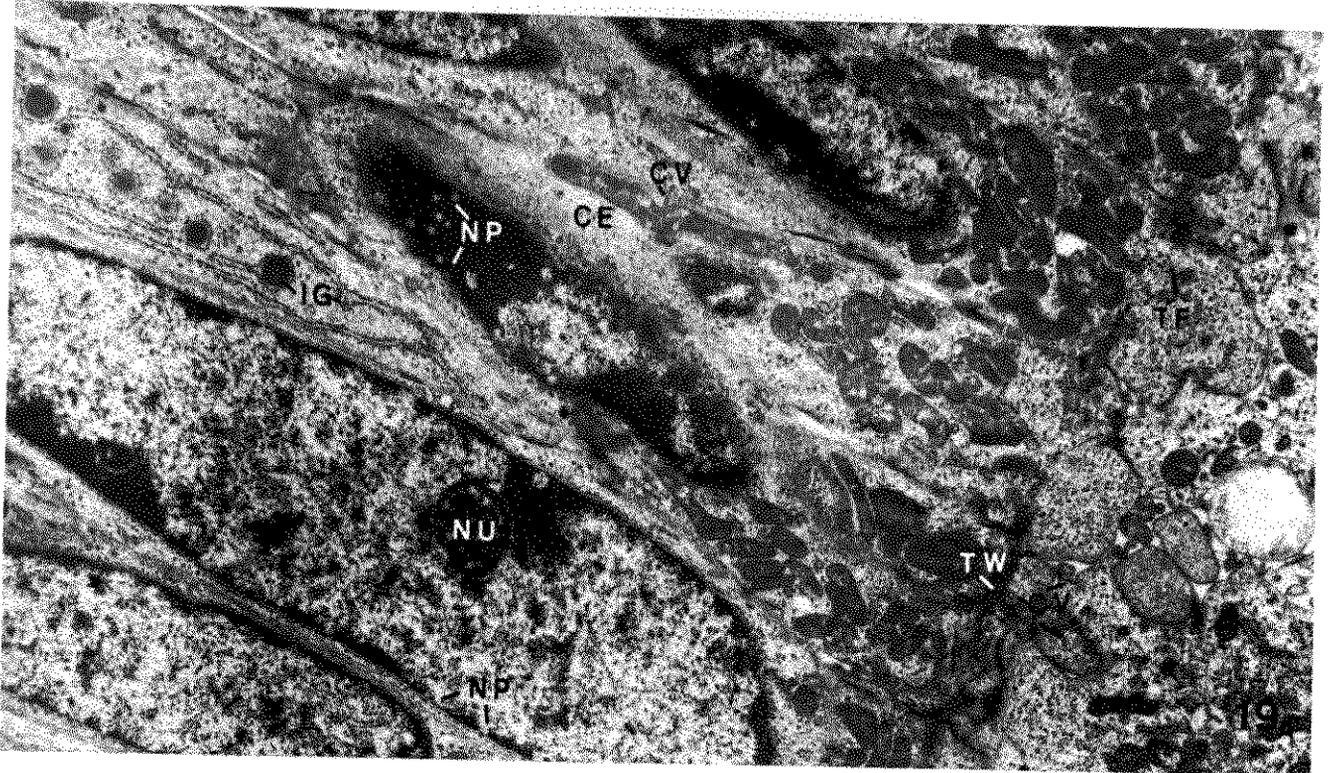
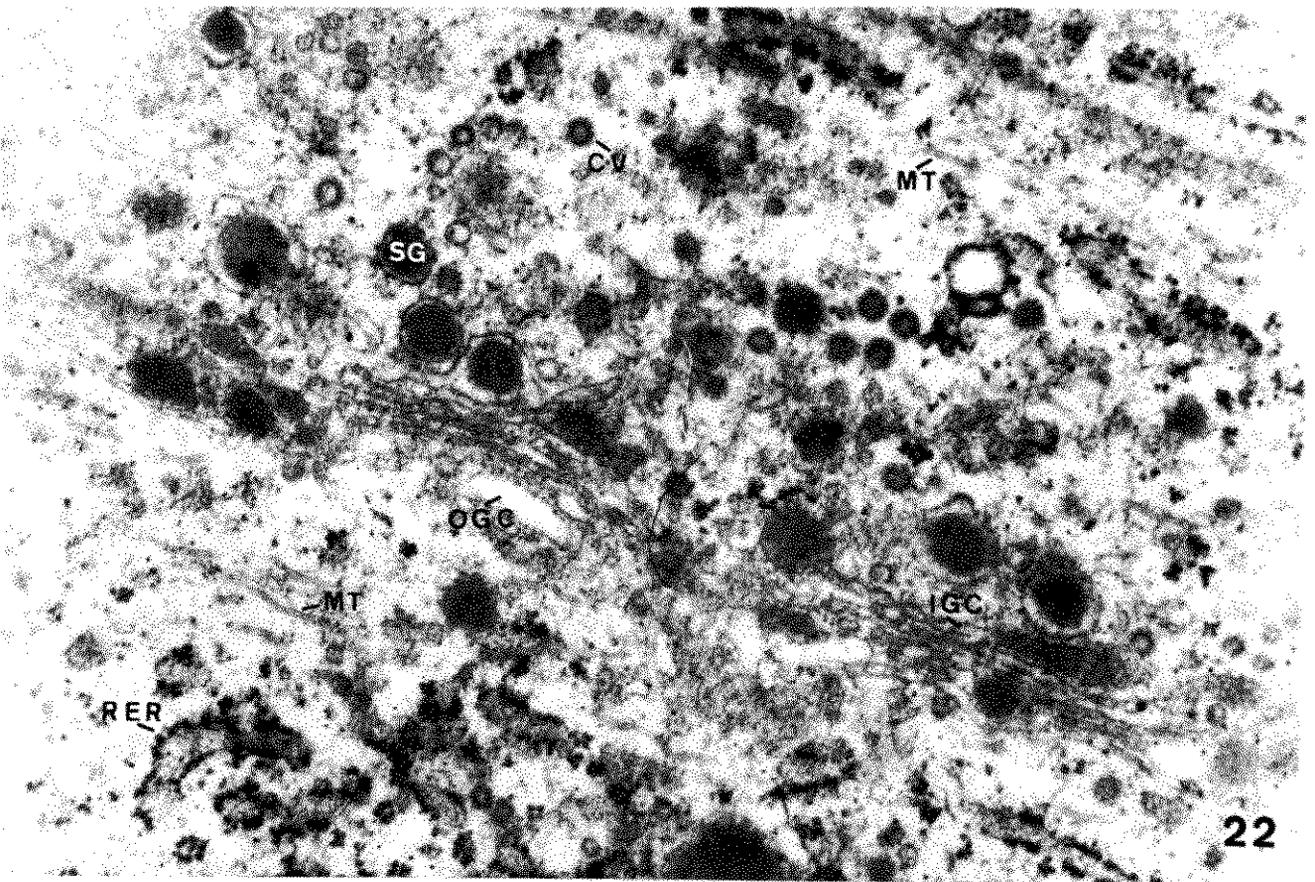
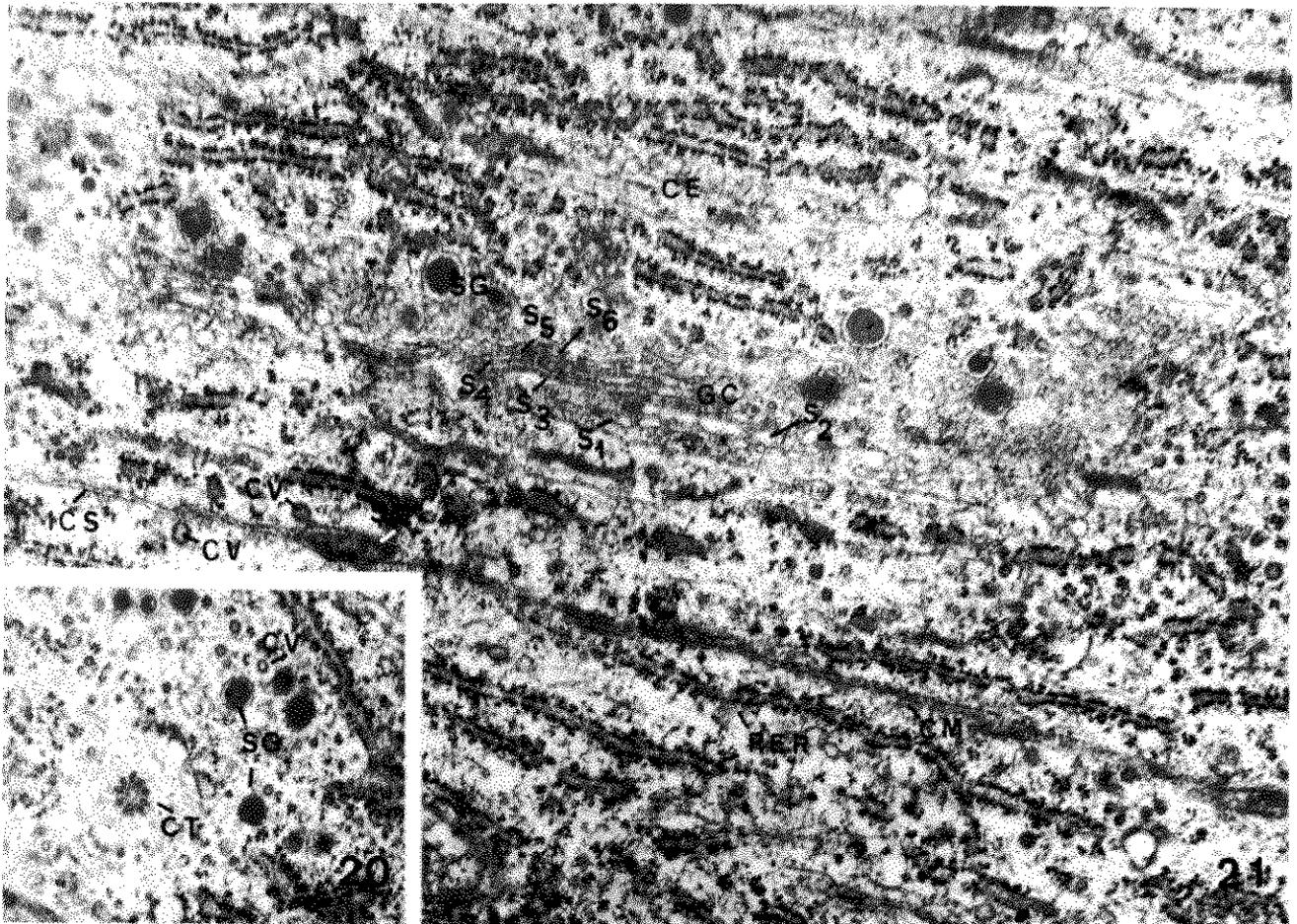


FIGURA 20 - "Insert" - detalhe de uma porção mais distal da região focalizada na Figura 21. Nota-se uma estrutura com aspecto de centríolo (CT) cortado transversalmente, próxima a grânulos de secreção (SG-3000 a 4000Å) e vesículas encapadas (CV- 1500 a 1800Å).

FIGURA 21 - Micrografia de ameloblastos do terço médio do compartimento secretor, focalizando o complexo de Golgi e estruturas vizinhas. O complexo de Golgi (GC) apresenta diversos sáculos (S_1, S_2, \dots, S_6) dos quais os mais externos são formados de frações curtas e largas e têm conteúdo menos denso que os mais internos. Próximos a estes, aparecem muitos grânulos de secreção (SG- 2000 - 3200Å) e vesículas. Vesículas encapadas (CV- cerca de 640Å), bem características, aparecem próximas ou ligadas à membrana celular (CM). No espaço intercelular (ICS), normalmente estreito, às vezes se acumula um material finamente granuloso (SM). Ao redor do complexo de Golgi vemos um, bem desenvolvido, retículo endoplasmático rugoso (RER) e um citoesqueleto (CE). (15 600 X)

FIGURA 22 - Complexo de Golgi de ameloblastos do terço médio do compartimento secretor (células relacionadas à secreção de esmalte interno). Nota-se que os sáculos mais externos do complexo de Golgi (OGC) são, mais curtos, mais largos e têm conteúdo mais claro que os mais internos (IGC). Nas extremidades destes últimos observa-se, às vezes, uma dilatação cujo conteúdo denso (IG) é semelhante ao dos grânulos de secreção (SG- tamanho 2000 - 3400Å). Na região do complexo de Golgi aparece, ainda, uma grande quantidade de vesículas encapadas (CV- 730 - 1000Å) e, próximos a ele, muitos microtúbulos e perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) frequentemente cortados na direção transversal (40 800 X).



FIGURAS 23 a 28 - Região do complexo de Golgi e estruturas relacionadas a ele, de ameloblastos da porção oclusal do terço médio do compartimento secretor.

FIGURA 23 - As membranas celulares (CM), de ameloblastos vizinhos, aparecem muito próximas, de modo que, é estreito, o espaço intercelular (ICS). Um citoesqueleto (CE) formado de fibrilas, isoladas ou em feixes (TF), dispostas longitudinal ou transversalmente (↙ seta branca, inclinada) é responsabilizado, em parte, pela manutenção do formato celular. Na luz do complexo de Golgi notam-se grânulos de secreção e vesículas (1000 a 1300Å). Material semelhante ao dos grânulos aparece, às vezes, em dilatações das extremidade dos sáculos mais internos (IG- 120 a 1000Å) Próximos ao complexo de Golgi notam-se grandes grânulos de secreção (SG- 2000 a 3400Å) (15 800 X)

FIGURAS 24 a 28 - Temos detalhes de estruturas encontráveis na região do complexo de Golgi.

FIGURA 24 - Nesta região, rica em fibrilas e vesículas encapadas de aproximadamente 800 Å, vêem-se, em detalhe, dois corpos multivesiculados de conteúdo claro (MVB₁) e estruturas aparentemente tubulares envolvidas por membrana e preenchidas por um material fibroso (←) (24 000 X)

FIGURA 25 - Detalhe da região supranuclear de ameloblasto secretor, mostrando uma região, lateralmente localizada em relação ao complexo de Golgi. Notam-se perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) e estruturas semelhantes a lisossomas em estágio funcional mais precoce (L₁) ou mais avançado (L₃). ART-artefato (25 500 X)

FIGURA 26 - Detalhe de região de contacto entre dois ameloblastos secretores na altura do complexo de Golgi. Notam-se as membranas celulares (CM) muito próximas deixando, entre os ameloblastos, pequeno espaço intercelular (ICS). Próximos à membrana vemos um corpo multivesiculado de conteúdo denso (MVB₂) e vesícula encapada (CV- de aproximadamente 1500Å). (40 000 X)

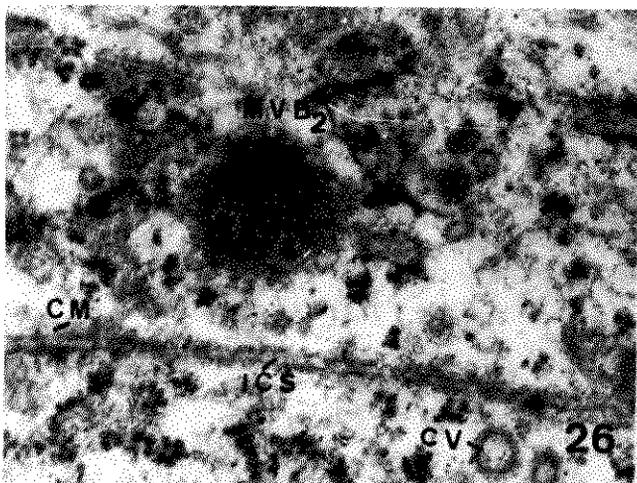
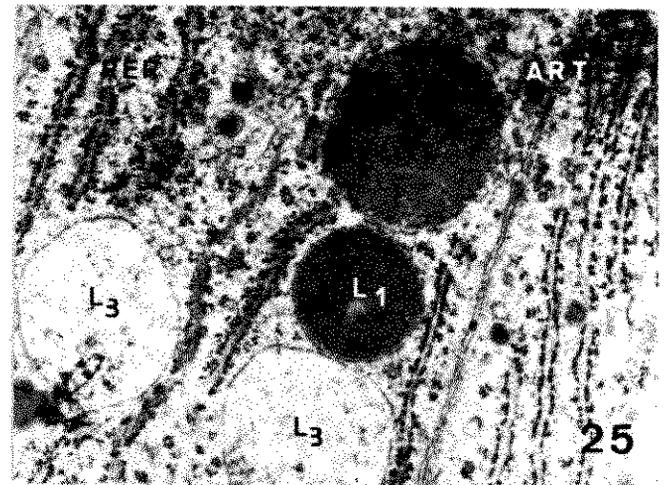
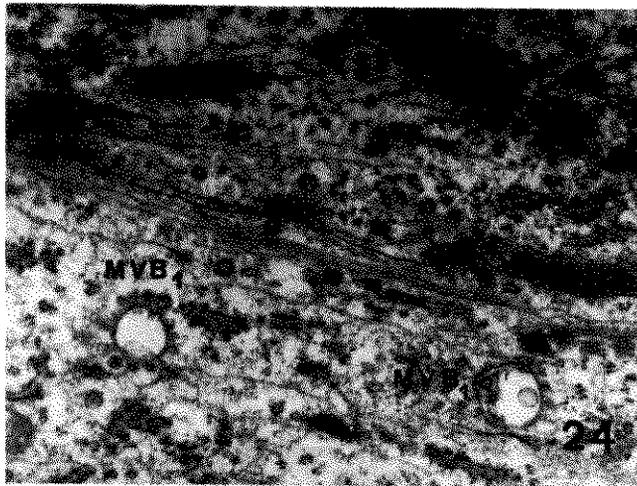
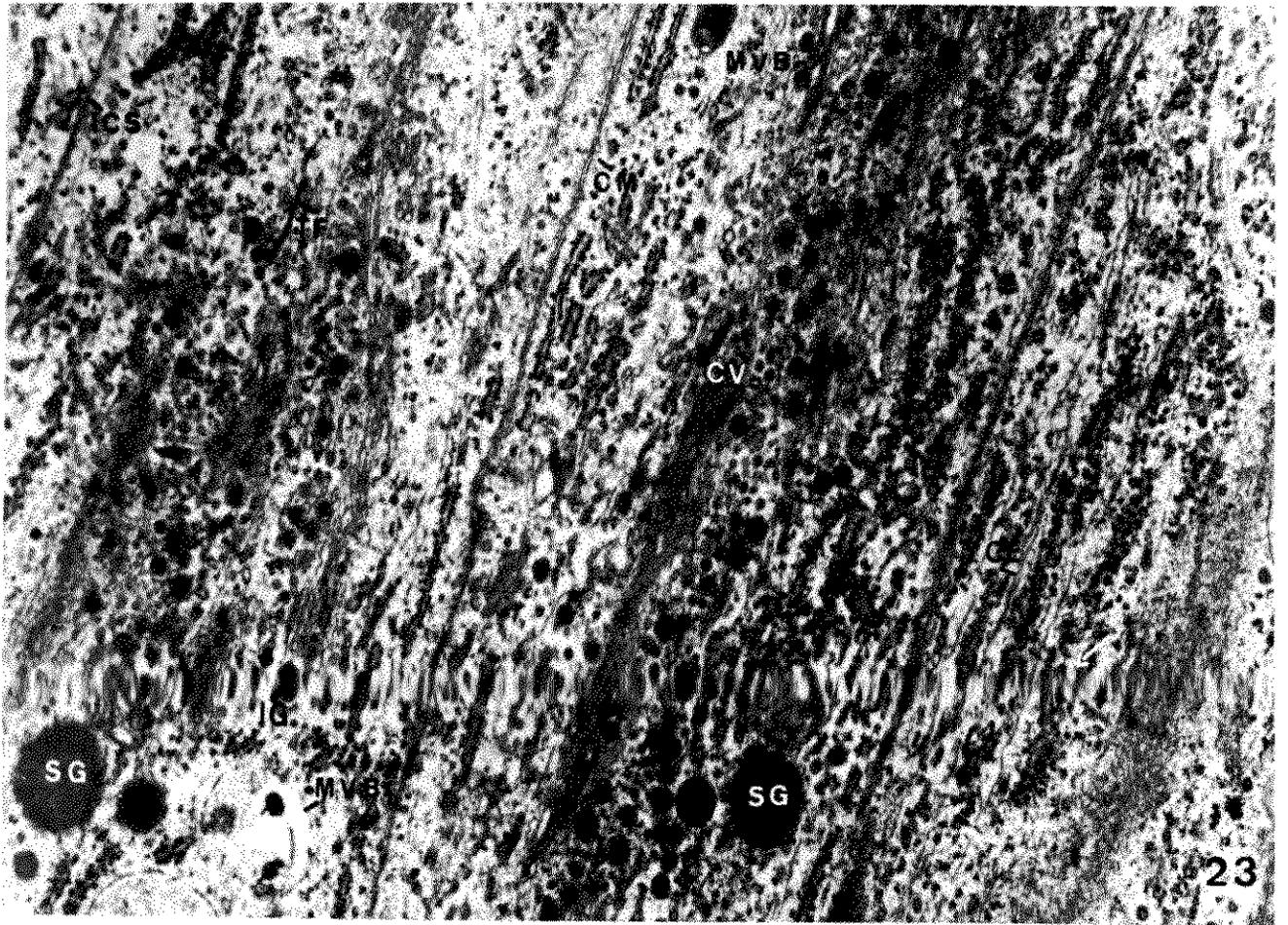


FIGURA 29 - Micrografia de corte transversal do complexo de Golgi de ameloblasto do terço mais oclusal do compartimento secretor. (responsável pela secreção do esmalte externo. O complexo de Golgi (GC) constitui-se de pilhas de sáculos que se dispõem num arranjo semelhante a um U. Na parte interna a este arranjo as estruturas mais abundantes são as vesículas encapadas (CV- cerca de 720Å) e na extremidade superior direita do complexo vê-se um grânulo de secreção (SG). Outros grânulos semelhantes a esse, aparecem nesta região porém externamente colocados em relação ao GC. São alongados, e seu mais longo eixo mede entre 3900 a 6200Å. Lateralmente ao GC, aparecem, ainda, inúmeras cisternas de retículo endoplasmático rugoso, cortadas transversalmente e contendo um material finamente granulado em suas cisternas (IM). Além do RER são comuns aí, os microtúbulos (MT). No espaço intercelular (ICS), às vezes, relativamente largo, aparecem porções isoladas de citoplasma (talvez microvilosidades) com estruturas distintas em seu interior (na porção inferior direita vemos uma com vesícula encapada (CV- 1800Å) em seu interior (27600 X)

FIGURA 30 - Região supranuclear proximal de ameloblasto secretor de esmalte interno. No núcleo notam-se poros (NP) entre regiões heterocromáticas, provavelmente, e logo acima do núcleo (à direita, na fotografia) vemos uma fração de retículo endoplasmático rugoso - (RER) e na célula vizinha uma grande quantidade desta organela. No ameloblasto da parte superior notam-se corpos multivesiculados de conteúdo claro (MVB₁) e feixes de tonofibrilas (TF). Nota-se, ainda, uma projeção de um ameloblasto em direção ao seu vizinho e, ao redor dela, um acúmulo de material de textura fina (FTM). Nessa mesma região nota-se uma estrutura semelhante à parte de um túbulo, com material fibrilar em seu interior (← seta preta horizontal) (19 700 X)

FIGURA 27 - Também na altura do complexo de Golgi, nota-se, a qui um corpo multivesiculado de conteúdo predominantemente claro (MVB_1). (24 000 X)

FIGURA 28 - Notam-se, aqui, corpúsculos esféricos, com conteúdos de aspecto e densidade variados, parecendo os rela cionados a processos digestivos. (18 000 X)

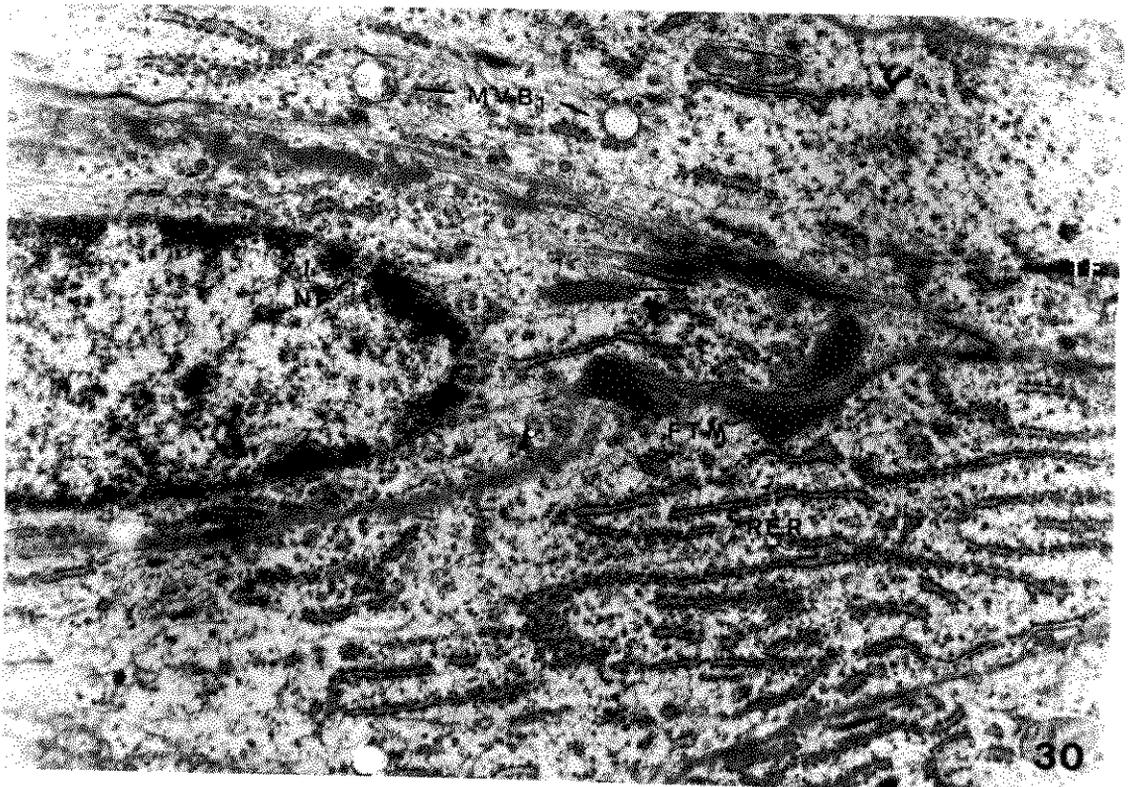


FIGURA 31 - Região supranuclear mais distal e processo de Tomes de ameloblastos do fim do terço apical do compartimento secretor. Considera-se como processo ameloblástico (ou processo de Tomes) a porção, da célula, situada além da trama terminal (TW). Na porção supranuclear, que se estende até a trama terminal nota-se um retículo endoplasmático rugoso (RER), predominantemente paralelo ao longo-eixo da célula. As membranas celulares (CM) laterais, muito juntas, apenas raramente permitem acúmulo de um material denso (DM) no espaço intercelular. Nesta micrografia, nota-se uma vesícula encapada (CV), com material denso em seu interior, em contacto com esse local de acúmulo. Em alguns ameloblastos a trama celular resume-se a uma estrutura cônica próxima à "zonula adherens" (ZA) e podem-se ver estruturas semelhantes a grânulos densos, vesículas e microtúbulos (MT) atravessando o espaço livre de fibras da TW, em direção ao processo de Tomes. Porém não observamos RER adentrando esses processos. Nos processos de Tomes observamos grânulos densos, semelhantes aos de secreção (SG aproximadamente 2700Å), microtúbulos (MT), vesículas encapadas (CV- 1000 a 1350Å), além de outras estruturas menos características. Apresentam contorno bastante irregular, com invaginações bem profundas, às vezes. EM- matriz do esmalte. (14500 X)

FIGURA 32 - Processos de Tomes de ameloblastos mais apicais do terço médio do compartimento secretor. Além das estruturas gerais, descritas na Figura 31, (MT- microtúbulo, CV- aproximadamente 1000Å, vesícula encapada, SG- 1000 a 2500Å, grânulos semelhantes aos de secreção da região do complexo de Golgi) notam-se aqui, uma espécie de túbulo profundo (↓ seta vertical) que se estende entre a membrana lateral e o interior do ameloblasto transversalmente e uma estrutura semelhante a um corpo multivesiculado claro (MVB₁) ou a um lisossoma em estágio funcional adiantado (L₃). EM - matriz do esmalte. Abaixo da trama terminal (TW) e "zonula adherens" (ZA) notam-se perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) (19700 X)

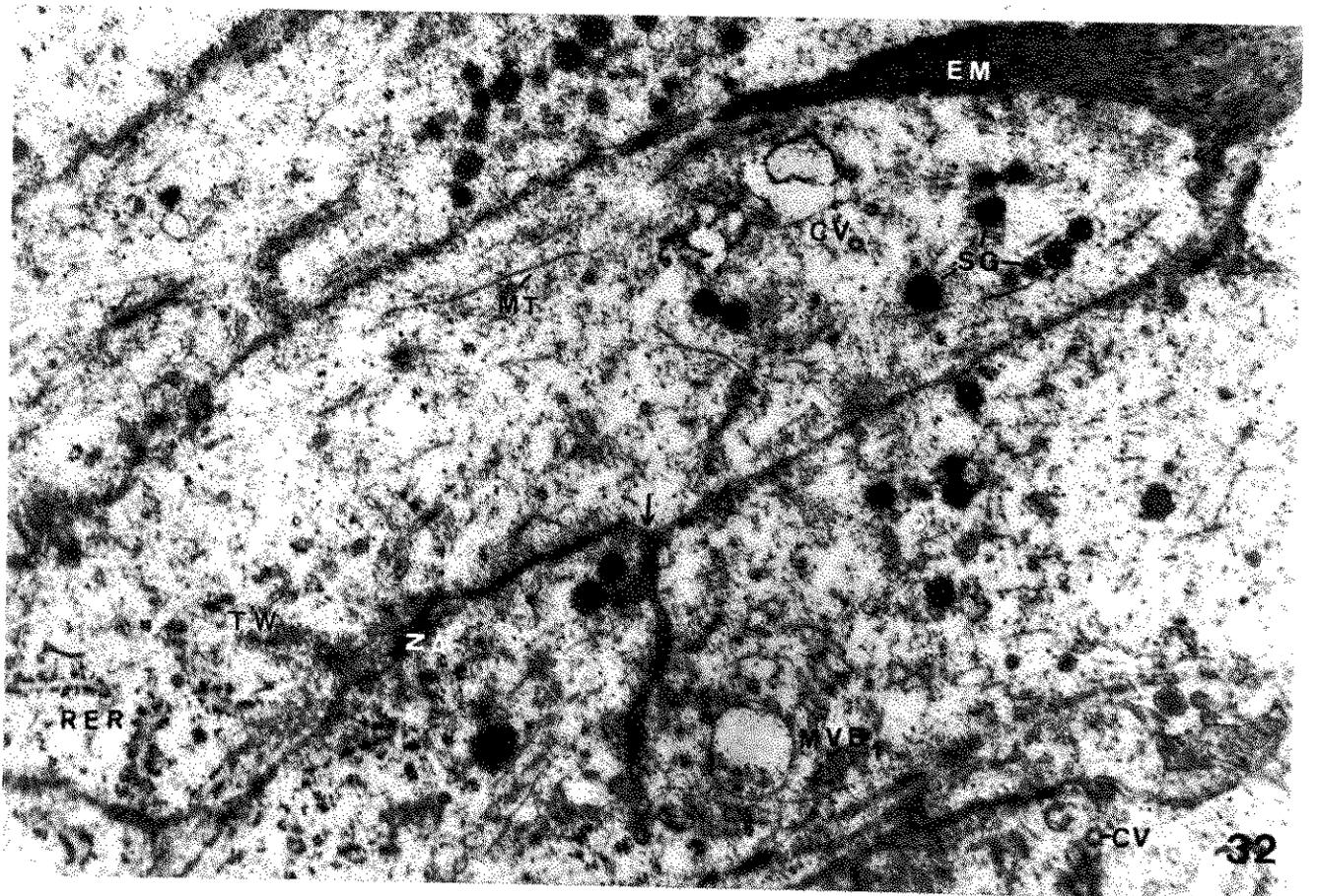
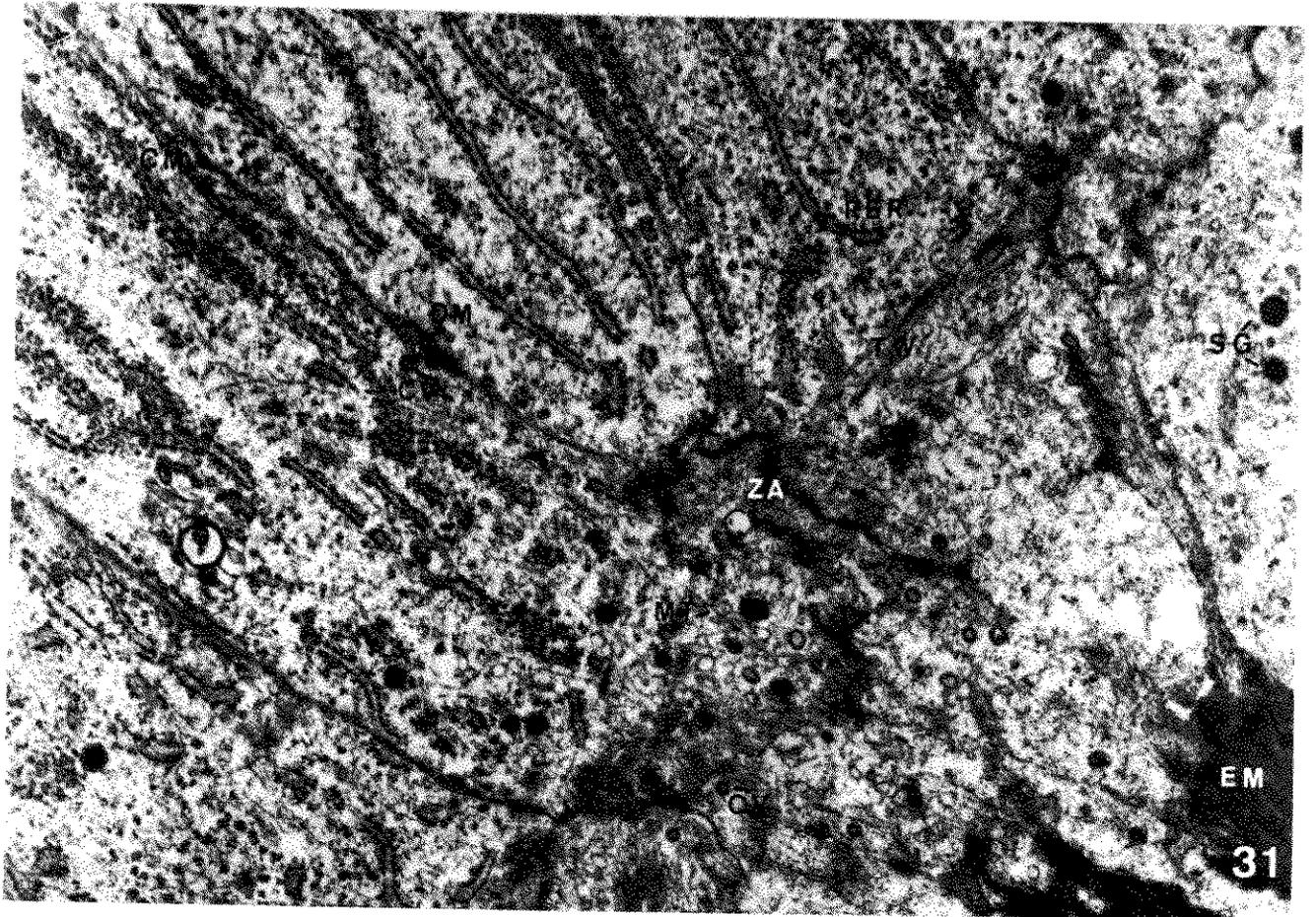


FIGURA 33 - Processos de Tomes de ameloblastos mais oclusais do terço médio do compartimento secretor. Na região voltada para a matriz do esmalte (EM), as freqüentes invaginações apresentam, às vezes, um material homogêneo, de textura fina (FTM) ou um material finamente granulado (SM). Dentro do processo notam-se grânulos de secreção (SG- 1250 a 2500Å), vesículas pouco características, corpos multivesiculados claro (MVB₁) e escuro (MVB₂), sendo que, este último, na altura que normalmente seria ocupada pela trama terminal. TF- feixes de tonofilamentos (23 700 X)

FIGURA 34 - Processos de Tomes de ameloblastos do terço mais oclusal do compartimento secretor. Nota-se um aumento relativo dos grânulos de secreção (SG- 1500 a 2500Å). Vesículas encapadas (CV- 1000 a 1500Å) podem ser vistas próximas à membrana celular ou abrindo-se nela. No limite entre a parte proximal e a extremidade livre dos processos ameloblásticos (AP), acumula-se, às vezes, um material finamente granulado (SM). MT- microtúbulo; EM- matriz do esmalte; ART artefato. (20 000 X)

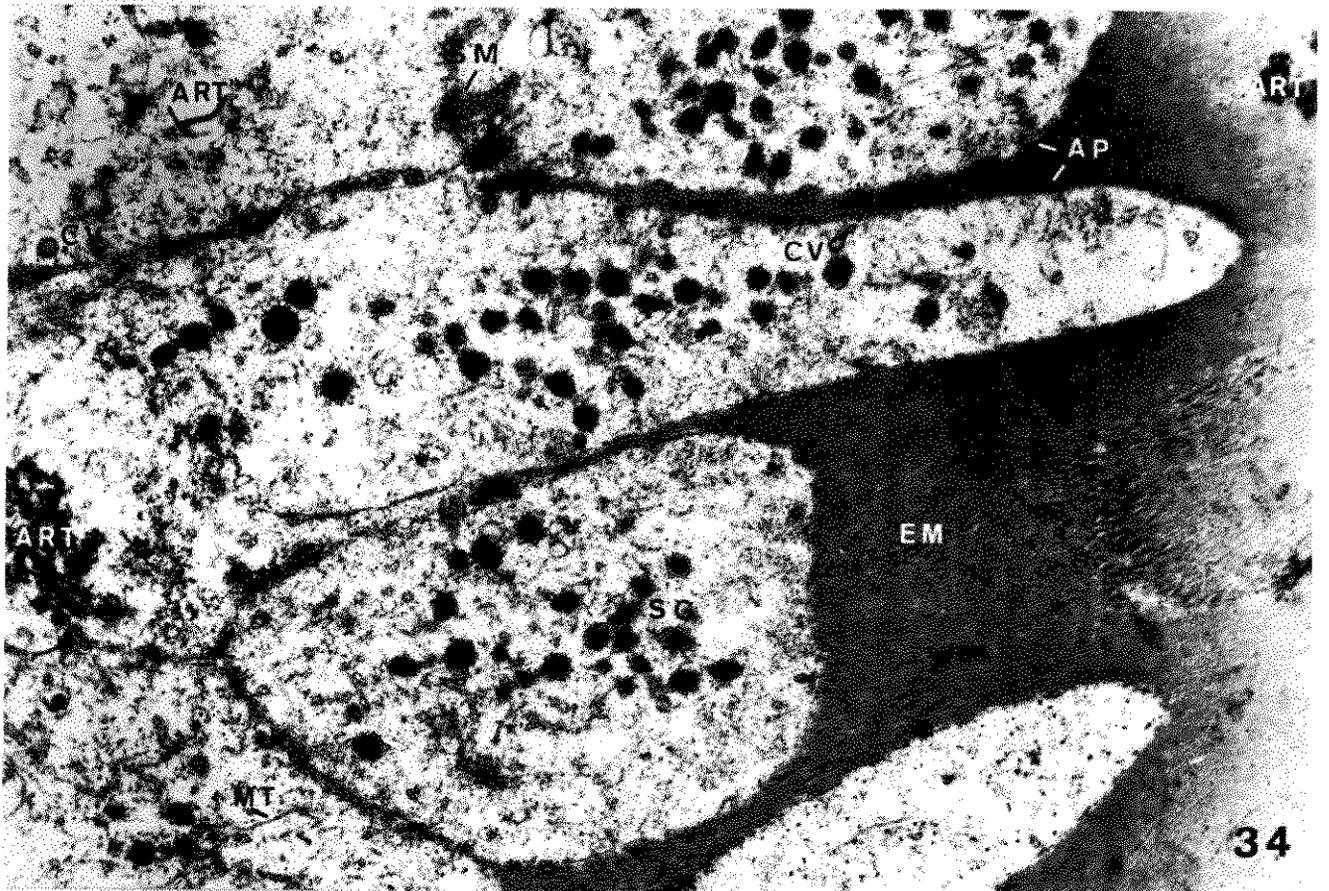
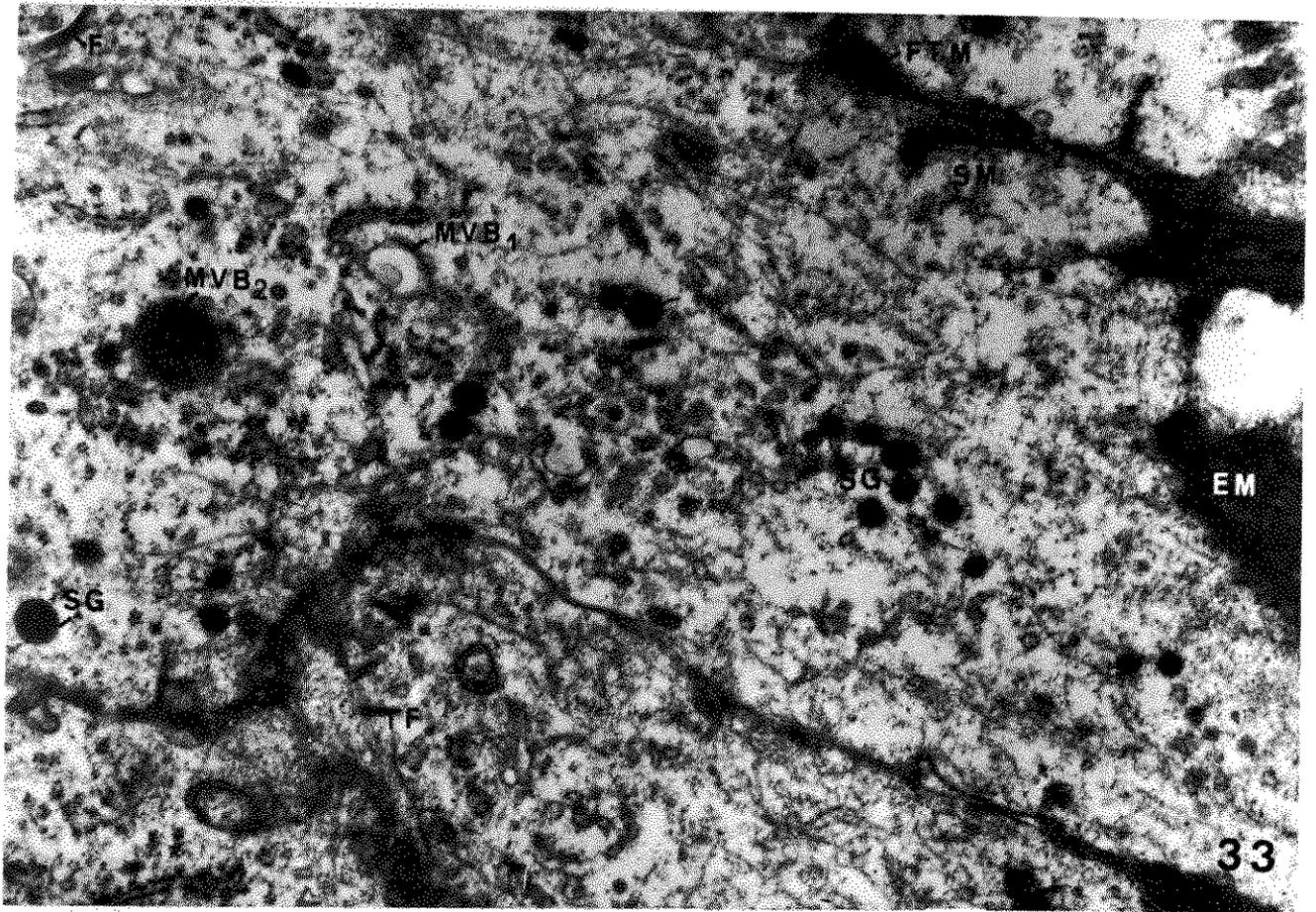
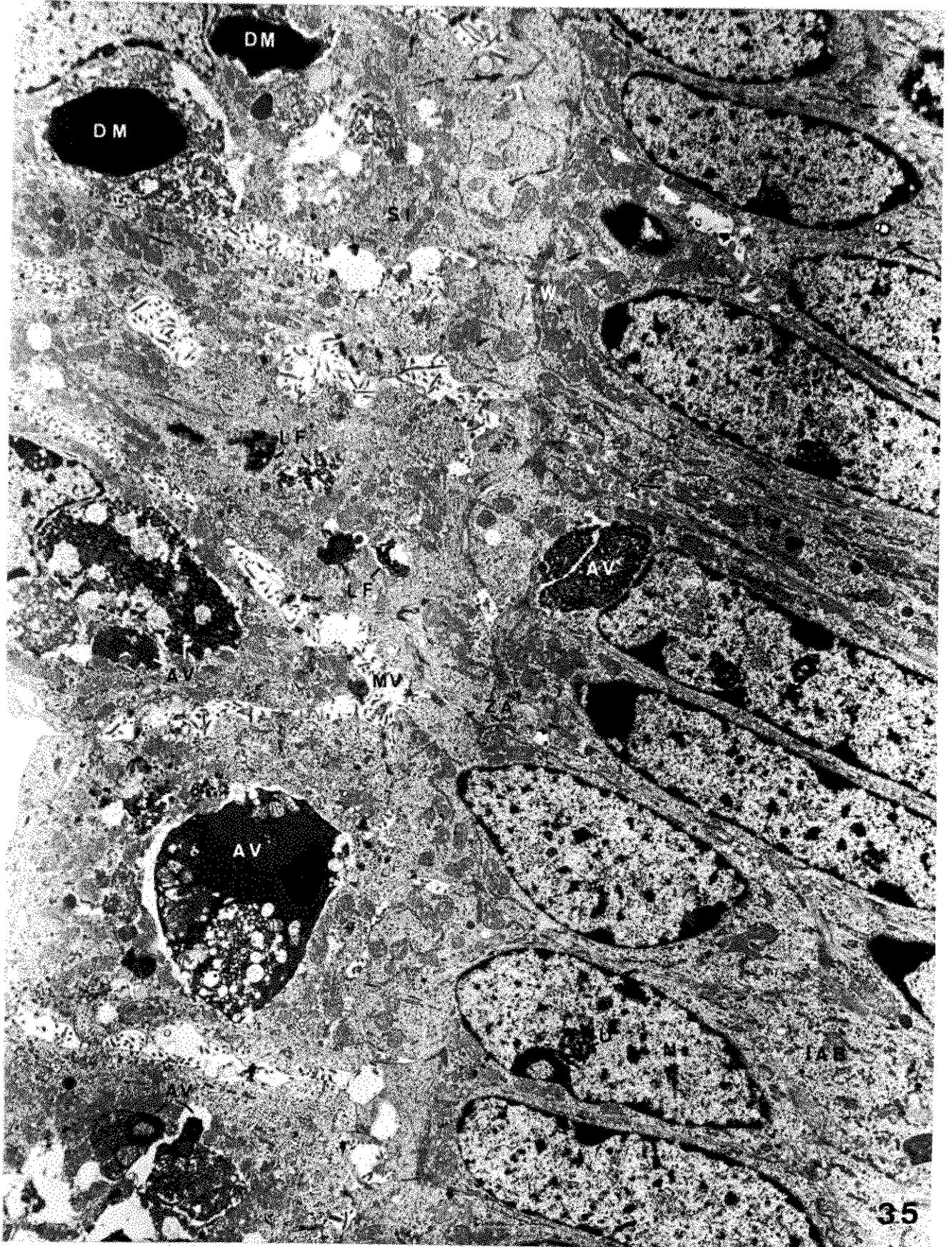


FIGURA 35 - Regiões "nuclear" e "infranuclear" dos ameloblastos do compartimento de transição entre os de secreção e pós-secreção. A principal característica das células deste compartimento é a presença de grandes estruturas envolvidas por membrana em cujo interior podemos reconhecer, às vezes, corpos que lembram fragmentos celulares. São os chamados vacúolos autofágicos (AV) e aparecem tanto nos ameloblastos (IAB) como em células do estrato intermédio (SI). Nestas últimas encontramos, ainda, pequenos fragmentos (LF), que lembram miniaturas dos AV, e corpos com um material denso (DM) e homogêneo em seu interior. Os ameloblastos, aqui também, interfásicos (IAB) têm núcleo (N) com formato e tamanho variáveis em diferentes células. Em muitos desses núcleos distingue-se uma estrutura com aspecto de nucléolo (NU). A trama terminal (TW) e a "zonula adherens" (ZA) infranucleares, da maioria dos ameloblastos, mantêm-se neste compartimento. O espaço interameloblástico normalmente é estreito, mas onde se alarga, às vezes, projetam-se estruturas semelhantes a bolhas (← seta horizontal) ou a microvilosidades para esse espaço. Os grandes espaços, entre os ameloblastos e células do estrato intermédio, exibem grande número de microvilosidades (MV). (5 200 X)



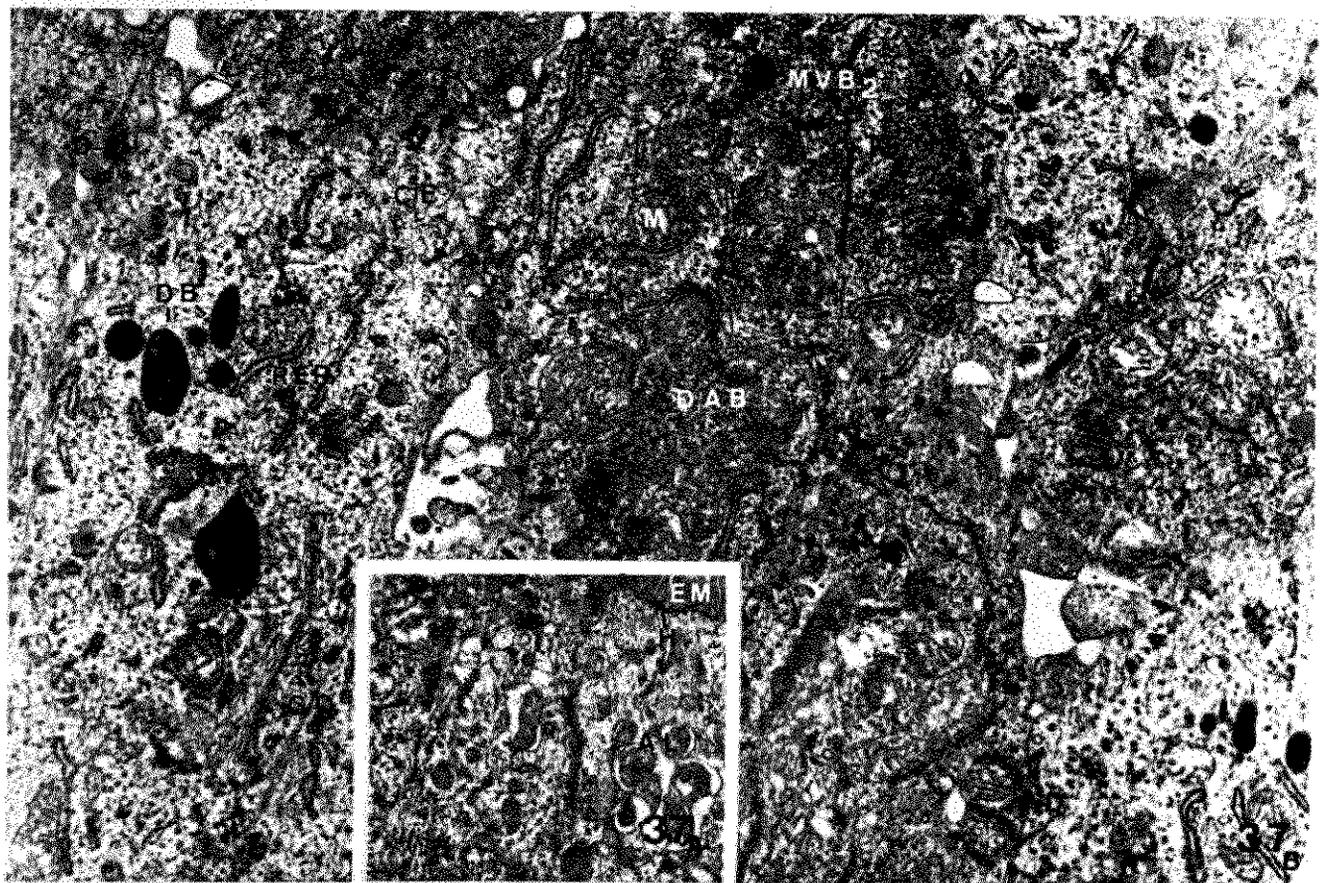
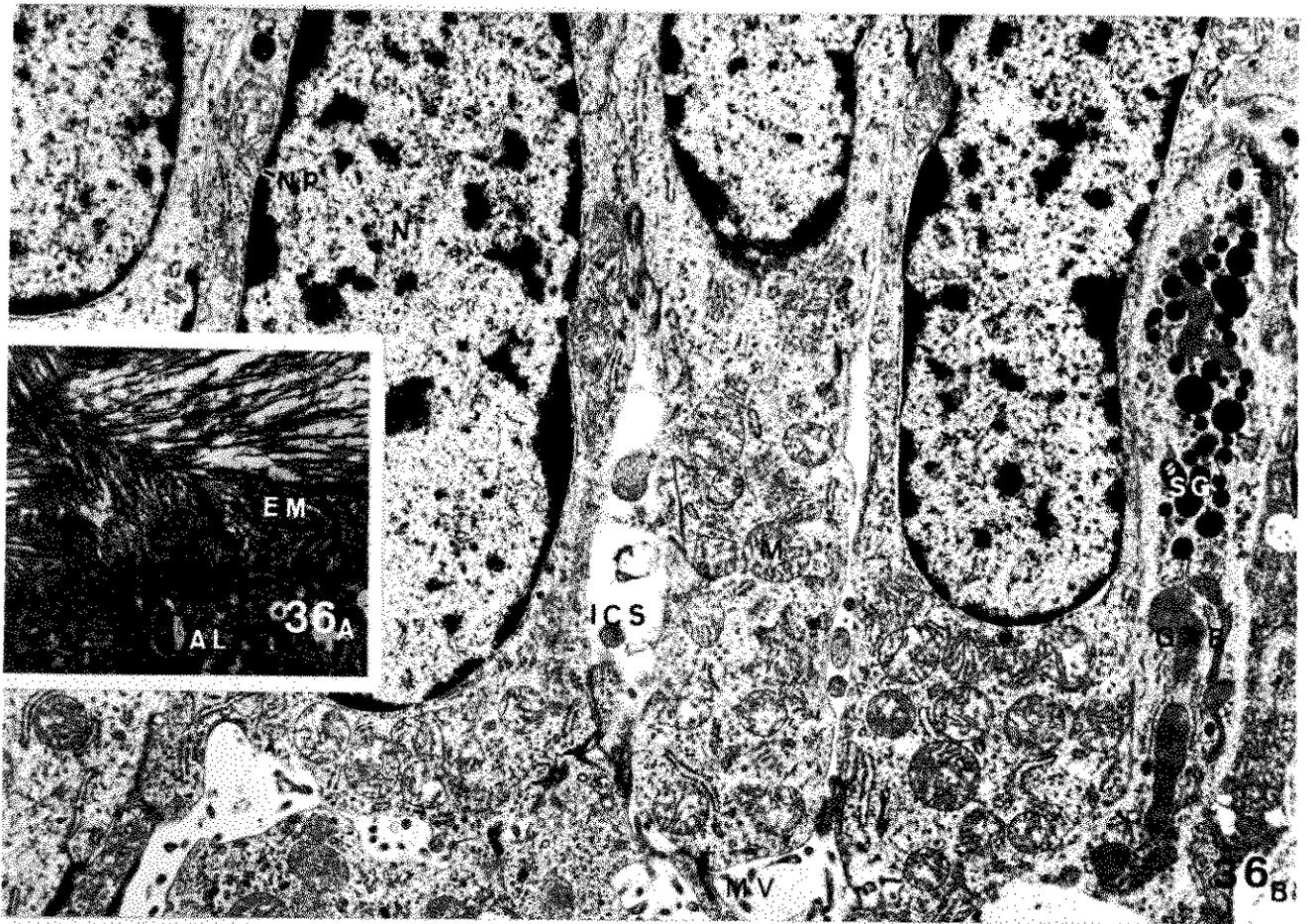
FIGURAS 36A e 36B - Micrografias de ameloblastos pós-secretore
da zona "D".

FIGURA 36A - A matriz do esmalte (EM) dispõe-se como fibras entremeadas de regiões claras. A membrana do ameloblasto adjacente à matriz começa a se invaginar em alguns pontos como a iniciar o desenvolvimento do "labirinto apical" (AL) ou bordo estriado. Adjacentes a essas invaginações aparecem estruturas, não muito características, que lembram mitocôndrias. - (7 500 X)

FIGURA 36B - À direita estão as células mais apicais. Relativamente raros, os ameloblastos granulares (GAB) são células em cujo interior se acumula um grande número de estruturas densas, semelhantes a grânulos de secreção ("SG") embora se encontrem, já, no compartimento pós-secretor. Na região "infranuclear" já não se distingue uma trama terminal, mas aparecem, ainda, muitos mitocôndrias (M) nesse espaço. Entre os ameloblastos e entre eles e as células do estrato intermédio aparecem grandes espaços intercelulares (ICS) Observa-se, às vezes, microvilosidades (MV) nesses espaços. (8 000 X)

FIGURA 37A - Região supranuclear distal de ameloblastos mais oclusais que os da Figura 36A. Nota-se uma evolução na complexidade do labirinto apical (AL); H-hemidesmossoma; EM- matriz do esmalte (11 700 X)

FIGURA 37B - Região supranuclear de ameloblastos mais oclusais que os da Figura 36B. Os resultados de nossas primeiras tentativas em obtermos cortes longitudinais, sugerem que os ameloblastos mudam ligeiramente sua inclinação na zona "D". No centro da figura notamos uma célula mais escura (DAB) que é considerada, por alguns autores, uma célula ligeiramente defeituosa. De um modo geral, nessa região desses ameloblastos, notam-se muitos mitocôndrias (M), fibrilas isoladas formando um citoesqueleto (CE) ou feixe de tonofibrilas (TF), corpos multivesiculados [aqui se vê um de conteúdo denso (MVB₂)], corpos densos (DB), uma



FIGURAS 38 e 39 - Ameloblastos pós-secretóres oclusais da zona "E".

FIGURA 38 - Porção mais distal da região "supranuclear". Nota-se uma grande redução no material orgânico da matriz do esmalte (EM) remanescente após o processamento histológico utilizado. Entre as invaginações que formam o labirinto apical (AL) aparecem no lado interno da membrana dos ameloblastos, espessamentos morfológicamente semelhantes a hemidesmossomas. Os poucos perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) que permanecem nessas células aparentemente não têm uma disposição preferencial. Mitocôndrias (M) aparecem espalhados por toda a região "supranuclear", bem como corpos densos (DB) e vesículas de vários tipos (V_1, V_2, V_3, V_4), que talvez correspondam a estruturas relacionadas a digestão intracelular em diferentes estágios funcionais. Consideramos vesículas do tipo 1- (V_1)- àquelas envoltas por uma membrana densa e cujo conteúdo mais claro inclui, também, um "núcleo" denso; vesículas do tipo 2- (V_2)- àquelas formadas por um material claro onde se vêem pequenos pontos mais escuros, bem como um "núcleo" mais denso; vesículas do tipo 3- (V_3)- àquelas relativamente homogêneas e cujo conteúdo apresenta densidade alta e vesículas do tipo 4- (V_4)- àquelas contendo um material denso, aparentemente granuloso, com uma espécie de contorno mais escuro logo abaixo da membrana. (8 000 X)

FIGURA 39 - Porção mais proximal da região "supranuclear". As mitocôndrias (M) estão espalhados de modo aparentemente casual nessa região. Pode-se observar uma projeção semelhante a uma vesícula em alguns mitocôndrias (\downarrow). O retículo endoplasmático rugoso (RER) parece não ter uma disposição preferencial e o complexo de Golgi (GC) perde o seu formato tubular aparecendo como pilhas simples de sáculos (dictiossomas), em um ou mais locais, na mesma célula. Na região do GC existem vesículas encapadas (CV), corpos densos (DB) e outras estruturas menos característi

quantidade bem menor de perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) e um complexo de Golgi (GC), que perde o seu formato tubular. Entre os ameloblastos, aparecem espaços intercelulares (ICS) relativamente grandes, mas ainda há muitos desmossomas (D). -

(11 700 X)

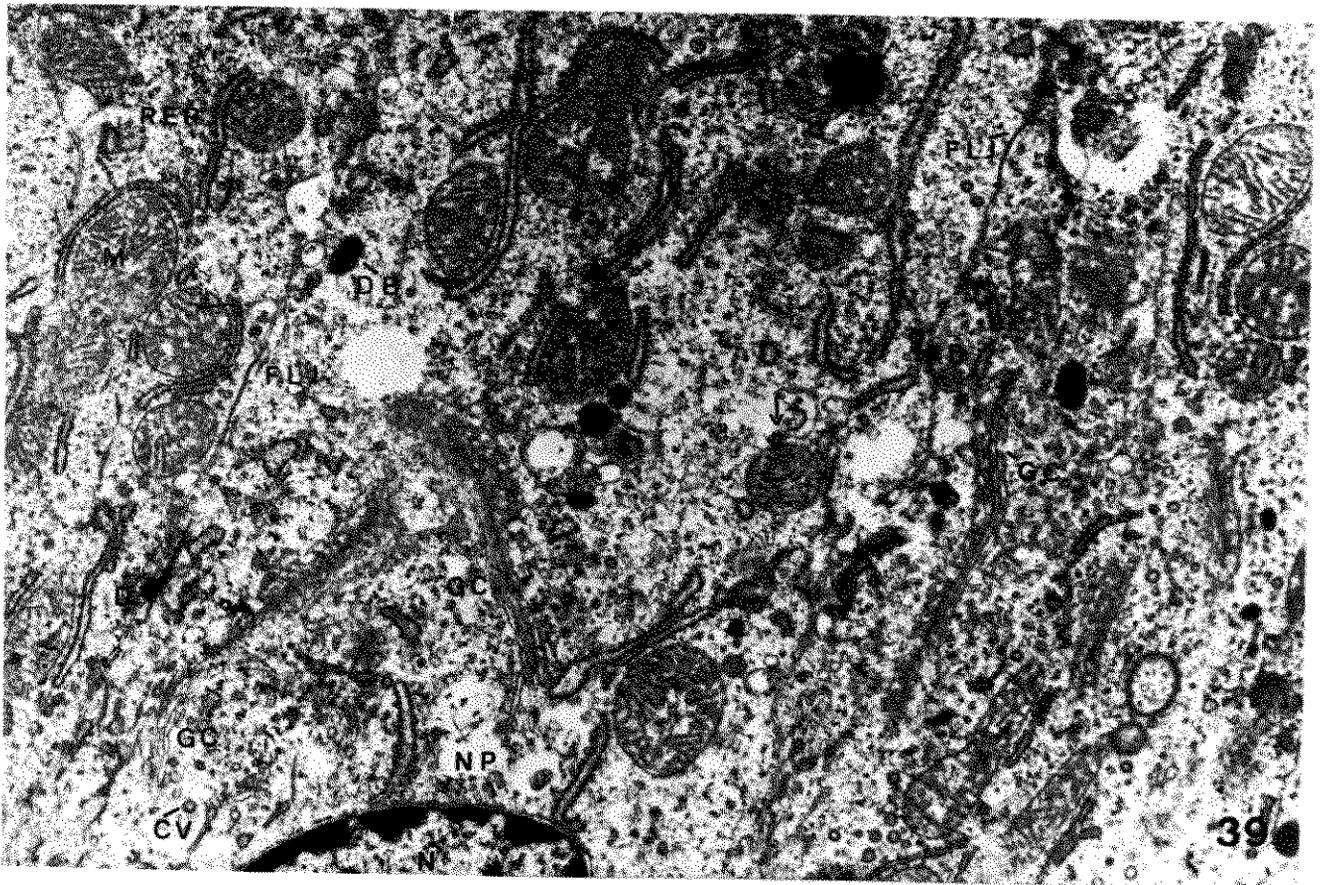
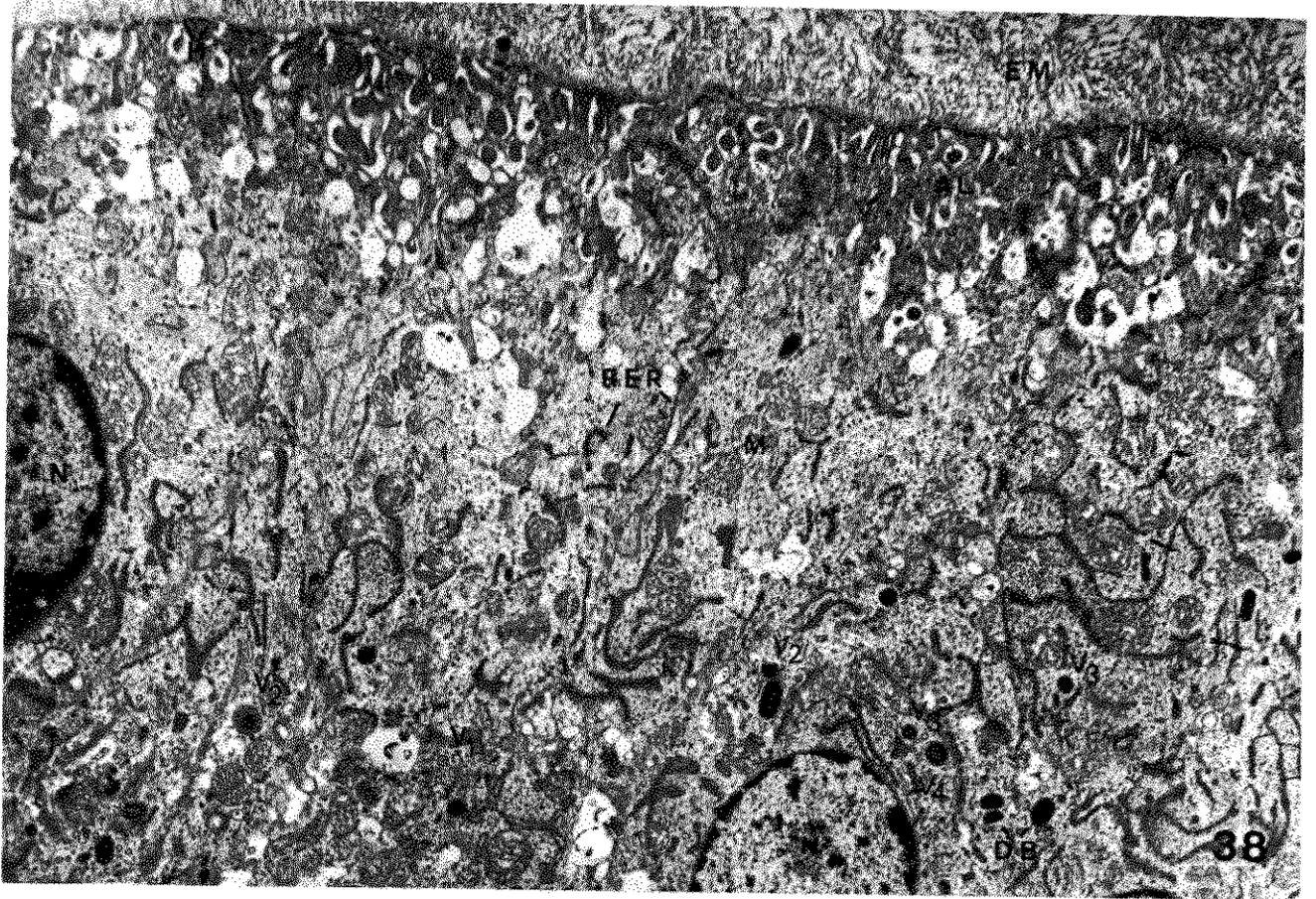


FIGURA 40 - Região "supranuclear" de ameloblastos pós-secretóres, mais oclusais, da zona "E". Nota-se a pequena quantidade, remanescente, de matriz do esmalte (EM) após o processamento histológico utilizado. Na parte interna da membrana ameloblástica voltada para o esmalte aparece uma grande quantidade de estruturas densas, morfológicamente semelhantes a hemidesmosomas (H), nos espaços entre as invaginações, que constituem uma das principais estruturas do "labirinto apical" (AL). Outras, menos abundantes, são os corpos, envoltos por membrana, contendo um material granuloso, que são citados na literatura como corpos membranosos não descritos (←). Mitocôndrias (M) aparecem em número considerável na região do AL., mas perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) são vistos, apenas, entre o nível da "zonula adherens" (ZA) e o núcleo. A ZA e feixes de tonofibrilas (TF) podem ser os responsáveis pela manutenção do formato celular, mas a falta de outras estruturas juncionais entre as membranas celulares (CM) de ameloblastos vizinhos, possibilita o aparecimento de grandes espaços intercelulares, nos quais se encontra um grande número de microvilosidades (MV). MVB₁ - corpos multivesiculados de conteúdo claro. (27 600 X)

cas. Nessa micrografia os ameloblastos aparecem bem juntos e entre eles notam-se desmossomas (D) e junções firmes com aspecto semelhante ao das pentades tratificadas (FLJ). O núcleo (N) apresenta poros nucleares (NP). (9 600 X)

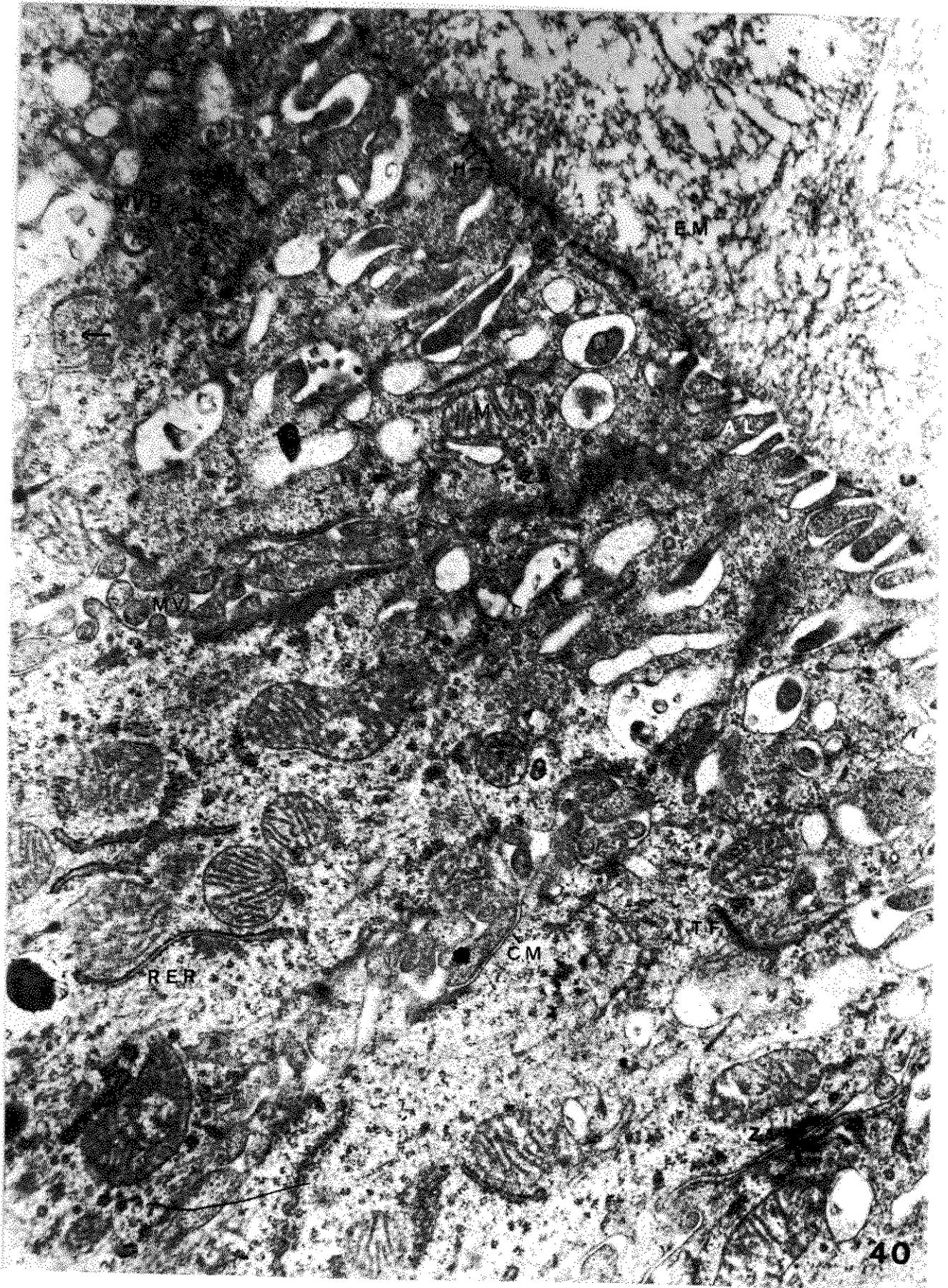


FIGURA 41 - Região "supranuclear" proximal de ameloblastos pós-secretores, oclusais, da zona "E". O núcleo (N) apresenta estruturas semelhantes a poros (NP) na carioteca. No citoplasma "supranuclear" proximal notam-se: poucos perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) e um complexo de Golgi (GC) pouco desenvolvido. Porém, aparecem em maior número, corpos densos (DB), vesículas encapadas (CV), corpos multivesiculados de conteúdo relativamente claro (MVB₁) e estruturas semelhantes a lisossomas em estágio funcional adiantado (L₃). Próximo ao "labirinto apical" notam-se várias frações de feixes de tonofibrilas - (TF), que talvez façam parte de um mesmo sistema de sustentação. Uma estrutura juncional semelhante a "zonula ocludens" (ZO) pode ser vista, em alguns pontos, entre dois ameloblastos vizinhos. As membranas de células (CM) contíguas, nem sempre muito juntas, permitem o aparecimento de grandes espaços intercelulares (ICS) nos quais muitas vezes se observam microvilosidades (MV). Próximo ao "labirinto apical", podem aparecer "corpos membranosos não descritos" - (←) no ICS. ART - artefato (27 600 X).

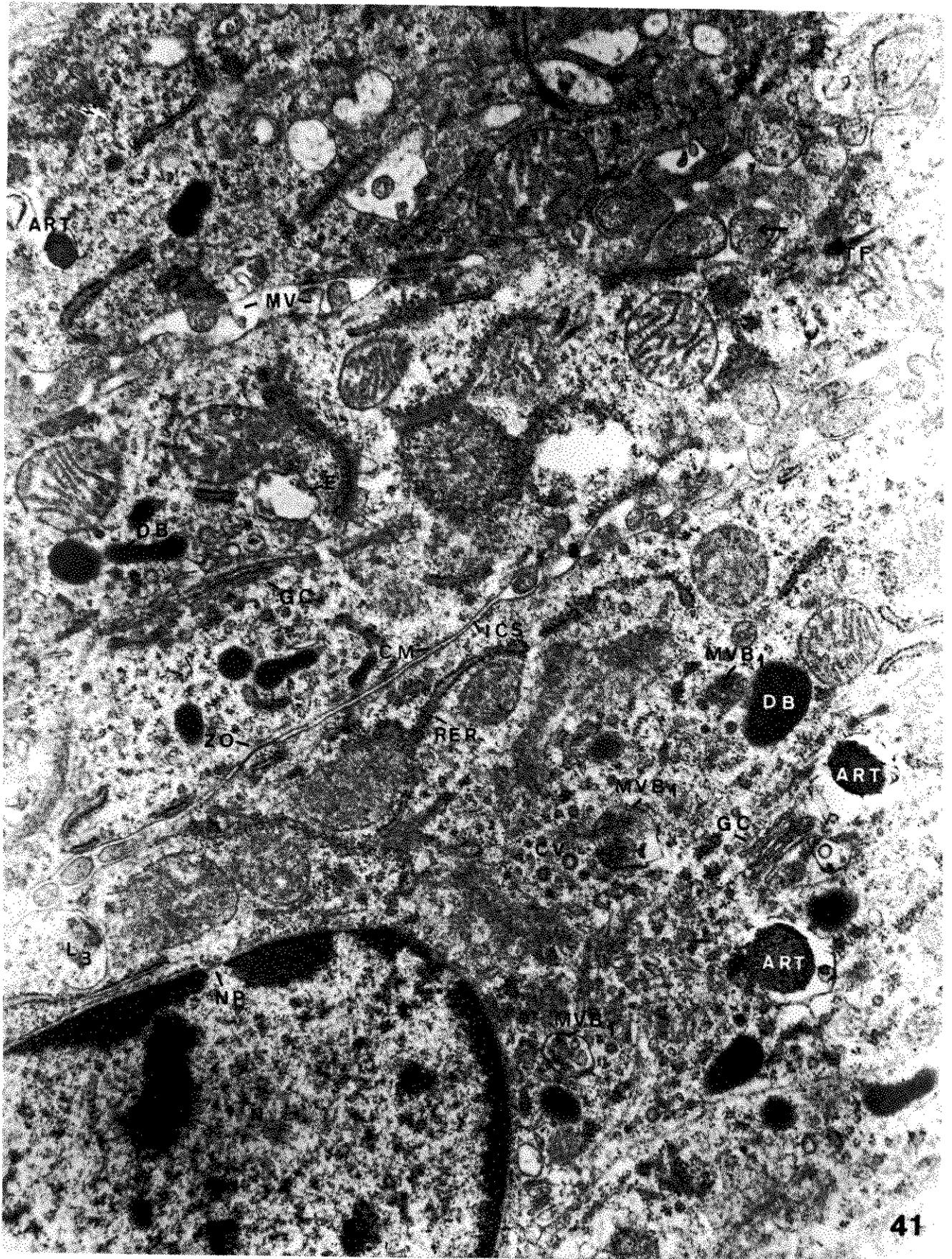


FIGURA 42 - Região "supranuclear" de ameloblastos reduzidos, da zona "E" do compartimento pós-secretor. No "labirinto apical" pode-se notar um material de aspecto semelhante ao da matriz do esmalte (EM), no interior de algumas invaginações (↙ - seta branca inclinada). A seta preta, horizontal (←) indica "corpos membranosos não descritos", apenas citados na literatura. Mitocôndrias (M) e alguns perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) podem ser vistos nesta região, bem como um ou outro corpo denso (DB) e alguns microtúbulos (MT). Entre os ameloblastos podem-se notar algumas estruturas juncionais como "zonula adherens" (ZA) e desmossoma (D). (18 200 X)

FIGURA 43 - Região "infranuclear" de ameloblastos reduzidos da zona "E" do compartimento pós-secretor. Nota-se o núcleo (N) e, no citoplasma "infranuclear", mitocôndrias (M) e algumas porções de retículo endoplasmático rugoso (RER). Os grandes espaços entre as bases dos ameloblastos podem ser devidos em parte à ausência de estruturas juncionais e, em parte, a artefato de técnica. Entre os ameloblastos e as células do estrato intermédio (SI) aparecem alguns desmossomas (D), e, nos espaços intercelulares, há muitas microvilosidades (MV). MVB₂ - corpo multivesiculado escuro (em célula do estrato intermédio) ART - artefato (9 600 X)

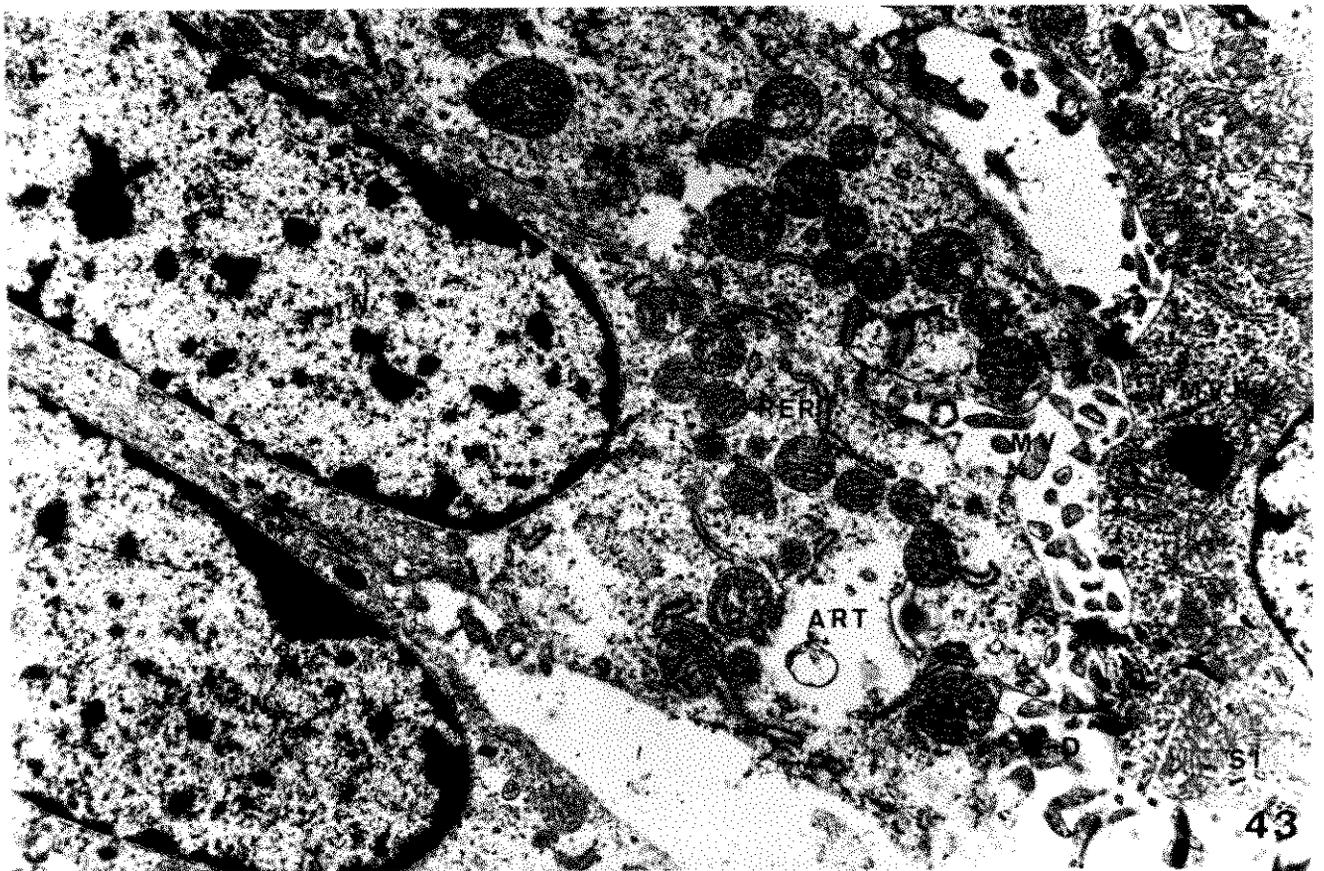
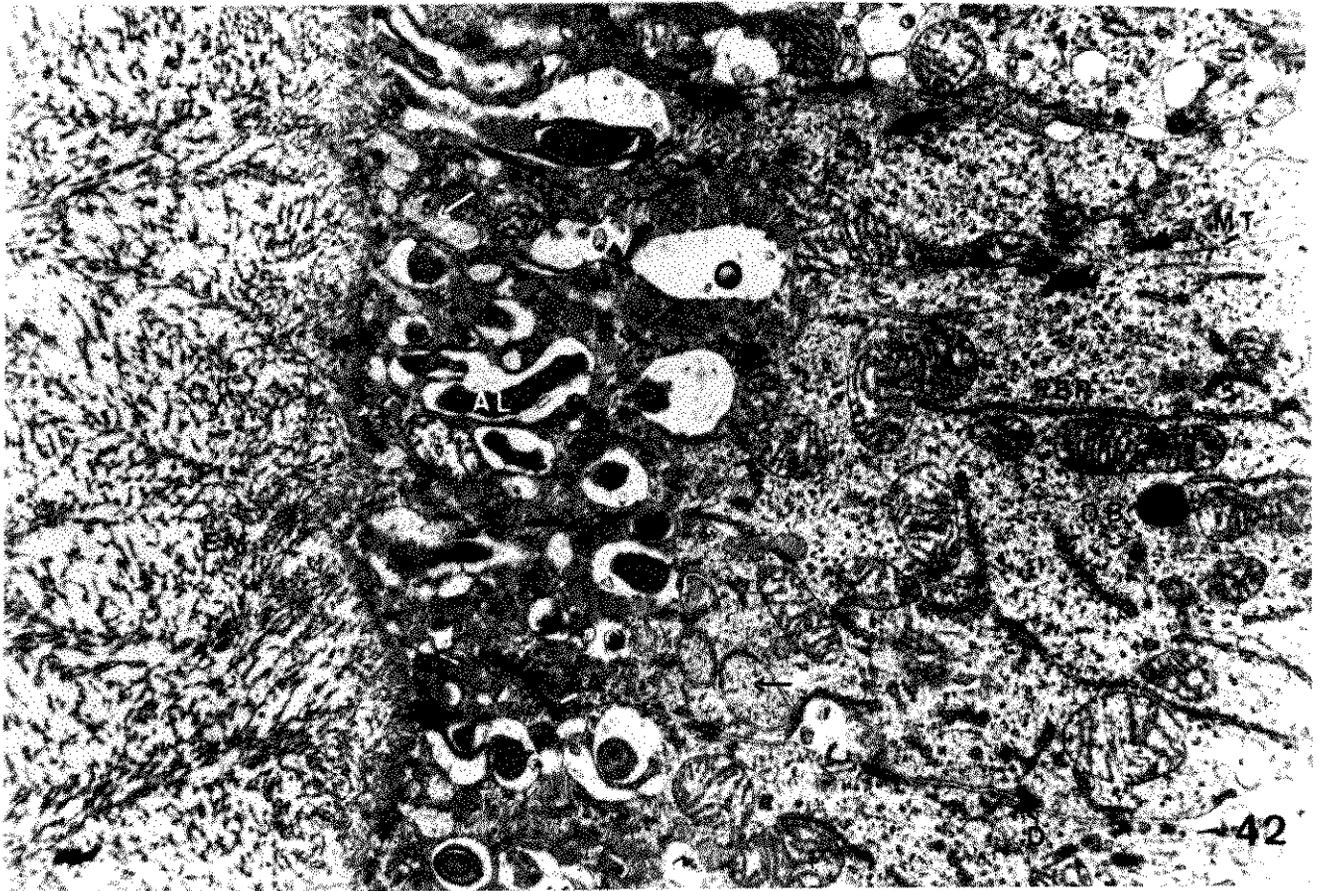


FIGURA 44 - Região "supranuclear" de ameloblastos reduzidos da porção apical da zona "F" do compartimento pós-secretor. Os hemidesmossomas (H) e o labirinto apical (AL) ainda permanecem nessas células, mas praticamente toda a matriz de esmalte foi removida, pelo processamento histológico utilizado. Próximos à membrana lateral, notam-se os "corpos membranosos não descritos (←) que talvez sejam túbulos retorcidos - cortados em várias alturas. Próximos ao labirinto apical, os mitocôndrias (M) são relativamente numerosos, mas aparecem poucos perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) e o complexo de Golgi (GC) é muito pouco desenvolvido, onde aparece. Corpos densos (DB), vesículas do tipo 2 -(V₂) e estruturas aparentemente ligadas a processos de digestão intracelular como essas que morfologicamente parecem vazias (E), são vistos em algumas células. Na região inferior da micrografia nota-se parte dos núcleos (N) de três ameloblastos. O plano de corte não foi bem longitudinal e talvez por isso as células não estão dispostas numa só fileira. CM - membrana celular (10 000 X)

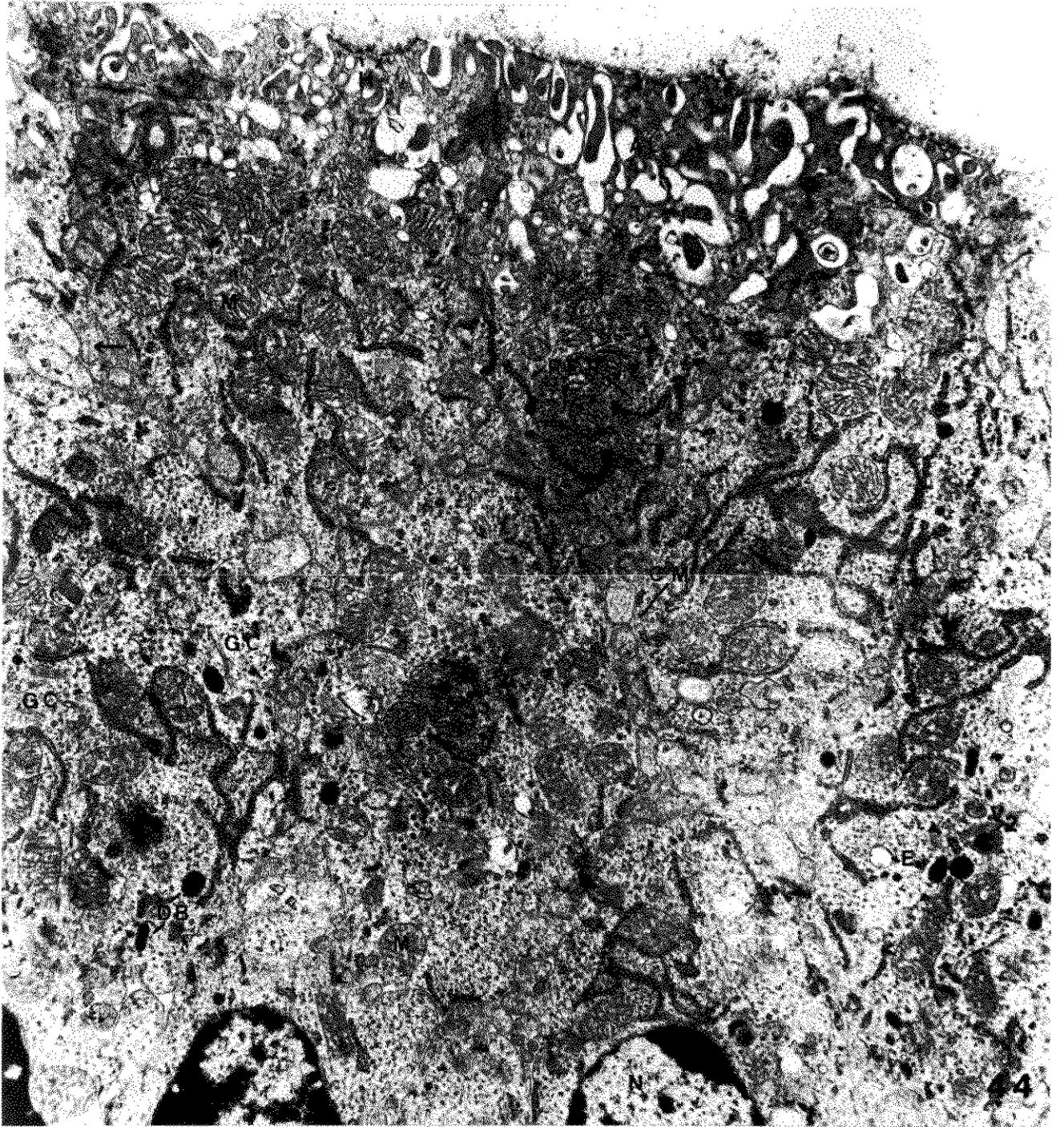
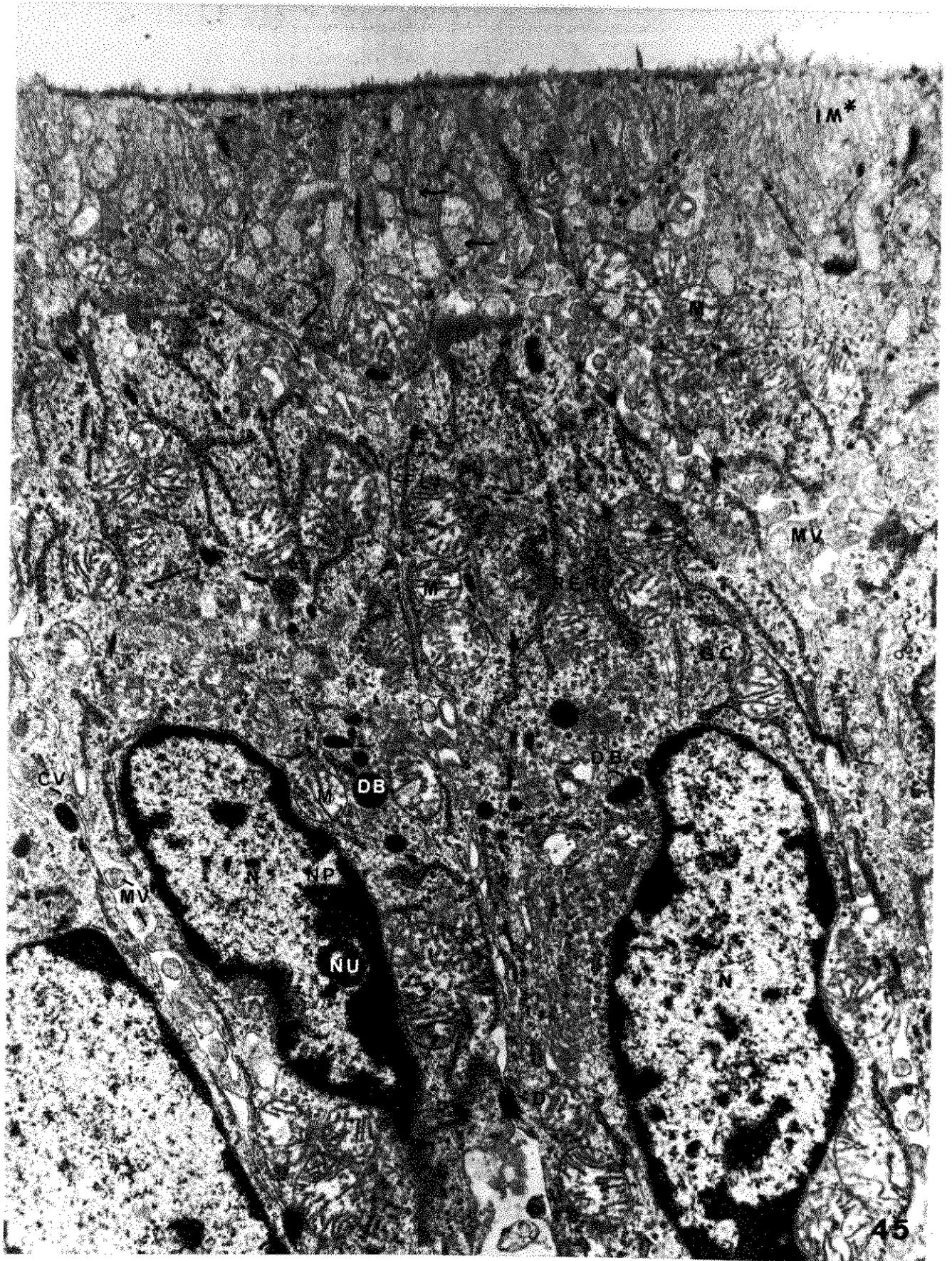


FIGURA 45 - Regiões nuclear e "supranuclear" de ameloblastos re-
duzidos da zona "F" do compartimento pós-secretor.

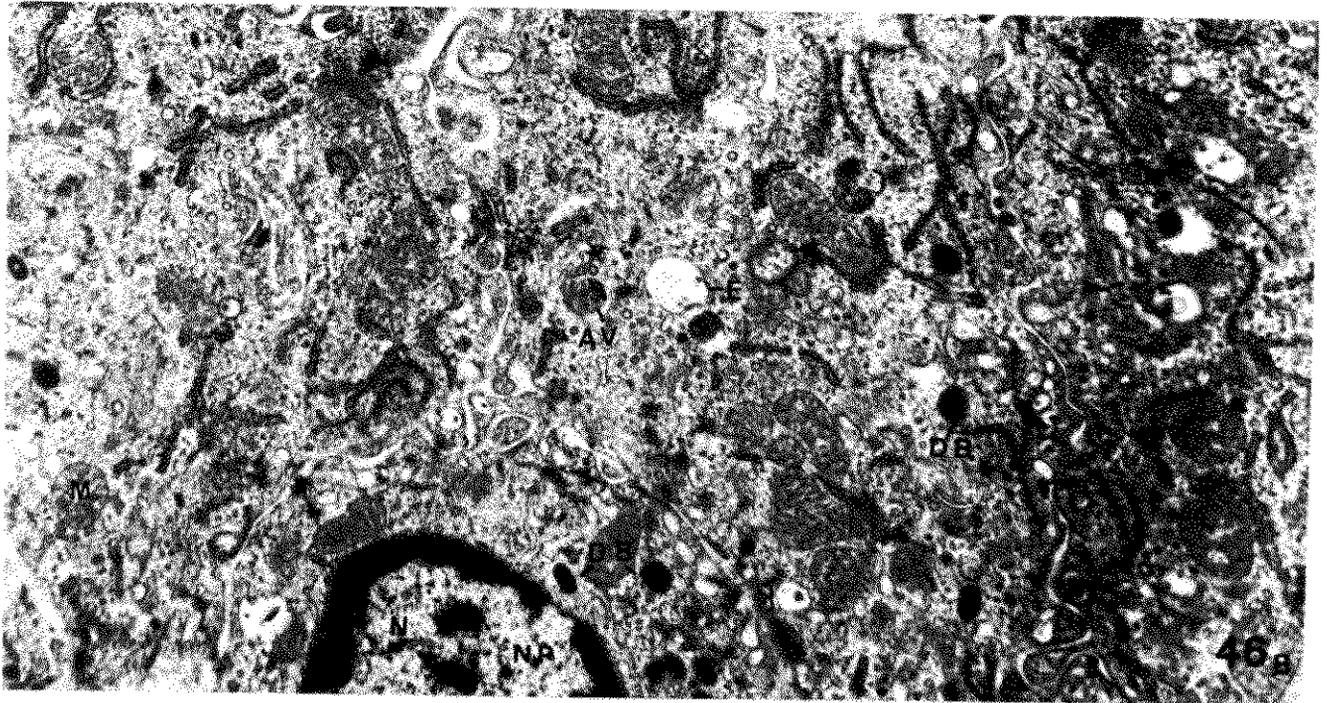
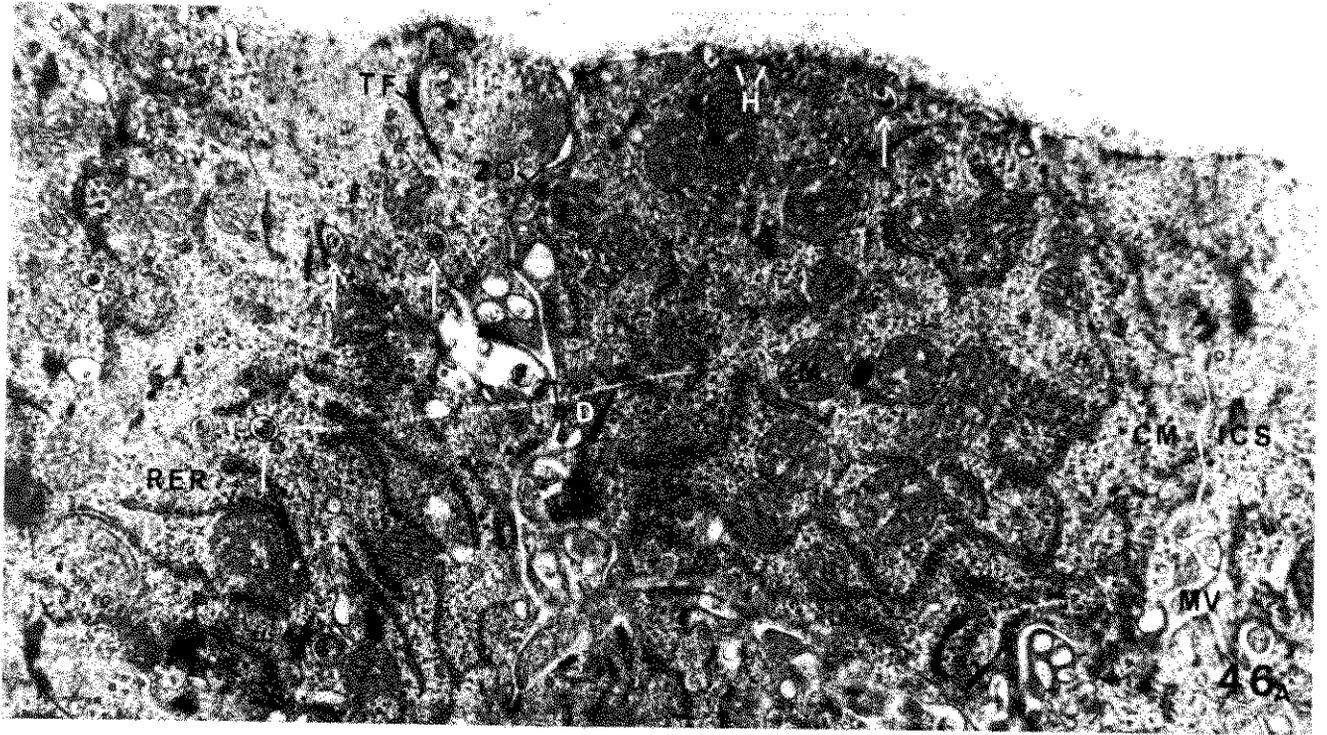
O material que se observa, depositado sobre a mem-
brana ameloblástica, no lado externo, voltado para
o lugar onde estaria o esmalte assemelha-se ao des-
crito como capa celular. Notam-se como que invagina-
ções da membrana (IM*) em contato com o esmalte (o
qual foi totalmente removido pelo processamento his-
tológico empregado). Estas invaginações têm um as-
pecto muito mais regular que as da zona "E". Mito-
côndrias (M) e perfis de retículo endoplasmático ru-
goso (RER) aparecem espalhados pelo citoplasma, bem
como corpos densos (DB), vesículas encapadas (CV) e
estruturas menos características, porém semelhantes
àquelas ligadas à digestão intracelular. O complexo
de Golgi (GC) não se apresenta muito desenvolvido.
Desmossomas (D) e junções com aparência das pentaes-
tratificadas mantêm os ameloblastos vizinhos, próxi-
mos, no lugar onde aparecem, mas há grandes espaços
intracelulares para os quais se projetam muitas mi-
crovilosidades (MV). No núcleo (N) podemos notar poros
(NP) e nucléolo (NU); A disposição aparentemente ir-
regular das células nesta zona dificulta a obtenção
de cortes perfeitamente longitudinais. (←) "cor-
pos membranosos não descritos". (11 700)



FIGURAS 46A e 46B - Região "supranuclear" de ameloblastos redu- zidos de uma das partes mais oclusais do comparti- mento pós-secretor. O corte apanhou células em vá- rias alturas.

FIGURA 46A - O espaço praticamente vazio na parte superior da micrografia, é ocupado pelo esmalte (em tecidos não descalcificados). O material remanescente, aqui, pa- rece corresponder à capa celular. Mitocôndrias (M) aparecem em algumas células, em número maior que em outras, talvez devido ao corte atingi-las em altu- ras diferentes. Nos, relativamente largos, espaços- intercelulares (ICS), projetam-se microvilosidades- (MV). As membranas celulares (CM) de ameloblastos vizinhos mantêm-se juntas em locais onde aparecem desmossomas (D) e "zonula ocludens"(ZO). Notam-se retí- culo endoplasmático rugoso (RER) e estruturas apa- rentemente ligadas à digestão intracelular (↑). H- hemidesmossomas. (12 400 X)

FIGURA 46B - Na célula à esquerda, existe uma estrutura que lembra um complexo de Golgi, relativamente pouco de- senvolvido, próximo à vesículas, algumas das quais, semelhantes a vesículas encapadas. Nas células aqui fotografadas, há menos mitocôndrias (M) e porções de retículo endoplasmático rugoso que na 46A, mas há corpos densos (DB), vesículas semelhantes a vesícu- las encapadas (não muito características), vesículas aparentemente vazias (E) na maior parte do seu volu- me, estruturas semelhantes a vacúolos autofágicos - (AV). Inferiormente vemos o núcleo (N) e uma região sem heterocromatina (talvez um poro nuclear (NP)) . (12 400 X)



DISCUSSÃO

COMPARTIMENTO EMBRIONÁRIO

Este é o compartimento onde são produzidas células, que vão substituir as perdidas, por desgaste, na zona oclusal, (Weinstock, 1972) de modo que, num estudo apenas morfológico dos ameloblastos, eram esperadas e realmente observamos muitas figuras de mitose, que sugerem a grande atividade proliferativa destas células. Essas observações reforçam as feitas anteriormente ao M.O., em molares de cobaia, por vários pesquisadores, dentre os quais Wassermann (1944), Hunt (1959), Hunt e Paynter (1963), Blumen (1970).

Estudos radioautográficos, usando timidina radioativa como precursor, realizados por Hunt e Paynter (1963) e por Blumen (1970) em cobaias, além dos realizados por Messier e Leblond (1960), em ratos e camundongos, por Starkey (1963), em coelhos e por Hwang e col. (1966), em camundongos, demonstraram uma marcante incorporação do composto radioativo por núcleos interfásicos de células deste compartimento, confirmando, através deste método, nossos achados morfológicos.

É fato estabelecido que timidina é precursor específico de DNA, ou seja, incorporação de timidina indica síntese de DNA, para duplicação desta molécula, o que só ocorre durante a interfase, quando a célula se prepara para dividir-se. O método radioautográfico permite, deste modo, confirmar as suposições baseadas em observações morfológicas. Assim, a incorporação de timidina indica que mesmo as células morfológicamente em interfase podem estar, nesta região, preparando-se para a divisão.

Nossos resultados demonstraram que as estruturas que mais se evidenciam nos ameloblastos embrionários, dada a sua grande quantidade, são os ribossomos livres, que aparecem espalhados por todo o citoplasma. Estas organelas são tradicionalmente consideradas um índice morfológico da síntese de proteínas estruturais, ou sejam, aquelas que permanecerão nas células para reparo e ampliação de estruturas bem como para preparação da célula para uma próxima divisão, o que foi comprovado, por exemplo, pelos trabalhos de RAG com aminoácidos (Blumen 1970; Frank, 1971) confirmando os achados de Carneiro (1959) pa

ra outros tipos de células. Duas outras estruturas ligadas à síntese aparecem, em nossas micrografias de ameloblastos embrionários, relativamente pouco desenvolvidas: o retículo endoplasmático rugoso (RER) e o complexo de Golgi que aqui ainda aparece ocupando normalmente uma posição lateral ao núcleo. Tal posição difere ligeiramente da observada para esta organela em outros espécimes como, por exemplo, molares de ratos jovens, (Reith, 1967), incisivos de ratos (Kallenbach, 1971; Smith, 1979) molares de ratos adultos (Katchburian e Holt, 1972) e em dentes de gatos jovens (Kallenbach, 1976). Considerando-se que o RER está relacionado à síntese de proteínas exportáveis, o seu pequeno desenvolvimento observado em nossos resultados sugere que elas não ocorrem em grande quantidade neste compartimento. De fato, pequena exportação de substâncias proteicas foi observada nesta região. (Trestald e Slavkin, 1974; Güenter e col. 1977; Slavkin, 1978). A incorporação relativamente baixa de aminoácidos em tempos curtos, demonstrada nos trabalhos radioautográficos (Carneiro, 1959; Warshawsky e col., 1963), reforça tal idéia.

Ao complexo de Golgi atribuem-se as funções de síntese da fração carboidrática e sulfatação de glicoproteínas (Peterson e Leblond, 1964; Neutra e Leblond, 1969). Nesse compartimento, onde nossos resultados mostram essa estrutura pouco desenvolvida, espera-se uma quantidade proporcionalmente pequena de tais produtos. As especulações que podemos fazer com os nossos achados morfológicos são confirmadas por estudos radioautográficos realizados com ^{35}S (Blumen, 1970).

O sulfato pode ser utilizado na síntese de mucopolissacarídeos sulfatados (Dziwiatkowsky, 1949, 1951; Böström e Odeblad, 1953; Bescot-Liversac, 1958; Spicer, 1963) e em quantidades mínimas também na de aminoácidos sulfatados (Dziwiatkowsky, 1954; Kulwich e col., 1954). O conhecimento destes fatos talvez explique a quantidade insignificante de grânulos, mas também a presença de arranjos de microtúbulos nos fusos mitóticos, uma vez que estes microtúbulos são constituídos de proteínas sulfatadas (Mazia, 1969).

Os microtúbulos que têm sido considerados estruturas importantes na movimentação de organelas dentro de algumas células (Kallenbach, 1971) não são visíveis em quantidade marcante nos ameloblastos morfológicamente interfásicos; formam, no

entanto, um arranjo mais evidente nos ameloblastos, em plena atividade mitótica, segundo sua aparência morfológica. Assim, por exemplo, naqueles aparentemente metafásicos, o aspecto do arranjo aproxima-se muito do descrito tradicionalmente como fuso mitótico.

Estudos realizados por Iverson e col. (1961) demonstraram, no aparelho mitótico, a presença de uma enzima ativa que cinde o ATP. Este achado, que sugere a necessidade de energia para a divisão celular, talvez explique, em parte, a presença, em nossas micrografias, de mitocôndrias espalhados no citoplasma de ameloblastos em mitose, próximos aos cromossomas (Fig. 3 e 4).

Mitocôndrias aglomeram-se, às vezes, em grupos maiores ou menores próximos às membranas voltadas para o estrato intermédio ou para as células da papila dental sugerindo atividades que requerem energia, nestes locais; talvez transporte ativo (Fig. 3 e 5 a 8).

O único indício morfológico de transporte, visível em nossas micrografias, são vesículas encapadas próximas ou ligadas à membrana (Fig. 3 e 6).

Os ameloblastos embrionários dispõem-se muito irregularmente (Fig. 3 a 8) como já houvera observado Wasserman (1944) que os classificou como epitélio pseudo-estratificado, o que não pode ser observado em nossos resultados; em nossas micrografias tem-se a impressão de um epitélio pluriestratificado - que mais oclusalmente, à medida que caminhamos para o compartimento de diferenciação, tende a se organizar numa única camada de células.

Nos molares de cobaia não é muito evidente a causa de tal organização, mas parece que ela é fundamental para a secreção. Moe (1971), estudando incisivos de ratos, observou que a organização da camada única de ameloblastos está diretamente relacionada ao desenvolvimento das barras terminais e desmossomas.

Limite entre ameloblastos e odontoblastos

Os ameloblastos do compartimento embrionário apresentam uma face voltada para os odontoblastos e nesta face a membrana dos ameloblastos apresenta-se plana ou ligeiramente ondu

lada e em toda a extensão desse compartimento há uma lâmina basal íntegra que se estende sobre todos os ameloblastos a acompanhá-los a mais leve ondulação. Tal integridade ocorre mesmo nos locais onde a membrana ameloblástica emite pequenas projeções, de modo que a lâmina basal apresenta nesses lugares uma ondulação no sentido de acompanhar o acidente da membrana.

Tais fatos observáveis neste trabalho nas Figuras 5 a 8 foram observados também por outros pesquisadores (Nylen e Scott, 1960 em incisivos de camundongos; Decker, 1963, em molar de rato; Costacurta, 1965, em incisivo superior de rato; Zaki e col., 1970, em germes dentários de rã leopardo; Slavkin, 1974; Warshawsky e Smith, 1974, em incisivo de rato; Croissant e col., 1975, Slavkin e colab., 1976; Ten Cate e col., 1970, germe de primeiro molar de camundongos de diferentes dias; Slavkin, 1979, molar de feto de camundongo).

Combinações iso e heterocronais de epitélio e mesênquima têm sempre mostrado que o epitélio dental mais interno é necessário para a manutenção dos ameloblastos (Revel, 1979).

Este resultado de trabalho de outros pesquisadores faz-nos pensar em se as vesículas que aparecem em pequenos acúmulos nos ameloblastos não poderiam ser as responsáveis por algum tipo de indução química que os ameloblastos possam exercer, já nessa fase, sobre os odontoblastos. Há especulações no sentido de que a indução entre os estratos é mútua e simultânea e de que o fato dos odontoblastos diferenciarem-se primeiro deveria ser uma característica genética destas células que as tornaria mais rápidas no processo de diferenciação.

Em nossas fotografias, os aglomerados de vesículas e grânulos apresentam estruturas com aspectos variados o que pode sugerir também uma diversidade de funções. Dois outros papéis atribuídos a eles seriam ainda a digestão "in situ" da lâmina basal (Kallenbach, 1971), que se verifica mais oclusalmente, e remoção de substâncias entre os ameloblastos e odontoblastos para o interior dos ameloblastos (Reith, 1967).

No espaço entre os ameloblastos e odontoblastos, observamos, em nossas micrografias, fibras e um material granulado dos quais não sabemos o significado.

COMPARTIMENTO DE DIFERENCIAÇÃO

Os ameloblastos em diferenciação, mais altos que os

embrionários, demonstram uma característica tendência à polarização.

Uma estrutura que aparece em grande quantidade nas células deste compartimento são os microtúbulos, que aqui nunca são vistos num arranjo como o fuso mitótico da zona precedente. Koch e col. (1970), fazendo experimentos "in vitro", observaram que um sistema intacto de microtúbulos parece condição essencial para que os ameloblastos se diferenciem.

No compartimento de diferenciação considera-se tradicionalmente que as células perderam a sua capacidade de proliferação e as evidências morfológicas e radioautográficas de ausência de marcação quando se injeta ^3H -timidina (Starkey, 1963; Hwang e col., 1966; Blumen, 1970) corroboram esta suposição. Embora os ameloblastos tenham perdido a sua capacidade proliferativa, a grande quantidade de microtúbulos poderia justificar-se se eles puderem ter algum papel na intensa movimentação de organelas que tornará os ameloblastos, completamente diferenciados, células altamente polarizadas.

Porter (1966) sugeriu e Kallenbach (1971) admite a possibilidade de que os microtúbulos, além de ajudarem na movimentação intracitoplasmática de organelas, auxiliariam também na preservação do formato celular.

Como a comprovar que neste compartimento há necessidade de manutenção da forma dos ameloblastos, notamos por todo o seu citoplasma muitas fibrilas e até alguns feixes de tonofilamentos. Ainda como parte do citoesqueleto temos, neste compartimento, a elaboração da trama citoplasmática "supranuclear". Estudos de coloração para proteínas sugerem que as tramas citoplasmáticas descritas a nível de M.E. correspondem às barras terminais observadas ao M.O. que se sabia aparecerem primeiro na região infranuclear e logo depois na supranuclear da célula (Kallenbach, 1963; 1971).

O aumento acentuado de desmossomas principalmente na região "infranuclear", mais as tramas terminais parecem essenciais à definitiva disposição dos ameloblastos numa única camada de células, fato este que também houvera sido observado por Moe (1971) em incisivos de ratos.

Segundo Moe (1971), o alinhamento e a estabilização dos ameloblastos poderia assegurar uma passagem controlada de substâncias no sentido estrato intermédio-ameloblastos e garan

tir regularidade no processo de deposição da matriz.

Em relação às estruturas ligadas à síntese proteica, observamos que, à medida que o processo de diferenciação dos ameloblastos progride, aumenta a quantidade de RER por associação de ribossomas à membrana de uma quantidade cada vez maior de perfis de R.E.. Não temos subsídios para afirmar se a quantidade de ribossomas livres diminui devido a isso. Talvez método dos citoquímicos e uma dosagem bioquímica de RNP(ribonucleoproteínas) pudesse esclarecer sobre a síntese, ou não, de uma quantidade extra de ribossomas para o RER. O que podemos dizer é que a ainda grande quantidade de ribossomas livres revelam, aqui, células engajadas numa intensa atividade de síntese para utilização interna, enquanto que os perfis de RER revelam, já, alguma síntese de proteína exportável. Tais observações morfológicas confirmam as de outros estudiosos, neste e em outros materiais (Decker, 1963, órgão de esmalte de molar de rato ; Frank e Nalbandian, 1967, germes dentários de gato; Slavkin , 1974).

Estudos radioautográficos realizados com aminoácidos tritiados demonstram que a incorporação do precursor radioativo de proteínas é bastante acentuado neste compartimento, embora comparativamente menor que no secretor propriamente dito - (Blumen, 1970; Blumen e Merzel, 1973; Slavkin, Mino e Bringas, 1976; Warshawsky e Vugman, 1977).

Pelos padrões estabelecidos nos trabalhos de Carneiro (1959) e Warshawsky e col (1963), considerando ainda, os resultados de trabalhos radioautográficos (Blumen, 1970; Blumen e Merzel, 1973; Slavkin, Mino e Bringas, 1976; Warshawsky e Vugman, 1977) e as descrições de dentes de crescimento contínuo de outros animais, correspondentes a células desta mesma região ou em estágio correspondente (Nylen e Scott, 1958; Watson, 1960; Reith, 1961; Kallenbach e col, 1963; Warshawsky, 1968; Elwood e Bernstein, 1968; Garant e Nalbandian, 1968; Slavkin e col. 1969; Frank, 1979) ficam reforçadas as nossas suposições de que neste compartimento já se inicia uma produção pouco mais acentuada de proteína exportável, embora as atividades de construção e rearranjo de estruturas internas, próprios de uma célula em diferenciação, requeiram a síntese de proteínas estruturais também.

Frank e Nalbandian (1967) sugerem que a principal ati

vidade dos ameloblastos na primeira fase de diferenciação (chamados, por eles, pré-ameloblastos), seria construir e rearranjar equipamentos para uso futuro, idéia esta esposada também por Kallenbach (1971).

Nesta linha de raciocínio a secreção, neste compartimento, seria esperada mais tarde quando as células já estão com a maquinaria secretora relativamente mais desenvolvida. Com efeito, é o que observamos comparando as micrografias 10 a 15 deste trabalho, onde se vêem grânulos, vesículas, material de textura fina (FTM) e material de textura grossa (CTM), sendo estes dois últimos considerados indícios morfológicos de início de atividade de secreção de material exportável.

Chamou-nos a atenção, em fotografias referentes ao final do compartimento, a continuidade que se pode observar entre o envoltório nuclear e o retículo endoplasmático (Fig.14), embora não possamos explicar claramente o significado dela.

Outra observação curiosa é o acúmulo de material dentro das cisternas do RER. Semelhante fenômeno foi observado também em células intestinais de Paneth (Behnke e Moe, 1964), nas de incisivos de ratos, em diferenciação (Moe, 1971) e foi provocado experimentalmente no pâncreas exócrino (Palade, 1956). Ao que parece, ele indica que o processo de síntese teve início antes que as estruturas responsáveis pela elaboração e exportação do material produzido tivessem alcançado correspondente grau de desenvolvimento ou de atividade (Moe, 1971; Kallenbach, 1971).

Os mitocôndrias tendem a se arranjar, inicialmente, em aglomerados na base das células, embora em alguns ameloblastos em estágio avançado de diferenciação também haja grupos bastante expressivos na região "supranuclear" (Fig. 15). Contudo isto não parece ser uma característica apenas de molares de cobaia, uma vez que observação semelhante foi constatada também em germes dentários de gatos (Frank e Nalbandian, 1967) e em órgão dental de incisivos de camundongos recém-nascidos (Slavkin e col., 1975; Slavkin e col., 1976).

Concentrações de mitocôndrias normalmente são observadas em locais de transporte ativo como ficou demonstrado nos trabalhos de Sjostrand e Rhodin (1953), Pease (1966), Copeland (1964), Anderson e Harvey (1966).

Assim podemos supor que esteja havendo algum transpor

te na superfície "infranuclear" e, eventualmente, na "supranuclear" de ameloblastos em diferenciação. Que tipo de material estaria sendo transportado e o sentido do transporte é mais difícil de explicar, principalmente na superfície "supranuclear".

Limite dos ameloblastos com a pré-dentina

No compartimento de diferenciação a membrana ameloblástica mais distal na região "supranuclear" apresenta projeções mais acentuadas e como conseqüência há um rompimento da lâmina basal (Figuras 10 a 13, e 15).

Em molar de rato (Reith, 1967) e em dentes humanos (Ronholm, 1962) e de gato (Frank e Nalbandian, 1967) os processos que penetram a lâmina basal são finos e semelhantes a microvilosidades.

Em molares de cobaia observamos que essas projeções são grossas e menos numerosas por célula (Figuras 10 a 12 e 15). Esta observação foi feita também em incisivos de ratos (Kallenbach, 1971).

As projeções dos ameloblastos mais a presença das originárias dos odontoblastos poderiam sugerir um reforço da hipótese de que é necessário o contacto entre as projeções das células dos dois estratos celulares para ocorrer a indução química de diferenciação posterior dos ameloblastos. Contactos celulares têm sido descritos entre ameloblastos e odontoblastos durante estágios precoces de odontogênese (Silva e Kailis, 1972; Sisca e Provenza, 1972; Kallenbach, 1976; Katchburian e Burgess, 1977; Meyer e col. 1977) e um papel indutivo tem sido atribuído a tais contactos (Croissant e col., 1975; Slavkin e col., 1976).

Porém, em nossos resultados, não observamos contacto direto entre células dos dois estratos; além do mais, projeções de células de um deles as vezes desenvolviam-se em direção a um local aparentemente livre das correspondentes no estrato fronteiro.

Assim, pelo menos com base no que nos foi dado a observar morfológicamente, não haveria necessidade de contacto direto entre estas células heterotípicas para que a indução química ocorra.

Reforçando esta idéia há trabalhos interessantes rea

lizados com miliporos interpostos a estes estratos celulares ainda indiferenciados. Estas culturas transfiltro demonstraram não haver interferência no processo de diferenciação quando se impossibilita o contacto entre odontoblastos e ameloblastos [Wolters e Mullen, 1977 - cultura transfiltro de germes dentários de rato (epitélio e mesênquima)].

Ainda, por analogia com vesículas sinápticas, tem-se aventado a hipótese de que a instrução para a diferenciação pode ser transmitida através de vesículas contendo precursores do colágeno, ácidos ribonucleicos ou outros constituintes (Slavkin, 1974; Croissant e col. 1975). Embora Wolters e VonMulle (1977) tenham observado, em culturas transfiltro de dente de rato, que dois tipos de vesículas de ameloblastos pré-secretoras não têm função indutiva, esta hipótese não pode ser desprezada.

Como podemos observar por exemplo na Figura 13 deste trabalho, os ameloblastos em processo de diferenciação estão justapostos à matriz colágena de pré-dentina.

Dados de vários experimentos parecem indicar que o colágeno tem importante papel no estabelecimento da forma de epitélios. Assim, demonstrou-se que a polarização dos ameloblastos pós-mitóticos é condicionada por fatores, lábeis em presença de collagenase, presentes na pré-dentina (Ruch e col. 1973). Por outro lado, tratamento com hialuronidase não afeta a diferenciação de ameloblastos.

Substâncias como L - azetidina que suprimem a produção do colágeno extracelular inibem a diferenciação do ameloblasto (Ruch e col., 1974). Tais trabalhos ainda apresentam alguns pontos obscuros como: se a collagenase, em si, toma parte na diferenciação dos ameloblastos e ainda o fato da L-azetidina (uma substância análoga à prolina) também ter ação na síntese de glicoproteínas e proteoglicans.

Culturas de germes dentários às quais se adiciona alguma substância que iniba a "ligação transversal" do colágeno (β -amino propionitrilo) apresentam supressão na diferenciação dos ameloblastos (Kollar, 1972).

Além desse material, morfológicamente semelhante a colágeno, que podemos observar em nossas micrografias (Fig. 13 e 15), aparece também um material de textura fina em locais onde a lâmina basal já não é visível. Este material é visto também no interior do ameloblasto, em vesículas aparentemente iso-

ladas ou ligadas ao espaço extracelular por meio de túbulos (Fig. 13). Acredita-se que este material possa ser precursor de algum componente da matriz orgânica do esmalte (Kallenbach, 1971; Slavkin, 1979).

Kallenbach (1971), estudando incisivos de ratos, verificou que seguem um esquema bastante rígido de diferenciação, o que não ocorre com molares de cobaia, como podemos observar em nossos resultados e como foi observado por Reith (1967) em molares de rato. Assim observamos que os ameloblastos que rompem a membrana basal às vezes são altos e bem diferenciados, outras vezes não. No trabalho com incisivos, Kallenbach (1971) pôde observar que, antes da ruptura da lâmina basal, aparecia no espaço extracelular um material de textura grosseira, no mesmo lugar que seria ocupado, após o rompimento daquela, pelo material de textura fina. Não conseguimos perceber tamanha precisão de eventos no molar de cobaia. Além disto, pelas características de seu trabalho, Reith (1967) observou que em molares de rato às vezes a calcificação da dentina já havia começado, outras não, quando os ameloblastos estavam penetrando a lâmina basal, fato este que não pudemos observar porque trabalhamos com material descalcificado.

Um outro aspecto que torna o epitélio ameloblástico bastante diferente é o desaparecimento da lâmina basal antes da deposição do precursor do esmalte, enquanto que durante a secreção e deposição de proteínas de peso molecular tão alto como o do colágeno, no caso da córnea, por exemplo, a lâmina basal permanece (Revel, 1979).

Epitélio sem lâmina basal é uma grande raridade sendo mesmo desastrosa muitas vezes a sua falta quando então as células epiteliais podem perder a sua localização superficial. Há casos de embriões jovens em que o escape de células do epiblasto da linha primitiva onde não existe lâmina basal, resultou casos patológicos tais como vários cânceres epiteliais. (Revel 1979).

Para que os processos ameloblásticos penetrem a lâmina basal, há necessidade de remoção do material desta. Podemos pensar pelo menos em duas possibilidades. Uma delas seria a remoção deste material por meio de vesículas de pinocitose do tipo vesículas encapadas, por exemplo. Em molares de rato acredita-se que isto possa ocorrer devido ao elevado número de tais

vesículas (Reith, 1967). Já em incisivos de ratos (Kallenbach, 1971) e em molares de cobaia (Fig. 15 deste trabalho) temos um número relativamente menor dessas vesículas, razão por que não estamos certos de podermos atribuir-lhes a remoção de toda a lâmina basal.

Resta então uma outra hipótese: a de que a lâmina basal é digerida "in situ" por material produzido pelos ameloblastos (Kallenbach, 1971). Os processos ameloblásticos teriam que digerir também um pouco de colágeno e da substância de fundo para poder penetrar na pré-dentina (Kallenbach, 1971).

COMPARTIMENTO SECRETOR

Baseados unicamente em observações morfológicas é lógico tratarmos os ameloblastos deste compartimento como células tipicamente secretoras. Porém técnicas mais apuradas de citotóxica, radioautografia e novas evidências morfológicas a nível de M.E., que tendem a apurar idéias, levaram-nos a especular que os dentes de crescimento contínuo são estruturas muito dinâmicas na medida em que a delimitação de compartimentos apenas representa células onde um determinado fenômeno é mais marcante naquele estágio funcional. Assim, neste compartimento a secreção atinge o seu pico, mas não é exclusiva uma vez que, aparentemente, já se ensaia mais apicalmente; por outro lado, há evidências que levam a supor reabsorção de matéria orgânica nesta zona.

Conforme pudemos observar em nossas micrografias, o máximo desenvolvimento das estruturas internas e a disposição das mesmas em regiões preferenciais no citoplasma fazem, dos ameloblastos secretores, células muito altas e marcadamente polarizadas. Tal evidência vem corroborar as observações de outros autores, tais como Nylen e Scott (1960), Reith (1961, 1967 e 1970), Costacurta (1965), Devotto e Scott (1968), Elwood e Bernstein (1968), Garant e Nalbandian (1968), Warshawsky (1968), Matthiessen e von Büllow (1969), Moe (1971), Kallenbach (1972), Weinstock (1972), Revel (1979), Smith (1979).

Devido à polaridade acentuada dos ameloblastos, neste compartimento, podemos, mais apropriadamente, nos referir a regiões infranuclear, nuclear e supranuclear.

Região Infranuclear

Vários eventos parecem sugerir uma dinamização nas relações entre a camada de ameloblastos e o espaço voltado para o estrato intermédio. Assim é que em nossos resultados percebemos um considerável aumento de superfície dado pelas microvilosidades, reentrâncias e pelo abaulamento da membrana ameloblástica voltada para o estrato intermédio.

Nesta face da membrana ameloblástica parece-nos significativa a presença de microvesículas de pinocitose ou vesículas encapadas. Tais estruturas, juntamente com o visível acúmulo de mitocôndrias na região infranuclear, faz supor transporte de material entre os dois estratos celulares e, conquanto seja difícil determinar-se em qual direção, tudo leva a crer que deve ocorrer no sentido estrato intermédio-ameloblasto uma vez que este último está empenhado em atividade secretora e impossibilitado de receber substâncias através do polo oposto da do que a dentina já está calcificada.

Estas observações são semelhantes àquelas obtidas por diversos autores em outros espécimes, como: incisivos de camundongo (Scott e col., 1959; Nylén e Scott, 1960; Garant e Nalbandian, 1968), incisivos de ratos (Warshawsky, 1968; Moe, 1971; Kallenbach, 1972) e molar de ratos jovens (Reith, 1970).

Como já tivemos oportunidade de relatar, em resultados, pudemos observar um grande acúmulo de mitocôndrias entre a trama terminal infranuclear e o núcleo, em micrografias de ameloblastos em pleno processo de secreção.

A presença de tais organelas reconhecidamente ligadas a reações que liberam energia pode significar, nesta região, a ocorrência de algum evento que requer energia, talvez algum tipo de transporte ativo.

Esta disposição dos mitocôndrias já fora observada em outros espécimes por outros pesquisadores (Scott e col.; 1959; Nylén e Scott, 1960; Reith, 1961; Elwood e Bernstein, 1968; Garant e Nalbandian, 1968; Warshawsky, 1968; Kallenbach, 1972; Weinstock, 1972).

Ao que parece, distribuição ligeiramente diferente dos mitocôndrias, com uma quantidade maior ou menor também na extremidade formativa dos ameloblastos em estágio secretor, ocorre em gatos (Frank e Nalbandian, 1967) e no homem (Matthiessen

e von Büllow, 1969). Estudos bastante detalhados realizados em incisivos de ratos (Moe, 1971; Smith, 1979) revelam que os mitocôndrias tendem a se acumularem na extremidade infranuclear até um certo ponto do compartimento secretor sendo que no final deste podem ser encontrados lateral ou superiormente colocados em relação ao núcleo. Watson (1960) e Reith (1970) descrevem a presença de mitocôndrias em pequeno número lateral ou supranuclearmente em ameloblastos secretores de ratos. Em molares de cobaia só os observamos em número bem reduzido na região supranuclear.

É interessante, conquanto ainda careça de explicação, que estudos de células do órgão do esmalte, realizados em incisivos de camundongos (Elwood e Bernstein, 1968), em germes dentários de gatos recém-nascidos (Frank, 1971) e de homem (Frank e Nalbandian, 1963), revelaram que há esta distribuição polarizada de mitocôndrias apenas nos ameloblastos.

Quanto ao material que estaria sendo transferido para os ameloblastos, por transporte ativo, podemos supor que aminoácidos, açúcares, sais de Ca e P possam passar dos capilares para as células ou espaços intercelulares do estrato intermédio, daí para os ameloblastos e, finalmente, para a matriz do esmalte.

Resultados encontrados na literatura, de trabalhos realizados com aminoácidos tais como prolina, glicina, serina, triptofano, ... tritiados (Blumen, 1970; Slavkin e col., 1976; Leblond e Warshawsky, 1979) demonstraram pequena marcação sobre o estrato intermédio e sobre a região infranuclear dos ameloblastos em tempos curtos após a injeção do aminoácido radioativo, enquanto que a concentração maior já se verifica supranuclearmente.

Quanto a açúcares, trabalhos radioautográficos com galactose e glucose tritiadas (Weinstock e Leblond, 1971; Weinstock, 1972) também mostraram fraca marcação sobre o estrato intermédio bem como sobre a base dos ameloblastos e mais acentuada sobre a região do complexo de Golgi, em tempos tão curtos como 2,5 minutos, por exemplo.

Quanto aos sais de Ca, os resultados descritos na literatura são bastante diversos. Alguns demonstraram que há um alto teor de Ca no estrato intermédio (Hampp, 1940), que íons minerais de ^{45}Ca atravessam o órgão do esmalte (Reith e Cotty,

1962) e que radioatividade devida a ^{45}Ca pode ser observada nos ameloblastos secretores (Kashiwa e Sigman, 1966; Oka e Shimizu, 1972; Nagai e Frank, 1975), nos mitocôndrias, RER, aparelho de Golgi, microvesículas (Oka e Shimizu, 1972; Nagai e Frank, 1975), enquanto outros relatos a respeito da trajetória do Ca sugerem que a rota preferencial é o espaço intercélular (Munhoz e Leblond, 1974; Nagai e Frank, 1975; Eisemann e col. 1979).

Assim, as estruturas que indicam transporte pelo interior do ameloblasto permanecem, mas os resultados dos trabalhos feitos até agora no sentido de esclarecer o tipo de substância que pode estar sendo transportada, não lograram alcançar seu objetivo.

Estruturas juncionais que morfologicamente lembram desmossomas, "Z.O.", "Z.A." e constituintes do citoesqueleto, tais como tramas terminais e feixes de tonofilamentos, aparecem tanto na região infra como na supranuclear, conforme tivemos oportunidade de relatar em nossos resultados, sugerindo a necessidade da manutenção da forma dos ameloblastos bem como da sua posição relativa às células vizinhas, talvez para garantir uma continuidade no processo de deposição do esmalte, como sugeriu Moe (1971).

Muitos trabalhos apresentam resultados semelhantes no que concerne a estas estruturas (Reith, 1960; Frank e Nalbandian, 1963; Elwood e Bernstein, 1968; Garant e Nalbandian, 1968; Warshawsky, 1968; Reith, 1970; Moe, 1971; Revel, 1979; Smith, 1979); nossos resultados diferem, em parte, do de Nylen e Scott, 1960, que não observaram barra terminal supranuclear em ameloblastos secretores de incisivo de camundongo.

Em nossas micrografias temos estruturas juncionais que representamos pela abreviatura "Z.O.", mas que não temos condições de afirmar se se trata de verdadeiras zonas de oclusão ou das chamadas "gap junctions" que eram confundidas com as primeiras e só mais recentemente se percebeu tratar-se de junções não de cinco, mas de sete camadas formada pela estrutura trilinear de cada uma das células contatantes, separadas por uma fenda de 20Å; há, ainda, nesta estrutura, um poro central que permite a passagem de íons e moléculas pequenas entre as células (Ham, 1978). Segundo Eisemann e col (1979) "gap junctions", podem ser locais onde ocorrem transferências de íons entre os compartimentos celular e intercelular. Se se tratarem de "Z.O."

mesmo, vimos que elas são consideradas capazes de selar o espaço intercelular (Farquhar e Palade, 1963; Brightman, 1965) o que, na região infranuclear poderia forçar o material que eventualmente viesse das células dos estrato intermédio (ou dos capilares, pelo espaço intercelular) a passar por dentro dos ameloblastos; por outro lado poderia evitar o refluxo da matriz orgânica do esmalte pelo espaço interameloblástico (Garant e Nalbandian, 1968).

Considerando nossas observações a respeito das estruturas relacionadas à membrana ameloblástica voltada para o estrato intermédio, que sugerem intervenção no processo de transporte; considerando os trabalhos de Munhoz e Leblond (1974) e de Eise mann e col. (1979) entre outros, em que sais de Ca parecem mover-se preferencialmente pelo espaço interameloblástico e considerando, finalmente, os trabalhos radioautográficos com aminoácidos (Blumen, 1970; Blumen e Merzel, 1973; Slavkin e col. 1976; Leblond e Warshawsky, 1979), com açúcares (Weinstock e Leblond, 1971; Weinstock, 1972) e com ^{35}S -sulfato (Blumen e Merzel, 1976) poderíamos, a título de especulação, sugerir o seguinte mecanismo de transporte:

Material referente à parte orgânica e inorgânica do esmalte, provindos dos capilares sangüíneos, ao chegarem à extremidade não formativa dos ameloblastos adentrariam a célula. Então, aqueles que dependessem de uma elaboração por parte da célula, como é o caso dos aminoácidos, sulfato, carboidratos, seguiriam via intracelular e aqueles independentes de um tal processamento passariam, de maneira extremamente rápida para o espaço interameloblástico, um caminho sem dúvida com menos entraves. Na altura do processo de Tomes novamente passariam para o interior da célula e seriam eliminados, de modo que o ameloblasto teria mais um papel de regulador de deposição que propriamente no transporte de íons.

Relativamente a estruturas ligadas à síntese, observamos que os ribossomas livres ainda são abundantes na região infranuclear, embora não tenhamos dados quantitativos para afirmar se há uma variação na quantidade de partículas de RNP; há também um ligeiro aumento de perfis de RER neste polo da célula, o que indica possivelmente que ela passa a engajar-se também na produção de proteína exportável; talvez os pouco desenvolvidos RER infra e paranucleares sejam os responsáveis pelas

pequenas cadeias de polipéptides que atingem o complexo de Golgi e podem ser detectados por RAG em tempos curtos como 5 minutos (Frank, 1971).

Ribossomas livres são tradicionalmente considerados - uma evidência de síntese de proteína estrutural. A presença de tais proteínas é comprovada por vários autores, através de RAG, após a injeção de vários aminoácidos radioativos (Blumen, 1970; Warshawsky e Vugman, 1977).

Em ameloblastos no início do compartimento secretor às vezes se acumula um material dentro de cisternas do RER, fenômeno este que sugere um bloqueio no transporte deste material-proteico, quer por que a célula apresente algum defeito de estrutura, quer porque o desenvolvimento do complexo de Golgi e o número de vesículas de transporte não seja condizente com o nível funcional do RER (Jamieson e Palade, 1968). Raramente este acúmulo é observado em células em estágio avançado de secreção. Quando ocorre, o citoplasma fica praticamente tomado pelas estruturas de aspecto granular, razão por que chamamos tais células de ameloblastos granulados.

Região Nuclear

Apresenta-se aqui praticamente com as mesmas características que no compartimento de diferenciação. Em nossas micrografias, porém, podemos notar um acentuado aumento do volume nuclear dos ameloblastos desta região, em relação aos do compartimento embrionário.

Estudos cariométricos ao nível de M.O. (Costacurta, 1965) em ameloblastos de incisivos de rato demonstraram que o volume nuclear aumenta nos compartimentos de diferenciação e de secreção até uma certa altura. Costuma-se relacionar este aumento de volume com a intensa síntese de RNA, o que se exterioriza no incremento de síntese proteica, nesta região, como detectado por Karpishka e col. (1959); Young e Greulich (1963); Warshawsky (1963); Miller e Warshawsky (1963); Cotton e Hefferren (1966), Blumen (1970); Frank (1970), Slavkin e col. (1976); Leblond e Warshawsky (1979), em trabalhos radioautográficos com vários aminoácidos tritiados.

Além disso, descrições dessas células ao M.E. sugerem que concomitantemente com o desenvolvimento do núcleo ocorre o

das estruturas responsáveis pela síntese de proteínas, na região supranuclear (Nylen e Scott, 1958; Watson, 1960; Reith, 1961; Kallenbach e col., 1963; Warshawsky, 1968; Elwoode Bernstein, 1968; Garant e Nalbandian, 1968; Smith, 1979) que discutiremos adiante.

A parte externa do envoltório nuclear apresenta estruturas semelhantes a bolhas que talvez evoluam para RER, reforçando a idéia de continuidade entre essas duas estruturas membranosas.

Região Supranuclear

Estruturas ligadas à síntese de material exportável ou aparentemente relacionadas a fenômenos de digestão intracelular ocupam praticamente todo o volume supranuclear até a trama citoplasmática. Assim, a partir do núcleo, em direção ao processo ameloblástico temos uns poucos perfis de RER, um muito bem desenvolvido complexo de Golgi com seus grânulos característicos mais vesículas e corpos multivesiculados; mais distalmente observamos a porção mais representativa do RER que, em nossas micrografias não adentra o processo de Tomes; nem ao menos chega até a trama terminal supranuclear.

Segundo demonstraram Carneiro (1959) e Warshawsky e col., (1963) em outros tipos de células, a presença de ribossomas livres é indício de produção de proteínas estruturais, assim como RER o é de proteínas exportáveis. Nos ameloblastos secretores temos relativamente grande quantidade de ambos os tipos de estruturas e a comprovação de que eles produzem, tanto um como outro tipo de proteína, pode ser obtida em trabalhos de radioautografia com precursores radioativos das proteínas aí produzidas (Blumen, 1970; Blumen e Merzel, 1972 e 1973; Frank, 1970; Warshawsky e Vugman, 1977).

Quanto ao complexo de Golgi, cada uma das suas unidades estruturais mostrou-se bastante semelhante às dos ameloblastos secretores de outros animais. Resumidamente constam de conjuntos com números variáveis de sáculos membranosos achatados empilhados; nota-se uma espécie de polaridade nesta estrutura no sentido de que os sáculos mais externos, mais curtos e mais largos, contêm um material mais claro, considerado imaturo em relação ao que se encontra nos sáculos mais internos que

aparecem mais longos, porém muito mais estreitos. O conteúdo dos sáculos, progressivamente mais denso, acumula-se em dilatações que aparecem nas extremidades dos bem internos e assemelha-se aos grânulos de secreção que vemos tanto na região do complexo de Golgi como no processo de Tomes, como a indicar sua migração para este. Trabalhos radioautográficos comprovam esta hipótese (Leblond e col. 1955; Blumen, 1970; Blumen e Merzel, 1972, 1973; Frank, 1971; Weinstock e Leblond, 1971; Weinstock, 1972; Warshawsky e Vugman, 1977; Kallenbach, 1978; Warshawsky, 1978).

Não pudemos obter evidências morfológicas da extrusão do material destes grânulos no espaço extracelular, mas os trabalhos RAG acima citados a nível de M.O. e de M.E. e alguns trabalhos morfológicos ao M.E. têm conseguido, através de fotografias bastante sugestivas, a evidência da extrusão que apenas pudemos inferir (Frank e Nalbandian, 1963; Reith, 1967; Warshawsky, 1968; Matthiessen e von Büllow, 1969; Kallenbach, 1973; Warshawsky e Vugman, 1977).

Na região do complexo de Golgi ou próximos a ela notam-se, além dos grânulos de secreção, vesículas encapadas, corpos que lembram lisossomas, corpos multivesiculados e outras inclusões menos características que sugerem que, além da atividade secretora, outros processos podem estar ocorrendo nesta região, muito provavelmente ligados à digestão intracelular (Katchburian e col.; Garant e Nalbandian, 1968; Katchburian e Holt, 1969).

As características morfológicas dos ameloblastos sugerem que eles se comportam como células merócrinas no seu modo de excretar o produto de síntese (Slavkin, 1974), mas diferentemente do que sugeriu Warshawsky (1963), eles não parecem assemelhar-se a células glandulares, onde a região do complexo de Golgi fica entre o RER organizado e a superfície secretora.

Alguns destes fatos relativos à porção supranuclear já haviam sido detectados por outros pesquisadores tais como Watson (1960); Nylén e Scott (1960); Reith (1961); Frank e Nalbandian (1963), Kallenbach e col., (1963); Kallenbach e col. (1965); Devotto e Scott, (1968); Warshawsky, (1968); Katchburian e Holt (1969); Matthiessen e von Büllow (1969); Weinstock, (1970 e 1972) Weinstock e Leblond (1971); Kallenbach (1972).

Esses investigadores, à exceção de Matthiessen e von

Büllow (1969), confirmam também as nossas observações de que o complexo de Golgi assume um formato tubular cujas paredes são constituídas de arranjos semelhantes a dictiosomas e de que o retículo endoplasmático, em cortes longitudinais, dispõe-se num arranjo de estruturas longas e aproximadamente paralelas de duplas membranas a cuja face externa aderem partículas de RNP.

Matthiessen e von Büllow (1969) estudaram dentes humanos cujos ameloblastos, em fase de secreção, mostravam o complexo de Golgi com aspecto de dictiosomas esparsos, em volta dos quais dispunham-se perfis arredondados de RER sem qualquer orientação preferencial aparente.

As vesículas contendo um material claro e envoltas por uma membrana, sobre as quais se nota um material flocoso chamamos genericamente vesículas encapadas. São abundantes na região do complexo de Golgi, mas podem ser vistas, em nossas micrografias, espalhadas em maior ou menor quantidade por todo o citoplasma, abrindo-se, às vezes, na membrana ameloblástica. Em molares de cobaia atingem tamanho variável entre 640 a 1800Å, na maior parte das micrografias.

Tradicionalmente estas vesículas são consideradas capazes de transportar proteínas sendo que as maiores (cerca de 1000Å de diâmetro) o fariam da membrana plasmática para o interior e, eventualmente, se fundiriam com corpos multivesiculares; as menores (aproximadamente 750Å de diâmetro) transportariam enzimas líticas do complexo de Golgi a corpos multivesiculares - (Friend e Farquhar, 1967).

Além dos corpos multivesiculares, que neste trabalho, estão sendo considerados uma espécie de vacúolo digestivo, há ainda nesta região, corpos cuja membrana apresenta uma espécie de placas ligeiramente mais densas na membrana o que, segundo alguns estudiosos, pode ser um indício morfológico do processo de fusão das "CV" a eles. (Rosenbluth e Wissig, 1964; Smith e Farquhar, 1966; Friend e Farquhar, 1967).

Há algumas hipóteses tentando explicar a presença de tão desenvolvido sistema digestivo numa células secretora.

Segundo uma, o ameloblasto regularia a excreção do material sintetizado pelo rompimento do excedente em corpos multivesiculares à maneira do que se verifica na hipófise (Smith e Farquhar, 1966).

Outra sugere que já na região de deposição da matriz

de esmalte possa haver remodelação com degradação de parte do componente proteico (Eastoe, 1963; Reith, 1967; Katchburian e Holt, 1969).

Uma terceira admite que além da degradação possa haver, já nesta região, uma reabsorção de parte do componente proteico (Blumen, 1970, 1977, 1979; Blumen e Merzel, 1972, 1974 e 1976; Fukae e Shimizu, 1974; Robinson e col. 1977; Seyer e Glimcher, 1977).

Estudos citoquímicos realizados por Garant e Nalbandian (1968) entre outros, indicam que fosfatase ácida é abundante tanto nas cisternas do complexo de Golgi como em corpos citoplasmáticos com dimensões comparáveis a lisossomas e MVB (Katchburian e col., 1967).

Tais observações indicam que os ameloblastos possuem um sistema bem desenvolvido para degradação de material endógeno e exógeno.

Limite entre ameloblastos e esmalte

Os ameloblastos completamente diferenciados apresentam um processo celular (processo de Tomes) bastante desenvolvido e grande número de pesquisadores atribuem-lhes a secreção de matriz de esmalte imaturo, isto é, apenas parcialmente mineralizada (Leblond e col., 1955; Nysten e Scott, 1960; Reith, 1961; 1967; 1970; Frank e Nalbandian, 1963; 1967; Costacurta, 1965; Elwood e Bernstein, 1968; Garant e Nalbandian, 1968; Matthiesen e von Bülow, 1969; Frank, 1971; Weinstock e Leblond, 1971; Weinstock, 1972; Warshawsky e Vugman, 1977; Leblond e Warshawsky, 1979).

Morfologicamente, podemos observar, em nossos resultados, que o processo de Tomes inclui grânulos de secreção, algumas vesículas e uns poucos corpos multivesiculados e que a membrana celular que o separa da matriz do esmalte muitas vezes apresenta invaginações irregulares conforme podemos observar em nossas micrografias de números 31 a 34.

Trabalhos de RAG têm auxiliado na elucidação dos locais de síntese de proteínas e sua migração no interior da célula para o exterior, em direção à matriz. Assim, tem-se usado aminoácidos tritiados para proteínas em geral (Blumen, 1970; Blumen e Merzel, 1972, 1973, 1976; Warshawsky e Vugman, 1977;

Leblond e Warshawsky, 1979; ^{33}P -fosfato para fosfoproteínas (Weinstock, 1979); carboidratos tais como ^3H - galactose, fucose (Weinstock e Leblond, 1971; Weinstock, 1972), N-acetilmanosamina para as glicoproteínas (Weinstock e Leblond, 1971; Leblond e Warshawsky, 1979) e ^{35}S - sulfato para proteoglicans sulfatados (Leblond, Bélanger e Greulich, 1955; Blumen, 1970; Weinstock, 1972; Weinstock e Young, 1972; Blumen e Merzel, 1976).

Todos os quatro tipos de precursores demonstraram uma reação radioautográfica sobre os ameloblastos secretores e, em cerca de meia hora após a injeção, sobre os processos de Tomes e matriz adjacente a eles.

Assim, segundo conclusões de vários pesquisadores, utilizando diferentes métodos de estudo, a matriz do esmalte é um produto de secreção dos ameloblastos (Blumen, 1970, 1977, 1979; Weinstock e Leblond, 1971; Blumen e Merzel, 1972, 1973, 1976; Slavkin, Mino e Bringas, 1976; Warshawsky e Vugman, 1977; Eastoe, 1979; Frank, 1979; Leblond e Warshawsky, 1979; Sasaki e Shimokawa, 1979).

Atualmente aceita-se que o esmalte em desenvolvimento contém um sistema heterogêneo de proteínas diferentes de colágeno e queratina (Frank, 1979), admitindo-se que talvez o ameloblasto secrete apenas uma proteína de esmalte (Fukae e col. 1972) que depois é cindida em outras. Neste sentido Seyer e Glimcher (1977) demonstraram que o grande número de componentes encontrados no esmalte de bovinos não se deve a proteólise durante o procedimento bioquímico. Segundo estes pesquisadores, uma degradação de proteínas de alto peso molecular pode ocorrer "in vivo", rapidamente e antes da perda de proteínas que se verifica durante a maturação do esmalte.

Por outro lado, a maioria dos estudiosos dessa área, parece estar de acordo com Eastoe (1963) e Fearnhead (1963) que consideram, o material orgânico da matriz, um gel tixotrópico.

Nos trabalhos apresentados no Terceiro Simpósio Internacional sobre Esmalte Dentário (1979), parece haver um consenso em se considerar que existem dois grupos de proteínas, no esmalte: "amelogenins" e "enamelins".

"Amelogenin" foi um termo sugerido por Eastoe (1965) para designar a família de proteínas com pesos moleculares na faixa de 16 000 a 25 000 daltons, aproximadamente, em que predominam prolina, leucina e histidina. Acredita-se que são as que

se perdem durante a maturação. "Enamelin" é o nome reservado para uma segunda família de proteínas de pesos moleculares entre 3 500 e 5 000 daltons. São constituídas principalmente de glicina, serina e ácido aspártico e acreditam alguns pesquisadores tratar-se das proteínas persistentes no esmalte (Eastoe 1965, 1979; Eggert, Allen e Burgess, 1973; Leblond e Warshawsky, 1979).

Eastoe (1979) afirma que a matriz do esmalte jovem é formada de uns vinte componentes distintos com pesos moleculares entre 3 000 e 16 000 daltons que estão em equilíbrio com agregados maiores e que durante a maturação a maior parte destes componentes é perdida seletivamente do esmalte. A perda já havia sido descrita por Deakins (1942), em dentes de porco, em desenvolvimento. Verificou-se também que as proteínas de maior peso molecular aumentam rapidamente no início do compartimento secretor enquanto as de peso molecular menor o fazem perto do final (Leblond e Warshawsky, 1979).

Estudos bioquímicos têm mostrado que certa quantidade de matéria orgânica pode ser removida enquanto os ameloblastos estão secretando (Fukae e Shimizu, 1974; Robinson e col. 1977; Seyer e Glincher, 1977). A possibilidade de reabsorção pelos ameloblastos secretores, que tem sido sugerida com base em características morfológicas, principalmente do processo de Tomes (Reith, 1967; Garant e Nalbandian, 1968; Smith, 1979), já havia sido observada por Blumen (1970; 1977; 1979) e Blumen e Merzel (1972; 1973; 1976) em trabalhos de radioautografia com aminoácidos tritiados.

Vale salientar que, talvez reforçando a idéia de que os "amelogeníns", ricos em prolina dentre outros aminoácidos, são as substâncias perdidas na maturação, Blumen (1970; 1977; 1979) obteve os resultados mais expressivos exatamente com este aminoácido.

Em relação à maneira de secreção não se sabe ainda exatamente como os ameloblastos eliminam o material que sintetizam, mas pensa-se que o que é eliminado pelo topo do processo de Tomes torna-se prisma de esmalte, enquanto o que o faz pela superfície entre células adjacentes torna-se material interprismático (Weinstock e Leblond, 1971; Skobe, 1976; 1977; Kallenbach, 1977; Warshawsky e Vugman, 1977; Warshawsky, 1978; Frank, 1979; Smith, 1979).

COMPARTIMENTO DE TRANSIÇÃO

Entre os compartimentos de secreção e pós-secreção propriamente considerados, observamos, em nossa micrografia, (Fig. 35) uma zona de umas poucas células que se caracterizam, ao microscópio óptico, por apresentarem glóbulos relativamente grandes no citoplasma, tanto na camada de ameloblastos como no estrato intermédio, onde aparecem em maior número.

Esta característica marcante desta zona de transição fora observada também por outros autores ao M.O., tanto em molares de cobaia (Wassermann, 1944; Blumen, 1970) como em incisivos de ratos (Marsland, 1952; Symons, 1962).

Com base em reações citoquímicas Symons (1962) já sugerira tratar-se de constituintes celulares, ou células em de geração, o que morfológicamente foi constatado ao microscópio eletrônico, onde aparecem como vacúolos autofágicos ou citossegrossomas, apresentados, aqui, à Fig. 35 e visto também por Elwood e Bernstein (1968); Moe e Jessen (1972) em incisivos de ratos e por Reith (1970), em molares de ratos.

O significado dessas estruturas ainda não está totalmente esclarecido, mas há evidências morfológicas de que, em incisivos de rato, ameloblastos inteiros, ou partes deles degeneraram (Moe e Jessen, 1972).

Por outro lado, em seu trabalho com molares de rato, Reith (1970), verificando o grande número destes "glóbulos" no estrato intermédio, especulou que podem representar degeneração de algumas das células deste estrato. É notável um certo desarranjo desta camada celular, nesta região; segundo Reith (1970) o rearranjo posterior não seria perfeito, ficando muitas células desacomodadas, o que se verifica, segundo ele, pelos espaços intercelulares maiores. Assim, as que não se acomodam pereceriam, eventualmente.

Outra hipótese é de que só ameloblastos pereçam. Os restos destas células degeneradas poderiam ter dois destinos: ser fagocitados por células do estrato intermédio ou ser englobados pelos ameloblastos vizinhos e, então, transportados para o estrato intermédio, onde, em qualquer dos dois casos, seriam digeridos (Moe e Jessen, 1972).

No entanto algumas questões ficam em aberto: quantas e quais células degeneram; há alguma significância deste fenô

meno em relação ao número total de células necessário à maturação do esmalte (Reith, 1970); o que motivaria a degeneração ?

Em resposta a esta última questão, há alguns estudos interessantes sobre lisossomas que demonstram que ocorre autofagia, ou seja, introdução de partes da célula em seus próprios lisossomas, sempre que a célula necessita usar partes de sua própria estrutura para renovação dos seus constituintes essenciais ou como combustível (De Duve, 1969). Seria este o caso dos ameloblastos que saem de um ativo período de secreção ?

Também há possibilidade de uma autodissolução da célula pela ruptura das membranas lisossômicas. Tal fenômeno ocorre, por exemplo, em células repentinamente privadas de oxigênio, ou expostas a certos venenos celulares (De Duve, 1969). Se este for o caso, poderia a ligeira desorganização do estrato intermédio ser o responsável pelas trocas imperfeitas entre ameloblastos e capilares, com conseqüente dissolução de algumas células por falta de oxigênio e/ou acúmulo de resíduos tóxicos ?

As demais alterações de estrutura discutiremos juntamente com a região pós-secretora, propriamente dita.

COMPARTIMENTO PÓS-SECRETOR

Os ameloblastos deste compartimento, oclusalmente dispostos em relação àqueles que ao M.O. apresentam "glóbulos" no citoplasma, são tradicionalmente relacionados às funções de secreção da capa celular (Weinstock, 1972) ou cutícula primária (Provenza e Sisca, 1970) e maturação do esmalte (Wassermann, 1944; Marsland, 1952; Reith e Cotty, 1966; Kallenbach, 1968; Reith, 1970).

Nosso estudo, de caráter morfológico apenas, permite-nos algumas especulações baseadas nas profundas modificações - que observamos no conteúdo, disposição de organelas e tamanho dos ameloblastos.

Comparando as Figuras 35, 36B e 43, observamos, por exemplo, o paulatino desaparecimento da trama citoplasmática e, finalmente, da "Z.A." as quais constituem o aparato da barra terminal "infranuclear". Como conseqüência disto e, talvez, devido a artefato de técnica, temos um aumento do espaço lateral entre os ameloblastos. Tal fato foi observado também por Reith (1963; 1970); Kallenbach (1968); Boyde e Reith (1976); Frank

(1979); Fejerskov (1979); Leblond e Warshawsky (1979); Revel (1979); Smith (1979).

Quanto à barra terminal supranuclear, aparece, em nos sas micrografias, reduzida à "ZA" nos locais onde é bem eviden te.

Embora haja alguma controvérsia sobre a possível cau sa do fenômeno, um trabalho de Revel (1979), com lantânio, de monstrou que esta substância que se difunde através do espaço interameloblástico não atinge o esmalte, embora chegue até meio caminho no compartimento de transição e até mais adiante nos compartimentos de maturação precoce ou tardia.

Há estudiosos que acreditam que se trate de uma difi culdade maior ou menor de difusão, porém outros crêem que o lantânio caminha mais facilmente no compartimento de pós-secreção em locais onde não há barra terminal e, conquanto Warshawsky (1979) tenha lembrado que complexos juncionais não selam o espaço intercelular, Bawden (1979) sugere que talvez retardem a difusão de substâncias.

Quanto ao núcleo, ainda se localiza predominantemente na extremidade oposta à do esmalte, mas como a demonstrar um certo desarranjo da camada ameloblástica, neste compartimento, às vezes ele pode ser visto em altura diferente desta. (Fig. 38)

Os mitocôndrias, espalhados por todo o citoplasma, po dem representar que o requerimento de energia agora está mais difundido por toda a célula. Chama atenção, por exemplo, o gran de número de mitocôndrias próximos ao labirinto apical ou bor do estriado dos chamados, por alguns autores, ameloblastos em fase de maturação precoce (Fig. 38, 40, 42, 44), como a indi car ali algum tipo de transporte ativo.

Em outras micrografias (Fig. 37, 39, 44) mitocôndrias são literalmente rodeados por pequenos perfis de RER. Significa ria isto que o processo de síntese está dificultado, necessitan do um suprimento extra de energia?

Conquanto bastante diminuídos e desorganizados em re lação aos do compartimento secretor, o RER e o complexo de Golgi são visíveis ainda nos ameloblastos reduzidos (Fig. 37B a 46B). Tal observação, reforçada pelos trabalhos de vários pes quisadores (Reith, 1961, 1963, 1970; Kallenbach, 1968; Provenza e Sisca, 1970; Weinstock, 1972; Revel, 1979; Smith, 1979) - tem-nos conduzido principalmente a duas hipóteses.

Assim, alguns estudiosos relacionam a permanência das organelas à secreção da capa celular (Weinstock, 1972) ou cutícula primária (Provenza e Sisca, 1970). Conquanto não especificuem o produto, vários pesquisadores (Hwang e col. 1963; Cotton e Hefferren, 1966; Smith, 1979) admitem uma função secretora para os ameloblastos reduzidos. Trabalhos radioautográficos com aminoácidos tritiados demonstraram uma pequena incorporação destes precursores. (Blumen, 1970).

Outra possível explicação seria a de que a região do complexo de Golgi sintetiza lisossomas e outros corpúsculos ligados ao processo digestivo os quais são abundantes, notadamente na região "supranuclear" dos ameloblastos reduzidos (Kallenbach, 1968). Segundo este estudioso talvez isto explique um aparato de síntese tão desenvolvido (Fig. 39 deste trabalho) numa célula que presumivelmente não elabora nenhum produto de secreção.

Vesículas encapadas ("CV") raramente foram observadas próximas ao espaço voltado para o esmalte (Fig. 40); mais frequentemente foram vistas na região do aparelho de Golgi (Fig. 39, 41, 45) próximas a vesículas aparentemente vazias (E), com pequenas placas densas na membrana envolvente (Fig. 41, 44, 45, 46B). Tais vesículas (E), sugere Kallenbach (1968), podem ser corpos multivesiculares imaturos sendo que as placas mais densas poderiam representar os pontos de fusão de CV.

Pensa-se que, se um ameloblasto tem função reabsorvente, deve estar capacitado também para degradar, no interior da célula, o material absorvido quando este possuir natureza orgânica (Smith, 1979).

Como já vimos, labirinto apical com os seus característicos hemidesmosomas, invaginações profundas, grânulos de conteúdo denso, canais tubulares retorcidos e mitocôndrias abaixo do nível da barra terminal "supranuclear" são características que fazem supor os ameloblastos reduzidos capazes de reabsorção (Marsland (1952), Reith (1961, 1963, 1970), Kallenbach (1968).

Porém, nos ameloblastos do compartimento secretor também observamos, nos processos de Tomes, hemidesmosomas, invaginações mais ou menos profundas da membrana, canais tubulares mais ou menos retorcidos e grânulos envolvidos por membrana (a maioria dos quais pensa-se tratarem-se de grânulos contendo esmalte) (Fig. 31 a 34)

Quanto à segunda exigência em relação a uma célula reabsorvente - a degradação do material orgânico reabsorvido - ambos os tipos de células têm um sistema lisossômico semelhante.

Pelo que podemos observar, as evidências morfológicas não parecem suficientes para se estabelecer definitivamente a função dos ameloblastos pós-secretoras. Por exemplo, a quantidade de material semelhante à matriz que podemos observar, umas poucas vezes, no interior das invaginações do "labirinto apical" (Fig. 42) parece-nos insignificante pelo menos em termos de quantidade, para justificar o grau de reabsorção que se atribui a esta zona.

Este material poderia, inclusive, ser arrastado para dentro das invaginações durante o processo de dobramento da membrana (Blumen, opinião pessoal).

Blumen (1970), apoiado no trabalho de Deakins (1942) e nos resultados de seu próprio trabalho de radioautografia com aminoácidos e sulfato, sugere que talvez os ameloblastos reduzidos tenham função reabsorvente ligada à perda de água que se verifica no processo de maturação.

O uso de técnicas histológicas um pouco mais apuradas, com resultados por vezes inesperados e surpreendentes, que envolvem RAG e reações bioquímicas, entre outras, tem levado alguns pesquisadores a uma revisão de conceitos sobre essas células.

Assim, trabalhos com aminoácidos tritiados (Blumen, 1970, 1972, 1973) e com ^{35}S - sulfato de sódio (Blumen, 1970 ; Blumen e Merzel, 1976) demonstraram que síntese, excreção e de crescimento de proteínas da matriz do esmalte ocorrem na região dos ameloblastos secretoras.

Tomando para exemplo os resultados obtidos para a prolina (Blumen, 1970), há uma intensa marcação na matriz do esmalte, na região de secreção, 24 horas após a administração do precursor radioativo, seguida de um decréscimo há 48 horas da injeção. Segundo cálculos do autor, são necessárias aproximadamente 120 horas para as células atravessarem este compartimento, de modo que não se pode atribuir a diminuição dos grãos de prata ao arrastamento dos ameloblastos para o compartimento pós-secretor.

A perda de material orgânico antes do aumento dos sais de Ca já fora verificada por vários investigadores, por RAG

(Leblond e col., 1955; Bélanger, 1955; Kumamoto e Leblond, 1958; Costacurta, 1964; Cotton e Hefferren, 1966).

Recentemente, um estudo dos ameloblastos secretores e pós-secretores, realizado por Smith (1979), com o objetivo de testar o conteúdo dos sistemas lisossômicos, morfologicamente-semelhantes, levou-o à conclusão de que: nestes dois tipos de células a) o órgão do esmalte contém altos níveis de atividade de fosfatase ácida, b) não há diferença significativa na capacidade de degradação dos ameloblastos primariamente secretores e ameloblastos considerados absorventes e envolvidos em degradação baseada em atividade desta enzima.

Assim, segundo este autor, embora a função secretora seja dominante numa fase do ciclo vital, as evidências que temos não parecem suficientes para se estabelecer uma função reabsorvente e degradativa como dominante em qualquer outro ponto do ciclo.

Posteriores ao trabalho de Blumen (1970), estudos bioquímicos (Fukae e Shimizu, 1974; Robinson e col., 1977; Seyer e Glimcher, 1977) e de RAG em material fixado por congelação (Blumen, 1977) têm demonstrado que uma certa perda de material orgânico pode ser detectada quando o ameloblasto está efetivamente secretando o esmalte. Porém, segundo Fukae e Shimizu (1974), Hiller e col. (1975) e Robinson e col. (1977) a maior perda de material orgânico, bem como uma mudança nas proporções de aminoácidos ocorre no que tem sido denominado limite opaco entre o "esmalte translúcido" (recentemente formado) e o "opaco" (inicialmente formado).

Limite dos ameloblastos com o esmalte em maturação

Como já tivemos oportunidade de discutir, várias observações, principalmente de caráter morfológico, levaram os pesquisadores a acreditarem que os ameloblastos pós-secretores têm função reabsorvente.

Pudemos observar em nossos resultados (Fig. 38, 40 e 42) que a certa altura do compartimento pós-secretor a porção mais distal da membrana "supranuclear" dos ameloblastos em contacto com o esmalte sofre uma série de invaginações.

Este fato foi observado também por vários pesquisadores em dentes de outros espécimes (Pindborg e Weinmann, 1959;

Reith, 1961; 1963; 1970; Elwood e Bernstein, 1968; Kallenbach, 1968; 1969; 1970; Weinstock, 1972; Fukae e Shimizu, 1974; Boyde e Reith, 1977; Revel, 1979; Smith, 1979, dentre outros.

Em incisivos de roedores foi descrito (Fukae e Shimizu, 1974; Boyde e Reith, 1977) que os ameloblastos perdem e refazem este labirinto apical ou bordo estriado periodicamente enquanto completam o processo de maturação do esmalte. Acrescentaram ainda estes pesquisadores que as células deste compartimento permanecem cerca de 80% do tempo com e 20% sem o bordo estriado, o que corresponderia a, aproximadamente, duas vezes, enquanto o esmalte está em maturação, e a, mais duas ou três vezes quando completamente maturo (Smith, 1979).

Em molares de cobaia não observamos esta oscilação, mas achamos interessante o reaparecimento do bordo estriado, em incisivos de roedores, na região de esmalte maturo.

Outros fatos reforçam a idéia de reabsorção neste compartimento, a saber: um número bastante expressivo de mitocôndrias acumula-se na região "supranuclear" e muitos deles ficam em relação com as invaginações do labirinto apical. Esta observação que pode ser feita nas Figuras 37B a 42 e 44, foi relatada também por outros estudiosos (Reith, 1961; 1970; Elwood e Bernstein, 1968) que relacionaram a presença dos mitocôndrias ao requerimento de energia para algum tipo de transporte ativo.

Na altura da zona "E" do nosso trabalho, observamos algumas invaginações que contêm um material semelhante à matriz de esmalte em dentes descalcificados, observação que também foi relatada por Kallenbach (1966); Reith (1970).

São fatos estabelecidos que a secreção de esmalte cessa quando a espessura definitiva deste é alcançada e que o processo de maturação envolve a perda de substâncias orgânicas e água, perda esta acompanhada de um acréscimo da fração mineral.

Associando todas essas informações, seria racional pensarmos que os ameloblastos pós-secretórios têm função absorvente. Consideremos, porém, algumas evidências que talvez nos auxiliem a definir o que poderia, ou não, estar sendo reabsorvido.

Trabalhos de RAG não demonstraram reabsorção de material orgânico pelos ameloblastos reduzidos (Blumen, 1977; 1979a; 1979b). Resultados semelhantes demonstraram os estudos bioquímicos realizados por Fukae e Shimizu (1974), Robinson e col. (1977), Seyer e Glimcher (1977), que detectaram uma certa per

da de matéria orgânica, quando os ameloblastos estão secretando o esmalte. Porém, a maior perda de material orgânico, bem como mudança na proporção dos aminoácidos, eles observaram no limite opaco entre os esmaltes "translúcido" e "opaco".

Qualquer que seja o caso nos molares de cobaia, parece não haver reabsorção de frações proteicas no compartimento pós-secretor. Mesmo com base na observação daquele material semelhante a matriz dentro das invaginações, parece-nos que a proporção do evento não é significativa para justificar toda a reabsorção de proteína que se admite fica reduzida a menos de 10% da quantidade inicialmente depositada (Deakins, 1942).

Justificando a presença do labirinto apical, Kallenbach (1966) sugere que ele poderia estar relacionado à absorção de água e eletrólitos e/ou transporte de sais minerais em sentido contrário (Elwood e Bernstein, 1968).

Por outro lado, enquanto a presença de leucil-naftilamida nos ameloblastos reduzidos, durante a maturação, sugere função absorvente e degradativa, nenhuma atividade de protease foi encontrada neste estágio (Frank, 1979).

Essas células revelaram altos níveis de atividade de enzimas oxidativas que talvez reflitam uma função produtora de energia para o transporte ativo de íons inorgânicos através do epitélio do esmalte (Frank, 1979).

Finalmente, na região onde toda a matriz do esmalte é removida pelo processamento histológico, em dentes descalcificados, podemos ver, sobre a membrana, um material denso, conforme as Figuras 45 e 46A deste trabalho.

Estudos de RAG com ^3H - fucose (Weinstock, 1970; 1972) demonstraram que esta substância é incorporada em glicoproteínas que aparentemente contribuem para a formação dessa capa celular e de um material que se localiza na superfície do esmalte em maturação. Como percebemos, estes resultados acenam com a possibilidade de uma função secretora para os ameloblastos pós-secretores.

Uma análise de todos os dados que temos sobre o compartimento pós-secretor conduzem-nos a reforçar as palavras de Smith (1979) no sentido de que as funções dos ameloblastos reduzidos são ainda menos conhecidas que as dos secretores.

RESUMO E CONCLUSÕES

Segundos molares de cobaias de dois dias de vida, fixados por perfusão com uma solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato e pós-fixados por imersão no mesmo líquido, descalcificados em EDTA a 4,13% e pós-fixados finalmente, em tetróxido de ósmio a 1% foram incluídos em Epon para exame ao M.E.

Os compartimentos (de acordo com Blumen, 1970) do órgão do esmalte dos lados mesial ou distal foram selecionados, aparados e os ameloblastos mais algumas estruturas e células das regiões limítrofes de cada um deles, foram montados em telas de cobre de 200 a 300 "mesh".

Em resumo obtivemos as seguintes conclusões referentes a cada compartimento:

COMPARTIMENTO EMBRIONÁRIO:

1 - Os ameloblastos apresentam-se cúbicos ou ligeiramente alongados e com aparência morfológica de células interfásicas ou em mitose.

2 - As organelas citoplasmáticas são relativamente pouco desenvolvidas; há uns poucos mitocôndrias espalhados, um grande número de ribossomas livres, pouco RER, complexo de Golgi relativamente pouco desenvolvido, lateralmente colocado em relação ao núcleo ou no espaço entre o núcleo e a membrana voltada para o estrato intermédio.

3 - A trama citoplasmática "infra-nuclear" parece antes da "supra-nuclear".

4 - Em algumas regiões entre os ameloblastos há muito poucas estruturas juncionais o que pode ser responsável em parte pelos grandes espaços intercelulares.

5 - Há pouco grânulos e vesículas no citoplasma e os que existem geralmente se acumulam próximos à membrana voltada para as células mais superficiais da papila dental.

6 - Sobre os ameloblastos, na face voltada para as células mais superficiais da papila dental, há uma lâmina basal contínua. Pequenas projeções dos ameloblastos dão-lhe uma ondulação, porém não a rompem.

7 - No espaço, entre a lâmina basal e as células mais

superficiais da papila dental, aparecem prolongamentos destas últimas células, fibras de vários tipos - um material de fundo, finamente granulado; mas não pudemos distinguir nenhuma vesícula característica.

COMPARTIMENTO DE DIFERENCIAÇÃO

1 - Os ameloblastos que aparecem como células alongadas, perdem a capacidade de se dividirem (do que resulta ausência de figuras de mitose) e ensaiam o estabelecimento de polarização de suas organelas.

2 - A região "infranuclear", abaula-se e se complexa pelo aparecimento de vesículas e microvilosidades.

3 - A trama terminal "infranuclear", bem desenvolvida, serve de limite "inferior" para um compartimento mitocondrial que se estende até o núcleo. Os mitocôndrios também aparecem, às vezes em aglomerados próximos à trama terminal "supranuclear" que, até o final do compartimento de diferenciação, está bem desenvolvida.

4 - Estruturas juncionais e do citoesqueleto desenvolvem-se como a garantir a forma e a posição dos ameloblastos em diferenciação.

5 - O RER aumenta em quantidade. Possivelmente, como resultado de sua atividade e da do complexo de Golgi (que não foi observado em nossas micrografias), aparece, no espaço interameloblástico lateral, um material de textura grosseira (CTM). Em células mais oclusais, em lugar do CTM, vê-se um material de textura fina (FTM), que é visto também, em vesículas no interior dos ameloblastos e no espaço voltado para os odontoblastos.

6 - Acima da trama terminal "supranuclear", os ameloblastos emitem projeções mais desenvolvidas que contém, muitas vezes, grânulos densos, vesículas encapadas, corpos multivesiculados ... Estas projeções às vezes se aproximam muito das odontoblásticas, mas não observamos nenhum contacto direto entre elas.

7 - As projeções dos ameloblastos rompem a membrana basal a qual desaparece no final deste compartimento.

8 - A matriz extracelular muda de aspecto enriquecendo-se com fibras. Nas micrografias mais oclusais deste compartimento, as fibras apresentam as características das colágenas

que formam a pré-dentina.

COMPARTIMENTO SECRETOR

1 - Os ameloblastos alongam-se, ainda, no terço apical do compartimento secretor. Permanecem com essa altura máxima, até quase o final dessa zona e, aproximadamente no décimo mais oclusal dela, começam a regredir em altura.

2 - Aqui, considera-se que os ameloblastos exibem polaridade definida.

3 - Considerando a região "infranuclear": A) Em cerca de quatro quintos do compartimento, a partir do seu limite apical: I) o "compartimento bulbar" apresenta complexidade crescente quanto às ondulações da membrana, microvilosidades, vesículas encapadas, corpos multivesiculados... II) o espaço entre a trama terminal "infranuclear" e o núcleo de alguns ameloblastos está praticamente tomado por mitocôndrias, mas, em outros, aparecem muitos ribossomas livres e uns raros perfis de RER. Nas células mais apicais freqüentemente se acumula um material finamente granulado no interior das cisternas do RER. - B) No quinto mais oclusal: I) o "compartimento bulbar" é relativamente menos complexo, quer em aspectos que envolvem a membrana, quer em estruturas intracelulares. II) a trama terminal "infranuclear" apresenta regiões mais e menos densas e, entre ela e o núcleo, há, ainda, muitos mitocôndrias e um número relativamente maior de segmentos de RER, além de densos feixes de tonofibrilas.

4 - Considerando a região "supranuclear": A) Enquanto os ameloblastos estão se desenvolvendo e, durante o estágio em que conservam sua altura máxima, as estruturas relacionados aos processos de secreção e digestão, apresentam grande desenvolvimento. I) entre o núcleo e o complexo de Golgi, lateralmente a este, e, entre o complexo de Golgi e a trama terminal "supranuclear", dispõem-se, num arranjo aproximadamente paralelo ao longo-eixo da célula, os segmentos de RER. II) o complexo de Golgi, de aspecto tubular, tem as paredes formadas por um número variável ao redor de cinco sáculos. Desses, os mais externos são mais curtos e largos e contêm um material mais denso em relação aos mais internos. A porção correspondente à luz desse "túbulo" é rica em grânulos e vesículas. III) mate

rial semelhante ao dos grânulos aparece também em dilatações nas extremidades dos sáculos mais internos do complexo de Golgi. IV) as estruturas de aspecto vesicular mais freqüentes nessa região são as vesículas encapadas, aparecendo, próximos a elas, corpos multivesiculados, em menor quantidade.

Processos de Tomes

I) Os processos ameloblásticos atingem, no compartimento secretor, o seu máximo desenvolvimento em tamanho e complexidade.

II) Nos processos de Tomes encontramos grânulos morfológicamente semelhantes aos da região do complexo de Golgi e vesículas encapadas, as quais, às vezes, se abrem na membrana, bem como corpos multivesiculados. Além das vesículas encapadas, a membrana do processo de Tomes apresenta sulcos mais ou menos profundos, dentro dos quais aparece um material denso.

III) Até aproximadamente o limite oclusal do terço médio desse compartimento, os processos de Tomes dispõem-se em várias direções e considera-se que os ameloblastos, aí, estejam relacionados à secreção de esmalte interno. No terço mais oclusal eles se orientam todos na mesma direção (considera-se que secretam esmalte externo, então).

C) Em todas as células do compartimento secretor ocorre secreção de matriz de esmalte e há evidências morfológicas que sugerem reabsorção de parte desse material desde a zona de secreção de esmalte interno.

COMPARTIMENTO DE TRANSIÇÃO

1 - Separando os compartimentos de secreção e pós-secreção, podemos considerar um de transição, onde a principal característica é a presença de corpos membranosos, dentro dos quais há como que fragmentos celulares.

2 - Considera-se que tais estruturas são responsáveis pela segregação e posterior destruição de restos de células que perecem nesta zona.

COMPARTIMENTO DE PÓS-SECREÇÃO

1 - De modo geral, há uma involução em todas as estru

turas internas dos ameloblastos e uma certa perda da polaridade estabelecida no compartimento secretor.

2 - A membrana voltada para o esmalte, inicialmente lisa, descreve, a certa altura do compartimento pós-secretor, uma série de invaginações que formam o chamado "labirinto apical". Na parte mais oclusal dessa zona, os ameloblastos voltam a exibir uma face lisa na região de contato com o esmalte.

3 - Os mitocôndrias aparecem por todo o citoplasma acumulando-se, em número considerável, na região voltada para o estrato intermédio e próximos ao "labirinto apical".

4 - Na região "supra-nuclear" dos ameloblastos pós-secretores, ocorrem estruturas relacionadas à digestão tais como corpos multivesiculados e vesículas encapadas.

5 - A presença de "labirinto apical", mitocôndrias, corpos multivesiculados e vesículas encapadas na região "supra-nuclear" dos ameloblastos pós-secretores levou a maioria dos cientistas a acreditarem que estas células são responsáveis pela reabsorção de proteína, água e eletrólitos, pelo transporte de sais minerais e pela degradação da parte orgânica da matriz do esmalte reabsorvida. Estudos mais recentes têm conduzido a uma revisão desta hipótese, pelo menos no que diz respeito à fração da matriz.

6 - Diminui a quantidade de perfis de RER.

7 - Tradicionalmente, os ameloblastos pós-secretores não são considerados como células envolvidas em síntese de proteína exportável para formação da matriz. Porém os molares de cobaia apresentam um aparelho de Golgi bastante desenvolvido ainda, embora perca o seu formato tubular e adquira um arranjo de dictiosomas.

8 - Entre a membrana e o esmalte observa-se o depósito de um material, a capa celular, cuja síntese se atribui aos ameloblastos pós-secretores, o que talvez justifique, em parte, o pequeno RER e o aparelho de Golgi remanescentes.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, E. & HARVEY, W.R. J. Cell. Biol., 31:107, 1966. Apud GARANT, P.R. & NALBANDIAN, J., op. cit. ref. 46.
- BAWDEN, J.W. 1979. (Opinião Pessoal) Apud REVEL, J.P. op. cit. ref. 113, p. 746-8.
- BEHNKE, O. & MOE, H. An eletron microscope study of mature and differentiating Paneth cells in the rat, especially of their endoplasmatic reticulum and lisosomes. J. cell, Biol., 22: 633-52, 1964.
- BÉLANGER, L.F. Autoradiographic detection of radiosulfate in corporation by the growing enamel of rats and hamsters. J. dent. Res., 34: 20-7, 1955.
- BESCOL - LIVERSAC, J. Les mucopolysaccharides étudiés par la fixation du radio-sulfate. Annls Histochem., 3:309-65, 1958
- BLUMEN, G. Aspectos da formação e maturação da matriz orgânica do esmalte em molares de Cavia porcellus, L. estudados radioautograficamente. São Paulo, 1970. |Tese (Doutoramento) E.P.M.|
- _____. A participação dos ameloblastos secretores na remoção do material orgânico de matriz durante o processo de amelogênese estudada radioautograficamente através de incorporação de ³H- Prolina. Piracicaba, 1977. |Tese (Livre-Docência) F.O.P.|
- _____. Preliminary autohistoradiographic studies about the possible participation of the secretory ameloblasts during the enamel maturation. Cell molec. Biol., 24: 143-50, 1979.
- _____. 1979. (Comunicação Pessoal)
- _____ & MERZEL, J. The decrease in the concentration of organic material in the course of formation of the enamel matrix. Experientia, 28: 545-8, 1972.
- _____ & _____. 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.
- _____ & _____. Autoradiographic study with |³⁵S|-sodium

- sulphate of loss of sulphated glycosaminoglycans during amelogenesis in the guinea pig. Archs oral Biol., 21:513-21, - 1976.
- BÖSTRÖM, H. & ODEBLAD, E. Autoradiographic observation on the incorporation of ³⁵S-labeled sodium sulfate in the rabbit fetus. Anat. Rec., 115: 505-14, 1953.
- BOYDE, A. & REITH, E.J. Scanning electron microscopy of the lateral cell surfaces of rat incisor ameloblasts. J. Anat. (Lond.), 122: 603-10, 1976.
- _____ & _____. Scanning electron microscopy of rat maturation ameloblasts. Cell Tiss. Res., 178: 221-8, 1977.
- BOYLE, P.E.; HILLIER, J.; DAVIDSON, N.R. Preliminary observations of the enamel of human and guinea pig teeth using the electron microscope. J. dent. Res., 25: 156, 1946.
- BRIGHTMAN, M.W. Am. J. Anat., 117:193, 1965. Apud GARANT, P. R. & NALBANDIAN, J., op. cit. ref. 46.
- BURKE, C.N. & GEISELMAN, C.W. Exat anhydride epoxi percentages for electron microscopy embedding (Epon). J. Ultrastruct Res., 36:119-26, 1971.
- CARNEIRO, J. Estudo radioautográfico sobre síntese proteica. Incorporação de Leucina, Metionina e Glicina radioativas (³H) em tecidos de camundongos. Recife, 1959. [Tese (Livre-Docência) - F.M.]
- COPELAND, E.J. J. Cell Biol., 23:253, 1964. Apud GARANT, P. R. & NALBANDIAN, J., op. cit. ref. 46.
- COSTACURTA, L. Autoradiography of incorporated Leucine-³H in the enamel matrix and enamel organ of the upper incisor of the rat. Nucl. Med., IV: 186-92, 1964.
- _____. A study of cell height and nuclear volume in the enamel organ during amelogenesis in the upper incisor of the rat. J. dent. Res., 44: 1247-53, 1965.
- COTTON, W.R. & HEFFERREN, S.M. An autoradiographic study of triptophane - ³H incorporation into rat enamel and dentine matrices. Archs oral Biol., 11: 1027-37, 1966.
- CROISSANT, R.; GUENTER, H.; SLAVKIN, H.C. How are embryonic preameloblasts instructed by odontoblasts to synthesize ena

- mel ? In: SLAVKIN, H.C. & GREULICH, R.C., eds. Extracellular matrix influences on gene expression. New York, Academic press, 1975. p. 515-21.
- DEAKINS, M. Changes in the ash, water and organic content of pig enamel during calcification. J. dent. Res., 21:429-35, 1942.
- DECKER, J.D. A light and electron microscope study of the rat molar enamel organ. Archs oral Biol., 8:301-10, 1963.
- DE DUVE, C. Lysosomes: a new group of cytoplasmic particles. In: HAYASHI, T. ed. Subcellular particles. Ronald press, 1959. Apud DE DUVE, C., op. cit. ref. 28.
- _____. O lisosomo. In: SCIENTIFIC AMERICAN. A célula viva. São Paulo, Polígono - Ed. U.S.P., 1969. pt. 2, art. 7, p. 74-83.
- DEVOTTO, C.H.F. & SCOTT, D.B. Ultra estructura de los cuerpos adamantinos de los ameloblastos de raton. Revta Soc. argent. Biol., 44: 163-9, 1968.
- DZIEWIATKOWSKY, D.D. Rate of excretion of radioactive sulfur and its concentration in some tissues of the rat after intraperitoneal administration of labeled sulfate. J. biol. Chem., 178: 197-202, 1949.
- _____. Isolation of chondroitin sulfate - ³⁵S from articular cartilage of rat. J. biol. Chem., 189: 187-90, 1951.
- _____. Utilization of sulfate sulfur in the rat for the synthesis of cystine. J. biol. Chem., 207: 181-6, 1954.
- EASTOE, J. E. The aminoacid composition of proteins from the oral tissues. II- The matrix protein in dentine and enamel from developing human deciduous teeth. Archs oral Biol., 8: 633-52, 1963.
- _____. Enamel protein chemistry - past, present and future. J. dent. Res., 58(Spec. issue B): 753-64, Mar. 1979.
- ELWOOD, W.K. & BERNSTEIN, M.H. The ultrastructure of the enamel organ related to the enamel formation. Am. J. Anat., 122: 73-94, 1968.
- EGGERT, F.M.; ALLEN, G.F.A.; BURGUESS, R.C. Amelohins purification and partial characterization of proteins from develop

- FARQUHAR, M.G. & PALADE, G.E. Junctional complexes in various epithelia. J. cell Biol.,17: 375-412, 1963.
- FEARNHEAD, R.W. Recent observations in the structure of developing enamel. Archs oral Biol., (Spec. Suppl.):257-64,1963
- FEJERSKOV, D. Human dentition and experimental animals. J. dent. Res.,58: (Spec.issue B):725-34, 1979.
- FRANK, R.M. Autoradiographic quantitative de l'amelogenese en microscopie eletronique a l'aide de la proline tritiee chez le chat. Revue fr. Odonto-Stomat.,18: 577-90, 1971
- _____. Tooth enamel: current state of the art. J. dent.Res 58(Spec.issue B): 684-94, 1979.
- _____ & NALBANDIAN, J. Comparative aspects of development of dental hard structures. J. dent. Res.,42:422-37, 1963.
- _____ & _____. Ultrastructure of amelogenesis. In: MILES, A.E.W., ed. Structural and Chemical Organization of teeth. New York, Academic press, 1967. V. 1, p. 399-466.
- FRIEND, D.S. & FARQUHAR, M.G. J. cell Biol.,35:357, 1967. A pud GARANT, P.R. & NALBANDIAN, J., op. cit. ref. 46
- FUKAE, M. & SHIMIZU, M. Studies on the proteins of developing bovine enamel. Archs oral Biol., 19:381-6, 1974.
- GARANT, P.R. & NALBANDIAN, J. Observations on the ultrastructure of ameloblast with special reference to the Golgi complex and related components. J. Ultrastruct. Res., 23:427-43, 1968.
- GUENTHER, H.; CROISSANT, R.D.; SCHONFELD, S.E.; SLAVKIN, H.C. Identification of four extracellular matrix enamel proteins during embryonic rabbit tooth organ development. Biochem.J., 163: 591-603, 1977.
- HAM, A.W. Histologia. 7. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. p. 128, 129 e 179.
- HAMPP, E. G. Mineral distribution in the developing tooth. Anat Rec., 77:273-91, 1940.
- HARMAN, M.T. & SMITH, A. Some observations on the development of the teeth of *Cavia cobaia*. Anat. Rec., 66:97-111, 1936.
- HILLER, C.R.; ROBINSON, C.; WEATHERELL, J.A. Variations in the

- composition of developing rat incisor enamel. Calc. Tiss. Res., 18: 1-12, 1975.
- HOMMES, O.R.; WARSHAWSKY, H.; LEBLOND, C.P. Fixation of brain and incisor teeth for light microscopy; glutaraldehyde perfusion followed by immersion in bouin's fluid. Stain Technol., 41(5): 261-5, 1966.
- HUNT, A.M. A description of the molar teeth and investing tissues of normal guinea pigs. J. dent. Res., 38: 216-31, 1959.
- _____ & PAYNTER, K.J. The role of cells of the stratum intermedium in the development of the guinea pig molar. A study of cell differentiation and migration using tritiated Thymidine. Archs oral Biol., 8: 65-78, 1963.
- HWANG, W.S.S.; CRONKITE, E.P.; TONNA, E.A. Cell proliferation kinetics of the internal enamel epithelium of mouse incisors. J. dent. Res., 45: 350-8, 1966.
- _____ ; TONNA, E.A.; CRONKITE, E.P. An autoradiographic study of the mouse incisor tritiated Histidine. Archs oral Biol., 8: 377-95, 1963
- IVERSON, R.M.; CHAFFEE, R.C.; MAZIA, D. Apud MAZIA, D., op.cit. ref. 88
- JAMIESON, J.D. & PALADE, G.E. J. cell Biol., 39: 589, 1968. Apud KALLENBACH, E., op. cit. ref. 64.
- KALLENBACH, E. Electron microscopy of the papillary layer of rat incisor enamel organ during enamel maturation. J. Ultrastruct. Res., 14: 518-33, 1966.
- _____. Cell architecture in the papillary layer of rat incisor enamel organ at the stage of enamel maturation. Anat. Rec., 157: 683-98, 1967.
- _____. Fine structure of rat incisor ameloblasts during enamel maturation. J. Ultrastruct. Res., 22: 90-119, 1968.
- _____. Fine structure of rat incisor enamel organ during late pigmentation and regression stages. J. Ultrastruct. Res., 30: 38-63, 1970.
- _____. Electron microscopy of the differentiating rat incisor ameloblast. J. Ultrastruct. Res., 35: 508-31, 1971.
- _____. Granules in cisternae of rough endoplasmic reticu

- lum (RER) of preameloblasts and ameloblasts and a possible function of the RER in preameloblasts of rat incisor. J. Ultrastruct. Res., 39: 96-105, 1972.
- _____. The fine structure of Tomes' process of rat incisor ameloblasts and its relationship to the elaboration of enamel. Tissue & Cell, 5: 501-24, 1973.
- _____. Fine structure of differentiating ameloblasts in the kitten. Am. J. Anat., 145: 283-317, 1976.
- _____. Fine structure of secretory ameloblasts in the kitten. Am. J. Anat., 148: 479-512, 1977.
- _____. Fine structure of the stratum intermedium, stellate reticulum and outer enamel epithelium in the enamel organ of the kitten. J. Anat., 126: 247-60, 1978.
- _____; CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P. The cell web in the ameloblasts of the rat incisor. Anat. Rec., 153: 55-70, 1965.
- _____; SANDBORN, E.; WARSHAWSKY, H. The Golgi apparatus of the ameloblast of the rat at the stage of enamel matrix formation. J. Cell Biol., 16: 629-32, 1963.
- KARPISHKA, I.; LEBLOND, C.P.; CARNEIRO, J. Radioautographic investigation of the uptake of labelled methionine by the dentine and enamel matrix of growing teeth. Archs oral Biol., 1: 23-8, 1959.
- KASHIWA, H.K. & SIGMAN JR., M.D. Calcium localized in odontogenic cells of rat mandibular teeth by the Glyoxal Bis (2-hydroxyanil). J. dent. Res., 45: 1796-9, 1966.
- KATCHBURIAN, E. & BURGUESS, R.C. Fine structure of contacts between ameloblasts and odontoblasts in the rat tooth germ. Archs oral Biol., 22: 551-3, 1977.
- _____ & HOLT, S.J. Role of lysosomes in amelogenesis. Nature, 223: 1367-8, 1969.
- _____ & _____. Studies on the development of ameloblasts I - Fine structure. J. cell Sci., 11: 415-47, 1972.
- _____; KATCHBURIAN, A.V.; PEARSE, A.G.E. Histochemistry of lysosomal enzymes in developing teeth of albino rats. J. Anat., 101: 783-92, 1967.

- KERR, J.F.R. Liver cell defaecation: an electron-microscope study of the discharge of lysosomal residual bodies into the intercellular space. J. Path. Bact., 100:99-103, 1970.
- KOCH, W.; KOCH, B.; LEDBURY, P. In vitro differentiation of tooth rudiments of embryonic mice. II- Growth of isolated thirds of embryonic mouse incisors. Anat. Rec., 166: 517, 1970.
- KOLLAR, E.J. Histogenetic aspects of dermal-epidermal interactions In: SLAVKIN, H.C. & BAVETTA, L.A., eds. Developmental aspects of oral biology. New York, Academic press, 1972 cap. 7, p. 126-49.
- KULWICH, R.; STRUCLIA, L.; JACKSON, J.T.; PEARSON, P.B. Synthesis of cystine and methionine from ³⁵S- labelled sodium sulfate in the rabbit. Fed. Proc., 13: 463, 1954.
- KUMAMOTO, Y & LEBLOND, C.P. Visualization of ¹⁴C in the tooth matrix after administration of labelled hexoses. J. dent. Res., 37:147-61, 1958.
- LEBLOND, C.P. & WARSHAWSKY, H. Dynamics of enamel formation in the rat incisor tooth. J. dent. Res., 58 (Spec. issue B): 950-79, 1979.
- _____ ; BÉLANGER, L.F.; GREULICH, R.C. Formation of bones and teeth as visualized by radioautography. Ann. N.Y. Acad. Sci. 60: 629-59, 1955.
- LUFT, J. Improvements in epoxy-resin-embedding. J. biophys. biochem. Cytol., 9: 409, 1961.
- MARSLAND, E. A. Histological investigation of amelogenesis in rats. I- Matrix formation. Br. dent. J., 91: 251-61, 1951.
- _____. A histological investigation of amelogenesis in rats. II- Maturation. Br. dent. J., 92: 109-19, 1952.
- MATTHIESSEN, M.E. & VON BULLOW, F.A. The ultrastructure of human secretory ameloblasts. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 101: 232-40, 1969.
- MAZIA, D. Como as células se dividem. In: SCIENTIFIC AMERICAN A célula viva. São Paulo, Polígono - Ed. U.S.P., 1969. pt 5, art. 17, p. 209-22.
- MESSIER, B. & LEBLOND, C.P. Cell proliferation and migration

as revealed by radioautography after injection of Thymidine ³H into male rats and mice. Am. J. Anat., 106:247-85, 1960.

MEYER, J.M.; FABRE, M.; STAUBLI, A.; RUCH, J.V. Relations cellulaires au cours de l'odontogenèse. J. Biol. Buccale, 5: 107-19, 1977.

MILLER, S. & WARSHAWSKY, H. Quantitative investigation of enamel matrix synthesis in the incisor of the rat. McGill Dent. Rev., 26:30-3, 1963.

MOE, H. Morphological changes in the infranuclear portion of the enamel-producing cells during their life cycle. J. Anat., 108: 43-62, 1971.

_____ & JESSEN, H. Phagocytosis and elimination of amelocyte debris by stratum intermedium cells in the transitional zone of enamel organ of rat incisor. Z. Zellforsch., mikroskop. Anat., 131: 63-75, 1972.

MUNHOZ, C.O.G. & LEBLOND, C.P. Deposition of calcium phosphate into dentin and enamel as shown by radioautography of sections of incisor teeth following injection of ⁴⁵Ca into rats. Calc. Tiss. Res., 15:221-35, 1974.

NAGAI, N. & FRANK, R.M. Transfer du ⁴⁵Ca par autoradiographie en microscopie électronique au cours de l'amélogénèse. Calc. Tiss. Res., 19: 211-21, 1975.

NEUTRA, M. & LEBLOND, C.P. The Golgi apparatus. Scient. Am., 5: 100-7, 1969.

NYLEN, M.U. & SCOTT, D.B. Electron microscopic studies of the early stages of amelogenesis. J. dent. Res., 37: 22, 1958.

_____ & _____. Electron microscopic studies of odontogenesis. J. Indiana St. dent. Ass., 39: 406-21, 1960.

OKA, N. & SHIMIZU, T. Electron microscopic studies of mineral movements in calcifying processes in hard tissues. I- Uptake of ⁴⁵Ca during enamel matrix formation. Jap. J. oral Biol., 14: 560-70, 1972.

PALADE, G.E. Intracisternal granules in the exocrine cells of the pancreas. J. biophys. biochem. Cytol., 2: 417, 1956.

PARVIS, V.P. & RONCORONI, G. Ricerche istochimiche e morfologiche sul cemento condroide e sulle connessioni alveolo-dentali dei molari della Cavia. Biologica lat., 3:181-220, 1950

- PEASE, D.C. Anat. Rec., 121: 723, 1955. Apud GARANT, P.R. & NALBANDIAN, J., op. cit. ref. 46
- PETERSON, M. & LEBLOND, C.P. Synthesis of complex carbohydrates in the Golgi region, as shown by radioautography after injection of labelled glucose. J. cell. Biol, 21:143-7, 1964
- PINDBORG, J.J. & WEINMANN, J.P. Morphologic and functional correlations in the enamel organ of the rat incisor during amelogenesis. Acta anat., 36: 367-81, 1959.
- PROVENZA, D.V. & SISCA, R.F. Fine structure features of monkey (Macaca mulatta) reduced enamel epithelium. J. Periodont., 41:313-9, 1970.
- REITH, E.J. The ultrastructure of ameloblasts from the growing and of rat incisors. Archs oral Biol., 2: 253, 1960.
- _____. The ultrastructure of ameloblasts during matrix formation and the maturation of enamel. J. biophys. biochem. Cytol., 9: 825-40, 1961.
- _____. The ultrastructure of ameloblasts during early stages of maturation of enamel. J. Cell. Biol., 118:691-6, 1963
- _____. The early stage of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. J. Ultrastruct. Res., 17: 503-26, 1967.
- _____. The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. J. Ultrasturct. Res., 30:111-51, 1970
- _____. & BOYDE, A. A correlated scanning and transmission electron microscopic study of maturation ameloblasts in developing molar teeth of rats. Cell Tiss. Res., 197: 421-31 1979.
- _____. & COTTY, V.F. Autoradiographic studies on calcification of enamel. Archs oral Biol., 7:365-72, 1962.
- REVEL, J.P. Ameloblast biology - a personal assessment. J. dent. Res., 58 (Spec.issue B): 742-52, 1979.
- RONHOLM, E. An electron microscopic study of the amelogenesis in human teeth. I- The fine structure of the ameloblasts. J. Ultrastruct. Res., 6: 229-48, 1962.
- ROSENBLUTH, J. & WISSIG, S.L. J. Cell Biol., 23:307, 1964 . Apud GARANT, P.R. & NALBANDIAN, J., op. cit. ref. 46.

- ROBINSON, C.; LOWE, N.R.; WEATHERELL, J.A. Changes in amino acid incorporation of developing rat incisor enamel. Calc. Tiss. Res., 23: 19-31, 1977.
- RUCH, J.V.; FABRE, M.; KARCHER-DJURICIC, V.; GERBER, R. Les déterminismes de la morphogenèse et des cytofférentations / des ébauches dentaires des souris. J. Biol. Buccale, 1: 45-56, 1973.
- _____ ; _____ ; _____ ; STAUBLI, A. The effects of 1-azetidine -2- carboxylic acid (analogue of proline) on dental cytodifferentiations in vitro. Differentiation, 2: 211-20, 1974.
- SANTONÉ, P. Osservazioni sulla struttura e sulla genesi del cosiddetto cemento cartilagineo nei molari di *Cavia cobaia*. Archs ital. Anat. Embriol., 31: 582-97, 1933.
- _____. Studien über den aufbau, die struktur und die histogenese der molaren der saugetiére. Zeitschrift f. Mikr. Anat. Forschung, 37: 49-100, 1934.
- SASAKI, S. & SHIMOKAWA, H. Enamel proteins: biosynthesis and chemistry. J. dent. Res., 58(Spec.issue B): 765-72, 1979.
- SCOTT, D.B.; NYLEN, M.U.; TAKUMA, S. Electron microscopy of developing and mature calcified tissues. Revue belge Sci. dent. 14: 329-42, 1959.
- SEYER, J. & GLIMCHER, M.J. Evidence for the presence of numerous proteins components in immature bovine dental enamel. Calc. Tiss. Res., 24: 253-7, 1977.
- SILVA, D.G. & KAILIS, D.G. Ultrastructural studies on the cervical loop and the development of amelo-dentinal junction in the cat. Archs oral Biol., 17: 279-89, 1972.
- SISCA, R.F. & PROVENZA, D.V. Initial dentin formation in human deciduous teeth. An electron microscope study. Calc. Tiss. Res., 9: 1-16, 1972.
- SJOSTRAND, F.S. & RHODIN, J. The ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as revealed by high resolution electron microscopy. Expl. Cell Res., 4: 426-56, 1953.
- SKOBE, Z. The secretory stage of amelogenesis in rat mandibu

lar incisor teeth observed by scanning electron microscopy. Calc. Tiss. Res., 21: 83-103, 1976.

_____. Enamel rod formation in the monkey observed by scanning electron microscopy. Anat. Rec., 187: 329-34, 1977.

SLAVKIN, H.C. Embryonic tooth formation; a tool for developmental biology. Copenhagen. Munksgaard, 1974. 136 p. (Oral Science reviews, 4)

_____. The nature and nurture of epithelial - mesenchymal interactions during tooth morphogenesis, J. Biol. Buccale, 6: 189-203, 1978.

_____. Amelogenesis in vitro. J. dent. Res., 58 (Spec. issue B): 735-41, 1979.

_____; MINO, W.; BRINGAS JR.; P. The biosynthesis and secretion of precursor enamel protein by ameloblasts as visualized by autoradiography after tryptofan administration. Anat. Rec., 185: 289-312, 1976.

_____; BRINGAS, P.; LE BARON, R.; CAMERON, J.; BAVETTA, L.A. The fine structure of the extracellular matrix during epithelio-mesenchymal interactions in the rabbit embryonic incisor. Anat. Rec., 165: 237-55, 1969(a).

_____; _____; _____; _____; _____. Epithelial and mesenchymal cell interactions with extracellular matrix material in vitro. J. Embryol. exp. Morph., 22: 395-405, 1969(b)

_____; MATOSIAN, P.; WILSON, P.; BRINGAS, P.; MINO, W.; CROISSANT, R.D. & GUENTER, H. Epithelial-specific extracellular matrix influences on mesenchyme collagen bio-synthesis in vitro. In: SLAVKIN, H.C. & GREULICH, R.C., eds. Extracellular matrix influences on gene expression. New York, Academic press, 1975. p. 237-51.

_____; WELIKY, B.; STELLAR, W.; SLAVKIN, M.D.; ZEICHNERGAN CZ, M.; BRINGAS JR., P.; HYATT-FISCHER, H.; SHIMIZU, M.; FUKAE, M. Ameloblast differentiation: protein synthesis and secretion in fetal New Zealand white rabbit molar tooth organs and isolated epithelia in vitro. J. Biol. Buccale, 6: 309-26, 1978.

SMITH, R.E. & FARQUHAR, M.C. J. Cell Biol., 31: 319, 1966. Apud GARANT, P.R. & NALBANDIAN, J. op. cit. ref. 46.

- SMITH, C.E. Ameloblasts: Secretory and Resorptive Functions .
J. dent. Res., 58 (Spec.issue B): 695-707, 1979.
- SPICER, S.S. Histochemical differentiation of mamalian mucopolysaccharides. Ann. N. Y. Acad. Sci., 106: 379-88, 1963.
- STARKEY, W.E. The migration and renewall of tritium labelled cells in the developing enamel organ of rabbits. Br. dent. J., 115: 143-53, 1963.
- SYMONS, N.B.B. Globular structures associated with the completion of the enamel matrix in the rat. J. dent. Res., 41: 55-60, 1962.
- TEN CATE, A.R.; MELCHER, A.H.; PUDY, G.; WAGNER, D. The non-fibrous nature of the von Korff fibres in developing dentine. A light and electron microscope study. Anat. Rec., 168: 491-523, 1970.
- TRESTALD, R.L. & SLAVKIN, H.C. Collagen synthesis by the enamel organ epithelia of the embryonic rabbit tooth. Biochem. biophys. Res. Commun., 59: 443-9, 1974.
- WARSHAWSKY, H. Synthesis and migration of enamel matrix protein as studied by radioautography. McGill dent. Rev., 26: 24-9, 1963.
- _____. The fine structure of secretory ameloblast in rat incisors. Anat. Rec., 161: 211-29, 1968.
- _____. A freeze-fracture study of the topographic relationship between inner enamel secretory ameloblasts in the rat incisor. Am. J. Anat., 152: 153-208, 1978.
- _____. 1979. (Opinião Pessoal) Apud REVEL, J.P. op.cit. ref. 113, p. 745
- _____ & MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. J. Histochem. Cytochem., 15: 542-9, 1967.
- _____ & SMITH, C.E. Morphological classification of rat incisor ameloblasts. Anat. Rec., 179: 423-46, 1974.
- _____ & VUGMAN, I, A comparison of the protein synthetic activity of presecretory and secretory ameloblasts in rat incisors. Anat. Rec., 188: 143-72, 1977.
- _____; LEBLOND, C.P.; DROZ, B. Synthesis and migration of

proteins in the cells of the exocrine pancreas as revealed by specific activity determination from radioautography. J. Cell. Biol., 16: 1-23, 1963.

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.

WATSON, M. The extracellular nature of enamel in the rat. J. biophys.biochem. Cytol., 7: 489-509, 1960.

WEINSTOCK, A. Cytotoxic effects of puromycin on the Golgi apparatus of pancreatic acinar cells, hepatocytes and ameloblasts. J. Histochem. Cytochem., 18: 875-885, 1970.

_____. Secretory function of postsecretory ameloblasts as shown by electron microscope radioautography. IADR, n. 136 1972 (Abstract).

_____. Matrix development in mineralizing tissues as shown by radioautography: formation of enamel and dentin. In: SLAVKIN, H.C. & BAVETTA, L.A. "Developmental aspects of oral biology". New York, Academic press, 1972, cap. 10, p.201-42.

_____ & LEBLOND, C.P. Elaboration of the matrix glycoprotein of enamel by the secretory ameloblasts of the rat incisor as revealed by autoradiography after ³H-galactose injection. J. Cell Biol., 51: 26-51, 1971.

WOLTERS; J.M.L. & VAN MULLEN, P.J. Electron microscopy of epithelio-mesenchyme intercellular communication in trans-filter cultures of rat tooth germs. Archs oral Biol., 22:705-9, 1977.

YOUNG, R.W. & GREULICH, R.C. Distinctive autoradiographic patterns of Glycine incorporation in rat enamel and dentine matrices. Archs oral Biol., 8: 509-21, 1963.

ZAKI, A.E.; YAEGER, J.A. & GILLETTE, R. Fine structure of the epithelial dental organ in the frog during early odontogenesis. Anat. Rec., 168: 79-92, 1970.