

MARIA MERCEDES FERNANDEZ SAMPERIZ

EFEITOS DA COLCHICINA, VIMBLASTINA E VINCRISTINA, NO CICLO CELULAR E NA VELOCIDADE DE MIGRAÇÃO DOS AMELOBLASTOS AO LONGO DO ÓRGÃO DE ESMALTE, EM INCISIVOS INFERIORES DE CAMUNDONGO, ESTUDADOS RADIOAUTOGRAFICAMENTE, ATRAVÉS DA INCORPORAÇÃO DE ^3H -TIMIDINA.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Mestre em Biologia e Patologia Bucodental, na área de Histologia e Embriologia.

PIRACICABA
1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais,

cujos preciosos ensinamentos me
proporcionaram tranquilidade de
opção na luta por ideais verda-
deiros.

Aos meus irmãos,

com carinho.

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

Ao Doutor *GUILHERME BLUMEN*, Professor Adjunto do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela orientação deste trabalho, bem como pelo interesse e presença constantes durante esta iniciação científica.

Ao Professor Dr. ANTONIO CARLOS FERRAZ CORRÊA, Coordenador da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba e do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental desta Escola, pela oportunidade concedida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo Médicas 78/0399;

Ao Professor Dr. JOSÉ MERZEL, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelas sugestões apresentadas e valiosa colaboração durante a revisão final do texto;

À Professora Dra. SONIA VIEIRA e ao senhor RONALDO SEICHI WADA, da Disciplina de Bioestatística do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela disponibilidade e atenção e pela realização da análise estatística;

Aos Laboratórios Pierre Docta S/A e Eli Lilly do Brasil Ltda, pela cessão das drogas antimicrotubulares;

Aos Professores Dra. TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELLO e Dr. Cássio Odnev Garcia Munhoz, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela atenção com que nos distinguiram durante o curso de pós-graduação;

À Sra. IVANY DO CARMO GUIDOLIN GEROLA, bibliotecária da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela assistência na revisão bibliográfica;

Ao Sr. PAULO DO AMARAL e Srta. MARIA APARECIDA NALIN, respectivamente técnico do laboratório de Histologia e Embriologia e secretária do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela gentileza com que sempre atenderam aos nossos pedidos;

Ao Dr. MOISES ROIZENBLATT, cujos cuidados médicos permitiram a continuidade desta jornada;

À biomédica HELOISA HELENA FIGUEIREDO e às colegas do curso de pós-graduação, C.D. LELI FERNANDES DE AZEVEDO , bióloga CÉLIA REGINA SCHIAVINATTO e C.D. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO, pela colaboração prestada;

Ao Sr. ADÁRIO CANGIANI, pela documentação fotográfica;

Ao arquiteto EDGAR VAZ OLIVEIRA, pelo traçado dos gráficos;

Aos amigos e colegas do curso de pós-graduação, C.D. MIRIAM ELIZABETH MENDES ANGELUCCI e C.D. CARLOS ROBERTO ROLDI, pelo apoio e incentivo constantes;

A cada um, entre meus caros amigos, pela gratificante convivência.

S U M Á R I O

	pg.
I - INTRODUÇÃO	1
II - MATERIAL E MÉTODOS	4
III - RESULTADOS	8
1. Ciclo celular dos ameloblastos	9
2. Velocidade de migração dos ameloblastos	20
IV - DISCUSSÃO	27
1. Ciclo celular dos ameloblastos	28
2. Velocidade de migração dos ameloblastos	39
V - RESUMO E CONCLUSÕES	43
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

I - INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

O incisivo de camundongo, dente de crescimento contínuo, apresenta como um de seus constituintes, os ameloblastos que são renovados devido à existência do órgão odontogênico, localizado na porção apical do dente. Tal órgão persiste por toda a vida do animal, o que permite que, além do crescimento, células e tecidos desgastados na superfície incisal sejam continuamente substituídos. Assim, os ameloblastos do órgão de esmalte dos incisivos, constituem uma população de células renováveis, na qual a proliferação e a migração celular são componentes importantes no processo de crescimento contínuo (Smith & Warshawsky, 1975a,b).

Existem evidências de que a Colchicina, Vimblastina e Vincristina, além de dissociar os microtúbulos do fuso mitótico de células em proliferação, afetam outras funções celulares que são dependentes, direta ou indiretamente, dessas estruturas (Wilson et alii, 1974; Burnside, 1975). Deste modo, nos últimos anos, tem sido de grande interesse, o estudo das alterações provocadas por essas drogas antimicrotubulares, nos tecidos que constituem os dentes de crescimento contínuo.

Foi demonstrado que a Colchicina atua sobre os tecidos dentários, alterando a secreção das matrizes de esmalte e dentina (Kudo, 1975), inibindo temporariamente a migração e exocitose dos grânulos de secreção nos ameloblastos (Karim & Warshawsky, 1979), alterando o tamanho, a forma e a polaridade dos odontoblastos (Nogueira et alii, 1980), retardando o processo de biossíntese de compostos

sulfatados, nos ameloblastos e odontoblastos (Azevedo, 1981) e diminuindo a erupção dental (Chiba et alii, 1968; Berkovitz, 1972; Costa, 1978; Chiba et alii, 1980). Já a Vimblastina, afeta principalmente os ameloblastos secretores, determinando como uma das primeiras alterações, o desaparecimento dos microtúbulos citoplasmáticos (Moe, 1979), atua sobre os precursores dos odontoblastos e odontoblastos secretores, com produção de dentina irregular (Mikkelsen, 1978), retarda nos ameloblastos e odontoblastos, o processo de biossíntese de compostos sulfatados (Azevedo, 1981) e inibe a taxa de erupção dental (Chiba et alii, 1980). A Vincristina, atua na dentinogênese, determinando a formação de osteodentina (Stene & Koppang, 1976), causando desintegração e edema nas células precursoras dos odontoblastos (Stene, 1978) e provocando a retenção de ^3H -prolina nos odontoblastos, com distribuição intracelular anormal de material radioativo e diminuição da secreção de matriz dentinária (Stene & Koppang, 1980).

No entanto, nada foi encontrado na literatura a respeito da ação dessas drogas antimicrotubulares no ciclo celular e na velocidade de migração dos ameloblastos ao longo do órgão de esmalte.

O objetivo do presente trabalho foi estudar radioautograficamente, o ciclo celular e a migração dos ameloblastos ao longo do órgão de esmalte, em incisivos inferiores de camundongos pré-tratados com Colchicina, Vimblastina e Vincristina.

II - MATERIAL E MÉTODOS

II - MATERIAL E MÉTODOS

Para realizar os experimentos, foram utilizados 92 camundongos fêmeas, com 5 semanas de vida, divididos em quatro grupos com 23 animais cada um, a saber:

I. Grupo Controle

Animais injetados por via intraperitoneal, com 1 μ Ci/g de peso, de timidina tritiada (A.E. = 5 Ci/mmol, Amersham, U.S.A.).

II. Grupo tratado com Colchicina

Animais tratados com Colchicina*, com a dose de 1 μ g/g de peso (Kudo, 1975), injetada por via intraperitoneal.

III. Grupo tratado com Vimblastina

Animais tratados com Sulfato de Vimblastina**, com a dose de 2 μ g/g de peso (Moe, 1977), injetada por via intraperitoneal.

IV. Grupo tratado com Vincristina

Animais tratados com Sulfato de Vincristina**, com a dose de 0.1 μ g/g de peso (Stene, 1978), injetada por via intraperitoneal.

Os camundongos dos grupos II, III e IV, após 6 horas de tratamento comas drogas acima citadas, recebe-

* Laboratório Pierre Docta S/A, Rio de Janeiro, RJ.

**Laboratório Eli Lilly do Brasil Ltda, São Paulo, SP.

ram por via intraperitoneal, 1 μ Ci/g de peso, de timidina tritiada.

Os animais foram sacrificados por decapitação, sob anestesia pelo éter sulfúrico, nos intervalos de tempo de 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 240 e 360 horas após a administração do composto radioativo.

As mandíbulas foram dissecadas, sob o pequeno aumento de uma lupa estereoscópica, separadas em hemimandíbulas, fixadas em Bouin por 24 horas e descalcificadas em EDTA, segundo Warshawsky & Moore (1967), durante 21 dias. Após a descalcificação, as hemi-mandíbulas contendo os incisivos, foram desidratadas em álcool com concentrações crescentes, diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina pura. Cortes longitudinais, com 6 μ m de espessura, no sentido mésio-distal do incisivo foram colhidos em lâminas previamente gelatinadas (0.5%) e radioautografadas pela técnica do "dipping" (Kopriwa & Leblond, 1962), utilizando emulsão Ilford K-5. Após 13 dias de exposição, os preparados foram revelados com revelador D-19 B Kodak, fixados em hipossulfito de sódio à 24% e corados com hematoxilina e eosina.

Foram realizados os seguintes estudos:

1. Ciclo celular dos ameloblastos no compartimento proliferativo

Utilizou-se o método de Quastler & Sherman (1959), o qual permite calcular graficamente a duração do ciclo celular e suas respectivas fases, através de curvas da variação de porcentagem de metáfases marcadas, em

função do tempo após a administração de timidina tritiada. Os animais utilizados para este estudo foram os sacrificados nos intervalos de tempo entre 0.75 e 24 horas após a injeção do composto radioativo.

2. Velocidade de migração dos ameloblastos ao longo do órgão de esmalte

Esta velocidade foi estudada de acordo com Blumen (1970), localizando-se a posição do ameloblasto com núcleo marcado mais distante da alça apical do incisivo, a cada intervalo de tempo de 24 horas a partir da primeira hora após a administração de timidina tritiada.

III - RESULTADOS

III. RESULTADOS

1. Ciclo celular dos ameloblastos

No presente estudo, o compartimento proliferativo dos incisivos inferiores de camundongo, foi delimitado entre o ponto de maior convexidade da alça apical e o início da secreção, pelos odontoblastos, de pré-dentina. Esta região corresponde na classificação de Warshawsky & Smith (1974), à zona pré-secretora, porção posterior da região de ameloblastos faceando a polpa.

As contagens celulares foram realizadas em três cortes selecionados de modo a apresentarem todos os constituintes dessa região.

Para estudar o ciclo celular, as porcentagens de metáfases marcadas de ameloblastos no compartimento proliferativo, foram calculadas nos vários intervalos de tempo após a administração de timidina tritiada. A tabela 1 apresenta as contagens referentes ao número total de metáfases, número de metáfases marcadas e porcentagem de metáfases marcadas, para o grupo controle e grupos trata-dos com Colchicina, Vimblastina e Vincristina.

TABELA 1 - Número total de metáfases, número de metáfases marcadas e porcentagem de metáfases marcadas de ameloblastos no compartimento proliferativo, em incisivos inferiores de camundongos do grupo controle (CON), e grupos tratados com Colchicina (CLC), Vimbastina (VBL) e Vincristina (VCR), nos vários intervalos de tempo após a administração de timidina tritiada.

Tempo (h)	Número total de metáfases				Número de metáfases marcadas				Porcentagem de metáfases marcadas			
	CON	CLC	VBL	VCR	CON	CLC	VBL	VCR	CON	CLC	VBL	VCR
0.75	7	12	17	9	0	0	1	1	0.0	0.0	5.9	11.1
1.00	8 *	10	52	13	1	3	13	2	12.5	30.0	25.0	15.4
1.50	10	12	26	6	6	4	7	2	60.0	33.3	26.9	33.3
2.00	11	20	35	4	10	18	13	4	90.9	90.0	37.1	100.0
4.00	5	12 *	33	10	5	11	28	10	100.0	91.7	84.8	100.0
5.00	6	6 *	49	22	6	5	42	22	100.0	83.3	85.7	100.0
7.00	3	6	22	9	3	5	20	8	100.0	83.3	90.9	88.9
8.00	8	9	69	10	6	8	53	7	75.0	88.9	76.8	70.0
10.00	11	13	13	9	3	5	3	3	27.3	38.5	23.1	33.3
12.00	9	12	7	8	1	3	1	1	11.1	25.0	14.3	12.5
16.00	11	14	8	6	2	8	2	1	18.2	57.1	25.0	16.7
18.00	15	16	5 *	17	7	9	2	7	46.7	56.2	40.0	41.2
20.00	9	17	9	11	6	10	6	7	66.7	58.8	66.7	63.6
24.00	9	9	8	8	2	3	4	5	22.2	33.3	50.0	62.5

(*) Contagem em dois cortes

Nota-se nessa tabela 1 que somente no grupo tratado com Vimblastina, houve um maior aumento do número total de metáfases e do número de metáfases marcadas. Ainda neste grupo, houve um acúmulo de figuras mitóticas localizadas entre a camada de ameloblastos e o estrato intermédio. Tais mitoses, por ocuparem essa posição intermediária, não foram contadas.

A partir dos resultados da tabela 1, foram traçados curvogramas da variação da porcentagem de metáfases marcadas, em função do tempo após a administração de timidina tritiada.

A figura 1 mostra o curvograma obtido para o grupo controle, ilustrando a dedução dos seguintes parâmetros do ciclo celular:

- a) Tempo de Geração: G
- b) Tempo de síntese de DNA: S
- c) Tempo de pré-síntese ou pós-mitótico (G_1)
+ tempo de pós-síntese ou pré-mitótico (G_2) + tempo mitótico (M): $G_1 + G_2 + M$
- d) Tempo de pós-síntese ou pré-mitótico + 1/2 do tempo mitótico: $G_2 + 1/2 M$

Para cada um dos grupos tratados foi traçado um curvograma representado nas figuras 2, 3 e 4, para a Colchicina, Vimblastina e Vincristina, respectivamente. Em cada uma dessas figuras são apresentados dois curvogramas, isto é, um curvograma relativo ao grupo controle e outro, a um grupo tratado.

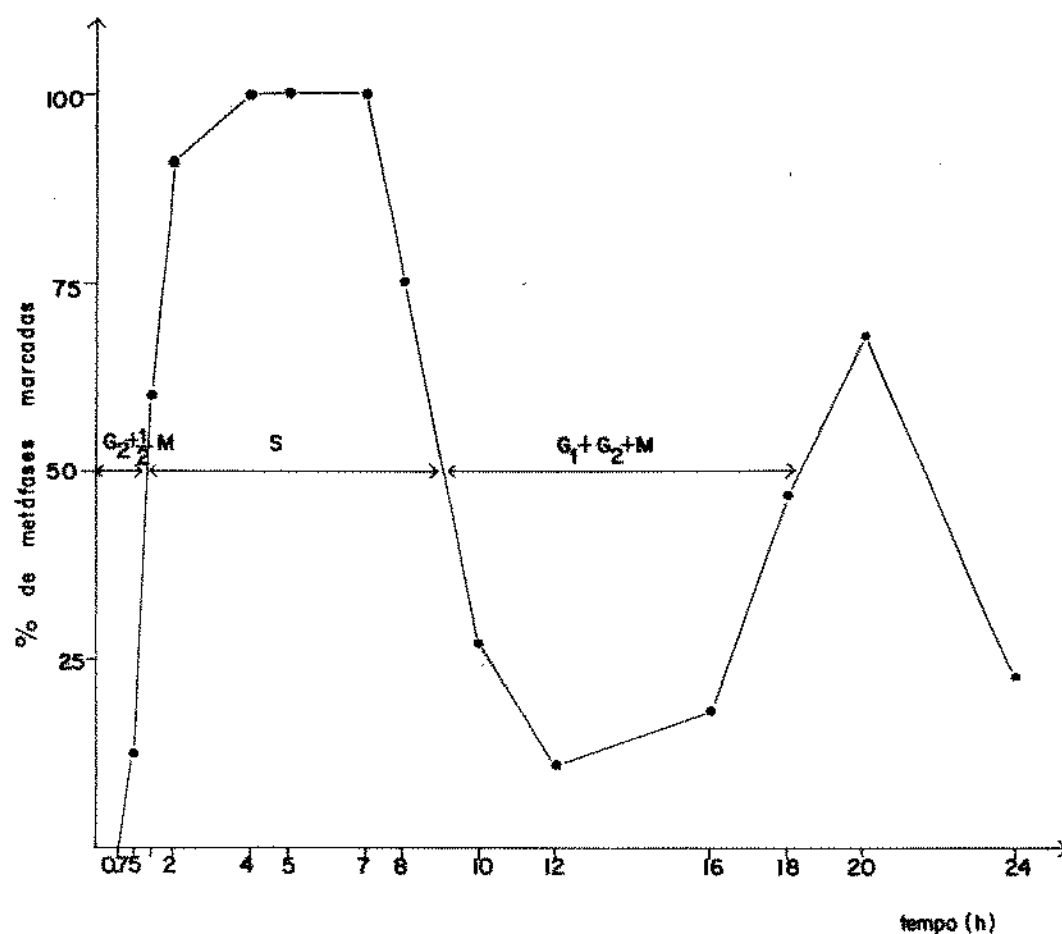
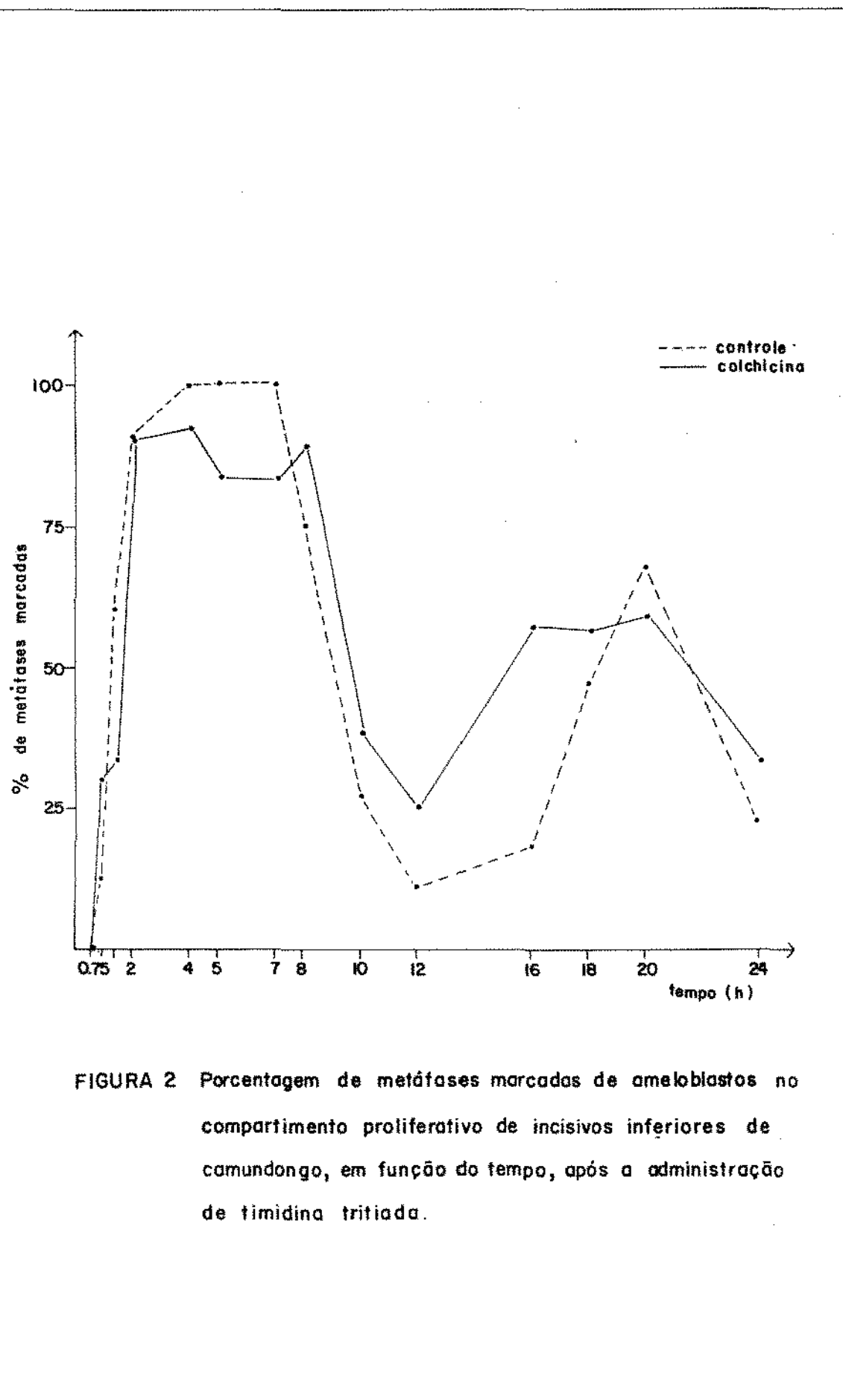


FIGURA 1 Porcentagem de metáfases marcadas de ameloblastos no compartimento proliferativo de incisivos inferiores, em função do tempo, após a administração de timidina tritiada em camundongos do grupo controle.



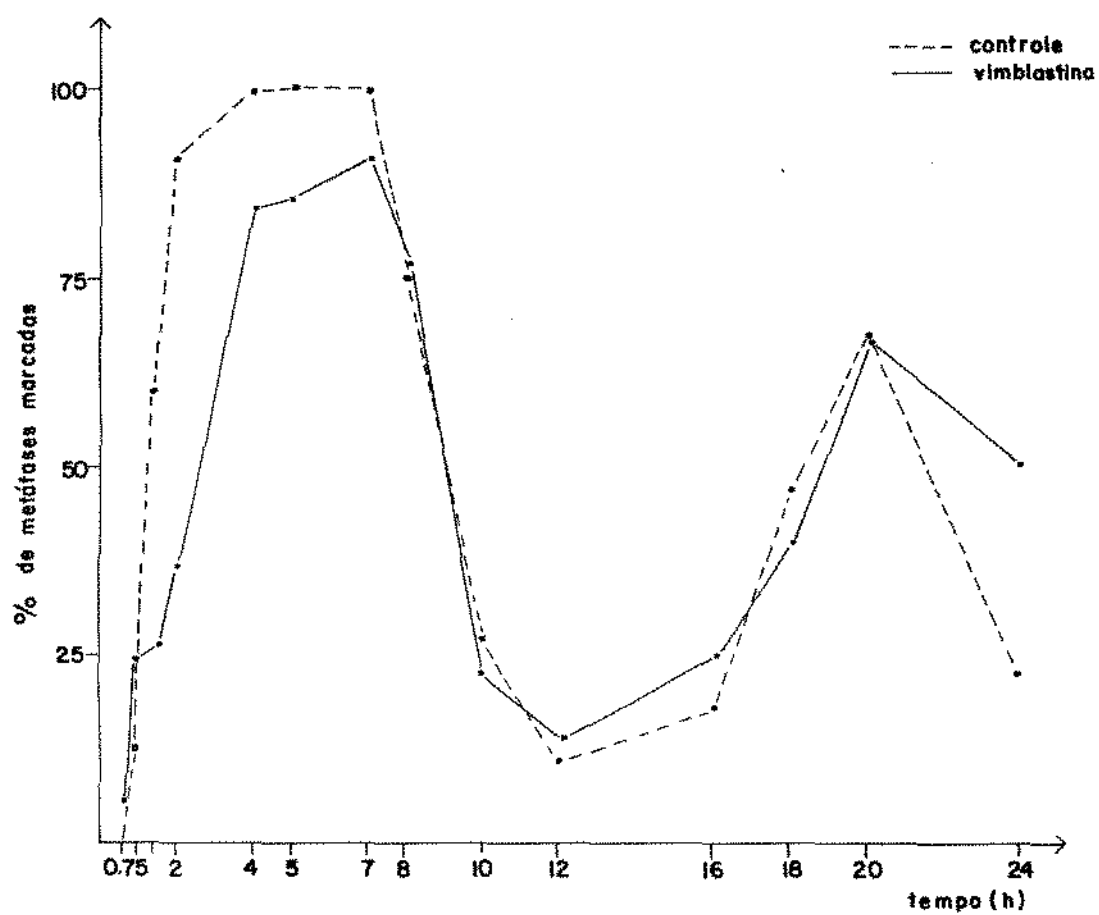


FIGURA 3 Porcentagem de metáfases marcadas de ameloblastos no compartimento proliferativo de incisivos inferiores de camundongo, em função do tempo, após a administração de timidina tritiada.

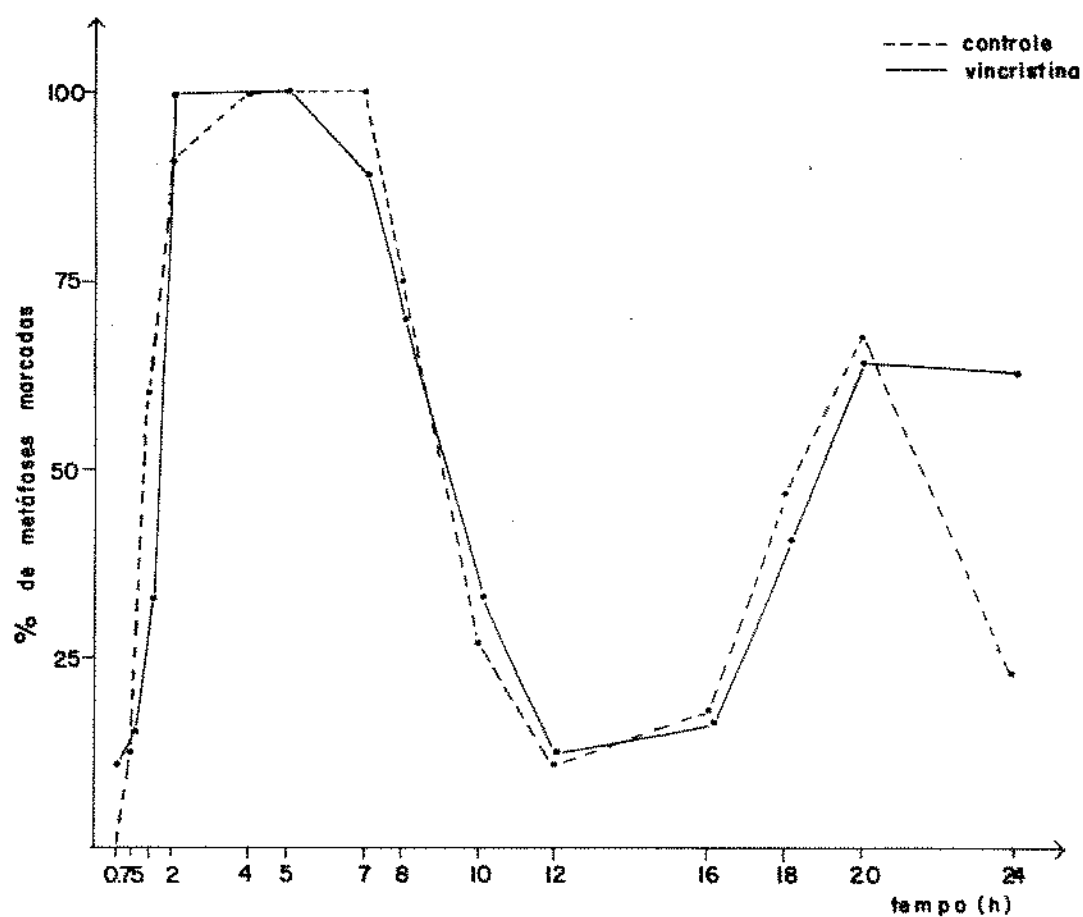


FIGURA 4 Porcentagem de metáfases marcadas de ameloblastos no compartimento proliferativo de incisivos inferiores de camundongo, em função do tempo, após a administração de timidina tritiada.

A tabela 2 apresenta os parâmetros do ciclo celular deduzidos graficamente, para cada um dos grupos em estudo.

TABELA 2 - Duração, em horas, do tempo de geração (G), do tempo de síntese de DNA (S), tempo pós-mitótico, pré-mitótico e tempo mitótico ($G_1 + G_2 + M$), tempo pré-mitótico + 1/2 do tempo mitótico ($G_2 + 1/2 M$) deduzidos das figuras 1, 2, 3 e 4, e tempo pós-mitótico + 1/2 do tempo mitótico ($G_1 + 1/2 M$) calculado, para o grupo controle e grupos tratados.

Grupos	G	S	G_1+G_2+M	$G_2+1/2 M$	$G_1+1/2 M$
Controle	17.0	7.6	9.4	1.4	8.0
Colchicina	13.6	7.9	5.7	1.6	4.1
Vimblastina	16.2	6.4	9.8	2.6	7.2
Vincristina	17.2	7.5	9.7	1.6	8.1

O valor de $G_1 + 1/2 M$, que consta na tabela 2, foi calculado a partir da diferença

$$G - (S + G_2 + 1/2 M)$$

O índice mitótico representa a proporção de células em mitose em uma determinada população. Assim, para obter este índice, foram contados o número de ameloblastos e o número de mitoses no compartimento proliferativo, em cada um dos grupos. Os resultados obtidos constam na tabela 3.

TABELA 3 - Número de ameloblastos, número de mitoses e índice mitótico, no compartimento proliferativo, em incisivos inferiores de camundongos do grupo controle (CON) e grupos tratados com Colchicina (CLC), Vincristina (VBL) e Vincristina (VCR), nos vários intervalos de tempo após a administração de timidina tritiada

Tempo (h)	Número de ameloblastos				Número de mitoses				Índice mitótico (%)			
	CON	CLC	VBL	VCR	CON	CLC	VBL	VCR	CON	CLC	VBL	VCR
0.75	387	282	257	279	14	12	19	17	3.6	4.2	6.6	6.1
1.00	220 *	266	228	440	12	14	53	29	5.4	5.3	23.2	6.6
1.50	329	324	265	225	14	14	26	9	4.2	4.3	9.8	4.0
2.00	349	300	251	230	21	27	35	14	6.0	9.0	13.9	6.1
4.00	384	179 *	264	295 *	15	14	35	21	3.9	7.8	13.3	7.1
5.00	324	176 *	265	457	15	7	49	22	4.6	4.0	18.5	4.8
7.00	357	300	226	368	12	20	26	21	3.4	6.7	11.5	5.7
8.00	397	326	232	367	10	18	100	36	2.5	5.5	43.1	9.8
10.00	382	304	227	391	14	21	26	22	3.7	6.9	11.4	5.6
12.00	337	274	342	291	15	15	20	14	4.4	5.5	5.8	4.8
16.00	336	310	262	275	20	19	12	11	5.9	6.1	4.6	4.0
18.00	333	298	148 *	436	13	22	6	28	3.9	7.4	4.0	6.4
20.00	326	314	205	407	16	21	15	21	4.9	6.7	7.3	5.1
24.00	312	242	330	342	16	17	20	16	5.1	7.0	6.1	4.7
Média									4.4	6.2	12.8	5.8

(*) Contagem em dois cortes

A média dos índices mitóticos calculados para o grupo controle, Colchicina, Vimblastina e Vincristina, foi respectivamente 4.4, 6.2, 12.8 e 5.8%.

Para verificar se, em média, os índices mitóticos relativos aos tratamentos em estudo foram diferentes, procedeu-se a uma análise de variância, conforme mostra a tabela 4.

TABELA 4 - Análise de variância para os índices mitóticos apresentados na tabela 3.

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	591.25	197.08	7.07*
Resíduo	52	1449.77	27.88	
Total	55	2041.02		

(*) significativa ao nível de 5%

O valor de F, apresentado nessa tabela 4, é significativo ao nível de 5%. Procedeu-se então, para comparar as médias duas a duas, ao teste t de Tukey que estabelece, como D.M.S. (diferença mínima significativa) ao nível de 5%, o valor 5.3. Com base nesse teste, pode-se afirmar que, em média, o índice mitótico relativo ao grupo tratado com Vimblastina, é significativamente maior que o índice do controle e dos demais grupos tratados.

A média dos índices mitóticos relativos a cada um dos tratamentos foi utilizada para calcular o tempo

mitótico (M) a partir da relação de Quastler (1963):

$$M = \text{Índice mitótico} \times \text{Tempo de geração}$$

O tempo mitótico, assim calculado, permitiu obter separadamente os tempos de G_1 e G_2 .

A tabela 5 mostra a duração das várias fases do ciclo celular, bem como o tempo de geração dos ameloblastos no compartimento proliferativo, em incisivos de camundongos do grupo controle e grupos tratados.

TABELA 5 - Duração, em horas, do tempo de geração (G), tempo de pré-síntese ou pós-mitótico (G_1), tempo de síntese de DNA (S), tempo de pós-síntese ou pré-mitótico (G_2) e tempo mitótico (M), obtida para o grupo controle e grupos tratados.

Grupos	G	G_1	S	G_2	M
Controle	17.0	7.6	7.6	1.0	0.75
Colchicina	13.6	3.7	7.9	1.2	0.84
Vimblastina	16.2	6.2	6.4	1.6	2.07
Vincristina	17.2	7.6	7.5	1.1	1.00

Com base nos resultados apresentados na tabela 5, pode-se observar, quando comparado com o controle, que no grupo tratado com:

- Colchicina: a duração de G e G_1 foi menor.
- Vimblastina: a duração de G_1 foi menor, enquanto que o valor de M foi maior.
- Vincristina: não houve diferenças entre os valores.

2. Velocidade de migração dos ameloblastos

Para estudar a migração dos ameloblastos ao longo do órgão de esmalte, em incisivos inferiores de camundongo, determinou-se a posição do núcleo marcado mais distante do ápice, em cada intervalo de tempo após a administração de timidina tritiada, contando o número de ameloblastos superpostos ao longo do eixo longitudinal do dente, a partir da alça apical. As contagens foram realizadas em um só corte. Os resultados obtidos para o grupo controle e grupos tratados constam na tabela 6.

TABELA 6 - Posição celular ocupada pelo ameloblasto marcado mais distante do ápice de incisivos inferiores de camundongo, nos vários intervalos de tempo, após a injeção de timidina tritiada, no grupo controle e grupos tratados.

Tempos (h)	Posição celular			
	Controle	Colchicina	Vimblastina	Vincristina
1	78	79	58	63
24	146	146	111	185
48	193	246	159	226
72	269	257	156	353
96	333	347	159	-
120	382	375	302	504
144	441	445	418	509
168	-	474	620	802
192	523	675	620	702
240	943	658	627	803
360	1200	814	862	991

(-) cortes perdidos

Para cada um dos 4 grupos, foi ajustada uma regressão linear simples de modelo

$$y_i = a + bx_i$$

onde

y_i representa o espaço total percorrido, medido pela posição celular do ameloblasto marcado mais distante do ápice do incisivo, no tempo x_i ;

x_i representa o tempo após a administração de timidina tritiada;

a é o coeficiente linear da regressão linear simples, isto é, representa o espaço inicial percorrido pelos ameloblastos;

b é o coeficiente angular da regressão linear simples, isto é, representa a velocidade de migração que se assume, seja constante.

Foi calculado, para cada grupo, o coeficiente de determinação que é uma medida do grau de ajuste do modelo de regressão linear simples, ou seja, dá a porcentagem de variação total explicada pela reta de regressão.

Os modelos de regressão linear, bem como os valores dos coeficientes de determinação estão representados na tabela 7.

TABELA 7 - Modelos de regressão ajustados e respectivos coeficientes de determinação segundo o grupo.

Grupos	Modelo	Coefficiente de determinação
Controle	$\hat{y}_i = 34.4 + 3.21x_i$	0.96
Colchicina	$\hat{y}_i = 124.9 + 2.14x_i$	0.94
Vimblastina	$\hat{y}_i = 41.1 + 2.48x_i$	0.91
Vincristina	$\hat{y}_i = 146.2 + 2.68x_i$	0.92

Os valores dos coeficientes de determinação, apresentados na tabela 7, são bastante altos, mostrando que os modelos de regressão adotados se ajustam bem aos dados. Portanto, é razoável admitir que a migração, medida através da posição celular, é função linear do tempo de observação.

Ainda na tabela 7, pode-se verificar que a velocidade de migração, medida pelo coeficiente angular da regressão linear simples, foi, para o grupo controle, 3.21 posições celulares/h, enquanto que para os grupos tratados com Colchicina, Vimblastina e Vincristina, foi respectivamente, 2.14, 2.48 e 2.68 posições celulares/h.

Então, para comparar a velocidade de migração dos ameloblastos em incisivos do grupo controle com os grupos tratados, procedeu-se a um teste t, ao nível de 5% de significância. Note-se, que neste caso, foram comparados coeficientes angulares de retas de regressão ajustadas. Os resultados obtidos constam na tabela 8.

TABELA 8 - Número de pares de observações (n), estimativa do coeficiente angular ($\hat{b}$) e o valor do teste t, segundo os grupos em comparação.

Grupos em comparação	n	$\hat{b}$	t
Controle	10	3.21	3.77*
Colchicina	11	2.14	
Controle	10	3.21	2.15*
Vimblastina	11	2.48	
Controle	10	3.21	1.45
Vincristina	10	2.68	

(*) significativa ao nível de 5%

A tabela 8 mostra valores de t , significantes ao nível de 5%, quando se comparam os grupos Controle e Colchicina e os grupos Controle e Vimblastina, indicando que a velocidade de migração foi menor nos grupos tratados com essas drogas enquanto que não houve diferença entre o grupo controle e o grupo tratado com Vincristina.

Para melhor visualizar a comparação dos modelos ajustados, foram traçadas as figuras 5, 6 e 7. Em cada uma dessas figuras são apresentadas duas retas de regressão, isto é, uma ajustada para os dados do grupo controle e outra ajustada para os dados de um grupo tratado, quais sejam, Colchicina, Vimblastina e Vincristina, respectivamente.

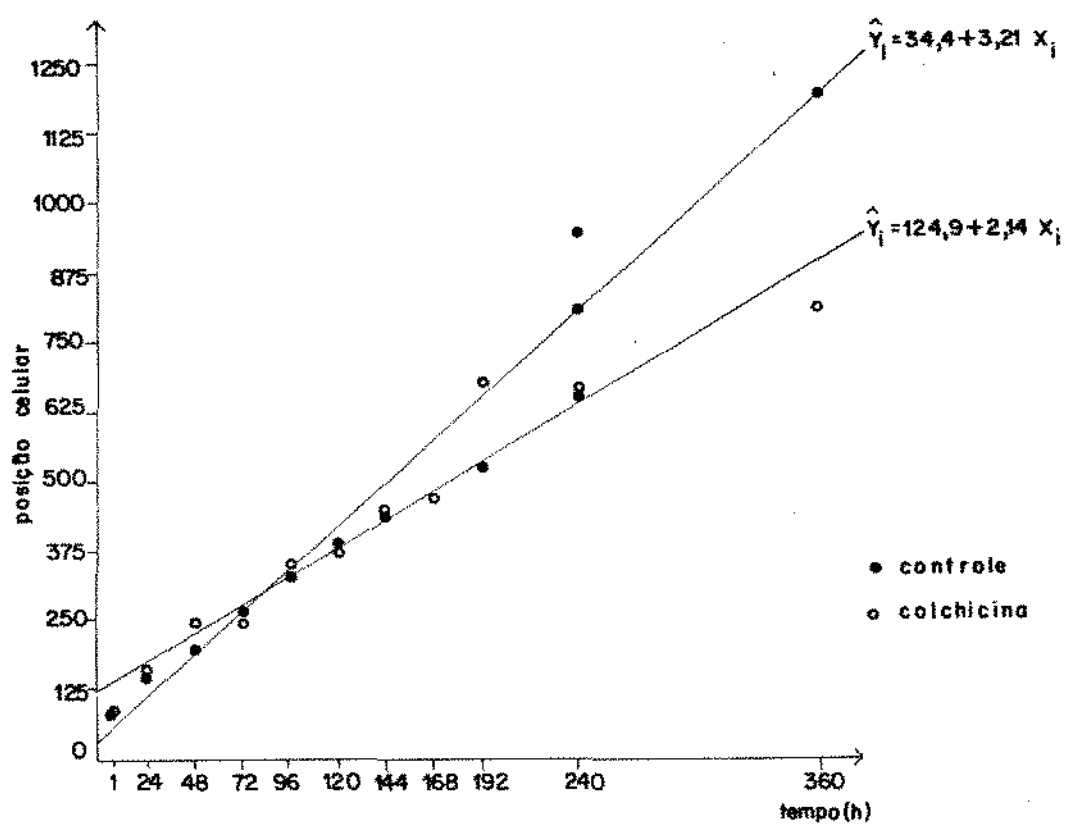


FIGURA 5 Retas de regressão da posição dos ameloblastos marcados em função do tempo.

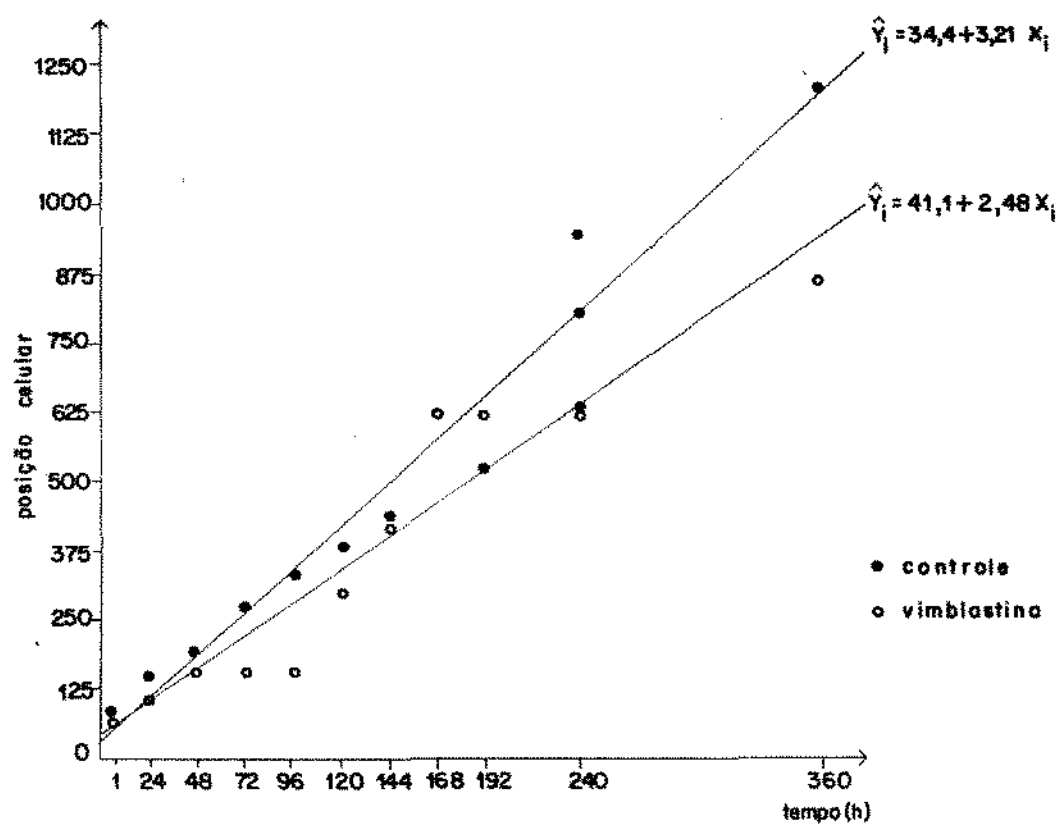


FIGURA 6 Retas de regressão da posição dos ameloblastos marcados em função do tempo

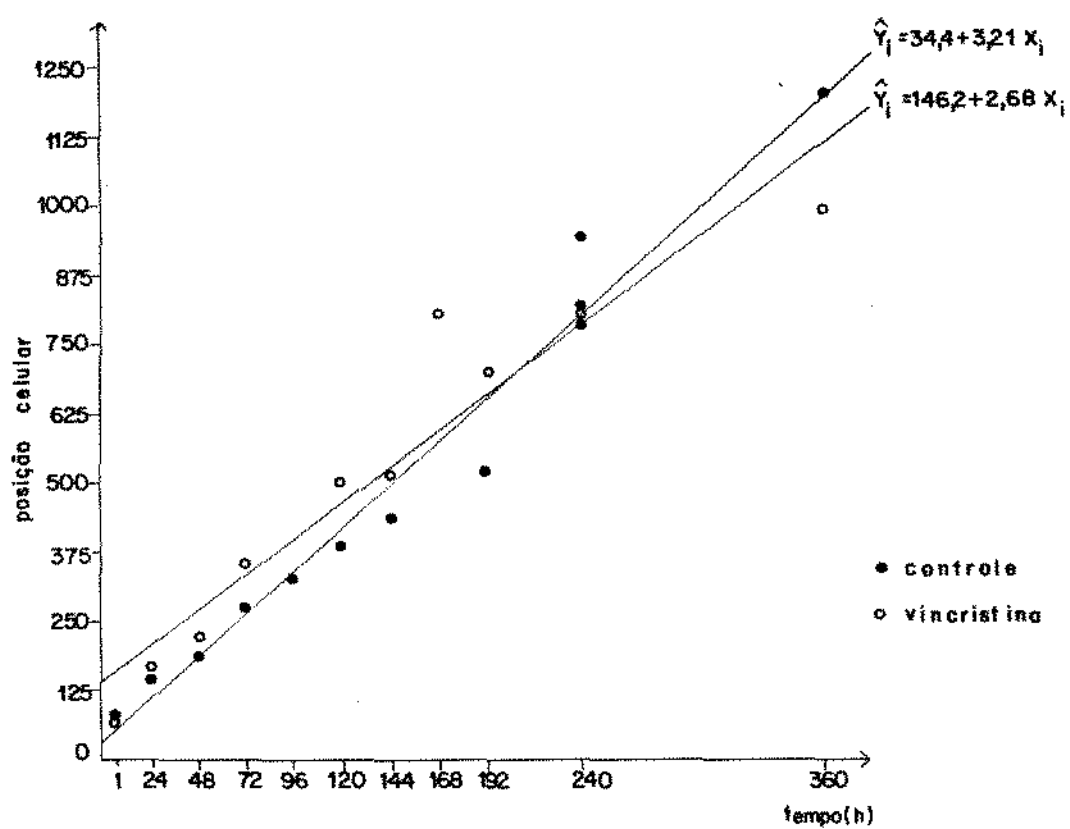


FIGURA 7 Retas de regressão da posição dos ameloblastos marcados em função do tempo

IV - DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

1. Ciclo celular dos ameloblastos

Colchicina, Vimblastina e Vincristina apresentam diversos efeitos biológicos, cuja expressão morfológica mais característica, é o bloqueio da mitose durante o estágio de metáfase, resultante da interferência nas proteínas microtubulares que integram o fuso mitótico (Sartorelli & Creasey, 1969).

Foi demonstrado que os efeitos dessas drogas antimicrotubulares são dependentes da dose utilizada. Desta forma, pequenas doses são capazes de provocar o bloqueio mitótico, enquanto altas doses determinam morte e deintegração tecidual (Bertalanffy & Leblond, 1953; Cutts, 1961; Frei et alii, 1964).

Considerando esta relação dose-efeito, no presente trabalho, foram utilizadas pequenas concentrações das drogas antimicrotubulares a fim de obter bloqueio mitótico sem outro comprometimento do órgão odontogênico. As doses usadas foram escolhidas com base em trabalhos realizados por outros autores.

Assim, a dose de Colchicina, geralmente usada, é de 1 µg/g de peso, e foi demonstrado que seu tempo de ação é de aproximadamente 6 h (Bertalanffy & Leblond, 1953).

Estudos realizados em ameloblastos do compartimento proliferativo (Moe, 1977) e na papila dental (Mikkelsen, 1978) de incisivos de rato, mostraram, 6 h após a injeção de 2 µg de Vimblastina/g de peso, inúmeras figuras

mitóticas bloqueadas nessas regiões.

Stene (1978) estudou o efeito de várias doses de Vincristina em células precursoras dos odontoblastos, verificando que após 5 h de tratamento com a dose de 0.1 µg/g de peso, a única alteração observada foi o acúmulo de células em metáfase.

A fim de discutir os resultados deste estudo, comparou-se inicialmente (tabela 9) os dados obtidos no grupo controle, com os valores correspondentes a cada fase do ciclo celular dos ameloblastos do compartimento proliferativo, descritos por Zajicek & Bar-Lev (1971 a, b) e Hwang et alii (1966).

TABELA 9 - Duração em horas, das fases do ciclo celular de ameloblastos do compartimento proliferativo, segundo os autores.

Autores	Fases do ciclo celular				
	G	G ₁	S	G ₂	M
Zajicek & Bar-Lev (rato)	22 [±] 4.4	12.5 [±] 2.5	7 [±] 1.4	2 [±] 0.4	0.5 [±] 0.1
	14.2	7.4	5.5	0.82	0.50
Hwang et alii*	24.0	14.35	7.2	1.7	0.75
(camundongo)	-	-	12.0	2.5	1.00
Neste estudo (camundongo)	17.0	7.6	7.6	1.0	0.75

(*) são apresentados os valores mínimo, médio e máximo, com exceção de G e G₁ máximos, que não foram calculados.

Com base na tabela 9, verifica-se que os valores obtidos no grupo controle para a duração dos vários

tempos determinados, de modo geral, quando comparados aos descritos pelos outros autores, apresentam variações, embora estejam dentro dos limites apresentados por Hwang et alii (1966).

Tais variações podem ser explicadas pelas diferentes delimitações do tamanho do compartimento proliferativo e métodos usados para a determinação das várias fases do ciclo celular, bem como dos animais utilizados.

Hwang et alii (1966) definiram o limite in cisal do compartimento proliferativo como sendo o ameloblasto marcado mais distante da alça apical, 1 h após a administração de timidina tritiada, enquanto para Zajicek & Bar-Lev (1971, a) esse limite foi a figura mitótica localizada mais incisalmente.

De acordo com Smith & Warshawsky (1975, b) a figura mitótica mais distante da alça apical, esta localizada numa posição mais incisal ao ameloblasto com núcleo marcado, 1 h após a administração do composto radioativo. Isto implica que o ameloblasto marcado 1 h após, sofre mitose numa posição mais incisal, o que os levou a concluir que o limite incisal do compartimento proliferativo é a fi gura mitótica mais distante da alça apical, 1 h após a injeção de timidina tritiada. Esta figura mitótica ocupa uma série de posições relativas ao início da secreção de pré-dentina.

No presente estudo, determinou-se como li mite incisal do compartimento proliferativo, o início da secreção de pré-dentina pelos odontoblastos, por ser um evento de fácil reconhecimento, ao nível da microscopia óp-

tica.

Além dessa variação de tamanho do compartimento proliferativo, o método de determinação usado pelos autores, apesar de ser o mesmo (Quastler & Sherman, 1959), apresenta algumas variações que podem ter determinado os diferentes valores obtidos.

Hwang et alii (1966) ajustaram os valores da variação da porcentagem de mitoses marcadas em função do tempo, à uma curva teórica de mitose e a partir disso obtiveram os tempos mínimo e máximo de G_2 , mínimo e máximo de S, mínimo de G e tempo mitótico. O tempo médio de S foi obtido ao nível de 37% da curva e, pela relação existente entre este tempo e o índice de marcação, foi calculado o tempo médio de G.

Zajicek & Bar-Lev (1971, a, b) calcularam o tempo de geração a partir do tempo de renovação do compartimento em síntese de DNA, enquanto que os valores de G_2 e S, foram obtidos a partir da curva de mitoses marcadas.

Neste trabalho, os parâmetros do ciclo celular foram obtidos a partir da mediana (nível de 50%), nos curvogramas da variação da porcentagem de metáfases marcadas, em função do tempo após a administração de timidina tritiada.

Considerando que a idade dos camundongos usados e o tempo de sacrifício após a administração do composto radioativo, foram os mesmos neste estudo e no realizado por Hwang et alii (1966), parece razoável utilizar para efeito comparativo, os valores dos diversos parâmetros

determinados por esses autores. Assim, considerou-se menores que os do grupo controle, aqueles valores inferiores ao limite mínimo estabelecido por Hwang et alii (1966), para a duração de cada fase do ciclo celular (tabela 9).

No grupo de animais tratados com Colchicina, ocorreu uma diminuição de G (13.6 h), enquanto que nos grupos tratados com Vimblastina e Vincristina, os valores obtidos foram aproximadamente os mesmos, quando comparados com o grupo controle.

Esta diminuição do tempo de geração dos a meloblastos em incisivos inferiores de camundongos tratados com Colchicina, pode significar uma recuperação das células bloqueadas após o final do efeito da droga, pois sabe-se que o seu tempo de ação varia entre 4 e 6 horas após a injeção (Leblond & Walker, 1956; Bertalanffy & Lau, 1962). Todavia, após este tempo, os ameloblastos bloqueados continuaram sua progressão através do ciclo, juntamente com células que não sofreram a ação da droga, fazendo com que um número maior de metáfases fosse observado antecipando, portanto, o início do segundo pico do curvograma (figura 2) usado para a determinação de G.

O tempo de pré-síntese ou pós-mitótico (G_1) foi menor nos grupos tratados com Colchicina (3.7 h) e com Vimblastina (6.2 h) e foi igual ao obtido para o grupo controle, no grupo tratado com Vincristina (7.6 h).

Para o grupo tratado com Colchicina, a diminuição de G_1 pode ter sido influenciada pela diminuição de G, uma vez que esse parâmetro foi calculado indiretamente. Além disso, a não ser o bloqueio de metáfases, a droga

aparentemente não altera outras fases do ciclo celular (Taylor, 1965).

No grupo tratado com Vimblastina, a diminuição de G_1 pode ser resultado da ação dessa droga pois alguns autores tem descrito os efeitos da Vimblastina em diferentes fases do ciclo celular.

Madoc-Jones & Mauro (1968) verificaram que células em final de G_1 diminuíam em número quando tratadas com altas concentrações de Vimblastina enquanto células tratadas durante a fase S, não tinham a sua progressão afetada através do ciclo até a mitose seguinte, onde o efeito letal se expressava como bloqueio em metáfase.

Chirife & Studzinsky (1978) definiram em cultura de células o período de maior sensibilidade à ação da droga e concluíram que eventos que ocorrem próximos ao limite S/ G_2 afetam a integridade do fuso mitótico na mitose subsequente.

Deve-se observar, no entanto, que esses estudos foram realizados em populações celulares sincrônicas e portanto, a observação de tais fenômenos é mais fácil. Já, os ameloblastos do compartimento proliferativo do incisivo inferior de camundongo, se encontram em diferentes fases do ciclo celular e sendo assim, é de se esperar que a expressão final do efeito da droga antimicrotubular não seja tão evidente.

Os valores obtidos para o tempo mitótico, nos grupos tratados com Colchicina (0.84 h), Vincristina (1.0 h) e Vimblastina (2.07 h) foram maiores que o obtido no grupo controle (0.75 h), embora, nos dois primeiros gru

pos, os valores estejam dentro dos limites máximo e mínimo estabelecidos para a duração desse tempo, por Hwang et alii (1966) (tabela 9).

Nos grupos tratados com Colchicina e Vincristina, este aumento não significou um bloqueio mitótico pois os índices mitóticos desses grupos, não apresentaram diferença significativa quando comparados com o controle. Já, o grupo tratado com Vinblastina, apresentou a maior duração do tempo mitótico e um índice mitótico significativamente maior que o obtido no controle, indicando um bloqueio mitótico.

Existem evidências de que a duração do bloqueio mitótico produzido pela Vinblastina é maior do que a obtida pela Colchicina e Vincristina (Cutts, 1961; Cardinalli et alii, 1963b; Palmer et alii, 1963), o que vem a confirmar os resultados encontrados no presente estudo.

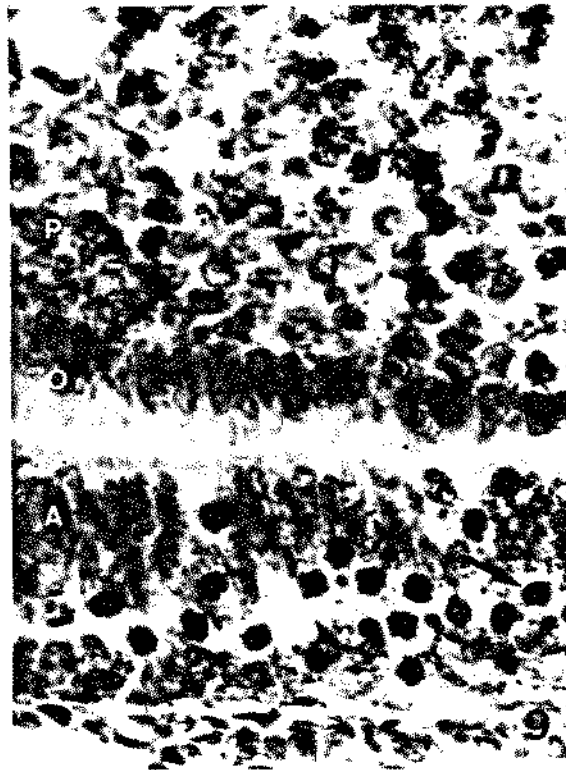
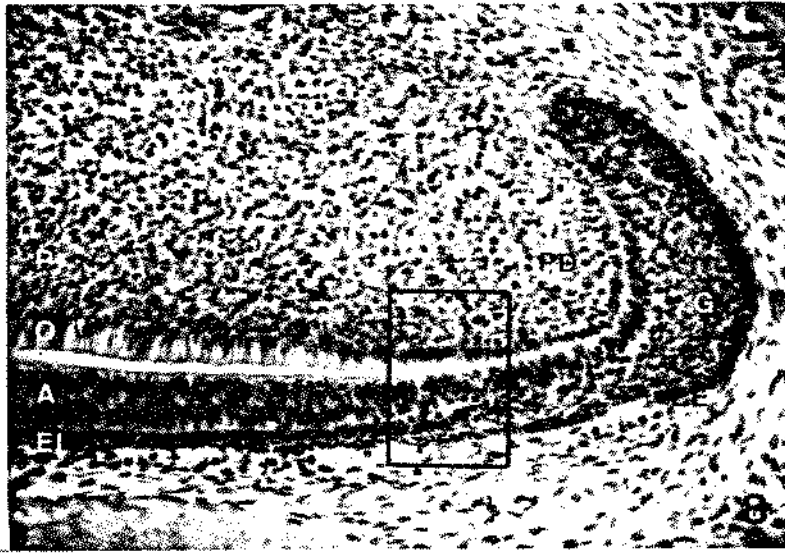
A ação da Vinblastina determinou um acúmulo de células em metáfase (figura 8), resultado do bloqueio mitótico nessa fase, e muitas mitoses apareceram numa posição intermediária (figura 9) entre a camada de ameloblastos e estrato intermédio. Essa ocorrência foi descrita por Ten Cate (1961), em germes dentais de embriões humanos e por Chiba (1965), em germes dentais de rato.

Smith & Warshawsky (1975a) relatam que o mecanismo mais conhecido de produção de novas células epiteliais no incisivo, é o de proliferação prototípica, mas no entanto, aventam a possibilidade de ocorrer permuta entre tipos celulares diferentes.

No presente estudo, somente no grupo tra-

FIGURA 8 - Radioautograma do compartimento proliferativo de incisivo inferior de camundongo tratado por 6 h com Vimblastina e sacrificado 1 h após a administração de timidina tritiada. Nota-se a grande quantidade de figuras mitóticas na fase de metáfase. Observar o acúmulo dessas figuras entre a camada de ameloblastos e o estrato intermédio. PD - papila dental. P - polpa. A - ameloblastos. EI - estrato intermédio. EE - epitélio externo do esmalte. G - geléia. O - odontoblastos. H.E. X 140.

FIGURA 9 - Radioautograma da região delimitada na figura 8, ampliada. Nota-se as metáfases em quantidade apreciável e células marcadas. Observar os grupos de metáfases intermediárias entre os ameloblastos e o estrato intermédio. P - polpa. O - odontoblastos. A - ameloblastos. → metáfases intermediárias. H.E. X 350.



tado com Vimblastina, houve maior ocorrência dessas células mitóticas localizadas entre os ameloblastos e o estrato intermédio. A origem e função dessas células são assuntos que ainda devem ser investigados.

Os efeitos da Vimblastina, quais sejam, aumento da duração do tempo mitótico, acúmulo de ameloblastos bloqueados em metáfase e acúmulo de figuras mitóticas intermediárias, devem provavelmente resultar do tempo de atuação da droga. Trabalhos realizados por Moe (1977) e Moe & Mikkelsen (1977b) sobre os efeitos da Vimblastina nos ameloblastos, mostraram que após 72 h da administração desta droga, ainda se podiam verificar as alterações provocadas.

Os valores de S e G₂ determinados nos grupos de Colchicina e Vimblastina não apresentaram diferenças quando comparados com o grupo controle e se mantiveram dentro dos limites mínimo e máximo estabelecidos por Hwang et alii (1966) (tabelas 5 e 9).

No grupo tratado com Vincristina, os valores de G (17.2 h), G₁ (7.6 h), S (7.5 h) e G₂ (1.1 h), foram aproximadamente iguais aos obtidos para o grupo controle. Dois fatores devem ser considerados em razão deste achado: a dose utilizada e o tempo de ação da droga.

Foi demonstrado que a ação das drogas antimicrotubulares é dependente da dose utilizada. Experimentos realizados com Vincristina demonstraram que o número de metáfases bloqueadas depende da concentração usada e aumenta até à 6^a hora após a administração (Cardinali et alii, 1963a). Entretanto, Frei et alii (1964) verificaram que em

ratos tratados com 0.9 $\mu\text{g/g}$ de peso, de Vincristina, o índice mitótico teve um aumento linear nas primeiras 6 horas, alcançando um pico máximo em aproximadamente 12 h.

Em cultura de células, verificou-se que o bloqueio mitótico foi reversível com doses de Vincristina 10 vezes menores do que aquelas necessárias para causar morte celular (Madoc-Jones & Mauro, 1975).

Diante dessas evidências é provável que a dose de 0.1 μg de Vincristina/g de peso, utilizada neste estudo, tenha sido insuficiente para bloquear os ameloblastos em metáfase durante o tempo de observação.

2. Velocidade de migração dos ameloblastos

A migração celular, em incisivos de crescimento contínuo, inclui um componente de movimento físico, representado pela erupção dental, e um componente de movimento aparente, resultante do crescimento ao longo do eixo longitudinal do dente. Assim, à medida que o incisivo erupciona, as células que o constituem são carregadas através das várias etapas de seu ciclo vital (Smith & Warshawsky, 1975 b).

A variação do espaço percorrido pelos ameloblastos ao longo do órgão de esmalte, medida pela posição das células marcadas em função do tempo após a administração de timidina tritiada, permitiu determinar a velocidade de migração a qual é a resultante dos dois movimentos acima mencionados.

Com base nos resultados obtidos, pode-se observar que a velocidade de migração dos ameloblastos foi menor em incisivos de camundongos tratados com Colchicina e Vimblastina, não havendo qualquer diferença entre os animais do grupo tratado com Vincristina e o grupo controle.

Alguns autores tem descrito a influência de drogas antimicrotubulares sobre a erupção dental em ratos, utilizando diferentes doses e esquemas de tratamento. Main & Adams (1966) não observaram qualquer diferença na taxa de erupção após a administração durante 10 dias, de 1 $\mu\text{g/g}$ de peso, de Demecolcina, um derivado da Colchicina enquanto que a dose de 2 $\mu\text{g/g}$ de peso, dessa mesma droga, repetida a cada 4 h paralizou a erupção após 24 h da injeção

(Chiba et alii, 1968).

Berkowitz (1972) injetando uma dose de 2 μ g de Demecolcina/g de peso, seguida de uma segunda 4 h após, verificou uma diminuição da taxa de erupção dental.

Costa (1978) estudando o efeito de pequenas doses diárias (0.025, 0.05, 0.1 e 0.2 μ g/g de peso) de Colchicina, durante 10 e 18 dias de tratamento, mostrou uma significativa diminuição da erupção dental, não havendo de maneira geral, influência das diferentes doses utilizadas e tampouco do tempo de tratamento.

Chiba et alii (1980) verificaram que doses únicas de Colchicina (1 e 1.5 μ g/g) e Vimblastina (2 e 2.5 μ g/g) causaram uma inibição da taxa de erupção e que este efeito foi dependente da dose utilizada.

Existem evidências de que o ligamento periodontal desempenha um papel importante durante a erupção dental (Berkowitz & Thomas, 1969; Berkowitz, 1971). Deste modo, Beertsen et alii (1974), estudando a ultraestrutura dos fibroblastos no ligamento periodontal de incisivos de rato, verificaram que os mesmos continham sistemas de microfilamentos e microtúbulos que poderiam estar associados com a migração dos fibroblastos durante o processo de erupção dental.

Sendo assim, é possível que o retardo na velocidade de migração dos ameloblastos ao longo do órgão de esmalte, tenha sido determinado pela interferência da Colchicina e Vimblastina nos microtúbulos existentes nos fibroblastos do ligamento periodontal. Esta influência pode ter ocorrido tanto na motilidade dos fibroblastos quan-

to na síntese de colágeno, ou ainda, pela interferência em ambos os processos.

Estudos "in vitro" demonstraram que a Colchicina e a Vinblastina inibem o movimento dos fibroblastos pela destruição dos microtúbulos (Weimar et alii, 1969; Goldman, 1971; Waddell et alii, 1974). Além disso, a síntese e secreção de colágeno também são inibidas pela ação dessas drogas antimicrotubulares (Ehrlich et alii, 1974).

Outro fator que deve ser considerado é a morte celular causada pela Vinblastina. Estudos ao nível da microscopia óptica mostraram que os ameloblastos que migram de áreas que incluem o compartimento proliferativo, aparentemente ficam reduzidos em número e morfologicamente alterados em consequência da morte de células bloqueadas em mitose, sendo que o estágio de secreção é o mais sensível à ação da droga (Moe & Mikkelsen, 1977 a, b; Moe, 1977). Ao nível da microscopia eletrônica foi possível demonstrar que os ameloblastos, tanto os sobreviventes quanto os necróticos, são afetados durante a secreção (Moe, 1979).

No grupo tratado com Vincristina, não foi encontrada diferença significativa na velocidade de migração dos ameloblastos, quando comparada com o controle. Tal achado, neste experimento, provavelmente se deve à utilização de uma dose pequena da droga, associada ao período de ação da mesma.

Foi demonstrado que a taxa de migração celular e a taxa de erupção dental são as mesmas, contudo, devido ao crescimento da porção não erupcionada do dente, a migração celular, como medida das zonas de amelogênese,

parece ser maior do que a erupção dental como medida na cavidade oral, e a essa diferença chama-se taxa de crescimento (Smith & Warshawsky, 1975 b).

Assim, resta ainda proceder a um estudo concomitante, do efeito da Colchicina e Vimblastina, tanto na migração dos ameloblastos quanto na erupção dental, bem como determinar a taxa de crescimento, sob a influência desas drogas. O conhecimento destes parâmetros poderá fornecer novos dados, na tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual essas drogas antimicrotubulares atuam sobre o incisivo de crescimento contínuo.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

V. RESUMO E CONCLUSÕES

Os efeitos da Colchicina, Vimblastina e Vincristina, no ciclo celular e na velocidade de migração dos ameloblastos ao longo do órgão de esmalte, em incisivos inferiores de camundongo foram estudados radioautograficamente, através da incorporação de timidina tritiada naquelas células.

Com base nos resultados obtidos pode-se verificar que no grupo de animais tratados com Colchicina, houve uma diminuição de G e G₁. A diminuição de G pode ter sido determinada pelo aumento do número de ameloblastos em metáfase, como consequência do final de ação da droga, em que células bloqueadas recuperaram sua capacidade de divisão e prosseguiram através do ciclo. Já, a diminuição de G₁ pode ter sido decorrente dessa diminuição de G, uma vez que a duração deste tempo foi calculada indiretamente.

O grupo tratado com Vimblastina apresentou um índice mitótico significativamente maior do que o obtido para o grupo controle e demais grupos tratados, bem como um aumento na duração do tempo mitótico. Tais achados indicam que a duração do bloqueio mitótico foi maior, talvez devido ao tempo de ação da droga. A diminuição de G₁ pode ter sido resultante da ação letal da Vimblastina.

O retardo na velocidade de migração dos ameloblastos, nos grupos tratados com Colchicina e Vimblastina, pode ter sido resultante da interferência causada por essas drogas nos mecanismos de erupção e/ou crescimento do dente.

No grupo tratado com Vincristina, quando comparado com o controle, não houve nenhuma diferença na duração das fases do ciclo celular e nem na velocidade de migração dos ameloblastos, o que provavelmente seja explica-do pela dose insuficiente da droga.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, L.F. Efeito da colchicina e vimblastina sobre a biossíntese de compostos sulfatados nos ameloblastos e odontoblastos de incisivo de camundongo, visualizado radioautograficamente, após a injeção de ^{35}S -sulfato de sódio. Piracicaba, 1981. {Tese (Mestrado) - F.O.P.} .
- BEERTSEN, W.; EVERTS, V.; VAN DEN HOOFF, A. Fine structure of fibroblasts in the periodontal ligament of the rat incisor and their possible role in tooth eruption. Archs oral Biol., 19: 1087-98, 1974.
- BERKOVITZ, B.K.B. The effect of root transection and partial root resection on the unimpeded eruption rate of the rat incisor. Archs oral Biol., 16: 1033-43, 1971.
- _____. The effect of demecolcine and of triethanolamine on the unimpeded eruption rate of normal and root resected incisor teeth in rats. Archs oral Biol., 17 : 937-47, 1972.
- _____ & THOMAS, N.R. Unimpeded eruption in the root-resected lower incisor of the rat with a preliminary note on root transection. Archs oral Biol., 14: 771-80, 1969.
- BERTALANFFY, F.D. e LAU, C. Cell Renewal. Intern. Rev. Cytol., 13: 357-66, 1962.
- _____ & LEBLOND, C.P. The continuous renewal of the two types of alveolar cells in the lung of the rat. Anat. Rec., 115(3): 515-41, 1953.
- BLUMEN, G. Aspectos da formação e maturação da matriz orgânica do esmalte em molares de *Cavia porcellus*, L. estudados radioautograficamente. São Paulo, 1970. {Tese (Dou

toramento) - E.P.M.}.

BURNSIDE,B. The form and arrangement of microtubules: an historical, primarily morphological, review. Ann.N.Y.-Acad.Sci., 253: 14-26, 1975.

CARDINALI,G.; CARDINALI,G.; ENEIN,M.A. Studies on the antimitotic activity of leurocristine (vincristine). Blood, 21(1): 102-10, 1963a.

_____; _____; MEHROTA,T.N. Comparative studies on the stathmokinetic effect of vincristine (VCR) vimblastine (VBL) and colchicine. Proc. Am. Ass. Cancer Res., 4(1): 10, 1963b (Abstract).

CHIBA,M. Cellular proliferation in the tooth germ of the rat incisor. Archs oral Biol., 10: 707-18, 1965.

_____; NARRAWAY,J.M.; NESS,A.R. Impeded and unimpeded eruption of the mandibular incisor of the adult male rat and its stoppage by demecolcine. J. dent. Res., 47: 986, 1968 (Abstract).

_____; TAKIZAWA,K.; OHSHIMA,S. Dose-response effects of colchicine on unimpeded eruption rates of the rat mandibular incisor. Archs oral Biol., 25(2): 115-9, 1980.

CHIRIFE,A.M. & STUDZINSKI,G.P. Definition of the cell cycle segment with special sensitivity to vinblastine. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 157: 206-10, 1978.

COSTA,A.M.D.D. Estudos com a Colchicina no crescimento de dentes de ratos. Piracicaba, 1978. {Tese (Mestrado)-F.O.P.}.

CUTTS,J.H. The effect of vincalcukoblastine on dividing -

- cells "in vivo". Cancer Res., 21: 168-72, 1961.
- EHRlich,H.P.; ROSS,R.; BORNSTEIN,P. Effects of antimicrotubular agents of the secretion of collagen. J. Cell.-Biol., 62: 390-405, 1974.
- FREI III,E.; WHANG,J.; SCOGGINS,R.B.; VAN SCOTT,E.J.; RALL,D.P.; BEN,M. The stathmokinetic effect of vincristine. Cancer Res., 24: 1918-25, 1964.
- GOLDMAN,R.D. The role of three cytoplasmic fibers in BHK-21 cell motility. 1-Microtubules and the effects of colchicine. J. Cell. Biol., 51: 752-62, 1971.
- 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(2): 350-8, 1966.
- KARIM,A. & WARSHAWSKY,H. The effect of colcemid on the structure and secretory activity of ameloblasts in the rat incisor as shown by radioautography after injection of ³H-proline. Anat. Rec., 195: 587-610, 1979.
- KOPRIWA,B.M. & LEBLOND,C.P. Improvements in the coating technique of radioautography. J. Histochem. Cytochem., 10: 269-84, 1962.
- KUDO,N. Effect of colchicine on the secretion of matrices of dentine and enamel in the rat incisor: an radioautographic study using ³H-proline. Calcif. Tiss. Res., 18: 37-46, 1975.
- LEBLOND,C.P. & WALKER,B.E. Renewal of cell populations. Physiol. Rev., 36: 255-75, 1956.
- MADOC-JONES,H. & MAURO,F. Interphase action of vinblasti-

ne and vincristine: differences in their lethal action through the mitotic cycle of cultured mammalian cells. J. Cell. Physiol., 72: 185-95, 1968.

MADOC-JONES, H. & MAURO, F. Site of action of cytotoxic agents in the cell cycle. In: SARTORELLI, A.C. & JOHNS, D.G. eds. Antineoplastic and immuno-depressive agents. I. Handbook of experimental pharmacology. Berlin, Springer, 1975. 38/1, p.205. Apud KLEIN, H.O. Cell kinetic alterations in normal and neoplastic cell populations 'in vitro' and 'in vivo' following vincristine. Cell.-Tiss. Kinet., 13: 425-34, 1980.

MAIN, J.H.P. & ADAMS, D. Experiments on the rat incisor into the cellular proliferation and blood-pressure theories of tooth eruption. Archs oral Biol., 11: 163-78, 1966.

MIKKELSEN, H.B. Acute and protracted effects of vinblastine on odontoblasts and dentinogenesis in rat incisors. Scand. J. dent. Res., 86: 313-24, 1978.

MOE, H. On the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors "in vivo". 3- Acute and protracted effect on differentiating ameloblasts. A light microscopical study. Acta path. microbiol. scand., Sect.A, 85: 330-4, 1977.

_____. Sequential ultrastructural changes in vinblastine-induced cell death of secretory ameloblasts of rat incisor "in vivo". Acta path. microbiol. scand., Sect.A, 87: 1-9, 1979.

_____ & MIKKELSEN, H. Light microscopical and ultrastructural observations on the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors "in vivo". 1- Short-term effect on secretory ameloblasts. Acta path. microbiol. scand., Sect.A, 85: 73-88, 1977a.

- MOE, H. & MIKKELSEN, H. On the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors "in vivo". 2- Protracted effect on secretory ameloblasts. A light microscopical study. Acta path. microbiol. scand., Sect. A, 85: 319-29, 1977b.
- NOGUEIRA, T.O.; STENE, T.; KOPPANG, H.S. Long-term effects of colchicine on dentinogenesis in rat incisors. Scand. J. dent. Res., 88(1): 15-21, 1980.
- PALMER, C.G.; WARREN, A.K.; SIMPSON, P.J. A comparison of the cytologic effects of leucosine methiodide and vinblastine in tissue culture. Cancer Chemoter. Rep., 31: 1-2, 1963.
- QUASTLER, H. The analysis of cell population kinetics. In: LAMERTON, L.F. & FRY, R.J.M. Cell Proliferation. Oxford, Blackwell Scientific Publ., 1963. p.18-34.
- _____ & SHERMAN, F.G. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Expl. Cell Res. 17: 420-38, 1959.
- SARTORELLI, A.C. & CREASEY, W.A. Cancer chemotherapy. A. - Rev. Pharmac., 9: 51-72, 1969.
- SMITH, C.E. & WARSHAWSKY, H. Histological and three dimensional organization of the odontogenic organ in the lower incisor of 100 gram rats. Am. J. Anat., 142: 403 - 30, 1975a.
- _____ & _____. Cellular renewal in the enamel organ and the odontoblast layer of the rat incisor as followed by radioautography using ³H-thymidine. Anat. Rec., 183 (4): 523-61, 1975b.
- STENE, T. Effect of vincristine on odontoblasts in rat incisor. Scand. J. dent. Res., 86: 346-56, 1978.

STENE, T. & KOPPANG, H.S. The effect of vincristine on dentinogenesis in the rat incisor. Scand. J. dent. Res., 84: 342-4, 1976.

_____ & _____. Autoradiographic investigation of dentin production in rat incisors after vincristine administration. Scand. J. dent. Res., 88: 104-12, 1980.

TAYLOR, E.W. The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. I- Kinetics of inhibition and the binding of ³H-colchicine. J. Cell. Biol., 25: 145-60, 1965.

TEN CATE, A.R. Recruitment in the internal enamel epithelium as a factor in growth of the human tooth germ. Br. dent. J., 110: 267-73, 1961.

WADDELL, A.W.; ROBSON, R.T.; EDWARDS, J.G. Colchicine and vinblastine inhibit fibroblast aggregation. Nature, 248: 239-41, 1974.

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

_____ & SMITH, C.E. Morphological classification of rat incisor ameloblasts. Anat. Rec., 179(4): 423-45, 1974.

WEIMAR, V.L.; FELLMAN, M.J.; DAVIS, M. Inhibitory action of colchicine on cell movement in organ culture. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 131: 1457-9, 1969.

WILSON, L.; BAMBURG, J.R.; MIZEL, S.B.; GRISHAM, L.M.; CRESWELL, K.M. Interaction of drugs with microtubule proteins. Fedn Proc., 33(2): 158-66, 1974.

ZAJICEK, G. & BAR-LEV, M. Kinetics of the inner enamel epi-

thelium in the adult rat incisor. I- Experimental results. Cell Tiss. Kinet., 4: 155-62, 1971a.

ZAJICEK, G. & BAR-LEV, M. Kinetics of the inner enamel epithelium in the adult rat incisor. II- Computer model. ' Cell Tiss. Kinet., 4: 163-70, 1971b.