

LELI FERNANDES DE AZEVEDO

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  $^{35}\text{S}$ -SULFATO DE SÓDIO.

*Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia e Patologia Buco-Dental, na área de Histologia e Embriologia.*

PIRACICABA

1981

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao GURGEL

o grande incentivador desta iniciação científica

ã pequena IRACEMA DALILA,

meus pais e irmãos,

a minha gratidão

Ao Professor Doutor

GUILHERME BLUMEN

Sincero agradecimento pela devotada  
ORIENTAÇÃO, alicerce fundamental e  
presença constante durante a realização  
desta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS FERRAZ CORRÊA, Coordenador da CPG da FOP e do Curso de Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia, pela oportunidade concedida.

Ao PICD-UFRN, pela bolsa concedida durante parte da realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. JOSÉ MERZEL, pela revisão final do texto.

À Profa Dra SÔNIA VIEIRA, do Departamento de Odontologia Social da FOP, pela orientação, e principalmente pela maneira atenciosa no tratamento estatístico.

Aos Professores Doutores TEREZA L.S. BARRIHELLO e CASSIO O.G. MUNHOZ, pelo bom relacionamento mantido durante a realização deste trabalho.

A Sra IVANY C.G.GEROLA, Bibliotecária da FOP, pelo valioso auxílio na revisão bibliográfica.

Ao Sr. MESSIAS S.de LIMA, pela cooperação, em parte, no desenvolvimento dos trabalhos práticos.

Ao Sr. SEBASTIÃO R. de BARROS, pelos serviços de impressão.

Aos PROFESSORES e FUNCIONÁRIOS do Departamento de Morfologia da FOP, que direta ou indiretamente contribuíram na realização desta Tese.

Aos COLEGAS do Curso, pelo clima de amizade e companheirismo recebidos.

Ao casal JOSÉ GUSTAVO e IRACEMA JUDITH DE MORAES FROTA, profundo e reconhecido agradecimento pelo carinho e dedicação exclusiva com a pequena Iracema Dalila, ao longo desta jornada.

## SUMÁRIO

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO .....                | 1  |
| MATERIAL E MÉTODOS .....        | 3  |
| RESULTADOS .....                | 7  |
| DISCUSSÃO .....                 | 32 |
| RESUMO E CONCLUSÕES .....       | 41 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |

## ABREVIATURAS USADAS POR ORDEM DE CITAÇÃO

|     |                                   |
|-----|-----------------------------------|
| A   | ameloblastos                      |
| EN  | esmalte                           |
| ART | artefato                          |
| O   | odontoblastos                     |
| PD  | pré-dentina                       |
| D   | dentina                           |
| CLC | colchicina                        |
| VBL | vimblastina                       |
| GL  | grau de liberdade                 |
| SQ  | soma dos quadrados                |
| QM  | quadrado médio                    |
| F   | teste F                           |
| RER | retículo endoplasmático<br>rugoso |

## INTRODUÇÃO

Foi demonstrado que a colchicina e a vimblastina são inibidores de microtúbulos (WILSON et alii., 1974). A colchicina atua desagregando o aparelho de Golgi (EHRlich et alii., 1974; MOSKALEWSKI et alii., 1975; 1976; THYBERG et alii., 1978), enquanto a vimblastina altera tanto o aparelho de Golgi, quanto o retículo endoplasmático rugoso (EHRlich et alii., 1974; MOSKALEWSKI et alii., 1975; 1976; MOE & MIKKELSEN, 1977; THYBERG et alii., 1978).

Alterações morfológicas em odontoblastos, durante a dentinogênese de incisivos de ratos, foram observadas após a administração da vimblastina (MIKKELSEN, 1978) e vincristina (STENE, 1978).

Efeitos da colchicina (KUDO, 1975; KARIM & WARSHAWSKY, 1979) e da vimblastina (GOLDBERG et alii., 1979), foram estudados através da incorporação de <sup>3</sup>H-prolina, sobre a secreção do precursor radioativo dos ameloblastos e odontoblastos, em matrizes do esmalte e da dentina adjacentes.

O aparelho de Golgi é a região celular responsável pela biossíntese da fração carboidrática de proteínas (PETERSON & LEBLOND, 1964; NEUTRA & LEBLOND, 1969; WEINSTOCK & LEBLOND, 1971; WEINSTOCK et alii., 1972; WEINSTOCK, 1979), bem como, o local onde se processa a sulfatação das mesmas (OTERO-VILARDEBŪ et alii., 1964; PETERSON & LEBLOND, 1964; BLUMEN, 1970; BLUMEN & MERZEL, 1973; 1976; MUNHOZ & MERZEL, 1977).

Desde que as matrizes do esmalte e da dentina contêm compostos sulfatados (BLUMEN & MERZEL, 1976), o objetivo do presente estudo será o de verificar radio-

autograficamente, através da incorporação do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio, ao nível da microscopia óptica, os efeitos que os antimicrotubulares, colchicina e vimblastina, poderão exercer nas organelas que participam da secreção celular, principalmente relacionada ao processo de sulfatação que ocorre no aparelho de Golgi, em ameloblastos e odontoblastos da região secretora de incisivos inferiores de camundongos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Doze camundongos *M. musculus, albinus*, machos, com cinco semanas de vida, pesando entre 22 e 25 g, foram divididos em 3 grupos, de quatro animais, cada.

Os animais que serviram como controle, receberam por via intraperitoneal uma única dose<sup>1</sup> de 10  $\mu\text{Ci/g}$  de <sup>35</sup>S-sulfato de sódio, livre de carreador (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP).

Dos animais restantes, quatro receberam por via intraperitoneal uma dose de 0,1 mg de Colchicina (Colchicina Houdé - Laboratório Pierre-Docta S.A., Rio de Janeiro, RJ) por 100 g de animal (KUDO, 1975). Após duas horas, os animais foram injetados pela mesma via, com uma dose de 10  $\mu\text{Ci/g}$  de <sup>35</sup>S-sulfato de sódio.

Os últimos quatro animais receberam intraperitonealmente uma dose de 0,2 mg de Sulfato de Vimblastina (Velban - Laboratório Eli Lilly do Brasil Ltda. São Paulo, SP) por 100 g de animal (MOE & MIKKELSEN, 1977) e, após três horas, foram administrados 10  $\mu\text{Ci/g}$  de <sup>35</sup>S-sulfato de sódio, pela via já mencionada.

Os animais dos três grupos foram sacrificados aos 10 e 30 minutos, 2 e 24 horas, após a injeção do composto radioativo, sendo sacrificado um animal de cada grupo nos tempos considerados.

Aos tempos de sacrifício, os animais foram anestesiados sob a inalação do éter sulfúrico, tendo-se o cuidado de manter o animal vivo. Em seguida foi realizada uma incisão, abrindo-se a cavidade abdominal e, após

---

1. A expressão  $\mu\text{Ci/g}$  corresponde à dose injetada em  $\mu\text{Ci}$  por g de animal.

rompida a membrana diafragmática, a parede torácica foi rebatida, a fim de expor o coração, com o objetivo de proceder-se a fixação por perfusão.

Um conjunto para fixação por perfusão foi mantido com uma agulha hipodérmica de 0,5 cm x 10 mm, colocada em um tubo flexível de polietileno adaptado a um frasco de soro fisiológico vazio, que serviu para depósito da solução fixadora. Este conjunto foi pendurado cerca de um metro acima da mesa cirúrgica, de modo a permitir que o líquido fluísse livremente pelo tubo.

Com a agulha introduzida no ventrículo esquerdo, liberou-se a válvula da sonda para passagem do *Paraformaldeído* a 4% (usado como fixador), tamponado<sup>2</sup> a pH 7,4. Imediatamente incisou-se a aurícula direita para a saída do fluxo sanguíneo. Deste modo a perfusão foi realizada deixando-se o líquido fluir por gravidade e pressão negativa, e percorrer os vasos sanguíneos de modo contínuo, cerca de 20 minutos.

As mandíbulas foram cuidadosamente dissecadas, separadas em hemimandíbulas e imersas em solução de *Glutaraldeído* a 25% (WARSHAWSKY & MOORE, 1967), tamponado<sup>3</sup> a pH 7,4 e usado como pós-fixador durante quatro horas.

Em seguida procedeu-se a lavagem das peças com uma solução de tampão-fosfato<sup>4</sup>.

- 
- 2) A solução tampão foi preparada tomando-se 1,88g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 0,43g de NaOH, completando-se o volume para 100 ml com água destilada.
  - 3) A solução tampão foi preparada tomando-se 2,09g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,58g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , completando-se o volume para 100 ml com água destilada.
  - 4) A solução tampão foi preparada tomando-se 36,10g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e 7,56g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , completando-se o volume para 1000 ml com água destilada.

Após o período de fixação, as hemimandíbulas foram descalcificadas com uma solução de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) a 4,13% (WARSHAWSKY & MOORE, 1967) e a 4°C, que durou aproximadamente doze dias, com trocas diárias do líquido e agitação freqüente das peças.

O grau de desmineralização foi testado a partir do oitavo dia, com pequenos cortes na porção incisal, usando-se lâminas de barbear novas.

Após a desmineralização, as peças foram lavadas com tampão-fosfato a 4°C, durante quarenta e oito horas. A cada doze horas trocou-se o líquido, com a finalidade de retirar os complexos formados a partir da interação do EDTA com os íons cálcio.

Com o emprego de uma lupa estereoscópica e usando-se lâmina de barbear nova, aparou-se cada hemimandíbula para selecionar a zona secretora de amelogênese e dentinogênese em estudo.

Estas zonas, de cada incisivo, foram aparadas a partir da curva cervical até a região distal do segundo molar, a fim de serem obtidos cortes no sentido longitudinal ou transversal do dente.

Em seguida os espécimens foram pós-fixados com tetróxido de ósmio ( $OsO_4$ ) a 1%, tamponado<sup>5</sup> a pH 7,4 e deixados a 4°C, durante quatro horas.

Após a fixação com  $OsO_4$ , o material ligeiramente lavado com o tampão-fosfato foi desidratado em soluções crescentes de acetona, infiltrado e incluído em EPON, de acordo com o método descrito por LUFT (1961), exceto que a proporção usada para as misturas A e B foi em partes iguais.

---

5) A solução tampão foi preparada tomando-se 5,58g de  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  e 1,17g de  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , completando-se o volume para 200 ml de água destilada.

Cortes semifinos de 1µm de espessura para microscopia óptica, obtidos nos sentidos *longitudinal* e *transversal*, utilizando-se de um ultramicrotomo "Porter-Blum" MT-2, foram montados em lâminas novas e previamente cobertas com gelatina a 0,5%, radioautografados com emulsão *Ilford-K5* (KOPRIWA & LEBLOND, 1962) e expostos a 4°C.

Após o tempo de exposição, que durou trinta e um dias, as lâminas foram reveladas com solução D19B da KODAK, durante 4 minutos, fixadas em hipossulfito de sódio a 24%, por 10 minutos, coradas com azul de metileno a 1% por 20 segundos e montadas com bálamo.

A avaliação quantitativa dos radioautogramas foi determinada sobre o citoplasma dos ameloblastos e em toda a extensão da matriz do esmalte da zona de secreção do esmalte interno (WARSHAWSKY & SMITH, 1974), e sobre o citoplasma dos odontoblastos e em toda a extensão da pré-dentina e dentina adjacentes, nos tempos de 10 minutos, 30 minutos e 2 horas. A análise quantitativa não foi avaliada no tempo correspondente a 24 horas devido ausência de radioatividade nas células.

Estas contagens foram realizadas utilizando-se de uma ocular quadriculada KPL-8x dividida em 10x10 quadrados que, no sistema óptico empregado, mediram 100µm<sup>2</sup> cada.

Os grãos de Ag, na região supranuclear dos ameloblastos e odontoblastos, foram contados em tantos quadrados necessários para cobri-la totalmente, numa extensão correspondente a 100µm<sup>2</sup>. Sobre a matriz do esmalte, pré-dentina e dentina, a contagem foi feita a partir de uma linha que, de um lado se limita com as células em estudo, e do outro, com a junção pré-dentina-dentina e amelo-dentinária, e em tantos quadrados de 100µm<sup>2</sup> necessários para cobrir toda a espessura destas matrizes.

Os valores médios obtidos das contagens foram lançados em tabelas e submetidos à análise de variância com o teste de Tukey.

## RESULTADOS

## 1. OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS

1.1 *Ameloblastos e matriz do esmalte*

As observações morfológicas foram realizadas nas mesmas lâminas radioautografadas, e mostraram nos grupos pré-tratados com colchicina e vimblastina, quando comparadas com o grupo controle, as seguintes alterações:

## a) Colchicina

Pequenos vacúolos e espaços vazios intercelulares, com maior evidência no terço médio da região supranuclear dos ameloblastos secretores (Figuras 5 a 8). Essas alterações foram observadas desde o intervalo de 10 minutos até 24 horas, após a injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio. Na matriz do esmalte não se verificaram alterações ao nível da microscopia óptica (Figuras 5 a 8).

## b) Vimblastina

Pequenos vacúolos e espaços vazios intercelulares. Vacúolos e espaços maiores na região infranuclear (Figuras 9 a 12). Essas alterações foram constatadas desde o intervalo de 3 a 5 horas após a injeção da droga (Figuras 9 a 11). Após 27 horas, houve desorganização celular total, como, camada ameloblástica totalmente desorganizada, com núcleos pequenos, arredondados, presentes desde a porção basal até a porção apical da célula (Fig. 12); matriz do esmalte mais alterada na região central entre os processos de Tomes e junção amelo-dentinária, apresentando redução na sua coloração.

1.2 *Odontoblastos, pré-dentina e dentina*

## a) Colchicina

Os odontoblastos dos animais tratados com colchicina apresentaram, quando comparados com os do gru-

po controle, alterações, tais como: vacúolos de vários tamanhos e espaços vazios entre uma célula e outra (Figuras 17 a 20). A pré-dentina e dentina não sofreram alterações, quando vistas ao microscópio óptico (Figuras 17 a 20).

b) Os odontoblastos de incisivo de animais tratados com vimblastina apresentaram vacúolos e espaços entre as células. A camada celular não sofreu irregularidades, apenas alguns núcleos se tornaram arredondados e outros alongados (Figuras 21 a 24). A pré-dentina e dentina não sofreram alterações morfológicas (Figuras 21 a 24).

## 2. ANÁLISE QUALITATIVA DA INCORPORAÇÃO DO <sup>35</sup>S-SULFATO DE SÓDIO

### 2.1 Ameloblastos e matriz do esmalte

Após 10 minutos, observou-se nos 3 grupos (<sup>35</sup>S-sulfato de sódio, colchicina e vimblastina) uma reação radioautográfica em todo o citoplasma da célula, com maior concentração no terço médio da região supranuclear, que corresponde à zona do Golgi (Figuras 1, 5 e 9). Ressalta-se que, no grupo previamente tratado com vimblastina, esta reação foi de baixa intensidade (Figura 9), em relação aos outros dois grupos. Nos grupos controle e tratado com colchicina, notou-se também uma reação radioativa, embora de baixa intensidade, na região correspondente aos processos de Tomes (Figuras 1 e 5).

Após 30 minutos, verificou-se que a radioatividade esteve presente na zona do Golgi e na região correspondente aos processos de Tomes. Para os grupos tratados com colchicina e vimblastina, a reatividade de maior intensidade foi na região supranuclear (Figuras 6 e 10), enquanto que, para o grupo controle,

## PRANCHA 1

FIGURAS 1-4 Radioautogramas de ameloblastos secretores do incisivo inferior de camundongo, em diferentes intervalos de tempo, após a injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio, corados com azul de metileno a 1%.

FIGURA 1 Após 10 minutos da injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio, observou-se uma reação radioativa na região supranuclear, correspondente à área do Golgi, indicando a biossíntese do sulfato incorporado. Alguns grãos de Ag, foram também observados no ápice dos ameloblastos e nos processos de Tomes, já alcançando a matriz do esmalte adjacente.

1310 x.

FIGURA 2 Após 30 minutos da injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio, notou-se a reação radioativa com um grau maior de intensidade, na região dos processos de Tomes e matriz do esmalte adjacente e um menor grau na região supranuclear, indicando uma secreção de material radioativo exportável.

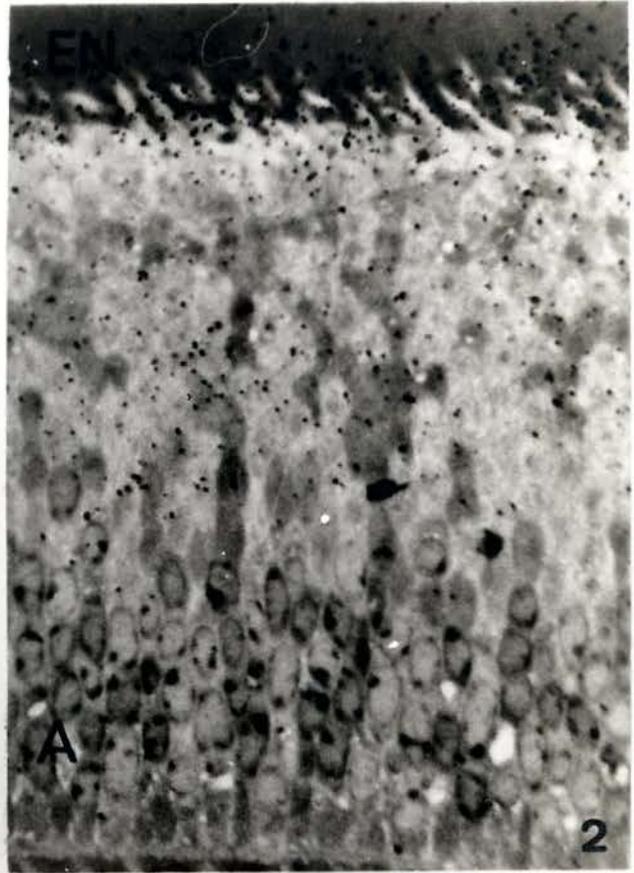
820 x.

FIGURA 3 Após 2 h da injeção do composto radioativo, verificou-se que a reação radioautográfica se deslocou até por volta de um terço de um terço da matriz do esmalte.

525 x.

FIGURA 4 Após 24 h da injeção do precursor radioativo observou-se radioatividade intensa e difusa de grãos de Ag sobre toda a largura e espessura da matriz do esmalte. No citoplasma dos ameloblastos, a reação radioautográfica foi praticamente nula.

820 x.



a reação de maior intensidade radioativa foi encontrada nos processos de Tomes (Figura 2). No grupo pré-tratado com vimblastina a área correspondente aos processos de Tomes permaneceu isenta de reação radioautográfica (Figura 10).

Após 2 horas, os radioautogramas mostraram que os 3 grupos se comportaram de modos diferentes. Assim, o grupo controle mostrou baixa intensidade de reatividade de grãos de Ag na região supranuclear (Figura 3); os grupos tratados com colchicina e vimblastina apresentaram reação radioativa difusa em todo o citoplasma, com maior intensidade na região supranuclear correspondente à zona do Golgi (Figuras 7 e 11); o grupo controle e o pré-tratado com colchicina mostraram uma reação fortemente radioativa nos dois terços da matriz do esmalte, a partir dos processos de Tomes (Figuras 3 e 7); enquanto que, o grupo que recebeu previamente a vimblastina, revelou baixa intensidade da reação radioautográfica na matriz do esmalte (Figura 11).

Após 24 horas, da injeção das drogas, o grupo controle e o grupo tratado previamente com colchicina, se comportaram de maneira semelhante, pois apresentaram radioatividade intensa de grãos de Ag na região correspondente à matriz de esmalte. Esta reação foi difusa sobre toda a espessura da matriz. Neste intervalo de tempo, a região supranuclear revelou um pronunciado decréscimo de sua reatividade (Figuras 4 e 8). O grupo tratado com vimblastina apresentou reação de baixa intensidade na matriz do esmalte e pouco ou quase nenhuma reação na região supranuclear (Figura 12).

## 2.2 Odontoblastos, pré-dentina e dentina

Após 10 minutos, verificou-se concentração de grãos de Ag na região supranuclear correspondente à zona do Golgi nos 3 grupos estudados, embora, a do gru-

## PRANCHA 2

FIGURAS 5-8 Radioautogramas de ameloblastos secretores de incisivos de camundongos, pré-tratados durante 2 h com colchicina, sacrificados em diferentes intervalos de tempo após a injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio, corados com azul de metileno a 1%. (Pequenas alterações morfológicas observadas desde 10 min até 24 h).

FIGURA 5 Após 10 minutos da injeção do composto radioativo, observou-se reação radioautográfica em todo o citoplasma, com predominância no terço médio dos ameloblastos, correspondente à região de Golgi. Os processos de Tomes e a matriz do esmalte se apresentaram praticamente sem reação.

820 x.

FIGURA 6 Após 30 minutos da injeção do composto radioativo, a reação foi mais intensa em toda a região supranuclear dos ameloblastos. O mesmo aconteceu na região dos processos de Tomes e um terço da matriz do esmalte.

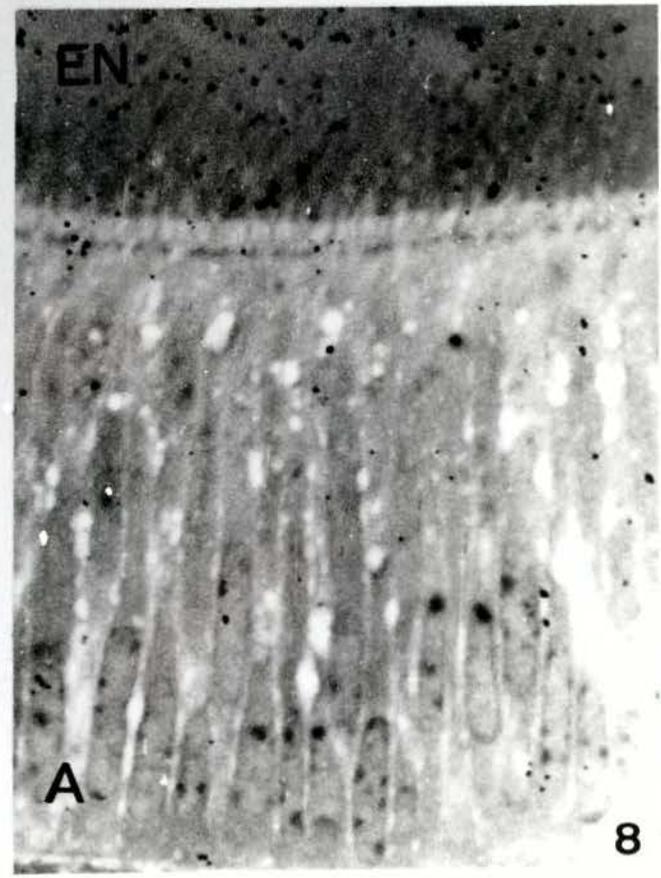
820 x.

FIGURA 7 Após 2 h da injeção do composto radioativo, houve uma forte distribuição de grãos de Ag por todo o citoplasma, bem como, no ápice dos ameloblastos e nos processos de Tomes, indicando o acúmulo de radioatividade no interior da célula. Na matriz do esmalte, a região também foi intensa, indicando secreção de material exportável.

1310 x.

FIGURA 8 Após 24 h da injeção, observou-se ausência de grãos de Ag no citoplasma dos ameloblastos, enquanto verificou-se intensa e difusa concentração de grãos de Ag, sobre a espessura da matriz do esmalte.

820 x.



## PRANCHA 3

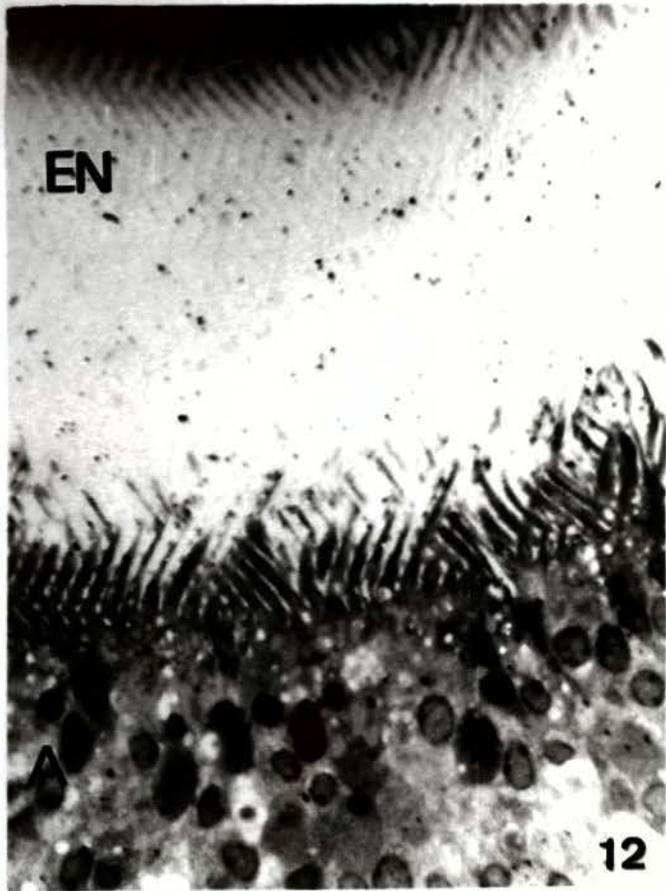
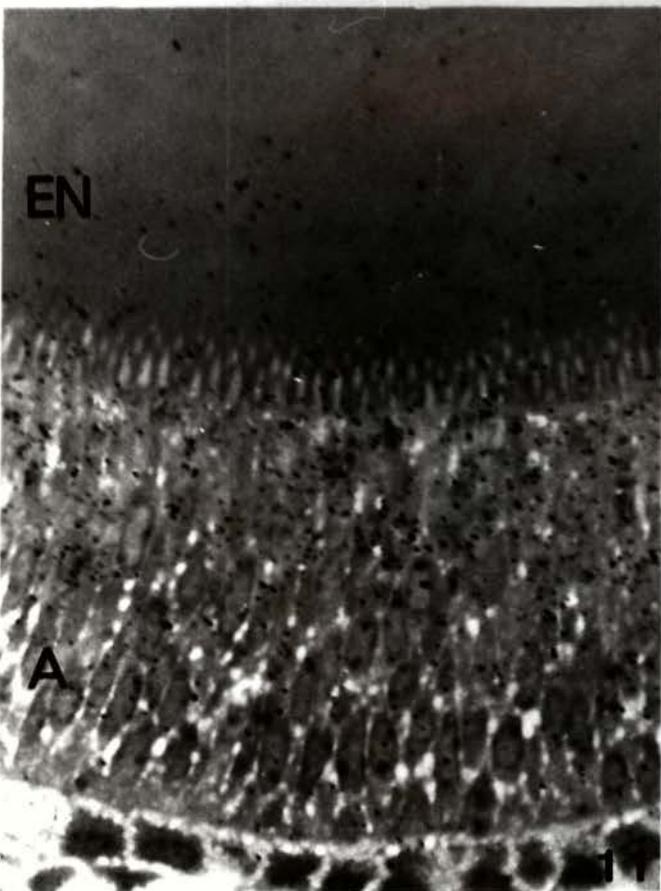
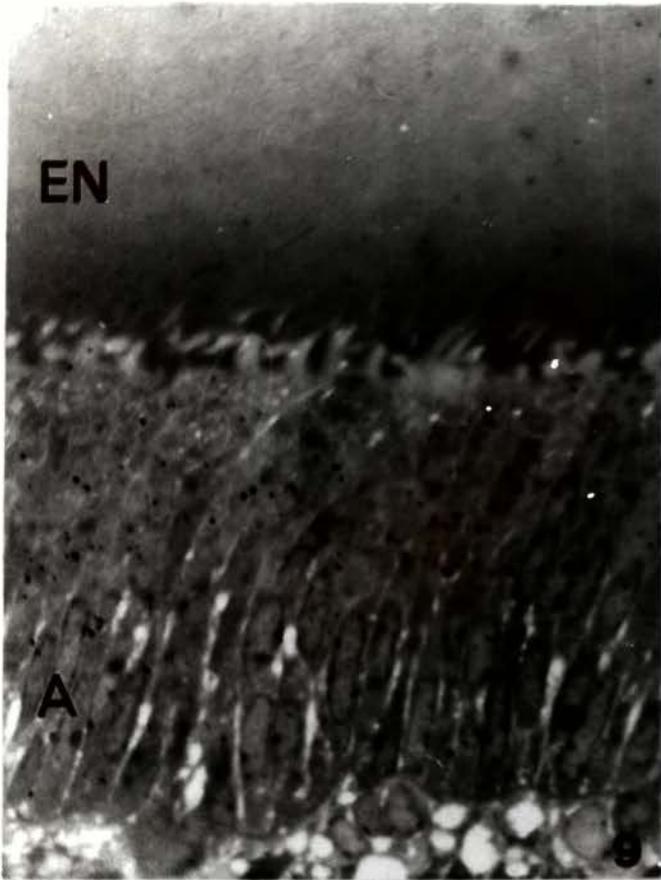
FIGURAS 9 - 12 Radioautogramas de ameloblastos secretores de incisivos de camundongos, prē-tratados durante 3 h com vimblastina, sacrificados em diferentes intervalos de tempo apōs a injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sōdio, corados com azul de metileno a 1%. (Pequenas alteraçōes morfolōgicas observadas desde 10 min atē 2 h).

FIGURA 9 Apōs 10 minutos da injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sōdio, observou-se baixa radioatividade no terço mēdio da regiāo supranuclear dos ameloblastos correspondente ā zona do Golgi, enquanto nos processos de Tomes e na matriz do esmalte adjacente a radioatividade foi nula.  
820 x.

FIGURA 10 Apōs 30 minutos da injeção do composto radioativo, verificou-se que a reaçaō foi mais acentuada na regiāo supranuclear dos ameloblastos, ao passo que, a matriz do esmalte apresentou muito pouca radioatividade.  
1310 x.

FIGURA 11 Apōs 2 h da injeção do precursor radioativo, notou-se uma concentraçaō maior de grāos de Ag na regiāo supranuclear dos ameloblastos, no tempo em que a matriz do esmalte demonstrou baixa concentraçaō de grāos de Ag, indicando que houve retençaō da radioatividade no interior da cēlula.  
820 x.

FIGURA 12 Apōs 24 h da administraçaō do composto radioativo, os ameloblastos se apresentaram isentos de radioatividade, enquanto a matriz do esmalte apresentou fraca reaçaō radioautogrāfica. Os ameloblastos perderam suas caracterīsticas morfolōgicas de cēlulas altas, e a matriz denotou pouca afinidade pelo corante.  
820 x.



po tratado com vimblastina tenha sido de menor, e a do tratado com colchicina, de maior intensidade (Figuras 21 e 17) quando comparadas com a do grupo controle (Figura 13). A reação radioautográfica na região correspondente aos prolongamentos odontoblásticos nos grupos controle e pré-tratado com colchicina, foi bem fraca (Figuras 13 e 17), e no grupo pré-tratado com a vimblastina, esta reação não foi notada (Figura 21).

Após 30 minutos da injeção do composto radioativo, a reação ainda esteve presente na região supranuclear dos odontoblastos nos três grupos (Figuras 14, 18 e 22); enquanto que, nos prolongamentos odontoblásticos e pré-dentina, nos grupos controle e tratado com colchicina, a reação foi mais intensa do que no tempo precedente (Figuras 14 e 18). No grupo tratado com vimblastina esta reação não foi observada (Figura 22).

Após 2 horas, ainda permaneceu radioatividade na região supranuclear dos 3 grupos (Figuras 15, 19 e 23), sendo que a reação dos grupos pré-tratados com colchicina e vimblastina se apresentou mais intensa (Figuras 19 e 23). Foi notada uma banda radioativa na pré-dentina e um terço da dentina dos três grupos (Figuras 15, 19 e 23), embora o grupo tratado com vimblastina tenha se mostrado menos concentrado (Figura 23) que os outros dois grupos (Figuras 15 e 19).

Após 24 horas da injeção das drogas, verificou-se um pronunciado decréscimo na concentração de grãos de Ag na região supranuclear dos odontoblastos nos três grupos (Figuras 16, 20 e 24) e uma banda radioativa bem definida na pré-dentina e um terço da dentina, nos grupos controle e previamente tratado com colchicina (Figuras 16 e 20). No grupo pré-tratado com vimblastina, esta banda foi de baixa intensidade (Figura 24).

## PRANCHA 4

FIGURAS 13 - 16 Radioautogramas dos odontoblastos da região secretora de incisivos inferiores de camundongos, em diferentes intervalos de tempo, após a injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio, corados com azul de metileno a 1%.

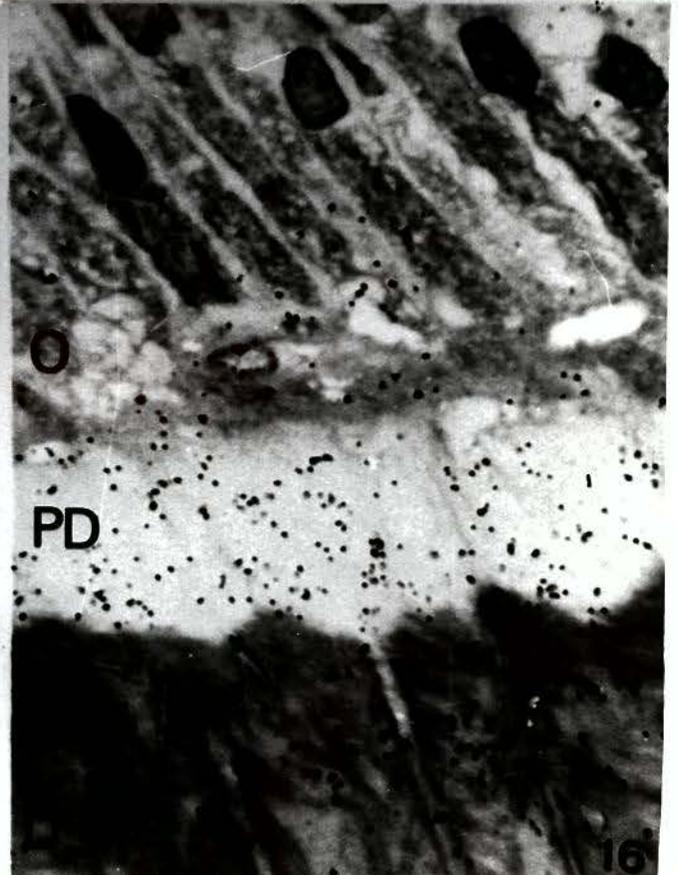
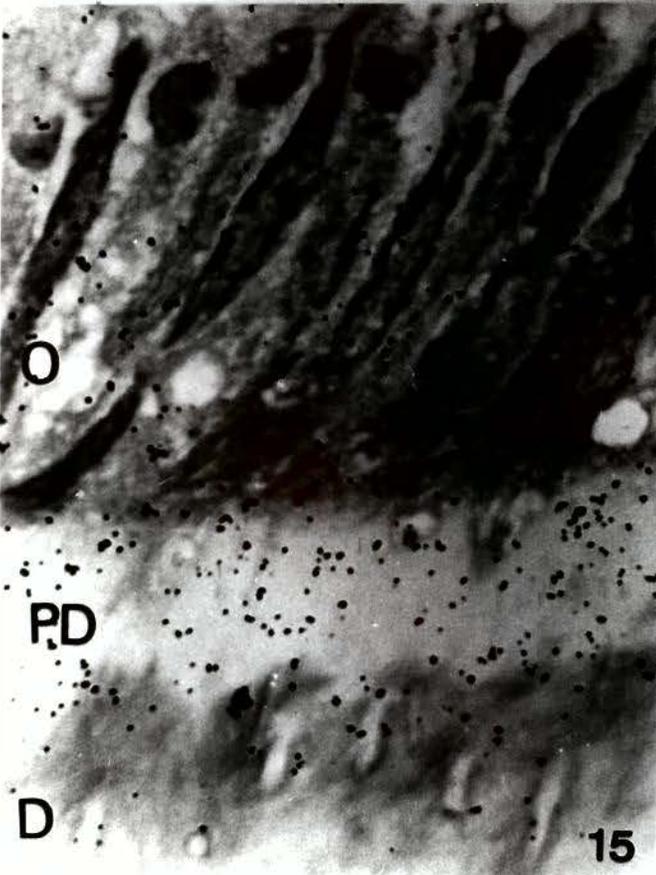
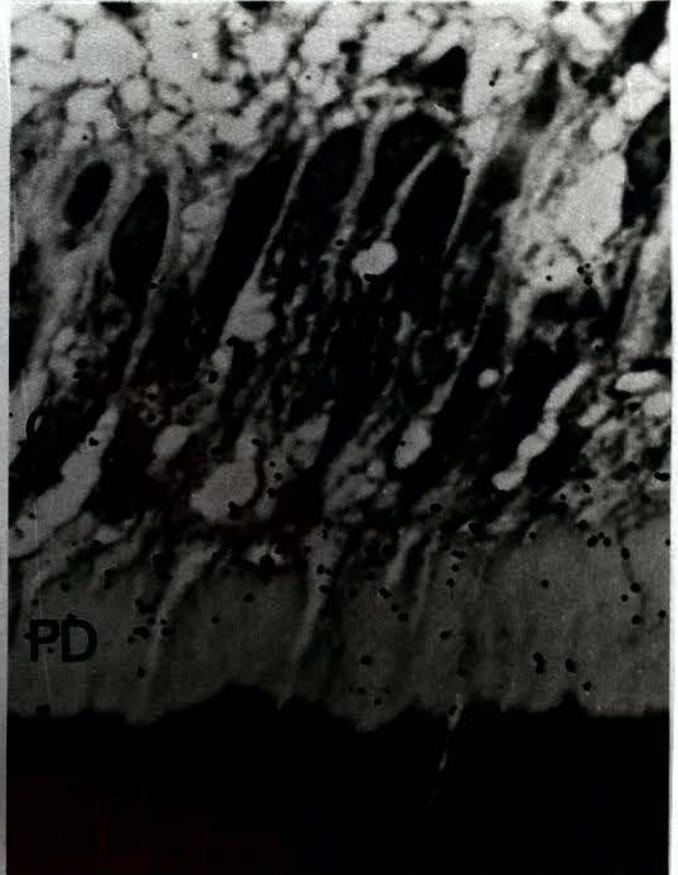
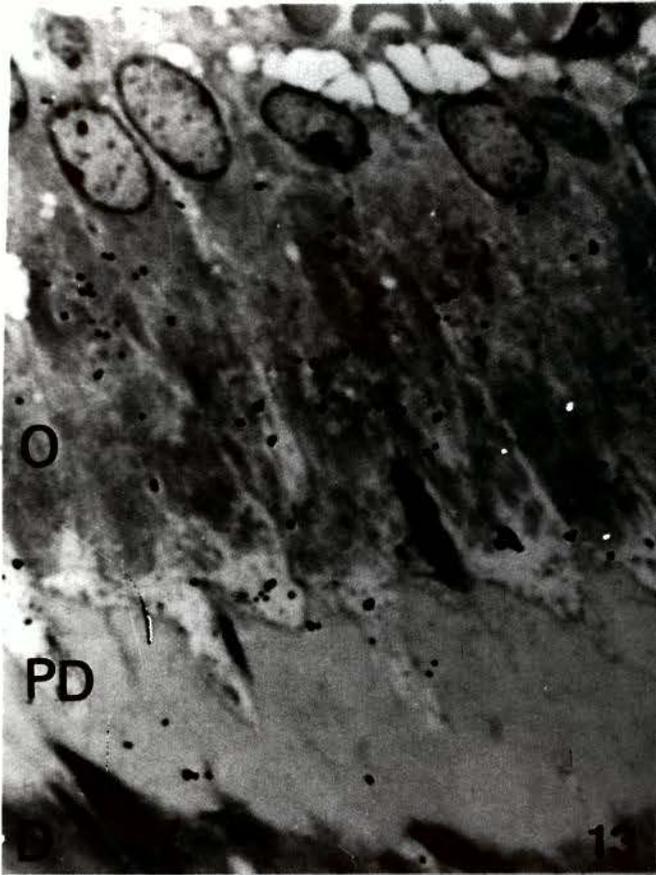
1310 x.

FIGURA 13 Após 10 minutos da injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio, observou-se reação radioautográfica na região supranuclear dos odontoblastos, correspondente à área do Golgi, indicando deste modo, o local da biossíntese do composto sulfatado. Alguns grãos de Ag foram observados na pré-dentina.

FIGURA 14 Após 30 minutos da administração do composto radioativo, notou-se uma concentração de grãos de Ag já nos prolongamentos odontoblasticos e pré-dentina adjacente, refletindo secreção do composto sulfatado.

FIGURA 15 Após 2 h da injeção do precursor radioativo, verificou-se distribuição mais intensa de grãos de Ag sobre a pré-dentina e menor intensidade no terço inicial da dentina. O citoplasma dos odontoblastos ainda se apresentou radioativo.

FIGURA 16 Após 24 h da injeção, observou-se radioatividade na pré-dentina e dois terços da dentina. No citoplasma dos odontoblastos, a reação foi praticamente nula. Isto demonstrou que o composto sulfatado sintetizado foi transportado, formando componentes da matriz orgânica da dentina.



## PRANCHA 5

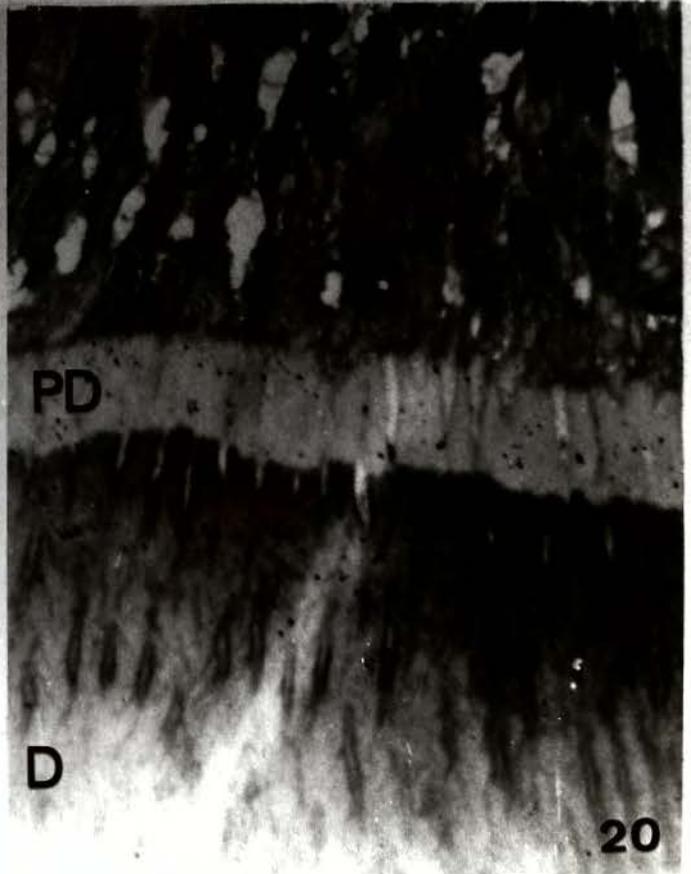
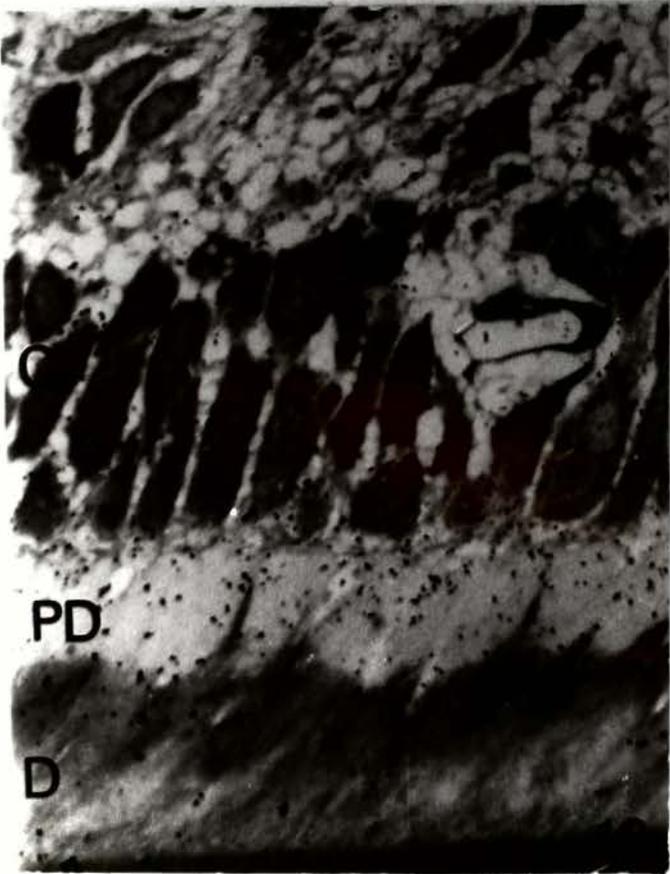
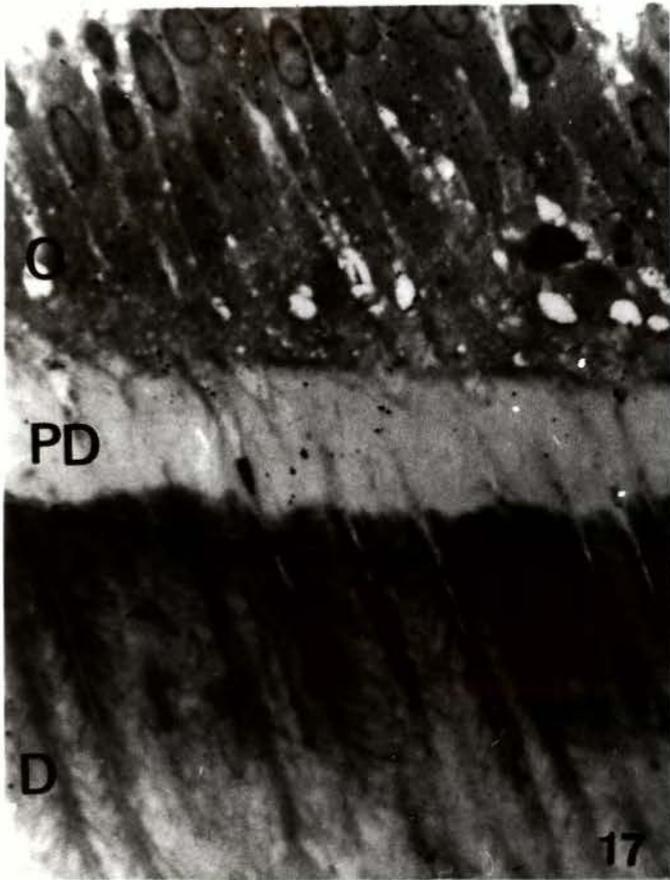
FIGURAS 17 - 20 Radioautogramas dos odontoblastos da região secretora de incisivos inferiores de camundongos, pré-tratados durante 2 h com colchicina, sacrificados em diferentes intervalos de tempo após a administração do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio e corados com azul de metileno a 1%. (Pequenas alterações morfológicas observadas desde 10 min até 24 h).  
820 x.

FIGURA 17 Após 10 minutos da injeção do sulfato radioativo, observou-se reação radioautográfica no terço correspondente à área de Golgi da região supranuclear dos odontoblastos. Alguns grãos de Ag foram observados na pré-dentina.

FIGURA 18 Após 30 minutos da injeção do composto radioativo, verificou-se, além da reação radioativa na região supranuclear dos odontoblastos, fraca concentração de grãos de Ag nos prolongamentos odontoblásticos, já alcançando a pré-dentina adjacente.

FIGURA 19 Após 2 h da injeção do precursor radioativo, verificou-se que a distribuição de grãos de Ag sobre a pré-dentina e um terço da dentina foi mais concentrada, enquanto permaneceu reação radioativa na região supranuclear dos odontoblastos, indicando acúmulo de radioatividade no interior da célula.

FIGURA 20 Após 24 h da injeção, a reação radioativa na região supranuclear dos odontoblastos foi praticamente nula, enquanto a radioatividade continuou na pré-dentina e 2 terços da dentina adjacentes.



## PRANCHA 6

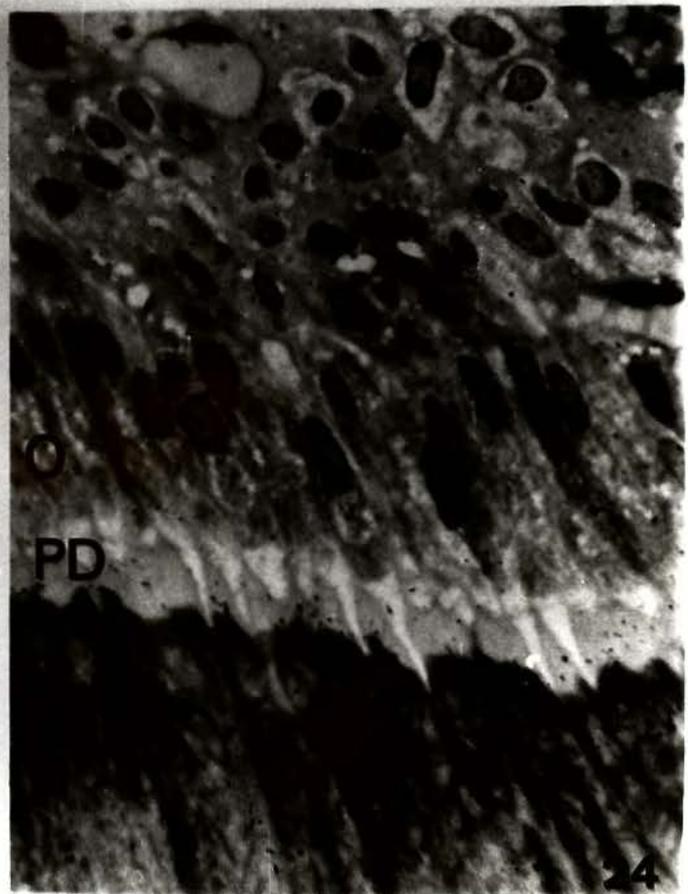
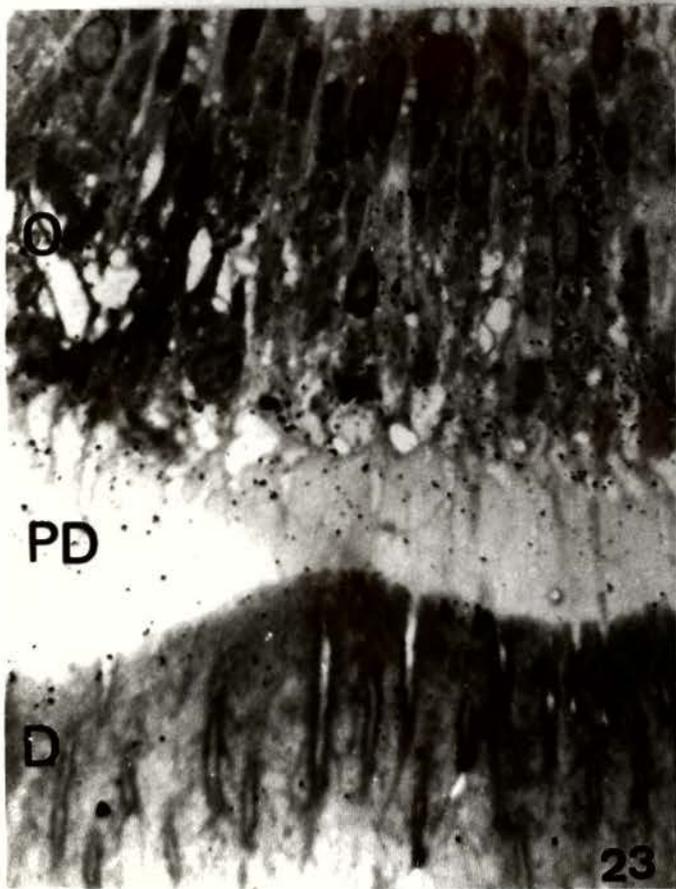
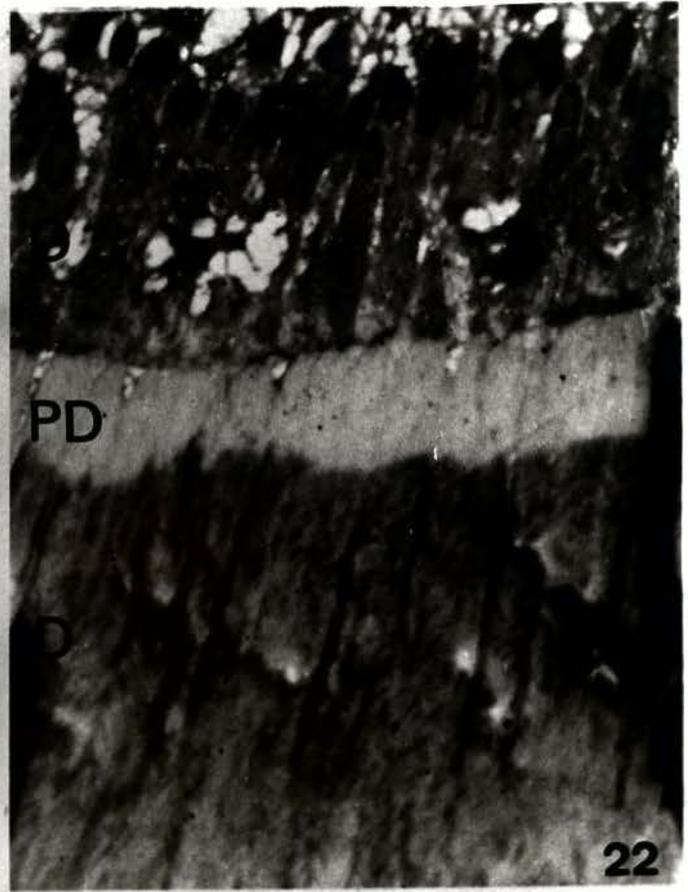
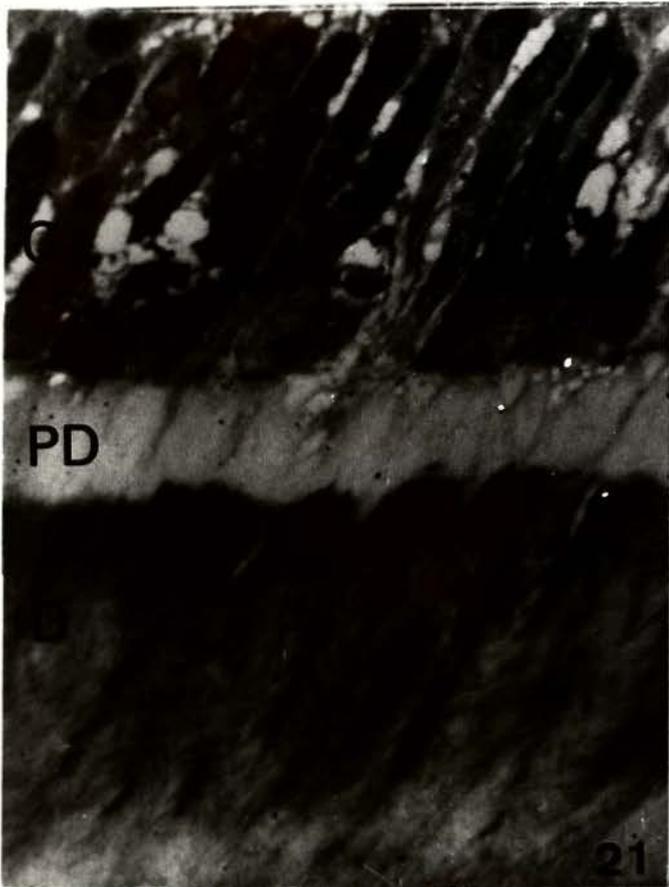
FIGURAS 21 - 24 Radioautogramas dos odontoblastos da região secretora de incisivos inferiores de camundongos, pré-tratados durante 3 h com vimblastina, sacrificados em diferentes intervalos de tempo após a administração do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio e corados com azul de metileno a 1%. (Pequenas alterações morfológicas observadas desde 10 min até 24 h).  
820 x.

FIGURA 21 Após 10 minutos da injeção do sulfato radioativo, observou-se fraca radioatividade na região supranuclear dos odontoblastos, correspondente à área do Golgi. A reação na pré-dentina foi praticamente nula.

FIGURA 22 Após 30 minutos da injeção do composto radioativo, notou-se ainda fraca radioatividade na região supranuclear dos odontoblastos. Na pré-dentina, a radioatividade foi praticamente nula.

FIGURA 23 Após 2 h da injeção do precursor radioativo, houve maior concentração de grãos de Ag na região supranuclear dos odontoblastos, bem como, reação radioativa nos prolongamentos odontoblásticos, na pré-dentina e um terço da dentina.

FIGURA 24 Após 24 h da injeção, a radioatividade na região supranuclear dos odontoblastos foi praticamente nula, enquanto continuou reação na pré-dentina e 2 terços da dentina adjacentes.



3. ANÁLISE QUANTITATIVA DA INCORPORAÇÃO DE  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 

3.1 Valores médios da contagem de grãos de Ag sobre a região supranuclear dos ameloblastos e matriz do esmalte da zona de secreção do esmalte interno.

Estas contagens foram feitas em 3 radioautogramas de cada animal, obtendo-se os valores médios de contagem, por unidade de área, os quais são apresentados nas tabelas 1 e 2.

TABELA 1 - Concentração de grãos de Ag em  $100\mu\text{m}^2$ , sobre a região supranuclear de ameloblastos de incisivos de camundongos tratados com colchicina e vimblastina, vários tempos após a administração do  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ .

| TEMPO (min) | CONTROLE | CLC   | VBL   |
|-------------|----------|-------|-------|
| 10          | 3,00 (*) | 5,80  | 1,70  |
|             | 4,50     | 6,30  | 2,10  |
|             | 4,90     | 7,80  | 3,20  |
| 30          | 8,10     | 10,40 | 7,50  |
|             | 9,10     | 10,90 | 9,10  |
|             | 11,00    | 12,10 | 9,80  |
| 120         | 4,80     | 17,00 | 13,20 |
|             | 5,00     | 18,90 | 13,60 |
|             | 6,20     | 23,10 | 13,70 |

(\*) Os valores representam a média de todas as áreas contadas em cada radioautograma.

TABELA 2 - Concentração de grãos de Ag em  $100\mu\text{m}^2$ , sobre a extensão da matriz do esmalte da zona de secreção do esmalte interno de incisivos de camundongos, tratados com colchicina e vimblastina, vários tempos após a administração do  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ .

| TEMPO (min) | CONTROLE | CLC   | VBL  |
|-------------|----------|-------|------|
| 10          | 1,10     | 2,60  | 0,10 |
|             | 1,90     | 2,40  | 0,50 |
|             | 1,10     | 2,80  | 0,20 |
| 30          | 15,70    | 8,60  | 0,50 |
|             | 17,40    | 9,10  | 0,70 |
|             | 15,10    | 10,00 | 1,00 |
| 120         | 24,00    | 21,10 | 2,00 |
|             | 23,20    | 20,00 | 1,50 |
|             | 24,70    | 19,70 | 1,30 |

Estes dados foram submetidos a um tratamento estatístico e, após a extração da raiz quadrada, foi aplicada uma análise de variância em modelo hierárquico, conforme mostram as tabelas 3 e 4.

TABELA 3 - Análise de variância, em modelo hierárquico, para os dados apresentados na tabela 1.

| CAUSAS DE VARIAÇÃO | GL | SQ        | QM       | F     |
|--------------------|----|-----------|----------|-------|
| Tempos             | 2  | 10,047040 | 5,02352  |       |
| Drogas ( 10 min)   | 2  | 1,674862  | 0,837431 | 17,53 |
| Drogas ( 30 min)   | 2  | 0,224492  | 0,112246 | 2,35  |
| Drogas (120 min)   | 2  | 6,931712  | 3,465856 | 72,56 |
| Resíduo            | 18 | 0,859693  | 0,047761 |       |

TABELA 4 - Análise de variância, em modelo hierárquico, para os dados apresentados na tabela 2.

| CAUSAS DE VARIAÇÃO | GL | SQ        | QM        | F      |
|--------------------|----|-----------|-----------|--------|
| Tempos             | 2  | 27,929029 | 13,964515 |        |
| Drogas ( 10 min)   | 2  | 1,909772  | 0,954886  | 50,92  |
| Drogas ( 30 min)   | 2  | 15,709059 | 7,854530  | 418,90 |
| Drogas (120 min)   | 2  | 23,879974 | 11,939987 | 636,79 |
| Resíduo            | 18 | 0,337504  | 0,018750  |        |

Com base nos valores F apresentados nas tabelas 3 e 4, verificou-se diferença significativa ao nível de 5% nas contagens médias de grãos de Ag, de animais submetidos a diferentes drogas, nos três tempos de sacrifício.

Para melhor expressar essas afirmativas, são apresentadas, nas tabelas 5 e 6, as médias da raiz quadrada dos valores médios de contagem de grãos de Ag, relativas a cada tempo e a cada droga.

TABELA 5 - Média da raiz quadrada dos valores constantes da tabela 1.

| TEMPO (min) | CONTROLE | CLC  | VBL  |
|-------------|----------|------|------|
| 10          | 2,02(*)  | 2,57 | 1,51 |
| 30          | 3,06     | 3,33 | 2,96 |
| 120         | 2,30     | 4,42 | 3,67 |

(\*) Cada valor representa a média das raízes quadradas dos valores para cada tempo provenientes da tabela 1. Diferença mínima significativa é de 0,46.

TABELA 5 - Média da raiz quadrada dos valores constantes da tabela 2.

| TEMPO (min) | CONTROLE | CLC  | VBL  |
|-------------|----------|------|------|
| 10          | 1,16(*)  | 1,61 | 0,50 |
| 30          | 4,01     | 3,04 | 0,90 |
| 120         | 4,90     | 4,50 | 1,30 |

(\*) Cada valor representa a média das raízes quadradas dos valores para cada tempo provenientes da tabela 2. Diferença mínima significativa 0,29.

Para comparar essas médias, procedeu-se ao teste de Tukey, ao nível de 5%, cujos cálculos forneceram 0,46 e 0,29, para ameloblastos e matriz do esmalte, respectivamente.

Baseando-se nas diferenças mínimas significantes, pôde-se afirmar que :

*nos ameloblastos,*

Aos 10 e 120 minutos, as contagens médias de grãos de Ag para animais tratados com colchicina foram maiores do que as contagens médias obtidas para animais do grupo controle, bem como para os animais tratados com vimblastina (CLC>controle>VBL);

Aos 10 minutos, as contagens médias para animais do grupo controle foram maiores em relação às contagens médias de grãos de Ag para animais tratados com vimblastina (controle>VBL);

Aos 120 minutos, as contagens médias de grãos de Ag referentes aos radioautogramas de animais tratados com vimblastina, foram maiores do que aquelas obtidas para animais do grupo controle (VBL>controle);

Aos 30 minutos, não houve diferença significativa entre as contagens médias de grãos de Ag dos radioautogramas de animais do grupo controle e pré-tratados com colchicina e vimblastina.

*na matriz do esmalte:*

Aos 10 minutos, as contagens médias de grãos de Ag para radioautogramas de animais tratados com colchicina foram maiores do que aquelas obtidas de animais do grupo controle e do grupo da vimblastina (CLC>controle>VBL).

Aos 30 e 120 minutos, as contagens médias de grãos de Ag para radioautogramas de animais do grupo controle foram maiores em relação às contagens médias obtidas para animais tratados com colchicina e vimblastina (controle>CLC>VBL). As contagens médias de grãos de Ag para radioautogramas de animais tratados com colchicina foram maiores do que aquelas para animais tratados com vimblastina.

Aos 10 minutos, as contagens médias de grãos de Ag para animais do grupo controle foram maiores do que aquelas obtidas de animais tratados com vimblastina (controle>VBL).

3.2 Valores médios da contagem de grãos de Ag sobre a região supranuclear dos odontoblastos, pré-dentina e dentina.

As contagens foram feitas, em 3 radioautogramas de cada animal, obtendo-se os valores médios de contagem, por unidade de área, os quais são apresentados nas tabelas 7, 8 e 9.

TABELA 7 - Concentração de grãos de Ag em  $100\mu\text{m}^2$ , sobre a região supranuclear de odontoblastos de incisivos de camundongos tratados com colchicina e vimblastina, vários tempos após a administração do  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ .

| TEMPO (min) | CONTROLE | CLC   | VBL  |
|-------------|----------|-------|------|
| 10          | 2,10(*)  | 3,60  | 1,70 |
|             | 2,20     | 4,00  | 1,80 |
|             | 2,40     | 3,80  | 2,00 |
| 30          | 3,10     | 4,90  | 3,00 |
|             | 3,60     | 5,30  | 3,80 |
|             | 3,70     | 6,20  | 4,10 |
| 120         | 3,80     | 7,50  | 6,10 |
|             | 4,00     | 9,00  | 7,00 |
|             | 4,60     | 10,70 | 9,40 |

(\*) Cada valor representa a média de todas as áreas contadas em cada radioautograma.

TABELA 8 - Concentração de grãos de Ag em  $100\mu\text{m}^2$ , sobre a extensão da pré-dentina de incisivos de camundongos, tratados com colchicina e vimblastina, vários tempos após a administração do  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ .

| TEMPO (min) | CONTROLE | CLC   | VBL  |
|-------------|----------|-------|------|
| 10          | 0,60     | 1,20  | 0,30 |
|             | 0,40     | 1,80  | 0,40 |
|             | 0,30     | 1,60  | 0,40 |
| 30          | 5,90     | 6,70  | 0,70 |
|             | 4,80     | 8,70  | 0,70 |
|             | 5,10     | 8,50  | 1,00 |
| 120         | 11,30    | 10,40 | 6,00 |
|             | 10,40    | 9,90  | 7,40 |
|             | 10,50    | 9,60  | 8,50 |

TABELA 9 - Concentração de grãos de Ag em  $100\mu\text{m}^2$ , sobre a extensão da dentina de incisivos de camundongos, tratados com colchicina e vimblastina, vários tempos após a administração do  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ .

| TEMPO (min) | CONTROLE | CLC  | VBL  |
|-------------|----------|------|------|
| 10          | 0,50     | 0,30 | 0,20 |
|             | 0,20     | 0,40 | 0,20 |
|             | 0,10     | 0,80 | 0,20 |
| 30          | 0,70     | 1,10 | 0,30 |
|             | 0,70     | 1,50 | 1,00 |
|             | 0,80     | 1,90 | 0,70 |
| 120         | 3,50     | 2,30 | 1,00 |
|             | 1,70     | 2,80 | 1,80 |
|             | 2,50     | 2,90 | 2,10 |

Após o processamento estatístico, os cálculos foram lançados nas tabelas 10, 11 e 12.

TABELA 10 - Análise de variância, em modelo hierárquico, para os dados apresentados na tabela 7.

| CAUSAS DE VARIAÇÃO | GL | SQ       | QM       | F     |
|--------------------|----|----------|----------|-------|
| Tempos             | 2  | 4,419770 | 2,209885 |       |
| Drogas ( 10 min)   | 2  | 0,581678 | 0,290839 | 11,18 |
| Drogas ( 30 min)   | 2  | 0,414717 | 0,207358 | 7,97  |
| Drogas (120 min)   | 2  | 1,504875 | 0,752437 | 28,94 |
| Resíduo            | 18 | 0,468056 | 0,026003 |       |

TABELA 11 - Análise de variância, em modelo hierárquico, para os dados apresentados na tabela 8.

| CAUSAS DE VARIAÇÃO | GL | SQ        | QM        | F      |
|--------------------|----|-----------|-----------|--------|
| Tempos             | 2  | 22,052831 | 11,026415 |        |
| Drogas ( 10 min)   | 2  | 0,738076  | 0,369038  | 41,63  |
| Drogas ( 30 min)   | 2  | 5,952543  | 2,976272  | 335,76 |
| Drogas (120 min)   | 2  | 0,564142  | 0,282071  | 31,82  |
| Resíduo            | 18 | 0,319115  | 0,017729  |        |

TABELA 12 - Análise de variância, em modelo hierárquico, para os dados apresentados na tabela 9.

| CAUSAS DE VARIAÇÃO | GL | SQ       | QM       | F    |
|--------------------|----|----------|----------|------|
| Tempos             | 2  | 4,472764 | 2,236382 |      |
| Drogas ( 10 min)   | 2  | 0,102082 | 0,051041 | 1,86 |
| Drogas ( 30 min)   | 2  | 0,312876 | 0,156438 | 5,71 |
| Drogas (120 min)   | 2  | 0,098508 | 0,049254 | 1,80 |
| Resíduo            | 18 | 0,492824 | 0,027379 |      |

Com base nos valores F apresentados nas tabelas 10, 11 e 12, verificou-se diferença significativa ao nível de 5% nas contagens médias de grãos de Ag, de animais tratados com colchicina e vimblastina, nos vários tempos após a administração do  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ .

Para melhor expressar essas afirmativas, são apresentadas nas tabelas 13, 14 e 15, as médias das raízes quadradas dos valores médios da contagem de grãos de Ag, relativas a cada tempo e a cada droga para odontoblastos, pré-dentina e dentina.

TABELA 13 - Média da raiz quadrada dos valores constantes da tabela 7.

| TEMPO (min) | CONTROLE | CLC  | VBL  |
|-------------|----------|------|------|
| 10          | 1,49(*)  | 1,95 | 1,35 |
| 30          | 1,86     | 2,34 | 1,90 |
| 120         | 2,03     | 3,00 | 2,73 |

(\*) Cada valor representa a média das raízes quadradas dos valores, para cada tempo, provenientes da tabela 7. Diferença mínima significativa 0,34.

TABELA 14 - Média da raiz quadrada dos valores constantes da tabela 8.

| TEMPO (min) | CONTROLE | CLC  | VBL  |
|-------------|----------|------|------|
| 10          | 0,65(*)  | 1,23 | 0,60 |
| 30          | 2,30     | 2,81 | 0,89 |
| 120         | 3,28     | 3,16 | 2,70 |

(\*) Cada valor representa a média das raízes quadradas dos valores, para cada tempo, provenientes da tabela 8. Diferença mínima significativa 0,28.

TABELA 15 - Média da raiz quadrada dos valores constantes da tabela 9.

| TEMPO (min) | CONTROLE | CLC  | VBL  |
|-------------|----------|------|------|
| 10          | 0,40(*)  | 0,69 | 0,45 |
| 30          | 0,86     | 1,22 | 0,79 |
| 120         | 1,59     | 1,63 | 1,39 |

(\*) Cada valor representa a média das raízes quadradas dos valores, para cada tempo, provenientes da tabela 9. Diferença mínima significativa 0,34.

Para comparar essas médias, foi utilizado o teste de Tukey, ao nível de 5% e os cálculos fornecidos para odontoblastos, pré-dentina e dentina foram 0,34, 0,28 e 0,34. Com base nestes valores, afirmou-se que:

*nos odontoblastos,*

Aos 10 e 30 minutos, as contagens médias de grãos de Ag para animais tratados com colchicina foram maiores do que as contagens médias de grãos de Ag encontradas para animais do grupo controle, assim como para animais tratados com vimblastina (CLC>controle>VBL).

Aos 120 minutos, as contagens médias para animais tratados com colchicina foram maiores em relação às daquelas do grupo controle (CLC>controle). Também se verifica que, aos 120 minutos, as contagens médias para animais tratados com vimblastina foram maiores do que as contagens médias obtidas para o grupo controle (VBL>controle).

*Na pré-dentina,*

Aos 10 e 30 minutos, as contagens de grãos de Ag, para animais tratados com colchicina foram maiores do que aquelas encontradas para animais do grupo controle, e para animais pré-tratados com vimblastina (CLC > controle > VBL).

Aos 120 minutos, enquanto não houve diferença significativa entre os grupos controle e pré-tratado com colchicina, as contagens médias de grãos de Ag para animais do grupo tratado com colchicina foram maiores do que aquelas obtidas para animais tratados com vimblastina (CLC > VBL). Também, as contagens médias de grãos de Ag para animais do grupo controle, aos 30 e 120 minutos, foram maiores do que as obtidas para o grupo tratado com a vimblastina (controle > VBL).

*Na dentina,*

Aos 10 e 120 minutos não houve diferença significativa entre as contagens médias de grãos de Ag para os três grupos.

Aos 30 minutos, as contagens médias de grãos de Ag para animais tratados com colchicina foram maiores do que aquelas obtidas para animais do grupo controle e tratado com vimblastina (CLC > controle > VBL). Entre o grupo controle e o pré-tratado com vimblastina não houve diferença significativa.

## DISCUSSÃO

É sabido que, tanto a colchicina, quanto a vimblastina provocam dissolução e rompimento dos microtúbulos. Estas drogas, além da inibição do aparelho mitótico, atuam em um grande número de diferentes funções celulares que são dependentes, direta ou indiretamente, destes elementos (WILSON et alii., 1974). A colchicina se liga às subunidades proteicas dos microtúbulos, reversivelmente, causando rompimento dos arranjos duplo-espirais dessas estruturas (BORISY & TAYLOR, 1967). A vimblastina se liga às subunidades da tubulina, impedindo a polimerização de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina, em microtúbulos (BRYAN, 1974).

De uma maneira geral, colchicina e vimblastina inibem temporariamente o processo secretor de células que estão ativamente sintetizando proteínas. Deste modo, ambas mostraram ser capazes, em meio de cultura, de inibir a secreção da insulina das células beta das ilhotas de Langerhans de ratos (LACY et alii., 1968; MOSKALEWSKI et alii., 1976); a liberação dos grânulos de histamina produzida pelos leucócitos humanos (LEVY & CARLTON, 1969); secreção da tireóide de camundongos (WILLIAMS & WOLF, 1972); a conversão do procolágeno em colágeno, isto é, inibir a síntese e secreção do colágeno (EHRlich et alii., 1974); a secreção de condrócitos (MOSKALEWSKI et alii., 1975), a secreção da amilase pela glândula parótida de rato, in vivo e in vitro (PATZELT et alii., 1977); a secreção de osteoblastos de embrião de pinto (THYBERG et alii., 1978) e ainda a secreção de células mamárias em lactação de cabra e de rata (KNUDSON et alii., 1978).

Alguns desses trabalhos relataram alterações na estrutura do aparelho de Golgi, e que a dissolução e rompimento dos microtúbulos provocados pela colchicina e vimblastina parecem interferir no movimento trans-

celular das vesículas derivadas do Golgi, resultando em um acúmulo do produto secretor, e posteriormente conduzindo a uma inibição da síntese (EHRLICH et alii., 1974; MOSKALEWSKI et alii., 1975; 1976; THYBERG et alii., 1978).

Por outro lado, é fato comprovado que a incorporação celular do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio demonstrada por radioautografia, revela a síntese de compostos sulfatados, e que a mesma se processa no aparelho de Golgi (OTERO-VILARDEBÓ et alii., 1964; PETERSON & LEBLOND, 1964; BLUMEN, 1970; BLUMEN & MERZEL, 1973; 1976). Contudo, em quantidades mínimas, este composto radioativo pode, também participar na síntese de aminoácidos sulfatados (DZIEWIATKOWSKY, 1954; KULWICH et alii., 1954).

Os primeiros trabalhos que demonstraram ser o aparelho de Golgi o local de síntese da fração carboidrática e da sulfatação de glicosaminoglicans (PETERSON & LEBLOND, 1964; OTERO-VILARDEBÓ et alii., 1964), foram posteriormente confirmados em vários tipos celulares, tais como células caliciformes (NEUTRA & LEBLOND, 1969), ameloblastos (BLUMEN, 1970; WEINSTOCK & LEBLOND, 1971; BLUMEN & MERZEL, 1973; 1976), odontoblastos (WEINSTOCK et alii., 1972) e osteoblastos (WEINSTOCK, 1979).

No presente trabalho, os resultados radioautográficos apresentados nas tabelas 5 e 13 demonstraram que, tanto os ameloblastos como os odontoblastos do incisivo inferior de camundongo, foram hábeis em incorporar o sulfato radioativo, aos 10 minutos da injeção, na região supranuclear, correspondente à zona do Golgi, nos três grupos experimentais. Após o tratamento com as drogas citostáticas usadas, a vimblastina mostrou uma concentração de grãos de Ag menor, indicando um maior grau de inibição provocado por esta droga, na biossíntese celular da fração sulfatada, quando comparada com os grupos da colchicina e o controle. Este padrão foi observado nos tempos seguintes, até a segunda hora após a injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio.

Estes dados revelam, que apesar de EHRLICH et alii., (1974); MOSKALEWSKI et alii., (1975, 1976); THYBERG et alii., (1978) terem verificado alterações nas vesículas de Golgi sob a ação da colchicina e da vimblastina, estas alterações pareceram não ser capazes de inibir totalmente a biossíntese de compostos sulfatados.

As tabelas 5 e 13 mostraram ainda que, aos 10 e 120 minutos, a contagem média de grãos de Ag nos ameloblastos dos animais tratados com colchicina foi maior que a dos grupos controle e pré-tratado com vimblastina. Aos 30 minutos, não houve diferença significativa na contagem média de grãos de Ag entre os três grupos. Com relação aos odontoblastos nos animais tratados com colchicina, a contagem média de grãos de Ag aos 10 e 30 minutos, foi maior que a dos grupos controle e do pré-tratado com vimblastina. Aos 120 minutos não houve diferença significativa entre colchicina e vimblastina, embora ambas tenham apresentado uma contagem média de grãos de Ag maior que a do grupo controle.

Estes dados, sugerem que existe uma diferença na atuação das drogas antimicrotubulares. Com efeito, os ameloblastos foram mais sensíveis (tabela 5 e 13; figuras 5 a 12), no tocante à inibição pela vimblastina (menor concentração de grãos de Ag), enquanto que, nos odontoblastos a ação da colchicina e da vimblastina se mostraram praticamente semelhantes (figuras 17 a 24).

Por outro lado, analisando-se isoladamente os dados quantitativos dos radioautogramas dos três grupos, nos diferentes tempos de duração do experimento, pôde-se deduzir que, de maneira geral, houve concentração progressiva de grãos de Ag nos citoplasmas dos ameloblastos e odontoblastos dos grupos pré-tratados com colchicina e vimblastina, estando portanto de acordo com EHRLICH et alii., (1974), MOSKALEWSKI et alii., (1975, 1976), THYBERG et alii., (1978).

Apesar de a colchicina ter acumulado maior radioatividade dentro da região supranuclear dos ameloblastos e dos odontoblastos (quando comparada com o grupo controle), as células exportaram material formador das matrizes do esmalte e da dentina, dentro da faixa de atuação desta droga, que correspondeu a quatro horas, após a sua administração. Pela análise da concentração de grãos de Ag nas matrizes do esmalte e da dentina, esta afirmativa revela que os ameloblastos e os odontoblastos secretores necessitaram um tempo maior para exportar o produto secretor, resultados estes que podem ser verificados nas tabelas 5 e 13 e nas figuras de 5 a 8 e de 17 a 20.

Com relação à vimblastina, esta droga praticamente concentrou toda a radioatividade dentro do citoplasma supranuclear dos ameloblastos e dos odontoblastos até a segunda hora após a injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio, que correspondeu a cinco horas após a sua administração. Sua ação foi mais pronunciada nos ameloblastos, onde a secreção do produto exportável, formador da matriz do esmalte, foi menor quando comparada com os odontoblastos (tabelas 5 e 13; figuras 9 a 12, 21 a 24), indicando por conseguinte, uma maior retenção do produto previamente sintetizado no aparelho de Golgi.

Deste modo, pôde-se afirmar, que o período de inibição das drogas, dentro do tempo de ação das mesmas, refletido pelo acúmulo de radioatividade no interior das células, foi transitório nos ameloblastos e nos odontoblastos pré-tratados com colchicina. Os ameloblastos dos animais pré-tratados com vimblastina foram mais afetados pela droga. Conseqüentemente, a inibição do produto secretor é reflexo de uma alteração celular profunda e de caráter morfológico que parece ter sido irreversível. Estas alterações serão discutidas mais adiante.

De qualquer forma, essas células após o tratamento com as drogas antimicrotubulares, foram capazes de sintetizar compostos sulfatados na forma de glicosaminoglicans, e provavelmente na forma de complexos proteoglicans (EMBERY, 1974), embora em concentrações diferentes, quando comparadas com o grupo controle, apesar de, essas drogas serem capazes de inibir, temporariamente, ambos os tipos celulares. Posteriormente o produto elaborado foi secretado com maior ou menor grau de concentração para o meio extracelular para formar as matrizes do esmalte e da dentina. Estes resultados são parcialmente concordantes com o preconizado por KUDO (1975), que estudando radioautograficamente o efeito da colchicina sobre a secreção das matrizes do esmalte e da dentina, em incisivo superior de rato, após a administração de prolina tritiada, afirmou que a droga não interferiu na incorporação deste precursor, nem na síntese proteica, mas afetou a secreção da matriz pelos ameloblastos e odontoblastos secretores. Os resultados apresentados no presente trabalho, mostraram que houve incorporação do sulfato após o tratamento com as drogas usadas, embora a velocidade desta incorporação, medida pela concentração de grãos de Ag, intracelularmente, tenha variado. Da mesma maneira, KARIM & WARSHAWSKY (1979) estudando o efeito da colcemide, um derivado da colchicina, e GOLDBERG et alii., (1979) estudando o efeito da vimblastina, presenciaram através de radioautogramas, o acúmulo transitório da radioatividade dentro da célula, resultando numa inibição temporária da secreção.

Os resultados radioautográficos, estão em concordância com as alterações morfológicas observadas nos ameloblastos e nos odontoblastos pré-tratados com colchicina e vimblastina, ao nível da microscopia óptica, onde os ameloblastos demonstraram ser, morfológicamente, mais sensíveis, que os odontoblastos, à ação, principalmente, da vimblastina (figuras 5 a 12; 17 a 24).

Com efeito, cinco horas após a administração da vimblastina, ou seja, duas horas após a injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio, os ameloblastos e odontoblastos secretores apresentaram vacúolos e espaços intercelulares, bem como, deslocamento de alguns núcleos para o centro da célula (figuras 9 a 11, 21 a 23). Os ameloblastos secretores se mostraram extremamente vulneráveis ao efeito cáotico da vimblastina, isto é, se apresentaram totalmente abalados, desorganizados e degenerados, 27 horas após a injeção da droga (o que correspondeu a 24 horas após a injeção do composto radioativo). Neste período, os ameloblastos perderam suas formas de células altas, polarizadas e se tornaram células pequenas e arredondadas com pequenos núcleos (figura 12). Os processos de Tomes apareceram de forma irregular, demonstrando terem perdido suas inclinações normais, levando-se a crer que, os ditos prolongamentos foram extremamente sensíveis à ação da vimblastina, o mesmo ocorrendo com a matriz adamantina (figura 12). Esses relatos são concordantes com MOE & MIKKELSEN (1977), que observaram o efeito da vimblastina sobre os ameloblastos de incisivo de rato e demonstraram que os ameloblastos secretores são profundamente afetados pela vimblastina, que causa a redução e morte da maioria das células.

Na camada odontoblástica secretora, no período de 27 horas após a administração da vimblastina, não houve desorganização total ao nível da microscopia óptica, como o ocorrido na camada ameloblástica. Constataram-se apenas, alterações envolvendo vacúolos, espaços intercelulares e deslocamento de núcleos para o centro ou parte distal da célula (figura 24). Esses resultados são condizentes com aqueles encontrados por MIKKELSEN (1978) e STENE (1978), que estudando os efeitos da vimblastina e vincristina sobre odontoblastos de incisivo de rato, notaram alterações envolvendo desorganização celular e deslocamento de núcleos, no período compreendido entre 6 e 24 horas.

Morfologicamente, as células pré-tratadas com colchicina, apresentaram comportamento semelhante àquele da vimblastina, ocorrido até a quinta hora após a sua administração, isto é, vacúolos e espaços intercelulares, conforme observado nas figuras 5 a 8 e 17 a 20, contudo, com intensidade consideravelmente mais baixa.

Com relação à secreção de material exportável, os resultados constatados no presente estudo demonstraram que, decorridos 10 minutos da injeção do composto radioativo, no grupo controle a reação radioautográfica já estava presente no ápice dos ameloblastos e nos seus processos de Tomes, bem como nos prolongamentos odontoblásticos, já alcançando as matrizes do esmalte e da dentina adjacentes (figuras 2 e 3, 14 e 15). No entanto, a concentração radioativa aumentou a partir dos 30 minutos, após a injeção do  $^{35}\text{S}$ -sulfato de sódio. Estes dados podem ser explicados, como resultantes da energia da radiação emitida pelo sulfato radioativo nas imediações das matrizes do esmalte e da dentina, ou mesmo, como uma pequena secreção, possível de ser observada, em virtude da utilização de cortes semifinos neste estudo. Deste modo, para efeitos práticos, admitiu-se que o tempo máximo necessário para que o material sulfatado deixasse a célula, constituindo as matrizes do esmalte e da dentina, variou de 10 a 20 minutos. Este último tempo já havia sido observado em cortes espessos de molares de cobaia (BLUMEN, 1970; BLUMEN & MERZEL, 1976). Após 24 horas da injeção do precursor radioativo, observou-se radioatividade intensa sobre toda a espessura da matriz do esmalte, assim como, uma banda radioativa na pré-dentina e um terço da dentina (figuras 4 e 16), estando portanto de acordo com o descrito na Literatura.

A matriz do esmalte das células pré-tratadas com colchicina obteve um maior número de grãos de Ag em relação àquele da matriz do esmalte das células pré-

-tratadas com a vimblastina, embora diminuído em relação ao grupo controle, exceto aos 10 minutos após a injeção do composto radioativo (tabela 6). A pré-dentina apresentou maior concentração de grãos de Ag no grupo da colchicina em relação tanto àquele da vimblastina, quanto ao do controle, nos tempos de 10 e 30 minutos, enquanto aos 120 minutos não houve diferença significativa entre o grupo da colchicina e o controle. Na dentina, nos tempos de 10 e 120 minutos não houve diferença significativa entre os três grupos, enquanto aos 30 minutos o número de grãos de Ag do grupo pré-tratado com colchicina foi maior do que aquele do grupo controle e o da vimblastina (tabelas 14 e 15).

No período de 3 a 5 horas correspondente à ação da droga, as matrizes das células tratadas com vimblastina, permaneceram isentas de radioatividade, ou seja, nesse período, devido à ação da droga, as células foram capazes de bloquear o mecanismo de transporte do produto formado, mantendo dentro dos citoplasmas a maior parte do produto de secreção, conseqüentemente, são conseguindo liberá-lo, gradualmente, após o período entre a segunda e vigésima quarta hora após a injeção do composto radioativo.

De modo geral o processo de formação da matriz (esmalte e dentina) pareceu não sofrer influência das drogas, com exceção da matriz adamantina do grupo tratado com vimblastina, correspondente a 24 horas após a injeção do composto radioativo. Neste intervalo de tempo, a matriz do esmalte demonstrou, ao nível da microscopia óptica, uma área clara revelando pouca afinidade pelo corante, como afirma MOE & MIKKELSEN (1977), quando apontam as alterações que ocorreram nos ameloblastos, provocadas pela ação da vimblastina.

Estudos ultraestruturais realizados em ameloblastos secretores (MOE & MIKKELSEN, 1977), afirmam que, embora o mecanismo do efeito inibitório da vimblas-

tina sobre a biossíntese de produtos secretores não tenha sido completamente elucidado (isto é, se a inibição é um efeito indireto do rompimento dos microtúbulos, ou se a vimblastina interage diretamente com as etapas no complexo processo da biossíntese, envolvendo o retículo endoplasmático rugoso e o aparelho de Golgi), a vimblastina causa distúrbios dentro de duas maiores áreas nas células diferenciadas: um, envolvendo os microtúbulos citoplasmáticos e o outro, a biossíntese de macromoléculas. Sabe-se que as alterações provocadas pela ação da vimblastina estão associadas com o retículo endoplasmático rugoso e o aparelho de Golgi, resultando numa dilatação das cisternas do RER e dissolução do complexo de Golgi (EHRLICH, et alii., 1974; MOE & MIKKELSEN, 1977). Por outro lado, a colchicina parece atuar, dentro das células, provocando uma dilatação das vesículas associadas com o aparelho de Golgi (EHRLICH et alii., 1974).

Com relação à formação das matrizes do esmalte e da dentina, o processo pareceu ocorrer sem alteração, com excessão da matriz do esmalte do grupo tratado com vimblastina, no período correspondente a 24 horas após a injeção do composto radioativo, que ao nível da microscopia óptica, denotou pouca afinidade pelo azul de metileno, empregado como corante.

O presente trabalho mostrou-se eficaz em demonstrar que a biossíntese da fração sulfatada dos precursores das matrizes do esmalte e da dentina, que se processa respectivamente nos ameloblastos e odontoblastos, sofreu influências pelos mecanismos de ação da colchicina e vimblastina, com menor ou maior grau de inibição, conduzindo a um retardo desse material secretor dentro das células.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Para o estudo da biossíntese de compostos sulfatados, nos ameloblastos e odontoblastos, sob a influência da colchicina e vimblastina, foram usados 12 camundongos (M.musculus, albinus), machos, pesando entre 22 e 25 g. divididos em 3 grupos, de quatro animais cada. Um grupo serviu de controle, outro recebeu 0,1mg de colchicina e o último recebeu 0,2mg de vimblastina. Duas horas após a administração da colchicina e três horas após a vimblastina, todos os animais tratados e os do controle receberam uma única dose de 10 $\mu$ Ci/g de <sup>35</sup>S-sulfato de sódio e foram sacrificados após 10 e 30 minutos, 2 e 24 horas. Os incisivos inferiores dos animais fixados por perfusão com paraformaldeído a 4%, foram pós-fixados por imersão com glutaraldeído a 25%, descalcificados em EDTA a 4,13%, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, incluídos em EPON e submetidos a cortes de 1 $\mu$ m de espessura para microscopia óptica. Os espécimens foram radioautografados e após exposição de 31 dias, revelados, corados com azul de metileno a 1%, e submetidos à análise quantitativa.

Este estudo mostrou que os ameloblastos e os odontoblastos secretores, na presença da colchicina e da vimblastina, incorporaram o material radioativo, mas ocorreu um retardo no processo de biossíntese de compostos sulfatados.

Presume-se que o mencionado retardo na biossíntese de compostos sulfatados tenha ocorrido devido a uma dissociação dos microtúbulos decorrente do mecanismo de ação das drogas usadas, conduzindo a uma desagregação das estruturas do Golgi, impedindo o acondicio-

namento normal do material secretor neste local, do que resultou um acúmulo intracelular do produto, acúmulo este, que conduziu a uma inibição temporária da secreção.

Particularizando os resultados obtidos no presente trabalho, pôde-se verificar ainda que o acúmulo intracelular de compostos radioativos, provocado pela colchicina e vimblastina, conduzindo a um menor ou maior grau de inibição no transporte intracelular da secreção, talvez, tenha sido devido a dois fatores: um, a colchicina no interior dos ameloblastos e dos odontoblastos parece ter atuado na fase final do processo de sulfatação, onde o sulfato radioativo já deve ter sido acondicionado na forma de glicosaminoglicans ou proteoglicans sulfatados; e o outro, relaciona-se com a vimblastina, cuja atuação, presume-se ter ocorrido, primariamente, no local onde o substrato proteico dos compostos sulfatados (glicosaminoglicans) é sintetizado, resultando numa falta de material para que o enxofre radioativo administrado se ligasse.

Por outro lado, verificou-se que os ameloblastos se apresentaram mais sensíveis à ação inibidora da vimblastina, que causou profunda desorganização irreversível destas células cinco horas após a administração da droga, com reflexos na formação da matriz do esmalte que se apresentou, hipocorada, denotando insuficiência de material que a constitui.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLUMEN, G. Aspectos da formação e maturação da matriz orgânica do esmalte em molares de *Cavia porcellus*, L. estudados radioautograficamente. São Paulo, 1970 (Tese de Doutorado - E.P.M).
- \_\_\_\_\_ & MERZEL, J. Aspectos da formação e maturação da matriz orgânica do esmalte em molares de cobaia (*Cavia porcellus*, L.), estudados radioautograficamente. Anais Acad. bras. Cienc., 45: 165-87, 1973.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Autoradiographic study with  $\{^{35}\text{S}\}$ -sodium sulphate of loss of sulphated glycosaminoglycans during amelogenesis in the guinea pig. Archs oral Biol., 21: 513-21, 1976.
- BORISY, G.G. & TAYLOR, E.W. The mechanism of action colchicine. J. cell Biol., 34: 525-33, 1967.
- BRYAN, J. Biochemical properties of microtubules. Fedn Proc., 33: 152-7, 1974.
- DZIEWIATKOWSKY, D.D. Utilization of sulphate sulfur in the rat for the synthesis of cystine. J. biol. Chem., 207: 181-6, 1954.
- EHRLICH, H.P.; ROSS, R.; BORNSTEIN, P. Effects of anti microtubular agents on the secretion of collagen. J. cell Biol., 62: 390-405, 1974.
- EMBERY, G. The isolation of chondroitin 4- $\{^{35}\text{S}\}$  sulphate from the molar teeth of young rats receiving sodium  $\{^{35}\text{S}\}$  sulphate. Calc. Tissue Res., 14: 59-65, 1974.
- GOLDBERG, M et alii., Etude autoradiographique de l'activité des odontoblastes et des améloblastes sécréteurs de l'incisive de rat: Modifications induites par la vinblastine. J. Biol. Buccale, 7: 377-85, 1979.

- 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  $^3\text{H}$ -proline. Anat. Rec., 195: 587-610, 1979.
- KULWICH, P. et alii., Synthesis of cystine and methionine from [ $^{35}\text{S}$ ]-labeled sodium sulphate in the rabbit Fedn. Proc., 13: 463, 1954.
- KNUDSON, C.M.; STEMBERGER, B.H.; PATTON, S. Effects of colchicine on ultrastructure of the lactating mammary cell: Membrane involvement and stress on the Golgi apparatus. Cell Tissue Res., 195: 169-81, 1978.
- 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 autoradiographic study using [ $^3\text{H}$ ]-proline. Calc. Tissue Res., 18: 37-46, 1975.
- LACY, P.E. et alii., New hypothesis of insulin secretion. Nature, 219: 1177-9, 1968.
- LEVY, D.A. & CARLTON, J.A. Influence of temperature on the inhibition by colchicine of allergic histamine release. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 130: 1333-6, 1969.
- LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods J. bioph Biochem. Cytol., 9: 409-14, 1961.
- 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. Acta path. microbiol scand., 85: 330-4, 1977.

MOE, H. & MIKKELSEN, H. Light microscopical and ultrastructural observations on the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors in vivo. Acta path. microbiol. scand., 85: 73-88, 1977.

\_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. On the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors in vivo. Acta path. microbiol. scand., 85: 319-29, 1977.

MOSKALEWSKI, S.; THYBERG, J.; FRIBERG, U. In vitro influence of colchicine on the Golgi complex in A- and B-cells of guinea pig pancreatic islets. J. Ultrastruct. Res., 54: 304-17, 1976.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, LOHMANDER, S.; FRIBERG, U. Influence of colchicine and vinblastine on the Golgi complex and matrix deposition in chondrocyte aggregates. Exptl Cell Res., 95: 440-54, 1975.

MUNHOZ, C.O.G & MERZEL, J. Incorporation of radioactive sulphate ( $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ ) by mouse adrenal medullary cells as shown by radioautography. Cienc. Cult., 29: 1424-5, 1977.

NEUTRA, M. & LEBLOND, C.P. The Golgi apparatus. Scient. Am., 220: 100-7, 1969

OTERO-VILARDEBÓ, L.R.; LANE, N.; GODMAN, G.C. Some characteristics of cells secreting sulfated mucopolysaccharides. J. Histochem. Cytochem., 12, 1964.

PATZELT, C.; BROWN, D.; JEANRENAUD, B. Inhibitory effect of colchicine on amylase secretion by rat parotid glands. J. cell Biol., 73: 578-93, 1977.

PETERSON, M. & LEBLOND, C.P. Synthesis of complex carbohydrates in the Golgi region, as shown by radioautography after injection of labeled glucose. J. cell Biol., 21: 143-8, 1964.

- STENE, T. Effect of vincristine on odontoblasts in rat incisor. Scand. J. Dent. Res., 86: 346-56, 1978.
- THYBERG, J.; MOSKALEWSKI, S.; FRIBERG, U. Effects of antimicrotubular agents on the fine structure of the Golgi complex in embryonic chick osteoblasts. Cell Tissue Res., 193: 247-57, 1978.
- WARSHAWSKY, H. & 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.
- WEINSTOCK, A. & LEBLOND, C.P. Elaboration of the matrix glycoprotein of enamel by the secretory ameloblasts of the rat incisor as revealed by radioautography after galactose-<sup>3</sup>H injection. J. cell Biol., 51: 26-51, 1971.
- \_\_\_\_\_, WEINSTOCK, M. & LEBLOND, C.P. Autoradiographic detection of <sup>3</sup>H-fucose incorporation into glycoprotein by odontoblasts and its deposition at the site of the calcification front in dentin. Calc. Tissue Res., 8: 181-9, 1972.
- WEINSTOCK, M. Radioautographic visualization of <sup>3</sup>H-fucose incorporation into glycoprotein by osteoblasts and its deposition into bone matrix. Calc. Tissue Intl., 27: 177-85, 1979.
- WILLIAMS, J.A. & WOLFF, J. Colchicine-binding protein and the secretion of thyroid hormone. J. cell Biol., 54: 157-65, 1972.
- WILSON, L. et alii., Interaction of drugs with microtubule proteins. Fedn Proc., 33: 158-66, 1974.