#### **GUILHERME BLUMEN**

# A PARTICIPAÇÃO DOS AMELOBLASTOS SECRETORES NA REMOÇÃO DE MATERIAL ORGÂNICO DA MATRIZ DURANTE O PROCESSO DE A-MELOGÊNESE ESTUDADA RADIOAUTOGRAFICAMENTE ATRAVÉS DA INCORPORAÇÃO DE <sup>3</sup>H-PROLINA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para o Concurso de Habilitação à Docência Livre em Histologia e Embriologia.

B625p 840/BC

1

PIRACICABA 1976

# A minha esposa, pelo afeto e compreensão nos momentos difíceis

۵. ۱۹۹۲ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹ - ۲۰۰۹

,

# A minha filha Alessandra

Dedico este trabalho.

. . .

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL

#### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Zeferino Vaz, Magnifico Reitor da Universidade E<u>s</u> tadual de Campinas, pelo apoio com que vem distinguindo os Pr<u>o</u> fessores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao Prof. Dr. José Merzel, DD. Diretor da Faculdade de Odontol<u>o</u> gia de Piracicaba e Professor Titular de Histologia do Depart<u>a</u> mento de Morfologia da mesma Escola, por estimular e facilitar nossa ida para os Estados Unidos e por discutir como amigo pe<u>s</u> soal o presente texto.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Neder, DD. Diretor-Associado da F<u>a</u> culdade de Odontologia de Piracicaba e nosso particular amigo, pelas facilidades com que contribuiu para a nossa viagem.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Ferraz Corrêa, Chefe do Departame<u>n</u> to de Morfologia desta Escola pelas facilidad**es** para nossa def<u>e</u> sa de Tese de Livre-Docência.

Ao Professor Harold C. Slavkin, Chefe do "Department of Bioch<u>e</u> mestry and Nutrition, School of Dentistry, University of So<u>u</u> thern California, Los Angeles, California", EE.UU., por dive<u>r</u> sas sugestões durante nossa estada em seu laboratório.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos nos EE.UU. (proc. médicas 75/0016), da qual resultou este trabalho.

Ao Professor Flávio Moraes de Toledo Piza, pela leitura do te<u>x</u> to.

Ao Sr. Paulo do Amaral, técnico de Histologia **do Departamento de** Morfologia desta Faculdade, com quem aprendi as primeiras etapas, de grande valia, da técnica histológica. Ao Sr. Francisco Bueno de Camargo, pelas excelentes cópias fot<u>o</u> gráficas.

À biologista Srta. Célia Regina Schiavinato e à minha colega C. D. Darcy Tosello, pelas revisões iniciais do texto.

Ao Sr. Ulysses de Oliveira Martins, pelos excelentes serviços datilográficos.

A Sra. Ivany do Carmo Guidolin Gerola, Bibliotecária da Facu<u>l</u> dade de Odontologia de Piracicaba, pelo valioso auxílio na el<u>a</u> boração das referências bibliográficas.

Ao Sr. Sebastião Rodrigues de Barros, pelos serviços de impre<u>s</u> são.

Ao Sr.Sidney José Martins das Neves pelos serviços de encadern<u>a</u> ção.

A todos os colegas do Departamento de Morfologia, pelas demon<u>s</u> trações cotidianas de estímulo e de amizade.

في

ĨNDICE

INTRODUÇÃO	Pag.	6
MATERIAL E MÉTODOS	Pag.	8
RESULTADOS	Pag.	10
DISCUSSÃO	Pag.	18
RESUMO E CONCLUSÕES	Pag.	31

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pag. 33

\* \*

#### INTRODUÇÃO

A formação do esmalte envolve a biossíntese, secr<u>e</u> ção e maturação de uma matriz orgânica rica em água, mineral<u>i</u> zada em cerca de 25 a 30% e composta principalmente de glicopr<u>o</u> teínas.

Durante o processo de maturação a matriz jovem do es malte, contendo cerca de 20% de proteínas, sofre uma redução e apenas 0,3% foram encontradas no esmalte totalmente formado e ma duro.

A perda absoluta de proteínas, neste processo, foi d<u>e</u> monstrada por alguns autores (Deakins, 1942; Stack, 1954). Aos ameloblastos, que transitam pela região de pos-secreção apos so frerem modificações morfológicas, transformando-se em celulas tí picas de absorção e transporte, tem sido atribuído um papel na remoção de material orgânico da matriz adamantina (Wassermann, 1944; Marsland, 1952; Pindborg e Weinmann, 1959: Reith, 1961, 1963, 1970; Symons, 1962; Reith e Cotty, 1967; Elwood e Bernstein, 1968; Kallenbach, 1968).

De acordo com Eastoe (1960, 1963, 1966) e Glimcher e col., (1961, 1964) as proteínas do esmalte jovem são caracter<u>i</u> zadas pelo seu alto conteúdo de prolina (25%) e histidina. No <u>es</u> malte maduro, os aminoácidos predominantes são glicina e serina, o que indica uma perda seletiva durante a maturação. Ainda Eastoe (1966) sugeriu que a remoção das proteínas do esmalte jovem (as quais ele denominou de "Amelogenins") era devida ãs suas pr<u>o</u> priedades físico-químicas, provavelmente ao alto conteúdo de pr<u>o</u> lina.

Blumen (1970), Blumen e Merzel (1972, 1973,1976), us<u>a</u> ram molares de cobaia (dentes de crescimento contínuo) marcados com <sup>3</sup>H-prolina e <sup>35</sup>S-sulfato de sódio e radioautografias, ao m<u>i</u>

-6-

croscópio óptico. Com isso mostraram um decréscimo da concentr<u>a</u> çãode grãos de Ag reduzida destes precursores de proteínas e de compostos sulfatados, enquanto a matriz estava ainda na região de secreção e portanto relacionada com os ameloblastos secret<u>o</u> res.

Embora nesses estudos tenhamos apresentado uma hipót<u>e</u> se indicativa da participação dos ameloblastos secretores dura<u>n</u> te aquela remoção, hipótese que contrariava as de Wassermann (1944); Marsland (1952); Pindborg e Weinmann (1959);Reith e Cotty (1967); entre outros, **nã**o pudemos verificar como aquelas celulas removiam material orgânico.

Bioquimicamente, foi demonstrado que, durante a min<u>e</u> ralização do esmalte, se processa uma degradação da(s)proteína(s) da matriz, de que resultam pequenas frações ou polipéptides de baixo peso molecular (Seyer e Glimcher, 1971; Guenter e col., 1975). Por outro lado, Stack (1954), Battistone e Burnett (1956 <u>b</u>), Piez (1962) usando descalcificadores e Droz e Warshawsky (1963) empregando líquido Bouin como fixador, demonstraram a ação que estes agentes químicos exercem nos tecidos removendo polipéptides de baixo peso molecular.

Em nossos estudos anteriores, foram utilizados especi mes submetidos à ação previa de agentes químicos como fixadores e um descalcificador, os quais, como mencionado no paragrafo a<u>n</u> terior, removem polipéptides de baixo peso molecular. Não nos foi, contudo, possível verificar se os ameloblastos secretores são os responsáveis pela remoção do material orgânico da matriz durante o processo de maturação do esmalte.

O objetivo do presente estudo foi esclarecer a parti cipação dos ameloblastos secretores na remoção de material orgâ nico da matriz, durante a maturação do esmalte, utilizando o m<u>é</u> todo de congelação sem prévia fix**ação** e descalcificação dos es pécimes, o qual elimina algumas variãveis empregadas no processo histológico de rotina.

-7-

### MATERIAL E METODOS

BIOSSÍNTESE DA MATRIZ DO ESMALTE: Camundongos com zero dias de idade receberam por via intra-peritonial uma injeção de 40ul de uma solução salina contendo 40µCi de L-Prolina (2,3,4,5 <sup>3</sup>H(N)) em 0,01N de HCl previamente liofilizada e posteriormente redi luída ao mesmo volume original em solução salina (soro fisiolo gico a 0,9%; A.E. = 1mCi-0,0016mg; New England, Boston, Mass., USA). Radioautografias foram obtidas dos animais sacrificados em gru pos de 4 nos tempos de 4, 24, 48, 72, 96 e 120 horas seguidasda administração do composto radioativo. Para o estudo em microsco pia optica, cortes transversais, obtidos como será descrito abai xo, foram radioautografados com emulsão NTB2 da Kodak segundo o procedimento de Kopriwa e Leblond (1962). Após exposição de 4 dias a 49C as radioautografias foram reveladas, coradas com He matoxilina e Eosina e montadas.

PREPARAÇÃO DOS ESPECIMES: 40 camundongos (Swiss Webster albinus) de zero a 5 dias de idade, em grupos de 4, pesando cada animal de 1,4 a 1,7 gramas foram sacrificados por decapitação. 24 an<u>i</u> mais foram usados para o estudo da biossíntese da matriz do es malte e 16 para observações morfológicas. Sob o pequeno aumento de um microscópio esterioscópio, após dissecados e retiradoscui dadosamente os tecidos moles, as mandíbulas foram removidas e separadas em hemi-mandíbulas. Os espécimes, cada um contendo um dente incisivo, foram processados para obtenção de cortes por congelação e em parafina.

CORTES POR CONGELAÇÃO: Hemi-mandíbulas não descalcificadas, ob tidas de 3 animais de cada idade, foram incluídas em cápsulasde gelatina com "Tissue Tek II" (Division Miller, Lab. Inc. Naper ville, Illinois, USA) de modo a obter cortes transversais, ini

-8-

ciados pela região incisal. Imediatamente após, os espécimes f<u>o</u> ram congelados em gelo seco a -90ºC e cortes seriados de 6µm de espessura, feitos em criostato a -30ºC, foram montados em lâm<u>i</u> nas para microscopia.

CORTES DE MATERIAL INCLUÍDO EM PARAFINA: Hemi-mandibulas de l animal por idade foram imediatamente imersas em uma solução de Bouin-Hollande a temperatura ambiente durante 24 horas e, post<u>e</u> riormente, descalcificadas em EDTA a temperatura ambiente. Os e<u>s</u> pécimes foram embebidos e incluídos em parafina, de modo a obter cortes, ou no sentido transversal ou longitudinal na direção m<u><u>e</u> sio-distal. Cortes de 6µm foram montados em l<u>a</u>minas para as o<u>b</u> servações morfológicas. Para os procedimentos radioautográficos foram usadas l<u>a</u>minas cobertas previamente com gelatina a 0,5%.</u>

OBSERVAÇÕES MORFOLÕGICAS: Cortes por congelação, foram corados com uma solução de 0,365g de Azul de Toluidina, 0,135g de Fucs<u>i</u> na Básica e Álcool Etílico a 30%-50ml. Os cortes em parafina,f<u>o</u> ram corados com Hematoxilina e Eosina e reação do P.A.S.

#### RESULTADOS

OBSERVAÇÕES MORFOLÕGICAS: O õrgão do esmalte do tecido odontog<u>e</u> nético da superfície labial do incisivo de camundongo pode ser melhor observado em cortes obtidos pela técnica de inclusão em parafina. A semelhança do órgão do esmalte de outros dentes de crescimento contínuo, apresenta 4 regiões típicas, do ápice em direção incisal: embrionária, diferenciação, secreção da matriz adamantina e pós-secreção.

Desde que a morfologia do órgão do esmalte destes den tes não difere fundamentalmente da dos demais roedores e jā des crita por outros autores (Pindborg e Weinmann, 1959; Suga, 1959; Costacurta, 1965; Warshawsky e Smith, 1974), descreveremos su mariamente as regiões de secreção e pós-secreção, mencionando an tes que: aos zero dias de vida, o órgão do esmalte é constituí do pelas regiões: embrionária, diferenciação e secreção. Portan to, nesta idade ainda não se formou a região de pós-secreção. Es ta é região constituída pelos ameloblastos reduzidos (que não ela ram matriz orgânica do esmalte) e esmalte de transição (entre ou tras estruturas do órgão do esmalte). Ela aparece num intervalo de tempo entre l e 2 dias de vida do animal. Somențe com 5 dias de vida aparece uma pequena faixa de esmalte totalmente calcifi cado e completamente removível por agentes descalcificantes.

Região de Secreção: Já está diferenciada aos zero dias de idade. Apresenta limites apicais no ponto onde se inicia a secreção do esmalte interno (Warshawsky e Smith, 1974 ou <u>zona 3</u> de Pindborg e Weinmann, 1959) e limites incisais onde os ameloblastos sofrem mudanças em sua forma na  $48^{a}_{-}$  hora (entre  $24^{a}_{-}$  e  $48^{a}_{-}$  hora). Nesta ārea, os ameloblastos aparecem como células colunares com cara<u>c</u> terísticas de células secretoras (fig. 1). Gradualmente, aume<u>n</u> tam em altura, mostram um núcleo alongado localizado na região

-10-

Figuras 1 e 2: Fotomicrografias do incisivo do camundongo obti das por inclusão em parafina, no sentido mésio-distal do dente.

Fig. 1: Este corte foi obtido de camundongos com zero dias de vida. A região de pos-secreção ainda não está diferenciada.RL: região labial; RE: região embrionária; RD: região de diferencia ção; RS: região de secreção; observa-se ainda o 1º Molar Infe rior. Coloração pela H.E. 30 X.

Fig. 2: Região de pos-secreção de camundongos com 5 dias de vi da. Notar a camada de ameloblastos reduzidos (AR); o desapareci mento da substância que separa os ameloblastos secretores do es trato intermédio. O estrato intermédio mostra-se formado por uma camada de célula sem limites precisos (EI). A matriz do es malte encontra-se na etapa do esmalte de transição (ME); D: den tina; PD: pré-dentina. Coloração pela H.E. 270 X.



basal, uma região supra-nuclear e outra infra-nuclear acidofila e PAS positiva. No ápice destes ameloblastos aparecem os proces sos de Tomes. Pequenos grânulos de secreção, PAS positivos, são vistos na região supra-nuclear destas células e distalmente no meio extra-celular. A região infra-nuclear apresenta um material PAS positivo nos cortes obtidos por congelação, mas não nos ob tidos por parafina. As barras terminais apicais são nitidamente visíveis e PAS positivas. Os ameloblastos desta área são separa dos das celulas do estrato intermedio por um delgado material, aci dofilo e PAS positivo. O estrato intermédio está disposto em uma camada de celulas cuboides adjacentes as celulas da camada papi lar. A matriz do esmalte observada aos zero dias de vida corres ponde praticamente à região de secreção do esmalte interno des crita por Warshawsky e Smith (1974). Apos 24 horas, a matriz do esmalte é acrescida da região de secreção do esmalte externodes crita pelos mesmos autores. Inicialmente a espessura da matriz do esmalte é fina, aumentando gradualmente em direção oclusal. A matriz do esmalte desta região, quando corada pela Hematoxili na e Eosina, é acidofila e homogênea. O epitélio externo nesta região não pode mais ser visualizado, confundindo-se com cēlu las do saco dental.

Região de pos-secreção: Esta região fo observada apos o 29 dia de vida do camundongo. Ocupa o comprimento incisal do orgão do esmalte do dente e corresponde às regiões de transição pos-secr<u>e</u> tora e maturação descritas por Warshawsky e Smith (1974) ou se ja, às final do <u>39 setor</u> e <u>total do 49 setor</u> (zonas) descritos por Pindborg e Weinmann (1959). Caracteriza-se pela presença de ameloblastos, que em direção incisal se tornam mais curtos (fig. 2). O citoplasma tem uma quantidade considerável de grânulos pri<u>n</u> cipalmente na zona de transição onde os ameloblastos secretores, que são células altas e colunares, se transformam em células mais curtas. A barra terminal apical não é vista, o mesmo ocorrendo

ł

-12-

com a delgada substância que separa os ameloblastos do estrato intermédio. As células do estrato intermédio apresentam-se como células cuboides, perdendo gradativamente sua organização de uma camada bem caracterizada. A matriz do esmalte nesta região apre senta uma coloração heterogênea, típica do esmalte de transição; ao final do 50 dia uma pequena faixa de esmalte totalmente madu ro é removido pelo descalcificador.

-12-

ESTUDO DA BIOSSÍNTESE DA MATRIZ DO ESMALTE

I - Cortes obtidos pela técnica de congelação

a) Região de secreção: A análise qualitativa dos radioauto creamas mostra, ros ameloblastos, após 4 horas da administração de <sup>3</sup>H-prolina, uma reação radioativa na região supra-nuclear ( fig. 3). Após 24 horas (fig. 4) a reação radioautográfica mos trou-se bem menor, para aumentar novamente na  $48^{\frac{3}{2}}$  hora (fig. 5), permanecendo praticamente inalterada até 96 horas (fig. 5 e 6); ao fim de 120 horas a reação foi ligeiramente menor. A matriz do esmalte mostrou uma reação radioautográfica intensa e difusa por toda sua espessura após 4 e 24 horas da injeção do composto ra dioativo (fig. 3 e 4). Nos tempos de 48 a 120 horas da admini<u>s</u> tração (fig. 5 e 6) a reação decaiu, mas não sofrendo significa tivas mudanças na concentração.

b) Região de pos-secteção: A reação nos ameloblastos desta região so pode ser vista a partir da  $48^{\frac{3}{2}}$  hora (fig. 7). A reação radioautográfica até a  $120^{\frac{3}{2}}$  hora foi de baixa intensidade (fig. 8). Na matriz do esmalte, nestes mesmos intervalos de tempo, a reação foi semelhante à verificada na região de secreção.

II - Cortes obtidos pela técnica de inclusão em parafina

Figuras 3 a 6: Radioautogramas da região de secreção ob cortes transversais do incisivo pela técnica de concelaç virtude da diferença do plano de foco microscópico exist aumento usado, entre os ameloblastos e a matriz orgânica malte, as mesmas foram fotografadas separadamente e pos te montadas para a confecção da fotos. Após 4 horas da a tração de <sup>3</sup>H-prolina (fig. 3), notamos uma grande quanti grãos de Ag reduzida sobre a região supra-nuclear dos amtos (A). A matriz do esmalte (E) encontra-se fortemente ativa; apos 24 horas da administração do composto radie (fig. 4), a reação nos ameloblastos na sua região supra-1 diminuiu de intensidade (A), enquanto que a matriz do e permaneceu praticamente inalterada (E). Apos a 48ª hora, ção na região supra-nuclear dos ameloblastos aumentou nov de intensidade (A) permanecendo inalterada no tempo SΕ (fig. 5 e 6). Em relação à matriz do esmalte (E) nos inte de tempo de 48 a 72 horas após a injeção (fig. 5 e 6) hou decrescimo de concentração quando comparada com o tempo horas (fig. 4). Coloração pela H.E. 750 X.

Figuras 7 e 8: Radioautogramas de cortes transversais da de pós-secreção pela técnica de congelação após 48 e 72 h adminstração do composto radioativo. Em ambas as fotomi fias a reação nos ameloblastos reduzidos (RA) fo bem meno do comparada com os ameloblastos da região de secreção no: mos intervalos de tempo. A matriz do esmalte (E) não most: riações na intensidade radioativa quando comparada com a r da região de secreção nos mesmos intevalos de tempo. Colo pela H.E. 970 X.

E F



a) Região de secreção: Os ameloblastos desta região mostr<u>a</u> ram, em todos os intervalos de tempo analisados, uma fraca re<u>a</u> çao radioautográfica. A intensidade da reação, quando comparada com a da técnica de congelação, mostrou-se de modo geral sempre de menor intensidade. A matriz do esmalte mostrou-se radioaut<u>o</u> graficamente semelhante em relação ao comportamento fisiológico, porém de intensidade bem mais baixa.

b) Região de Pos-secreção: Os ameloblastos desta região, nas 48 horas, mostraram reação radioautográfica semelhante à da téc nica anterior, decaindo de intensidade após 72 horas da injeção, permanecendo praticamente inalterada até a  $120^{\frac{a}{2}}$  horas. A matriz do esmalte mostrou uma reação semelhante à verificada nos cor tes obtidos por congelação; no entanto, nesta técnica a concen tração foi um pouco maior do que a apresentada pela zona de se creção. Contudo, a mesma constância em relação à concentração radioativa foi observada, se bem que com menor intensidade, na região análoga analisada na outra técnica.

Avaliação quantitativa: A concentração de grãos de Ag reduzida foi determinada sobre o citoplasma dos ameloblastos e sobre t<u>o</u> da a extensão da matriz do esmalte, nas regiões de secreção e pos-secreção, de cortes transversais, em ambas as técnicas e<u>m</u> pregadas.

Esta contagem foi realizada em vários cortes que di<u>s</u> tavam de  $36\mu$ m entre si, usando-se uma ocular quadriculada KPL-8x. Foram contados, no mínimo, 30 quadrados que, no sistema optico usado, mediram  $100\mu$ m<sup>2</sup>. No citoplasma dos ameloblastos, os grãos de Ag reduzida foram contados dentro de uma área delimitada por uma linha imaginária, indo da base distal do núcleo até o limi te celular com a matriz do esmalte, onde a contagem foi feita a partir de uma linha que, de um lado se liminou com os amelobla<u>s</u> tos e do outro, com a junção amelodentinária (Tabelas l e 2).

-16-

### TABELA 1

Concentração de grãos de Ag reduzida/ $100\mu m^2$  em ameloblastos e ma triz do esmalte das regiões de secreção e pos-secreção, em cor tes obtidos por congelação

TEMPO(horas)	REGIÃO DE	E SECREÇÃO	REGIÃO DE I	PÕS-SECREÇÃO
	AMELOBLASTOS	MATRIZ	AMELOBLASTOS	MATRIZ
4	22,5 (0,8)	44,6 (2,3)	0	0
24	7,3 (0,6)	46,8 (2,9)	0	0
48	14,3 (0,7)	15,1 (1,5)	9,6 (0,6)	15,1 (0,8)
72	14,6 (0,9)	17,1 (1,3)	5,8 (0,4)	15,2 )1,0)
96	14,8 (0,5)	15,6 (1,4)	6,0 (0,4)	15,0 (0,9)
120	11,6 (0,8)	15,3 (0,8)	6,2 (0,9)	14,4 (0,5)

## TABELA 2

Concentração de grãos de Ag reduzida/100µm<sup>2</sup> em ameloblastos em<u>a</u> triz do esmalte das regiões de secreção e pos-secreção, em co<u>r</u> tes obtidos por parafina

TEMPO(horas)	REGIÃO DE SECREÇÃO		REGIÃO DE POS-SECREÇÃO	
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AMELOBLASTOS	MATRIZ	AMELOBLASTO	S MATRIZ
4	6,1 (0,4)	18,3 (0,8)	0	0
24	5,4 (0,2)	23,8 (1,1)	0	0
48	6,7 (0,2)	12,8 (0,6)	7,3 (0,7)	14,3 (0,6)
72	4,2 (0,3)	9,3 (0,4)	3,7 (0,3)	11,2 (1,1)
96	7,1 (0,3)	9,5 (0,4)	2,9 (0,3)	10,6 (0,6)
120	5,1 (0,3)	7,9 (0,4)	3,5 (0,4)	10,0 (0,5)
Erro padrão d	a modia ( )			

irro padrao da media ( ).

-17-

### DISCUSSÃO

A matriz orgânica do esmalte, após sua secreção pelos ameloblastos, sofre transformações que Chase (1940) denominou maturação. Durante este processo a matriz jovem do esmalte  $\bar{a}c\underline{i}$ do-insolúvel e calcificada em cerca de 25 a 30% (Weinmann e col. 1942; Elwood e Apostolopoulus, 1975) transforma-se em um tecido altamente calcificado e acido-solúvel (Marsland, 1952).

A matriz imatura do esmalte contem cerca de 20% de ma terial orgânico. Este material, representado principalmente por proteínas (Hess e Lee, 1954; Battistone e Burnett, 1956 aeb; Eastoe, 1960; Glimcher e col., 1961; Piez, 1962; Levine e Glim cher, 1965), 1 a 2% de carbohidratos (Stack, 1954; Seyer e Glim cher, 1969; Seyer e Vincent, 1971; Weinstock e Leblond, 1971) e proteínas fosforiladas (Seyer e Glimcher, 1969; Seyer e Vincent, 1971), além de água (Battistone e Burnett, 1956 a e b), é redu zido durante o processo de maturação e passa a representar cer ca de 0,3% no esmalte maduro (Deakins, 1942; Stack, 1954). Além da remoção de material orgânico, a maturação do esmalte envolve perda de agua acompanhada de um aumento crescente de sais de cal cio, os quais são inicialmente depositados em forma solúvel,cris talizando-se em seguida em apatitas (Weinmann e col. 1942; Dea kins, 1942; Wassermann, 1944; Marsland, 1952).

A perda ou remoção de material orgânico em outros t<u>e</u> cidos calcificados foi demonstrada durante a formação do osso (Hirchman e Dziewiatkowsky,1966; Baylink e col., 1972) e na fo<u>r</u> mação da dentina (Sundstrom, 1971).

Estudos radioautográficos, utilizando os mais variados tipos de radiotraçadores da matriz do esmalte,demonstraram também, perda de material orgânico durante a amelogenese. Estas observ<u>a</u> ções,contudo,foram feitas analisando-se apenas extremosproximais

-18-

(matriz imatura) e distais (matriz madura) (Leblond e col,1955; Bélanger, 1955; Kennedy e Kennedy, 1957; Kumamoto e Leblond, 1958; Hwang e col., 1962, 1963; Costacurta, 1964; Greulich e Slavkin, 1965; Cotton e Hefferren, 1966).

Estudos histológicos, realizados ao nível do microsc<u>o</u> pio optico e eletrônico, mostram que os ameloblastos, apos pa<u>s</u> sarem pela etapa de secreção da matriz orgânica do esmalte, s<u>o</u> frem modificações, transformando-se em ameloblastos reduzidos (Wassermann, 1944; Marsland, 1952; Pindborg e Weinmann, 1959) os quais apresentam microvilosidades na sua superfície apical adquirindo forma típica de celulas especializadas em absorsão e transporte (Reith, 1961, 1963, 1970; Elwood e Bernstein, 1968; Kallenbach, 1968).

A estas células tem sido atribuída uma função releva<u>n</u> te de remoção de material orgânico durante a maturação do esma<u>l</u> te (Wassermann, 1944; Marsland, 1952; Symons, 1962; Reith e Co<u>t</u> ty, 1967; Elwood e Bernstein, 1968).

Paralelamente ao processo de redução dos ameloblastos, a matriz do esmalte mais adulta apresenta, gradualmente diferen tes afinidades tintoriais. Assim, no estágio de esmalte de tran sição, perde sua textura homogênea (característica do esmalte imaturo) alterando a cor até que, ao atingir o estado altamente calcificado, se torna totalmente solúvel e removível por agentes descalcificantes. Por outro lado, análises bioquímicas,comparan do dados obtidos de amostras do esmalte imaturo colhidas ao nī vel dos ameloblastos secretores, demonstraram a existência de maior quantidade de material orgânico quando comparadas as do es malte de transição ou maduro e totalmente calcificado, relacionados em posição aos ameloblastos reduzidos. Em vista destes fa tores, os autores tendem a admitir serem estas celulas reduzidas responsáveis pela remoção do material orgânico durante a amelo genese.

-19-

Recentemente, Blumen (1970); Blumen e Merzel(1972,1973, 1976) verificaram que a perda ou remoção de material orgânico ocorreu paralelamente à secreção da matriz do esmalte, relacionan do-se, portanto, também aos ameloblastos durante a sua fase se cretora. Para tanto, utilizaram-se de radioautografias obtidas de molares de cobaia (dentes de crescimento contínuo) retirados de animais que receberam injeção prévia de <sup>3</sup>H-prolina e <sup>35</sup>S-sul fato de sódio, precursores respectivamente de proteínas e compos tos sulfatados. Correlacionando a velocidade de crescimento des tes dentes obtidos de animais injetados com <sup>3</sup>H-timidina (através contagem de núcleos dos ameloblastos superpostos do ápice em di reção oclusal, em 56 células por dia) com a concentração radio ativa dos precursores sobre a matriz, em regiões bem delimitadas do orgão do esmalte das zonas de secreção e pos-secreção (esta ultima, na região do esmalte de transição), verificaram que а concentração radioativa sobre a matriz da região de secreção atin giu o pico de intensidade máxima após 24 horas, decaindo após 48 horas para, durante a migração em direção oclusal, permanecer es tável. Isto foi verificado a cada 24 horas até o final dos expe rimentos em todas as regiões em que o õrgão do esmalte fora de limitado. Embora tenham aventado esta hipótese pela primeira vez na literatura, utilizando-se de um processo histológico de maior precisão, não puderam verificar como os ameloblastos secretores poderiam remover material orgânico ou afastar a possibilidade da participação dos ameloblastos reduzidos desta remoção, durante esta etapa da amelogênese. Este fato se deveu à utilização, à se melhança de outros autores, de espécimes previamente submetidos à fixação e outros agentes químicos, v.g., descalcificador, 0 qual durante o processamento histológico removeu todo o esmalte maduro e totalmente calcificado na região relacionada aos amelo blastos reduzidos.

Droz e Warshawsky (1963) demonstraram que cerca de 10

a 50% de radioatividade nos tecidos são perdidos quando utiliz<u>a</u> mos líquido Bouin como agente fixador, enquanto que estudos bi<u>o</u> químicos têm comprovado a ação que os agentes descalcificadores empregados no estudo da amelogênese exercem na remoção de mat<u>e</u> rial orgânico da matriz do esmalte (Stack, 1954; Battistone e Burnett, 1956 b; Piez, 1962).

Por outro lado, foi demonstrado que existe uma degr<u>a</u> dação e quebra da(s) proteína(s) componete(s) do esmalte imat<u>u</u> ro, durante o desenvolvimento do mesmo (Seyer e Glimcher, 1971; Seyer, 1972: Seyer e Vincent, 1972; Fukae e col., 1972; Fukae e Shimizu, 1974; Guenter e col. 1975).

Portanto, é bem provável que estas pequenas frações, resultantes da quebra molecular, perdendo sua estabilidade de<u>n</u> tro da configuração molecular, possam ser facilmente eliminadas dos tecidos durante o processamento histológico de rotina. Este fato torna praticamente impossível seguir o destino destas p<u>e</u> quenas frações ou mesmo visualisar se realmente os ameloblastos têm um papel de reabsorção.

O presente estudo, pelo fato de eliminarmos algumas v<u>a</u> riãveis utilizadas no processo acima citado, permitiu-nos, de<u>n</u> tro das condições em que o experimento foi realizado, uma anál<u>i</u> se da participação dos ameloblastos durante sua fase secretora na remoção de material orgânico da matriz imatura do esmalte em desenvolvimento, resultantes da degradação proteica.

**Como** neste trabalho não nos utilizamos de regiões bem delimitadas do órgão do esmalte, como o fizemos nos estudos an teriores (Blumen, 1970; Blumen e Merzel, 1972, 1973, 1976), os resultados serão cautelosamente apresentados. Diversos são os fa tores que nos levam a considerar com precauções a interpretação dos mesmos. Entre as causas existentes, podemos dizer que, te<u>c</u> nicamente, em virtude da curvatura longitudinal na direção mésio distal na forma do incisivo do camundongo, não conseguimos co<u>r</u>

-21-

tes longitudinais pela técnica de congelação. Dadas as dificulda des técnicas encontradas para a obtenção destes cortes, não nos foi possível calcular a taxa diária do crescimento do dente ( Blu men, 1970; Blumen e Merzel, 1973). Assim, as regiões do õrgão do esmalte não puderam ser delimitadas e, consequentemente,compara das aos diversos tempos e animais. Desde que não conseguimos cor tes longitudinais na direção mésio-distal, usamos para a inter pretação de nossos resultados cortes transversais, com ambas as técnicas. Com o intuito de contornar, dentro de limitações prā ticas, estas dificuldades oriundas de problemas puramente técni cos, procuramos obter uma média das contagens de grãos de Ag/100µm<sup>2</sup>. Para tal usamos diversos cortes, separados por uma distância mi nima de 36µm em todos os animais, para cada intervalo de tempo abrangendo uma faixa mais ampla da região de secreção (única re gião usada para as contagens de grãos de Ag nas primeiras 24 ho ras) e praticamente toda a região de pos-secreção perfeitamente delimitada da anterior.

Conforme nossas observações morfológicas demonstraram, aos zero dias de idade, a região labial do incisivo do camundon go apresenta região de secreção onde os ameloblastos aparecem como celulas totalmente diferenciadas. A matriz imatura do es malte apresenta uma textura homogênea quando corada. Por outro lado, a região de pós-secreção relacionada aos ameloblastos"re duzidos" sõ foi visualisada a partir da 48ª hora de vida do ani mal e apresentava nesta idade uma pequena extensão decorrente do crescimento do dente do animal. Ao lado do aparecimento dos ame loblastos reduzidos, a matriz do esmalte mostra uma textura he terogênea e parcialmente descorada quando tratada com corantes o que é típico do esmalte de transição. Estas modificações pude ram ser melhor evidenciadas nos cortes obtidos por processamen to histologico de rotina.

Apesar do dente estar crescendo nesta idade em todas

-22-

as direções, a região de pos-secreção reflete um crescimento em direção incisal, por aposição de novas células originárias da r<u>e</u> gião embrionária e que antestransitaram pela região de secreção. O fato desta região apresentar poucas células apos 48 horas nos levou a considerar estas observações como um fator importante p<u>a</u> ra a interpretação dos nossos resultados radioautográficos, os quais poderão ser evidenciados durante a discussão.

Analisemos, primeiramente, a concentração de grãos de Ag reduzida sobre a matriz do esmalte da região de secreção, em cortes de dentes obtidos através do método de congelação, nos di ferentes intervalos de tempo após a administração do composto radioativo. Podemos verificar que a reação radioautográfica, após atingir o seu pico de intensidade radioativa máxima após 24 ho ras, decaiu nas 48 horas para, em seguida, manter-se praticamen te inalterada (Tab. 1). Quando comparamos estes dados com aque les obtidos de cortes em parafina, de espécimes submetidos a pro cessos histológicos rotineiros de fixação química e descalcifi cação prévia (Tab. 2), verificamos que houve um comportamento semelhante em relação à concentração radioativa.

Droz e Warshawsky (1963) verificaram que, no mínimo cerca de 91 a 97% da radioatividade retida em cortes histológ<u>i</u> cos obtidos rotineiramente após a injeção de aminoácidos marc<u>a</u> dos, se encontram firmemente ligados a proteínas (presumivelme<u>n</u> te por ligações peptídicas).

Deste modo, a avaliação realizada nos cortes dos de<u>n</u> tes submetidos previamente a agentes químicos de fixação e de<u>s</u> calcificação reflete realmente a presença de macromoléculas pr<u>o</u> téicas que permaneceram no tecido estudado e, portanto, estes cortes podem ser analisados e, dentro das condições deste exp<u>e</u> rimento, como jã explicado, comparados com aqueles obtidos sem a prévia ação destes agentes.

Comparando-se as concentrações de grãos de Ag reduzi da sobre a matriz do esmalte obtidas com ambos os procedimentos

-23-

nas regiões de secreção e pos-secreção (Tab. 1 e 2),verificamos que houve um decrescimo acentuado na matriz do esmalte imaturo da região de secreção, demonstrando assim a ação dos agentes quí micos empregados para a obtenção de cortes, removendo, dos mes mos, material orgânico da matriz do esmalte, comprovando os tr<u>a</u> balhos de Stack (1954): Battistone e Burnett (1956 <u>b</u>); Piez(1962); Droz e Warshawsky (1963). Para que esta remoção possa ocorrer, torna-se necessário que a matriz orgânica sofra um processo de degradação de seus componentes orgânicos, o qual transforma suas macromoléculas em frações menores, solúveis, e portanto, passí veis de ser reabsorvidas.

Analisando os radioautogramas da região de pos-secr<u>e</u> ção dos cortes de congelação, verificamos que a intensidade r<u>a</u> dioativa sobre a matriz adamantina, apos 48 horas, não sofreu modificações, sendo praticamente semelhante aquela observada<u>s</u> na matriz imatura da região de secreção. O confronto destes d<u>a</u> dos com os obtidos dos espécimes submetidos a prévia fixação qu<u>í</u> mica e descalcificação mostrou que a perda de material orgânico foi relativamente pequena, o que indicaria uma maior estabilid<u>a</u> de da fração remanescente da matriz.

Deakins (1942) demonstrou que, durante a maturação do esmalte, existe primeiramente uma perda de material orgânico,em seguida de água, e aumento concomitante de sais de cálcio. Após a remoção de material orgânico ter sido completada, a fração res tante permanece inalterada. Blumen e Merzel (1976), usando <sup>35</sup>Ssulfato de sódio e radioautografias, obtiveram resultados que concordaram com os de Deakins (1942), nas condições em que o tr<u>a</u> balho foi realizado, no que se refere à constância da fração or gânica restante.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmaram o estudo por nos realizado anteriormente, com a vantagem de p<u>o</u> derem, ainda, ser estendidos totalmente a zona do esmalte enco<u>n</u>

> UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL

trada na região de pos-secreção, onde a matriz adamantina se apre senta mais calcificada. A concentração radioativa após 48 h até 120 horas da administração do composto radioativo, em ambas as técnicas, mostrou tendência a permanecer praticamente constante, sugerindo a existência de uma distribuição espacial da parte or gânica que permaneceria estável, confirmando o postulado de Blu men e Merzel (1976). Segundo estes autores, esta matriz seria formada por macromoléculas que não se deslocariam com a adição de material orgânico recém-formado, enquanto que uma outra par te, labil, seria removida na região dos ameloblastos secretores durante o movimento e crescimento do dente em direção incisal ou oclusal, conforme discutiremos a seguir.

Analisando os resultados obtidos em relação aos amelo blastos da região de secreção, nos cortes dos dentes obtidos por congelação, verificamos que a reação radioativa após 4 horas da injeção apresentou 22 grãos de Ag/100µm<sup>2</sup>, decrescendo para 7 grãos apos 24 horas (Tab. 1). O significado deste decrescimo jã foi descrito e discutido por diversos autores que estudaram а biossíntese e formação da matriz orgânica do esmalte (literatu ra ampla citada nos trabalhos de Weinstock, 1972;Slavkin,1974). Contudo, no intervalo de 48 horas após a administração do compos to radioativo, verificamos que houve um grande aumento na concen tração de grãos de Ag reduzida na região supra-nuclear dos ame loblastos da região de secreção (14 grãos/100µm<sup>2</sup>), concentração esta que permaneceu praticamente inalterada nos intervalos pos teriores da duração do experimento (Tab. 1).

Comparando estas concentrações àquelas obtidas nosme<u>s</u> mos intervalos de tempo na região de pos-secreção, verificamos que a concentração radioativa sobre o citoplasma dos amelobla<u>s</u> tos foi bem menor e, praticamente, semelhante à dos ameloblastos das regiões de secreção e pos-secreção dos dentes submetidos ao processamento histológico de rotina. Como estas concentrações em

-25-

ambas as técnicas foram relativamente baixas, isto sugere a pr<u>e</u> sença de proteínas sedentárias (Carneiro, 1959; Warshawsky e col., 1963).

Uma vez que, após 48 horas da administração do compos to radioativo, o aumento de concentração nos ameloblastos rela cionados a região de secreção dos cortes obtidos por congelação (e não nos cortes obtidos por inclusão em parafina) foi signifi cante, o referido aumento so pode ser atribuído - dentro dos li mites em que o presente experimento foi realizado — a uma reab sorção de material orgânico pelos ameloblastos enquanto transi tam por esta região do dente em desenvolvimento. A relação esta belecida entre os cortes obtidos por congelação e parafina ain da mostrou que esta reabsorção parece ser sempre maior do que o material que permanece na matriz, o que indicaria a presença de proteínas de menor peso molecular e portanto passíveis de ser removidas.

Como poderiam então os ameloblastos que transitam p<u>e</u> la região de secreção remover material orgânico durante o pr<u>o</u> cesso de maturação ?

Eastoe (1966) sugeriu que a remoção das proteínas do esmalte jovem (as quais ele denominou de "Amelogenins") era r<u>e</u> sultado de uma autodespolimerização das proteínas devido a muda<u>n</u> ças físico-quimicas, provavelmente em virtude das característ<u>i</u> cas da composição de aminoácidos (por ex. alto conteúdo de pr<u>o</u> lina).

Componentes de baixo peso molecular (polipéptides),na matriz do esmalte, foram detectados por Seyer e Glimcher (1971) Seyer e Vincent (1972),Guenter e col.,(1975),os quais, segundo Fukae e col. (1972), seriam resultados de transformações no meio extra-celular, de uma única proteína secretada pelos ameloblastos. Verificou-se ainda que, durante este processo, há uma perda s<u>e</u> letiva dos constituintes protéicos, perda que poderia represe<u>n</u>

. .....

-26-

tar a quebra de um sistema complexo (Fukae e col., 1972). Como resultado deste processo, ha um decréscimo do diâmetro molecular da proteina do esmalte, o qual ocorre durante o seu desenvolvi mento, enquanto a principal proteina do esmalte imaturo(polipép tide) é degradada durante o estágio inicial do desenvolvimento (Fukae e Shimizu, 1974).

Significativas observações ao microscópio eletrônico foram realizadas por Reith (1967), nas quais constatou a exi<u>s</u> tência de microvilosidades e vesículas encapadas nas extremid<u>a</u> des distais dos processos de Tomes de ameloblastos de molares de rato na fase precoce da amelogênese.

Por outro lado, a atividade da fosfatase ācida(um dos enzimas do sistema lisossomal) foi verificada durante a calcifi cação das matrizes da dentina e do osso (Burstone, 1959), esta<u>n</u> do a mesma presente não so nas células osseas, mas também no o<u>s</u> teoide na frente de mineralização (Wergendal e Baylink, 1969), relacionando-se a āreas de reabsorção onde apresentaria um papel de relevo neste mecanismo (Schajowicz e Cabrini, 1958).

Estudos histoquímicos demonstraram que enzimas perten centes ao sistema lisossomal estão presentes no citoplasma su pra-nuclear dos ameloblastos (Quintarelli, 1961). Sabe-se que estes organóides participam da degradação intra e extra-celular (De Duve e Wattiaux, 1966). Sua presença foi verificada na r<u>e</u> gião supra-nuclear e processos de Tomes dos ameloblastos total mente diferenciados por Katchburian e col., (1967); Matthiessen (1967); Warshawsky (1968); Garant e Nalbandian (1968); Katchb<u>u</u> rian e Holt (1969).

De acordo com os estudos acima citados, é provávelque exista uma quebra de molécula(s) protéica(s) por ação físicoquímica, enzimática ou ação combinada de ambos os processos, os quais atuariam concomitantemente. Como resultado da quebra mol<u>e</u> cular, a(s) proteína(s) do esmalte em desenvolvimento se tran<u>s</u>

-27-

formaria(m) em pequenos polipéptides, de baixo peso molecular, os quais poderiam ser reabsorvidos durante sua etapa secretora, <u>a</u> través dos processos de Tomes dos ameloblastos. Como estas p<u>e</u> quenas unidades provavelmente seriam solúveis em agentes quím<u>i</u> cos empregados durante o procedimento histológico de rotina p<u>a</u> ra o estudo da amelogênese, é evidente que as mesmas não pod<u>e</u> riam ser detectadas pela técnica radioautográfica, usando proc<u>e</u> dimentos histológicos rotineiros.

Conforme nossos resultados demonstraram, nos cortes obtidos por congelação, nos intervalos de 48 a 120 horas após a administração do composto radioativo, existe a tendência da con centração de grãos de Ag reduzida permanecer inalterada no cito plasma dos ameloblastos da região de secreção. Este fato um é forte indício de que este material poderia permanecer como pro teínas sedentárias nos ameloblastos localizados nesta região,ao lado de uma outra fração, lábil, a qual sofreria possivel uma degradação por ação enzimática. Com efeito, a estabilidade da concentração parece demonstrar que enzimas pertencentes ao sis tema lisossomal, v.g., fosfatase acida, não atuariam no meio in tra-celular dos ameloblastos da região de secreção, pois, se is to ocorresse, a concentração intra-celular tenderia gradualmen te a decrescer nos diferentes intervalos de tempo até 120 horas, fato este que não ocorreu. Como a concentração foi bem menor nos ameloblastos da região de pos-secreção, acredita-se que esta al teração seja devida às proteínas sedentárias; portanto, a dife rença de concentração radioativa encontrada entre os ameloblas tos da região de secreção e os da região de pos-secreção poderia indicar uma degradação intra-celular de material orgânico previamente reabsorvido pelos ameloblastos durante seu trajeto pela região de secreção. Nossos resultados a este respeito encon tram apoio em trabalhos de vários autores. Assim Ten Cate(1963) observou atividade de fosfatase acida em largas goticulas cito

-28-

plasmáticas na camada de ameloblastos, ao final da formação da matriz. Por outro lado, Sakamoto e Sasaki (1969) verificaram a atividade catéptica no orgão do esmalte de germe dentário de boi durante o desenvolvimento, atividade esta que aumentava nos es tágios tardios da amelogênese, sugerindo então um possível pa pel desta atividade na degradação da matriz proteica absorvida durante a maturação do esmalte. Estas observações confirmam o trabalho de Reith (1963).

Recentemente, Hammarstrom e Hasselgren (1974) determi naram a presença de três tipos de fosfatase ácida em dentes hu manos e de macacos. Um dos tipos deu reação intensa nos amelo blastos reduzidos. Como esta enzima pertence ao sistema lisosso mal, este fato confirma os trabalhos de Ten Cate (1963) e de Sa kamoto e Sasaki (1969). Estes trabalhos poderiam explicar ainda a redução de concentração de grãos de Ag reduzida, e eliminação dos grânulos denominados de "material globular" (Wassermann, 1944) ou "glóbulos de maturação" (Marsland, 1952; Symon, 1962). Estes materiais são morfologicamente descritos nos ameloblastos no fi nal da região de secreção e início da região de pós-secreção,pa ra desaparecerem ã medida que os mesmos se aproximam da região incisal ou oclusal.

Do que foi exposto, torna-se ainda óbvio que os amel<u>o</u> blastos apresentam um papel regulador durante a maturação do e<u>s</u> malte. Contudo, para determinarmos este papel sobre a matriz <u>a</u> damantina seria necessário inibir o complexo enzimático da cél<u>u</u> la relacionado com a síntese protéica. Deste modo, poderíamos saber se a quebra da(s) proteína(s) da matriz é resultado de ação enzimática, alterações físico-químicas ou ação combinadade ambos os processos.

De qualquer modo, do que foi discutido, em relação aos nossos resultados em confronto com os dos demais autores, pod<u>e</u> mos afirmar que, dentro das condições em que este experimento foi

-29-

realizado, existe realmente a participação dos ameloblastos, d<u>u</u> rante sua fase secretora, na remoção de material orgânico no pr<u>o</u> cesso de maturação do esmalte.

### RESUMO E CONCLUSÕES

Para o estudo da participação dos ameloblastos secre tores na remoção de material orgânico da matriz jovem do esmal te, durante o processo de maturação, foram usados 40 camundon gos (Swiss Webster albinus) pesando entre 1,4 a 1,7 gramas. 24 animais receberam por via intraperitonial uma única dose de 40  $\mu$ Ci/peso total de Prolina (2,3,4,5- $^{3}$ H(N)) e foram sacrificados em grupos de 4, após 4, 24, 48, 72, 96 e 120 horas da injeção. De hemi-mandíbulas de 3 animais por idade foram obtidos cortes transversais por congelação. Hemi-mandíbulas de l animal de сa da idade foram fixadas em Bouin-Hollande (24 horas), descalcifi cadas em EDTA a temperatura ambiente e incluidas em parafina de modo a obter cortes transversais.

Cortes de 6µm de espessura, obtidos por ambas as té<u>c</u> nicas, foram radioautografados e, após exposição de 4 dias,rev<u>e</u> lados, corados com Hematoxilina e Eosina e montados.

Hemi-mandībulas dos 16 animais restantes foram util<u>i</u> zadas para observações morfológicas. Cortes transversais de 6µm de espessura, obtidos por congelação, ou cortes transversais e longitudinais na direção mésio-distal, obtidos por inclusão em parafina, foram corados com uma mistura de Azul de Toluidina e Fucsina Básica em Alcool Etílico ou Hematoxilina e Eosina e re<u>a</u> ção PAS.

As observações morfológicas foram realizadas na região labial de cortes longitudinais no sentido mésio-distal, obtidos pela técnica de inclusão em parafina. As mesmas demonstram que, aos zero dias de idade, se encontram formadas as regiões:embri<u>o</u> nária, diferenciação e secreção.A região de pos-secreção somente apareceu ãs 48 horas.

As análises dos radioautogramas de cortes obtidos por congelação demonstraram que os ameloblastos da região de secr<u>e</u>

ção, após apresentarem uma alta concentração de grãos de Agreduzida às 4 horas, sofrem um decréscimo nas 24 horas, para na  $48^{\frac{3}{4}}$  hora após a administração do composto radioativo apresentarem um aumento substancial daquela em sua região supra-nuclear.O aumento de concentração verificado às 48 horas permaneceu pratica mente inalterado até o final do experimento. Este comportamento não foi observado nos cortes obtidos por inclusão em parafina.

Comparando-se as técnicas empregadas, verificamos que os componentes orgânicos da matriz do esmalte e dos ameloblastos sofrem a ação dos agentes químicos empregados no processamento histológico rotineiro.

Isto significa que existe provavelmente uma quebra da(s) proteína(s) da matriz em desenvolvimento de que resultariam p<u>e</u> quenas frações de baixo peso molecular e, portanto, solúveis em agentes químicos empregados no processamento histológico de r<u>o</u> tina.

Por outro lado, com ambos os métodos, os ameloblastos encontrados na região de pos-secreção, a partir da 48ª hora apos a administração do composto radioativo, não mostraram nenhum a<u>u</u> mento significativo de concentração de material radioativo, se<u>n</u> do esta sempre inferior a encontrada nos ameloblastos da região de secreção em cortes obtidos por congelação.

Na matriz jovem do esmalte, a concentração em ambas as técnicas, após atingir o pico de intensidade máxima às 24 horas, decaiu às 48 horas para permanecer praticamente inalterada até o final do experimento. Isto ocorreu em ambas as regiões e foi mais pronunciada com a técnica de congelação, o que nos leva à especulação sobre a provável existência de uma fração orgânica lábil, ao lado de outra que permanece estável.

Estes dados — dentro dos limites em que o experimento foi realizado — permitem-nos concluir que os ameloblastos,dura<u>n</u> te o seu trajeto pela região de secreção, removem material org<u>â</u> nico da matriz jovem do esmalte. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BATTISTONE, G.C. & BURNETT, G.W. Studies of the composition of teeth. IV- The amino acid composition of human enamel protein. J.dent.Res., 35: 260-2, 1956 a.
- Studies of the composition of teeth. V-  $V_{\underline{a}}$ riations in the amino acid composition of dentin and enamel. J.dent.Res., 35: 263-72, 1956 b.
- BAYLINK, D.; WERGEDAL, J.; THOMPSON, E. Loss of proteinpolisac charides at sites where bone mineralization is initiated. J.Histochem.Cytochem., 20: 279-92, 1972.
- BELANGER, L.F. Autoradiographic detection of radiosulfate incor corpation by the growing enamel of rats and hamsters.<u>J.dent.</u> <u>Res.</u>, 34: 20-7, 1955.
- BLUMEN, G. <u>Aspectos da formação e maturação da matriz orgânica</u> <u>do esmalte em molares de Cavia porcellus, L. estudados radio-</u> <u>autograficamente</u>. São Paulo, 1970 (Tese (Doutoramento) - E. P.M.).

A MERZEL, J. The decrease in the concentration of o<u>r</u> ganic material in the course of formation of the enamel m<u>a</u> trix. Experientia, 28: 545-8, 1972.

Aspectos da formação e maturação da matriz orgânica do esmaite em molares de cobaia (<u>(avia porcellus,L.</u>), estudados radioautograficamente. <u>An.Acad.brasil.Ciên.</u>, <u>45</u>: 165-87, 1973.

A The loss of sulphated glycosaminoglycans du ring amélogenesis as revealed by autoradiography after in

-33-

jection of <sup>35</sup>S-sodium sulphate. Aceito para publicação em <u>Archs\_oral Biol.</u>, 1976.

- BURSTONE, M.S. Acid phosphatase activity of calcifying and den tin matrices. J.Histochem.Cytochem.,7: 147-8, 1959.
- CARNEIRO, J. <u>Estudo radioautográfico sobre síntese protéica.In</u> <u>corporação de Leucina, Metionina e Glicina radioativas (H<sup>3</sup>)</u> <u>em tecidos de camundongos</u>. Recife, 1959. (Tese (Livre - D<u>o</u> cência) - F.M.).
- CHASE, S.W. <u>Proc. of the dental centenary celebration</u>. Baltimo re, p. 425. Apud MARSLAND, E.A., op. cit. ref. 43.
- COSTACURTA, L. Autoradiography of incorporated Leucine-<sup>3</sup>H in enamel matrix and enamel organ of the upper incisor of the rat. Nucl.Med.,4: 186-92, 1964.
- A study of cell hight and nuclear volume in the en<u>a</u> mel organ during Amelogenesis in the upper incisor of the rat. J.dent.Res.,44: 1247-53, 1965.
- COTTON, W.R. & HEFFERREN, S.M. An autoradiographic study of tryptophane-<sup>3</sup>H incorporation into rat enamel and dentine m<u>a</u> trices. Archs oral Biol.,11: 1027-37, 1966.
- DEAKINS, M. Changes in the ash, water and organic content of pig enamel during calcification. J.dent.Res.,21:429-35,1942.
- DE DUVE, C. & WATTIAUX, R. Function of Lysosomes.<u>A.Rev.Physiol.</u>, 28:435-92, 1966.
- DROZ, B. & WARSHAWSKY, H. Reability of the radioautographic technique for the detection of newly synthesized protein. J.Histochem.Cytochem., 11: 426-35, 1963.

- EASTOE, J.E. Organic matrix of tooth enamel. <u>Nature</u>,187:411-12, 1960.
- The amino acid composition of proteins from the oral tissues. II- The matrix protein in dentin and enamel from developing human deciduous teeth. <u>Archs oral Biol.,8</u>: 633-52, 1963.
- \_\_\_\_\_ The changing nature of developing dental enamel. <u>Br.</u> dent.J.,121: 451-4, 1966.
- ELWOOD, K.W. & APOSTOLOPOULUS, A.X. Analysis of developing en<u>a</u> mel of the rat. I- Fractionation: Protein and Calcium co<u>n</u> tent. Calc.Tiss.Res.,17: 317-26, 1975.
  - & BERNSTEIN, M.H. The ultrastructure of the enamel o<u>r</u> gan related to the enamel formation. <u>Am.J.Anat.,122</u>:73-94, 1968.
- FUKAE, M. & SHIMIZU, M. Studies on the proteins of developing bovine enamel. Archs oral Biol., 19: 381-6, 1974.
- et alii. Studies on the biosynthesis of enamel proteins of rat by utilization of <sup>3</sup>H-proline. <u>J.dent.Res.,51</u>: 1298, 1972. (Abstract).
- GARANT, P.R. & NALBANDIAN, J. Observations on the ultrastruct<u>u</u> re of ameloblasts with especial reference to the Golgi com plex and related components. <u>J.Ultrastructure.Res.,23</u>:427-43, 1968.
- GLIMCHER, M.J.; FRIBERG, U.A.; LEVINE, P.T. The isolation and amino acid composition of the enamel proteins of erupted bo vine teeth. Biochem.J.,93:202-10, 1964.

- GLIMCHER, M.J. et alii. The amino acid composition of the organic matrix of decalcified fetal bovine dental enamel.<u>J.biol.</u> Chem.,236: 3210-3, 1961.
- GREULICH, R.C. & SLAVKIN, H.C. Amino acid utilization in the synthesis of enamel and dentin matrices as visualized by r<u>a</u> dioautography. LEBLOND, C.P. & WARREN, K.B., eds. In: <u>The</u> <u>use of radioautography in investigating Protein Synthesis</u>. New York, Academic Press, 1965. p. 199-214. (Symposia).
- GUENTER, H. et alii. Enamel proteins: identification of epith<u>e</u> lial-specific differentiation products. In: SLAVKIN, H.C. & GREULICH, R.C., eds. <u>Extra celular matrix influences on ge</u> ne expression. New York, Academic Press, 1975. p. 387-98.
- HAMMARSTROM, L.E. & HASSELGREN, H. Acid phosphatase in develo ping teeth and bone of man and macaque monkey. <u>Scand.J.dent</u>. Res.,82: 381-95, 1974.
- HESS; W.C. & LEE, C. The amino acid composition of proteins iso lated from the healthy enamel and dentin of carious teeth. J.dent.Res.,33: 62-4, 1954.
- HIRCHMAN, A. & DZIEWIATKOWSKY, D.D. Protein-polisaccharide loss during endocondral ossification: Immunochemical evidence. Science,154: 393-5, 1966.
- HWANG, W.S.S.; TONNA, A.E.; CROKITE, E.P. Localization and dis tribuition of tritiated histidine in growing mouse incisor. Nature,193: 896, 1962.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ An autoradiographic study of the mouse incisor tritiated histidine. <u>Archs oral Biol.,8</u>:377-95, 1963.

- KALLENBACH, E. Fine structure of rat incisor ameloblasts. <u>J.</u> Ultrastruct.Res.,22: 90-119, 1968.
- KATCHBURIAN, E.; KATCHBURIAN. A.V.; PEARSE, A.G.E. Histochemis try of lysosomal enzimes in developing teeth of albinusrats. J.Anat.,101: 783-92, 1967.
- & HOLT, S.J. Role of lysosomes in amelogenesis. <u>Natu</u>re,223: 1367-68, 1969.
- KENNEDY, J.S. & KENNEDY, G.D.C. Sulphated mucopolysaccharides in rodent teeth. J.Anat.,91: 398-408, 1957.
- KOPRIWA, B.M. & LEBLOND, C.P. Improvements in the coating tech nique of radioautography. <u>J.Histochem.Cytochem.</u>, <u>10</u>:269-78, 1962.
- KUMAMOTO, Y. & LEBLOND, C.P. Visualization of C<sup>14</sup> in the tooth matrix after administration of labeled hexoses. <u>J.dent.Res.</u> 37: 147-61, 1958.
- LEBLOND, C.P.; BELANGER, L.F.; GREULICH, R.C. Formation of bones teeth visualized by radioautography. Ann.N.Y.Acad.Sci., 60: 629-59, 1955.
- LEVINE, P.T. & GLIMCHER, M.J. The isolation and amino acid com position of the organic matrix and neutral soluble proteins of developing rodent enamel. <u>Archs oral Biol.,10</u>: 753-756, 1965.
- MARSLAND, E.A. A histological investigation of amelogenesis in rats. part. II- Maturation. Br.dent.J.,92: 109-19, 1952.
- MATTHIESSEN, M.E. Comparative enzyme histochemical studies on the development of teeth in man, pig and mouse. <u>Acta anat.</u>, 66: 375-86, 1967.

- PIEZ, K.A. Chemistry of the protein matrix of enamel. BUTCHER, E.O. & SOGNAES, F.R. eds. In: <u>Fundamentals of Keratinizan</u> <u>tion</u>. Washington, D.C., American Association for the Advan cement of Science, 1962. cap. 11, p. 173-84.
- PINDBORG, J.J. & WEINMANN, J.P. Morphologic and functional correlations in the enamel organ of the rat incisor during amelogenesis. Acta anat., 36: 367-81, 1959.
- QUINTARELLI, G. Enzime histochemestry of tooth germs. <u>Archo</u> It. Biol. orale,2: 1-25, 1961.
- REITH, E.J. The ultrastructure of ameloblasts during matrix for mation and the maturation of enamel. <u>J.biochem.Cytol.</u>, <u>9</u>: 825-40, 1961.

The ultrastructure of ameloblasts during early stages of maturation of enamel. J.cell Biol.,18: 691-6, 1963.

The early stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. J.Ultrastruct.Res.,17: 503-26, 1967.

\_\_\_\_\_ The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. J.Ultrastruct.Res.,30: 111-51, 1970.

& COTTY, V.P. The absorptive activity of ameloblasts during the maturation of enamel. Anat.Rec.,157:577-88, 1967.

SAKAMOTO, S. & SASAKI, S. Changes in catheptic activity in the enamel organ of bovine tooth germ during development. <u>Archs.</u> oral Biol.,14: 987-90, 1969.

SCHAJOWICZ, F. & CABRINI, R.L. Histochemical localization of Acid phosphatase in bone tissue. Science, 127: 1447-8, 1958.

SLAVKIN, H.C. Embryonic tooth formation; a tool for develop-

-38-

<u>mental Biology</u>. Copenhagen, Munksgaard, 1974. 136 p. (Oral Science reviews, 4).

- SEYER, J. Evolution of mineralizing tissues. In: SLAVKIN, H.C. ed. <u>The comparative molecular biology of extracelullar ma-</u> trices. New York, Academic Press, 1972. p. 273.
- & GLIMCHER, M.J. The content and nature of the carbo hydrate compounds of the organic matrix of embryonic bovine enamel. Biochim.biophys.Acta, 184: 509-22, 1969.
- & \_\_\_\_\_ The isolation of phosphorylated polypeptide components of the organic matrix of embryonic bovine enamel. Biochim.byophys.Acta, 236: 279-91, 1971.
- & VINCENT, E. Evolution of mineralizing tissues. In: SLAVKIN, H.C., ed. <u>The comparative molecular biology of ex</u> <u>tracellular matrices</u>. New York, Academic Press, 1972. p. 276-89.
- STACK, M.V. Organic constituents of enamel. J.Am.dent.Ass.,48: 297-366, 1954.
- SUGA, S. Amelogenesis. Some histological and histochemical ob servations. Int.dent.J., 9: 394-419, 1959.
- SUNDSTROM, B. New aspects on the utilization of inorganic sul phate during dentin formation. Histochimie, 26: 61-6, 1971.
- SYMONS, N.B.B. Globular structures associated with the completion of the enamel matrix in the rat. <u>J.dent.Res.,41</u>:55-60, 1962.
- TEN CATE, A.R. The distribuition of hydrolytic enzimes and li pids in the enamel epithelium of man and macaque monkey. <u>Ar</u>chs oral Biol.,8: 755-63, 1963.

- WARSHAWSKY, H. The finestructure of secretory ameloblasts in rat incisors. Anat.Rec.,161: 211-29, 1968.
  - \_\_\_\_\_ & SMITH, C.E. Morphological classification of rat in cisor ameloblasts. Anat.Rec., 179: 423-46, 1974.
- ; LEBLOND, C.P.; DROZ, B. Synthesis and migration of proteins in the cells of the exocrine pancreas as revealed by specific activity determination from radioautography. J. cell Biol., 16: 1-23, 1963.
- WASSERMANN, F. Analysis of the enamel formation in the continuously growing teeth of normal and vitamin C deficient guinea pigs. J. dent. Res., 23: 463-509, 1944.
- WEINMANN, J.P.; WESSINGER, G.D.; REED, G. Correlation of chemi cal and histological investigations on developing enamel. J.dent.Res., 21: 171-82, 1942.
- WEINSTOCK, A. Matrix development in meneralizing tissues as shown by radioautography: Formation of enamel and dentin.In: SLAVKIN, H.C., ed. <u>Developmental aspects of oral Biology</u>. New York, Academic Press, 1972. cap. 10, p. 201-42.

& LEBLOND, C.P. Elaboration of the matrix glycoprotein of enamel by the secretory ameloblasts of the rats incisor as revealed by radioautography after galactose-<sup>3</sup>H injection. J.cell Biol.,51: 26-37, 1971.

WERGENDAL, J.E. & BAYLINK, D.J. Distribuition of acid and alka line phosphatase activity in undemineralized sections of rat tibial diaphysis. J.Histochem.Cytochem., <u>17</u>: 799-806, 1969.