

DOS DENTES DE *Spheroides testudineus* (BAIACU-MIRIM). ESTUDO DO ENAMELÓIDE AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO, À LUZ POLARIZADA, POR MÉTODOS HISTOQUÍMICOS E SOB AÇÃO DA COLAGENASE

Alfredo PEREIRA NETO*

Roberto Domingos ANDREUCCI*

RESUMO: Utilizando a microscopia eletrônica, à luz polarizada, métodos histoquímicos e a ação da collagenase estudamos alguns aspectos da matriz do enamelóide dos dentes do baiacu, *Spheroides testudineus*, concluindo que neste peixe essa matriz está baseada em trama fibrilar constituída de fibras colágenas e por substância cimentante rica em mucopolissacarídeos ácidos e neutros, associados a proteínas cujos aminoácidos detectados são aqueles que fazem parte das estruturas adamantinas de mamíferos; que essa matriz prossegue em sua mineralização, mesmo depois de inteiramente formada, quando sofre um amadurecimento progressivo, como se fora esmalte.

UNITERMOS: Enamelóide; matriz enameloidal, dentino-componentes; amelo-componentes.

INTRODUÇÃO

Vários autores estudaram os tecidos dos dentes de baiacus: alguns^{2, 3, 4, 5, 8, 27} descreveram como formados de dentina, outros de esmalte e dentina³⁸ ou de esmalte²⁵. THOMASSET³⁶ assegura que a dentina dos tetraodontídeos é de tipo muito particular, assemelhando-se ao esmalte tubular, que por sugestão de MOSS, APPLEBAUM²³, passou a ser conhecido por esmalte fibroso. Ganhando aceitação mais ampla³⁷, passou a designar o tecido altamente mineralizado dos dentes de peixes, que contém túbulos com prolongamentos odontoblásticos, à maneira de dentina, mas que pela desmineralização é removido como se fora esmalte. Este tecido atraiu a atenção de dois tipos de observadores: uns que o estudaram sem criar novas denominações^{16, 17, 18, 19, 20, 41, 42}; outros que o fizeram procurando relacioná-lo com a dentina ou com o esmalte. Por isso é também conhecido por vitrodentina³¹ e durodentina³⁴ ou como esmalte placóide¹³ e esmalte mesodérmico²⁶. Concluindo pela impropriedade desses termos e assegurando que nenhum recebeu consagração universal, POOLE²⁹ rotulou

este tecido de amelóide. Fazendo o primeiro estudo radioautográfico do amelóide deste peixe^{5, 6}, tivemos a primazia de afirmar que se trata de um tecido ectodérmico, ou seja, amelodentinário, onde coexistem dois tipos de componentes: uns que lembram a dentina (dentino-componentes); outros que se aproximam do esmalte (ameloblastos). Posteriormente⁷, conceituamos o que é “osso” e o que é “dente” nos Tetraodontóidea, concluindo que os “odontoblastos” co-responsáveis (juntamente com os “ameloblastos”) pela produção do amelóide, após cessarem esse trabalho, produzem na porção basal deste tecido uma fina porção de osteodentina, que geralmente preenche o espaço entre duas peças do amelóide da mesma pilha. Portanto embora da mesma textura da osteodentina produzida na cavidade dental (osteodentina cavitária) ela é de origem distinta. Assim o dente de *Spheroides* é a “peça” de amelóide acrescida do tecido osteodentinário subjacente (osteodentina ameloidal), onde se abrigam, em canais pseudohaversianos de Lison, os corpos dos “odontoblastos”. Agora é nosso propósito através dos métodos mencionados estudar o amelóide dos dentes de *Spheroides testudineus* a fim de minudenciar alguns aspectos estruturais e de composição de sua matriz.

MATERIAL E MÉTODOS

Microscopia eletrônica – Utilizamos hemimaxilas e hemimandíbulas de onde retiramos dentículos em formação. Foram fixados em solução gelada de tetróxido de ósmio a 1%, em tampão de fosfato de sódio a 0,1M a pH 7,15, submetidos a solução aquosa de ácido tricloroacético a 5%, incluídos em resina Epon e cortados em ultramicrotomo do tipo Porter-Blum (\pm 20nm de espessura); posteriormente, “corados” pelo acetato de urânio e citrato de chumbo foram levados ao microscópio eletrônico Siemens I.

Polarização – Hemimaxilas e hemimandíbulas maceradas foram cortadas sob jato d’água fria, obtendo-se finas lamelas, desgastadas e polidas segundo os cuidados recomendados por SCHMIDT³⁴. Fotografamos sob luz polarizada a matriz ameloidial de dentes mineralizados com objetivas planocromáticas e filme Agfacolor 50 ASA.

Histoquímica – Hemimaxilas e hemimandíbulas fixadas em Gendre e Bouin (para polissacarídeos) ou formol a 10% (para proteínas) foram descalcificadas em EDTA a 9%, saturado e filtrado, incluídas em parafina e cortadas em microtomo convencional. Os métodos utilizados para a detecção de polissacarídeos (P. A. S.; Alfa amilase + P. A. S.; Acetilação + P. A. S.; Ferro coloidal; Alcian blue pH 2,5; Alcian blue pH 0,5; Alcian blue pH 2,5 + P. A. S.) e de proteínas (Millon, modificado por Bensley e Gersh; Millon, após bloqueio pela iodação; Lison e Pinheiro, após bloqueio por ácido perfórmico; Sakaguchi, após bloqueio pela Benzoilação; Adams e Sloper – PFAAL; Adams, ferricianeto férrico; Adams, após bloqueio pela Iodoacetamida) são de conhecimento público, sendo encontrados nos vários tratados de histoquímica, todos sobejamente difundidos.

Colagenase – Hemimaxilas e hemimandíbulas fixadas em Bouin foram descalcificadas em solução aquosa de ácido tricloroacético a 5%, desidratadas, diafanizadas

e incluídas em parafina, por métodos rotineiros. Cortes contendo dentículos em formação foram divididos em três grupos: no primeiro usamos colagenase purificada cromatograficamente da Worthington Biochemical Corporation (Freehold – New Jersey, USA), no segundo da Sigma Chemical Company (St. Louis – Missouri, USA) e no terceiro da Nutritional Biochemical Corporation (Cleveland – Ohio, USA). A digestão foi feita segundo CARNEIRO & LEBLOND¹⁰, ficando os preparados sob ação da enzima por 5 horas, sendo corados por H. E. ou pelo Mallory. A ilustração desta técnica foi obtida com objetivas planocromáticas e filme Agfacolor 50 ASA.

RESULTADOS

Os resultados, presentes nas Figuras 1 (microscópio eletrônico), 2 (colagenase) e 3 (polarização) podem ser assim resumidos: examinado ao microscópio eletrônico, o material permitiu a identificação de microfibrilas com periodicidade axial de 64nm (Fig. 1). A colagenase digeriu a osteodentina de maxilas e mandíbulas e o conjuntivo em torno dos dentículos em formação, nas cavidades dentais (Fig. 2). Esses dentículos que se coram em azul pelo tricrômico, neste caso foram corados em sua maioria em tom avermelhado. Não notamos diferença de ação nas marcas de enzima empregadas. Assim os resultados de CARNEIRO & LEBLOND¹⁰ para o camundongo, onde os preparados devem permanecer sob a ação da enzima por aproximadamente 5 horas, também são válidas para o baiacu. Com a polarização identificamos aumento na birrefringência do enamelóide dos dentículos completamente formados e empilhados, indo da base para o topo das pilhas (Fig. 3). Os resultados histoquímicos estão representados pelas Tabelas 1 e 2.

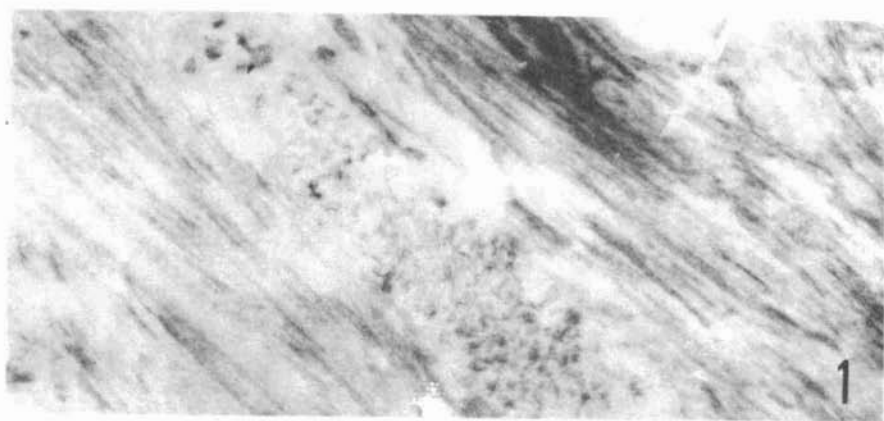


FIG. 1 – Micrografia eletrônica (32.000 X) de um dentículo, mostrando microfibrilas com periodicidade axial de 64nm.



FIG. 2 – Premaxilar descalcificado, tratado pela colagenase, corado pelo tricrômico de Mallory (40 X), onde a enzima digeriu: A, o colágeno do conjuntivo distribuído em torno de dentículos; D, estruturas fibrilares da matriz enameoidal.

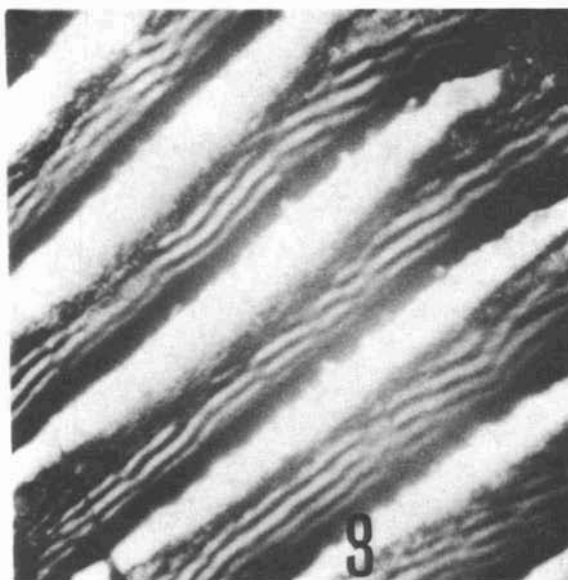


FIG. 3 – Pilha de dentículos de dentário desgastado sagitalmente (60 X); percorrendo-a de baixo para cima observa-se aumento na birrefringência dos dentículos.

TABELA 1 – Resultados de detecção histoquímica de polissacarídeos (1) e proteínas (2) nos denticulos de *Spheroides testudineus* (baiacu)

Tab. 1

Métodos	Grupo evidenciado ou bloqueado	Resultados
PAS	vic-glicol (CHOH-CHOH) (evidenciado)	+
Alfa amilase + PAS	vic-glicol (CHOH-CHOH) (evidenciado)	+
Acetilação + PAS	vic-glicol (CHOH-CHOH) (bloqueado)	-
Ferro coloidal	glicídeos com função ácida (COOH e OSO ₃ H) (evidenciado)	+
Ferro coloidal, após ação da hialuronidase testicular	glicídeos com função ácida (OSO ₃ H – tipo B) (evidenciado)	+
Metilação + Ferro coloidal	bloqueio dos grupos com função ácida (COOH e OSO ₃ H)	-
Metilação + Saponificação + Ferro coloidal	evidenciação dos grupos carboxila (COOH)	-
Alcian blue pH 2,5	glicídeos com função ácida (COOH e OSO ₃ H) (evidenciado)	+
Alcian blue pH 0,5	glicídeos com função ácida (OSO ₃ H) (evidenciado)	+
Alcian blue pH 2,5 + PAS	polissacarídeos neutros e ácidos	+ (violeta)

TABELA 2 – Resultados de detecção histoquímica de polissacarídeos (1) e proteínas (2) nos dentículos de *Spheroides testudineus* (baiaçu)

Tab. 2

Métodos	Radical evidenciado ou bloqueado	Resultados
Millon (modificado por Bensley e Gersh)	p. hidroxi-fenila (Tirosina) (evidenciado)	+
Millon, após bloqueio pela Iodação	p. hidroxi-fenila (Tirosina) (bloqueado)	-
Lison e Pinheiro	beta-indolila (Triptófano) (evidenciado)	+
Lison e Pinheiro, após bloqueio p/ ac. per fórmico	beta-indolila (Triptófano) (bloqueado)	-
Sakaguchi (modif. por Baker)	guanidina (Arginina) (evidenciado)	+
Sakaguchi, após bloqueio pela Benzoilação	guanidina (Arginina) (bloqueado)	-
Adams e Sloper (PFAAL)	dissulfeto (-S-S) (evidenciado)	-
Adams (ferricianeto férrico)	sulfidril (-SH) (evidenciado)	+
Adams, após bloqueio pela Iodoacetamida	sulfidril (-SH) (bloqueado)	-

DISCUSSÃO

A microscopia eletrônica permitiu identificar no enamelóide dos dentículos em formação nas cavidades dentais a presença de fibrilas com periodicidade axial de 64 nm, o que equivale a colágeno, uma vez que a especificidade da enzima utilizada permite que ela remova somente o colágeno^{12, 21, 40}. Isso foi feito removendo-o da osteodentina de maxilas e mandíbulas, do conjuntivo que se distribui em torno de dentículos em formação e das estruturas fibrilares dos próprios dentículos. Nestes o

enamelóide se cora em azul pelo Tricrômico, mas sem o colágeno corou-se em tom avermelhado, à semelhança da matriz orgânica do esmalte, pois, sendo a enzima específica, não digeriu os componentes enameloïdais que lembram tal tecido adamantino. O colágeno é, portanto, um dos referidos dentino-componentes desta matriz enameloïdal. Essa trama fibrilar é unida por substância cimentante rica em polissacarídeos ácidos e neutros, associados a proteínas cujos aminoácidos detectados (tirosina, arginina, triptófano e cisteína) são aqueles que fazem parte de estruturas enameloïdais^{11, 15, 22, 28, 30, 32, 33}. As reações histoquímicas para proteínas permitem afirmar que os dentículos em formação têm glicoproteínas neutras (mucopolissacarídeos neutros) em seu enamelóide, cujos aminoácidos do componente protéico são: tirosina, arginina, triptófano e cisteína. As reações para polissacarídeos permitem identificar mucopolissacarídeos ácidos sulfatados (possivelmente ácido condroitinsulfúrico – tipo B), componentes não-protéicos de glicoproteína encontrada. Foram localizados mucopolissacarídeos fortemente sulfatados na matriz orgânica do esmalte^{9, 14, 32, 39}; assim, nos referimos agora a amelo-componentes desta matriz enameloïdal. Levando em conta os resultados obtidos e as considerações feitas, acreditamos lícito afirmar que este enamelóide é formado por matriz baseada em trama fibrilar constituída de fibras colágenas e por substância cimentante rica em mucopolissacarídeos ácidos e neutros, associados a proteínas cujos aminoácidos detectados são aqueles que normalmente fazem parte das estruturas adamantinas de mamíferos.

Com a polarização, pelo aumento da birrefringência³⁹, o enamelóide dos dentículos completamente formados torna-se mais calcificado à medida que progride da base para o topo das pilhas (superfície mastigatória), onde os dentículos se tornarão funcionais. Comprovamos assim não somente uma dedução já feita^{1, 2, 3, 4, 8, 24, 27, 38} como também o fato da matriz prosseguir em sua mineralização, mesmo depois de inteiramente formada; sofre então um amadurecimento progressivo, como se fora esmalte e que deve depender dos amelo-componentes.

Tais resultados quanto ao enamelóide do dentículo em formação ou em amadurecimento são concordes com SHELLIS, MILES³⁵ em *Anguilha anguilha* e *Labrus bergylta*, onde, nos tecidos enameloïdais, a proteína secretada pelos “odontoblastos” é colágeno e as proteínas secretadas pelos “ameloblastos” que se difundem na matriz enameloïdal pré-formada são semelhantes àquelas da matriz protéica do esmalte de mamíferos, em organização e composição; onde os tecidos enameloïdais perdem por redução todas suas fibras colágenas durante a maturação (mas não antes do processo de mineralização ter início); onde, finalmente, a maturação se dá como se fora esmalte.

CONCLUSÕES

A matriz do enamelóide dos dentes de *Spheroides testudineus* está baseada em trama fibrilar constituída de fibras colágenas e por substância cimentante rica em mucopolissacarídeos ácidos e neutros, associados a proteínas cujos aminoácidos detectados são aqueles que fazem parte das estruturas adamantinas de mamíferos; ela prossegue em sua mineralização, mesmo depois de inteiramente formada, quando sofre um amadurecimento progressivo, como se fora esmalte.

PEREIRA NETO, A., ANDREUCCI, R. D. Study of the enameloid from the *Spheroides testudineus*'s teeth (globefish) by using polarized light, histochemical methods and collagenase action. *Rev. Odont. UNESP, São Paulo*, v. 20, p. 41-50, 1991.

ABSTRACT: *By studying some aspects of the enameloid matrix of the globefish's teeth, Spheroides testudineus, we conclude that in this fish, the matrix is based upon a fibrillar network of collagen fibers and cementing substance rich in acid and neutral mucopolysaccharides associated to proteins in which the amino-acids are the ones that take part in the mammalian adamantine structures. This matrix goes on in its mineralization even after it has been completely formed, when it suffers a progressive maturation like the proper enamel.*

KEYWORDS: *Enameloid; enameloid matrix; dentine-components; amelo-components.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREUCCI, R.D. Aspectos morfológicos, macro e microscópico dos dentes de *Spheroides testudineus* (L., 1735) (*baiacu*). São José dos Campos: UNESP, 1966. Tese (Doutorado) – Fac. Odont. São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 1966.
2. ANDREUCCI, R.D. Aspectos estruturais dos dentes de *Spheroides testudineus*. *Rev. Ass. Paul. Cirurg. Dent.*, v. 20, p. 252-7, 1966.
3. ANDREUCCI, R.D. Aspectos anatômicos dos dentes de *Spheroides testudineus*. *Rev. Ass. méd. bras.*, v. 14, p. 245-6, 1968.
4. ANDREUCCI, R.D. Macroscopic and microscopic morphology of *Spheroides testudineus* teeth (checkered puffer). *Acta anat.*, v. 71, p. 448-71, 1968.
5. ANDREUCCI, R.D. *Dos dentes de Spheroides testudineus* (L., 1735) (*baiacu-mirim*). *Estudo radioautográfico e à luz polarizada*. São José dos Campos: UNESP, 1969. Tese (Livre-Docência) – Fac. Odont. São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 1969.
6. ANDREUCCI, R.D., BLUMEN, G. Radioautographic study of *Spheroides testudineus* denticles (checkered puffer). *Acta anat.*, v. 79, p. 76-83, 1971.
7. ANDREUCCI, R.D., BRITSKI, H.A., CARNEIRO, J. Structure and evolution of tetraodontoid teeth: an autoradiographic study (Pisces, Tetraodontiformes). *J. Morph.*, v. 171, p. 283-92, 1982.
8. ARSUFFI, R. Beiträge zur Vergleichenden Histologie und Histogenese der Zähne. Untersuchungen am Gebis von Labridae, Sparidae und Gymnodontes. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, v. 29, p. 670-93, 1939.
9. BELANGER, L.F. Autoradiographic detection of radiosulfate incorporation by the growing enamel of rats and hamsters. *J. dent. Res.*, v. 34, p. 20-7, 1955.
10. CARNEIRO, J., LEBLOND, C.P. Suitability of collagenase treatment for the radioautographic identification of newly synthesized collagen labeled with glycine. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 14, p. 334-44, 1966.

11. EASTOE, J.F. Organic matrix of tooth enamel. *Nature*, v. 187, p. 411-2, 1960.
12. GRANT, N.H., ALBURN, H.E. Studies of the collagenases of *Cl. histolyticum*. *Arch. Biochem.*, v. 82, p. 245-55, 1959.
13. JAEKEL, O. Über die Gattung *Pristophorus*. *Arch. Naturgesch.*, v. 57, p. 15-20, 1891.
14. KENNEDY, J.S., KENNEDY, G.D.C. Sulfate mucopolysaccharides in rodent teeth. *J. Anat.*, v. 91, p. 398-408, 1957.
15. KÉREBEL, B. Les structures organiques de l'émail et les théories protéolytiques des caries. *Arch. oral Biol.*, v. 4, p. 107-19, 1961.
16. KERR, T. Development and structure of some actinopterygian and urodele teeth. *Proc. zool. Soc. Lond.*, v. 133, p. 401-22, 1960.
17. LEVY, G. Sulla calcificazione dello smalto nei Teleostei. Esperienze di colorazione vitale con alizarina. *Bull. Histol. Techn. Micr.*, v. 16, p. 121-7, 1939.
18. LEVY, G. Études sur le développement des dents chez les Teleostéens – I. Les dents de substitution chez les genres *Phidium*, *Trigla*, *Rhombus*, *Belone*. *Arch. Anat. Micr. Morphol. exp.*, v. 35, p. 101-46, 1939.
19. LEVY, G. Études sur le développement des dents chez les Teleostéens – II. Développement des dents pourvues de dentine trabeculaire. (*Esox*, *Sphyaena*). *Arch. Anat. Micr. Morphol. exp.*, v. 35, p. 201-21, 1939.
20. LEVY, G. Études sur le développement des dents chez les Teleostéens – III. Développement des dents de substitution de *Merlucius*, *Chrysophrys*, *Cepola*, *Lophius*. *Arch. Anat. Micr. Morphol. exp.*, v. 35, p. 415-55, 1939.
21. MANDL, I. Collagenase and elastases. *Adv. Enzymol.*, v. 23, p. 163-248, 1961.
22. MATTHIESSEN, M.E. Histochemical studies of the prenatal development of human deciduous teeth. *Acta anat.*, v. 55, p. 201-23, 1963.
23. MOSS, M.L., APPLEBAUM, E. The fibrillar matrix of Marsupial enamel. *Acta anat.*, v. 53, p. 289-97, 1963.
24. OWEN, R. Sur la structure microscopique et les developpment des dents des poissons gymnodontes. *Ann. Sci. Nat.*, v. 12, p. 347-52, 1839.
25. ORVIG, T. Histologic studies of Placoderms and fossil Elasmobranchs. I – The endoskeleton with remarks on the hard tissues of lower vertebrates in general. *Ark. Zool.*, v. 2, p. 321-454, 1951.
26. PEREIRA NETO, A. *Estudo histoquímico de polissacarídeos e proteínas em dentes de baiacu (Spheroides testudineus) (L., 1735)*. São José dos Campos: UNESP, 1969. Tese (Doutorado) – Fac. Odont. São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 1969.
27. PFLUGFELDER, O. Das Gebiss der Gymnodontem. Ein Beitrag zur Histogenese der Dentin. *Z. Anat. EntwGesch.*, v. 93, p. 543-66, 1930.
28. PHILIPPI, J. Detecção histoquímica de polissacarídeos, lipídeos, proteínas e fosfatase alcalina em ameloblastos de germes dentais de rato (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia). *Rev. Fac. Odont. São Paulo*, v. 3, p. 45-62, 1965.
29. POOLE, D.F.G. Phylogeny of tooth tissues; enameloid and enamel in recent vertebrates, with a note on the history of cementum. In: MILLES, A.E.W. – *Structural and chemical organization of teeth*. London, Academic Press, 1967. v. 1, p. 111.

30. POURTOIS, M. Contribution à l' étude des bourgeons dentaires chez la Souris. II, Phases de cytodifferentiation, d' elaboration organique et de mineralization. *Arch. Biol.*, v. 73, p. 225-309, 1962.
31. ROSE, C. Ueber die verschiedenem Abänderungen der Hartgewebe beiniedereren Wirbeltieren. *Anat. Anz.*, v. 14, p. 16-69, 1898.
32. SASSO, W.S., CASTRO, N.M. Histochemical study of amelogenesis and dentinogenesis. *Oral Surg.*, v. 10, p. 1323-9, 1957.
33. SASSO, W.S., LONGHI, L., VILLA, N. Estudo histoquímico dos "grânulos de secreção" dos ameloblastos. Sua relação com a matriz do pré-esmalte. *Rev. Fac. Odont. São Paulo*, v. 5, p. 5-17, 1967.
34. SCHIMDT, W.J. Polarisationsoptische Untersuchung schmelzartiger Aussenschichten des Zahnbeins von Fischen – II. Das porzellanartige Dentin (Durodentin) der Selachier. *Z. Zellforsch.*, v. 30, p. 235-72, 1940.
35. SHELLIS, R.P., MILES, A.E.W. Autoradiographic study of the formation of enameloid and dentine matrices in teleost fishes using tritiated amino acids. *Proc. roy Soc. London B.*, v. 185, p. 51-72, 1974.
36. THOMASSET, J.J. Recherches sur les tissus de poissons fossiles. *Arch. Anat. Histol. Embryol.*, v. 11, p. 5-153, 1930.
37. TOMES, C. Upon Rose's proposed classification of the forms of dentin. *Anat. Anz.*, v. 14, p. 343-8, 1898.
38. TRETJAKOFF, D. Die Zähne der Plectognathen. *Z. wiss. Zool.*, v. 127, p. 619-44, 1926.
39. VERNE, J., WEILL, R. Données histologiques nouvelles sur la genèse de la matrice protéique de tissus durs de la dent. *Presse méd.*, v. 61, p. 427-8, 1953.
40. YOSHIDA, E., NODA, H. Studies on collagenase. *Collagen Curr.*, v. 5, p. 38, 1964.
41. WEIDENREICH, F. Ueber den Bau und die Entwicklung des Zahnbeins in die Reith der Wirbeltiere (knochenstudien IV teil). *Z. Anat. EntwGesch.*, v. 76, p. 218-60, 1925.
42. WEIDENREICH, F. Ueber den Schmelz der Wirbeltiere und seine Beziehung zum Zahnbein. *Z. Anat. EntwGesch.*, v. 79, p. 292-351, 1926.

Recebido para publicação em 25/6/1990.