

ORIENTAÇÃO DO COLÁGENO E CRISTAIS DE APATITA EM TECIDOS MINERALIZADOS DE PEIXES E RÉPTEIS. ESTUDO COM LUZ POLARIZADA

MOACYR PINHEIRO MONTEIRO

Professor Livre Docente do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
(recebido em 22.VIII.1983)

RESUMO - Estudando dentes e tecido ósseo de peixes e répteis, o autor mostra que as fibras colágenas e cristais de apatita dessas estruturas mineralizadas se dispõem de forma organizada em torno das cavidades, canais ou canaliculos. Colágeno e cristais de apatita, ambos com a mesma orientação, se arranjam de maneira concêntrica e alternada, isto é, a uma camada colocada circularmente segue-se outra com orientação longitudinal à estrutura estudada.

Unitermos: Histologia comparada, luz polarizada, colágeno, cristais de apatita, estruturas mineralizadas.

ABSTRACT - The Author has studied bone and dentine of fishes and reptiles under polarizing microscopy. The collagen and apatite crystals of these mineralized tissues are arranged in an ordered fashion around cavities, canals or dentinal tubules. Both collagen and apatite crystals have the same orientation. In the structures studied they are concentrically arranged in alternate layers, one being circularly and the next longitudinally orientated.

Uniterms: Comparative histology, polarized light, collagen, apatite crystals, mineralized structures.

INTRODUÇÃO

A orientação do colágeno e dos cristais de apatita nos tecidos mineralizados dos animais não é assunto novo. Já von Ebner, em 1875, se refere ao fato quando trata da estrutura do tecido ósseo.

Com o emprego da luz polarizada em microscopia, novos dados foram acrescentados aos conhecimentos e, desde então, numerosos autores se preocuparam com o assunto. O material pesquisado é abundante e grande o número de trabalhos publicados.

Falta, no entanto, sistematizar os conhecimentos adquiridos e estabelecer as relações entre as várias estruturas observadas.

O objetivo do trabalho é estudar a disposição das fibras colágenas e cristais de apatita em relação aos canais e cavidades de tecidos mineralizados em Peixes e Répteis. Pretendemos verificar seu comportamento em cada um dos animais e também testar a hipótese de uma provável organização semelhante em todos eles.

MATERIAL E MÉTODOS

O material reunido para o estudo consiste de tecidos mineralizados (ossos e dentes), macerados e secos, de Peixes e Répteis, distribuídos de acordo com a relação seguinte:

Chondrichthyes			
Galeiformes	Isuroidei	Odontaspidae	<i>Odontaspis taurus</i>
	Carcharhinoides	Carcharhinidae	<i>Galeocerdo cuvier</i>
Rajiformes	Dasyatoidei	Myliobatidae	<i>Myliobatis aquila</i>
Osteichthyes			
Cypriniformes	Characoidei	Characidae	<i>Serrasalmus</i> sp. <i>Myleus</i> sp. <i>Hoplias malabaricus</i>
Perciformes	Percoidei	Lutianidae	<i>Lutianus</i> sp.
Reptilia			
Squamata	Sauria	Teiidae	<i>Tupinambis teguixin</i>
	Serpentes	Viperidae	<i>Crotalus terrificus</i>
	Crocodylia	Crocodylidae	<i>Paleosuchus trigonatus</i>

Os animais foram obtidos das seguintes fontes: *Odontaspis taurus* e *Galeocerdo cuvier*, da Base Sul do Instituto Oceanográfico da USP (Dr. Victor Sadowsky); *Crotalus terrificus*, do Instituto Butantã (Dr. Helio Belluomini); *Myliobatis aquila*, *Serrasalmus* sp., *Myleus* sp., *Hoplias malabaricus*, *Lutianus* sp., *Tupinambis teguixin* e *Paleosuchus trigonatus*, do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Prof. Octavio Della Serra).

O material foi cortado segundo planos transversais e longitudinais orientados em relação aos eixos dos dentes e também em relação aos canais de Havers do osso ou canais dos dentinários.

As fatias obtidas por desgaste, cuja espessura variou entre 0,330 mm a 0,055 mm - consideradas razoáveis para o estudo com luz polarizada (Monteiro, 1969) - foram montadas em água destilada segundo a técnica preconizada por Hals (1958) e fotografadas com luz polarizada num Fotomicroscópio Zeiss. Para que pudéssemos obter a orientação exata do colágeno e dos cristais de apatita, duas lamelas de uma mesma estrutura

eram submetidas a tratamentos diferentes: de uma delas retirávamos o colágeno mediante cocção em glicerina e hidróxido de potássio, segundo a técnica de Schmidt e Keil (1971) e de outra retirávamos o mineral pela descalcificação em EDTA (solução a 5%, pH 7) durante três dias, à temperatura ambiente (24 a 28°C), em vidros de relógio e câmara úmida. Com isso foi possível determinar, no primeiro caso, a orientação dos cristais de apatita e no segundo, a orientação do colágeno.

A vantagem desse tipo de procedimento reside no fato de permitir a comparação de cortes semelhantes, antes macerados e depois descalcificados ou descolagenizados.

RESULTADOS

As estruturas por nós estudadas, nesses animais, são as seguintes:

- osteodentina (Lison, 1954)
- pseudodentina (Thomasset, 1930)
- vasodentina (Tomes, 1914)
- ortodentina (Röse, 1898)
- ortodentina vascularizada (Lison, 1954)
- osso de inserção (Noble, 1969)

Orientação do colágeno

Osteodentina

A observação feita com microscopia de polarização, onde se acrescentou o compensador vermelho de primeira ordem (Rot I), indica que o colágeno da substância fundamental da osteodentina tem uma disposição orientada em relação aos canais vasculares. Os cortes transversais dessas estruturas mostram que os quadrantes negativos brilham em azul e os positivos em amarelo, indicando que as fibras colágenas são orientadas, de um modo geral, circularmente em relação ao canal vascular (Fig. 1) Observando-se, no entanto, com mais cuidado, essas zonas coloridas, verifica-se que existem nelas faixas finas, concêntricas aos canais, que se apresentam, nos quatro quadrantes, de cor avermelhada (cor de fundo), o que indica se tratar de faixas de comportamento isotrópico (Fig. 2 e 3) Ora, os cortes longitudinais a esses canais vasculares apresentam um fenômeno diferente: colágeno paralelamente colocado em relação ao longo eixo do canal e faixas finas, de comportamento isotrópico, intercaladas.

Esses dados nos levam a conclusão de que essas finas faixas isotrópicas, vistas em cortes transversais, concêntricas aos canais, nada mais são do que regiões onde o colágeno assume orientação paralela ao longo eixo do canal.

Os canaliculos dentinários da osteodentina apresentam um arranjo semelhante. Nos cortes transversais dessas estruturas, observados em grande aumento, vê-se cruzeiros de polarização negativos, isto é, idênticas aquelas que são vistas em torno dos canais vasculares. Quadrantes negativos em azul e positivos em amarelo revelam colágeno orientado circularmen-

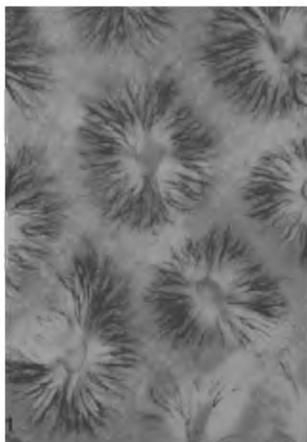


Figura 1 - *Myliobatis aquila*. Osteodentina. Corte transversal aos canais vasculares Desgaste. 137 X.

te aos canalículos dentinários. Os cortes longitudinais aos canalículos revelaram, aqui também, colágeno disposto paralelamente a eles.

Podemos portanto dizer que, em torno dos canalículos dentinários da osteodentina, o colágeno dispõe-se segundo dupla orientação: circular e longitudinal.

A osteodentina, tal como a descrevemos, foi encontrada no *Odontaspis taurus* e *Myliobatis aquila*.

Pseudodentina

A pseudodentina pode ser encontrada revestindo, externamente osteodentina ou uma cavidade pulpar. Tanto num como no outro caso, considerando-se o dente como um todo, verificamos que nele o colágeno está orientado segundo duas direções principais: circular e longitudinal.

Tem-se a impressão que o dente, assim considerado, tem a mesma disposição estrutural que a da osteodentina, descrita anteriormente, isto é, o colágeno se arranja em camadas concêntricas e, alternadamente, circulares e longitudinais. Aqui, no entanto, a alternância das camadas circulares e longitudinais não é tão regular como na osteodentina. Há predominância de colágeno disposto circularmente junto à porção interna (cavidade pulpar ou osteodentina) e, na região mais externa, orienta-se, predominantemente, no sentido longitudinal.

Os canalículos dentinários da pseudodentina também se apresentam circundados por colágeno com dupla orientação (Fig. 4).

A pseudodentina foi estudada nos dentes do *Odontaspis taurus* e *Galeocerdo cuvier*.

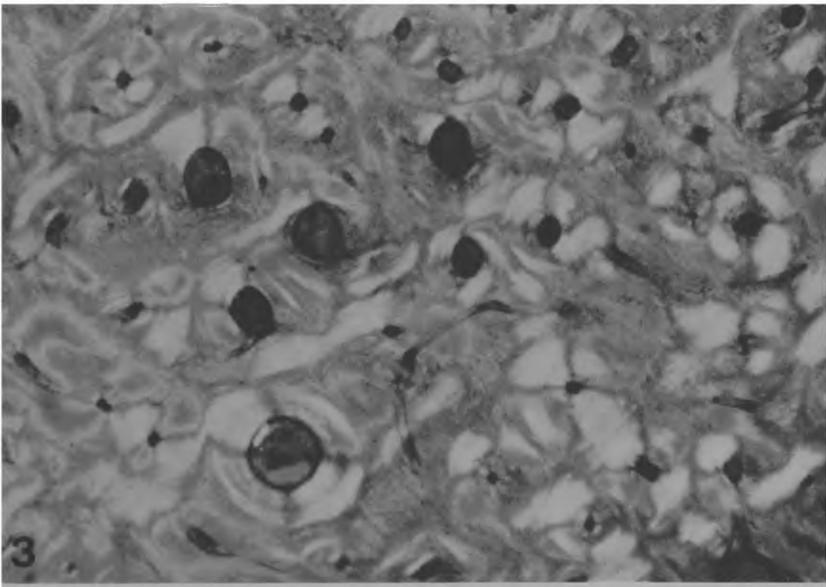
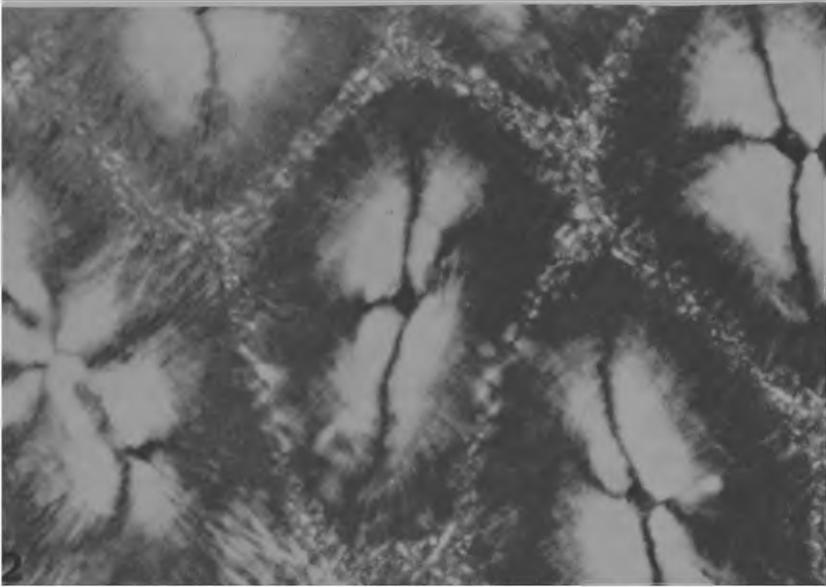


Figura 2 - *Myliobatis aquila*. Corte transversal aos canais vasculares e canalículos dentinários. Desgaste. 137 X.

Figura 3 - *Odontaspis taurus*. Osteodentina. Corte transversal aos canais vasculares. Desgaste. 34 X.

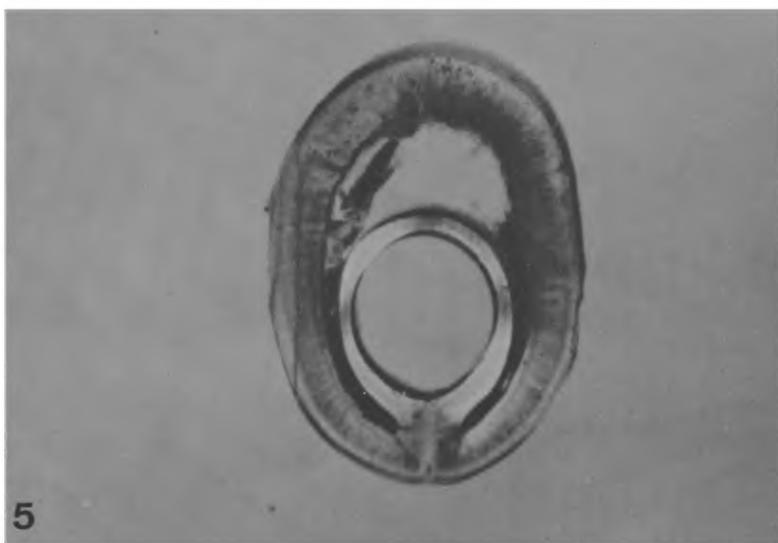
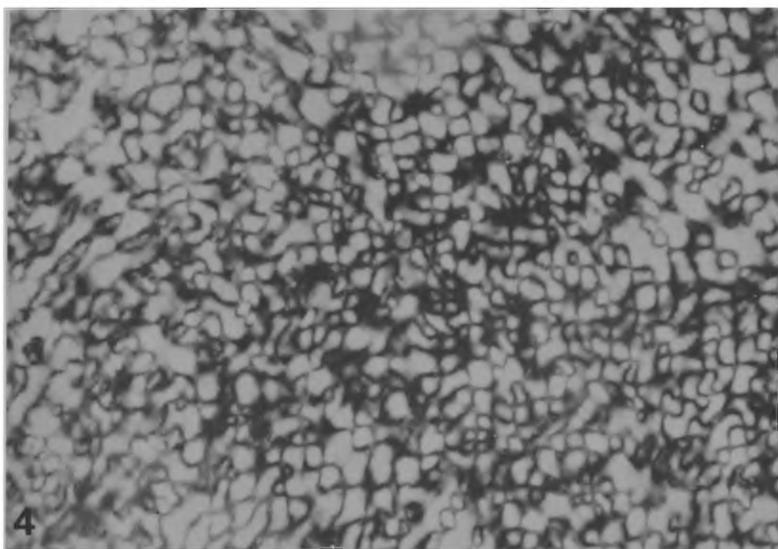


Figura 4 - *Galeocерdo cuvier*. Pseudodentina. Corte transversal aos canaliculos dentinários. Desgaste. 219 X.

Figura 5 - *Crotalus terrificus*. Corte transversal da presa inoculadora. Cruzes de polarização no canal do veneno e dentina circumpulpar. Desgaste. 34 X.

Vasodentina

O colágeno, na vasodentina por nós estudada, que é a - quella do *Lutianus* sp., mostra-se também orientado, como no caso da pseudodentina, em duas direções principais: circular e longitudinal à cavidade pulpar. Também neste caso, podemos comparar o dente todo a um canal vascular e substância fundamental da osteodentina. Há também aqui predominância da orientação circular junto à câmara pulpar. Na porção externa a orientação longitudinal é a que predomina. Existe, no entanto, tanto numa como na outra porção do dente, alternância de orientação, isto é, as fibras colágenas, nas camadas sucessivas, cruzam-se umas com as outras.

Uma estreita faixa periférica difere das demais por possuir colágeno disposto radialmente em relação à câmara pulpar.

Em torno dos canais vasculares da vasodentina o arranjo do colágeno segue o mesmo padrão. Isto se dá, não somente junto à origem do canal, próximo à câmara pulpar, mas também na sua porção terminal, em alça.

Ortodentina

A ortodentina também se apresenta com dupla orientação de colágeno. Ambas alternam-se embora haja predominância de uma orientação sobre a outra, conforme a região observada. Assim, junto à câmara pulpar, como acontece na vasodentina, a predominância das fibras circularmente colocadas é marcante. Na parte mais externa são as fibras longitudinais, paralelas ao maior eixo do dente, que predominam sobre as demais. No entanto, as duas orientações coexistem.

Juntamente com essas disposições das fibras, nota-se também que existem aquelas colocadas radialmente, ou seja, as que acompanham o trajeto dos canalículos dentinários. Estes também possuem fibras colágenas com dupla orientação. Não somente os cortes transversais desses canalículos, mas também seus cortes longitudinais, revelam essa disposição.

A ortodentina foi estudada em *Myleus* sp., *Serrasalmus* sp., *Lutianus* sp., *Hoplias malabaricus*, *Crotalus terrificus* (Fig. 5), *Tupinambis teguixin* e *Paleosuchus trigonatus*.

Ortodentina vascularizada

O arranjo do colágeno na ortodentina vascularizada que foi por nós estudada na porção basal dos dentes do *Myleus* sp. e no *Serrasalmus* sp., é semelhante àquela da vasodentina, descrita anteriormente. A porção mais próxima à câmara pulpar tem orientação predominantemente circular, enquanto a parte mais externa dispõe-se longitudinalmente. Apenas uma estreita faixa na periferia possui colágeno radialmente orientado. Isto não invalida a afirmação de que também aqui uma observação mais cuidadosa, feita com ampliações maiores ou em cortes longitudinais ao dente, revelam a presença de colágeno disposto longitudinalmente na porção de predominância circular e vice-versa (Fig. 6)

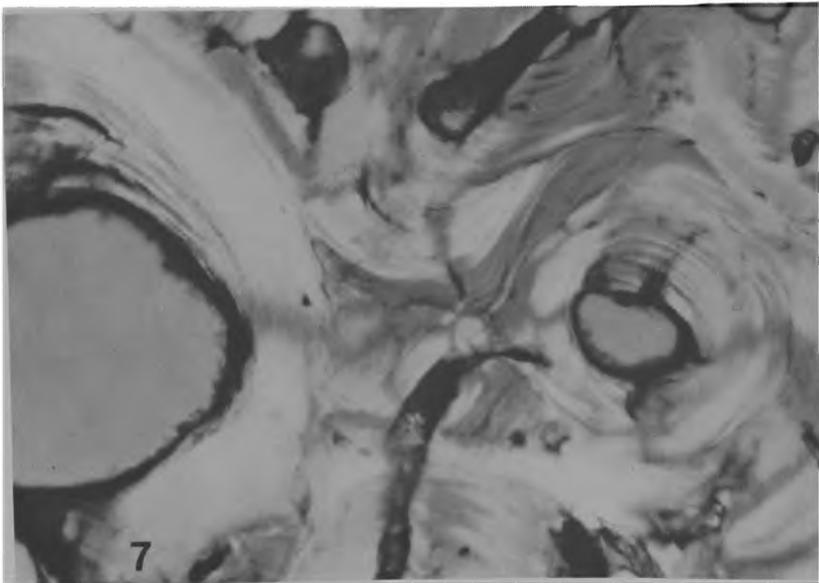
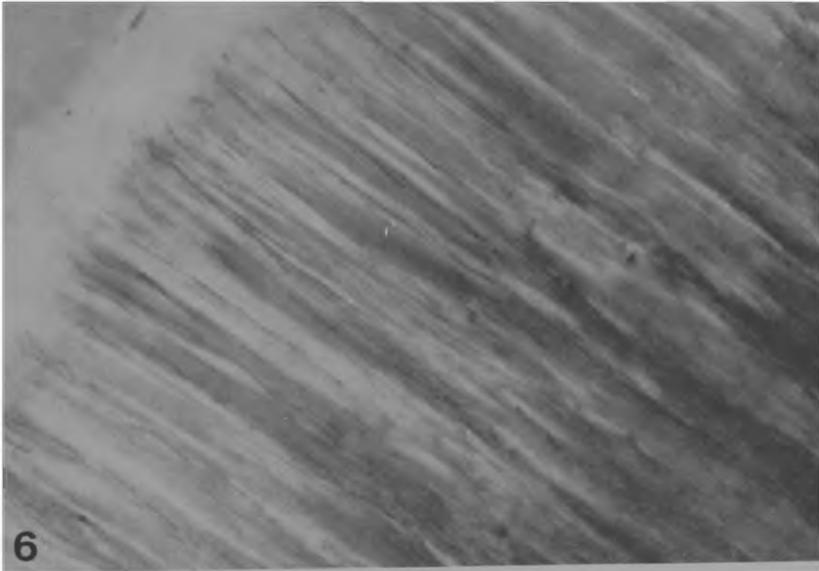


Figura 6 - *Serrasalmus* sp. Ortodontina vascularizada. Corte longitudinal aos canálculos dentinários. Desgaste. 219 X.
Figura 7 - *Lutianus* sp. Osso de inserção. Desgaste. 137 X.

Canais vasculares e canaliculos dentinários, ambos se apresentam envolvidos por colágeno com dupla orientação, como nos canais e canaliculos da osteodentina e ortodentina.

Osso de inserção

A mesma sistemática de orientação, isto é, colágeno dispondo-se sempre segundo duas direções que se cruzam, é em contrada no osso de inserção.

Tanto nos canais de Havers como nas cavidades medulares o arranjo em camadas concêntricas e alternadamente circulares e longitudinais é muito evidente (Fig. 7)

No material estudado, observamos o osso de inserção em: *Lutianus* sp., *Myleus* sp., *Serrasalmus* sp., *Hoplias malabaricus* e *Crotalus terrificus*.

Orientação dos cristais de apatita

Os cristais de apatita sempre acompanham a orientação do colágeno. Isto vale para qualquer uma das estruturas que estudamos. O fenômeno é muito bem evidenciado pela técnica da descolagenização proposta por Schmidt e Keil (1971). Nesse caso, quando se estabelece comparação de uma determinada estrutura antes e depois de ser submetida à cocção com glicerina e hidróxido de potássio, verifica-se que há inversão completa do sinal óptico e as cores de adição e subtração, no microscópio de polarização trocam de posição.

DISCUSSÃO

A análise dos resultados que obtivemos e dos dados da literatura especializada sobre o assunto permite estabelecer comparações entre o que foi estudado anteriormente por outros pesquisadores e o que pudemos observar em nosso material.

Osteodentina

A substância fundamental da osteodentina arranja-se concêntricamente em relação aos canais pulpareis. As fibras colágenas e os cristais de apatita, que seguem a direção das fibras, dispõem-se em camadas ou lamelas alternadamente circulares e longitudinais. Isto vale dizer que, tanto os cortes transversais como longitudinais, ambos revelam fibras colágenas cortadas transversal e longitudinalmente. Essas nossas observações confirmam Lison, em 1941, quando descreveu a osteodentina do *Protopterus aethiopicus* e os resultados de Ørvig (1951 e 1967) quando fala da laminação da osteodentina no *Odontaspis macrota*, *Alaspis* sp. e *Enchodus* sp. Nessas particular suas afirmações são reforçadas por Poole (1971) que relata os mesmos fatos.

Embora não se referindo às diferenças existentes entre as várias lamelas das paredes dos canais pulpareis da osteo-

dentina, Sasso e colaboradores, em 1961, Monteiro (1969) e Andreucci (1970), também puderam observar cruces de polarização negativas nos canais vasculares da osteodentina; os primeiros no *Odontaspis* e *Carcharias taurus* e o último no *Sphaeroides testudineus*.

Schmidt e Keil que, no nosso entender, foram aqueles que estudaram mais exaustivamente tecidos mineralizados dentários com luz polarizada, na edição inglesa de seu livro, publicada em 1971, apresentam muitas descrições ilustradas com fotografias excelentes, onde fatos que observamos em nosso material vêm registrados. É assim que na osteodentina do *Oxyrhina glauca*, *Carcharias* sp., *Esox lucius*, *Myliobatis aquila* e *Sphyræna vulgaris* esses pesquisadores alemães já registram o aparecimento de cruces de polarização negativas quando os canais vasculares eram apanhados em cortes transversais. Na sua descrição dessa mesma estrutura no *Anarhicas lupus* e nos Dipnoi, acrescentam mais minúcias, isto é, apresentam-na como formada por anéis concêntricos, alternadamente claros e escuros, comparando-os com os sistemas de Havers do osso humano.

Pseudodentina

Os fatos por nós encontrados na pseudodentina são confirmados apenas por Sasso e colaboradores (1961) quando assinalam que essa estrutura no *Odontaspis* mostra uma fraca birrefringência negativa em cortes longitudinais. Essa birrefringência foi também por nós observada e correspondia às fibras colágenas que acompanhavam o trajeto dos canalículos dentinários. Em relação a estes últimos, a disposição da substância fundamental (colágeno e cristais de apatita) mostrou seguir o padrão geral, isto é, fibras concêntricas circulares e longitudinais, alternadas.

Vasodentina

Ortodentina

Ortodentina vascularizada

Essas três estruturas podem ser reunidas, para efeito de comparação, em um único grupo. No nosso material, considerando o dente como um todo, o colágeno e cristais de apatita apresentavam-se com disposição predominantemente circular junto à cavidade pulpar - observação já feita por Moss (1974) - enquanto que, na zona periférica, seu trajeto é mais longitudinal, paralelo ao longo eixo do dente. Nas três variedades o dente comporta-se, em seu todo, como um canal vascular e a disposição geral - que se observa melhor quando olhado em pequenos aumentos - é de colágeno orientado segundo duas direções em relação à câmara pulpar.

Esse fato, do dente como um todo, apresentar cruces de polarização negativas quando em cortes transversais, também é mostrado por Schmidt e Keil (1971) no *Carcharias* sp., *Gavialis gangeticus*, *Crocodylus niloticus*, *Megalobatrachus japonicus* e *Physeter macrocephalus*. Em nosso material isso foi confirmado em todos os exemplares estudados.

Um outro detalhe que pudemos observar é a alternância de camadas mono e birrefringentes que correspondem, de certo modo, ao padrão incremental da dentina. Esse tipo de comportamento, aliás, já havia sido assinalado por Schmidt e Keil (1971) no *Homo*, Répteis e Peixes.

O arranjo do colágeno e cristais de apatita em torno dos canais e dos canalículos dentinários da vasodentina e da ortodentina vascularizada é fato também conhecido por outros pesquisadores. Assim, Barros (1970) no *Paralichtys brasiliensis*, Schmidt e Keil (1971) no *Merluccius vulgaris* e Ribeiro & Monteiro (1971) no *Lutianus* sp., observaram comportamento semelhante àquele por nós constatado com relação aos canais da vasodentina.

Osso de inserção

No osso de inserção as fibras colágenas e cristais de apatita se arranjam em camadas concêntricas aos canais de Havers ou cavidades medulares. Essas camadas são alternadamente mono e birrefringentes, deixando entrever nelas o traçado do colágeno, diferente de uma camada para outra.

Dessa análise comparativa de nossos resultados com aqueles dos vários autores que se dedicaram ao assunto, muito embora com enfoque diferente do nosso, é possível destacar um fato comum: a natureza usa sempre o mesmo arranjo quando se trata de cavidades, canais ou canalículos dos tecidos mineralizados. Toda a vez que deparamos com uma cavidade (pulpar ou medular) ou um canal, verificamos que a substância intercelular, mais especificamente, o colágeno da substância intercelular e com ele os cristais de apatita, está sempre disposto concentricamente e em camadas, de maneira orientada em relação a essas estruturas. Mais do que isso, notamos que, nessas lamelas ou camadas concêntricas, há uma variação de uma para a outra. De modo alternado, nas várias camadas, as fibras colágenas ora são apanhadas transversalmente ora longitudinalmente num mesmo corte, formando ângulos maiores ou menores.

Para os canalículos dentinários a solução usada pela natureza também é semelhante. Não só na osteodentina como também na pseudodentina, ortodentina e ortodentina vascularizada, essas estruturas apresentam, em torno de si, um arranjo muito parecido, isto é, fibras colágenas se dispoem circular e longitudinalmente. Os cortes transversais nem sempre evidenciam bem essa dupla disposição. Nesses casos, mais do que em outros, há necessidade de cortes longitudinais aos canalículos. É por essa razão que vários autores, usando muitas vezes o mesmo material, chegam a conclusões diferentes.

CONCLUSÃO

A substância intercelular dos tecidos mineralizados dos Peixes e Répteis se arranja de modo semelhante em torno das cavidades, canais ou canalículos. O colágeno e com ele os cristais de apatita está sempre disposto em camadas alter

nadas e concêntricas onde sua orientação difere, pois se cruzam em ângulos de graus variados.

REFERÊNCIAS

- ANDREUCCI, R.D. 1970. Sobre a estrutura das lojas denticulares de *Spheroides testudineus* (Baiacu mirim) *Rev.bras.pesqui.méd.biol.*, 3:63-7.
- BARROS, J. 1970. *Estudo morfológico da vasodentina do Paralichtys brasiliensis* (Linguado) Vitória. (Tese (doutoramento) Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo).
- EBNER, V. von 1875. Über den feineren Bau der Knochensubstanz. *Sitzungsber.Oesterr.Akad.Wiss., math-naturwiss.Kl.*, 72:49-138.
- HALS, E. 1958. Hereditary enamel hypoplasia. *Odont.T.*, 66:562-82.
- LISON, L. 1941. Recherches sur la structure et l'histogenèse des dents des poissons dipneutes. *Arch.Biol.* (Liège), 52:279-320.
- LISON, L. 1954. Les dents. In: GRASSE, P.P. *Traité de zoologie*. Paris, Masson, p. 792-853.
- MONTEIRO, M.P. 1969. *Histologia comparada dos dentes de alguns Selâquios da costa brasileira (Subordem Galeoidea)* São Paulo. (Tese (doutoramento) Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo).
- MOSS, M.L. 1974. Studies on dentin. *Acta anat.* (Basel), 87:481-507.
- NOBLE, H.W. 1969. The evolution of the mammalian periodontium. In: MELCHER, A.H. & BOWEN, W.H. *Biology of the periodontium*. New York, Academic Press, p.1-26.
- ØRVIG, T. 1951. Histologic studies of placoderms and fossil elasmobranchs. I. The endoskeleton, with remarks on the bone tissues of lower vertebrates in general. *Ark.Zool.*, 2:321-456.
- ØRVIG, T. 1967. Phylogeny of tooth tissues: evolution of some calcified tissues in early vertebrates. In: MILLES, A. E.W. *Structural and chemical organization of teeth*. New York, Academic Press, v.1, p.45-110.
- POOLE, D.F.G. 1971. An introduction to the phylogeny of calcified tissues. In DAHLBERG, A.A. *Dental morphology and evolution*. Chicago, Univ. Chicago Press, p. 65-79.
- RIBEIRO, M.C.L. & MONTEIRO, M.P. 1971. Structure histologique des dents du *Lutjanus* sp. (Caranha): étude microscopique sous lumière ordinaire et lumière polarisée. *Arch.Biol.* (Liège), 82:529-41.
- ROSE, C. 1898. Über die verschiedenen Abänderung der Hartgewebe bei niederen Wirbeltiere. *Anat.Anz.*, 14:21-31; 33-69.
- SASSO, W.S.; SOUZA CAMPOS, H.; DELLA SERRA, O. 1961. Observações sobre as estruturas mineralizadas do dente do cação do gênero "Odontaspis" (Selachii, Pisces). *Rev.bras.Biol.*, 21:79-95.
- SCHMIDT, W.J & KEIL, A. 1971. *Polarizing microscopy of dental tissues*. Oxford, Pergamon Press.

- THOMASSET, J.J 1930. Recherches sur les tissus dentaires des poissons fossiles. *Arch.Anat.* (Strasbourg), 11:5-153.
- TOMES, C.S. 1914. *A manual of dental anatomy: human and comparative.* 7th. ed. Philadelphia, Blakiston.

