

COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES DESCALCIFICADORES NO ESTUDO DA ULTRAESTRUTURA DENTÁRIA EM PEIXES¹

Alexandre Scharcansky²
Carlos Alberto Santos de Lucena³

ytzhak.scharcansky@mail.huji.ac.il, lucena@puccrs.br

RESUMO

Com objetivo de verificar qual o agente descalcificador apresenta melhor performance na visualização em MEV dos cristais de apatita - mineral fisiologicamente depositado no esqueleto dos vertebrados, inclusive dentes - que compõem o tecido enamelóide dentário, três tipos foram testados: EDTA, ácido clorídrico e ácido fosfórico. A melhor solução foi através da imersão dos dentes em ácido fosfórico 15% entre 4 a 15 segundos, dependendo do tamanho do dente. Após a descalcificação, os dentes foram submetidos ao protocolo comumente usado na preparação da peça para observação em MEV.

Palavras – Chave: técnica; Characiformes; dentes; Neotropical; América do Sul.

Abstract

Three types of agent to etching teeth were tested to verify which presents better performance in the visualization in SEM of the apatite crystals - mineral deposited in the skeleton of the vertebrates, including teeth - that compose the dental enameloid tissue: EDTA, hydrochloric acid, and phosphoric acid. The best solution was through the immersion of the teeth in phosphoric acid 15% from 4 to 15 seconds, depending on the size of the teeth. After decalcification the teeth were submitted to the protocol commonly used in preparing the piece for observation in SEM.

Keywords, Mots – Clès, Palabras – Clave: technique; Characiformes; teeth; Neotropical; South America.

A descalcificação parcial de dentes para a visualização sob Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) dos cristais de fosfato de cálcio (hidroxyl-apatita), que compõem o esmalte e enamelóide, é muito utilizada em estudos de tecidos dentários de vertebrados recentes e fósseis, de peixes a mamíferos (e.g. Richter & Smith, 1995; Weiss & Malabarba, 2005). A partir, principalmente, da década de 1970, os resultados sobre ultraestrutura dentária em peixes começaram a ser publicados. Dentre outros, podemos citar Richter (1983; 1987) em peixes fósseis; Sasagawa (1998), Sasagawa & Akai (1999) e Shimada (2002) em elasmobrânquios recentes e Herold (1970),

Shellis & Berkovitz (1976), Sasawaga (1998) e Kemp (2003) em teleósteos.

Uma das técnicas amplamente utilizadas é a simples fratura (Shellis & Berkovitz, 1976) que implica na quebra do dente, expondo os tecidos da coroa. Alternativamente, procede-se o emblocamento do dente em resina epoxy ou Araldite industrial; após consolidada, secciona-se o bloco, desgastando e polindo o dente de acordo com a superfície que se deseja examinar. Após o polimento, submete-se a superfície polida ao ácido para individualização dos cristais de apatita (Richter & Smith, 1995). Entretanto, tais procedimentos podem não ser recomendáveis para peças dentárias pequenas

¹ Parte da dissertação de mestrado do autor. Faculdade de Biociências, PUCRS.

² Animal Science and Veterinary Laboratory. Hebrew University of Jerusalém.

³ Setor de Ictiologia. Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS.

(entre 76µm e 493µm), pois há necessidade de obter-se maior precisão no desgaste da peça, o que não é conseguido com as técnicas da fratura e polimento. Além disso, há o risco de ocorrer a desintegração das peças com o uso das mesmas.

Durante a análise comparativa da ultra-estrutura dentária de Characiformes, realizada pelo autor sênior (Scharcansky, 2006), foi necessário preparar dentes pequenos, entre 76µm e 200µm de altura, que ocorrem, por exemplo, em representantes das famílias Hemiodontidae, Chilodontidae e Characidae. Na medida em que o uso da fratura ou do desgaste em dentes dessas dimensões não é recomendado pelo dano que o choque mecânico causaria, optou-se pela preparação das peças usando-se somente descalcificadores. Três agentes descalcificadores foram testados: EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), ácido clorídrico e ácido fosfórico e os resultados apresentados aqui.

Inicialmente foram retirados até cinco dentes do pré-maxilar do lado esquerdo de exemplares previamente escolhidos, tomando o cuidado de não danificar o aparato bucal dos mesmos. Foram evitados exemplares muito antigos e espécimes com os pré-maxilares com grande número de dentes não calcificados na totalidade. Assim, foi dada a preferência para exemplares adultos e que estivessem recentemente preservados. O material usado nesse trabalho está depositado na coleção do Setor de Ictiologia do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (MCP) e encontra-se listado ao final. A altura do dente foi medida em MEV e corresponde a vertical que vai da inserção do dente no osso até seu ápice.

Os pré-maxilares de cada uma das espécies representando as famílias de Characiformes foram retirados e examinados com auxílio de um estereomicroscópio. Posteriormente foram dissecados e lavados em um banho de 4 minutos em ultrassom para que os tecidos fixados não interferissem na captação das imagens e na análise. Após, foram acondicionados em *ependorffs* com solução digestiva (tripsina 1g/L) por um período de cinco dias a fim de obter a limpeza das peças.

Para a descalcificação, três estudos piloto foram desenvolvidos com os diferentes tipos de descalcificadores objetivando a remoção da camada de enamelóide que protege o dente sem prejudicar a visualização dos cristais de apatita. Além disso, os pilotos tiveram o objetivo de associar ao descalcificador, uma determinada concentração que exigisse o menor tempo possível de imersão. Para cada tempo de imersão testado com o agente descalcificador, foram utilizadas diferentes amostras de dentes.

Inicialmente foi utilizado o descalcificador EDTA em diferentes graus de concentração, 4%, 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%. Os pré-maxilares foram imersos em diferentes intervalos de tempo, não ultrapassando o máximo de 60 segundos. A cada dois segundos a peça era retirada e imersa em água destilada para interromper o processo. Após, a peça era examinada com o auxílio de estereomicroscópio, seguindo-se o processo de desidratação máxima através de uma série alcoólica de 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, seguida de uma série cetônica de concentrações 70%, 80%, 90% e 100%. Na série alcoólica, as peças permaneceram 40 min em cada concentração, enquanto na série cetônica, 30 minutos. Posteriormente, os pré-maxilares foram fixados em fitas de carbono e montados em *stubs*, sendo assim metalizadas com carbono e ouro paladium.

O outro agente descalcificador testado foi o ácido clorídrico, em diferentes graus de concentração que variaram de 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 35%. Nesse caso, o tempo de imersão da peça foram intervalos de 5 minutos. A série para desidratação máxima seguiu os mesmos procedimentos mencionados acima.

No entanto, não houve resultados satisfatórios com nenhuma dessas substâncias EDTA e ácido clorídrico. Na primeira, em concentrações pequenas (1% a 4%), mesmo após longo tempo de imersão (até 30 min), não houve desgaste da camada de enamelóide; em concentrações maiores (acima de 10%), mesmo considerando-se o intervalo de tempo de 1 a cerca de 10 min, o dente colapsou (descalcificação total).

Com o ácido clorídrico, a concentração máxima que obteve melhores resultados, em um menor tempo de influência do ácido foi a de

45%, mesmo assim com duração de 30 min (Tabela 1). Nas concentrações inferiores a 45%, não se obteve descalcificação satisfatória, nem mesmo com 40 min de exposição.

Por fim, em um terceiro estudo piloto foi utilizado o ácido fosfórico nas concentrações de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 45%. O tempo de imersão da peça foi em intervalos de um segundo. Na concentração de 15% (Tabela 1) foram obtidos os menores tempo-totais de imersão com resultados mais satisfatórios, comparados com àqueles obtidos utilizando-se ácido clorídrico ou fosfórico. A série para desidratação máxima seguiu os mesmos procedimentos mencionados acima. A partir desses resultados, optou-se por utilizar esse protocolo para a descalcificação de todas as peças estudadas em MEV.

Para a visualização da ultraestrutura do esmalte dos dentes em MEV foram utilizadas magnitudes que variaram de 800 a 1500 vezes (Fig. 1).

Material examinado.

Após o nome específico, segue-se o número de catálogo; número de espécimes; Alc- álcool, Me- microscopia eletrônica e procedência.

Apareiodon ibitiensis: MCP 14430, 2, 98,26 mm e 95,69 mm, Alc, Me, Brasil, alto rio Paraná; *Leporinus reinhardti*: MCP 17146, 1, CP 82,72 mm, Alc, Me, Brasil, rio São Francisco; *Caenotropus labyrinthicus*: MCP 22515, 2, 54,22 mm e 59,35 mm, Alc, Me, Brasil, rio Amazonas; *Caenotropus sp.*: MCP 30101, 1, 79,46 mm, Alc, Me, Brasil, rio Tapajós; *Prochilodus lineatus*: MCP 14385, 1, 174,89 mm, Alc, Me, Brasil, lago Guaíba; *Characidium pterostictum*: MCP 25239, 2, 25,11 mm e 47,38 mm, Alc, Me, Brasil, rio Uruguai; *Hemiodus ternetzi*: MCP 22074, 2, 70,88 mm e 75,11 mm, Alc, Me, Brasil, rio Amazonas; *Bryconalestes longipinnis*: MCP 14726, 1, 72,80 mm, Alc, Me, África, rio Loango; *Thoracocharax stellatus*: MCP 19729, 1, 59,27 mm, Alc, Me, Brasil, rio Tocantins; *Astyanax sp.*: MCP 14914, 1, 67,57 mm, Alc, Me, Brasil, rio Ribeira; *Bryconamericus stramineus*: MCP 12292, 1, 34,55 mm, Alc, Me, Brasil, rio Uruguai; *Bryconops affinis*: MCP 30882, 1, 84,98 mm, Alc, Me, Brasil, rio Tapajós; *Charax stenopterus*: MCP 18729, 1, 79,47 mm, Alc, Me, Brasil, lago Guaíba; *Cheirodon interruptus*: MCP 19438, 1, 35,98 mm, Alc, Me, Brasil, rio Jacuí; *Cynopotamus argentus*: MCP 11878, 1, 222,65 mm, Alc, Me, Brasil, rio Uruguai; *Deuterodon stigmaturus*: MCP 10774, 1, 37,69 mm, Alc, Me, Brasil, rio Maquiné; *Odontostoechus lethostigmus*: MCP 10774, 2, 37,42mm e 37,69 mm, Alc, Me, Brasil, rio Maquiné; *Oligosarcus jenynsii*: MCP 10044, 1, 185,15 mm, Alc, Me, Brasil, rio Tramandai; *Phenacogaster franciscoensis*: MCP 34619, 1, 32,12

mm, Alc, Me, Brasil, rio São Francisco; *Rhaphiodon vulpinus*: MCP 10521, 1, 185,45 mm, Alc, Me, Brasil, rio Uruguai; *Roeboides prognathus*: MCP 12444, 1, 104,92 mm, Alc, Me, Brasil, rio Uruguai; *Serrasalmus maculatus*: MCP 32113, 1, 102,33 mm, Alc, Me, Brasil, São Francisco; *Acestrorhynchus lacustris*: MCP 14047, 1, 150,93 mm, Alc, Me, Brasil, rio São Francisco; *Hoplias malabaricus*: MCP 18381, 2, 146,41 mm e 154,32 mm, Alc, Me, Brasil, rio Uruguai; *Pyrrhulina australis*: MCP 10414, 1, 32,54 mm, Alc, Me, Brasil, drenagem do rio Jacuí; *Boulengerella maculata*: MCP 18209, 1, 197,63 mm, Alc, Me, Brasil, rio Tocantins.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Berenice Dedavid que de forma especial disponibilizou o maior número de horas possível para a utilização do MEV. Aos técnicos e amigos do Centro de Microscopia Eletrônica e Micro-análises da PUCRS, Eduardo Perosa, Miriam Dos Santos, Mauricio França, Carmem Gomes e Mariele Stocker pela dedicada atenção em todos os momentos. À Dra Martha Richter do Natural History Museum, Londres, pela bibliografia enviada e suas valiosas sugestões ao manuscrito.

REFERÊNCIAS

- [1] HEROLD, R. C. The fine structure of vasodentine in the teeth of the white hake, *Urophycis tenuis* (Pisces, Gadidae). **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 15, p.311-322, 1970.
- [2] KEMP, A. 2003. Ultrastructure of developing tooth plates in the australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* (Osteichthyes: Dipnoi). **Tissue & Cell**, Cambridge, v. 35, p. 401-426, 2003
- [3] RICHTER, Martha. Ultra-estrutura de dentes de paleoniscideos (Pisces) do Grupo Passa Dois, RS, Brasil. **Iheringia**, série Geologia, Porto Alegre. v. 8, p. 131-145, 1983
- [4] RICHTER, Martha. Dental histology of a Characoid fish from the Plio-Pleistocene of Acre, Brazil. **Zoologica Scripta**, Oslo, v. 13, n. 1, p. 69-79. 1984.
- [5] RICHTER, Martha. & SMITH, M. A microstructural study of the ganoine tissue of selected lower vertebrates. **Journal of the Linnean Society**, London, v. 114, p. 173-212, 1995.

[6] SAWASAGA, I. The features of enameloid formation during odontogenesis in Teleost. **Dental Morphology**, v. 30, n. 2, p. 285-292, 1998.

[7] SASAWAGA, I. & AKAI, J. Ultrastructural observations of dental epithelial cells and enameloid during enameloid mineralization and maturation stages in stingrays, *Urolophus aurantiacus*, an elasmobranch. **Journal of Electron Microscopy**, Tokyo, v. 48, n. 4, p. 455-463, 1999.

[8] SCHARCANSKY, A. **Estudo comparado da dentição em representantes da Ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi: Othophysii)**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006. 186 p.

[9] SHELLIS, R. P. & BERKOVITZ, B. K. B. Observation on the dental anatomy of piranhas (Characidae) with special reference to tooth structure. **Journal of Zoology of London**, London, v. 180, p. 69-84, 1976.

[10] SHELLIS, R.P. & MILES, R. Autoradiographic study of the formation of enameloid matrices in teleosts fishes using tritiated aminoacids. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 185, p. 51-72, 1974.

[11] SHIMADA, K. Dental homologies in lamniform sharks (Chondrichthyes: Elasmobranchii). **Journal of Morphology**, New York, v. 251, p. 38-72, 2002.

[12] WEISS, F. E. & MALABARBA, M. C. Dental enamel microstructure in three rodents (Mammalia: Rodentia): *Noronhomys vespucii* Carleton & Olson, 1999, *Myocastor coypus* Kerr, 1792 and *Hydrochaeris hydrochaeris* Linneaus, 1766. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS**, Série Zoologia, Porto Alegre, v.18, n.2, p. 151-160, 2005.

Tabela 1. Tempos mínimos necessários para visualização dos cristais de apatita, considerando os ácidos clorídrico e fosfórico, em relação a dimensão do dente e a espécie de peixe analisada.

| <i>Espécie</i> | <i>Altura dos dentes</i> | <i>Tempo de imersão em Ácido Clorídrico em concentração de 45% (minutos)</i> | <i>Tempo de imersão em Ácido Fosfórico em concentração de 15% (segundos)</i> |
|-------------------------------------|--------------------------|--|--|
| <i>Leporinus reinhardti</i> | 1,11mm | 30 | 14 |
| <i>Caenotropus labyrinthicus</i> | 103µm | 5 | 4 |
| <i>Prochilodus lineatus</i> | 403µm | 10 | 7 |
| <i>Characidium pterostictum</i> | 304µm | 5 | 4 |
| <i>Hemiodus ternetzi</i> | 076µm | 5 | 4 |
| <i>Bryconops longipinnis</i> | 578µm | 20 | 10 |
| <i>Thoracocharax stellatus</i> | 606µm | 20 | 10 |
| <i>Astyanax bimaculatus</i> | 211µm | 25 | 12 |
| <i>Astyanax sp.</i> | 229µm | 25 | 12 |
| <i>Bryconamericus stramineus</i> | 218µm | 20 | 10 |
| <i>Bryconops affinis</i> | 589µm | 10 | 8 |
| <i>Charax stenopterus</i> | 675µm | 30 | 15 |
| <i>Cheirodon interruptus</i> | 191µm | 10 | 6 |
| <i>Cynopotamus argentus</i> | 2,66mm | 30 | 15 |
| <i>Deuterodon stigmaturus</i> | 493µm | 10 | 6 |
| <i>Odontostoechus lethostigmus</i> | 448µm | 30 | 14 |
| <i>Oligosarcus jenynsii</i> | 3,06mm | 30 | 15 |
| <i>Phenacogaster franciscoensis</i> | 172µm | 5 | 5 |
| <i>Rhaphiodon vulpinus</i> | 2,79mm | 30 | 15 |
| <i>Roeboides prognatus</i> | 259µm | 30 | 15 |
| <i>Serrasalmus sp.</i> | 1,37mm | 30 | 13 |
| <i>Acestrorhynchus lacustris</i> | 3,93mm | 30 | 14 |
| <i>Hoplias malabaricus</i> | 4,07mm | 30 | 15 |
| <i>Pyrhulina australis</i> | 164µm | 5 | 4 |
| <i>Boulengerella maculata</i> | 351µm | 10 | 7 |

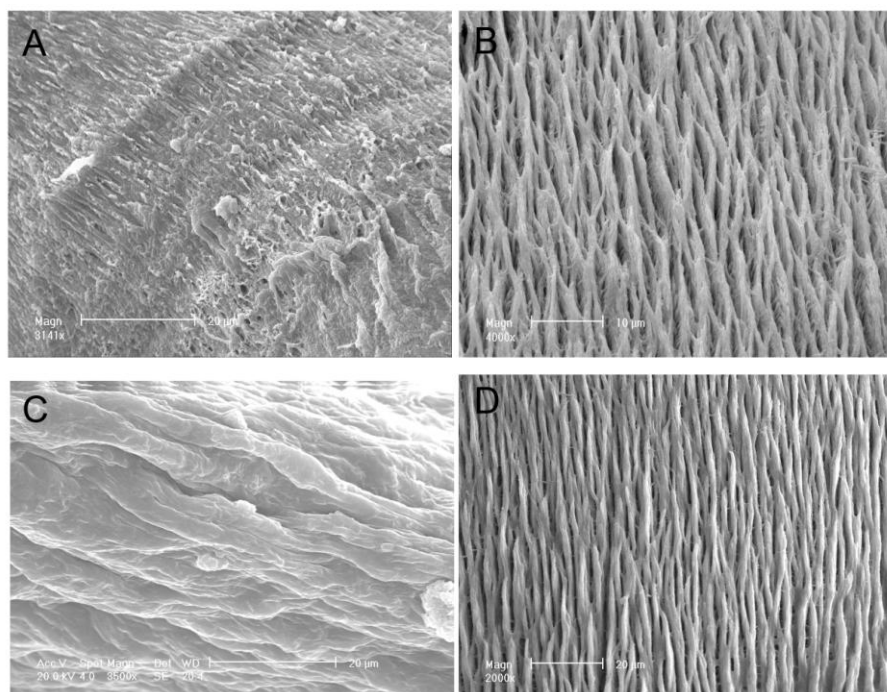


Figura 1. A – Região da coroa de dente de *Boulengerella maculata* em MEV preparado com ácido clorídrico. B. Região da coroa de um dente de *Boulengerella maculata* em MEV preparado com ácido fosfórico 15%. C. Região da coroa de um dente de *Hoplias malabaricus* em MEV preparado com EDTA. D. Região da coroa de um dente de *Hoplias malabaricus* em MEV preparado com ácido fosfórico 15%. Notar a perfeita visualização dos arranjos dos cristais de apatita quando utilizado o ácido fosfórico.