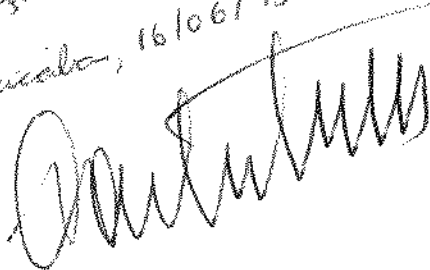


ANDRÉA MOREIRA ROLLA *R. W. P.*  
=Cirurgiã-Dentista=

*Este exemplar foi  
devidamente corrigido  
conforme resolução CCPG/036/83.*

*Piracicaba, 16/06/93*



INFLUÊNCIA DE ELEMENTOS TRAÇOS "IN VITRO" E "IN VIVO" NA  
ATIVIDADE DA  $Ca^{++}$ -ATPASE ( E.C.3.6.1.3.) DO GÉRME  
DENTAL DO RATO

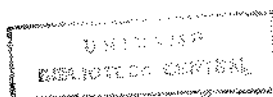
Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da  
UNICAMP, para obtenção do grau  
de Mestre em Ciências - Área de  
Fisiologia e Biofísica do Siste  
ma Estomatognático.

P I R A C I C A B A - S P  
Novembro - 1992

R647i

19496/BC

6



À minha mãe e as minhas irmãs,

De quem sempre recebi estímulo,  
compreensão e apoio e com quem  
aprendi à superar obstáculos.

Ao OTÁVIO meu marido, pelo in-  
centivo recebido, pela sua ho-  
nestidade, capacidade e dina-  
mismo que sempre demonstrou,  
dando a mim segurança e entusi-  
asmo para concluir este traba-  
lho.

As minhas filhas,

MARIANNA E MARCELLA,

que são as jóias de to-  
dos os meus sonhos.

Ao Professor Doutor CARLOS EDUARDO/PINHEIRO, X  
por sua imensa capacidade de compreensão, pa  
ciência e incentivo, pela dedicação e empe  
nho demonstrados durante a orientação deste  
trabalho.

O MEU MUITO OBRIGADA.

Ao Professor Doutor DÉCIO TEIXEIRA,  
pelo pioneirismo e força de vontade  
demonstrado na implantação do Curso  
de Pós-Graduação em Fisiologia e Bi  
ofísica do Sistema Estomatognático,  
pelo estímulo e apoio diante das di  
ficuldades surgidas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Vogt, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas pelo seu empenho em melhorar a qualidade de ensino e pesquisa.

Ao Professor Doutor Renato Roberto Biral, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pelo seu exemplo de amor e dedicação à nossa escola.

Ao Professor Doutor Mathias Vitti, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP pela seriedade com que conduz seu trabalho.

Ao Professor Doutor João Leonel José, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomatognático, pela amizade, atenção, positivismo no decorrer do trabalho.

Ao Professor Doutor Alcides Guimarães, Chefe da Área de Fisiologia e Biofísica, do Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP-UNICAMP, pela atenção e incentivo para a consolidação deste trabalho.

A Professora Doutora Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga, pelo apoio e amizade transmitidos no decorrer deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Otávio Machado Menten, da USP-Esalq, Piracicaba, pela atenção, sugestões valiosas, pela orientação na parte estatística, nas traduções de inglês e incentivo no decorrer da pesquisa.

Ao Sr. Carlos Alberto Aparecido Feliciano, pela grande amizade, e indispensável apoio técnico e boa vontade.

À Sra. Shirley Rosana Sbravatti Moreto, pela prestimosa colaboração.

À Sra. Suely Duarte de Oliveira Soliani, pelo auxílio na revisão bibliográfica.

A todos àqueles que direta ou indiretamente possibilitaram a realização desta pesquisa.

# C O N T E Ú D O

	Página
CAPITULO I	
1. INTRODUÇÃO.....	01
CAPITULO II	
2. PROPOSIÇÃO.....	03
CAPITULO III	
3. REVISTA DA LITERATURA.....	04
3.1. Distribuição e Função da $Ca^{++}$ -ATPase do Gérmen Dental.....	04
CAPITULO IV	
4. MATERIAL E MÉTODO.....	14
4.1. Determinação da Atividade da $Ca^{++}$ -ATPase do Gérmen Dental.....	14
4.2. Influência de Elementos Traços "In Vi- tro" Sobre a $Ca^{++}$ -ATPase do Gérmen Den- tal.....	16
4.3. Influência de Elementos Traços "In Vi- vo" Sobre a $Ca^{++}$ -ATPase do Gérmen Den- tal.....	17
4.4. Influência do Levamisole (Cloridrato de Levamisol) na Atividade da $Ca^{++}$ -ATPase de Germens Dentais.....	18
4.5. Análise Estatística.....	18
CAPITULO V	
5. RESULTADOS.....	19
5.1. Efeito de Elementos Traços "In Vivo" So- bre a Atividade Enzimática Total ( $Ca^{++}$ - ATPase + Fosfatase Alcalina).....	19
5.2. Efeito de Elementos Traços "In Vivo" Sobre a Atividade Enzimática da $Ca^{++}$ - ATPase.....	19
5.3. Efeito de Elementos Traços "In Vitro" So- bre a Atividade Enzimática Total ( $Ca^{++}$ - ATPase + Fosfatase Alcalina).....	20

5.4. Efeito de Elementos Traços "In Vitro" Sobre a Atividade Enzimática da $Ca^{++}$ -ATPase.....	21
5.5. Contribuição Relativa da $Ca^{++}$ -ATPase e da Fosfatase Alcalina com Relação à Inibição Enzimática dos Elementos Traços "In Vitro" Sobre o Gérmen Dental do Rato.....	21
CAPITULO VI	
6. DISCUSSÃO.....	37
CAPITULO VII	
7. CONCLUSÕES.....	42
CAPITULO VIII	
8. RESUMO.....	43
CAPITULO IX	
9. SUMMARY.....	45
CAPITULO X	
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

## 1. INTRODUÇÃO

A enzima  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase desempenha importante papel no transporte dos íons cálcio através da membrana plasmática e das organelas celulares.

A concentração dos íons cálcio dentro de compartimentos intracelulares é de grande importância biológica, tanto no que diz respeito à reserva de cálcio para as reações enzimáticas celulares como também na redução da concentração dos íons cálcio livres do citosol, uma vez que em concentração acima de  $10^{-6}\text{M}$ , ele se torna tóxico para a célula.

Inúmeros são os processos bioquímicos celulares dependentes do íon cálcio. Pode-se dizer que o íon cálcio é essencial ao funcionamento da maquinária celular, seja como ativador enzimático, como modulador da conformação proteica ou como participante de processos químicos extracelulares.

Com relação ao gérmen dental, a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase participa ativamente no transporte e na concentração do cálcio celular e também no processo de mineralização biológica.

Como se sabe, os tecidos do gérmen dental, que compõem o órgão do esmalte e a papila dentária, irão se transformar em tecidos calcificados do esmalte e da dentina, respectivamente.

Durante o processo de calcificação do gérmen dental, o transporte e o armazenamento de íons cálcio se processam com grande rapidez, movidas pela necessidade de cálcio da matriz orgânica em fase de mineralização.



Durante o processo de mineralização, o gérmen dental está sujeito à influência de vários fatores sistêmicos que podem interferir favorável ou desfavorávelmente na formação do dente e, conseqüentemente, torná-lo mais ou menos resistente as agressões do meio ambiente após seu irrompimento na cavidade bucal.

Um desses fatores, e que tem merecido a atenção dos pesquisadores por mais de 5 décadas, são os elementos traços. Estes elementos são encontrados normalmente em quantidades muito pequenas no organismo animal, mas são de fundamental importância para os variados processos biológicos. O fato desses elementos serem encontrados em concentrações ínfimas, denuncia por si mesmo a sua grande reatividade. Isto significa que um pequeno aumento na concentração destes elementos pode ocasionar sérios distúrbios para o organismo.

Neste trabalho procura-se selecionar alguns elementos traços que estejam relacionados com a cárie dentária (MUHLER et al 1957; TANK & STORVICK, 1960; HADJMARKOS, 1966; CURZON & CROCKER, 1978) e estudar, "in vivo e "in vitro", a sua interferência no metabolismo do gérmen dental avaliando a atividade da  $Ca^{++}$ -ATPase em diversas condições.

## 2. PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem por objetivo avaliar a influência, "in vivo" e "in vitro", dos seguintes elementos traços: Flúor(NaF), Cobalto(CoCl<sub>2</sub>), Molibdênio(NH<sub>4</sub>MO<sub>4</sub>), Níquel(NiCl<sub>2</sub>) , Vanádio(NaVO<sub>3</sub>) e Selênio(NaSeO<sub>3</sub>), na atividade da Ca<sup>++</sup>-ATPase do gêrmen dental do rato.

### 3. REVISTA DA LITERATURA

#### 3.1. Distribuição e Função da $Ca^{++}$ -ATPase do Gérmen Dental

HEYDEN & FROM(1969) demonstraram, mediante técnica histoquímica, a presença da ATPase ( $Ca^{++}$ -ATPase) no gérmen dental de molares de camundongos. A enzima aparece aos 17 dias de vida intrauterina (fase de capuz adiantado) e se distribue preponderantemente no epitélio externo, retículo estrelado e extrato intermediário. Nenhuma reação foi evidenciada no epitélio interno e na papila dentária (polpa primitiva). Aos dois dias de vida extrauterina, correspondente à fase avançada de formação da matriz do esmalte e da dentina, só foi observada a reação enzimática nos ameloblastos. Devido a presença constante da ATPase nos germens de molares de camundongos durante a formação da matriz dentinária e da matriz do esmalte, os autores suportam a idéia de que esta enzima esteja implicada no processo de mineralização biológica.

HEYDEN(1970) realizou um estudo histoquímico da distribuição da ATPase no gérmen dental de molar de camundongo durante a fase de irrompimento da corôa dental. Aos 7 dias de idade, o gérmen dental apresenta intensa atividade da ATPase nos vasos sanguíneos adjacentes ao órgão do esmalte. Os ameloblastos e odontoblastos não apresentam reação evidenciável. Aos 10 dias de idade (irrompimento da corôa dentária) um rico suprimento vascular é observado sob o epitélio queratinizado e na área central do tecido conjuntivo. Uma intensa atividade da ATPase é observada nos vasos sanguíneos. Os ameloblastos apresentam uma reação

modesta. O autor descreve, neste trabalho, uma fraca atividade da ATPase no gérmen dental após a descalcificação com EDTA; contudo, durante a formação da matriz orgânica, os ameloblastos e odontoblastos apresentam reação mais intensa. Por esta razão, estes dados confirmam, em parte, a idéia da participação da ATPase na mineralização do gérmen dental. O autor conclue que a intensa atividade da ATPase nas células endoteliais sugerem um papel desta enzima no transporte de nutrientes através da barreira celular.

SERVERSON(1971) demonstrou, por método histoquímico, a presença da ATPase na região germinal do dente incisivo de camundongos adultos. Os ameloblastos da zona de maturação do esmalte apresentam reação positiva. As células do extrato intermediário e do retículo estrelado apresentam reação moderada. Os odontoblastos apresentam fraca reação. As células da polpa dão reação negativa. O autor conclue que a ATPase, encontrada nos ameloblastos nas fases de secreção e de maturação do esmalte, está associada à presença de mitocôndrias na região apical destas células, e que a hidrólise do ATP nesta região deve servir não somente para a liberação de energia para o transporte iônico como também fornecer os íons fosfatos para a mineralização da matriz orgânica.

La ROCHE(1971), utilizando método histoquímico, estudou a distribuição da ATPase no gérmen dental de molares de coelho durante a fase intrauterina até ao nascimento. Aos 22 dias de vida intrauterina, a ATPase está presente no epitélio externo, retículo estrelado, extrato intermediário, odontoblastos, polpa periférica e região perivascular da polpa. Aos 24 dias observa-se uma forte reação no epitélio externo, retí-

culo estrelado, extrato intermediário, odontoblastos, polpa periférica e região perivascular. Aos 26, 28 e 29 a distribuição da ATPase é semelhante aos 24 dias apenas com o aparecimento da atividade na região apical dos ameloblastos.

No 19 dia após o nascimento, observa-se o irrompimento do primeiro molar; fato este que é acompanhado de uma diminuição da atividade da ATPase, exceto na zona odontoblástica, sub-odontoblástica e nas regiões perivasculares da polpa.

O autor conclue que a ATPase é encontrada nas regiões que participam do desenvolvimento das células que elaboram a mineralização do dente, isto é, nas células nutridoras dos ameloblastos e odontoblastos. Ao final da odontogênese a atividade da ATPase diminui a ponto de desaparecer.

MAGNUSSON & LINDE(1974) demonstraram, por método histoquímico, a presença da ATPase em germens dentais de molares de camundongos recém-nascidos. As células do extrato intermediário e odontoblastos revelaram intensa atividade enzimática como também os vasos sanguíneos adjacentes. O epitélio externo apresentou baixa atividade. Os pré-ameloblastos e ameloblastos secretores apresentaram reação positiva. A ATPase foi localizada no citoplasma basal do ameloblasto. Quando o inibidor de fosfatases não específicas, R-8231, foi adicionado ao meio de incubação, a reação para ATPase só foi bem evidenciada nos ameloblastos e vasos sanguíneos. Os autores concluem que, devido ao tipo de inibição específica e da dependência de íons, a ATPase demonstrada para os ameloblastos e odontoblastos é a  $Ca^{++}$ -ATPase.

Um estudo bioquímico da  $Ca^{++}$ -ATPase do germen dental do feto de porco foi realizado, através da centrifugação fra

cionada. Os autores concluem que a  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}\text{ATPase}$  da polpa dentária pode estar implicada no processo de mineralização dentinária.

"  
GRANSTRÖM & LINDE(1976) utilizaram método bioquímico para o estudo da ATPase de odontoblastos do incisivo de ratos. Esses autores prepararam um homogenado da camada de odontoblastos e pré-dentina, isolados por escavação dos dentes incisivos de ratos, e prepararam um homonegado destas células que serviu como fonte de ATPase. Para a avaliação da atividade enzimática, utilizaram vários substratos (ATP-ADP-UTP-AMP-ITP) em diferentes condições de pH, concentração de substrato e ativadores, na presença do inibidor de fosfatases não específicas (R-8231).

Os dados experimentais apresentados indicam que existe nos odontoblastos duas enzimas que hidrolisam o ATP, nas condições utilizadas, isto é, uma  $\text{Ca}^{++}\text{-ATPase}$  e uma fosfatase alcalina. Os autores concluem que a  $\text{Ca}^{++}\text{-ATPase}$  odontoblástica deve estar implicada no processo de mineralização dentinária.

ABIKO et al(1976) identificaram dois tipos de ATPase em microsossomos obtidos por centrifugação fracionada de homogenados da polpa dental de incisivos de coelhos. A  $\text{Ca}^{++}\text{-ATPase}$  tem pH ótimo em 8,6 e a  $\text{Mg}^{++}\text{-ATPase}$  em 9,2. Estas duas enzimas da polpa de incisivos diferem de enzimas semelhantes de outros órgãos do coelho. Os autores concluem que a  $\text{Ca}^{++}\text{-ATPase}$  da polpa deve estar relacionada com o processo de mineralização dentinária.

"  
MÖRNSTAD & SUNDSTRÖM(1976) avaliaram a atividade da ATPase do germen dental de molares de ratos com 9

dias, utilizando método histoquímico em cortes descalcificados e não descalcificados. Utilizando íons metálicos bivalentes como ativadores ( $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ ), eles demonstraram a presença da ATPase específica na região apical de ameloblastos em fase de maturação. Os autores concluem a conveniência do método histoquímico da captura por íons de chumbo em pH alcalino para a demonstração da ativação da ATPase por íons metálicos bivalentes.

Através de metodologia bioquímica, ABIKO(1977) de terminou a localização sub-celular da ATPase em polpas de dentes de coelho. A maior concentração da atividade da ATPase foi encontrada na fração microssomal. Duas ATPases,  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  dependentes, foram identificadas e estudadas as suas propriedades. A  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase da polpa de dentes de coelho difere da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase de outros órgãos, particularmente no que diz respeito aos inibidores. A  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase da polpa não é inibida por fluoreto na concentração de 1mM. O autor sugere a hipótese da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase es tar implicada na calcificação dentinária.

"  
MÖRNSTAD(1977), através de método bioquímico, estudou as propriedades da ATPase de homogenado de órgão de esmalte de dentes incisivos do rato, utilizando meio de incubação de métodos histoquímicos, com o objetivo de avaliar os produtos de hidrólise do ATP e a influência do chumbo empregado como meio de captura do fosfato, na hidrólise não enzimática do ATP. Os resultados obtidos indicam que o chumbo em pH 7,2 inibe a ATPase e provoca uma fraca hidrólise do ATP; em pH 9,4 produz uma acentuada hidrólise não enzimática do ATP.

Um amplo estudo da cinética enzimática da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase foi realizado por MÖRNSTAD(1978) em homogenado de órgão do esmalte de dentes incisivos de rato. Os resultados obti

dos com relação aos parâmetros enzimáticos foram os seguintes: os principais produtos da reação foram ADP para a reação inicial até 10 minutos e ADP e AMP após 30 minutos.

GRANSTROM et al (1979) purificaram a  $Ca^{++}$ -ATPase e a fosfatase alcalina de odontoblastos de incisivos de ratos através de método bioquímico de extração com butanol e EDTA e posterior filtração molecular em gel "Sepharose 4B". Pela eluição da cromatografia em gel obtiveram dois tipos com atividade enzimática. A fração I, de peso molecular 49.000 daltons apresentou atividade enzimática com o ATP, p-nitrofenil fosfato e pirofosfato inorgânico e foi inibida pelo R-8231 (inibidor de fosfatase alcalina). A fração II, de peso molecular 18.000 daltons, apresentou atividade com o ATP e não foi inibida pelo R-8231. Os autores concluem que a hidrólise do ATP em pH alcalino (8,0), pelo homogenado de odontoblastos, é feito por duas enzimas distintas, isto é, a fosfatase alcalina e a  $Ca^{++}$ -ATPase e que ambas devem estar envolvidas no processo de transporte de cálcio e mineralização da dentina.

MENANTRAU (1981), utilizando método bioquímico da centrifugação fracionada de homogenado de polpa de germens dentais de molares bovinos, identificou três enzimas capazes de hidrolisar o ATP em pH alcalino. Uma delas, inibida totalmente na presença de l-p-bromotetramisole (R-30402), se identifica com a fosfatase alcalina. As outras duas ATPases se distinguem pelo pH ótimo (8 e 10) e pela distribuição subcelular. Ambas as enzimas são ativadas pelo  $Mg^{++}$  e pelo  $Ca^{++}$ , até a concentração ótima de 3mM. O  $Mg^{++}$  em alta concentração (maior 5mM) é inibidor da ATPase (pH 8,0) e da fosfatase alcalina.

LE BELL (1981) isolou, de polpa de dentes humanos,



a enzima ATPase, ativada por íons  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ . O método empregado foi o da extração com solventes (triton x-100), homogeneização e centrifugação. A enzima obtida possui pH ótimo de 9,0 e não é inibida por concentrações elevadas (10mM) de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ . O uso de tetramisole (2mM) no meio de incubação inibiu 30% da atividade enzimática de hidrólise de ATP em pH alcalino, o que equivale dizer que esta porcentagem de hidrólise do ATP é devida à fosfatase alcalina. Os resultados obtidos indicam que se trata de uma mesma enzima ativada por íons  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ .

CRENSHAW & TAKANO (1982) avaliaram histoquimicamente, utilizando a microscopia eletrônica, a distribuição da ATPase e, do cálcio radioativo ( $^{45}\text{Ca}^{++}$ ) no órgão do esmalte do dente incisivo de rato. Nos ameloblastos secretores, a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase se distribue uniformemente na membrana plasmática. Na fase de maturação, a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase se distribue na membrana proximal dos ameloblastos (adjacente à camada papilar). Com exceção do endotélio dos vasos sanguíneos, a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase não é encontrada nas células da camada papilar do órgão do esmalte. Os autores concluem que o transporte de  $^{45}\text{Ca}^{++}$  no ameloblasto secretor é mediado pela  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase da membrana plasmática e no ameloblasto em fase de maturação é mediado pela  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase da membrana distal do ameloblasto, com membrana em escova e por difusão passiva e por troca com íons  $\text{Na}^+$  nos ameloblastos com membrana lisa.

SALAMA et alii (1985) identificaram, por método histoquímico, a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do órgão do esmalte do incisivo de rato. Usando no meio de incubação ouabaina (inibidor da K-Na-ATPase) e levamisole (inibidor da fosfatase alcalina), detectaram uma intensa reação enzimática na membrana plasmática do ameloblasto secretor e nas células da camada papilar. Os ameloblas-

tos, na fase de maturação, apresentaram intensa atividade na membrana plasmática da bordadura em escôva. Segundo os autores, a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, devido sua localização plasmática e seu papel no transporte de cálcio, deve exercer um importante papel no processo de mineralização do esmalte.

TAKANO et al(1986) evidenciaram, por método histoquímico e microscopia eletrônica, a distribuição da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase e da fosfatase alcalina no órgão do esmalte e na papila dentária durante o estágio inicial da mineralização do esmalte e dentina do incisivo de rato. A  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase foi localizada na cisterna de Golgi, vesícula citoplasmática e ao longo da superfície dos ameloblastos pré-secretóres e secretóres, enquanto que está totalmente ausente nos odontoblastos. De modo contrário, a fosfatase alcalina foi localizada ao longo da superfície externa dos odontoblastos, mas totalmente ausente nos ameloblastos. Os autores sugerem que a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, encontrada nas vesículas de matriz distribuídas na matriz orgânica da pré-dentina, tem sua origem no epitélio interno do esmalte e/ou nos pré-ameloblastos, enquanto que a fosfatase alcalina origina dos odontoblastos da polpa; portanto, a coexistência das duas enzimas nas vesículas de matriz sugere um papel regulador destas enzimas no estágio inicial da mineralização do órgão dental.

SASAKI & GARANT(1986) realizaram um estudo citquímico e com microscopia eletrônica da distribuição da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do órgão do esmalte de incisivos de rato. A  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase se encontra em maior concentração na membrana plasmática do ameloblasto secretor em menor intensidade na membrana basal do ameloblastos na fase de maturação e no processo de To-

mes. Segundo estes autores, a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase é regulada pela Calmodulina e está relacionada ao transporte transcelular dos íons cálcio, durante o processo de mineralização do esmalte.

SALAMA et alii(1987), empregando método histoquímico e microscopia eletrônica, descreveram a reação enzimática da  $\text{Ca}^{++}$ -  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase no ameloblasto do incisivo de rato durante a amelogênese. A atividade enzimática foi obtida, exclusivamente, na membrana celular. A intensidade do produto de reação enzimática depende do estágio de evolução do ameloblasto. Os dados obtidos sugerem que a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do ameloblasto tenha um papel importante no controle da disponibilidade do cálcio na mineralização da matriz orgânica do esmalte.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1. Determinação da Atividade da $Ca^{++}$ -ATPase do Gérmen Dental

Foram usados neste trabalho os germens dentais dos primeiros molares de Rattus norvegicus, albinus, Wistar de ambos os sexos, com sete dias de idade, com peso corporal entre 30 e 35 gramas. Os animais foram alimentados durante o período experimental com leite materno, sendo mantidos a temperatura ambiente. Os animais eram decaptados com tesoura e a cabeça separada em duas metades através de um corte longitudinal, ao nível das bochechas, separando a mandíbula da maxila. Em seguida os germens dentais eram removidos por meio de uma incisão na face superior(oclusal) das gengivas, abrindo-se o corte com cuidado até a exposição do gérmen dental que era removido com uma espátula e colocado imediatamente no meio de incubação.

A atividade da  $Ca^{++}$ -ATPase era determinada usando-se o seguinte meio de incubação:

Tampão Tris - HCl 0,1M pH 7,4	- 0,7 ml
Cloreto de Cálcio 0,05M	- 0,05 ml
Água Destilada	- 0,15 ml
ATP (20mg/ml)	- 0,10 ml
	<hr/>
Total	1,0 ml

\* Adenosina trifosfato sal sódico da sigma chemical, grau 2.

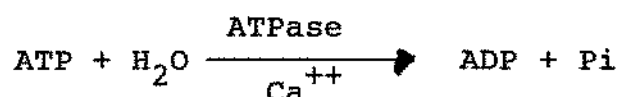
Após a colocação dos germens dentais no meio de incubação (sem ATP) os tubos de ensaio eram levados à estufa à 37°C durante 10 minutos, para equilibrar a temperatura.

Em seguida, adicionava-se o substrato (ATP) e deixava-se incubar por mais 30 minutos. A reação era paralizada, coletando-se o meio líquido para um outro tubo de ensaio.

Os germens dentais remanescentes no tubo eram coletados em um papel de filtro e colocados em uma pequena forma de "papel alumínio" e levados a estufa a 50°C, por 24 horas.

Após a secagem, os germens dentais eram pesados em balança de precisão até a quarta casa decimal.

A determinação da atividade da Ca<sup>++</sup>-ATPase era feita dosando-se o fosfato inorgânico liberado no meio de incubação pela hidrólise do ATP, seguindo a seguinte reação:



A dosagem de fosfato inorgânico foi feita segundo o método de RUSSEL & ALLEN (RUSSEL & ALLEN, 1940) utilizando-se o seguinte meio de reação:

- 0,5 ml de amostra
- 2,5 ml de água destilada
- 0,2 ml de ácido perclórico à 70%
- 0,2 ml de Elon à 1%
- 0,1 ml de Molibdato de amônio à 5%

Após 30 minutos de repouso à temperatura ambiente, a intensidade da coloração azul do fosfomolibdato de amônio era lida em um espectrofotômetro em 700 nm.

A curva padrão era feita com solução de fosfato de sódio à 100 mg/litro.

#### 4.2. Influência de Elementos Traços "In Vitro" Sobre a $\text{Ca}^{++}$ ATPase do Gérmen Dental

Os elementos traços foram empregados na forma dos seguintes sais , todos na concentração de 10 mM:

1. Fluoreto de sódio (NaF)
2. Cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ )
3. Cloreto de Níquel ( $\text{NiCl}_2$ )
4. Selenito de sódio ( $\text{NaSeO}_3$ )
5. Metavanadato de sódio ( $\text{NaVO}_3$ )
6. Molibdato de amônio ( $\text{NH}_4\text{MoO}_4$ )

A influência dos elementos traços sobre a  $\text{Ca}^{++}$  ATPase foi avaliada da seguinte maneira:

Os germens dentais recém-coletados eram pré-incubados por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$  na seguinte solução:

Tampão Tris - HCl - 0,1M pH 7,4	-	0,5 ml
NaCl à 0,9%	-	0,4 ml
Elemento traço (10mM)	-	0,1 ml

O meio era desprezado e os germens lavados com solução de NaCl à 0,9% (1 ml) em seguida incubados no meio para a dosagem da  $\text{Ca}^{++}$  ATPase, como descrita no item 4.1.

4.3. Influência de Elementos Traços "In Vivo" Sobre a  
Ca<sup>++</sup>-ATPase do Gérmen Dental

Os elementos traços eram usados nas seguintes concentrações, obedecendo ao critério de toxicidade dos mesmos, que por esta razão foram diferentes entre si. As soluções dos elementos traços foram preparadas nas seguintes concentrações:

NaSeO <sub>3</sub>	-	0,22%
NaVO <sub>3</sub>	-	0,60%
NiCl <sub>2</sub>	-	0,67%
NaF	-	0,22%
CoCl <sub>2</sub>	-	0,63%
NH <sub>4</sub> MO <sub>4</sub>	-	1,50%

As soluções dos sais dos elementos traços eram injetadas nos ratos com sete dias de idade, por via subcutânea, num volume de 0,1 ml de solução, variando de 0,32 a 0,52 mM, duas vezes no sétimo dia (às 8:30 e 17:30 horas) e uma vez no oitavo dia (às 8:30 hs.).

Após uma hora da última dose os ratos eram sacrificados e seus germens dentais retirados para a dosagem da Ca<sup>++</sup>-ATPase, como descrito no item 4.1.

4.4. Influência do Levamisole(Cloridrato de Levamisol)  
na Atividade da Ca<sup>++</sup>ATPase de Germens Dentais

O Levamisole foi usado no meio de incubação, na concentração final de 0,5 mM, com a finalidade de inibir a atividade das fosfatases alcalinas não específicas para evidenciar a atividade isolada da enzima Ca<sup>++</sup>-ATPase.

4.5. Análise Estatística

A análise estatística empregada foi a análise de Variância a um critério e o teste de Tuckey para comparações individuais ao nível de significância de 1%.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efeito de Elementos Traços "In Vivo" Sobre a Atividade Enzimática Total (Ca<sup>++</sup>-ATPase + Fosfatase Alcalina)

Os valores médios da atividade enzimática total, expressos em ug de fósforo inorgânico por 100 mg de peso seco do gérmen dental de rato estão expressos na Tabela 1. Através da análise estatística, apresentada na Tabela 2, foi detectado efeito altamente significativo do tratamento com os diferentes elementos traços. Pelo teste de Tuckey, ao nível de 1% de probabilidade, constatou-se que todos os tratamentos diferiram do controle. Entre os elementos traços, o que apresentou maior inibição da atividade enzimática total foi o Se, embora não diferisse estatisticamente do Co. Em seguida, em ordem decrescente de inibição da atividade total, estão F, Mo, Ni (não diferindo entre si) e V. Para melhor visualização do efeito dos elementos traços, os resultados estão expressos graficamente na Figura I, em ordem decrescente de atividade enzimática total.

### 5.2. Efeito de Elementos Traços "In Vivo" Sobre a Atividade Enzimática da Ca<sup>++</sup>-ATPase

Os valores médios da atividade enzimática da Ca<sup>++</sup>-ATPase encontram-se na Tabela 3. Através da análise de va

riância (Tabela 4) constatou-se efeito altamente significativo dos tratamentos sobre a atividade enzimática. O Teste de Tuckey mostrou que todos os elementos traços empregados causaram significativa inibição da atividade enzimática da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase. A maior inibição foi obtida pelo Co, embora não diferisse do Ni, F e Se. Estes três elementos também não diferiram estatisticamente do Mo e V. Estes resultados estão também expressos graficamente na Figura II, onde os elementos estão em ordem decrescente de atividade da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

### 5.3. Efeito de Elementos Traços "In Vitro" Sobre a Atividade Enzimática Total ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase + Fosfatase Alcalina)

Os dados referentes a atividade enzimática total do gérmen dental de rato, submetido ao tratamento com diferentes elementos traços "in vitro" estão expressos na Tabela 5. A análise de variância, mostrada na Tabela 6, demonstra um efeito significativo dos tratamentos sobre a atividade enzimática total. Pelo teste de Tuckey a 1%, com exceção do Co, todos os elementos diferiram significativamente do controle e não foram diferentes entre si quanto a inibição da atividade enzimática total (Tabela 5 e Figura III).

5.4. Efeito de Elementos Traços "In Vitro" Sobre a Atividade Enzimática de  $Ca^{++}$ -ATPase

Na Tabela 7 podem ser observados os valores médios de atividade enzimática da  $Ca^{++}$ -ATPase após o tratamento do gérmen dental de rato com diferentes elementos traços. A análise de variância mostrou efeito significativo dos tratamentos (Tabela 8). Ainda na Tabela 7 pode-se observar que, pelo teste de Tuckey a 1%, os elementos não diferiram entre si, mas ficaram significativamente menores que o controle (Figura IV).

5.5. Contribuição Relativa de  $Ca^{++}$ -ATPase e da Fosfatase Alcalina Com Relação à Inibição Enzimática dos Elementos Traços "In Vivo" e "In Vitro" Sobre o Gérmen Dental do Rato

Na Tabela 9 estão expressas as porcentagens da atividade enzimática da  $Ca^{++}$ -ATPase e da Fosfatase alcalina (em ug de fósforo inorgânico/100mg de peso seco) do gérmen dental do rato. Verifica-se que nos controles, tanto "in vivo" quanto "in vitro", a  $Ca^{++}$ -ATPase foi a principal responsável pela atividade enzimática. Os elementos traços, em geral, aumentaram a participação relativa da fosfatase alcalina na atividade enzimática, sendo isto mais evidente "in vivo". Os

casos mais característicos são o Ni e o Co, que permitiram que a fosfatase alcalina fosse a principal responsável pela atividade enzimática. Exceção a esta tendência geral foi o Ni "in vitro", que aumentou a participação relativa da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase em relação ao controle.

A Figura V mostra, graficamente, o efeito de elementos traços "in vivo" e "in vitro", sobre a atividade enzimática da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase e da enzima total. Observa-se que os elementos traços, em geral, fizeram com que a participação da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase diminuisse na atividade enzimática total.

A Figura V também permite comparar o comportamento da atividade enzimática da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase e da fosfatase alcalina. De maneira geral, houve um efeito semelhante dos elementos traços tanto "in vivo" como "in vitro". Merecem destaque, por apresentarem maior atividade "in vitro" que "in vivo", os efeitos do Se e do Co, tanto para a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase como para a atividade enzimática total, e do Ni para a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

TABELA 1:- Efeito de elementos traços "In Vivo" sobre a atividade enzimática total da  $Ca^{++}$ -ATPase ( $Ca^{++}$ -ATPase + Fosfatase alcalina) expressa em microgramas de fósforo inorgânico/100 mg de peso seco do gérmen dental de rato.

TRATAMENTOS	FÓSFORO INORGÂNICO (ug/100 mg de peso seco)	
	1	2
Controle	251,49	a
Se	90,96	d
V	172,64	b
Ni	158,83	bc
F	134,71	c
Mo	148,53	bc
Co	122,59	cd
DMS	37,49	

1. Média de 7 amostras
2. Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem significativamente entre si ao nível de 1% pelo teste de Tuckey.

TABELA 2:- Análise de variância dos resultados da Tabela 1,  
nível de significância de 1%.

CAUSA DA VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F	Pr	F
Tratamentos	6	106634,31	17772,38	34,62	0,0001	
Resíduo	42	21560,24	513,36			
TOTAL	48	128195,23				

TABELA 3:- Efeito de elementos traços "In Vivo" sobre a atividade enzimática da  $Ca^{++}$ -ATPase expressa em microgramas de fósforo inorgânico/100 mg de peso seco do gérmen dental de rato.

TRATAMENTOS	FÓSFORO INORGÂNICO (ug/100 mg de peso seco)	
	1	2
Controle	189,07	a
Se	65,27	bc
V	95,55	b
Ni	55,82	bc
F	62,08	bc
Mo	90,21	b
Co	46,26	c
DMS	43,284	

1. Média de 7 amostras
2. Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem significativamente entre si ao nível de 1% pelo teste de Tuckey.

TABELA 4:- Análise de variância dos resultados da Tabela 3,  
nível de significância de 1%.

CAUSA DA VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F	Pr	F
Tratamentos	6	99557,55	16592,92	24,25	0,0001	
Resíduo	42	28741,77	684,31			
TOTAL	48	128298,77				



TABELA 5:- Efeito de elementos traços "In Vitro" sobre a atividade enzimática total da  $Ca^{++}$ -ATPase ( $Ca^{++}$ -ATPase e  $Ca^{++}$ -ATPase + Fosfatase alcalina) expressa em microgramas de fósforo inorgânico/100mg de peso seco do germen dental do rato.

TRATAMENTOS	FÓSFORO INORGÂNICO (ug/100 mg de peso seco)	
	1	2
Controle	222,37	a
Se	156,72	b
V	170,44	b
Ni	128,93	b
F	158,87	b
Mo	128,48	b
Co	177,25	ab
DMS	50,923	

1. Média de 6 amostras
2. Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem significativamente entre si ao nível de 1% pelo teste de Tuckey.

TABELA 6:- Análise de variância dos resultados da Tabela 5,  
nível de significância de 1%.

CAUSA DA VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F	Pr F
Tratamentos	6	37147,28	6191,21	7,78	0,0001
Resíduo	35	27863,26	796,10		
TOTAL	41	65010,64			

TABELA 7:- Efeito de elementos traços "In Vitro" sobre a atividade enzimática da  $Ca^{++}$ -ATPase, expressa em microgramas de fósforo inorgânico/100mg de peso seco do gérmen dental do rato.

TRATAMENTOS	FÓSFORO INORGÂNICO (ug/100 mg de peso seco)	
	1	2
Controle	147,83	a
Se	83,04	b
V	81,96	b
Ni	98,99	b
F	54,62	b
Mo	75,03	b
Co	80,03	b
DMS	45,962	

1. Média de 5 amostras
2. Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem significativamente entre si ao nível de 1% pelo teste de Tuckey.

TABELA 8:- Análise de variância dos resultados da Tabela 7,  
nível de significância de 1%.

CAUSA DA VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F	Pr	F
Tratamentos	6	15514,39	4252,39	8,10	0,0001	
Resíduo	28	14696,04	524,86			
TOTAL	34	40210,43				

TABELA 9:- Efeito de elementos traços "In Vivo" e "In Vitro" sobre a atividade enzimática da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase e da Fosfatase alcalina do gérmen dental do rato.

ELEMENTOS	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (EM PORCENTAGEM)			
	"IN VIVO"		"IN VITRO"	
	$\text{Ca}^{++}$ -ATPase	Fosf.Alcal.	$\text{Ca}^{++}$ -ATPase	Fosf.Alcal.
Controle	75,17	24,83	66,47	33,53
Se	71,75	28,24	53,05	49,95
V	55,34	44,65	48,09	51,90
Ni	35,21	64,79	76,78	23,22
F	51,39	48,61	34,39	65,61
Mo	60,40	39,50	53,45	46,55
Co	37,73	62,26	45,16	54,84

**Figura I - Efeito de elementos traços "in vivo" sobre a atividade enzimática total**

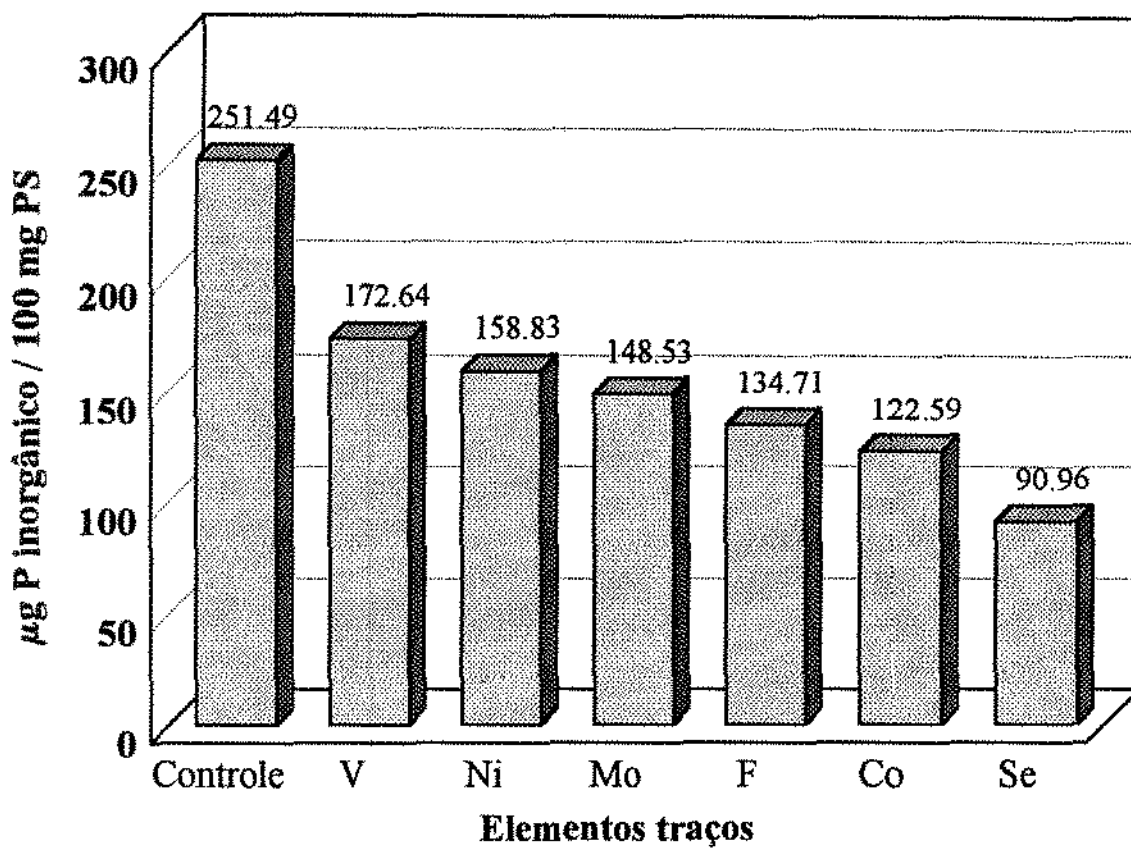


FIGURA II: Efeito de elementos traços "in vivo" sobre a atividade da  $\text{Ca}^{++}$  ATPase

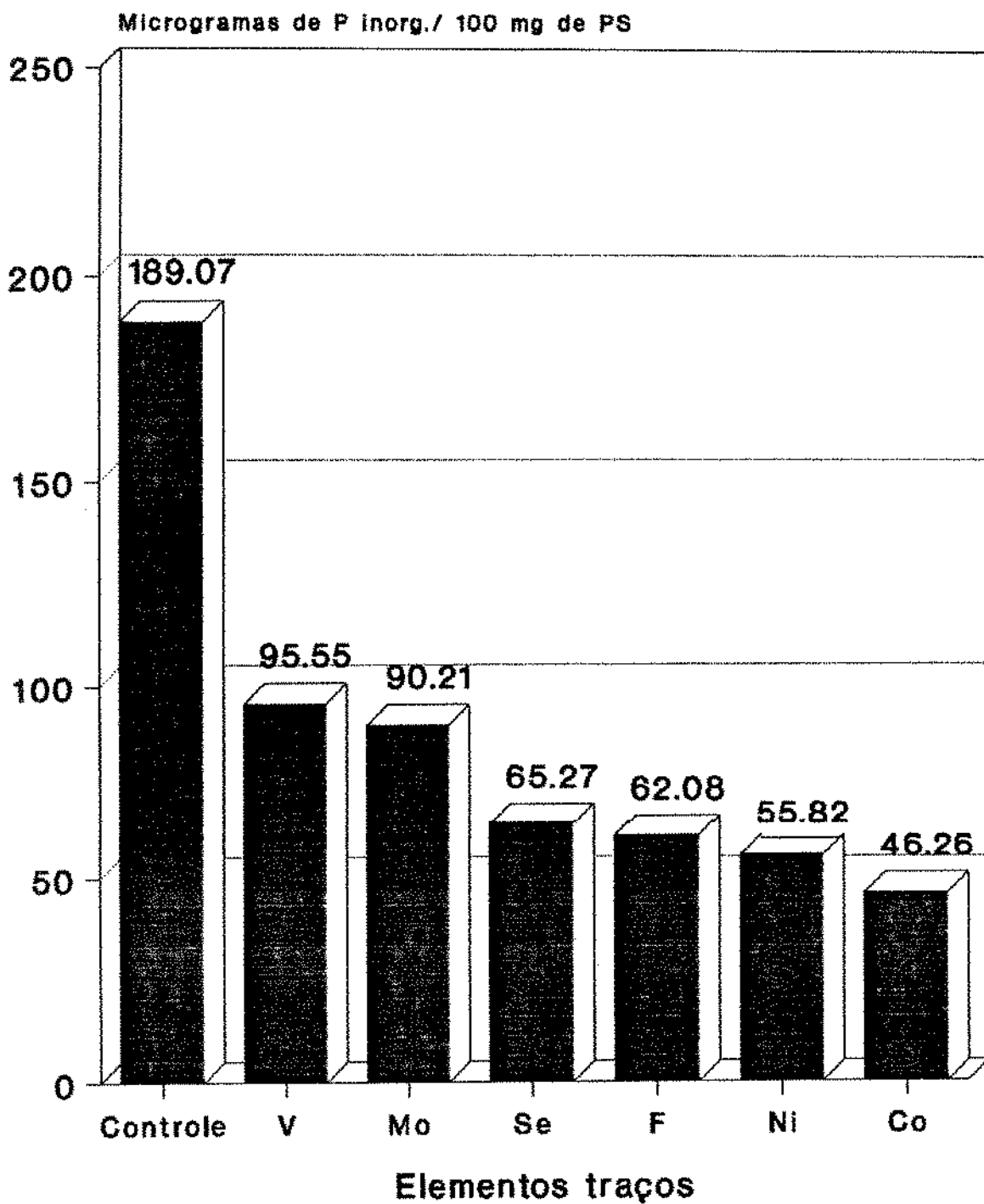


FIGURA III: Efeito de elementos traços "in vitro" sobre a atividade enzimática total

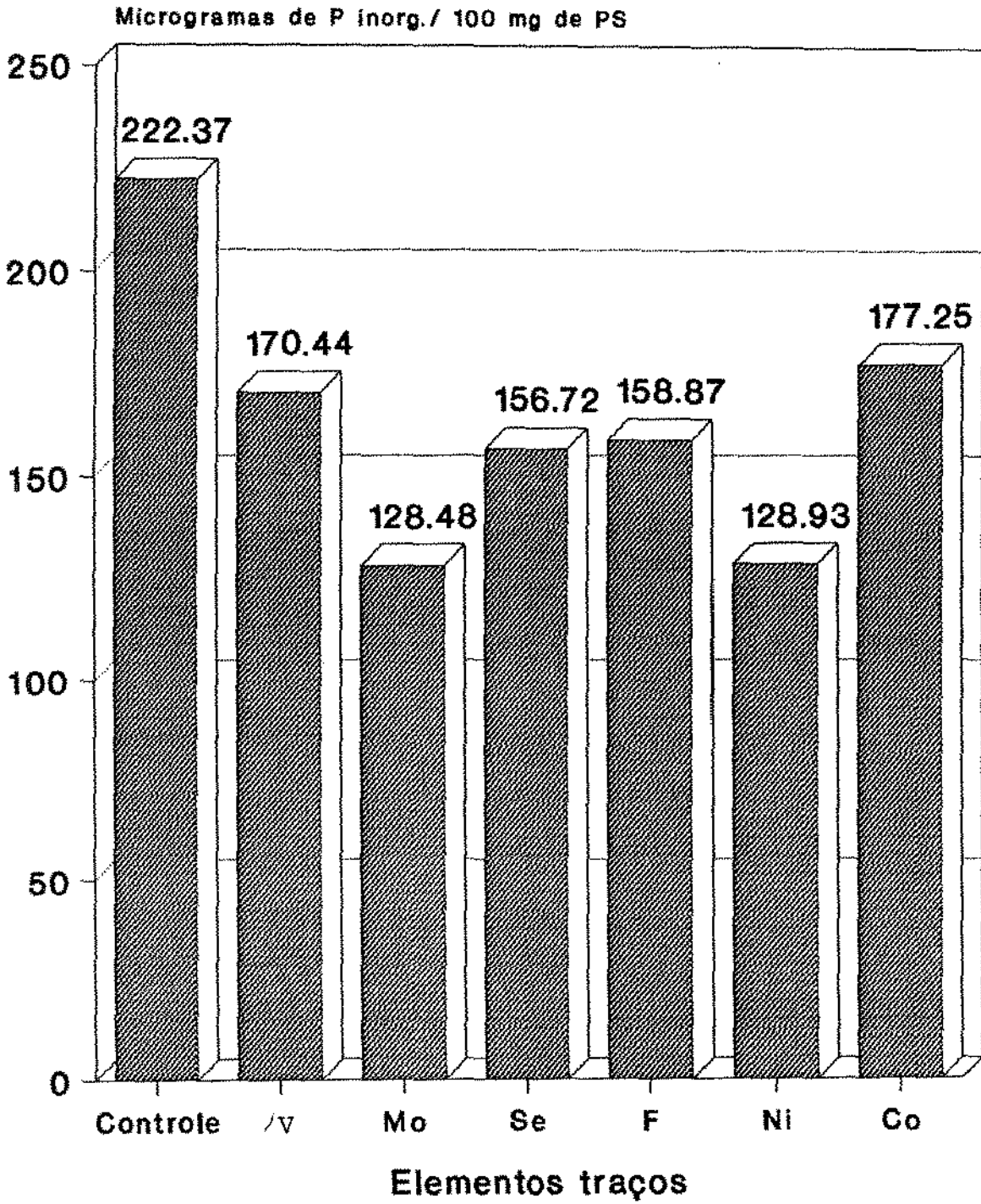




FIGURA IV: Efeito de elementos traços "in vitro" sobre a atividade da  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase

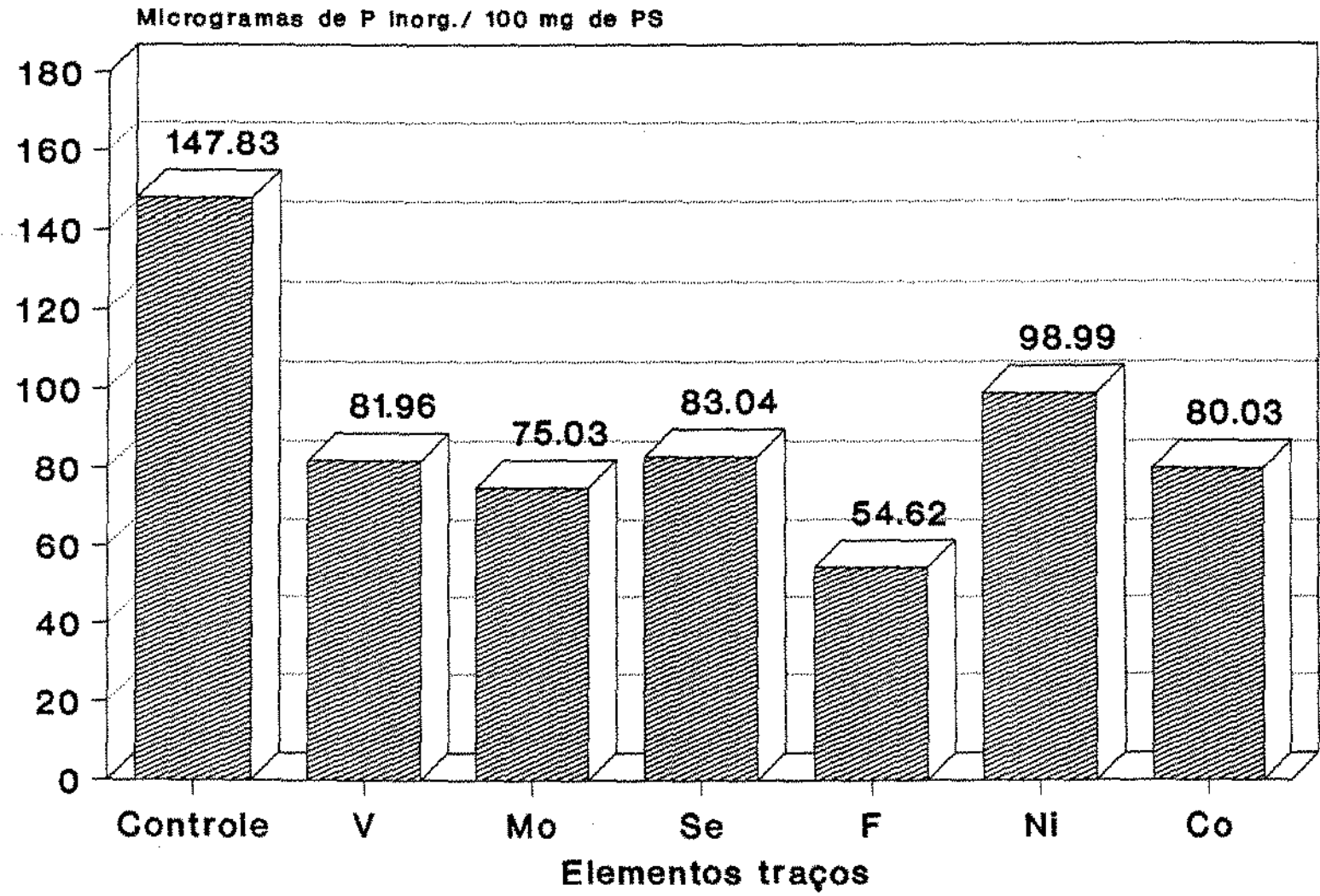
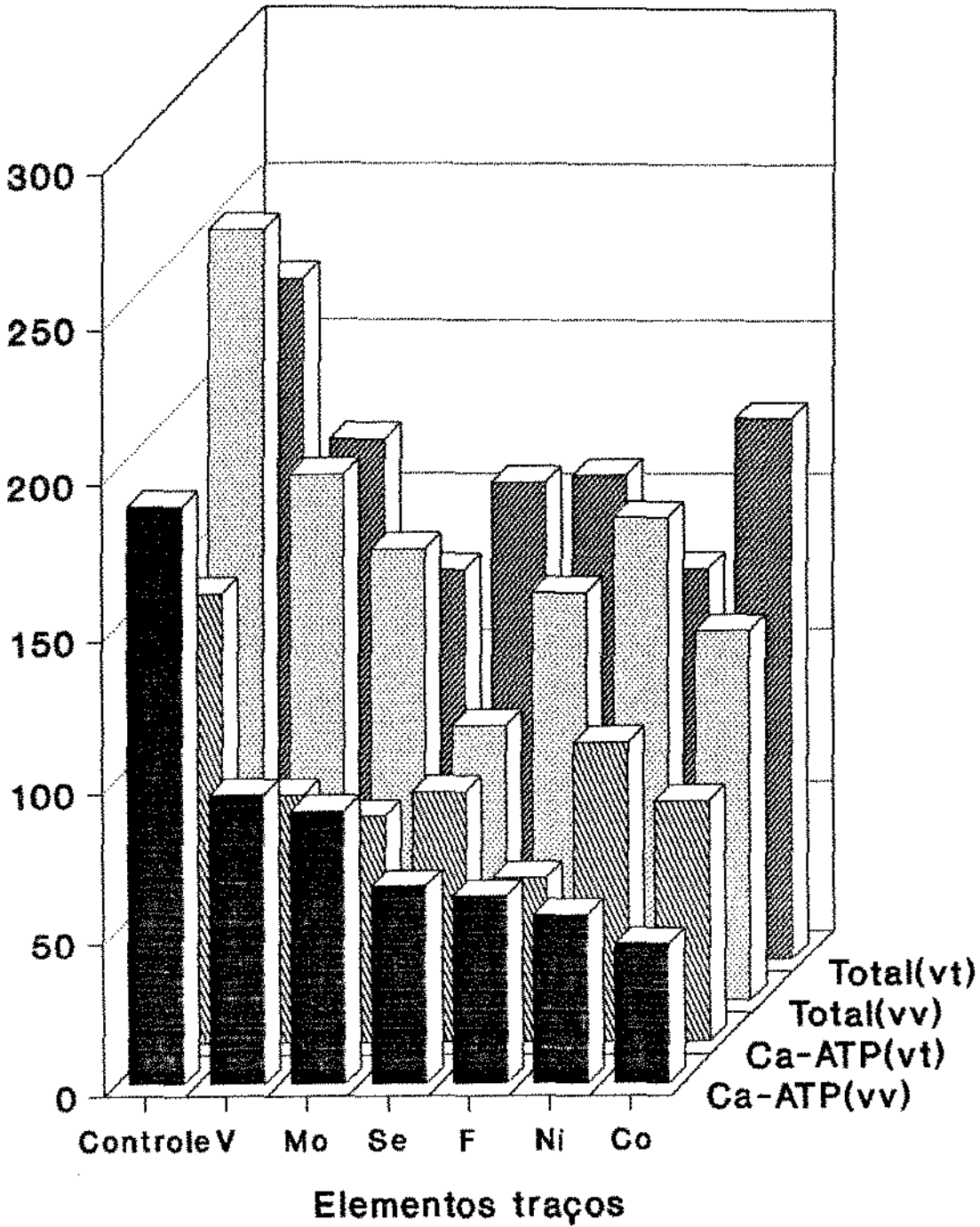


FIGURA V: Atividade enzimática "in vivo" e "in vitro" da  $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$  e total ( $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$  + fosfatase alcalina).  
Microgramas de P inorg./ 100 mg de PS



## 6. DISCUSSÃO

A  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase participa do transporte do cálcio iônico em todas as células do organismo; contudo, para os tecidos que se calcificam ela desempenha um importante papel no fluxo do cálcio à zona de mineralização.

Por outro lado, o cálcio iônico é um importante cofator de enzimas envolvidas em muitos processos metabólicos e, conseqüentemente, a sua regulação se reflete diretamente no controle da atividade metabólica celular. Por essa razão, torna-se de relevante importância o estudo da ação de elementos traços sobre a atividade da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do gérmen dental, uma vez que estes elementos estão implicados, de alguma maneira, às alterações do processo de mineralização biológica e, também, com a incidência de cárie (MUHLER et al 1957; TANK & STORVICK, 1960; HADJMARKOS, 1966; CURZON & CROCKER, 1978).

A avaliação da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do gérmen dental foi feita considerando-se a atividade total ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase e fosfatase alcalina) e a atividade isolada da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase. Para isto, utilizou-se no meio de incubação a droga Levamisole, que é um inibidor específico da fosfatase alcalina (MAGNUSSON & LINDE, 1974; SALAMA et alii, 1985; SALAMA et alii, 1987). Este procedimento foi necessário uma vez que nas condições utilizadas para a incubação do gérmen dental, as duas enzimas conseguem hidrolisar o ATP, sendo aproximadamente 70% para a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase e 30% para a fosfatase alcalina (LE BELL, 1981).

A avaliação da atividade enzimática total apresen-

ta a vantagem de se considerar a ação das duas enzimas e, também, o efeito dos elementos traços sobre cada uma delas.

Os resultados obtidos da administração intraperitoneal dos elementos traços aos ratos com 7 dias de idade, mostram claramente que todos eles inibiram significativamente a atividade total ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase + fosfatase alcalina) dos germes dentais dos primeiros molares (Tabela 1). Com exceção do selênio, que se mostrou mais eficaz, os outros elementos não apresentaram diferenças entre si.

Como o grau de toxicidade é variável entre os elementos, não foi possível padronizar a dosagem, uma vez que se diluisse todas as concentrações em função do elemento mais tóxico, os outros perderiam de muito a sua atividade. Por esta razão, a dosagem dos elementos traços foi escolhida baseando-se no seu grau de tolerabilidade pelo rato.

O selênio foi o elemento que apresentou o maior grau de toxicidade para o rato, o que está em acordo com trabalhos de outros autores (ROSENFELD & BRANT, 1964). O selênio é um elemento cariogênico (CURZON & CROCKER, 1978; HADJIMARKOS, 1965; MUHLER et al., 1957; TANK & STORWICK, 1960), enquanto que o F, V e Mo são anticariogênicos (HADJIMARKOS, 1966; TANK & STORWICK, 1960). Sendo assim, parece não haver nenhuma relação direta da atividade total da ATPase com a cárie dentária.

Quando se considera a atividade enzimática da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase isoladamente, os resultados mostram o efeito inibitório em relação aos elementos traços, isto é, todos eles inibiram significativamente a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase. Contudo, a variação da inibição não seguiu o mesmo padrão da atividade total, sendo que, o Co, Ni, F e Se foram os que apresentaram maior grau de

inibição (Tabela 3).

Esta diferença entre a inibição da atividade total e a da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase indica que os elementos traços agiram diferentemente sobre as duas enzimas ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase e fosfatase alcalina), como indica a Tabela 9.

A atividade enzimática total "in vitro" apresentou resultado semelhante ao apresentado "in vivo", isto é, todos os elementos inibiram significativamente a atividade das enzimas  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase e fosfatase alcalina (Tabela 5); contudo, neste caso, o selênio não diferiu dos outros elementos. Comparando a ação inibitória dos elementos "in vivo" e "in vitro", pode-se constatar que houve diferença no comportamento dos mesmos. Assim, o selênio, o cobalto e o flúor foram mais ativos quando injetados intraperitonealmente do que "in vitro". Os outros elementos se comportaram de forma semelhante, não havendo diferença significativa entre eles, com exceção do Ni e o Co que foram mais ativos "in vitro".

No que diz respeito a atividade da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, a atuação "in vitro" de todos os elementos foi semelhante aos resultados obtidos "in vivo", isto é, todos eles inibiram significativamente a atividade enzimática do gérmen dental, não havendo diferença significante entre eles, embora o flúor e o Co foram os que apresentaram maior grau de inibição.

A inibição da ATPase pelo flúor é um fato conhecido e confirmado por vários autores (MARQUIS, 1976; KIRSCHNER, 1963). Segundo LE BELL (1981) a percentagem da hidrólise do ATP pelo gérmen dentário, "in vitro", é de aproximadamente 70% para a  $\text{Ca}^{++}$ ATPase e 30% para a fosfatase alcalina, nas condições próximas da neutralidade de pH.

Os presentes resultados indicam que, para a atuação "in vivo" dos elementos, somente o rato controle e o tratado com selênio apresentaram esta proporção. Isto significa que, "in vivo", o selênio inibiu de forma equivalente as enzimas  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase e fosfatase alcalina. Por outro lado, o níquel e o cobalto inibiram mais intensamente a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do que a fosfatase alcalina (Tabela 9).

Com relação a percentagem de inibição "in vitro", com exceção do níquel, todos os elementos inibiram mais a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do que a fosfatase alcalina, sendo que o flúor foi o mais eficaz (Tabela 9).

De modo geral pode-se dizer que, com exceção do selênio in vivo e do níquel in vitro, todos os elementos inibiram proporcionalmente mais a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do que a fosfatase alcalina.

A diferença existente entre a atuação dos elementos "in vivo" e "in vitro", se deve, provavelmente, às condições diferentes em que os mesmos se encontram e da particularidade química de cada um. Nas condições "in vivo", os elementos que tem maior facilidade de difusão pela corrente sanguínea e de se acumular dentro do gérmen dental tem, obviamente, maior potencial de inibição do que os outros. É o caso do selênio, do cobalto e do níquel para a atividade da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase. Já no caso da inibição "in vitro", o flúor foi o inibidor mais potente. Na verdade ainda não se tem dados suficientes para explicar claramente esta diferença de atuação dos elementos "in vivo" e "in vitro", considerando-se, também, que a concentração dos mesmos não foram iguais nas duas condições. Portanto, há necessidade de mais estudos sobre a inibição da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase pe

los elementos traços para que se possa esclarecer melhor a respeito do mecanismo de ação desses elementos.

## 7. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, da ação dos elementos traços *in vivo* e *in vitro* sobre a atividade da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do gérmen dental do rato, parece lícito emitir as seguintes conclusões:

1. Todos os elementos estudados *in vivo* inibiram significativamente a atividade enzimática total ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase + fosfatase alcalina).

2. O selênio foi o elemento que apresentou *in vivo* o maior grau de inibição da atividade enzimática total ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase + fosfatase alcalina).

3. Todos os elementos estudados *in vivo* inibiram significativamente a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

4. O cobalto foi o elemento que apresentou, *in vivo*, o maior grau de inibição da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

5. Todos os elementos estudados *in vitro* inibiram significativamente a atividade enzimática total ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase + fosfatase alcalina).

6. Todos os elementos estudados *in vitro* inibiram significativamente a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

7. O flúor foi o elemento que apresentou *in vitro* o maior grau de inibição da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

Como conclusão geral pode-se dizer que os elementos traços (Se, V, Ni, F, Mo e Co), estudados *in vivo* e *in vitro*, são inibidores eficazes da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase e da fosfatase alcalina do gérmen dental do rato, quando se usa o ATP como substrato em pH próximo da neutralidade.



## 8. RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a influência *in vivo* e *in vitro* de elementos traços (Se, V, Ni, Mo, F e Co) na atividade enzimática da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do gérmen dental do rato.

No estudo *in vivo*, os elementos foram injetados intraperitonealmente em ratos com 7 dias de idade, em doses variando de (0,32 a 0,52 mM) por rato, 3 vezes no período de 24 horas. Uma hora após a última dose, os ratos foram sacrificados e retirados os germens de seus primeiros molares. A avaliação da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase foi feita incubando-se os germens em meio neutro, à 37°C, contendo ou não Levamisole como inibidor da fosfatase alcalina e ATP como substrato.

No estudo *in vitro*, os germens dentais dos primeiros molares de ratos com 8 dias de idade foram pré-incubados em meio contendo os elementos traços na concentração de 10 mM durante 60 minutos, à 37°C. Os germens, em seguida, foram lavados com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e incubados da mesma maneira do estudo *in vivo*.

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1. Todos os elementos estudados *in vivo* inibiram significativamente a atividade total da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase + fosfatase alcalina).

2. O selênio foi o elemento que apresentou, *in vivo*, o maior grau de inibição da atividade enzimática total ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase + fosfatase alcalina).

3. Todos os elementos estudados *in vivo* inibiram significativamente a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

4. O cobalto foi o elemento que apresentou, *in vivo*, o maior grau de inibição da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

5. Todos os elementos estudados *in vitro* inibiram significativamente a atividade enzimática total ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase + fosfatase alcalina).

6. Todos os elementos estudados *in vitro* inibiram significativamente a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

7. O flúor foi o elemento que apresentou, *in vitro*, o maior grau de inibição da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

Como conclusão geral pode-se afirmar que os elementos traços (Se, V, Ni, F, Mo e Co) estudados *in vivo* e *in vitro*, são inibidores eficazes da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase e da fosfatase alcalina do gêrmen dental do rato, quando se usa o ATP como substrato em pH próximo da neutralidade.

## 9. SUMMARY

This research was carried out to reach as objective to study the influence of trace elements (Se, V, Ni, Mo, F and Co) "in vivo" and "in vitro" on the activity of  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase from dental germ of rat.

In the "in vivo" studies the elements were injected intraperitoneally in seven day-old rats. The doses varied from 0,32 to 0,52 mM per rat and were injected three times during a period of 24 hours. One hour after the last dose, the rats were sacrificed and the germs of their first molars were taken out.

$\text{Ca}^{++}$ -ATPase activity was evaluated by incubating the germs in neutral media at  $37^{\circ}\text{C}$ , containing or not ATP as substrate and levamisole as an inhibitor of alkaline phosphatase.

In the "in vitro" work, the dental germs of the first molars from seven day-old rats, were pre-incubated in media containing traces elements at 10 mM concentration during 60 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$ . The germs were then washed with physiological solution (0,9% NaCl) and incubated in the same way as in the "in vivo" studies.

The results obtained allowed the following conclusions:

1. All the elements studied "in vivo" inhibited significantly the total enzyme activity ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase + alkaline phosphatase).

2. Selenium was the element which exhibited the highest degree of inhibition of total enzyme activity ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase + alkaline phosphatase) "in vivo".

3. All the elements studied "in vivo" significantly inhibited the activity of  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

4. Cobalt was the element which presented "in vivo" the highest inhibition of  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase activity.

5. All the elements studied "in vitro" inhibited significantly the total enzyme activity ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase + alkaline phosphatase)

6. All the elements studied "in vitro" significantly inhibited the  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase activity.

7. Fluoride was the element that exhibited "in vivo" the highest inhibition of  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase activity.

As a general conclusion, it is possible to state that the trace elements Se, V, Ni, F, Mo and Co are effective inhibitors of the enzyme  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase and alkaline phosphatase of rat dental germ, when the reaction was carried out at neutral pH.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIKO, Y. et alli.  $Ca^{++}$  stimulated adenosine triphosphatase dental pulp of albino rabbit. J.dent.Res., 56: 91, 1976.
2. ABIKO, Y. Studies on calcium-stimulated adenosine triphosphatase in the albino rabbit dental pulp: its subcellular distribution and properties. J.dent.Res., 56(12): 1558-68, 1977.
3. CRENSHAW, M.A. & TAKANO, Y.  $Ca^{++}$ -ATPase in the rat molar enamel organ. J.dent.Res., 60(suppl.): 130-2, 1982.
4. CURZON, M.E.J. & CROCKER, D.C. Relationship of trace elements in human tooth enamel to dental caries. Archs oral Biol., 23: 647-53, 1978.
5. GRANSTROM, G. & LINDE, A. A comparison of ATP-degrading enzyme activities in rat incisor odontoblasts. J. Histochem.Cytochem., 24(2): 1026-32, 1976.
6. \_\_\_\_\_; JONTELL, M.; LINDE; A. Separation of odontoblast  $Ca^{++}$ -ATPase and alkaline phosphate. Calcif. tiss.Int., 27: 211-7, 1979.

7. GUO, M.K. & MESSER, H.H. Properties of  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ - activated adenosine triphosphatase from rat incisor pulp. Archs oral Biol., 21: 637-40, 1976.
8. HADJIMARKOS, D.M. Effect of selenium on dental caries. Archs envir.Hlth., 10: 893-9, 1965.
9. \_\_\_\_\_. Micronutrient elements in relation to dental caries. B.Rev.Nutr.Res., 27: 3, 1966.
10. HEYDEN, G. An enzyme histochemical study of adenosine triphosphatase (ATPase) activity during molar eruption in the mouse. J.periodont.Res., 5: 69-77, 1970.
11. \_\_\_\_\_ & FROM, S.H. A histochemical demonstration of ATPase activity during tooth ontogeny in the mouse. Archs oral Biol., 14: 1225-32, 1969.
12. INAGE, T. & WEINSTOCK, A. Localization of the enzyme ATPase in the rat secretory ameloblast by means of electron microscopy. J.dent.Res., 58(suppl.): 1010-1, 1979.
13. KIRSCHNER, L.B. Fluoride inhibition of sodium extrusion from swine erythrocytes and its metabolic correlates. Archs Biochem.Biophys., 106: 57-64, 1964

14. LA ROCHE; B.R. Activite ATPasique an corirs de l'odon-  
togenise chez le foctes de lapin. C.r.Séanc. Soc.  
Biol., 165: 1897-9, 1971.
15. LE BELL, Y.  $Ca^{++}$ -and- $Mg^{++}$ -ativated ATP hydrolysis in  
human tooth pulp. J.dent.Res., 60(2): 128-33, 1981.
16. MAGNUSSUM, B.C. & LINDE, A. Alkaline phosphatase nu-  
cleotidase and ATPase activity in the molar region  
of the mouse. Histochemistry, 42: 221-32, 1974a.
17. MARQUIS, E.R. Inhibition of streptococcal adenosine tri-  
phosphatase by fluoride. J.dent.Res., 56:6, 1977.
18. MENANTREAU, J. Hydrolysis of ATP and P<sub>i</sub> in the pulp  
of mineralizing molars. The influence of  $Ca^{2+}$  and  
 $Mg^{2+}$ . J.Biol.Bucale, 9: 5-16, 1981.
19. MORNSTAD, H. Adenosine triphosphate catabolism in homo-  
genates of rat secretory enamel organs incubated in  
histochemical lead media. Histochemistry, 50: 301-  
11, 1977.
20. \_\_\_\_\_. Calcium-stimulated ATPase activity in homoge-  
nates of the secretory enamel organ in the rat.  
Scand.J.dent.Res., 86: 1-11, 1978.
21. \_\_\_\_\_ & SUNDSTRON, B. Adenosine triphosphate hydro-  
lysis in rat dental tissues. Histochemistry, 47:  
303-14, 1976a.

22. MÖRNSTAD, H. & SUNDSTRÖM, B. Adenosine triphosphate hydrolysis in rat dental tissues. Histochemistry, 48: 33-42, 1976b.
23. MUHLER, J.C. et al. The effect of selenium on the incidence of dental caries in rats. J.dent.Res., 36: 895-6, 1957.
24. ROSENFELD, I.S. & BRATH, O.A. Selenium geobotany, biochemistry, toxicity and nutrition. New York, Academic, 1964. p. 372-409.
25. RUSSEL, J. & ALLEN, L. Estimation of phosphorus. J. Biochem., 34: 858-61, 1940.
26. SALAMA, A.H. et alii Cytochemistry of  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  ATPase in rat incisor ameloblast. J.dent.Res., 64(suppl.) : 372, 1985.
27. \_\_\_\_\_ et alii Cytochemical localization of  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  adenosine triphosphatase in rat incisor ameloblast during enamel secretion and maturation. J. Histochem.Cytochem., 35(4): 471-82, 1987.
28. SASAKI, T. & GARANT, P.R. Ultracytochemical demonstration of ATP dependent calcium pump in ameloblast of rat incisor enamel organ. Calcif.tiss.int., 39: 86-96, 1986.



29. SEIBEL, W.A. Ultrastructural Localization of Adenosine Triphosphatase in the Odontogenic Tissue of the Mouse Molar. I.A.D.R., 57: 132, 1978.
  
30. SEVERSON, A.R. Histochemical Demonstration of Nucleoside Triphosphate Hydrolysis in the Mouse Dentition. Acta Histochem. Bd., 40: 5, 86-97, 1971.
  
31. TAKANO, Y. et alii. Ca-ATPase and ALPase Activities at the Initial Calcification Sites of Dentin and Enamel in the Rat Incisor. Cell.Tis.Res., 243: 91-99, 1986.
  
32. TANK, G. & STORVICK, C.A. Effect of Naturally Occurring Selenium and Vanadium on Dental Caries. J.D. Res., 39: 473-88, 1960.
  
33. YOSHIMURA, F. & SUZUKI, T. Calcium-Stimulated Adenosine Triphosphatase in the Microsomal Fraction of Tooth Germ From Porcine Fetus. Bioch. Bioph. Acta, 410: 167-77, 1975.