

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Estrutura e composição química do esmalte dentário em vertebrados terrestres fósseis e
recentes**

Structure and chemical composition of dental enamel in modern and fossil terrestrial
vertebrates

Caroline Pessoa de Lima

Ribeirão Preto - SP

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Estrutura e composição química do esmalte dentário em vertebrados terrestres fósseis e recentes

Structure and chemical composition of dental enamel in modern and fossil terrestrial vertebrates

Caroline Pessoa de Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Alicino Bockmann

Ribeirão Preto - SP

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lima, Caroline Pessoa de

Estrutura e composição química do esmalte dentário em vertebrados terrestres fósseis e recentes. Ribeirão Preto, 2023.

96 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Comparada

Orientador: Bockmann, Flávio Alicino

1. dentes. 2. esmalte. 3. Mammalia. 4. Crododylia. 5. microestrutura. 6. composição. 7. fósseis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus orientadores Raquel e Flávio. À professora Raquel, que apesar de não ser minha orientadora formalmente, na prática, me orientou na maior parte deste projeto, me introduziu a essa área de estudo, suas técnicas e desafios e me inspirou muitas vezes com seu entusiasmo pela ciência e profunda curiosidade. Ao professor Flávio, por sempre apoiar nossas ideias, pelo bom humor e tranquilidade, por ser um exemplo e inspiração no dia-a-dia e na atividade científica de excelência, serei também sempre grata.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Histologia e Proteínas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Patricia Basile, Natalia Macedo, Jonas Figueiredo, Valéria Valle, Veridiana Mantovani, Ana, João Vítor, Luan e Renê Seabra, pela convivência e aprendizados. Especialmente a Pati, Natalia e Jonas, agradeço por toda a ajuda que me deram neste período.

Agradeço aos meus colegas do LIRP (Laboratório de Ictiologia de Ribeirão Preto), André Esguicero, Gabriel Afonso, Haroldo Braga, Otávio Goes, Malu Araújo, João Trevisan, Pedro Rizzato e Hertz Figueiredo, por serem sempre tão solícitos, por criarem um ambiente de trabalho tão instigador e agradável. Agradeço, especialmente, ao Gabriel pela revisão do texto e suporte emocional no fim do mestrado.

Agradeço aos professores Fábio Nogueira (UFRJ), Frederico Sousa (UFPB), Sérgio Line (Unicamp), Fernando Barbosa (FCFRP-USP), Carlos Sorgi (FFCLRP-USP), Annie Hsiou (FFCLRP-USP), Max Langer (FFCLRP-USP) e Edson Guilherme (UFAC), pelo suporte com material paleontológico e técnicas analíticas.

Agradeço à CAPES pelo financiamento através da concessão de bolsa de pesquisa, e ao CNPQ e FAPESP pelo financiamento indireto, através dos pesquisadores colaboradores citados acima.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	12
CAPÍTULO I: Composição química do esmalte dentário moderno e fossilizado	13
INTRODUÇÃO	13
Considerações sobre o esmalte dentário.....	13
O estudo de biomoléculas antigas	14
Composição inorgânica do esmalte	16
MATERIAIS E MÉTODOS	18
Amostra	18
Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva (EDS)	19
Preparação das amostras para microscopia de luz polarizada	20
Microscopia de luz polarizada.....	20
Quantificação dos principais componentes bioquímicos.....	20
Preparação de micro-amostra para espectrometria de massas: biópsia superficial do esmalte.....	21
Análise Química com Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma (ICP-MS).....	22
Espectrometria de Massas em Tandem (NanoLC-MS/MS)	22
Identificação de peptídeos e Inferência de Proteínas.....	23
RESULTADOS	24
Principais elementos da composição mineral do esmalte: Cálcio e Fósforo	24
Determinação do conteúdo mineral, orgânico e de água do esmalte	24
Composição de microelementos do esmalte superficial	25
Componente orgânico: proteoma do esmalte	26
DISCUSSÃO	29
Principais componentes bioquímicos	29
Microelementos no esmalte superficial	32
Componente orgânico: proteoma do esmalte	33
Comparação † <i>Purussaurus</i> e † <i>Neopiblema</i>	34
CONCLUSÕES	36
FIGURAS	37
TABELAS.....	50
LITERATURA CITADA	54
CAPÍTULO 2: Estrutura do esmalte de mamíferos a nível ordinal.....	62
INTRODUÇÃO	62
OBJETIVOS	65
MATERIAL E MÉTODOS.....	66
Amostra	66
Preparação dos cortes histológicos para a microscopia de luz	66
Preparação dos cortes histológicos para a microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	67

Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	67
Descrição da estrutura do esmalte	67
RESULTADOS	69
<i>Didelphis albiventris</i> (Figura 1) – Marsupialia, Didelphimorphia, Didelphidae - saruê	69
<i>Dasyus novemcinctus</i> (Figura 2) – Xenarthra, , Cingulata, Dasypodidae – tatu-galinha	69
<i>Felis catus</i> (Figura 3) – Carvinova, Felidae – gato-doméstico.....	69
<i>Pontoporia blainvillei</i> (Figura 4) – Artiodactyla, Cetacea, Pontoporiidae – toninha	70
<i>Subulo gouazoubira</i> (Figura 5) – Artiodactyla, Cervidae – veado-catingueiro.....	70
<i>Artibeus lituratus</i> (Figura 6) – Chiroptera, Phyllostomidae – morcego-da-cara-branca	70
<i>Sapajus</i> sp. (Figura 7) – Primata, Cebidae – macaco-prego.....	71
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (Figura 8) – Rodentia, Caviomorpha, Caviidae – capivara.....	71
† <i>Neopiblema</i> sp. (Figura 9) - Rodentia, Caviomorpha, †Neopiblemidae	71
<i>Caiman latirostris</i> (Figura 10)) – Crocodilia, Alligatoridae, Caimaninae - jacaré-de-papo-amarelo	72
<i>Melanosuchus niger</i> (Figura 11) – Crocodilia, Alligatoridae, Caimaninae - jacaré-açu	72
† <i>Purussaurus</i> sp. (Figura 12) - Crocodilia, Alligatoridae, Caimaninae	72
DISCUSSÃO	73
FIGURAS	82
LITERATURA CITADA	94

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I:

Figura 1. Árvore Filogenética de Amniota.

Figura 2. Imagens de um dente de †*Purussaurus* sp. (Crocodylia, Alligatoridae) usado para obter amostras superficiais do esmalte por ataque ácido.

Figura 3. Imagens de um dente de †*Neopiblema* sp. (Rodentia; Caviomorpha) usado para obter amostras superficiais do esmalte por ataque ácido.

Figura 4. Imagens de um dente de *Melanosuchus niger* (Crocodylia, Alligatoridae) usado para obter amostras superficiais do esmalte por ataque ácido.

Figura 5. Imagens de um dente de *Hydrochoerus hydrochaeris* (Rodentia; Caviomorpha) usado para obter amostras superficiais do esmalte por ataque ácido.

Figura 6. Regiões (4) mapeadas no esmalte de *Purussaurus* sp. para identificação e quantificação da composição de macrossubstâncias no tecido.

Figura 7. Três regiões do esmalte dentário de †*Purussaurus* sp. cujas amostras foram analisadas por espectrometria de massas.

Figura 8. Imagem microrradiográfica da amostra de corte de esmalte dentário de †*Purussaurus* sp.

Figura 9. Imagem microrradiográfica da amostra de corte de esmalte dentário de *M. niger*.

Figura 11. Imagem microrradiográfica da amostra de corte de esmalte dentário de *H. hydrochaeris*.

Figura 12. Microfotografia do corte histológico do esmalte dentário de †*Purussaurus* sp. sob luz polarizada com imersão em água.

Figura 13. Microfotografia do corte histológico do esmalte dentário de *Melanosuchus niger* sob luz polarizada com imersão em água.

Figura 14. Microfotografia do corte histológico do esmalte dentário de †*Neopiblema* sp. sob luz polarizada com imersão em água.

Figura 15. Microfotografia do corte histológico do esmalte dentário de *Hydrochoerus hydrochaeris* sob luz polarizada.

Figura 16. Volumes dos componentes mineral (A), orgânico (B) e de água total (B) no esmalte de †*Purussaurus* sp.

Figura 17. Volumes dos componentes mineral (A), orgânico (B) e de água total (B) no esmalte de *M. niger*.

Figura 18. Volumes dos componentes mineral (A), orgânico (B) e de água total (B) no esmalte de †*Neopiblema* sp.

Figura 19. Volumes dos componentes mineral (A), orgânico (B) e de água total (B) no esmalte de *H. hydrochaeris*.

Figura 20. Concentração em Log10 ($\mu\text{g/g}$ de esmalte) de 27 microelementos detectados nas amostras de esmalte por ICP-MS.

Figura 21. Resumo da composição inorgânica do esmalte das 4 espécies (\dagger *Purussaurus* sp., *M. niger*, \dagger *Neoepiblema* sp. e *H. hydrochaeris*).

CAPÍTULO II:

Figura 1. Corte longitudinal do dente de *Didelphis albiventris*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 2. Corte longitudinal do dente de *Dasybus novemcinctus*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 3. Corte longitudinal do dente de *Felis catus*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 4. Corte longitudinal do dente de *Pontoporia blainvillei*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 5. Corte longitudinal do dente de *Subulo gouazoubira*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 6. Corte longitudinal do dente de *Artibeus* sp. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 7. Corte longitudinal do dente de *Sapajus* sp. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 8. Corte longitudinal do dente de *Hydrochoerus hydrochaeris*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 9. Corte longitudinal do dente de \dagger *Neoepiblema* sp. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 10. Corte longitudinal do dente de *Caiman latirostris*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 11. Corte longitudinal do dente de *Melanosuchus niger*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 12. Corte longitudinal do dente de †*Purussaurus* sp. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 13. Microfotografias do corte histológico de †*Neopiblema* sp. sob microscopia de luz.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I:

Tabela 1. Espécies utilizadas para obtenção de amostras do esmalte para estudo da composição química (orgânica e inorgânica).

Tabela 2: Média \pm desvio padrão (n = 4-5 medidas em cada amostra) da composição de macroelementos (massa %) determinados no esmalte interno por MEV-EDS.

Tabela 3. Principais componentes bioquímicos do esmalte (porcentagem em volume e massa) medidos nas amostras de †*Purussaurus* sp., †*Melanosuchus niger*, †*Neoepiblema* sp. e *Hydrochoerus hydrochaeris*.

Tabela 4. Vinte e sete (27) microelementos na composição do esmalte determinados por ICP-MS.

Tabela 5. Limites de quantificação (LOQ) do método ICP-MS dos elementos no estudo.

LIMA, C. P. **Estrutura e composição química do esmalte dentário em vertebrados terrestres fósseis e recentes**. 2023. Dissertação (Mestrado) em Biologia Comparada - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

RESUMO

Os tecidos mineralizados dos vertebrados são a principal testemunha da existência de espécies extintas ao longo do tempo profundo. Por sua preservação no registro fóssil, são importantes para o estudo histórico da biodiversidade e dos diferentes ambientes da Terra. Dentre esses tecidos, o esmalte dentário é o que melhor se preserva, devido à hipermineralização quando comparado aos outros tecidos dentários e ossos. No entanto, pouco se sabe sobre as relações entre as características morfológicas e químicas (mineral e orgânica) do esmalte, assim como as mudanças que podem ocorrer neste tecido ao longo de milhões de anos. Um novo campo de estudo, denominado paleoproteômica, tem crescido e contribuído na compreensão da biodiversidade pré-histórica, pela recuperação de proteínas antigas de diversas idades, ambientes e tecidos. Neste sentido, este estudo tem como objetivo descrever e comparar as características morfológicas e composição química do esmalte de espécies extintas e atuais de Amniota. Foi realizada, por análise de espectroscopia de Raios-X (MEV-EDS), que ambos o esmalte fóssil e recente são constituídos dos mesmos macroatômos: 36,7% Cálcio, 17,2% Fósforo e 41% Oxigênio, composição característica da hidroxiapatita, o biomineral dos vertebrados. Vinte e sete (27) elementos químicos foram medidos por espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS) no esmalte superficial dos mesmos dentes. O Zinco foi o elemento mais abundante, seguido de Chumbo, Ferro, Magnésio e Alumínio. As medidas de conteúdo orgânico, mineral e de água foram obtidas a partir de cortes histológicos dos dentes das 4 espécies analisadas, submetidos à microrradiografia e análise de birrefringência a partir de microscopia de luz polarizada. Obteve-se medidas de volume de matéria orgânica muito maiores do que era previamente esperado (chegando a 49%). Foram analisadas amostras superficiais de esmalte por espectrometria de massas (LC-MS/MS) e ferramentas proteômicas a fim de recuperar e identificar as proteínas de esmalte nos espécimes estudados. Nas amostras atuais foram identificadas proteínas típicas do esmalte. Nas amostras fósseis, apenas um peptídeo de esmalte foi recuperado para *Purussaurus* sp. em apenas uma réplica de amostra para análise. Os resultados mostram que todas as principais características químicas (inorgânicas) e morfológicas do esmalte dentário se preservaram ao longo do tempo (8,5 a 10 Ma.) em ambos

os grupos. Outros estudos precisam ser feitos visando otimizar a recuperação de moléculas orgânicas. Também foi descrita a estrutura do esmalte de 9 espécies de Mammalia e 3 espécies de Alligatoridae, com a descrição de esmalte semiprismático para †*Purussaurus* sp, sendo a segunda descrição para uma espécie de Diapsida, que possui esmalte aprismático, tipicamente. Este estudo encontrou e descreveu uma grande variação da microestrutura do esmalte dentário entre as ordens de Mammalia, nos diferentes níveis de complexidade deste tecido.

Palavras-chave: dentes; esmalte; Mammalia; Crocodylia; microestrutura; composição; fósseis

LIMA, C. P. **Structure and chemical composition of dental enamel in modern and fossil terrestrial vertebrates**. 2023. Dissertação (Mestrado) em Biologia Comparada - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

ABSTRACT

The dental enamel is the most mineralized tissue of vertebrates, and its preservation in fossil records is important to better understand ancient life and the environment on Earth. However, the association of morphological features with this tissue's mineral and organic information still needs to be better understood. This study aims to compare morphological features and chemical composition of dental enamel of extinct and extant species of alligators and rodents. Semiprismatic enamel was observed in the alligator fossil. The fossilized enamel was in an excellent state for microscopic analyses. It is observed that both modern and fossil enamel exhibit the same major constituents: 36.7% calcium, 17.2% phosphorus, and 41% oxygen, characteristic of hydroxyapatite, the biomineral of vertebrates. Twenty-seven microelements were measured from superficial enamel. Zinc was the most abundant microelement, followed by lead, iron, magnesium, and aluminum. Organic, mineral, and water content were obtained on ground sections of four teeth, resulting in a higher organic volume than previously expected (up to 49%). Proteomic results recovered peptides from different enamel proteins in modern samples, and regarding the fossil samples one enamel peptide was recovered from *Purussaurus* sp. Results show that all major dental enamel's physical, chemical, and morphological features are present both in extant and extinct fossil tooth enamel (>8.5 Ma) in both taxa.

Keywords: teeth; enamel; Mammalia; Crocodylia; structure; composition; fossils.

CAPÍTULO I: Composição química do esmalte dentário moderno e fossilizado

INTRODUÇÃO

Considerações sobre o esmalte dentário

Os tecidos mineralizados dos vertebrados compartilham a mesma base mineral inorgânica, a hidroxiapatita (GLIMCHER et al., 1990). Contudo, o esmalte dentário é um tecido que se diferencia muito dos demais em sua composição molecular, formação e características físicas.

Apesar das características singulares de cada tecido, ossos, dentina e cemento são tecidos conjuntivos mineralizados que contêm como principal componente proteico o colágeno tipo 1 e uma série de outras proteínas em comum (PARK et al., 2009; SALMON et al., 2013), enquanto o esmalte possui um proteoma muito distinto, composto, principalmente, por amelogeninas, enamelinas e ameloblastinas e é formado a partir de células epiteliais (ameloblastos) (DEUTSCH et al., 1995).

Durante sua maturação, o esmalte tem a matriz proteica substituída, quase completamente, por cristais de hidroxiapatita. Ao fim desse processo, que envolve também a digestão de suas proteínas pelas proteases MMP-20 e calicreína 4 (SIMMER; HU, 2002), torna-se um tecido acelular e o mais mineralizado dos vertebrados. Sua densidade mineral equivale ao dobro da densidade de outros tecidos mineralizados, como a dentina e ossos, em humanos (DJOMEHRI et al., 2015). Segundo alguns autores, o esmalte maduro contém 87% de seu volume formado por cristais de hidroxiapatita, sendo os outros 13% constituídos por água e proteínas (majoritariamente peptídeos que restaram do processo de digestão por proteases), enquanto o volume mineral do tecido ósseo, por exemplo, é de 60%, aproximadamente (GLIMCHER, 1990). Outros autores afirmam que o esmalte possui até 93% de volume mineral, 5,5% de água e apenas 1,5% de componente orgânico (ANGMAR et al., 1963; SOUSA et al., 2006). Outros tecidos mineralizados são celulares e podem continuar se formando e remodelando ao longo da vida do organismo.

Outra característica física do esmalte muito relevante é a ausência de poros microscópicos encontrados em tecidos conjuntivos mineralizados que permitem a passagem de microrganismos. O esmalte contém nanoporos (três ordens de magnitude menores que

microporos), ou seja, sua estrutura impede a passagem de microorganismos, uma das razões pelas quais é um tecido mais resistente aos processos diagenéticos (LINE et al., 2000 e 2005; PORTO et al., 2011; CAPPELLINI et al., 2018, NOGUEIRA et al., 2021).

O estudo de biomoléculas antigas

O registro da biodiversidade pretérita pode ser acessado, em grande parte, devido à preservação de tecidos mineralizados, que nos animais vertebrados, correspondem aos ossos e tecidos dentários – cimento, dentina e esmalte. A análise de características morfológicas dos tecidos mineralizados fossilizados é uma importante ferramenta para as áreas de conhecimento que buscam descrever a diversidade biológica do passado, contribuir nos estudos taxonômicos de grupos biológicos atuais e extintos e compreender a história evolutiva de diversos grupos animais, entre outras diversas perguntas na Biologia Evolutiva.

Recentemente, outras ferramentas teóricas e metodológicas, advindas da Biologia Molecular e Bioquímica, têm ganhado espaço e contribuído na busca de desvelar do passado algumas peças do grande e instigador quebra-cabeças da história evolutiva dos seres vivos. Dentre essas ferramentas destacam-se a Paleogenômica e a Paleoproteômica, que correspondem à recuperação de sequências de DNA e proteínas, respectivamente, de origem antiga, variando desde algumas centenas de anos até alguns milhões de anos. Essas abordagens se tornaram possíveis graças a avanços tecnológicos em técnicas robustas de sequenciamento, como a espectrometria de massas para análise de proteínas (CAPPELLINI et al., 2018).

Trabalhos utilizando a técnica de espectrometria de massas, para detectar osteocalcina em osso de 53 mil anos (OSTROM et al., 2000) e para identificar espécies através da “impressão digital” de massas dos peptídeos (PMF) (BUCKLEY et al., 2009), são importantes marcos para o início do campo de pesquisa em proteínas antigas. Ainda que já houvesse sido detectada a presença de aminoácidos em fósseis, os resultados eram pouco conclusivos, sem a possibilidade de sequenciamento confiável (CAPPELLINI et al., 2018).

Embora as sequências de nucleotídeos apresentem maior resolução de informação genética do que as sequências de aminoácidos, estas são importantes em trabalhos de larga escala temporal e em áreas geográficas pouco favoráveis à preservação de DNA, como as regiões tropicais. As proteínas possuem grande potencial para estudos da biodiversidade do passado pois podem ser recuperadas de épocas antigas mesmo em condições geográficas pouco

propícias à preservação de biomoléculas (WELKER et al., 2015; DEMARCHI et al., 2016; CAPPELLINI et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2021).

O primeiro proteoma ósseo antigo foi obtido em 2012 a partir de um fóssil de *Mammuthus primigenius* de 43 mil anos (CAPPELLINI et al., 2012). O primeiro proteoma de esmalte foi obtido em 2016, com técnica não-destrutiva de coleta de peptídeos em material arqueológico (STEWART et al., 2016). Desde então, as técnicas de espectrometria de massas vêm sendo utilizadas com ampla abrangência de grupos biológicos, escalas temporais, regiões geográficas e para responder diferentes questões evolutivas (CAPPELLINI et al., 2018).

Desde 2006 (PORTO et al., 2006), amostras superficiais de esmalte passaram a ser obtidas por uma técnica não-destrutiva de ataque ácido, originalmente utilizada para medição de Chumbo (GOMES et al., 2004; BARBOSA et al., 2005; COSTA DE ALMEIDA et al., 2007). O desenvolvimento de técnicas ultra limpas e não destrutivas foi essencial para a obtenção de dados com alta qualidade a partir de espectrometria de massas para Proteômica de esmalte (STEWART et al., 2016, 2017).

Dentre vinte e um dos principais trabalhos científicos que recuperaram proteínas antigas de tecidos mineralizados fósseis (vertebrados, exceto *Homo sapiens*), publicados entre 2007 e 2022 (HUMPULA et al., 2007; CAPPELLINI et al., 2012; BUCKLEY, M, 2013; RYBCZYNSKI et al., 2013; BUCKLEY, M, 2015; HILL et al., 2015; WELKER et al., 2015; CLELAND et al., 2016; DEMARCHI et al., 2016; SCHROETER et al., 2017; WELKER et al., 2017; BUCKLEY; LAWLESS; RYBCZYNSKI, 2019; CAPPELLINI et al., 2019; PRESSLEE et al., 2019; WELKER et al., 2019, 2020; CAPPELLINI et al., 2020; COLLEARY et al., 2021; FROMENT et al., 2021; NOGUEIRA et al., 2021; CUCINA et al., 2022); apenas quatro o fizeram a partir de tecidos dentários (CAPPELLINI et al., 2019; WELKER et al., 2019, 2020; NOGUEIRA et al., 2021) e os demais a partir de tecido ósseo. Contudo, esse número vem crescendo nos últimos anos, devido à excelente preservação do esmalte no registro fóssil, e a possibilidade de inferências filogenéticas a partir das sequências de suas proteínas (DELGADO et al., 2008; CAPPELLINI et al., 2018)

Como já mencionado, a alta preservação em longos períodos de tempo, a composição física e molecular particular e a possibilidade de utilização de técnicas não-destrutivas (STEWART et al., 2016), fazem do esmalte um excelente tecido para recuperação de proteínas antigas (PORTO et al., 2011; STEWART et al., 2017; CAPPELLINI et al., 2019; WELKER et

al., 2019; NOGUEIRA et al., 2021). Contudo, existem muitas lacunas de conhecimento nessa área, o que pode ser esperado num campo de investigação muito novo, como é a paleoproteômica.

Composição inorgânica do esmalte

Este capítulo tem como objetivo descrever e comparar a composição química do esmalte dentário recente e fóssil de espécies extintas e atuais, pertencentes a dois grupos: Crocodylia e Rodentia. Crocodylia está representado por †*Purussaurus* sp. (fóssil) e *Melanosuchus niger* (moderno), ambos da mesma família Alligatoridae e Rodentia está representado por †*Neopibrama* sp. (fóssil) and *Hydrochoerus hydrochaeris* (moderno), espécies de diferentes famílias taxonômicas de Caviomorpha.

Foram combinadas diferentes técnicas para determinar os volumes de conteúdo mineral, orgânico e de água e identificar os macro e microelementos do esmalte. Técnicas adaptadas ao estudo do desenvolvimento do esmalte (SAIANI et al., 2009; PORTO [a] et al., 2009 e 2010) foram combinadas com o uso microscopia de luz polarizada e birrefringência para determinar os volumes de conteúdo orgânico, mineral e de água no esmalte (SOUSA et al., 2006). A composição de microelementos foi estudada com ICP-MS (DE SOUZA-GUERRA et al., 2014). A determinação dos macroelementos e seu volume relativo foi feito por EDS (Espectroscopia por Energia Dispersiva no MEV). A identificação e quantificação dos microelementos foi realizada por ICP-MS (Espectrometria de massas com fonte de plasma).

Foram detectados volumes de matéria orgânica maiores do que esperado e relatado na literatura para o esmalte dentário. Sugere-se que essas medidas sejam investigadas em detalhes e com outras técnicas complementares, em pesquisas seguintes, pois podem ser obtidas novas conclusões a respeito de conhecimentos que pareciam muito consolidados, como a porcentagem de matéria orgânica e mineral do esmalte, mesmo em mamíferos, o grupo mais estudado nesse aspecto.

Parte dos resultados apresentados nessa dissertação foram publicados no artigo Pessoa-Lima & Tostes-Figueiredo (2022). As análises químicas foram realizadas em colaboração com os seguintes pesquisadores: Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa, Prof. Dr. Fernando Barbosa Jr., Profa. Dra. Raquel Gerlach e Prof. Dr. Fábio Nogueira, afiliados às instituições Universidade Federal da Paraíba, Universidade de São Paulo e Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Com o objetivo de analisar as possíveis influências da morfologia (estrutura) do esmalte em sua preservação no tempo profundo, a amostra foi composta por grupos de vertebrados distantes filogeneticamente, representantes de Arcosauria e Mammalia (Figura 1). Os grupos possuem hábitos alimentares e histórias evolutivas bastante distintas, cujas linhagens evoluem independentemente desde o Paleozóico.

Espécimes fósseis

Ambos os espécimes fósseis utilizados neste estudo provêm da Bacia do Acre, uma bacia relacionada com a orogênese andina (JORDAN, 1995). É a mais ocidental de uma série de bacias interiores ao longo dos rios Solimões/Amazonas, na parte mais ocidental da Amazônia brasileira, vizinha do Peru e da Bolívia (SILVA et al., 2003; CUNHA et al., 2007; BISSARO-JÚNIOR et al., 2019). Os fósseis foram recolhidos nos depósitos sedimentares da Formação Solimões do Mioceno Tardio, que se encontram na sua maioria expostos ao longo das margens dos rios nos estados do Acre e Amazonas. Foi relatada uma fauna de vertebrados diversa para a Formação Solimões, incluindo peixes cartilaginosos e ósseos, rãs, tartarugas, aves, crocodilos, lagartos, cobras e mamíferos. (e.g., [COZZUOL, 2006; LUNDBERG et al., 2009; RIFF et al., 2010; NEGRI et al., 2009; HSIU, 2010]).

A primeira amostra (Figura 2) corresponde a um dente de †*Purussaurus* sp (UFAC-7226). Foi coletada na localidade conhecida como Niterói, que se encontra no rio Acre, município de Senador Guiomar. O fóssil provém do mesmo leito datado com U-Pb por Bissaro-Júnior et al. (2019), com uma idade máxima de $8,5 \pm 0,5$ Ma (Estágio Tortoniano, Miocénico tardio). †*Purussaurus* foi um dos maiores crocodilos conhecidos pela ciência, atingindo pelo menos 8 metros de comprimento, segundo estimativas recentes (PAIVA et al., 2022). Anteriormente, a estimativa era de mais de 10 metros de comprimento (AURELIANO et al., 2015), com registros no Mioceno do Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela e Panamá. †*Purussaurus* é considerado um predador semiaquático de topo, colocado em estudos filogenéticos recentes dentro de Alligatoridae e Caimaninae, formando com outros táxons o grupo irmão para *Jacarea* (RIO et al., 2021).

A outra amostra fóssil aqui analisada (Figura 3) é constituída por um pré-molar parcial de †*Neopiblema* sp. (UFAC-7227). Foi recolhida na localidade conhecida como Talismã, que está localizada no rio Purus, Estado do Amazonas, entre Manuel Urbano e a foz do rio Iaco. O fóssil provém do mesmo sítio datado por Bissaro-Júnior et al. (2019) com uma idade máxima de $10,89 \pm 0,13$ Ma (Mioceno Tardio). †*Neopiblema* é um grande roedor caviomorfo, com registros no Mioceno do Brasil, Peru, Venezuela e Argentina. Juntamente com outros neopiblemídeos, está mais estreitamente relacionado com chinchilídeos do que com outros caviomorfos (KERBER et al., 2022).

Espécimes recentes

Dentes de duas espécies atuais *Melanosuchus niger* (LIRP, não catalogado) e *Hydrochoerus hydrochaeris* (LIRP, não catalogado) foram analisados com o objetivo de comparar a composição química do esmalte entre amostras modernas e fósseis. *M. niger* é um jacaré sul-americano com distribuição geográfica no norte do continente. Diferentemente dos demais Alligatoridae viventes, *M. niger* é uma espécie que atinge grande tamanho corporal. *M. niger* e †*Purussaurus* sp. são espécies da mesma família, Alligatoridae. *H. hydrochaeris* é o maior roedor vivo e tem uma ocorrência geográfica dispersa pela América do Sul. †*Neopiblema* sp. e *H. hydrochaeris* são espécies de famílias diferentes, Chinchillidae e Caviidae, respectivamente, ambas Hystricomorpha. O espécime *M. niger* é proveniente da Reserva Mamirauá, Estado do Amazonas e o espécime *H. hydrochaeris* em Ribeirão Preto, Estado de São Paulo.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

A composição de macroelementos do esmalte dentário foi realizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando o modo de elétron retroespalhados (BSE) em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM - 5600LV, Tokyo, Japão) (SAIANI et al., 2009; DE FIGUEIREDO et al., 2016). Os sinais de EDS foram capturados utilizando a configuração padrão no modo BSE pelo detector Silicon Drift Detector (SDD, X-MaxN 150 mm² detector). Os sinais de EDS foram obtidos utilizando os seguintes parâmetros: as amostras foram posicionadas a uma distância de 10 mm do emissor, com 15 a 25 kV de emissão. O diâmetro do feixe de elétrons variou entre de 69 a 80 nm. As medições foram feitas na região mediana do esmalte dentário a partir de um corte transversal do dente dos espécimes (Figura 6). Para a

análise de MEV-EDS, foram utilizados padrões internos de multielementos para calibração de acordo com o fornecedor (Oxford Instruments, Scotts Valley, Califórnia). Foram feitos os mapas dos elementos mais abundantes com base na intensidade de sinal dos diferentes elementos pelo programa Aztec program (Oxford Instruments, Concord, MA, USA) (MEISNAR et al., 2014). Em cada amostra, foram realizadas 4 medições e calculou-se média e desvio padrão para estes valores.

A proporção dos macroelementos foi comparada com a conhecida para a fórmula química da hidroxiapatita (ELLIOT et al., 2007), com a composição $\text{Ca}_{8.856} \text{Mg}_{0.088} \text{Na}_{0.292} \text{K}_{0.010} (\text{PO}_4)_{5.312} (\text{HPO}_4)_{0.280} (\text{CO}_3)_{0.407} (\text{OH})_{0.702} \text{Cl}_{0.078} (\text{CO}_3)_{0.050}$, densidade de $2,99 \text{ g/cm}^3$ (ref 48), sendo 37% da massa total de cálcio e 18% da massa de fósforo (taxa Ca/P de 2,06).

Preparação das amostras para microscopia de luz polarizada

Fragmentos de dentes foram incorporados em resina acrílica autopolimerizável (JET, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) e cortados com um disco diamantado em máquina de corte para tecidos calcificados (Elsaw, Elquip, São Carlos, SP, Brasil). Os cortes foram cuidadosamente lixados com uma diminuição gradual da granulação da lixa, de 600 para 4000, utilizando água, até que os cortes atingiram de 100 a 400 μm de espessura para o uso de microscopia de luz polarizada.

Microscopia de luz polarizada

Os cortes histológicos dos dentes foram fotografados no microscópio Axiovert 2.1 (Zeiss, Karlstadt, Alemanha) com e sem filtros de contraste de fase, e num Axioscope 40 (Zeiss, Karlstadt, Alemanha) utilizando filtros de polarização cruzada e o filtro /1 red.

Quantificação dos principais componentes bioquímicos

Os principais componentes bioquímicos do esmalte (água adsorvida, componente mineral e matéria orgânica; em porcentagens de volume e peso) foram medidos em cada amostra (cortes histológicos não desmineralizados com espessura de 100-400 μm), em cinco regiões de interesse (ROI; 12 μm x 12 μm) ao longo de uma linha longitudinal da superfície do esmalte até a junção amelodentinária (JAD), conforme descrito anteriormente em detalhes (DE ANDRADE DANTAS et al., 2020; DE MEDEIROS et al., 2012).

Parâmetros físicos básicos relacionados ao conteúdo mineral, orgânico e de água (composição de célula unitária mineral, coeficiente de atenuação linear de raio-X mineral, densidade mineral e índices de refração de todos os principais componentes bioquímicos), necessários para a quantificação, foram derivados do esmalte humano. A microradiografia transversal (ANGMAR et al., 1963), a técnica padrão-ouro para quantificação do volume mineral do esmalte dentário (ARENDS et al., 1992), foi utilizada para quantificar o conteúdo mineral. As seguintes suposições foram consideradas para a composição mineral do esmalte: densidade de 2,99 g/cm³ (ELLIOTT, 2007), com 37% em peso de cálcio e 18% em peso de fósforo (relação Ca/P de 2,06). As imagens digitais 2D de microrradiografia (cortes de esmalte e gradiente de alumínio, - 17 folhas de alumínio, com espessura variando de 20 a 340 µm) foram obtidas em equipamento microtomógrafo (Skyscan 1172, Bruker, Bélgica) operado a 60 kV, emitindo pico de energia de raios-X de 10 kV (DE ANDRADE DANTAS et al., 2020). Após a quantificação do volume mineral, medidas de birrefringência (média de cinco medidas) dos cortes imersos em água (e após imersão em água por 5 dias antes da análise) foram obtidas por Microscopia de Luz Polarizada (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha) equipada com um compensador de Berek de 0-5 ordens, e então os volumes orgânicos e de água foram quantificados a partir da interpretação matemática da birrefringência (SOUSA et al., 2006; DE MEDEIROS et al., 2012). Os índices de refração assumidos de matéria orgânica e água foram 1,56 e 1,00, respectivamente. A soma de todos os volumes medidos resultou em 100% do volume de esmalte em cada ROI. As porcentagens de volume foram convertidas em porcentagem de peso usando as seguintes densidades: 2,99 g/cm³ (mineral), 1,45 g/cm³ (orgânico; ácido glutâmico) e 1,0 g/cm³ (água).

Preparação de micro-amostra para espectrometria de massas: biópsia superficial do esmalte

Uma biópsia superficial e não-destrutiva foi feita na superfície do esmalte dentário de cada amostra com ataque ácido (Figuras 2-5). Este método foi utilizado por Brudevold et al. (BRUDEVOLD et al., 1975) para determinação de contaminação por microelementos.

No dente de *Purussaurus* sp., as biópsias foram realizadas em 3 regiões diferentes devido à variação de cor do esmalte (Figura 7). Nos demais espécimes apenas uma região foi amostrada. Todo o procedimento foi realizado dentro de uma capela de fluxo laminar Class 1000, utilizando apenas soluções ultra limpas para espectrometria de massas, e preparadas pouco tempo antes do uso.

Para delimitação da área da biópsia, foi utilizada fita adesiva livre de chumbo (Magic Tape, 810 Scotch, 3M, Sumaré, SP, Brasil) com uma perfuração circular de diâmetro de 2mm. A microbiópsia com ataque ácido foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: a superfície do esmalte foi lavada com água (MilliQ) e “atacada” com 20 µL de Ácido Clorídrico (HCl) a 10 % (v/v) por aproximadamente 20 segundos. A solução da microbiópsia foi transferida para um tubo para centrífuga (1,5 mL) (Axygen Scientific, Inc., Union City, USA). Os tubos foram vedados com parafilme e enviados para determinação de microelementos por ICP-MS (NexIon 5000, Perkin Elmer).

A segunda biópsia foi realizada, em seguida, na mesma área com 10 µL de Ácido Clorídrico (HCl) a 10 % (v/v) por aproximadamente 20 segundos com o uso de uma ponteira ZipTip (ZTC18S096; EMD Millipore), contendo resina hidrofóbica C18, responsável por capturar os peptídeos. Em seguida a solução ácida foi descartada e a mesma pipeta foi lavada com uma solução de Ácido Trifluoroacético a 0,2 % (v/v) para remoção de moléculas químicas incompatíveis com análise de espectrometria de massas para Proteômica. Em seguida, os peptídeos foram eluídos da coluna de resina com o uso de Acetonitrila a 80% (v/v) e Ácido Fórmico 0,2% (v/v) por 8 vezes. A amostra foi armazenada em um tubo para centrífuga, que ficou aberto dentro da capela até secar completamente.

Análise Química com Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma (ICP-MS)

Os macro e microelementos foram medidos a partir das amostras superficiais do esmalte por espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS) no Laboratório de Toxicologia de Metais, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

As concentrações de cálcio determinadas por MEV-EDS foram utilizadas para calcular a massa de esmalte em cada amostra. Deste modo, a concentração de cada elemento foi expressa em ppm (µg/g) de esmalte dentário.

Espectrometria de Massas em Tandem (NanoLC-MS/MS)

A mistura de peptídeos foi ressuspensa em 10 µL de solução de ácido fórmico 0,1%, e 4 µL de cada amostra foi injetada na nano-cromatografia líquida (EASY-nLC 1000 Thermo Scientific) ligada ao espectrômetro de massa (Q-Exactive Plus Thermo Scientific). As amostras passaram por uma pré-coluna e separadas em uma coluna analítica (25 cm de comprimento, 75µm de diâmetro interior, com resina Reprosil-Gold C-18 3-µm). Os peptídeos foram eluídos

de 95% de fase A (0,1% ácido fórmico) a 23% fase B (95% acetonitrila, 0,1% ácido fórmico) durante 57 min, 23-45% fase B durante 20 min, 45-98% fase B durante 5 min, e 98% fase B durante 8 min (total de 90 minutos com fluxo de 250 nL/min). Entre cada corrida, a coluna foi lavada com 90% de fase B e reequilibrada com fase A. A ionização foi feita pela técnica nanoElectrospray. Os espectros m/z foram adquiridos no modo positivo. Foram utilizada aquisição de MS scan e espectros de massa em tandem (MS/MS). O MS scan (350-2000 m/z) no analisador de massa Orbitrap foi definido com uma resolução de 70.000. Os espectros de MS/MS dos 20 íons mais intensos (top 20) foram obtidos com resolução de 17.500, por fragmentação HCD.

Identificação de peptídeos e Inferência de Proteínas

Os dados resultantes da Espectrometria de Massa (LC-MS/MS) foram analisados por 2 abordagens: *Peptide Spectrum Match* (PSM) e sequenciamento *de novo*.

A busca por PSM foi realizada com o software *Proteome Discoverer* (ORSBURN, 2021), através da comparação dos espectros de massas obtidos experimentalmente contra dados proteômicos disponíveis em bancos de dados como o UniProt (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021) para os táxons *Crocodylia* e *Hystricomorpha*.

O sequenciamento *de novo* foi conduzido com o uso do software *PEAKS* (TRAN et al., 2019). e *Novor* (MA, 2015) Os peptídeos sequenciados por estes dois softwares foram analisados com uma estratégia de identificação de busca por similaridade de sequências com o software *PEAKS*.

RESULTADOS

Principais elementos da composição mineral do esmalte: Cálcio e Fósforo

A quantificação relativa dos principais elementos químicos feita por MEV-EDS resultou na taxa entre Cálcio e Fósforo (Ca/P) de 2,0 a 2,2 para todos os espécimes, em esmalte fóssil e moderno (Tabela 2), taxa característica da hidroxiapatita. Esses resultados corroboram a ideia prévia de utilizar a “unit cell composition” proposta por Elliot (elliott_structure_nodate) para a determinação dos componentes mineral, orgânico e de água do esmalte dentário.

Determinação do conteúdo mineral, orgânico e de água do esmalte

Os principais componentes bioquímicos do esmalte (água adsorvida, componente mineral e matéria orgânica; em porcentagens de volume e peso) foram medidos em cada amostra (cortes histológicos não desmineralizados com espessura de 100-400 μm), em cinco regiões de interesse (ROI; 12 μm x 12 μm) ao longo de uma linha longitudinal da superfície do esmalte até a junção amelodentinária (JAD) (Figuras 8-11).

As Figuras 12 e 14 mostram as imagens dos cortes histológicos dos fósseis de jacaré e roedor feitas sob luz polarizada. Os cortes foram submergidos em água durante a preparação da amostra. Sem o filtro de interferência, o esmalte apresenta cores de alta interferência (Figura 12A-B e Figura 14A-B), indicando que a espessura do corte é relativamente alta. Com o filtro Red I, a adição na cor de interferência é mostrada a -45° (45° sentido antihorário) em posição diagonal, e a subtração da cor de interferência a $+45^\circ$ (45° sentido horário) em posição diagonal, indicando birrefringência negativa, baseado no gráfico de cores de interferência de Michel-Levy (WOOD, 1977). As Figuras 13 e 15 mostram os cortes das amostras de dentes recentes sob luz polarizada. Todas as quatro (4) amostras exibiram birrefringência negativa, característica do esmalte dentário.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores para os componentes mineral, orgânico e de água, em volume (v%) e massa (m%) obtidos com base no cálculo usado para o esmalte humano, o qual também possui birrefringência negativa. Os valores são referentes as cinco regiões de interesse selecionadas nas camadas de esmalte, considerando que a espessura do esmalte (distância entre a superfície e a JAD) varia entre as espécies. A espessura do esmalte de *†Purussaurus* sp. é de 115 μm , de *M. niger* é de 190 μm , de *†Neoepiblema* sp. é de 205 μm e *H. hydrochaeris* é de 145 μm .

A densidade da matéria orgânica foi estimada com base na densidade do ácido glutâmico (1,5 g/cm³). O componente “água” corresponde à água absorvida na preparação das amostras, localizada nos nanoporos do esmalte, fora dos cristais minerais, e não às moléculas de água que compõem a estrutura mineral de hidroxiapatita.

O volume mineral encontrado no esmalte de *†Purussaurus* sp. variou de 83,4 a 89,2 %, correspondendo de 92 a 95,3 % de massa. O volume de matéria orgânica foi de 8,1 % no esmalte mais superficial, correspondendo a 4,5 % da massa do esmalte, com aumento na região mediana (10,3 % em volume e 5,7 % em massa) e diminuição da matéria orgânica no esmalte mais profundo (5,8 % em volume e 3,1 % em massa). O volume de água não variou mais que 0,2 % entre as medições, indo de 6,6 a 6,4 %, correspondendo a 2,4 e 2,3 % de massa de esmalte, respectivamente.

Na amostra de esmalte de *M. niger*, a média do volume mineral foi de 59,4 % (massa de 75,2%). Os valores para o volume orgânico variaram entre 33,9 a 49 % (vol), correspondendo a 20,9 a 33,5 % em massa. O conteúdo de água variou de 1,17 a 5,18 % (vol), correspondendo a uma média de 1,4 % em massa.

As medidas da amostra de *†Neopibelema* sp. mostraram uma média de conteúdo mineral de 52,3 % (vol) e 70 % (massa), com o esmalte mais superficial apresentando volume 10 % menor que o mais profundo. O conteúdo orgânico foi de 39,2 % (vol) e 26,3 % (massa) e o conteúdo de água de 8,04 a 10,13 % do total de volume do esmalte (4,1 % da massa).

O esmalte de *H. hydrochaeris* mostrou a composição mineral mais homogênea dentre as amostras (Figura 19), variando entre 68,1 a 71,6 % de volume (82,9 - 85,3 % da massa), e média do componente orgânico de $18,5 \pm 1,2$ % em volume, correspondendo a $11,2 \pm 0,8$ % da massa de esmalte. O volume de água variou pouco entre as regiões de interesse, com média de $11,7 \pm 0,4$ %, correspondendo a $4,8 \pm 0,2$ % da massa de esmalte.

As Figuras 16 a 19 representam graficamente a variação da composição bioquímica ao longo da profundidade do esmalte nas amostras.

Composição de microelementos do esmalte superficial

A análise por ICP-MS identificou 27 elementos nas amostras superficiais do esmalte. Os valores de Cálcio foram utilizados para determinar a quantidade de esmalte obtido em cada amostra. Assim, os resultados dos 27 elementos foram expressos em ppm (ou µg/g) de esmalte.

O elemento mais abundante foi o Zn (4 - 23 %), seguido por Pb (0,05 - 3,7 %), Fe (0,5 - 1,7 %), Mg (0,2 - 1,5 %), Al (0,06 - 1,4 %), uma série de outros elementos próximos de 0,5 % (K, Cd, Cr, Mn e Co) e outros elementos menos abundantes (Be, V, Ni, Cu, As, Se, Rb, Ag, Ba, Tl, Bi, Pd, Th, La, Ce, Sm, and U) próximos ou menores que 0,01 %. Nem todos os elementos foram detectados em todas as amostras. Os resultados estão sintetizados nas Figuras 20 e 21, e detalhados na Tabela 4.

Há um aumento na concentração de Pb, Co, Cd, Ce, Th, As, Cu, Bi, Ag, Tl e U nas amostras fósseis, com diferentes magnitudes (Figura 20). Não foram encontradas diferenças expressivas entre as amostras fósseis e modernas para os outros elementos.

A Figura 21 sintetiza os resultados da composição inorgânica do esmalte. Os macroelementos (Ca, O, P e C), determinados por MEV-EDS são mostrados no gráfico de pizza. O MEV-EDS mede apenas elementos que representem mais de 1 % da composição da superfície scaneada. Deste modo, os microelementos não podem ser detectados com precisão por MEV-EDS, mas estão representados figurativamente pela fatia cinza do gráfico de pizza. Os microelementos, detectados por ICP-MS, estão representados em proporção relativa no gráfico de barras. A quantidade total de microelementos recuperados por ICP-MS foi transformada em 100 % e, com base nisso, foram distribuídas as quantidades relativas de cada microelemento, a fim de apresentar uma visão geral da composição química do esmalte.

Nota-se que o elemento mais abundante é o Zn, seguido por Pb ou Fe, dependendo da amostra. O Fe (apresentado em cor laranja) possui uma porcentagem absoluta similar (Tabela 4) em *M. niger* (1,7 %) e †*Neoeptiblema* sp. (1,5 %), mas a quantidade relativa semelhante não está evidente devido à ausência de Zn nas medidas de *M. niger*.

Tendo em vista que foram feitas amostras de três regiões superficiais do esmalte de †*Purussaurus* sp. (1: região mais escura do esmalte; 2: região predominante do esmalte de coloração marrom; 3: região amarela do esmalte), essas regiões foram mapeadas na imagem do dente na região superior da Figura 21, desta forma, os resultados para cada região podem ser vistos separadamente no gráfico.

Componente orgânico: proteoma do esmalte

Interferência de Resina Acrílica

Durante a preparação de amostras e corridas de LC-MS/MS, as amostras antigas sempre foram manipuladas antes das recentes. Esse protocolo visou evitar a contaminação das amostras antigas por proteínas no material recente. A primeira amostra analisada por espectrometria de massas foi a da biópsia de esmalte de †*Purussaurus* sp. Durante a corrida das amostras no equipamento, foi identificado um polímero em todas as amostras. Posteriormente, foi compreendida a origem do polímero, uma resina acrílica (Paraloid B-72) utilizada como tratamento para conservação de material, um método comum na Paleontologia (LÓPEZ-POLIN, 2012), mas não documentado junto ao material. O tratamento foi feito no fóssil de †*Purussaurus* sp. Os polímeros foram mantidos na coluna cromatográfica e apareceram nas amostras subsequentes.

A presença de polímeros em amostras para espectrometria de massas é um grande problema, primeiramente, porque podem inutilizar a coluna cromatográfica. Além disso, por serem moléculas carregadas positivamente, “competem” no detector de massas com as moléculas de interesse - peptídeos - que estão em menor volume, devido à natureza da amostra (microamostra). Deste modo, o sinal do polímero, muito provavelmente, cobriu todo o sinal das proteínas, inviabilizando uma análise proteômica adequada.

Sequenciamento *de novo* e busca por similaridade de sequências

Apesar do imprevisto metodológico, uma das réplicas de amostras de †*Purussaurus* sp. resultou na identificação do peptídeo de esmalte “YEVLTPLK”, típico da amelogenina, por sequenciamento *de novo*, em ambos software PEAKS e Novor. A busca por similaridade de sequências, pelos software PEAKS e PepExplorer, identificou o peptídeo por similaridade às sequências de amelogenina de *Alligator sinensis* e *A. mississippiensis*, disponíveis nos bancos de dados do Uniprot.

Novas análises proteômicas de †*Purussaurus* sp. precisam ser feitas, sem interferência de componentes como a resina acrílica, mas se confirmado o resultado, esse é o primeiro registro de sobrevivência de peptídeos de esmalte do Mioceno. Já que esta foi a primeira amostra a ser manipulada no experimento, não temos razão para acreditar que seja advinda de contaminação entre amostras. Corridas de “brancos” e as lavagens da coluna cromatográfica entre amostras foram utilizadas como controle.

Nenhum peptídeo de esmalte foi identificado na amostra de †*Neoepilema* sp.

Como esperado, as amostras das espécies recentes, *M. niger* e *H. hydrochaeris*, resultaram em identificações com maior suporte, em termos de número de espectros por peptídeo e cobertura da proteína. O sequenciamento *de novo* identificou outro peptídeo de amelogenina, fragmento N-terminal rico em Prolina, inferido por busca de similaridade de sequência, além do peptídeo já descrito para †*Purussaurus* sp também ter sido identificado nas amostras atuais. Outras proteínas de esmalte foram identificadas, como amelina, ameloblastina e MMP20.

DISCUSSÃO

Esse capítulo se baseou na necessidade de conhecimentos sólidos das similaridades e diferenças entre amostras de esmalte moderno e fóssil, e apresenta aspectos químicos deste tecido. Nas últimas décadas, moléculas antigas têm sido recuperadas de tecidos mineralizados fossilizados. O esmalte tem sido cada vez mais utilizado para esse fim devido à sua alta concentração mineral, como um tecido hipermineralizado, ou seja, ele é naturalmente um tecido “pré-fossilizado”.

Esse estudo foi realizado com a colaboração de especialistas de diferentes áreas de pesquisa e pequeno número de amostras para possibilitar determinações precisas. Os resultados aqui apresentados apontam questões que podem atrair mais atenção no futuro, quando informações químicas de alta qualidade foram obtidas de amostras mais amplas de fósseis, para melhor compreensão da vida pretérita em ambientes antigos.

Principais componentes bioquímicos

Apesar de ser conhecido na Paleontologia que os dentes são as estruturas que melhor se preservam no registro fóssil, a comparação entre o esmalte moderno e fóssil foi realizada por poucos grupos de pesquisa, em estudos de análises químicas com interesse particular em processos diagenéticos (JACQUES et al., 2008; KOKSIS, et al., 2010; KOHN et al., 1999), análises isotópicas (SCHOENINGER et al., 2003; DOMINGO et al., 2009; IVANOVA et al., 2022) e recuperação de proteínas antigas de fósseis (WELKER et al., 2019; CAPPELLINI et al., 2019; NOGUEIRA et al., 2021).

Este estudo relata, pela primeira vez, grandes volumes de componentes orgânicos no esmalte, descritos espacialmente em camadas histológicas do tecido. A soma dos volumes orgânico e de água constitui o volume dos poros entre o volume mineralizado, e somado ao volume mineral, é o volume total do esmalte. Corroborando a composição teórica mineral do esmalte (relação Ca/P de 2,06) utilizada para a técnica de microrradiografia (ELLIOTT, 2007), dados experimentais de MEV-EDS indicaram relações Ca/P na faixa de 2,0 a 2,2 (Tabela 2), ou seja, o esmalte fossilizado não sofre grandes alterações em sua composição mineral, preservando a estrutura química da hidroxiapatita. Todas as amostras apresentaram birrefringência negativa sob imersão em água, característica típica do esmalte dentário (ANGMAR et al., 1963). A birrefringência é uma propriedade física inerente à materiais

anisotrópicos, como alguns cristais, que geram dupla refração da luz. A diferença entre os valores máximo e mínimo dos índices de refração equivalem ao valor de birrefringência (MIRONOV, 2021). Deste modo, os resultados indicam que a estrutura cristalina do esmalte também se preserva ao longo de milhões de anos.

A intensidade da birrefringência negativa no esmalte (maduro) é diretamente proporcional ao volume sólido (mineral e orgânico), então a birrefringência negativa é explicada por um aumento do volume orgânico em locais com baixo volume mineral (medido aqui por microrradiografia transversal) (SOUSA et al., 2006; DE MEDEIROS et al., 2012). Em humanos, o esmalte dentário maduro apresenta, em média, 93 % de volume mineral, 5,5 % volume de água e 1,5 % volume orgânico (ANGMAR, 1963; SOUSA et al., 2006), medido pela mesma técnica descrita aqui.

Segundo a literatura, o conteúdo mineral diminui da região oclusal para a cervical da coroa do dente, e do esmalte externo para o interno, seguindo um gradiente decrescente de carga mecânica relacionada à mastigação (THEUNS et al., 1983), acompanhado pelo aumento de conteúdo de água e orgânico (MACENA et al., 2014). Embora esse padrão não tenha sido recuperado neste trabalho, as variações nos volumes dos principais componentes do esmalte descritos podem refletir variações no uso dos dentes para mastigação (ou trituração de alimentos), à ocorrência ou não de amelogenese contínua e à taxa de substituição dentária.

É possível que o maior conteúdo mineral no esmalte de *†Purussaurus* sp. em relação à *M. niger* seja explicado pelo uso mais intenso dos dentes para a quebra de alimentos, mas uma análise comparativa entre outras espécies de Alligatoridae e seus hábitos alimentares precisa ser realizada.

Já em relação aos roedores, o esmalte moderno, de *H. hydrochaeris* apresenta maior volume e massa de conteúdo mineral em relação à *†Neoeptiblema* sp. Neste caso, há vários fatores que podem influenciar os dados. A homologia da série dentária de roedores ainda não está bem resolvida. Deste modo, a variação pode ser da própria série dentária. Os dados também podem refletir uma variação interespecífica, aleatória ou não, que poderia ser melhor compreendida numa análise comparativa mais ampla entre diferentes grupos de roedores.

De forma geral, os dados obtidos sugerem que todas as amostras fornecem uma quantidade relativamente grande de matéria orgânica e seriam fontes adequadas para

recuperação de peptídeos de esmalte. No entanto, outros estudos com maior número de amostras e maior abrangência taxonômica precisam ser realizados.

As diferenças obtidas para os elementos encontrados nos espécimes modernos e fossilizados parecem refletir o processo de permineralização dos fósseis. O maior conteúdo mineral do esmalte fossilizado de †*Purussaurus* sp. em relação a †*Neoepiblema* sp., pode estar relacionado a diferentes processos taxonômicos e diagenéticos aos quais ambos podem ter sido expostos, ou seja, o fóssil de †*Neoepiblema* sp. pode ter sofrido desmineralização ao longo do tempo devido às alterações do pH, por exemplo, processo semelhante ao da perda mineral de dentes acometidos por cárie.

O uso de outras técnicas microscópicas para determinação da composição orgânica dos tecidos certamente beneficiará a compreensão dos dados obtidos neste estudo. Grandes volumes de matéria orgânica devem poder ser recuperados por técnicas histológicas adaptadas, como uma descalcificação bastante lenta das amostras após o uso de fixadores alternativos que preservem as moléculas nos tecidos (PORTO et al., 2009 [b]; PORTO et al., 2010).

Em relação aos altos valores para volume e massa de componente orgânico encontrados, há evidência que sugerem que os 96% de conteúdo mineral do esmalte podem ser encontrados apenas no esmalte humano muito superficial. O esmalte espesso dos mamíferos é conhecido por um processo de mineralização longo que resulta no alto conteúdo mineral na superfície externa (AOBA, 1996). Há também evidências de que as proteínas permanecem no esmalte em quantidades maiores das comumente relatadas, e técnicas microscópicas têm sido capazes de mostrar estruturas remanescentes de proteínas (chamadas de proteínas “tuft” no passado), como discutido por Robinson e Hudson (2011).

De acordo com Smith e colaboradores (SMITH et al., 2011), em um estudo sobre a proporção de minerais e componentes voláteis (associados aos minerais, incluindo as proteínas) no esmalte em desenvolvimento de camundongos normais e geneticamente modificados, “os componentes voláteis também foram encontrados em quantidades frequentemente superiores às esperadas, especialmente em esmalte maduro”. Esse estudo também mostrou que a ideia de que grandes quantidades de proteína não irão prejudicar a maturação do esmalte, como observado em alguns camundongos geneticamente modificados. Conforme declarado por Smith (SMITH et al., 2011) “os resultados deste estudo sugerem que o crescimento maturacional dos cristais de esmalte pode ocorrer na presença de quantidades relativamente

grandes de proteínas e/ou seus fragmentos. Os problemas da coroa [...] não têm nada a ver com proteínas ou minerais, mas ocorrem porque a amelogênese é encerrada precocemente e as células do órgão do esmalte se transformam em um epitélio displásico que secreta um material fino calcificado que não é esmalte”. Curiosamente, a Figura 13 mostra uma camada superficial no esmalte de *M. niger* que parece ser esmalte, mas pode ser uma indicação de que a amelogênese foi encerrada “precocemente” neste espécime.

Microelementos no esmalte superficial

Os dados do ICP-MS devem ser vistos com cautela já que uma única medição foi feita. Além disso, as amostras em branco tiveram medições relativamente altas, que foram retirados da contabilização de todas as amostras, portanto, muitos resultados possivelmente úteis podem ter sido excluídos. No entanto, embora os resultados exploratórios deste estudo, estes são importantes por sua contribuição para uma visão mais ampla de alguns aspectos do esmalte em amostras fósseis e modernas. Eles podem ajudar a formular novas hipóteses e a evitar alguns dos problemas mencionados no futuro.

A falta de Zn em uma das amostras é um dos problemas. Esta ausência pode resultar dos altos níveis de microelementos encontrados nas amostras brancas e à exclusão de muitos dados com base nisso. O zinco é um mineral muito importante para o metabolismo pois está presente em muitas proteínas (principalmente nas enzimas), e é sempre encontrado no esmalte dentário. Os resultados deste estudo são preliminares e precisam ser repetidos em um conjunto maior de amostras, com amostras coletadas pelo menos em triplicadas.

A discrepância entre a disponibilidade de elementos químicos (especialmente metais) em ambientes modernos e antigos é o que faz alguns elementos químicos tóxicos para os organismos, como o chumbo, por exemplo. O chumbo possui alta afinidade com a hidroxiapatita devido sua similaridade química com o cálcio (ERICSON et al., 1979). As células e tecidos mineralizados evoluíram em ambientes com baixos níveis de chumbo e grande disponibilidade de cálcio. Esqueletos humanos foram utilizados para evidenciar a contaminação antropogênica da Terra por chumbo, devido à capacidade do osso de reter chumbo em seus minerais por longos períodos de tempo, como décadas e séculos, como evidenciado pelo longo e complexo trabalho de pesquisadores como Clair Patterson nos anos 70 (ERICSON et al., 1979).

A escala de tempo parece ser importante para explicar a presença de chumbo em maiores concentrações no esmalte externo dos fósseis, além de outros fatores como a acidez do solo e o processo de fossilização. Esse acúmulo no esmalte externo ao longo de milhões de anos é diferente dos baixos níveis de chumbo encontrados no esmalte da maioria dos humanos ou animais. O esmalte superficial pode perder minerais como pode também ganhar minerais. Durante essas mudanças de pH, o chumbo pode ser incorporado ao esmalte, mesmo no esmalte mais profundo (MOLINA et al., 2011). No entanto, o chumbo na superfície do esmalte humano moderno - e, provavelmente, de outros animais também - reflete a contaminação do meio ambiente (BRUDEVOLD et al., 1977; CLEYMAET et al., 1991 [a],[b]; GOMES et al., 2004; COSTA DE ALMEIDA et al., 2007, 2011) e se acumula durante a formação do tecido, enquanto em fósseis o acúmulo se deve mais ao processo de permineralização ao longo de milhões de anos, não sendo possível associar aos níveis de chumbo disponíveis na superfície da Terra naquele momento. Em tempos pré-industriais espera-se que a composição do esmalte superficial tenha menos chumbo, já que níveis mais baixos de chumbo foram encontrados em esqueletos de humanos pré-históricos (ERICSON et al., 1979). Portanto, o fato de que chumbo e outros minerais mostram um gradiente na superfície do esmalte, assim como F, Cu e outros metais (WEATHERELL et al., 1974), aponta a necessidade de análise cuidadosa do esmalte superficial, levando em consideração a escala de tempo e a quantos micrômetros da superfície os íons foram determinados, pois as medidas superficiais não representam a quantidade de metais em todo o tecido.

Ivanova e colaboradores (2022) afirmam que elementos metálicos e alcalinos, como Ba e Cu, são incorporados em quantidades significativas durante a vida e traçam sinais ambientais, biológicos e diagenéticos. Assim, nossos resultados referentes aos elementos Al, Mn, Fe e Ba poderiam ser explicados por vários processos pré e post mortem, inacessíveis apenas com os dados atuais.

Componente orgânico: proteoma do esmalte

O peptídeo encontrado na amostra de *†Purussaurus* sp., “YEVLTPLK”, corrobora outros resultados nos quais peptídeos de mesma sequência, “SYEVLTPLK” e “VLTPLK” e de mesma localização da proteína, foram encontrados em trabalhos prévios de paleoproteômica de esmalte (WELKER et al., 2019; NOGUEIRA et al., 2021). É possível que esse mesmo peptídeo corresponda ao fragmento descrito no estudo bioquímico clássico que investiga a maturação do esmalte e digestão natural da amelogenina (BROOKES et al., 1995). Brookes descreve um

fragmento N-terminal de 5kDa que é sucessivamente clivado pela MMP20 em 3 fragmentos menores (4,5; 4,3 e 3 kDa). Esses peptídeos são, provavelmente, mantidos no esmalte em amostras recentes, tendo em vista que a região N-terminal da amelogenina interage com os cristais de hidroxiapatita (SHAW et al., 2020), permitindo a conservação destes fragmentos de proteína por tempo superior se comparado à outras regiões da proteína (DEMARCHI et al., 2016).

Foram feitas tentativas de remoção da resina acrílica da superfície do dente de *†Purussaurus* sp. com diversos protocolos, utilizando acetona, conhecido solvente da resina em questão, e outros solventes comuns, como o xilol, tanto em limpezas rápidas e superficiais, como em banhos de imersão do material, com trocas sucessivas de solvente. Nenhum protocolo resultou na remoção total da resina no esmalte. Os testes em espectrometria de massas mostraram que os banhos em acetona removeram os polímeros do tipo dímeros e maiores, mas o sinal de monômeros da resina continuou altos e, aparentemente, infiltraram o tecido em camadas mais profundas. Deste modo, não se recomenda a utilização de fósseis que tenham sido submetidos à procedimentos de conservação com interferências químicas, nem a tentativa de limpeza dos mesmos. Sugere-se que as coleções paleontológicas mantenham ao menos parte do material sem uso de tratamentos que possam inviabilizar análises químicas.

Comparação *†Purussaurus* e *†Neoepiblema*

A princípio, esperava-se maior sucesso em recuperar peptídeos da amostra de *†Neoepiblema* sp., por ser uma mamífero, e carregar as características estruturais complexas do esmalte deste grupo. No entanto, o resultado foi oposto. Nenhum peptídeo foi recuperado do esmalte de *†Neoepiblema* sp., e o material não foi submetido ao tratamento de resina, como o de *†Purussaurus* sp. Foi analisada, inclusive, uma segunda amostra de outro dente de *†Neoepiblema* (para testes), na qual também não foi encontrado nenhum peptídeo, mesmo sem resina na coluna de cromatografia.

A comparação entre os valores de volume mineral do esmalte das duas espécies, pode fornecer alguns insights em relação à preservação de moléculas antigas. É interessante notar que os valores de componente mineral do esmalte de *†Purussaurus* sp. são maiores que *†Neoepiblema* sp. Enquanto no primeiro o valor médio de componente mineral é de 85%, no segundo é de apenas 52%. *†Purussaurus* sp., das espécies analisadas, foi a que mais se aproximou dos valores médios descritos na literatura para esmalte humano, que varia entre 87

a 93% de volume mineral (ANGMAR et al., 1963; GLIMCHER, 1990; SOUSA et al., 2006). Os resultados indicam que o nível de mineralização do esmalte em volume (e massa) deve ser mais importante para a preservação de proteínas do que a maneira que o conteúdo está organizado, em prismas ou não. O esmalte prismático, característico dos mamíferos, carrega propriedades físicas de maior resistência às forças mastigatórias, sendo a mastigação uma característica também exclusiva deste grupo. No entanto, o grau de mineralização deste tecido parece sofrer grande variação entre diferentes grupos taxonômicos, o que pode afetar nossa capacidade de recuperar moléculas antigas para alguns desses grupos de diferentes idades geológicas.

Ainda não sabe ao certo quanto tempo as proteínas, ou seus fragmentos, sobrevivem no registro fóssil. Contudo, de acordo com os resultados aqui apresentados, não se deve esperar que diferentes materiais paleontológicos de mesma idade resultem no mesmo sucesso para recuperação de peptídeos, pois além dos fatores já conhecidos que interferem na preservação de moléculas antigas, através dos processos taxonômicos e diagenéticos, também a variação morfológica do esmalte entre espécies pode estar associada à capacidade de preservação das moléculas orgânicos no tecido mineralizado.

Ambas as espécies de Caviomorpha estudadas aqui, apresentam crescimento contínuo dos dentes. É possível que nesta condição, na qual a amelogênese ocorre de maneira contínua, o tecido formado seja menos mineralizado devido a menor disponibilidade de cálcio continuamente, quando comparado ao esmalte humano, por exemplo, que tem crescimento lento e delimitado. A etapa mais longa da amelogênese é, justamente, a maturação, quando a matriz orgânica é substituída pelo componente mineral de cristais de hidroxiapatita, em organização prismática ou não.

No entanto, não foi possível compreender o motivo de ter sido medido 39% de volume orgânico para *†Neopiblema* sp. mas este material não ter sido recuperado na análise por espectrometria de massas. É possível que o volume de amostra recuperado na microbiópsia (aproximadamente 10 uL) tenha sido pouco, e por ter sido feito apenas uma vez (uma única região), não tenha sido o suficiente, já que, provavelmente, as proteínas não se distribuem de maneira homogênea pelo tecido.

CONCLUSÕES

Os espécimes analisados neste estudo mostraram alta cristalinidade e alta densidade tanto no esmalte moderno quanto no fossilizado. Poucas alterações estruturais foram detectadas relacionadas à idade da amostra.

A microscopia de luz polarizada indicou a propriedade de birrefringência para as amostras modernas e fossilizadas (birrefringência negativa). A determinação por microrradiografia dos principais componentes bioquímicos do esmalte mostrou massa de componente orgânico inesperadamente alto (%) em dois espécimes (23,72 % em *M. niger* e 26,30 % em *†Neopibblema* sp.). A quantificação relativa dos principais elementos químicos por MEV-EDS resultou em uma razão de 2,0-2,2 entre Ca e P para o esmalte moderno e fóssil, característico da hidroxiapatita. As análises de ICP-MS recuperaram 27 microelementos (além do Ca) de amostras superficiais de esmalte. Para a maioria dos elementos químicos, não foi possível estabelecer diferenças entre o esmalte moderno e o fóssil. No entanto, um aumento na concentração de Pb, Co, Cd, Ce, Th, As, Cu, Bi, Ag e Tl foi detectado no esmalte fossilizado, provavelmente depositado durante a permineralização, com diferentes magnitudes de mudança. Acreditamos que estudos futuros devem ser conduzidos para testar se amostras maiores concordam com nossos resultados preliminares e melhoram o poder de inferência sobre a resistência do esmalte fóssil ao longo do tempo.

Os resultados deste estudo mostram a excelente preservação do esmalte dentário ao longo do tempo profundo, um tecido particularmente importante para o interesse atual no conhecimento de ambientes antigos e recuperação de moléculas e, como tal, para a Paleontologia.

FIGURAS

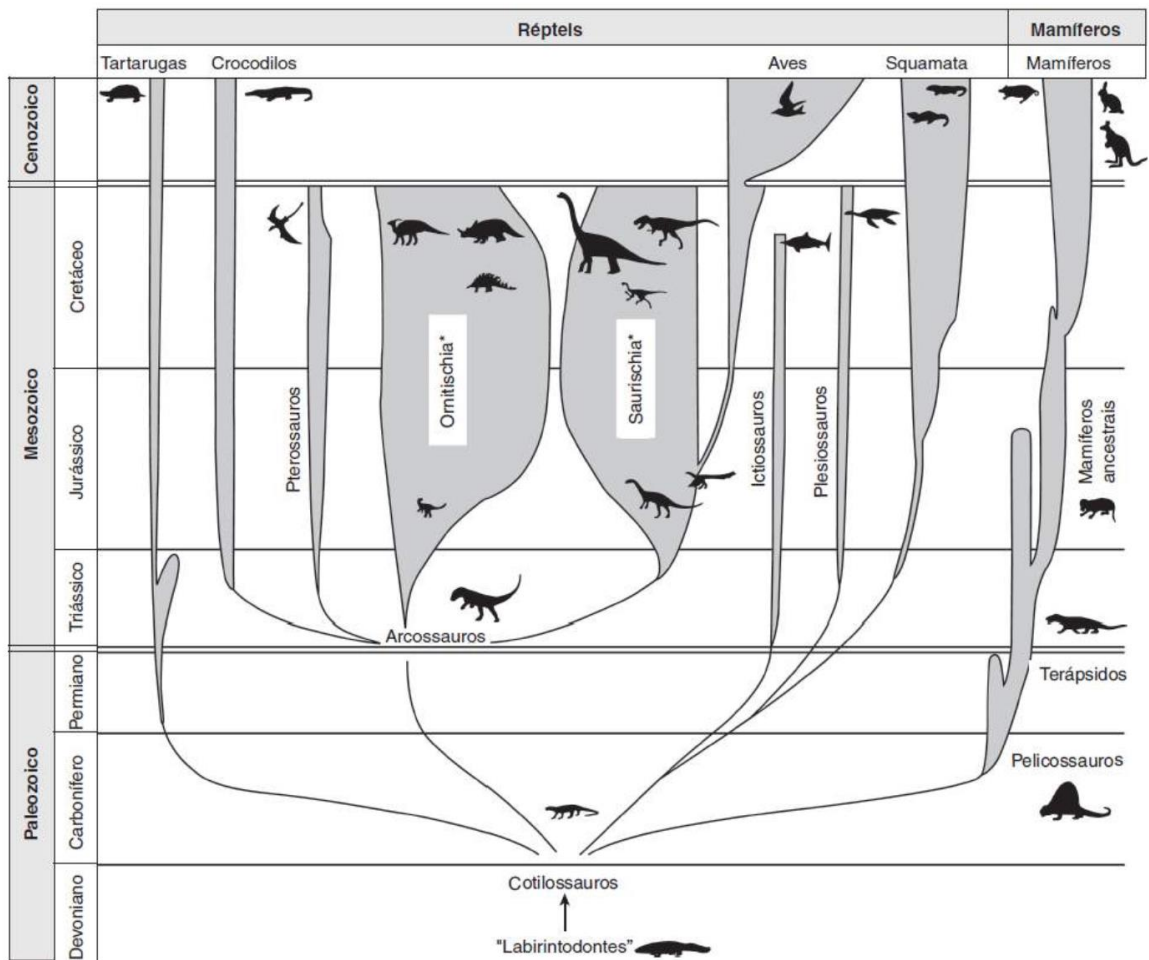


Figura 1. Figura retirada de Kardong (2016) representando a diversidade e extinções de grupos no Mesozoico. As larguras das linhas representam estimativas da abundância relativa de cada grupo. A imagem mostra que as duas linhagens representadas neste capítulo, os crocodilos e mamíferos, são distantes filogeneticamente e estão inseridos em linhagens que evoluem independentemente desde o Paleozoico.

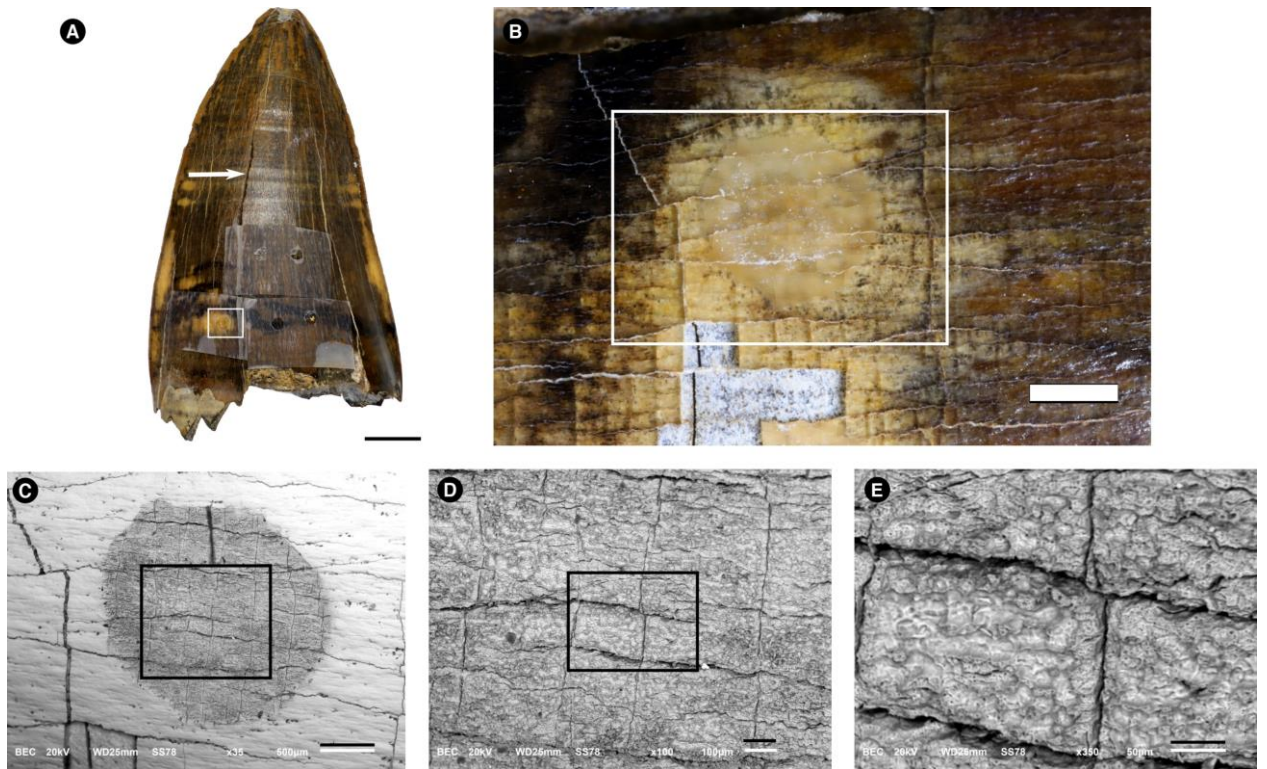


Figura 2. Imagens de um dente de *Purussaurus* sp. (Crocodylia, Alligatoridae) usado para obter amostras superficiais do esmalte por ataque ácido. Imagens feitas por câmera fotográfica (A-B) e Microscopia Eletrônica de Varredura no modo BSE (C-E). Os retângulos são amplificados no quadro seguinte da série. **A.** Dente de *Purussaurus* sp. sem o uso de dentes de amplificação; a seta branca indica rachaduras do esmalte; barra = 1 cm. **B.** Detalhes do retângulo mostrado em A; na parte inferior da imagem, alguns “quadrados” se soltaram, expondo a dentina (em cor cinza) por baixo do esmalte; barra = 1mm. **C.** Amplificação do retângulo branco mostrado na imagem B; a área circular (cinza) mostra a área atingida pelo ataque ácido (técnica de microbiópsia); barra = 500 μ m. **D.** Amplificação do retângulo mostrado em C mostrando rachaduras no esmalte a nível microscópico; barra = 100 μ m; **E.** Amplificação do retângulo mostrado em D; é possível observar as rachaduras microscópicas em maior detalhe; a superfície do esmalte após ataque ácido é irregular, com regiões côncavas em forma circular; barra = 50 μ m.

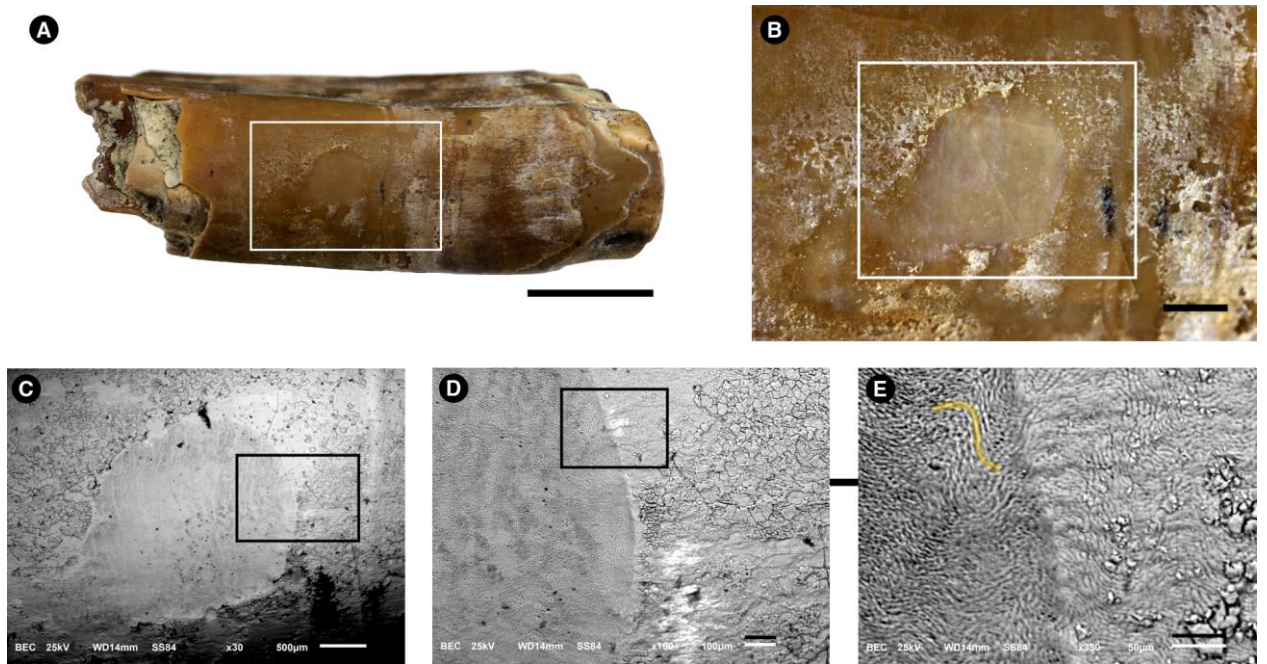


Figura 3. Imagens de um dente de †*Neopiblema* sp. (Rodentia; Caviomorpha) usado para obter amostras superficiais do esmalte por ataque ácido. Imagens feitas por câmera fotográfica (A-B) e Microscopia Eletrônica de Varredura no modo BSE (C-E). Os retângulos são amplificados no quadro seguinte da série. **A.** Fragmento do dente mostrando o esmalte superficial (marrom) com alguns depósitos (esbranquiçados); a região quebrada do lado esquerdo da imagem, a dentina (branco-acizentada) está aparente; barra = 0,5 cm. **B.** Detalhes do retângulo mostrado em A; barra = 1mm. **C.** Amplificação do retângulo branco mostrado em B; a região circular e de superfície mais uniforme foi atingida pelo ataque ácido; barra = 500 µm. **D.** Amplificação do retângulo mostrado em C; barra = 100 µm; **E.** Amplificação do retângulo mostrado em D; na área atingida pelo ataque ácido (à esquerda da imagem), os prismas do esmalte podem ser observados (linha amarela); barra = 50 µm.

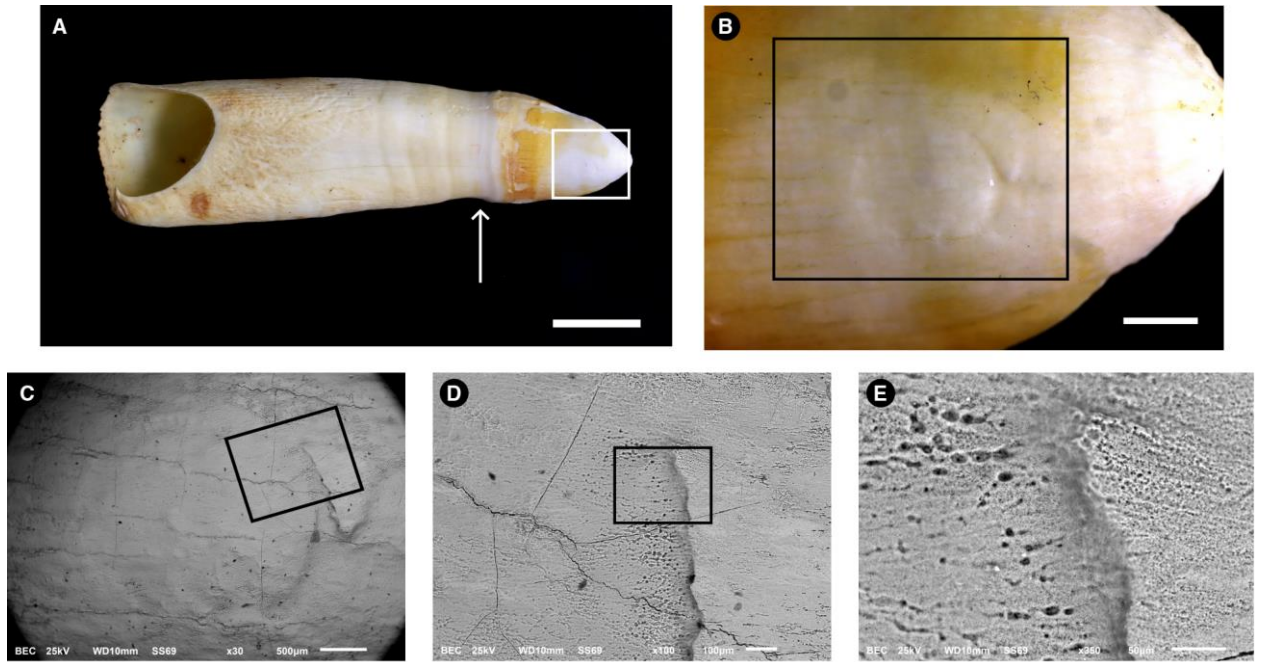


Figura 4. Imagens de um dente de *Melanosuchus niger* (Crocodylia, Alligatoridae) usado para obter amostras superficiais do esmalte por ataque ácido. Imagens feitas por câmera fotográfica (A-B) e Microscopia Eletrônica de Varredura no modo BSE (C-E). Os retângulos são amplificados no quadro seguinte da série. **A.** Imagens feita sem o uso de dente de amplificação; a seta indica o limite entre a coroa (à direita) e a raiz (à esquerda) do dente; barra = 1 cm. **B.** Detalhes do retângulo mostrado em A; a área circular no centro da imagem consiste na atingida pelo ataque ácido, mas parte do ácido escorreu para as laterais da área delimitada, removendo a superfície amarelada e expondo as áreas brancas do esmalte (subsuperficial); barra = 1mm. **C.** Amplificação do retângulo branco mostrado em B; barra = 500 μm . **D.** Amplificação do retângulo mostrado em C; barra = 100 μm ; **E.** Amplificação do retângulo mostrado em D; a alta porosidade do esmalte após o ataque ácido pode ser observada; não há prismas de esmalte; barra = 50 μm .

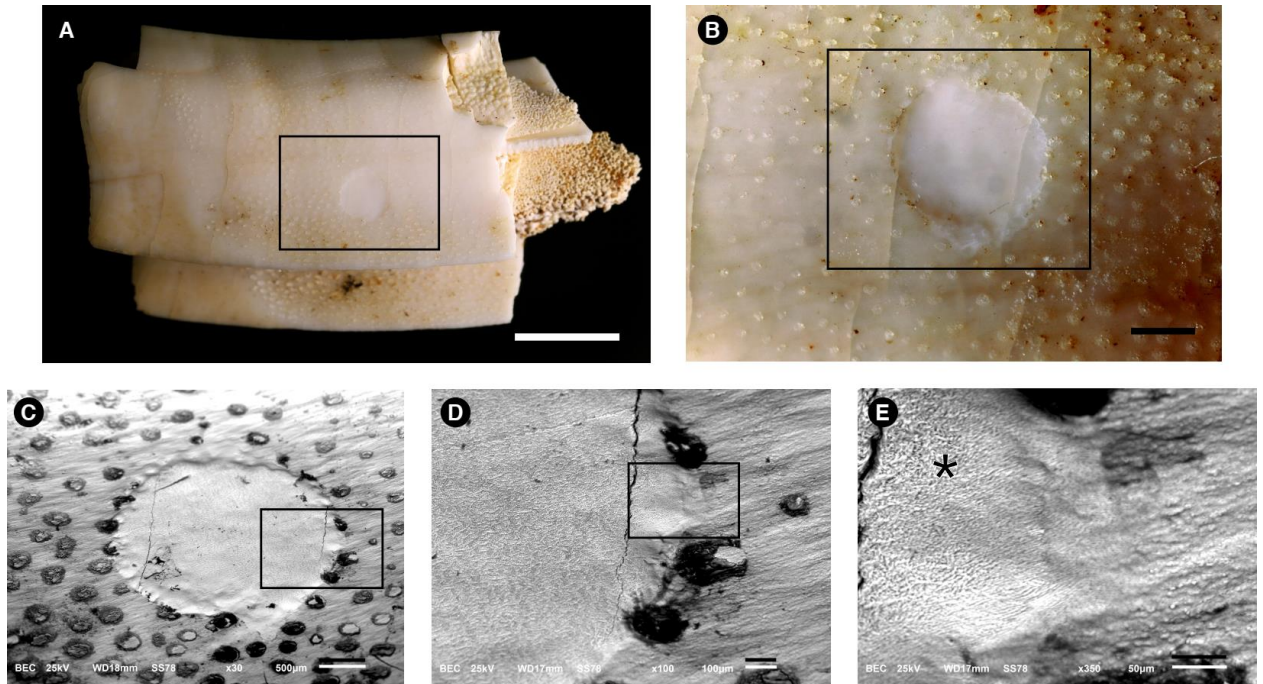


Figura 5. Imagens de um dente de *Hydrochoerus hydrochaeris* (Rodentia; Caviomorpha) usado para obter amostras superficiais do esmalte por ataque ácido. Imagens feitas por câmera fotográfica (A-B) e Microscopia Eletrônica de Varredura no modo BSE (C-E). Os retângulos são amplificados no quadro seguinte da série. **A.** Imagem feitas com uso de lentes de amplificação mostrando a área atingida pelo ataque ácido na parte central do retângulo; barra = 0,5 cm. **B.** Detalhes do retângulo mostrado em A; pontos transparentes e circulares com diâmetros de, aproximadamente 200 μm podem ser observados por toda a superfície do esmalte; barra = 1mm. **C.** Amplificação do retângulo branco mostrado em B; as estruturas circulares são bastante superficiais, pois foram removidas na região do ataque ácido e tem densidade menos densa que o próprio esmalte (sugerindo composição orgânica); barra = 500 μm . **D.** Amplificação do retângulo mostrado em C; barra = 100 μm ; **E.** Amplificação do retângulo mostrado em D; os prismas do esmalte podem ser observados à esquerda (asterisco) na região atingida pelo ataque ácido; barra = 50 μm .

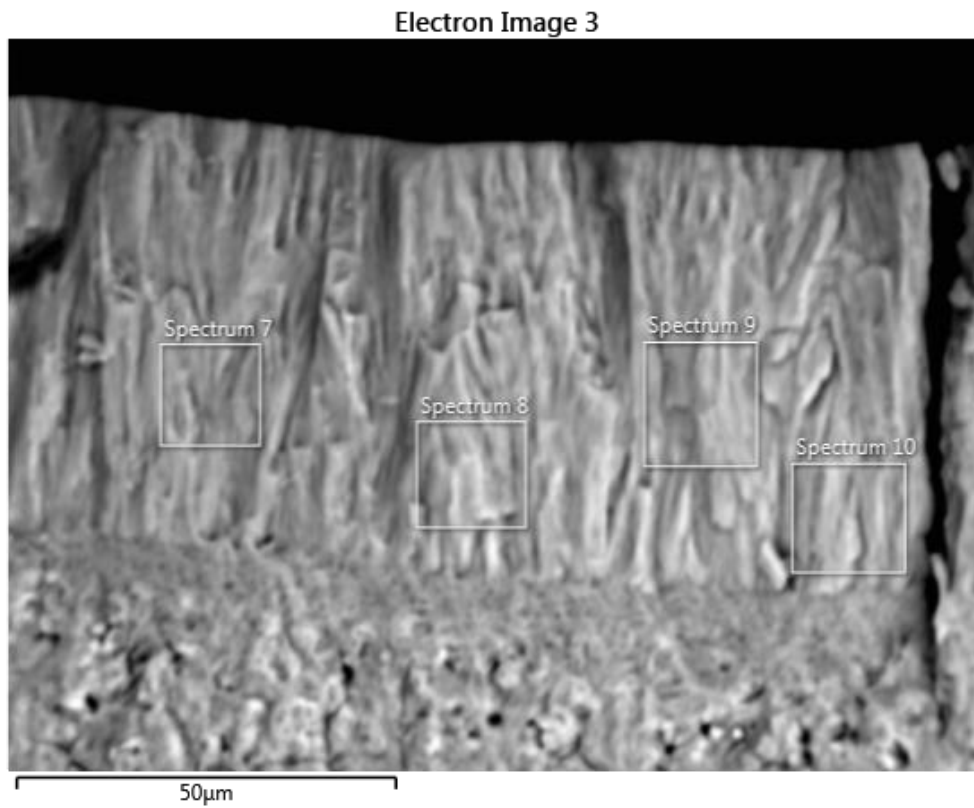


Figura 6. Regiões (4) mapeadas no esmalte de *Purussarus* sp. para identificação e quantificação da composição de macroelementos no tecido. Procedimento realizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando o modo de elétron retroespalhados (BSE).

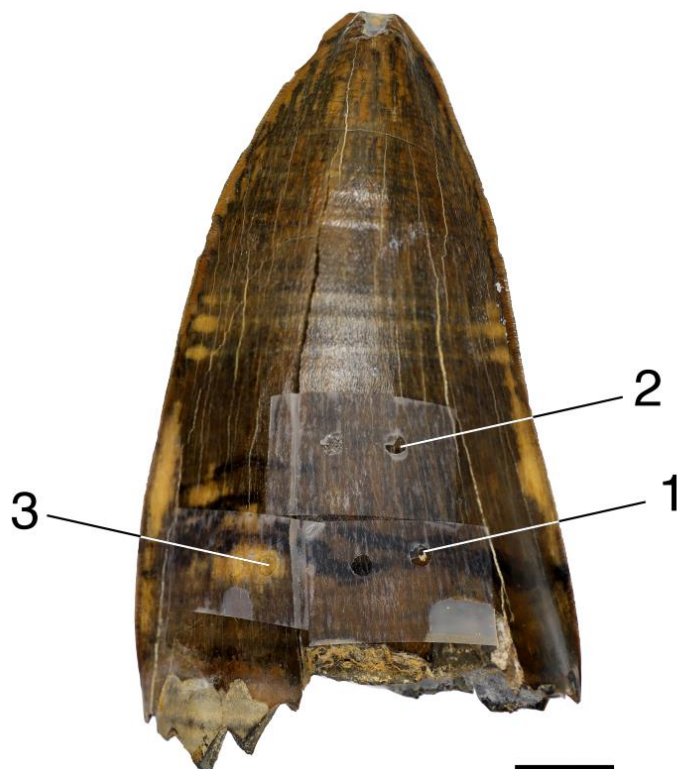


Figura 7. Três regiões do esmalte dentário de *Purussaurus* sp. cujas amostras foram analisadas por espectrometria de massas. 1. Região mais escura do esmalte; 2. Região com a cor predominante do esmalte, marrom; 3. Região de coloração amarela.

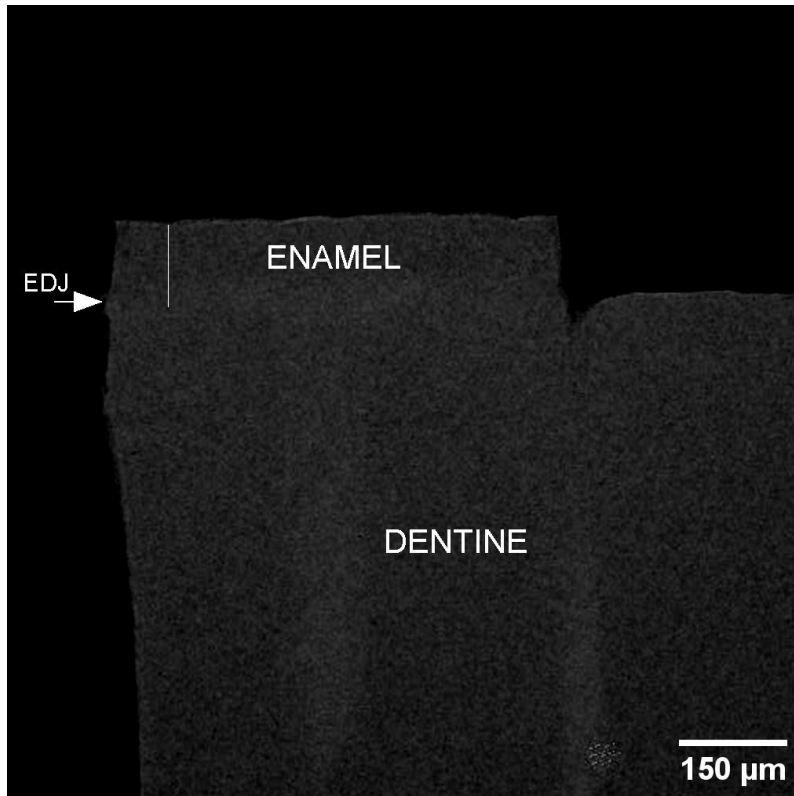


Figura 8. Imagem microrradiográfica da amostra de corte de esmalte dentário de *Purussaurus* sp. A seta indica a junção amelodentinária (JAD, EDJ). Os pontos de medição dos componentes bioquímicos (mineral, água e orgânico) foram localizados ao longo da linha longitudinal representada na camada de esmalte (a 15, 35, 55, 75 e 95 μm da superfície do esmalte). A espessura do esmalte é de 115 μm .

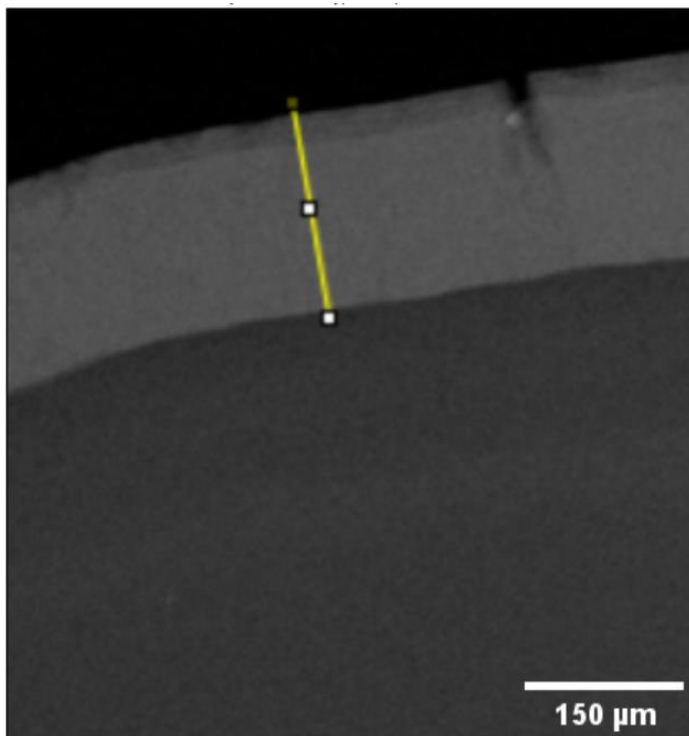


Figura 9. Imagem microrradiográfica da amostra de corte de esmalte dentário de *M. niger*. Os pontos de medição dos componentes bioquímicos (mineral, água e orgânico) foram localizados ao longo da linha longitudinal representada na camada de esmalte (a 15, 55, 95, 135 e 175 μm da superfície do esmalte). A espessura do esmalte é de 190 μm .

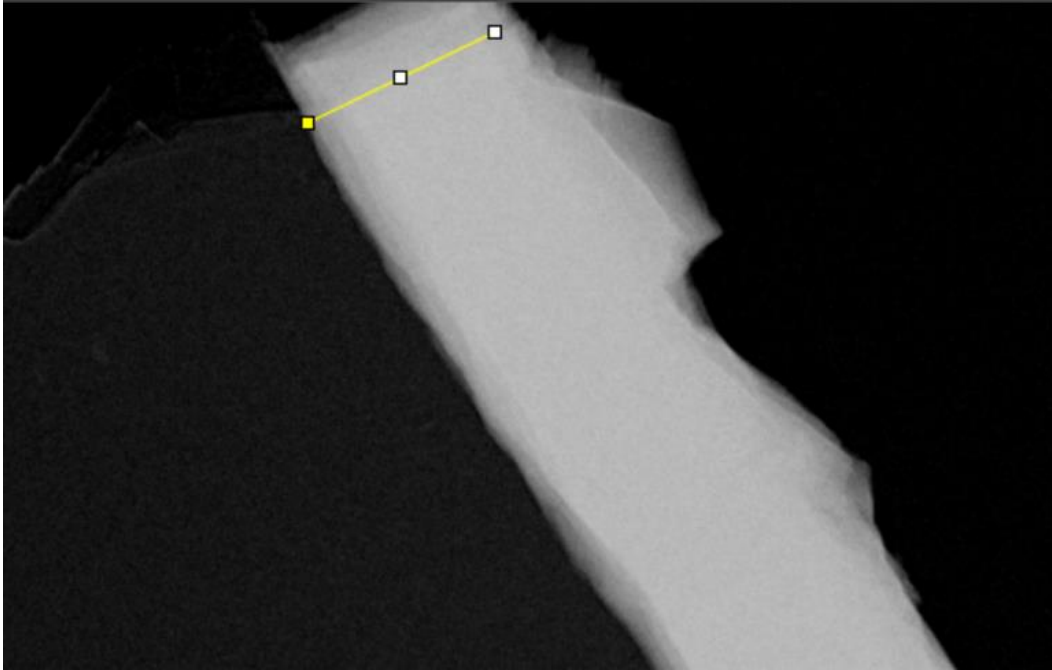


Figura 10. Imagem microrradiográfica da amostra de corte de esmalte dentário de *†Neopiblima* sp. Os pontos de medição dos componentes bioquímicos (mineral, água e orgânico) foram localizados ao longo da linha longitudinal representada na camada de esmalte (a 40, 70, 100, 130 e 160 μm da superfície do esmalte). A espessura do esmalte é de 205 μm .

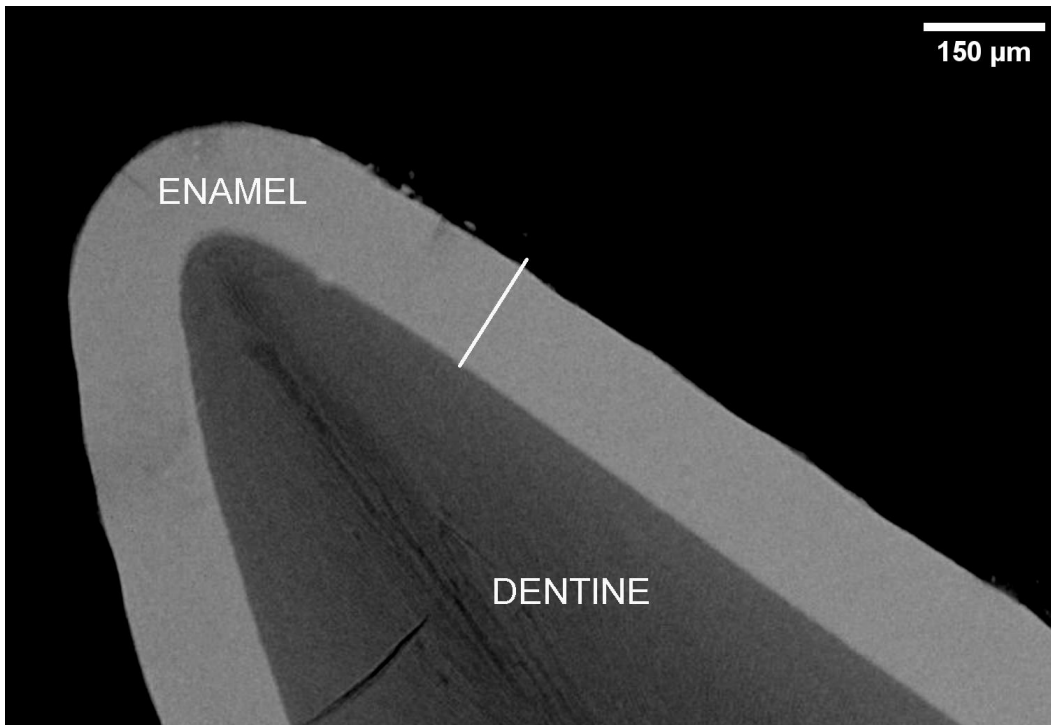


Figura 11. Imagem microrradiográfica da amostra de corte de esmalte dentário de *H. hydrochaeris*. Os pontos de medição dos componentes bioquímicos (mineral, água e orgânico) foram localizados ao longo da linha longitudinal representada na camada de esmalte (a 20, 45, 70, 95 e 120 μm da superfície do esmalte). A espessura do esmalte é de 145 μm .

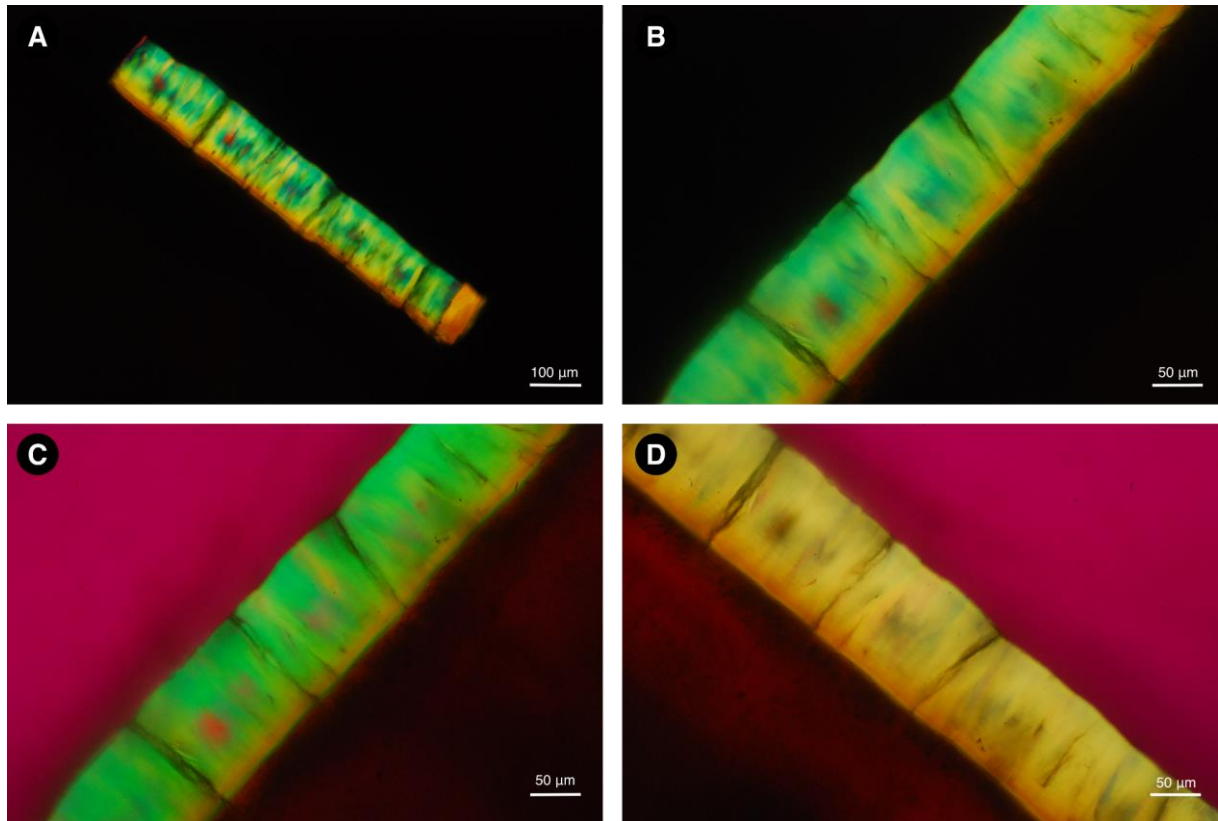


Figura 12. Microfotografia do corte histológico do esmalte dentário de *Purussaurus* sp. sob luz polarizada com imersão em água. Sem um filtro de interferência, o esmalte mostra cores de alta interferência (A-B), indicando que a espessura do corte é relativamente alta. Com o filtro Red I, a adição na cor de interferência é mostrada a -45° (C) em posição diagonal, e a subtração da cor de interferência a $+45^\circ$ (D) em posição diagonal, indicando birrefringência negativa. A mudança de cor refletida pelo esmalte entre as figuras C e D indicam a que a propriedade de birrefringência do esmalte é mantida no material fóssil.

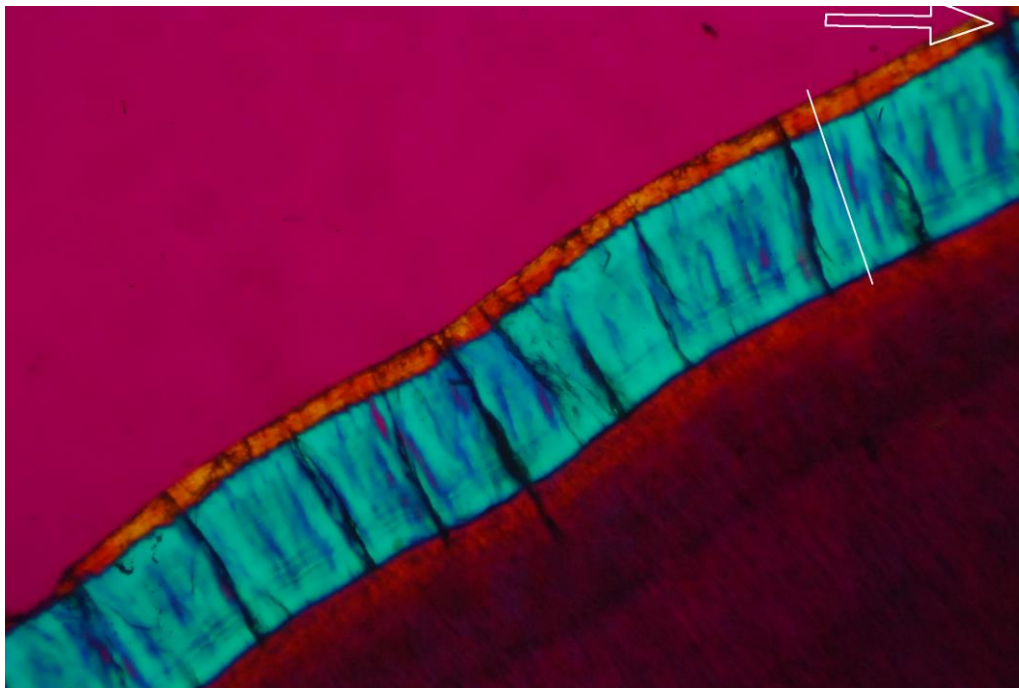


Figura 13. Microfotografia do corte histológico do esmalte dentário de *Melanosuchus niger* sob luz polarizada. A imagem foi feita com filtro Red I. A maior parte do esmalte está azul. O corte foi submetido a imersão em água antes da análise. Na superfície do esmalte há uma camada em coloração diferente (laranja) da camada mais interna.

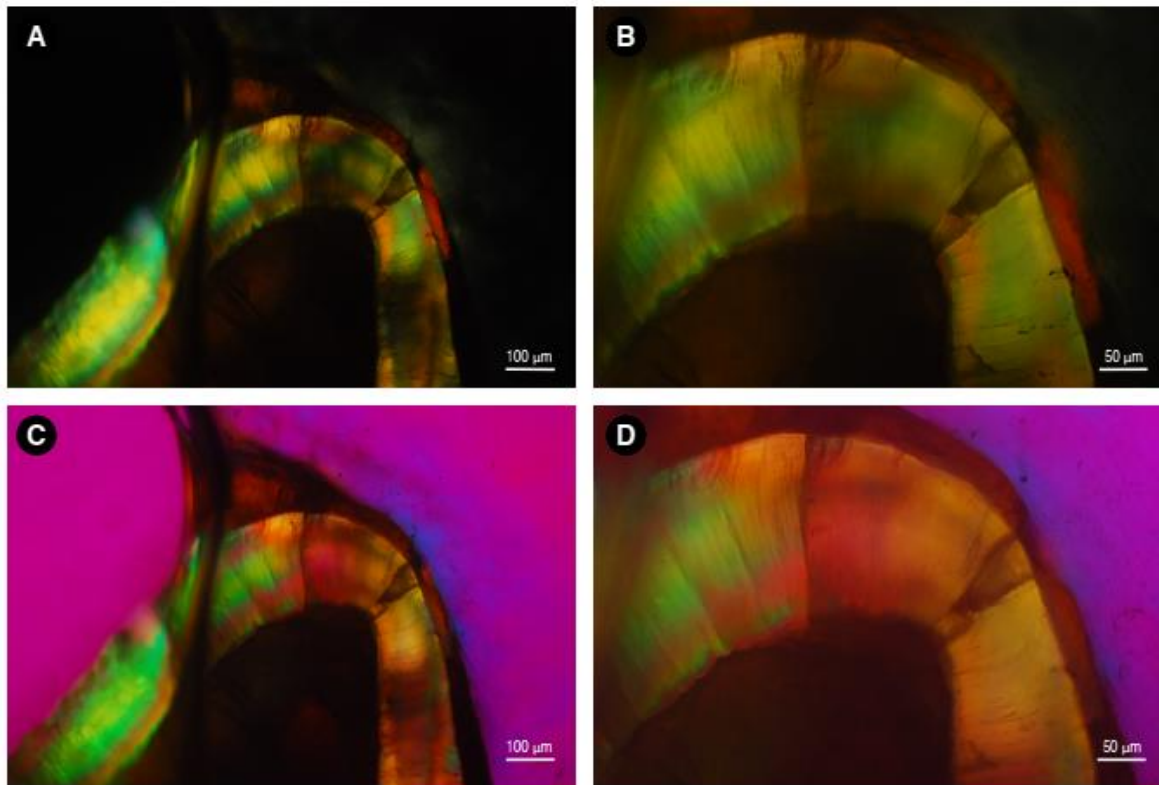


Figura 14. Microfotografia do corte histológico do esmalte dentário de *†Neopiblima* sp. sob luz polarizada com imersão em água. Sem um filtro de interferência, o esmalte mostra cores de alta interferência (A-B), indicando que a espessura do corte é relativamente alta. Com o filtro Red I, a adição na cor de interferência é mostrada a -45° (C) em posição diagonal, e a subtração da cor de interferência a $+45^\circ$ (D) em posição diagonal, indicando birrefringência negativa.

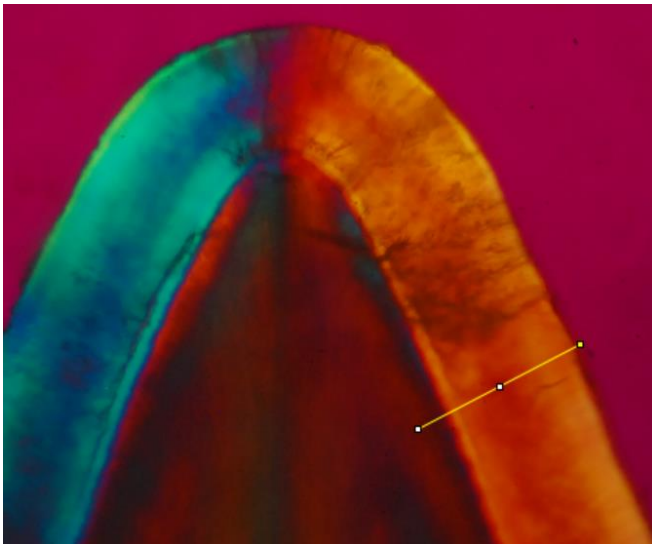


Figura 15. Microfotografia do corte histológico do esmalte dentário de *Hydrochoerus hydrochaeris* sob luz polarizada. A imagem foi feita com filtro Red I. O corte foi submetido a imersão em água antes da análise.

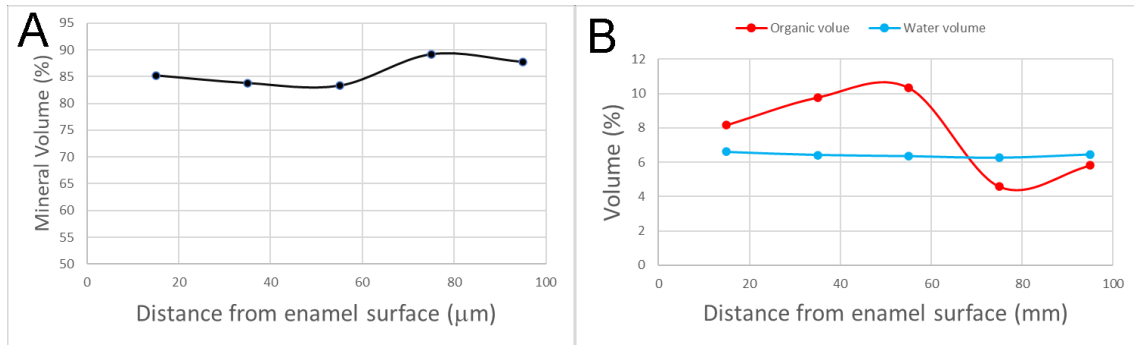


Figura 16. Volumes dos componentes mineral (A), orgânico (B) e de água total (B) no esmalte de *Purussaurus* sp. nos pontos histológicos localizados ao longo da linha longitudinal mostrada na Figura 8.

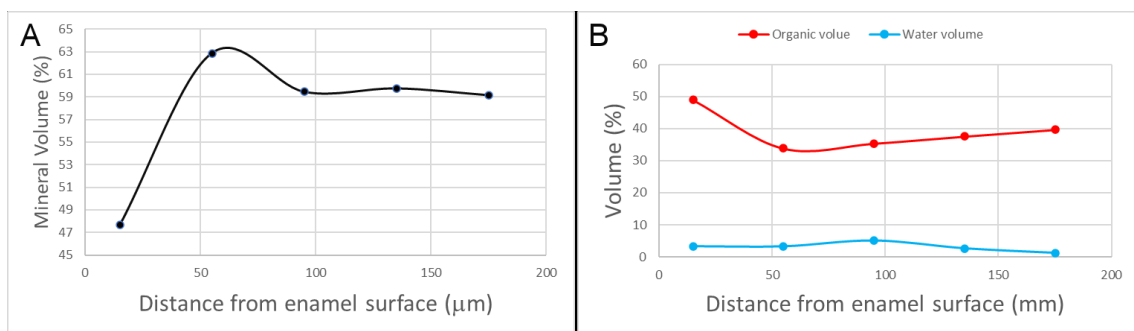


Figura 17. Volumes dos componentes mineral (A), orgânico (B) e de água total (B) no esmalte de *M. niger* nos pontos histológicos localizados ao longo da linha longitudinal mostrada na Figura 9.

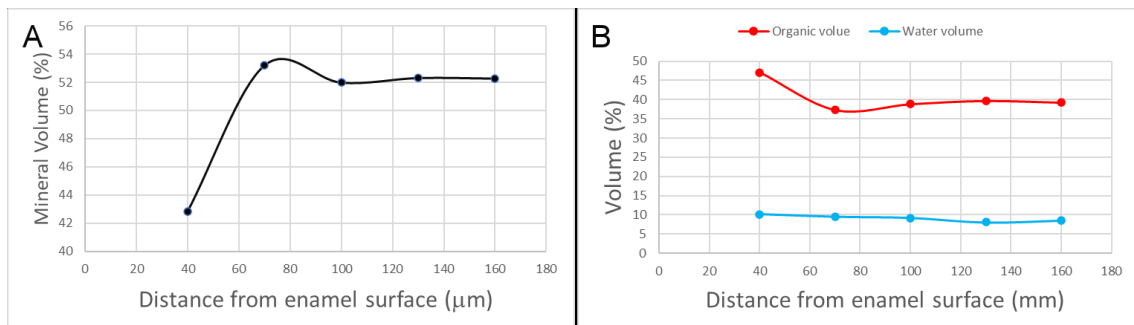


Figura 18. Volumes dos componentes mineral (A), orgânico (B) e de água total (B) no esmalte de *Neopiblema* sp. nos pontos histológicos localizados ao longo da linha longitudinal mostrada na Figura 10.

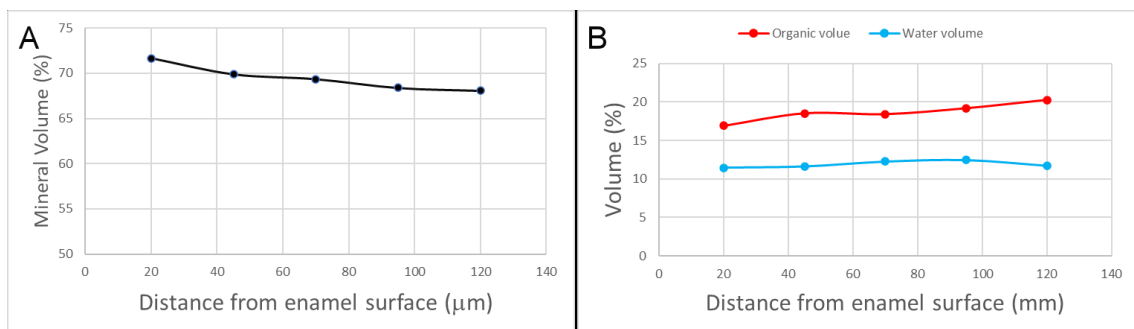


Figura 19. Volumes dos componentes mineral (A), orgânico (B) e de água total (B) no esmalte de *H. hydrochaeris* nos pontos histológicos localizados ao longo da linha longitudinal mostrada na Figura 11.

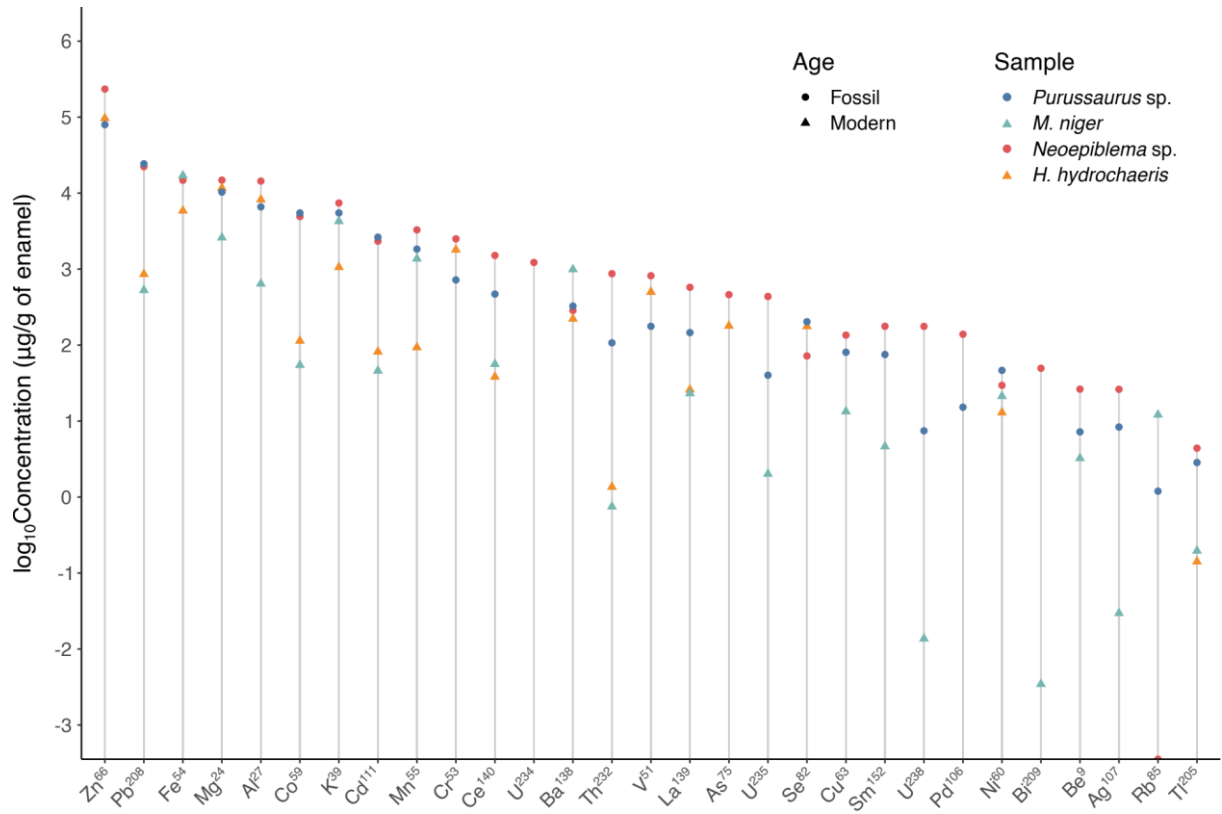


Figura 20. Concentração em Log10 (µg/g de esmalte) de 27 microelementos detectados nas amostras de esmalte por ICP-MS. As amostras fósseis estão identificadas por um ícone circular e as amostras modernas por um ícone triangular. Azul claro e escuro são usados para as espécies de jacaré, enquanto vermelho e laranja são usados para as espécies de roedor.

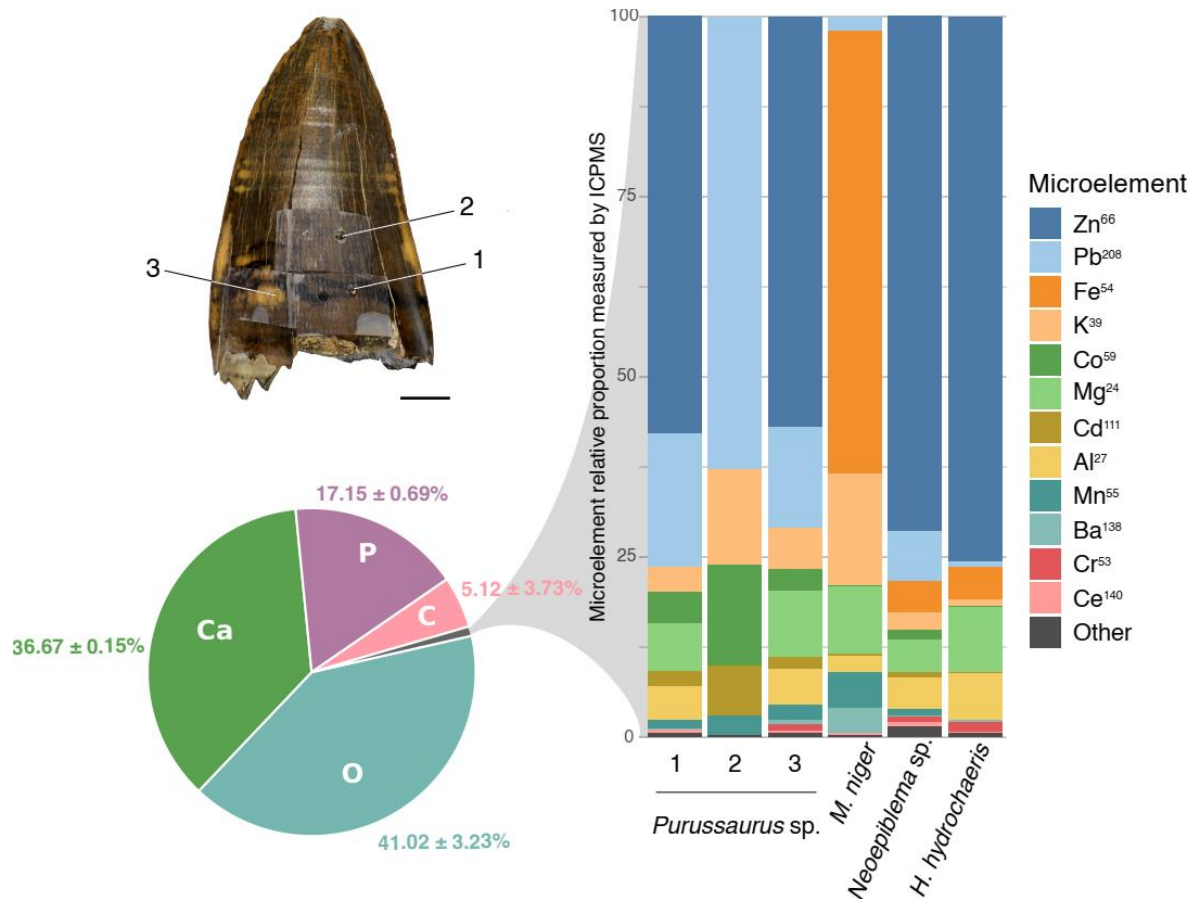


Figura 21. Resumo da composição inorgânica do esmalte das 4 espécies (*Purussaurus* sp., *M. niger*, *Neoepiblema* sp. e *H. hydrochaeris*). O gráfico de pizza apresenta a média dos macroelementos (Ca, O, P e C) encontrado no esmalte (em porcentagem de massa) de todas as amostras analisadas por MEV-EDS nesse estudo. À direita, o gráfico de barras mostra a proporção dos microelementos encontrados em cada amostra (determinados por ICP-MS). Nas barras, cada elemento aparece em porcentagem relativa a todos os microelementos medidos na amostra. A imagem no canto superior esquerdo mostra as 3 regiões diferentes analisadas no esmalte de *Purussaurus* sp: 1. Região mais escura do esmalte; 2. Região com a cor predominante do esmalte, marrom; 3. Região de coloração amarela.

TABELAS

Tabela 1. Espécies utilizadas para obtenção de amostras do esmalte para estudo da composição química (orgânica e inorgânica).

	Espécie	Táxon	Natureza do material
1	<i>†Purussaurus</i> sp.	Crocodylia, Aligatoridae	Fóssil
2	<i>Melanosuchus niger</i>	Crocodylia, Aligatoridae	Fóssil
3	<i>†Neoepiblema</i> sp.	Rodentia, Chinchillidae	Recente
4	<i>Hydrocherus hydrochaeris</i>	Rodentia, Chinchillidae	Recente

Tabela 2: Média \pm desvio padrão (n = 4-5 medidas em cada amostra) da composição de macroelementos (massa %) determinados no esmalte interno por MEV-EDS. As duas primeiras linhas são amostras dos jacarés (fóssil e atual), e as duas últimas linhas são amostras dos roedores (fóssil e atual). A taxa Cálcio/Fósforo (Ca/P) corresponde ao esperado para hidroxiapatita, mostrando que não houve grande variação desta molécula ao longo de milhões de anos.

	Ca (m%)	P (m%)	Taxa Ca/P
<i>†Purussaurus</i> sp.	36,8 \pm 24,4	16,5 \pm 0,2	2,2 \pm 0,03
<i>M. niger</i>	33,3 \pm 0,4	16,6 \pm 0,1	2,0 \pm 0,03
<i>†Neoepiblema</i> sp.	38,6 \pm 0,3	17,8 \pm 0,1	2,2 \pm 0,02
<i>H. hydrochaeris</i>	36,8 \pm 1,5	17,7 \pm 1,3	2,1 \pm 0,12

Tabela 3. Principais componentes bioquímicos do esmalte (porcentagem em volume e massa) medidos nas amostras de †*Purussaurus* sp., *Melanosuchus niger*, †*Neoepiblema* sp. e *Hydrochoerus hydrochaeris*. A medida de água corresponde a água absorvida durante a preparação da amostra. Distância = distância do ponto de medida em relação à superfície do esmalte; DP = desvio padrão; v = volume; m = massa.

	Distância (μm)	Mineral		Orgânico*		Água	
		v (%)	m (%)	v (%)	m (%)	v (%)	m (%)
† <i>Purussaurus</i> sp.	15	85,25	93,12	8,15	4,47	6,60	2,41
	35	83,83	92,25	9,75	5,38	6,42	2,36
	55	83,34	91,95	10,32	5,71	6,34	2,34
	75	89,17	95,31	4,58	2,46	6,25	2,23
	95	87,74	94,54	5,81	3,14	6,45	2,32
	Média	85,25	93,12	8,15	4,47	6,42	2,34
	DP	2,52	1,45	2,48	1,40	0,13	0,07
<i>M. niger</i>	15	47,67	64,98	49,00	33,51	3,33	1,52
	55	62,86	77,66	33,85	20,98	3,29	1,36
	95	59,45	75,32	35,37	22,48	5,18	2,19
	135	59,75	75,16	37,58	23,72	2,67	1,12
	175	59,15	74,45	39,68	25,05	1,17	0,49
	Média	59,45	75,16	37,58	23,72	3,29	1,36
	DP	5,84	4,92	5,96	4,91	1,44	0,62
† <i>Neoepiblema</i> sp.	40	42,82	61,34	47,05	33,81	10,13	4,86
	70	53,19	70,84	37,32	24,93	9,49	4,23
	100	51,98	69,74	38,82	26,13	9,20	4,13
	130	52,31	69,85	39,65	26,56	8,04	3,59
	160	52,27	69,89	39,21	26,30	8,52	3,81
	Média	52,27	69,85	39,21	26,30	9,20	4,13
	DP	4,32	3,93	3,81	3,56	0,82	0,48
<i>H. hydrochaeris</i>	20	71,66	85,35	16,89	10,09	11,45	4,56
	45	69,89	84,15	18,50	11,17	11,61	4,68
	70	69,35	83,88	18,40	11,16	12,25	4,96
	95	68,39	83,23	19,16	11,70	12,45	5,07
	120	68,07	82,88	20,23	12,36	11,70	4,76
	Média	69,35	83,88	18,50	11,17	11,70	4,76
	DP	1,42	0,96	1,22	0,83	0,43	0,21

* Densidade estimada com base na densidade do ácido glutâmico ($1,5 \text{ g/cm}^3$).

Tabela 4. Vinte e sete (27) microelementos na composição do esmalte determinados por ICP-MS. As medidas de concentração dos elementos na amostra líquida em ppb (partes por bilhão) foram convertidas em ppm (parte por milhão) de esmalte com base nos valores de Cálcio recuperados pelo MEV-EDS. †*Purussaurus* (1): região mais escura do esmalte, (2) região predominante do esmalte de coloração marrom, (3) região amarela do esmalte.

Elemento (Isótopo)	Amostra (ppm ou µg/g)					
	† <i>Purussaurus</i> sp. (1)	† <i>Purussaurus</i> sp. (2)	† <i>Purussaurus</i> sp. (3)	<i>M. niger</i>	† <i>Neopiblema</i> sp.	<i>H.</i> <i>hydrochaeris</i>
Zn (66)	114836	-	44509	-	234297	96565
Pb (208)	36873	25110	10950	528	22306	860
Fe (54)	-	-	-	17053	14774	5872
Mg (24)	13468	-	7172	2602	14827	11696
Al (27)	9211	-	3990	642	14412	8233
Co (59)	8411	5630	2412	55	4926	114
K (39)	6761	5239	4471	4271	7416	1060
Cd (111)	3995	2731	1183	46	2334	82
Mn (55)	2650	1134	1715	1372	3285	93
Ce (140)	717	-	222	56	1514	38
Se (82)	386	-	20	-	72	177
Ba (138)	299	-	353	993	285	222
La (139)	228	-	64	23	576	26
Cu (63)	179	17	46	13	135	-
Th (232)	125	-	90	0.7	871	1.4
Sm (152)	109	-	41	4.6	177	-
Ni (60)	78	45	17	21	30	13
Pd (106)	36	1.0	8.3	-	139	-
U (235)	36	-	44	2.0	436	-
U (238)	10	-	4.8	0.01	176	-
U (234)	-	-	-	-	1224	-
Be (9)	13	3.0	5.8	3.2	26	-
Tl (205)	5.3	-	0.4	0.2	4.4	0.1
Ag (107)	2.3	20	3.2	0.03	26	-
V (51)	-	-	177	-	819	500
Cr (53)	-	-	721	-	2501	1798
As (75)	-	-	-	-	461	179
Rb (85)	-	-	1.2	12	-	-
Bi (209)	-	-	-	0.003	50	-

Tabela 5. Limites de quantificação (LOQ) do método ICP-MS dos elementos no estudo.

Elemento	LOQ (ng/g)	Elemento	LOQ (ng/g)	Elemento	LOQ (ng/g)	Elemento	LOQ (ng/g)	Elemento	LOQ (ng/g)
Zn (66)	0.1	Co (59)	0.05	Se (82)	0.08	Sm (152)	0.05	U (238)	0.008
Pb (208)	0.007	K (39)	0.1	Ba (138)	0.05	Ni (60)	0.01	Be (9)	0.001
Fe (54)	0.1	Cd (111)	0.009	La (139)	0.08	Pd (106)	0.001	Ag (107)	0.001
Mg (24)	0.1	Mn (55)	0.01	Cu (63)	0.1	U (235)	0.07	V (51)	0.05
Al (27)	0.06	Ce (140)	0.08	Th (232)	0.06	U (234)	0.22	Cr (53)	0.05
As(75)	0.09	Rb (85)	0.02	Bi (029)	0.03				

LITERATURA CITADA

ANGMAR, B.; CARLSTROM, D.; GLAS, J.E. Estudos sobre a ultraestrutura do esmalte dental: IV. A mineralização do esmalte humano normal. *Journal of Ultrastructure Research*, v. 8, p. 12–23, 1963. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(63\)80017-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(63)80017-9).

AOBA, T. Recent observations on enamel crystal formation during mammalian amelogenesis. *The Anatomical Record*, v. 245, p. 208–218, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199606\)245:2<208::AID-AR8>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2<208::AID-AR8>3.0.CO;2-S).

ARENDS, J.; TEN BOSCH, J.J. Técnicas de avaliação de desmineralização e remineralização. *Journal of Dental Research*, v. 71, n. Spec No, p. 924–928, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/002203459207100S27>.

AURELIANO, T. et al. Morfometria, força de mordida e paleobiologia do Caiman Purussaurus brasiliensis do Mioceno tardio. *PLOS ONE*, v. 10, p. e0117944, 2015. Publicado por Public Library of Science. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117944>.

BARBOSA, F. et al. Uma revisão crítica dos biomarcadores utilizados para monitorar a exposição humana ao chumbo: vantagens, limitações e necessidades futuras. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, p. 1669–1674, 2005. Publicado por Environmental Health Perspectives. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.7917>.

BISSARO-JÚNIOR, M.C. et al. Geocronologia U-Pb de zircões detríticos restringe a idade de depósitos Neógenos brasileiros da Amazônia Ocidental. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, v. 516, p. 64–70, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2018.11.032>.

BROOKES, S.J. et al. Bioquímica e biologia molecular das proteínas amelogeninas no desenvolvimento do esmalte dentário. *Archives of Oral Biology*, v. 40, p. 1-14, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(94\)00135-X](https://doi.org/10.1016/0003-9969(94)00135-X).

BRUDEVOLD, F.; REDA, A.; AASENDEN, R.; BAKHOS, Y. Determinação de elementos traços no esmalte superficial de dentes humanos por um novo procedimento de biópsia. *Archives of Oral Biology*, v. 20, p. 667-673, 1975. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(75\)90135-1](https://doi.org/10.1016/0003-9969(75)90135-1).

BRUDEVOLD, F.; AASENDEN, R.; SRINIVASIAN, B.N.; BAKHOS, Y. Chumbo no esmalte e na saliva, cáries dentárias e o uso de biópsias de esmalte para medir a exposição passada ao chumbo. *Journal of Dental Research*, v. 56, p. 1165-1171, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/00220345770560100701>.

BUCKLEY, M. et al. Identificação de espécies por análise de colágeno ósseo usando espectrometria de massa por ionização/dessorção a laser assistida por matriz de tempo de voo. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 23, p. 3843-3854, 2009.

BUCKLEY, M. Uma filogenia molecular de Plesiorcyteropus reatribui a ordem extinta de mamíferos "Bibymalagasia". *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, 2013.

BUCKLEY, M. Colágeno antigo revela história evolutiva dos 'ungulados' endêmicos da América do Sul. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 282, n. 1806, 2015.

BUCKLEY, M.; LAWLESS, C.; RYBCZYNSKI, N. Análise de sequências de colágeno de camelos fósseis, *Camelops* e c.f. *Paracamelus*, do Ártico e subártico da América do Norte do Plio-Pleistoceno. *Journal of Proteomics*, v. 194, n. July 2018, p. 218-225, 2019.

CAPPELLINI, E. et al. Análise proteômica de um fêmur de mamute do Pleistoceno revela mais de cem proteínas ósseas antigas. *Journal of Proteome Research*, v. 11, n. 2, p. 917-926, 2012.

CAPPELLINI, E. et al. Biomoléculas antigas e inferência evolutiva. *Annual Review of Biochemistry*, v. 87, p. 1029-1060, 2018.

CAPPELLINI, E. et al. Sequências de proteoma de esmalte do início do Pleistoceno de Dmanisi resolvem a filogenia de *Stephanorhinus*. *Journal of Proteomics*, v. 18, p. 23, 2019.

CAPPELLINI, E. et al. Early Pleistocene enamel proteome sequences from Dmanisi resolve *Stephanorhinus* phylogeny. *Nature*, v. 574, n. 7776, p. 103–107, 2020.

CLELAND, T. P.; SCHROETER, E. R.; FERANEC, R. S.; VASHISHTH, D. Peptide sequences from the first *Castoroides ohioensis* skull and the utility of old museum collections for palaeoproteomics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 283, p. 20160593, 2016. DOI: 10.1098/rspb.2016.0593.

CLEYMAET, R. et al. A comparative study of the lead and cadmium content of surface enamel of Belgian and Kenyan children. *Science of The Total Environment*, v. 104, p. 175–189, 1991. DOI: 10.1016/0048-9697(91)90071-L.

CLEYMAET, R. et al. Study of lead and cadmium content of surface enamel of schoolchildren from an industrial area in Belgium. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, v. 19, p. 107–111, 1991. DOI: 10.1111/j.1600-0528.1991.tb00122.x.

COLLEARY, C. et al. Molecular preservation in mammoth bone and variation based on burial environment. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021.

COSTA DE ALMEIDA, G. R. et al. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environmental Research*, v. 104, p. 337–345, 2007. DOI: 10.1016/j.envres.2007.03.007.

COSTA DE ALMEIDA, G. R. et al. Lead contents in the surface enamel of primary and permanent teeth, whole blood, serum, and saliva of 6- to 8-year-old children. *The Science of the Total Environment*, v. 409, p. 1799–1805, 2011. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.01.004.

COZZUOL, M. A. The Acre vertebrate fauna: Age, diversity, and geography. *Journal of South American Earth Sciences*, v. 21, p. 185–203, 2006. DOI: 10.1016/j.jsames.2006.03.005.

CUCINA, A. et al. Meta-proteomic analysis of two mammoth's trunks by EVA technology and high-resolution mass spectrometry for an indirect picture of their habitat and the characterization of the collagen type I, alpha-1 and alpha-2 sequence. *Amino Acids*, v. 54, p. 935–954, 2022. DOI: 10.1007/s00726-022-03160-6.

CUNHA, P. C. et al. Bacia do Acre. *Boletim de Geociências da Petrobras*, v. 15, p. 207–215, 2007.

DE ANDRADE DANTAS, E.L. et al. Variation in mineral, organic, and water volumes at the

neonatal line and in pre- and postnatal enamel. *Archives of Oral Biology*, v. 118, p. 104850, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104850>.

DE FIGUEIREDO, F.A.T. et al. Lead line in rodents: an old sign of lead intoxication turned into a new method for environmental surveillance. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, p. 21475-21484, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7336-3>.

DE MEDEIROS, R. et al. Natural enamel caries in polarized light microscopy: differences in histopathological features derived from a qualitative versus a quantitative approach to interpret enamel birefringence. *Journal of Microscopy*, v. 246, p. 177-189, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03609.x>.

DELGADO, S. et al. Amelogenin, the major protein of tooth enamel: A new phylogenetic marker for ordinal mammal relationships. In: XXIV IUBMB and XV IUBMB Congress, 2008. p. 865-869.

DEMARCHI, B. et al. Protein sequences bound to mineral surfaces persist into deep time. *eLife*, v. 5, n. September, 2016.

DEUTSCH, D. et al. Enamel matrix proteins and ameloblast biology. *Connective Tissue Research*, v. 32, n. 1-4, p. 97-107, 1995.

DJOMEHRI, S.I. et al. Mineral Density Volume Gradients in Normal and Diseased Human Tissues. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, p. e0121611, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121611>.

DE SOUZA-GUERRA, C. et al. Anatomical variations in primary teeth microelements with known differences in lead content by micro-Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence (SRXRF) - A preliminary study. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 28, p. 186-193, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.01.007>.

DOMINGO, L. et al. Multiproxy reconstruction of the palaeoclimate and palaeoenvironment of the Middle Miocene Somosaguas site (Madrid, Spain) using herbivore dental enamel. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, v. 272, p. 53-68, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2008.11.006>.

ELLIOTT, J.C. Structure, Crystal Chemistry and Density of Enamel Apatites. In: *Ciba Foundation Symposium 205 - Dental Enamel*. John Wiley & Sons, Ltd, 2007, pp. 54-72. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9780470515303.ch5>.

FROMENT, C. et al. Protein sequence comparison of human and non-human primate tooth proteomes. *Journal of Proteomics*, v. 231, n. November, 2021.

GLIMCHER, M. J. et al. Biochemical Analyses of Fossil Enamel and Dentin. v. 16, n. 2, p. 219-232, 1990.

GOMES, V.E. et al. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Science of The Total Environment*, v. 320, p. 25-35, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.08.013>.

HILL, R. C. et al. Preserved proteins from extinct bison latifrons identified by tandem mass

spectrometry; Hydroxylysine glycosides are a common feature of ancient collagen. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 14, n. 7, p. 1946-1958, 2015.

HSIOU, A.S. Lagartos e serpentes (Lepidosauria, Squamata) do mioceno médio-superior da Região Norte da América do Sul, 2010. Accepted: 2010-06-11T04:18:40Z.

IVANOVA, V. et al. LA-ICP-MS analysis of rare earth elements in tooth enamel of fossil small mammals (Ust-Oda section, Fore-Baikal area, Siberia): paleoenvironmental interpretation. *Journal of Quaternary Science*, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jqs.3428>.

JACQUES, L. et al. Implications of diagenesis for the isotopic analysis of Upper Miocene large mammalian herbivore tooth enamel from Chad. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, v. 266, p. 200-210, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2008.03.040>.

HUMPULA, J. F. et al. Investigation of the protein osteocalcin of *Camelops hesternus*: Sequence, structure and phylogenetic implications. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 71, n. 24, p. 5956-5967, 2007. ISSN 0016-7037. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gca.2007.09.003>.

JORDAN, T. E. Retroarc foreland and related basins. In: *TECTONICS OF SEDIMENTARY BASINS*. 1995, p. 331-391.

KARDONG, K. V. Vertebrados: anatomia comparada, função e evolução. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. il. Tradução de Claudia Lucia Caetano de Araujo, Idilia Vanzellotti, Patricia Lydie Voeux. ISBN 978-85-277-2968-0.

KERBER, L. et al. Postcranial Morphology of the Extinct Rodent *Neopiblema* (Rodentia: Chinchilloidea): Insights Into the Paleobiology of Neopiblemids. *Journal of Mammalian Evolution*, v. 29, p. 207-235, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10914-021-09567-4>.

KOCSIS, L. et al. Protracted diagenetic alteration of REE contents in fossil bioapatites: Direct evidence from Lu–Hf isotope systematics. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 74, p. 6077-6092, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.08.007>.

KOHN, M. J. et al. Altered states: effects of diagenesis on fossil tooth chemistry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 63, p. 2737-2747, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(99\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00208-2).

LINE, S. R. P. Incremental markings of enamel in ectothermal vertebrates. *Archives of Oral Biology*, v. 45, p. 363-368, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(00\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(00)00005-4).

LINE, S. R. P.; BERGQVIST, L. P. Enamel structure of paleocene mammals of the São José de Itaboraí basin, Brazil. ‘Condylarthra’, Litopterna, Notoungulata, Xenungulata, and Astrapotheria. *Journal of Vertebrate Paleontology*, v. 25, p. 924-928, 2005. Publisher: Taylor & Francis. Disponível em: [https://doi.org/10.1671/0272-4634\(2005\)025\[0924:ESOPMO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1671/0272-4634(2005)025[0924:ESOPMO]2.0.CO;2).

LÓPEZ-POLÍN, L. Possible interferences of some conservation treatments with subsequent studies on fossil bones: A conservator’s overview. *Quaternary International*, v. 275, p. 120-127,

2012. ISSN 1040-6182. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2011.07.039>.

LUNDBERG, J. G. et al. The Amazonian neogene fish fauna. In: AMAZONIA: LANDSCAPE AND SPECIES EVOLUTION: A LOOK INTO THE PAST. 2009, p. 281-301.

MA, B. Novor: real-time peptide de novo sequencing software. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, v. 26, n. 11, p. 1885-1894, 2015.

MACENA, M. S. A. et al. A comparative study on component volumes from outer to inner dental enamel in relation to enamel tufts. Archives of Oral Biology, v. 59, p. 568-577, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.03.001>.

MEISNAR, M. et al. Low-energy EDX – A novel approach to study stress corrosion cracking in SUS304 stainless steel via scanning electron microscopy. Micron, v. 66, p. 16-22, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.04.008>.

MIRONOV, E. A. Description of the Birefringence Effect in Optical Media With Several Types of Anisotropy. IEEE Journal of Quantum Electronics, vol. 57, no. 5, pp. 1-7, Oct. 2021. Art no. 6100407. doi: 10.1109/JQE.2021.3102836.

MOLINA, G. F. et al. Lead deposition in bovine enamel during a pH-cycling regimen simulating the caries process. Caries Research, v. 45, p. 469-474, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000330602>.

NEGRI, F. R. et al. A review of Tertiary mammal faunas and birds from western Amazonia. In: AMAZONIA: LANDSCAPE AND SPECIES EVOLUTION: A LOOK INTO THE PAST. 2009, p. 243-258.

NOGUEIRA, F. C. S. et al. Ancient enamel peptides recovered from the South American Pleistocene species *Notiomastodon platensis* and *Myocastor cf. coypus*. Journal of Proteomics, v. 240, n. April 2020, p. 104187, 2021.

OSTROM, P. H. et al. New strategies for characterizing ancient proteins using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 64, n. 6, p. 1043-1050, 2000.

ORSBURN, B. C. Proteome Discoverer - A Community Enhanced Data Processing Suite for Protein Informatics. Proteomes, v. 9, n. 1, p. 15, jan. 2021.

PAIVA, A. L. S.; GODOY, P. L.; SOUZA, R. B. B.; KLEIN, W.; HSIU, A. S. Body size estimation of Caimaninae specimens from the Miocene of South America, Journal of South American Earth Sciences, Volume 118, 2022, 103970, ISSN 0895-9811, <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2022.103970>.

PARK, E. S. et al. Proteomics analysis of human dentin reveals distinct protein expression profiles. Journal of Proteome Research, v. 8, n. 3, p. 1338-1346, mar. 2009.

ERICSON, J. E.; SHIRAHATA, H.; PATTERSON, C. C. Skeletal Concentrations of Lead in Ancient Peruvians. New England Journal of Medicine, v. 300, p. 946-951, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJM197904263001703>.

PESSOA-LIMA, C. et al. Structure and Chemical Composition of ca. 10-Million-Year-Old

(Late Miocene of Western Amazon) and Present-Day Teeth of Related Species. *Biology*, v. 11, p. 1636, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology11111636>.

PORTO, I. M. et al. Comparison of three methods for enamel protein extraction in different developmental phases of rat lower incisors. *European Journal of Oral Sciences*, v. 114, Suppl 1, p. 272-275, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00323.x>.

PORTO, I. M. et al. Enamel mineralization in the absence of maturation stage ameloblasts. *Archives of Oral Biology*, v. 54, p. 313-321, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.01.007>.

PORTO, I. M. et al. In situ zymography and immunolabeling in fixed and decalcified craniofacial tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, v. 57, p. 615-622, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.952127>.

PORTO, I. M. et al. Organic and inorganic content of fluorotic rat incisors measured by FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 77, p. 59-63, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.04.024>.

PORTO, I. M. et al. Recovery and identification of mature enamel proteins in ancient teeth. *European Journal of Oral Sciences*, v. 119, Suppl 1, p. 83-87, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00885.x>.

PRESSLEE, S. et al. Palaeoproteomics resolves sloth relationships. *Nature Ecology and Evolution*, v. 3, n. 7, p. 1121-1130, jul. 2019.

RIFF, D.; ROMANO, P. S. R.; OLIVEIRA, G. R.; AGUILERA, O. A.; HOORN, C. Neogene crocodile and turtle fauna in northern South America. In: HOORN, C. (Ed.). *Amazonia. Landscapes and Species Evolution: A Look Into the Past*. 2010. p. 259-280.

RIO, J. P.; MANNION, P. D. Phylogenetic analysis of a new morphological dataset elucidates the evolutionary history of Crocodylia and resolves the long-standing gharial problem. *PeerJ*, v. 9, p. e12094, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.12094>.

ROBINSON, C.; HUDSON, J. Tuft protein: protein cross-linking in enamel development. *European Journal of Oral Sciences*, v. 119, p. 50-54, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00906.x>.

RYBCZYNSKI, N. et al. Mid-Pliocene warm-period deposits in the High Arctic yield insight into camel evolution. *Nature Communications*, v. 4, p. 1550-1559, 2013.

SAIANI, R. A. et al. Morphological characterization of rat incisor fluorotic lesions. *Archives of Oral Biology*, v. 54, p. 1008-1015, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.08.009>.

SALMON, C. R. et al. Proteomic analysis of human dental cementum and alveolar bone. *Journal of Proteomics*, v. 91, p. 544-555, 2013.

SCHOENINGER, M. J. et al. Isotopic alteration of mammalian tooth enamel. *International Journal of Osteoarchaeology*, v. 13, p. 11-19, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/oa.653>.

SCHROETER, E. R. et al. Expansion for the *Brachylophosaurus canadensis* Collagen i Sequence and Additional Evidence of the Preservation of Cretaceous Protein. *Journal of Proteome Research*, v. 16, n. 2, p. 920-932, 2017.

SHAW, W. J. et al. Controls of nature: Secondary, tertiary, and quaternary structure of the enamel protein amelogenin in solution and on hydroxyapatite. *Journal of Structural Biology*, v. 212, n. 3, p. 107630, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107630>.

SILVA, A. J. P.; LOPES, R. C. L.; VASCONCELOS, A. M. Bacias sedimentares paleozóicas e meso-cenozóicas interiores. In: _____. *Geologia, tectônica e recursos minerais do Brasil: texto, mapas & SIG*. 2003. p. 55.

SMITH, C. E. et al. Relationships between protein and mineral during enamel development in normal and genetically altered mice. *European Journal of Oral Sciences*, v. 119, p. 125-135, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00871.x>.

SIMMER, J. P.; HU, J. C. C. Expression, Structure, and Function of Enamel Proteinases. *Connective Tissue Research*, v. 43, n. 2-3, p. 441-449, 2002. DOI: 10.1080/03008200290001159.

SOUSA, F. B. et al. A new approach for improving the birefringence analysis of dental enamel mineral content using polarizing microscopy. *Journal of Microscopy*, v. 221, p. 79-83, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2818.2006.01547.x>.

STEWART, N. A. et al. The identification of peptides by nanoLC-MS/MS from human surface tooth enamel following a simple acid etch extraction. *RSC Advances*, v. 6, n. 66, p. 61673-61679, 2016.

STEWART, N. A. et al. Sex determination of human remains from peptides in tooth enamel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 52, p. 13649-13654, 2017.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. D1, p. D480-D489, 2021.

THEUNS, H. M. et al. The mineral content of human enamel studied by polarizing microscopy, microradiography and scanning electron microscopy. *Archives of Oral Biology*, v. 28, p. 797-803, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(83\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0003-9969(83)90035-3).

TRAN, N. H. et al. Deep learning enables de novo peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry. *Nature Methods*, v. 16, n. 1, p. 63-66, 2019.

WEATHERELL, J. A.; ROBINSON, C.; HALLSWORTH, A. S. Variations in the chemical composition of human enamel. *Journal of Dental Research*, v. 53, p. 180-192, 1974. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/00220345740530020501>.

WELKER, F. et al. Ancient proteins resolve the evolutionary history of Darwin's South American ungulates. *Nature*, v. 522, n. 7554, p. 81-84, 4 jun. 2015.

WELKER, F. et al. Middle Pleistocene protein sequences from the rhinoceros genus *Stephanorhinus* and the phylogeny of extant and extinct Middle/Late Pleistocene Rhinocerotidae. *PeerJ*, v. 2017, n. 3, p. 1-17, 2017.

WELKER, F. et al. Enamel proteome shows that Gigantopithecus was an early diverging pongine. *Nature*, v. 576, n. 7786, p. 262-265, 2019.

WELKER, F. et al. The dental proteome of Homo antecessor. *Nature*, v. 580, n. 7802, p. 235-238, 2020.

WOOD, E. A. *Crystals and Light: An Introduction to Optical Crystallography*. Courier Corporation, 1977. Google-Books-ID: cRi-jAjV6YwwC.

CAPÍTULO 2: Estrutura do esmalte de mamíferos a nível ordinal

INTRODUÇÃO

Os dentes dos vertebrados são estruturas mineralizadas compostas por diversos tecidos de origem epitelial e conjuntiva (MJÖR & FEJERSKOV, 1986; BERKOVITZ & SHELLIS; 2016). Eles desempenham papéis cruciais em funções como a alimentação, comunicação e defesa, e são especializados em funções como perfurar, cortar, moer e roer (KOENIGSWALD, 2018). Dentre esses tecidos, o esmalte dentário, tecido de revestimento dos dentes, destaca-se por sua extrema dureza e capacidade de resistir às forças mastigatórias. A compreensão da estrutura do esmalte dentário é essencial para entender a funcionalidade e a evolução dos dentes dos vertebrados.

O esmalte dentário é formado majoritariamente por cristais de hidroxiapatita organizados em arranjos diversos. A alta mineralização conferem ao esmalte a sua resistência e dureza características. A estrutura dos cristais de hidroxiapatita é altamente ordenada em planos que determinam as propriedades mecânicas e físicas do esmalte (KOENIGSWALD, 2018). A compreensão da organização estrutural desses cristais é fundamental para a compreensão das propriedades do esmalte dentário.

Ao longo da evolução dos mamíferos, por exemplo, ocorreram variações significativas na estrutura do esmalte dentário, refletindo adaptações a diferentes regimes alimentares e ambientes. Além disso, a diversidade estrutural do esmalte parece corroborar padrões gerais da filogenia de Tetrapoda (KOENIGSWALD & CLEMENS, 1992; FILIPPO et al., 2019; MARIVAUX et al., 2022). A evolução dos diferentes grupos taxonômicos levou ao desenvolvimento de tipos de esmalte distintos. Estudos descritivos e comparativos de diferentes espécies de tetrápodes revelaram variações na espessura, orientação dos cristais de hidroxiapatita e na presença de estruturas adicionais, como prismas de esmalte (serão definidos na próxima seção) e estruturas de Hunter-Schreger em mamíferos (KOENIGSWALD & SANDER, 1994). As Bandas de Hunter-Schreger são um tipo de organização dos prismas do esmalte. Cada banda é formada por vários prismas paralelos uns aos outros, na mesma orientação. Cada banda se diferencia das adjacentes pela orientação dos prismas (KOENIGSWALD & CLEMENS, 1992).

Sistema hierárquico das estruturas do esmalte

Koenigswald & Clemens (1992) propõem cinco níveis de organização da estrutura do esmalte de mamíferos, de acordo com o tamanho das estruturas. Essas são, em ordem crescente: cristais, prismas, tipos de esmalte, Schmelzmuster (ou padrão de distribuição dos tipos de esmalte) e dentição.

Cristais

São unidades cristalinas de hidroxiapatita longas e em formato de agulha. Podem estar orientadas paralelamente umas às outras e se estender da junção amelodentinária (JAD) à superfície do esmalte. Neste caso, o esmalte é aprismático. O aumento da complexidade da estrutura do esmalte em certos grupos é resultado da variação na orientação dos cristais. Em alguns grupos há descontinuidade na orientação dos cristais, sendo o esmalte prismático ou aprismático. No caso do esmalte prismático, os cristais dos prismas e da matriz interprismática (MPI) podem variar em sua orientação nos diferentes clados de Mammalia (KOENIGSWALD & CLEMENS, 1992). Algumas espécies apresentam o esmalte semiprismático (também denominado pseudoprismático e pré-prismático). Neste caso, os cristais formam estruturas colunares distinguíveis, que apresentam 3 aspectos: (i) vista transversal hexagonal ou poligonal (nos prismas, normalmente, é circular); (ii) ausência de matriz interprismática; (iii) orientação perpendicular à junção amelodentária (prismas apresentam diversas orientações, algumas vezes também perpendiculares à JAD);

Prismas

Os prismas são unidades de cristais agrupados por uma grande descontinuidade de orientação em relação a outros cristais. Em vista transversal, os prismas apresentam formato circular, com algumas variações. Os primas podem ser observados em diferentes planos (transversal, longitudinal e sagital) de cortes histológicos, o que permite a descrição tridimensional das estruturas, mas este detalhamento foge o escopo deste trabalho, pois outra preparação de material se faria necessária. O volume de matriz interprismática varia entre as espécies. Alguns clados de mamíferos apresentam túbulos entre os prismas e a matriz interprismática (MPI) (GILKESON, 1997).

Tipos de esmalte

Cada tipo de esmalte corresponde a uma unidade de esmalte na qual os prismas se orientam de forma similar. É comum em mamíferos que haja mais de um tipo de esmalte

distribuído de forma tridimensional (KOENIGSWALD & CLEMENS, 1992). A junção amelodentinária (JAD) é usada como referência para descrição tridimensional do esmalte. Neste nível hierárquico, são descritos quais os tipos de esmalte estão presentes no espécime estudado.

Padrão do esmalte

Essa característica é denominada na literatura de Schmelzmuster, e refere-se ao padrão de distribuição tridimensional dos tipos de esmalte em cada dente.

Dentição

Os padrões de esmalte podem variar de acordo com o tipo de dente da série dentária (incisivo, canino, pré-molar e molar). No entanto, essas características poderão ser comparadas com muita limitação, pois apenas um dente de cada espécime foi amostrado.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal descrever e comparar a estrutura morfológica do esmalte dentário em diferentes táxons de Mammalia. Para isso, 9 espécies de mamíferos de diversas ordens foram selecionadas como objeto de estudo. Além disso, dentes de 3 espécies de Crocodylia (Caimaninae) foram analisados como um grupo externo para fins de comparação.

Sabe-se que a estrutura prismática do esmalte dos mamíferos é, na verdade, uma estrutura que surge na linhagem de Synapsida e se mantém nos seus representantes vivos (WOOD et al., 1999). Deste modo, Caimaninae foi incluído como representante do outro grande grupo de Amniota, Sauropsida, a fim de investigar amplamente a universalidade das características estruturais aqui analisadas.

A compreensão da estrutura do esmalte dentário dos mamíferos em nível ordinal e sua comparação com um grupo distante (Caimaninae) permite futuras investigações de padrões evolutivos e adaptativos relacionados à dentição de Amniota. Os estudos atuais, recorrentemente, concentram-se em descrições de espécies próximas filogeneticamente (KOENIGSWALD & CLEMENS, 1992; KOSAWA et al., 1998; FILIPPO et al., 2019; BIALAS et al., 2021; MARIVAUX et al., 2022), como da mesma família taxonômica, por exemplo. Deste modo, uma abordagem comparativa mais ampla contribui para o avanço do conhecimento sobre a diversidade morfológica e evolução dos dentes em Amniota.

Neste estudo, utilizou-se os níveis de organização estrutural: cristais, prismas, tipos de esmalte e padrão do esmalte.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

O material estudado pertence às seguintes coleções (acrônimo institucional entre parênteses): Coleção de Mamíferos do Departamento de Biologia da FFCLRP, Universidade de São Paulo (CMDB) e Laboratório de Paleontologia da Universidade Federal do Acre (UFAC).

Mammalia

Didelphidae (Didelphimorphia): *Didelphis albiventris* (CMDB, não catalogado; pré-molar); Dasypodidae (Cingulata): *Dasyopus novemcinctus* (CMDB, não catalogado); Felidae (Carnivora): *Felis catus* (CMDB, não catalogado; canino); Pontoporiidae (Artiodactyla): *Pontoporia blainvillei* (CMDB, não catalogado); Cervidae (Artiodactyla): *Subulo gouazoubira* (CMDB, não catalogado; molar); Phyllostomidae (Chiroptera): *Artibeus lituratus* (CMDB, não catalogado; molar); Cebidae (Primata): *Sapajus* sp. (CMDB, não catalogado; pré-molar); Caviidae (Rodentia): *Hydrochoerus hydrochaeris* (CMDB, não catalogado; pré-molar) e Neopiblemidae (Rodentia): †*Neopiblema* sp. (UFAC 7227; pré-molar).

Crocodylia

Aligatoridae (Caimaninae): *Caiman latirostris* (LIRP, não catalogado), *Melanosuchus niger* (LIRP, não catalogado) e †*Purussaurus* sp. (UFAC-7226).

Preparação dos cortes histológicos para a microscopia de luz

Um dente †*Neopiblema* sp. foi preparado para microscopia de luz. O dente foi incorporado em resina acrílica autopolimerizável (JET, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) e cortado com um disco diamantado em máquina de corte para tecidos calcificados (Elsaw, Elquip, São Carlos, SP, Brasil). O corte foi feito em orientação transversal. O corte foi cuidadosamente lixados com uma diminuição gradual da granulação da lixa, de 600 para 4000, utilizando água, até que atingisse de 100 a 400 µm de espessura para o uso de microscopia de luz. Apenas o dente de †*Neopiblema* sp. foi analisado pois o objetivo foi testar quais informação morfológicas e estruturais podem ser obtidas desta preparação de esmalte fossilizado.

Preparação dos cortes histológicos para a microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os dentes das doze espécies descritas acima, na seção “Amostra” foram incorporados em blocos de resina autopolimerizável (JET, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) e cortados com disco diamantado em máquina de corte para tecidos calcificados (Elsaw, Elquip, São Carlos, SP, Brasil). Os cortes foram feitos longitudinalmente na região central do dente, em posição vestibulo-lingual. Os cortes foram preparados por desgaste, utilizando lixas d’água de granulação sucessiva de 1200, 1500, 2000 e 4000, para polimento da superfície. As superfícies dos cortes foram tratadas com ácido fosfórico (37%) por 30 segundos e, em seguida, lavadas em água destilada corrente por 60 segundos. Após secagem, os cortes foram mantidos por 3 horas em vácuo para eliminação da água restante no tecido e metalização com liga de ouro e paládio.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura dos cortes histológicos do esmalte dentário foram realizadas pelo modo convencional (para topografia) no microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM - 5600LV, Tokyo, Japão) do Laboratório Multiusuário de Microscopia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). As imagens foram geradas pelo software JEOL Scanning Electron Microscope.

Descrição da estrutura do esmalte

A descrição da estrutura do esmalte dentário dos espécimes foi ordenada a partir do sistema de classificação proposto por Koenigswald & Clemens (1992). Os autores sistematizaram 5 níveis de complexidade estrutural do esmalte a partir de trabalhos de pesquisa de pares e próprios. Os 5 níveis do sistema hierárquico da estrutura do esmalte de mamíferos são: cristais, prismas, tipo de esmalte, padrão do esmalte e dentição. A nomenclatura da descrição baseia-se em Koenigswald & Sander (1994).

Abreviações

Estrutura do Esmalte

MIP: matriz interprismática; JAD: junção amelodentinária; BHS: Bandas de Hunter-Schreger; SEE: superfície externa do esmalte; EAP: esmalte aprismático; UC: unidade colunar; E: esmalte; D: dentina; C: cemento; EV: esmalte vestigial; DM: depósito mineral; P: prisma.

RESULTADOS

As descrições da estrutura do esmalte de cada espécie do estudo são apresentadas a seguir.

***Didelphis albiventris* (Figura 1) – Marsupialia, Didelphimorphia, Didelphidae - saruê**

Esmalte de 3 a 5 vezes mais espesso nas laterais do dente do que na região interna da coroa. Na parte lateral do dente, a camada externa do esmalte é aprismática (menos espessa, ~1/4 da espessura total do esmalte), na qual os cristais são perpendiculares à superfície externa do esmalte, camada intermediária de transição com alguns prismas (~1/4 da espessura total do esmalte), nos quais os cristais são majoritariamente perpendiculares à JAD e alguns paralelos à JAD e camada interna (mais espessa) com decussação irregular, na qual os cristais estão em diversas direções. A cúspide do dente possui esmalte radial. O esmalte radial tem os prismas bem delimitados, separados por quantidade grande de matriz interprismática (MIP), algumas vezes com largura igual à dos prismas. O esmalte com decussação irregular, com matriz interprismática anastomosada. Na cúspide do dente, os prismas são circulares. Não foram observados túbulos no esmalte, reportados no esmalte de marsupiais australianos.

***Dasypus novemcinctus* (Figura 2) – Xenarthra, , Cingulata, Dasypodidae – tatu-galinha**

Não possui esmalte verdadeiro. Há uma fina camada de depósito mineral ao longo da superfície da coroa do dente que se diferencia da dentina. Essa camada é mais espessa na cúspide no dente.

***Felis catus* (Figura 3) – Carvinova, Felidae – gato-doméstico**

Esmalte na cúspide do dente mais espesso (~2x) que o esmalte que recobre as laterais da coroa dentária. Não há variação no tipo de esmalte ao longo das diferentes regiões do dente. O esmalte é composto por bandas de Hunter-Schreger (BHS) bem delimitadas com espessura variável (de 2 a 8 fileiras de prismas, aproximadamente). As bandas são enfileiradas perpendicularmente (~90°) ou ligeiramente obtusas (~120°) à JAD e à superfície do esmalte. Os prismas de cada banda são perpendiculares em relação aos prismas da banda subjacente, ou

seja, em vista longitudinal do dente, em uma banda os prismas estão cortados transversalmente, e na banda seguinte, os prismas estão cortados longitudinalmente. Cada prisma é bem delimitado por uma fina camada de matriz interprismática. O corte transversal do prisma exhibe seu formato de folha aberta. Os cristais da MIP são perpendiculares aos cristais dos prismas. Ainda que não seja objetivo deste trabalho analisar a dentina, nesta estão visíveis cristais estrelados próximas à JAD.

***Pontoporia blainvillei* (Figura 4) – Artiodactyla, Cetacea, Pontoporiidae – toninha**

Esmalte pouco espesso (menor que 100 µm) ao longo de toda a superfície do dente, um pouco mais espesso na cúspide do dente. O esmalte não é prismático. Os cristais não são distinguíveis em algumas regiões. Os cristais que são distinguíveis estão em orientações variadas e, aparentemente, aleatórias, formando unidades estruturais sem formato definido.

***Subulo gouazoubira* (Figura 5) – Artiodactyla, Cervidae – veado-catingueiro**

A espessura do esmalte varia pouco entre as regiões do dente. O esmalte é majoritariamente formado por bandas de Hunter-Schreger (BHS) com grande variação na espessura das bandas e direção dos prismas. Próximo à JAD, há uma estreita camada de esmalte radial. A região de transição entre as BHS apresenta decussação dos prismas (~2 fileiras de prismas), individualmente. As BHS estão anguladas a ~60° da JAD. Não foram feitas imagens de corte transversal do prisma, deste modo, não é possível descrever seu formato em detalhes. Contudo, aparentemente não tem formato circular, mas achatado ou de elipse. O volume de MIP varia entre as regiões do esmalte (porção labial e lingual). Os cristais da MIP são perpendiculares (~90°) em relação aos dos cristais dos prismas.

***Artibeus lituratus* (Figura 6) – Chiroptera, Phyllostomidae – morcego-da-cara-branca**

O esmalte desse espécime apresentou duas camadas diferentes. Na camada interna (próxima à JAD), os prismas tem margens irregulares, estão paralelos uns aos outros (esmalte radial), e em angulação aguda (entre 45 e 60°) em relação à JAD. Na camada externa, os prismas

são bem distinguíveis entre a matriz interprismática abundante, os prismas são mais agudos ($\sim 45^\circ$) em reação à JAD.

***Sapajus* sp. (Figura 7) – Primata, Cebidae – macaco-prego**

Esmalte espesso por toda a superfície do dente, com diminuição da espessura na região mais basal da coroa do dente, próxima à raiz. O esmalte é todo formado por BHS bem demarcadas, com espessura variável (em torno de 3 a 7 prismas por banda). Na lateral do dente, as BHS estão ligeiramente oblíquas ($+ de 90^\circ$) à JAD. Os prismas de uma banda são perpendiculares em relação aos prismas da banda subjacente, ou seja, em vista longitudinal do dente, em uma banda os prismas estão cortados transversalmente, e na banda seguinte, os prismas estão cortados longitudinalmente. Há pouca matriz interprismática entre os prismas. Ao que se pode notar neste corte, os prismas tem formato arredondado. Os cristais da MIP estão direcionados à, aproximadamente, 45° dos cristais dos prismas.

***Hydrochoerus hydrochaeris* (Figura 8) – Rodentia, Caviomorpha, Caviidae – capivara**

A camada externa do esmalte, adjacente à superfície dentária, e a camada mais interna, adjacente à JAD, são de esmalte radial. A camada intermediária é composta por esmalte com decussação irregular de grupos de prismas, entre os quais há cristais da MIP em orientações aleatórias.

†*Neopiblema* sp. (Figura 9) - Rodentia, Caviomorpha, †Neopiblemidae

Esmalte radial, com variação na direção dos prismas nas camadas interna e externa, em relação à intermediária. Linhas de crescimento visíveis na porção mais interna do esmalte (próximo à JAD). Parte da matriz interprismática (MIP) foi removida na preparação do material (tratamento com ácido) e a imagem apresenta espaços vazios. Parte da MIP pode ser observada entre os prismas. Os prismas possuem formato circular bem definido. Os cristais da MIP estão direcionados à, aproximadamente, 45° dos cristais dos prismas.

***Caiman latirostris* (Figura 10) – Crocodilia, Alligatoridae, Caimaninae - jacaré-de-papo-amarelo**

Esmalte aprismático. Linhas de crescimento paralelas à JAD por toda a profundidade do esmalte. Os cristais em formato de agulha são facilmente distinguíveis e perpendiculares à JAD e à superfície do esmalte, com pouca variação de angulação.

***Melanosuchus niger* (Figura 11) – Crocodilia, Alligatoridae, Caimaninae - jacaré-açu**

Esmalte aprismático. Linhas de crescimento paralelas à JAD por toda a profundidade do esmalte. Os cristais são perpendiculares ou oblíquos à JAD e à superfície do esmalte, em diferentes angulações. Próximo à JAD, os cristais estão arranjados formando estruturas em forma de leque.

***Purussaurus* sp. (Figura 12) - Crocodilia, Alligatoridae, Caimaninae**

Esmalte semiprismático formado por unidades colunares, bem delimitadas, de cristais posicionados paralelamente entre si e perpendiculares à JAD e à superfície do esmalte.

DISCUSSÃO

Este estudo apresenta, pela primeira vez até onde se sabe, uma análise descritiva e comparativa da microestrutura do esmalte de mamíferos em nível de Ordem. Muitos estudos tem sido realizados sobre este tema desde o século passado. Contudo, os mesmos investigam uma ou poucas espécies proximamente relacionadas (KOENIGSWALD & CLEMENS, 1992; KOSAWA et al., 1998; FILIPPO et al., 2019; BIALAS et al., 2021; MARIVAUX et al., 2022). A escolha de um escopo mais amplo neste trabalho visou prospectar o grau de variação anatômica da microestrutura do esmalte em Mammalia, investigada de maneira padronizada, de forma a detectar informações mais gerais compatíveis com as topologias filogenéticas mais aceitas na atualidade. É uma abordagem desafiadora visto o extenso acúmulo teórico relacionado à dentição de Mammalia que existe atualmente. Tratando-se de um capítulo de Dissertação, o objetivo foi, também, compilar parte dessas informações relacionadas ao esmalte e apontar algumas possíveis relações e lacunas no conhecimento. A abordagem amostral mais ampla que de costume permite um olhar mais holístico sobre a evolução deste tecido hipermineralizado de extrema relevância para a evolução de Mammalia como um todo. Também é apresentada a estrutura do esmalte de três espécies de Alligatoridae, com a descrição de esmalte semiprismático de *Purussaurus* sp., a qual representa o segundo caso de uma espécie de Diapsida, que tipicamente possui esmalte aprismático.

Este estudo encontrou e descreveu uma grande variação da microestrutura do esmalte dentário entre as ordens de Mammalia, nos diferentes níveis de complexidade deste tecido. O resultado era esperado, tendo em vista a grande diversidade destas ordens em seu modo de vida de vida e hábitos alimentares. Contudo, mesmo os grupos com hábitos alimentares semelhantes encontram diferentes estratégias adaptativas na morfologia da dentição como um todo, sendo que a microestrutura do esmalte é apenas uma delas. Alguns casos serão discutidos mais adiante.

O estudo de espécies antigas, além das atuais, traz à luz aspectos estruturais desconhecidos que podem colaborar na reconstrução da história evolutiva dos tecidos mineralizados. As modificações morfológicas (microestruturais) do esmalte devem-se à variação genética, em nível qualitativo (variação nas sequências das proteínas da matriz extracelular), quantitativo (volume de proteínas na matriz) e de expressão (especialmente temporal durante o desenvolvimento). Uma vez que o esmalte de camundongo geneticamente modificado foi estudado em detalhes com relação à maioria das proteínas do esmalte, a

correlação de tal modelo com descobertas sobre aspectos estruturais do esmalte de espécies extintas pode nos ajudar a entender melhor os organismos do passado e do presente. Por exemplo, uma dada sequência específica de proteínas do esmalte não apenas determina a orientação dos cristais, mas também podem interromper a amelogênese e produzir um esmalte mais fino. Este é o caso de animais transgênicos que superexpressam a ameloblastina, uma proteína do esmalte que é secretada na fase de secreção da amelogênese e faz parte da família das fosfoproteínas de ligação ao cálcio (SCPP), que evoluiu de um gene ancestral comum (DELGADO et al., 2001; KAWASAKI & WEISS, 2003). Níveis mais altos de expressão de ameloblastina numa matriz sem amelogenina resultaram em cristais de apatita curtos e orientados aleatoriamente, ou seja, esmalte aprismático, semelhante ao de *Iguana* (Figura 3 de LU et al., 2011).

Bartlett e colaboradores (BARTLETT et al., 2021) mostraram que o nocaute de *Amelx* e *Mmp20* em camundongos resultou na presença de arranjos de cristais em forma de leque no esmalte mais profundo (20 µm de esmalte), próximo à JAD, enquanto o esmalte médio e externo desses animais apresenta uma camada displásica e mais mineralizada. Curiosamente, o esmalte de *Melanosuchus niger* exibiu estruturas minerais que se assemelham a leques na forma (Figura 11d), com a mesma orientação (a borda maior do leque voltada para fora do esmalte). Estudos complementares do esmalte de jacarés modernos podem fornecer mais informações sobre o proteoma do esmalte, o arranjo cristalino detalhado e, possivelmente, a relação entre ambos.

De maneira geral, o esmalte dos jacarés vivos estudados aqui possui estrutura aprismática, que parece ser típica do grupo. Line (2000) descreveu as linhas incrementais de *Caiman crocodilus* como sendo de difícil visualização próximas à superfície do esmalte e bem demarcadas nas demais profundidades, o que difere dos resultados apresentados neste capítulo, no qual as linhas incrementais em *Caiman latirostris* são de fácil visualização próximo à superfície externa do esmalte (Figura 10) e por todo o esmalte em *Melanosuchus niger* (Figura 11). Já *Purussaurus* sp. apresenta um esmalte semiprismático, formado por unidades colunares de cristais (Figura 12).

Um aspecto essencial para a formação da estrutura prismática do esmalte dos mamíferos é a formação do Processo de Thomes, uma projeção do citoplasma dos ameloblastos que é formada na fase de maturação (deposição mineral) do esmalte. A morfologia dessa estrutura é responsável pela deposição dos cristais de hidroxiapatita em uma orientação oblíqua à camada de ameloblastos, de modo que cada célula é responsável pela formação de um prisma que

percorre toda a profundidade do esmalte. A matriz interprismática do esmalte é composta pela deposição mineral nos intervalos entre os prismas.

No esmalte aprismático não há relação entre a formação da unidade colunar com uma única célula. Esta é uma das características que diferencia o esmalte semiprismático do prismático. Deste modo, as estruturas colunares encontradas em †*Purussaurus* sp., não podem ser interpretadas como sendo originadas do mesmo tipo de formação de um prisma. Essas estruturas, muito provavelmente, têm relação com a orientação dos cristais exercida pela matriz proteica.

Em Diapsida, o esmalte semiprismático foi descrito do lagarto *Uromastyx aegyptia* (Agamidae) (Figura 7.2H de SANDER, 2000). A descrição desse arranjo cristalino no esmalte de †*Purussaurus* sp. é o segundo registro, até onde se sabe, fora de Synapsida. A investigação do proteoma do esmalte das duas espécies pode fornecer informação estrutural relevante para compreensão do papel das proteínas da matriz na orientação e evolução das estruturas de forma independente nesses grupos.

Através do estudo do esmalte de outras espécies de †*Purussaurus* e de †*Acrasuchus*, gênero filogeneticamente próximo descrito por Souza-Filho e colaboradores (2018), será possível estabelecer a origem do esmalte semiprismático nesse grupo. Sugere-se ainda a investigação de †*Mourasuchus* e *Paleosuchus* para melhor compreensão da característica nos Caimaninae como um todo.

A estrutura prismática do esmalte nos mamíferos, apesar de muito característica do grupo, não parece ter uma história simples e linear. O estudo dos Synapsida não-mamíferos sugere origens independentes desse arranjo estrutural (WOOD et al., 1999). Em Mammalia, o esmalte se diversifica intensamente entre os seus diferentes subgrupos, e a reconstrução da evolução desse tecido ainda se apresenta como um tema aberto à investigação. Contudo, a condição plesiomórfica do esmalte em Mammalia é de esmalte radial, no qual os prismas se orientam paralelos um aos outros e, normalmente, oblíquos à junção amelodentinária e superfície do esmalte (KOENIGSWALD, 1997).

A estrutura encontrada neste estudo do esmalte de *Didelphis albiventris* (Marsupialia) assemelha-se à de *Didelphis virginiana*, estudada por Stern & Crompton (1989). Em ambas as espécies, os prismas de esmalte atingem a superfície do dente na região de oclusão em orientação perpendicular à superfície. Os prismas são envoltos por uma espessa camada de

matriz interprismática e o esmalte é radial nesta região do dente. O esmalte da parte lateral do molar de ambas as espécies possui prismas paralelos entre si e oblíquos à JAD, além de uma camada de esmalte aprismático (Figura 1 deste trabalho e Figuras 2 C-D de Stern & Crompton, 1989). Kosawa e colaboradores (1998) também descrevem o arranjo dos prismas de esmalte de *Monodelphis domestica* como paralelos entre si e oblíquos à JAD. No entanto, os autores não informam qual a região do dente que foi analisada, de modo que não é possível entender se há variação.

O estudo da estrutura do esmalte dentário dos marsupiais australianos aponta a existência de túbulos entre os prismas e matriz interprismática em quase todas as espécies, com exceção de *Vombatus* (LESTER et al., 1987; GILKESON, 1997). Os túbulos são estruturas muito comuns na dentina, mas pouco comuns no esmalte, estando presentes nos marsupiais e algumas espécies de mamíferos placentários. Nestes animais, os túbulos do esmalte e dentina são contínuos (GILKESON, 1997). A origem celular dos túbulos do esmalte é alvo de divergências, pois há evidências para sua origem a partir de extensões citoplasmáticas dos ameloblastos (LESTER, 1970), como dos odontoblastos, células que formam a dentina (OSBORN, 1974). Azevedo & Goldberg (1987) afirmam, ainda, que é improvável que os túbulos tenham origem celular. Além dos marsupiais australianos, túbulos de esmalte foram descritos em *†Protodidelphis* (Didelphimorphia), assim como em *†Khasia* (Microbiotheria) (KOENIGSWALD & GOIN, 2000). Contudo, no presente estudo, não foi possível observar túbulos no esmalte de *Didelphis albiventris*, o que pode representar uma perda no grupo. No entanto, é possível que os túbulos sejam visíveis apenas (ou mais facilmente) em cortes transversais do dente, nos quais os prismas do esmalte também estejam cortados transversalmente (Figuras 1-4 de GILKESON, 1997).

Apesar dos estudos e debate no fim do século passado, o desenvolvimento e a evolução do esmalte dos Marsupiais foram muito pouco estudados e apresentam uma grande lacuna de conhecimento mesmo sobre a diversidade morfológica do grupo. Contudo, a presença predominante de esmalte radial neste grupo e nos mamíferos placentários é uma evidência da plesiomorfia dessa condição.

A história evolutiva do esmalte nos mamíferos também é constituída de reduções, perdas e simplificações estruturais. Como é mostrado neste estudo pelas espécies *Dasybus novemcinctus* (Cingulata) e *Pontoporia blainvillei* (Cetacea).

Os resultados que foram apresentados no presente estudo apontam para a ausência de esmalte verdadeiro em *Dasypus novemcinctus* (Cingulata, Xenarthra) (Figura 2). Contudo, Ciancio e colaboradores (2010) descrevem a presença de uma fina camada de esmalte no ápice do dente para indivíduos juvenis. Deste modo, o indivíduo utilizado como amostra neste capítulo, teve seu esmalte desgastado em vida, como indica Ciancio e colaboradores (2010; 2021). Ciancio e colaboradores (2021) descrevem a estrutura do esmalte de dentes decíduos e permanentes pré-erosão de quatro espécies de *Dasypus*. Nestes trabalhos, os autores reportaram a presença de esmalte prismático no dente permanente de *D. novemcinctus* e aprismático para as demais espécies.

Os Xenarthra são conhecidos por suas significativas modificações dentárias em relação aos demais mamíferos placentários, como a ausência de esmalte, na maioria das espécies, homodontia e até mesmo a completa ausência de dentes, como nos tamanduás (HAUTIER, 2016). Evidências moleculares (MEREDITH et al., 2009) e de morfologia comparada (CIANCIO et al., 2014) indicam que a perda do esmalte ocorreu mais de uma vez entre em Xenarthra, ou seja, independentemente em Cingulata e Pilosa, assim como também ocorreu independentemente dentro de Cingulata. Ciancio e colaboradores (2014) descrevem o esmalte dentário de †*Astegotherium dichotomus*, um tatu fóssil do Eoceno da Patagonia Argentina. Neste trabalho, os autores descrevem o esmalte prismático do tipo radial. Outra espécie de Cingulata para a qual foi reportada a presença de esmalte é do fóssil †*Utaetus buccatus* (SIMPSON, 1932), que também possui esmalte fino e ausente em adultos.

Neste estudo, *Artibeus lituratus* apresentou duas camadas de esmalte diferentes (Figura 6). Isso se deve, provavelmente, a uma mudança na orientação dos prismas. Apesar de distinguíveis, os prismas desse espécime não têm suas margens muito bem definidas. Lester & Hand (1987) descrevem e ilustram o esmalte de diversas espécies de diferentes famílias de Chiroptera. Não há, no entanto, imagens de *Artibeus* sp., apesar da espécie estar incluída na descrição. Neste trabalho, os autores analisaram a superfície do esmalte após ataque ácido e polimento, mas não foi feito corte em todos os espécimes. Os autores sugerem que a formato dos prismas de *Artibeus* sp. sejam do tipo “casco de cavalo”, mas não são conclusivos. Outras espécies de diferentes famílias (Mystacinidae, Vesperilionidae, Rhinolophiidae, Hipposideridae, †Palaeochiropterygidae e Pteropodidae) são analisadas mais detalhadamente no estudo. Nessas, os prismas são do tipo “casco de cavalo” na região mais interna do esmalte e, com exceção de Pteropodidae, adquirem o formato de prisma totalmente fechado (circular ou não) na região externa do esmalte (LESTER & HAND, 1987). Os prismas da região interna do

esmalte possuem cristais em duas direções, e suas bordas não são circulares (transversalmente), o que parece ser o caso de *Artibeus literatus* também. Os resultados desse capítulo e de Lester & Hand (1987) descrevem esmalte radial em Chiroptera. Os autores também relatam a presença de pequenos túbulos no esmalte em *Hipposideros diadema* (Hipposideridae) e *Taphozous georgianus* (Emballurionidae), não observados aqui.

Duas espécies de Artiodactyla foram analisadas neste estudo. A escolha deu-se ao fato que os cetáceos vivos são conhecidos por grandes modificações na dentição, incluindo reduções e homodontia (WERTH, 2000; ARMFIELD et al., 2013). *Pontoporia blainvillei* (Iniioidea, Pontoporiidae), popularmente conhecida como toninha, possui dentes caniniformes e indiferenciados. Alimenta-se principalmente de peixes, mas também moluscos (CAMPOS et al., 2020) e não necessita de movimentos mastigatórios complexos para processar o alimento. No presente estudo, o espécime apresentou esmalte aprismático, aparentemente (Figura 4). No entanto, Ishiyama (1987) e Loch et al. (2013) apresentam, em corte transversal, a estrutura prismática do esmalte da mesma espécie (Figuras 18 e 19 de ISHIYAMA, 1987; Figura 2e de LOCH et al., 2013). É possível notar no trabalho de Loch et al. (2013) que o esmalte de *Pontoporia blainvillei* apresenta uma espessa camada aprismática próxima à superfície do esmalte. Ishiyama (1987) relata que o esmalte da espécie apresenta grande volume de matriz interprismática. Deste modo, pode-se concluir que a aparência aprismática do esmalte encontrada nesse estudo (Figura 4) deve-se a artefatos metodológicos. É possível que o corte histológico tenha sido feito em uma região de maior volume interprismático, de modo que o ataque ácido utilizado na preparação dos cortes não foi suficiente para expor a estrutura dos prismas.

Ishiyama (1987) também descreve o esmalte prismático de *Stenella* (Delphinoidea, Delphinidae), *Lagenorhynchus* (Delphinoidea, Delphinidae) e esmalte aprismático de *Physeter* (Physeteroidea, Physeteridae) (Figuras 6 e 12 a 17 de ISHIYAMA, 1987). Embora o autor descreva o esmalte de *Physeter* como pseudoprismático, a estrutura é muito semelhante à descrita em *Melanosuchus niger* (Alligatoridae, Caimaninae) neste estudo (Figura 11). Loch et al. (2013) reporta a presença de esmalte prismático do tipo BHS em *Inia geoffrensis* (Iniioidea, Iniidae) e a combinação de esmalte radial e aprismático em todas as espécies de Delphinoidea estudadas, com exceção de *Phocoena spinipinnis* (Delphinoidea, Phocoenidae) que possui apenas esmalte aprismático. À luz das relações filogenéticas de Cetacea (STEEMAN et al., 2009), conclui-se que a estrutura do esmalte semelhante em *Pontoporia blainvillei* (Iniioidea, Pontoporiidae) e Delphinoidea são plesiomórficas e conservadas em ambos os grupos, enquanto

o esmalte do tipo BHS em *Inia* (Iniioidea, Iniidae) e esmalte exclusivamente aprismático em *Phocoena spinipinnis* (Delphinoidea, Phocoenidae) e *Physeter* (Physeteroidea, Physeteridae) são características apomórficas e de origem independente nos respectivos grupos.

Já o veado-catingueiro *Subulo gouazoubira* é uma espécie com estrutura do esmalte bastante complexa e diferenciada, uma condição comum aos artiodáctilos, de maneira geral. Neste estudo, foi descrita a estrutura do esmalte de *S. gouazoubira* como predominantemente composta por bandas de Hunter-Scheger e uma estreita camada de esmalte radial próximo à JAD (Figura 5). Com exceção de alguns cetáceos, como já mencionado, o esmalte desse grupo caracteriza-se pela presença de bandas de Hunter-Schreger. Esse tipo de esmalte surgiu independentemente diversas vezes em Mammalia, segundo o registro fóssil (KOENIGSWALD, 1997). Koenigswald (1997) reuniu resultados que descrevem a microestrutura do esmalte de Cervidae, Tylopoda e Bovidae, e afirmou que estes grupos apresentam uma camada de esmalte radial próximo à JAD, o que concorda com os resultados aqui encontrados em *S. gouazoubira*. Essa característica é atribuída às intensas forças sofridas pela compressão do esmalte e dentina durante a mastigação, e sugere que a camada de esmalte radial na intersecção dos dois tecidos, de diferentes durezas, serve como forma de dissipar parte dessa força.

Estudos indicam que as BHS verticais diminuem o desgaste do esmalte e que esse tipo de esmalte e o crescimento contínuo dos dentes surgiram independentemente diversas vezes no Paleógeno, nos “ungulados” sul-americanos, provavelmente, relacionado a mudanças climáticas (resfriamento) e predominância de gramíneas nessa época (KOENIGSWALD & PFRETZCHNER, 1991, KAY et al., 1999).

As BHS também previnem o esmalte de rachaduras no tecido, já que há descontinuidade dos prismas (KOENIGSWALD & PFRETZCHNER, 1991). Essa característica traz excelente durabilidade a esse tipo de esmalte, mesmo em espécies que não moem seu alimento, como Carnívora e Primata. Nesse estudo, ambas espécies *Felis catus* (Figura 3) e *Sapajus* sp. (Figura 7) apresentaram exclusivamente esse tipo de esmalte. Em Carnívora, BHS é o tipo de esmalte mais comumente relatado, com algumas variações na orientação das bandas, além de alguns grupos também possuírem camadas de esmalte radial. Dentre os primatas, o esmalte radial e BHS também são os tipos comumente descritos. No entanto, a morfologia dos prismas em vista transversal é bastante variável entre os subgrupos (KOENIGSWALD, 1997).

Nos roedores, as diferentes funções e morfologias dos incisivos e molares são extremas.

Os incisivos desses animais são, normalmente, formados por duas camadas, uma externa de BHS e uma interna de esmalte radial. O esmalte dos molares de Caviomorpha foi descrito de maneira generalizada por Koenigswald (1997) como sendo formado por BHS espessas combinadas com esmalte radial. Em um trabalho mais recente, Koenigswald (2004) descreveu a presença de decussação irregular do esmalte de *Cavia* (Hystricomorpha, Caviomorpha, Caviidae) e *Hydrochoerus* (Hystricomorpha, Caviomorpha, Caviidae), em concordância com os resultados sobre *Hydrochoerus hydrochaeris* apresentados neste capítulo (Figura 8). A decussação irregular do esmalte é uma característica presente na subfamília Arvicolinae de Cricetidae (Myomorpha), composta por campanhois (ou arvicolinos), lemingues e ratos-almiscarados, e interpretada como uma modificação de BHS uniseriais (KOENIGSWALD, 1997). É possível que o mesmo tenha ocorrido paralelamente em Hystricomorpha.

O esmalte de †*Neopiblema* sp. (Rodentia, Caviomorpha, †Neopiblemidae) apresenta uma linha incremental bem demarcada (Figura 9 e 13), semelhante à que pode ser observada em dentes decíduos humanos, nos quais é denominada linha neonatal. As linhas incrementais são região hipomineralizadas que marcam grandes alterações fisiológicas sofridas pelo organismo. A linha neonatal, especificamente, marca o evento de nascimento do indivíduo, que representa um grande estresse fisiológico. A presença da linha neonatal em †*Neopiblema* sp. é mais uma evidência a favor da erupção pós-natal do pré-molar, como sugerido por Kerber et al. (2019), diferentemente dos cavídeos, e semelhantes a outros caviomorfos. As linhas incrementais do esmalte aparecem tanto na microscopia de luz (Figura 13) quanto no MEV (Figura 9). Na microscopia de luz é possível observar diferenças na coloração do tecido, por exemplo. Por MEV, a topografia é evidenciada, deste modo, a variação de forma e orientação das microestruturas podem ser visualizadas.

Marivaux e colaboradores (2022) descreveram a estrutura do esmalte de outros Hystricomorpha fósseis. Neste trabalho, os autores analisam dentes incisivos que apresentam tipo de esmalte formado por BHS. Deste modo, não é possível concluir se a diferença dos tipos de esmalte BHS encontrado pelos autores e esmalte radial do pré-molar de †*Neopiblema* sp. apresentado neste capítulo se deve à variação da dentição ou se é de natureza taxonômica. No entanto, como já descrito acima, os molares de Caviomorpha são descritos pela combinação de BHS e esmalte radial. Portanto, o esmalte exclusivamente radial nos pré-molares de †*Neopiblema* sp. pode representar uma sinapomorfia desta espécie, do gênero †*Neopiblema*, ou mesmo da família †Neopiblemidae. Como declarado por Koenigswald & Pfretzschner (1991), o crescimento contínuo dos dentes parece ser mais eficiente que a conformação de BHS

para redução do desgaste. Neste sentido, a simplificação da estrutura do esmalte para esmalte radial pode não representar perda funcional significativa.

Este estudo buscou contribuir com o estudo da evolução do esmalte dentário em Amniota, pela descrição da estrutura geral do tecido e apontou algumas lacunas do conhecimento. Foi possível compreender que organizações como as Bandas de Hunter-Schreger e esmalte radial surgem e são fixadas diversas vezes ao longo da evolução dos mamíferos, associadas, principalmente, a adaptações aos regimes alimentares e forças físicas sofridas pelos dentes. Estudo da microestrutura do esmalte são bastante abundantes no final do século passado e, atualmente, concentram-se no estudo de formas fósseis. Este trabalho teve um escopo exploratório com o objetivo de reunir informações para uma amostra mais ampla da que é normalmente utilizada (nível de família ou inferior), mas devido às limitações procedimentais, apenas um plano de corte foi realizado em cada dente. Isso impossibilitou a descrição da microestrutura tridimensionalmente, como seria adequado e mais informativo. Outra limitação foi a utilização de apenas um tipo de dente da série dentária de cada espécie. Por fim, sugere-se que novos estudos com olhar integrativo sejam realizados e que estes incluam novos planos de corte dos dentes, amostras mais representativas da diversidade dentária dos indivíduos e taxonômica, de acordo com a pergunta de pesquisa.

Conclui-se que evolução do esmalte em Mammalia é majoritariamente influenciada por fatores biocamecânicos e, em alguns casos, filogenéticos. Foi descrita a primeira ocorrência de esmalte semiprismático em Archosauria, no espécime fóssil de †*Purussaurus* sp (Aligatoridae, Caimaninae). Também, reportado esmalte exclusivamente do tipo radial no pré-molar do fóssil de †*Neopiblema* sp. (Rodentia, †*Neopiblemidae*), em oposição à típica conformação de bandas de Hunter-Schreger em roedores, que corresponde a um tipo presumivelmente derivado de decussação dos prismas. Ambos os resultados apontam para a importância dos estudos paleontológicos para a compreensão da evolução de caracteres biológicos.

FIGURAS

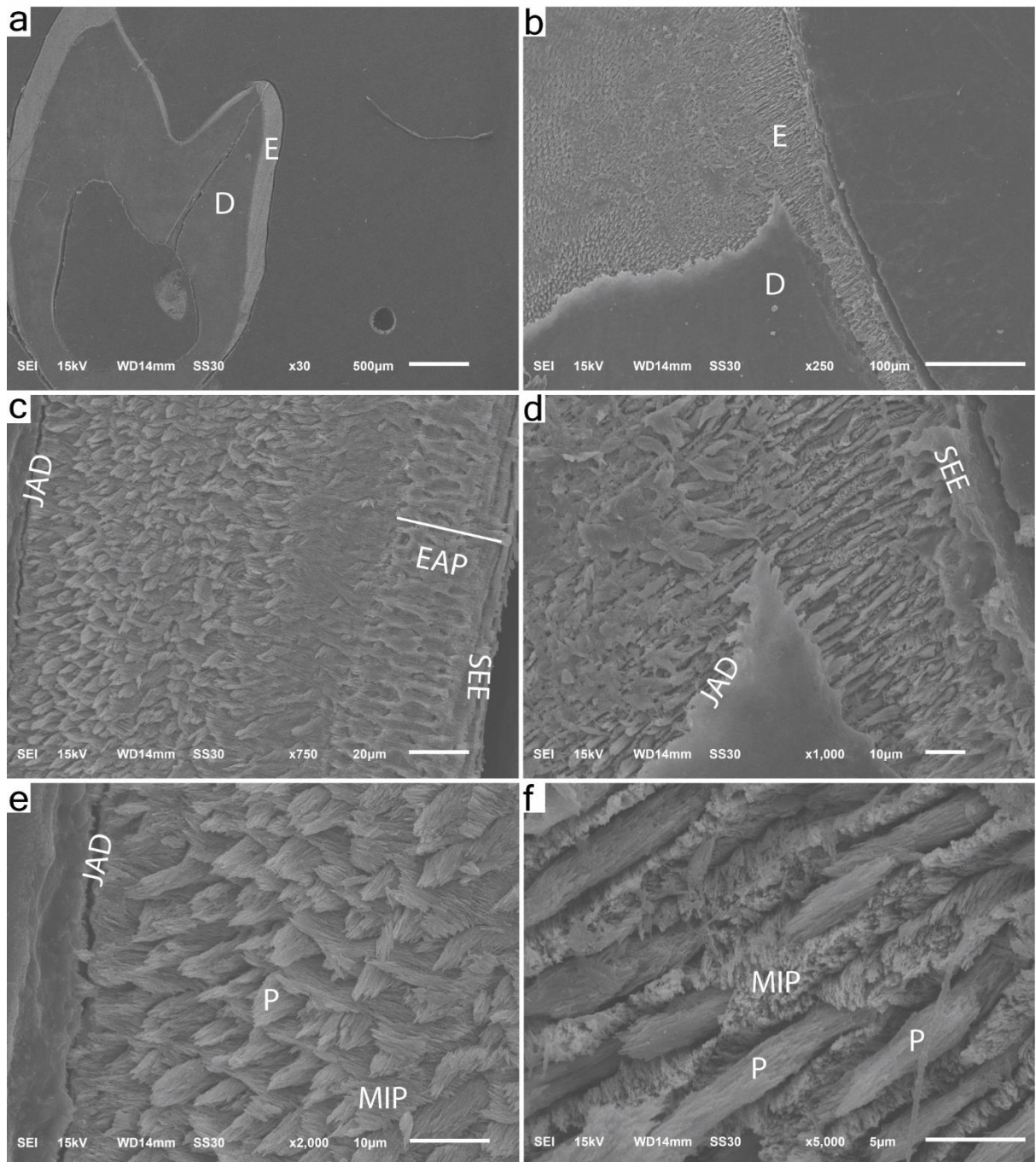


Figura 1. Corte longitudinal (vestíbulo-lingual) do dente de *Didelphis albiventris*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. Esmalte mais espesso nas laterais do que na parte interna da coroa (a-b). Esmalte na lateral do dente (c, e) possui camada mais interna aprismática (EAP) e camada com decussação irregular dos prismas (e). Esmalte na parte interna da coroa é formado por esmalte radial (d, f) com grande quantidade de matriz interprismática (MIP). E: esmalte; D: dentina; SEE: superfície externa do esmalte; JAD: junção amelodentinária; EAP: esmalte aprismático; MIP: matriz interprismática; P: prisma.

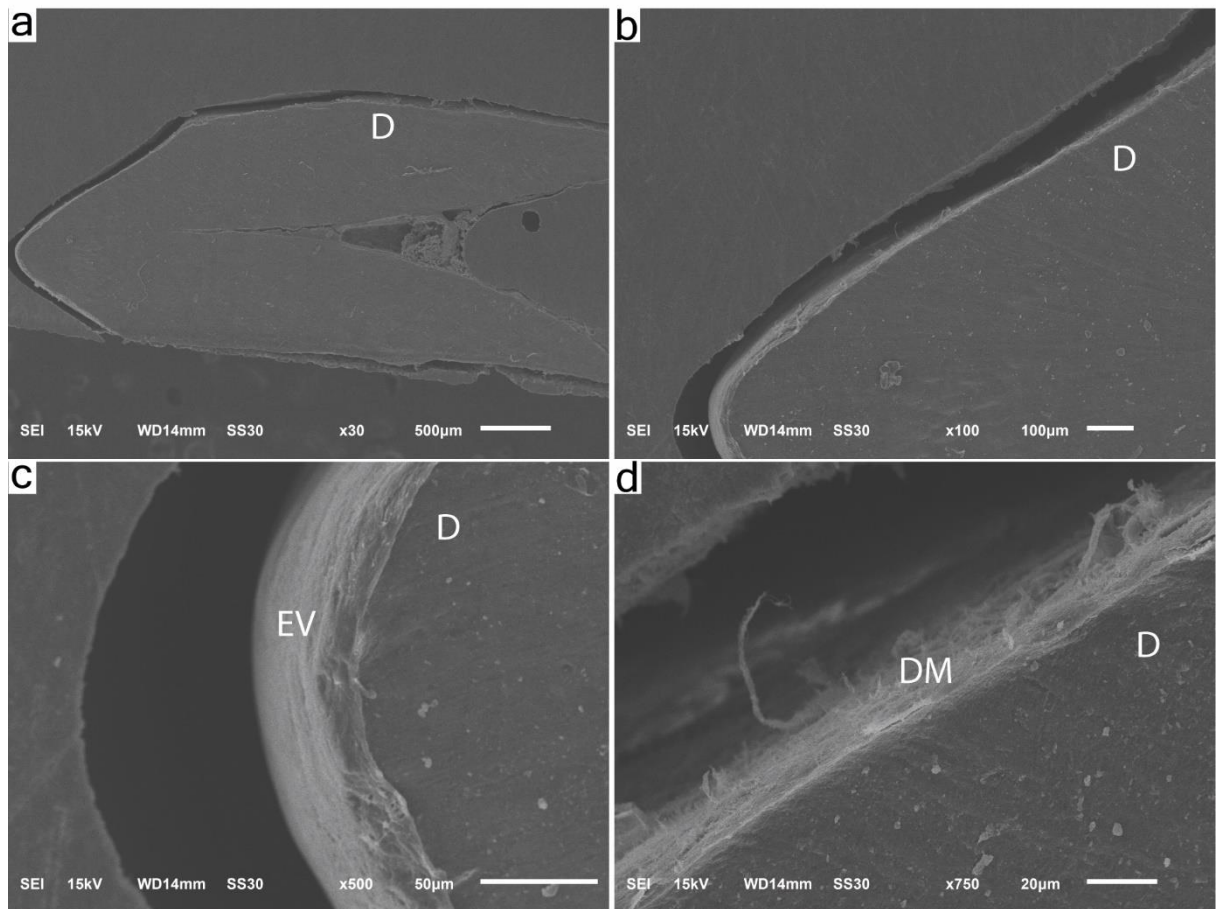


Figura 2. Corte longitudinal (vestíbulo-lingual) do dente de *Dasyurus novemcinctus*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. EV: esmalte vestigial; DM: depósito mineral; D: dentina.

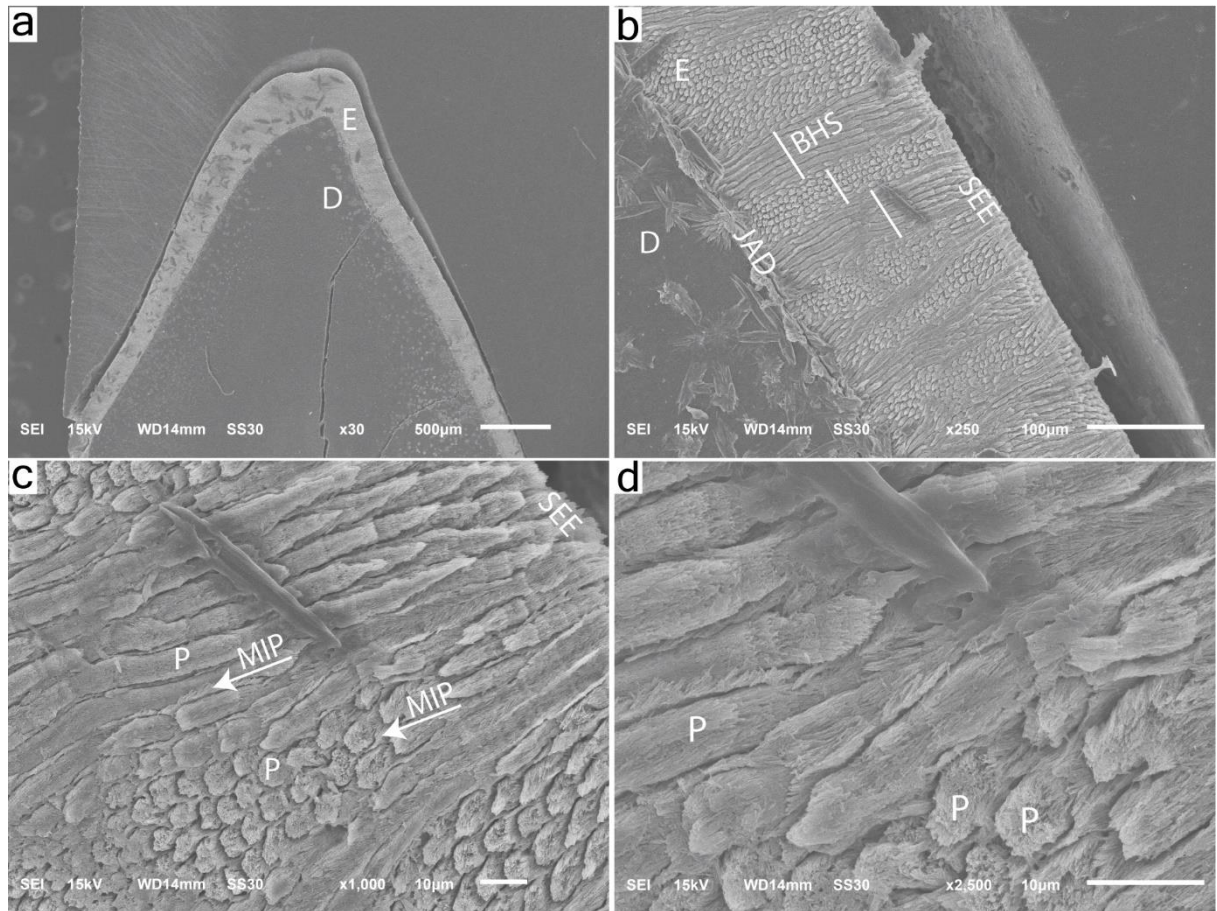


Figura 3. Corte longitudinal (vestíbulo-lingual) do dente de *Felis catus*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. E: esmalte; D: dentina; SEE: superfície externa do esmalte; JAD: junção amelodentinária; BHS: Bandas de Hunter-Scheger MIP: matriz interprismática; P: prisma.

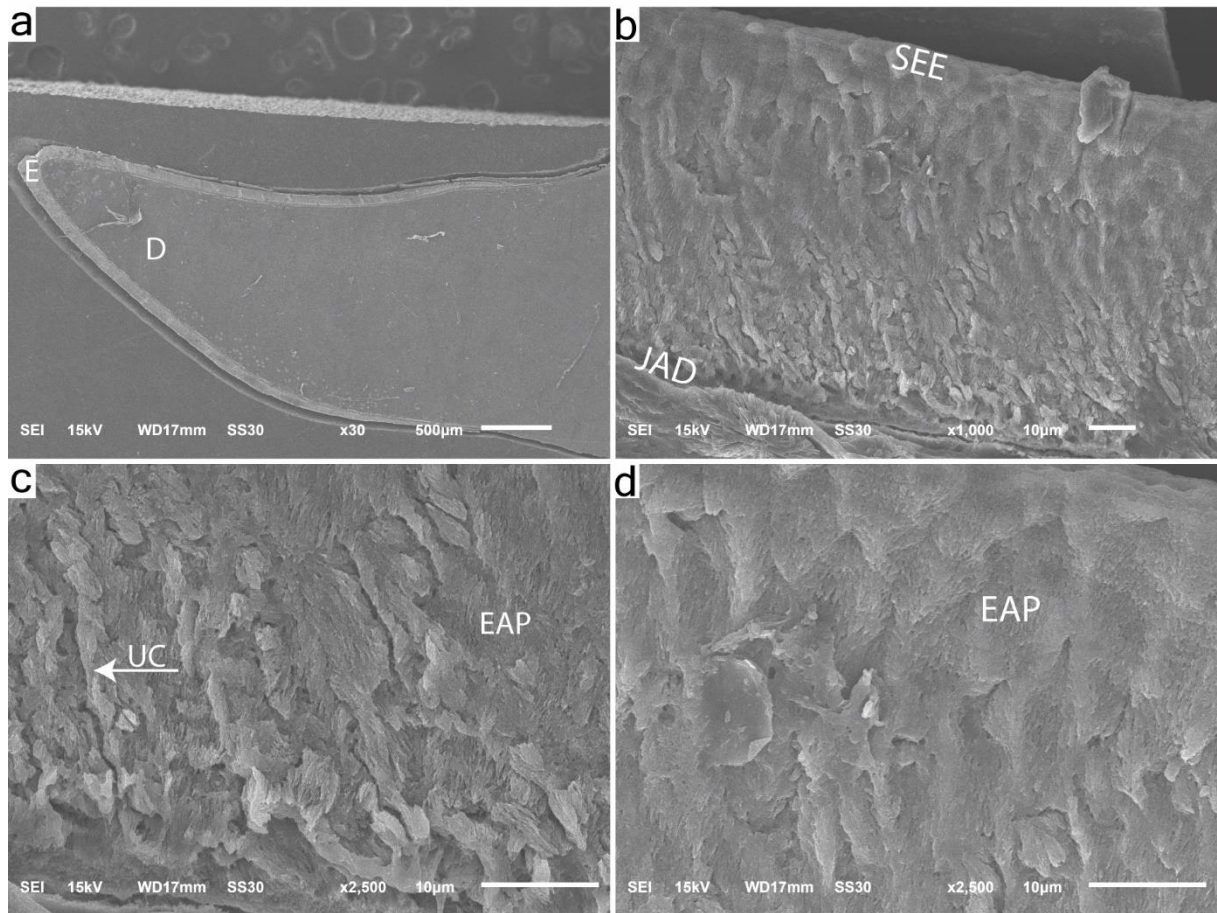


Figura 4. Corte longitudinal (vestíbulo-lingual) do dente de *Pontoporia blainvillei*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. E: esmalte; D: dentina; SEE: superfície externa do esmalte; JAD: junção amelodentinária; EAP: esmalte aprismático; UC: unidades colunares.

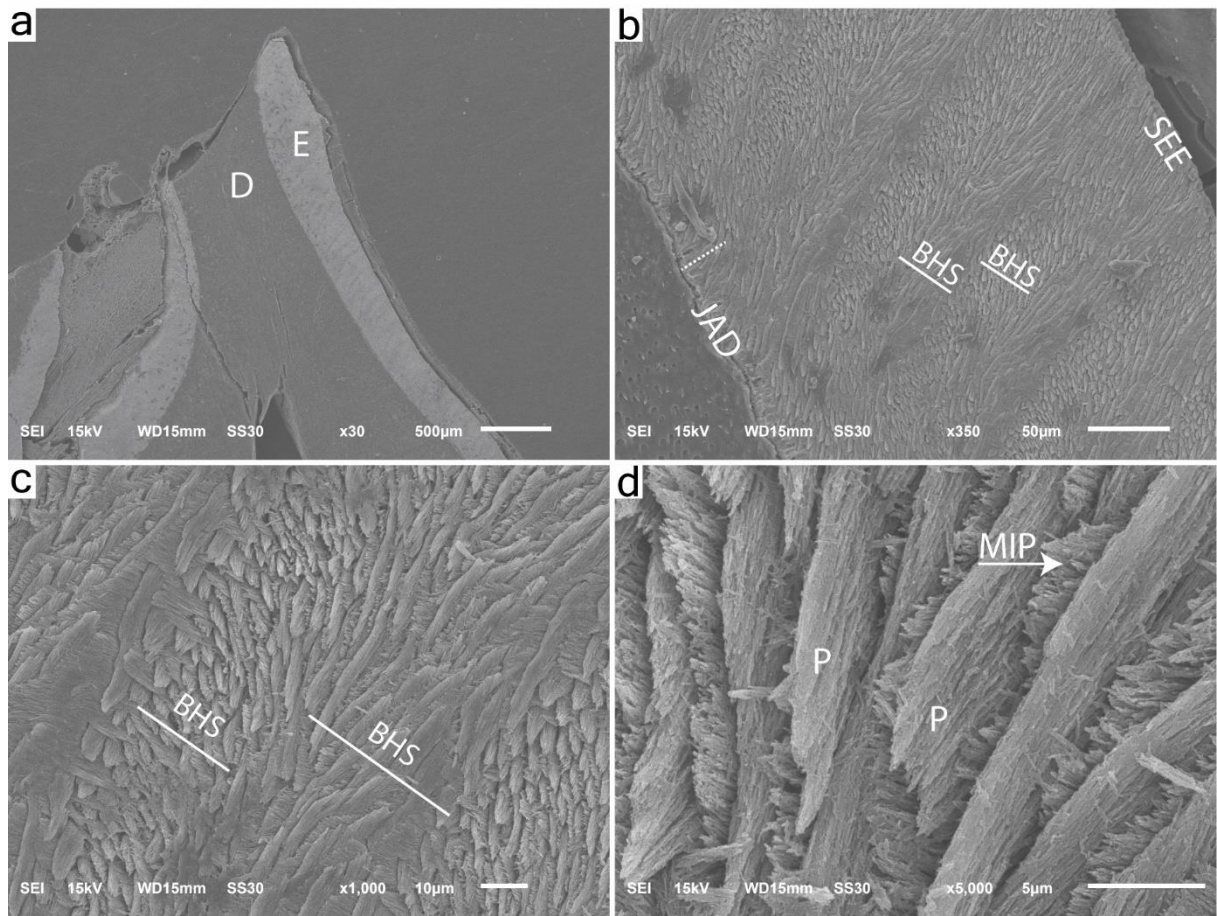


Figura 5. Corte longitudinal (vestíbulo-lingual) do dente de *Subulo gouazoubira*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. A linha pontilhada próxima à JAD indica a região de esmalte radial. E: esmalte; D: dentina; SEE: superfície externa do esmalte; JAD: junção amelodentinária; BHS: Bandas de Hunter-Scheger MIP: matriz interprismática; P: prisma.

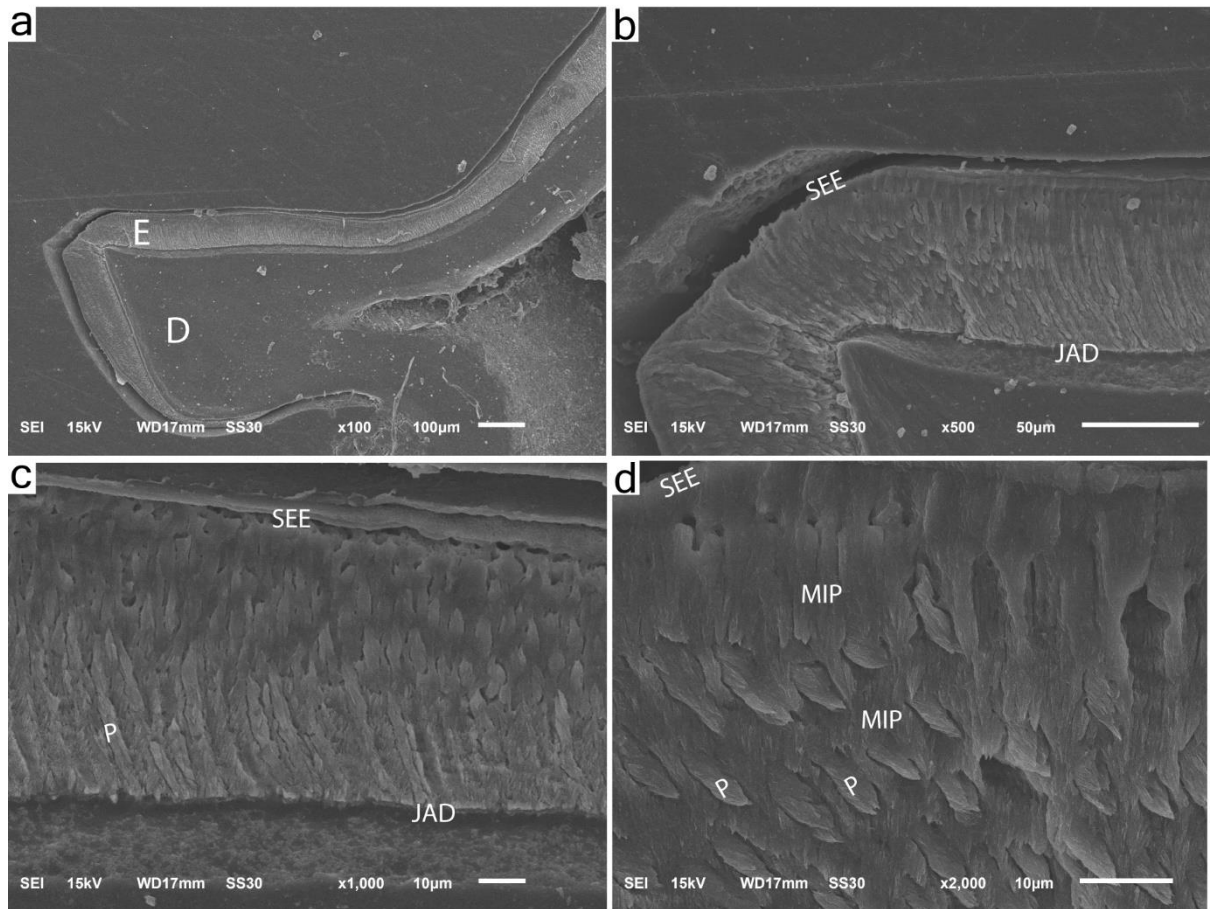


Figura 6. Corte longitudinal (vestíbulo-lingual) do dente de *Artibeus* sp. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. E: esmalte; D: dentina; SEE: superfície externa do esmalte; JAD: junção amelodentinária; MIP: matriz interprismática; P: prisma.

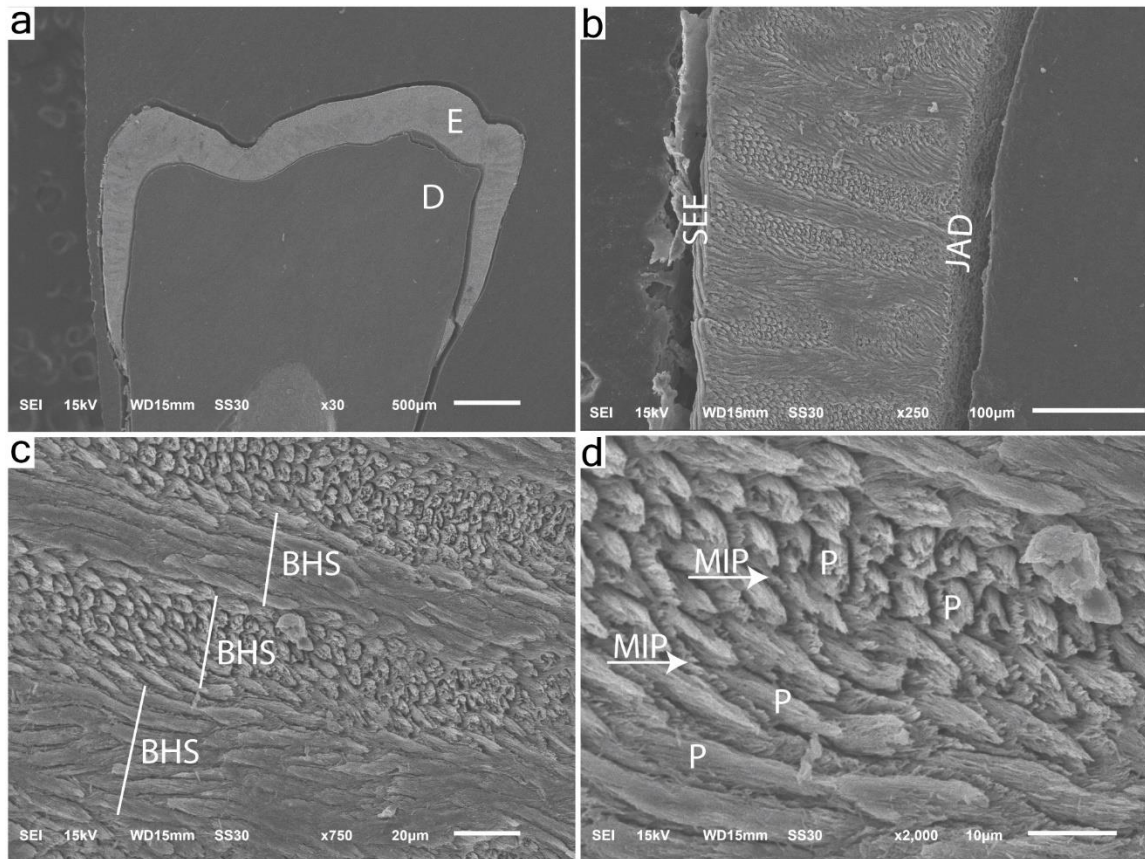


Figura 7. Corte longitudinal (vestíbulo-lingual) do dente de *Sapajus* sp. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. E: esmalte; D: dentina; SEE: superfície externa do esmalte; JAD: junção amelodentinária; BHS: Bandas de Hunter-Scheger MIP: matriz interprismática; P: prisma.

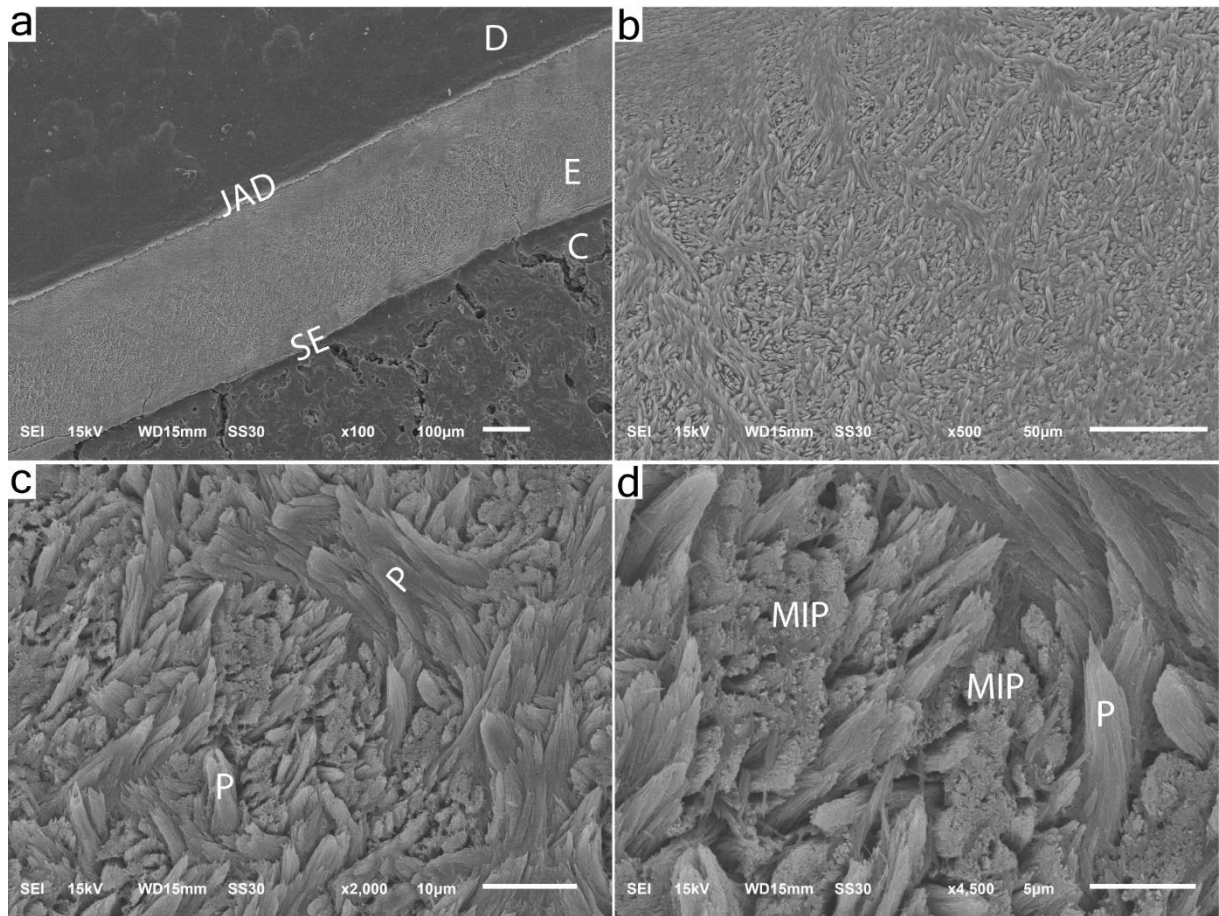


Figura 8. Corte longitudinal (vestíbulo-lingual) do dente de *Hydrochoerus hydrochaeris*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. E: esmalte; D: dentina; C: cimento; SE: superfície do esmalte; JAD: junção amelodentinária; MIP: matriz interprismática; P: prisma.

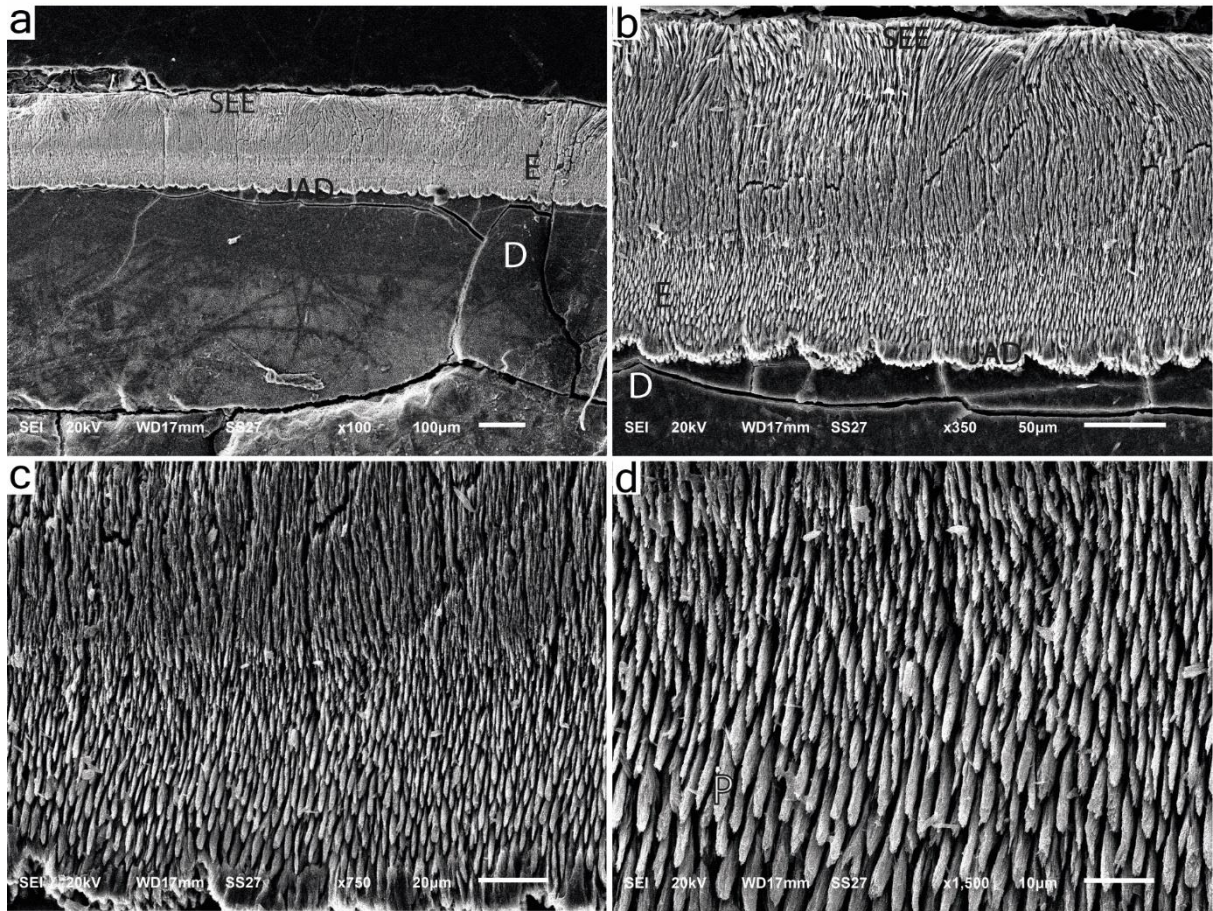


Figura 9. Corte transversal do dente de *Neoepiblema* sp. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. E: esmalte; D: dentina; SEE: superfície externa do esmalte; JAD: junção amelodentinária; P: prisma.

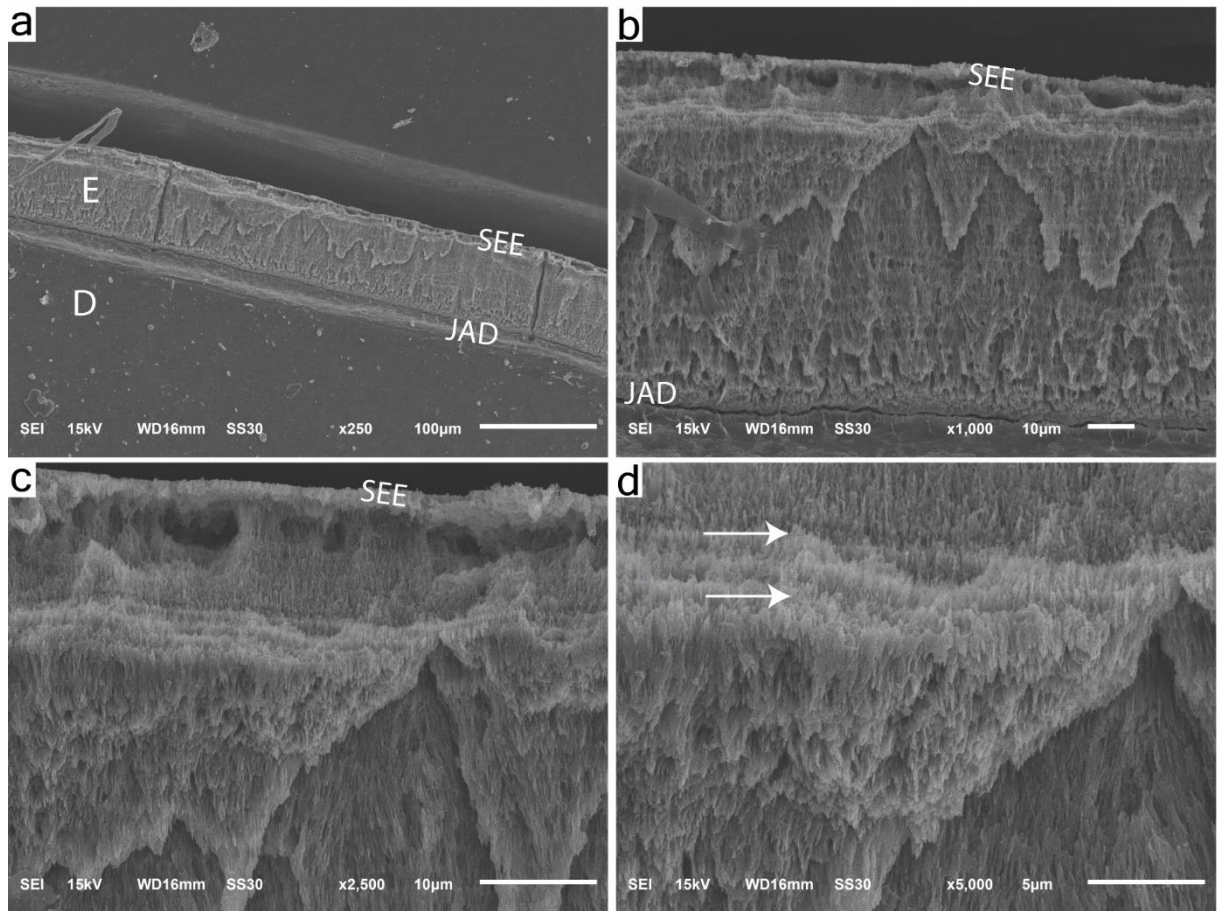


Figura 10. Corte longitudinal (vestíbulo-lingual) do dente de *Caiman latirostris*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. As setas indicam as linhas incrementais do esmalte. E: esmalte; D: dentina; SEE: superfície externa do esmalte; JAD: junção amelodentinária.

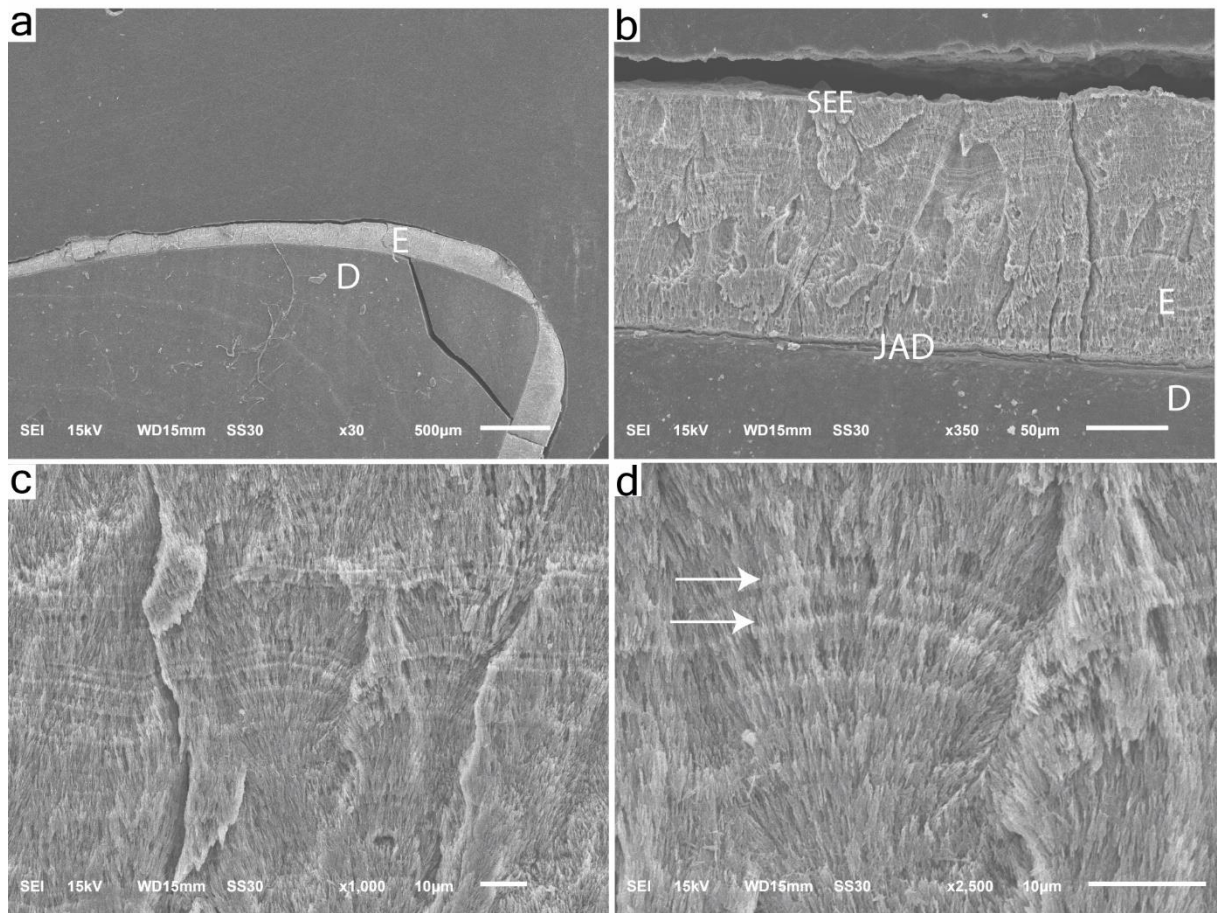


Figura 11. Corte longitudinal (vestíbulo-lingual) do dente de *Melanosuchus niger*. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. As setas indicam as linhas incrementais do esmalte. E: esmalte; D: dentina; SEE: superfície externa do esmalte; JAD: junção amelodentinária.

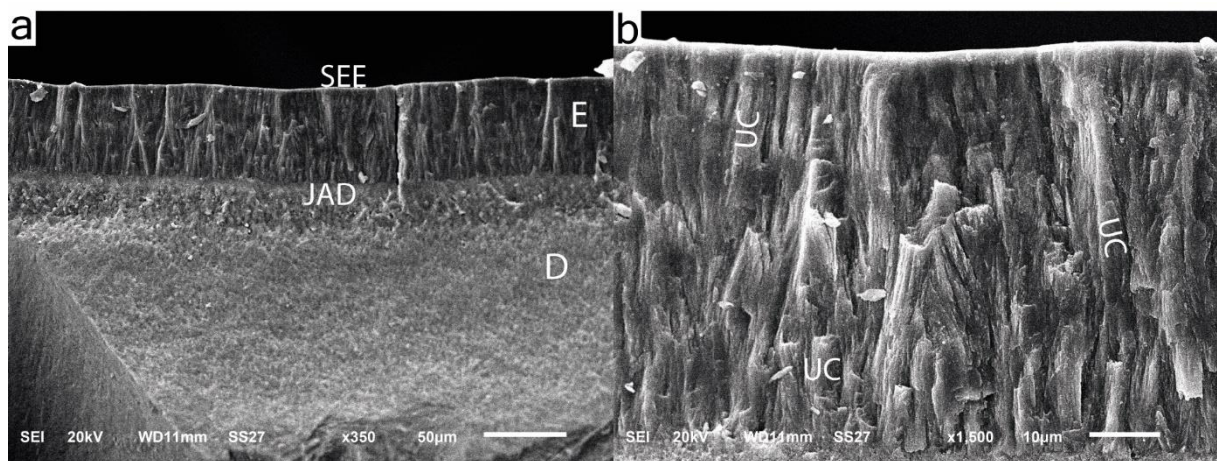


Figura 12. Corte transversal do dente de *Purussaurus* sp. Microfotografia obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. E: esmalte; D: dentina; SEE: superfície externa do esmalte; JAD: junção amelodentinária; UC: unidades colunares.

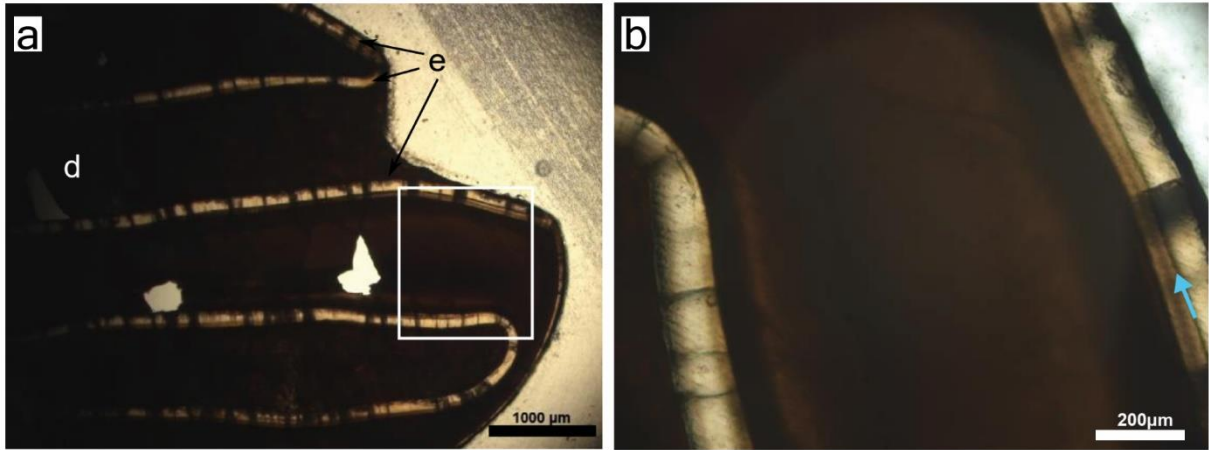


Figura 13. Microfotografias do corte histológico (transversal) de *Neoeptibema* sp. sob microscopia de luz. As imagens mostram que o esmalte dentário (e) é translúcido, enquanto a dentina (d) é escura e opaca. A seta azul indica a linha incremental bastante pronunciada.

LITERATURA CITADA

- ARMPFIELD, B. A. et al. Development and evolution of the unique cetacean dentition. *PeerJ* 1:e24, 2013. <https://doi.org/10.7717/peerj.24>
- AZEVEDO, N.; GOLDBERG, M. Post-natal development of tooth structures in *Didelphis albiventris*. *Journal de Biologie Buccale*, v. 15, n. 1, p. 23-35, mar. 1987. PMID: 2435710.
- BARTLETT, J. D. et al. MMP20-generated amelogenin cleavage products prevent formation of fan-shaped enamel malformations. *Sci Rep*, v. 11, p. 10570, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90005-z>
- BERKOVITZ, B.; SHELLIS, P. The teeth of non-mammalian vertebrates. Academic Press, 2016.
- CAMPOS, L. et al. Feeding habits of the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in southeastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 100, n. 2, p. 301-313, 2020. doi: 10.1017/S0025315420000120
- CIANCIO, M. R. et al. Estructura del esmalte en *Dasybus* (Xenarthra, Dasypodidae), consideraciones filogenéticas preliminares. XXIII JAM, Abstract nº 26, p. 89, 2010.
- CIANCIO, M. R. et al. When xenarthrans had enamel: insights on the evolution of their hypsodonty and paleontological support for independent evolution in armadillos. *Naturwissenschaften*, v. 101, p. 715–725, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00114-014-1208-9>
- CIANCIO, M. R. et al. Dental enamel structure in long-nosed armadillos (Xenarthra: *Dasybus*) and its evolutionary implications. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 192, n. 4, p. 1237–1252, Aug. 2021. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaa119>
- DELGADO, S. et al. Molecular evidence for Precambrian origin of amelogenin, the major protein of vertebrate enamel. *Molecular Biology and Evolution*, v. 18, n. 12, p. 2146–2153, Dec. 2001. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003760>
- GILKESON, C. F. Tubules in Australian marsupials. Tooth enamel microstructure, p. 137-161, 1997. Ba/kema, Rotterdam.
- HAUTIER, L. et al. The hidden teeth of sloths: evolutionary vestiges and the development of a simplified dentition. *Nature, Scientific Reports*, 6 (27763): 1-9, 2016.
- ISHIYAMA, M. Enamel structure in odontocete whales. *Scanning Microscopy*: vol 1, n. 3, article 22, 1987. Disponível em: <https://digitalcommons.usu.edu/microscopy/vol1/iss3/22/>
- KERBER, L.; NEGRÍ, F. R.; SANFELÍCE, D. Morphology of cheek teeth and dental replacement in the extinct rodent *Neoeptiblema* Ameghino, 1889 (Caviomorpha, Chinchilloidea, Neoeptiblemidae). *Journal of Vertebrate Paleontology*, v. 38, n. 6, p. e1549061, 2018. DOI: 10.1080/02724634.2018.1549061
- KAWASAKI, K.; WEISS, K. M. Mineralized tissue and vertebrate evolution: The secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *PNAS*, v. 100, n. 7, p. 4060-4065, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0638023100>

KAY, R. F. et al. Revised geochronology of the Casamayoran South American land mammal age: climatic and biotic interpretations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 96, p. 13235-13240, 1999.

KOZAWA, Y. et al. The function and structure of the marsupial enamel. *Connective Tissue Research*, v. 39, n. 1-3, p. 215-217, 1998. DOI: 10.3109/03008209809023929

KOENIGSWALD, W. Specialized wear facets and late ontogeny in mammalian dentitions. *Historical Biology*, v. 30, n. 1-2, p. 7-29, 2018. DOI: 10.1080/08912963.2016.1256399

KOENIGSWALD, W. et al. Brief survey of enamel diversity at the Schmelzmuster level in Cenozoic placental mammals. *Tooth enamel microstructure*, p. 137-161, 1997. CRC Press. ISBN 9781003077930

KOENIGSWALD, W.; CLEMENS, W. A. Levels of complexity in the microstructure of mammalian enamel and their application in studies of systematics. *Scanning Microscopy*, v. 6, n. 1, p. 16, 1992. Available at: <https://digitalcommons.usu.edu/microscopy/vol6/iss1/16>

KOENIGSWALD, W.; GOIN, F. Enamel differentiation in South American marsupials and a comparison of placental and marsupial enamel. *Palaeontographica Abt. A*. 255, Lgf. 4-6, 129-168, 2000.

KOENIGSWALD, W.; SANDER, P. M. Glossary of terms used for enamel microstructure. *Tooth Enamel Microstructure: Proceedings of the enamel microstructure workshop*, University of Bonn, Andernach, Rhine, 24-28 July 1997.

KOENIGSWALD, W.; SANDER, P. M. (Ed.). *Tooth enamel microstructure: Proceedings of the enamel microstructure workshop*, University of Bonn, Andernach, Rhine, 24-28 July 1997. CRC Press, 2020.

KOENIGSWALD, W.; PFRETZSCHNER, H. U. Biomechanics in the Enamel of Mammalian Teeth. In: SCHMIDT-KITTLER, N.; VOGEL, K. (Ed.). *Constructional Morphology and Evolution*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1991. https://doi.org/10.1007/978-3-642-76156-0_9

LESTER, K. S. On the nature of “fibrils” and tubules in developing enamel of the opossum, *Didelphis marsupialis*. *Journal of Ultrastructure Research*, v. 30, n. 1-2, p. 64-77, 1970. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(70\)90064-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(70)90064-X)

LESTER, K. S.; BOYDE, A.; GILKESON, C.; ARCHER, M. Marsupial and monotreme enamel structure. *Scanning Microsc*, Mar;1(1):401-20, 1987 PMID: 3589612.

LESTER, K. S.; HAND, S. J. Chiropteran enamel structure. *Scanning Microscopy*, v. 1, n. 1, p. 37, 1986. Available at: <https://digitalcommons.usu.edu/microscopy/vol1/iss1/37>

LINE, S. R. P. Incremental markings of enamel in ectothermal vertebrates. *Archives of Oral Biology*, v. 45, p. 363-368, 2000.

LOCH, C. et al. Ultrastructure of enamel and dentine in extant dolphins (Cetacea: Delphinoidea and Iniioidea). *Zoomorphology*, 132, 215 – 225, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00435-012-0180-1>

LU, X. et al. Ameloblastin-rich enamel matrix favors short and randomly oriented apatite

crystals. *European Journal of Oral Sciences*, v. 119, p. 254-260, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00905.x>

MARIVAUX, L. et al. Incisor enamel microstructure of West Indian caviomorph hystricognathous rodents (Octodontoidea and Chinchilloidea). *Journal of mammalian evolution*, v. 29, n. 4, p. 969-995, 2022.

MEREDITH, R. W. et al. Molecular decay of the tooth gene enamelin (ENAM) mirrors the loss of enamel in the fossil record of placental mammals. *PLoS Genet*, v. 5, p. 1-12, 2009.

MJÖR, I. A.; FEJERSKOV, O. *Human oral embryology and histology*. Munksgaard, Conhagen, Dinamarca. 1986.

OSBORN, J. W. The relationship between prisms and enamel tubules in the teeth of *Didelphis marsupialis*, and the probable origin of the tubules. *Archives of Oral Biology*, v. 19, n. 10, p. 835-IN5, 1974. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(74\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0003-9969(74)90044-2).

SANDER, P. M. Prismless enamel in amniotes: terminology, function, and evolution. *Development, function and evolution of teeth*, p. 92-106, 2000.

SIMPSON, G. G. Enamel on the teeth of an Eocene edentate. *Am Mus Novit*, v. 567, p. 1-4, 1932.

SOUZA-FILHO, J.P. et al. A new caimanine (Crocodylia, Alligatoroidea) species from the Solimões Formation of Brazil and the phylogeny of Caimaninae. *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 38, issue 5, 2018. <https://doi.org/10.1080/02724634.2018.1528450>

STEEMAN, S. E. et al. Radiation of extant cetaceans driven by restructuring of the oceans. *Systematic Biology*, Volume 58, Issue 6, 2009. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp060>

STERN, D. et al. Enamel ultrastructure and masticatory function in molars of the American opossum, *Didelphis virginiana*. *Zoological Journal of Linnean Society*, v. 95, p. 331-334, 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1989.tb02314.x>

WERTH, A. J. et al. Feeding in marine mammals. *Feeding: form, function and evolution in tetrapod vertebrates*, v. 475, p. 514, 2000.

WOOD, C. B. et al. New studies of enamel microstructure in Mesozoic mammals: a review of enamel prisms as a mammalian synapomorphy. *Journal of Mammalian Evolution*, v. 6, p. 177-213, 1999. <https://doi.org/10.1023/A:1020624222324>