DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO
Cirurgiã-Dentista

BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE INCISIVOS DE CAMUNDONGOS EM ERUPÇÃO DESIMPEDIDA E RETARDADA PELA VIMBLASTINA. ESTUDO RADIOAUTOGRÁFICO ATRAVÉS DA INCORPORAÇÃO DE ^{3}H-GLICINA.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia na Área de Biologia e Patologia Buco-Dental.

P I R A C I C A B A
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL
1 9 9 0

T639b
12557/BC

BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE INCISIVOS DE CAMUNDONGOS EM ERUPÇÃO DESIMPEDIDA E RETARDADA PELA VIMBLASTINA. ESTUDO RADIOAUTOGRÁFICO ATRAVÉS DA INCORPORAÇÃO DE ^{3}H-GLICINA.

DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO

Cirurgiã-Dentista

Este exemplar foi devidamente corrigido conforme resolução CCPG/086/93

6/7/6/90

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ MERZEL

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia na Área de Biologia e Patologia Buco-Dental.

P I R A C I C A B A

ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

1 9 9 0

Aos meus Pais,

FRANCISCO AUGUSTO (*in Memoriam*)

e **CONCEIÇÃO APARECIDA,**

pela instrução que me proporcionaram,

sem medir esforços ou sacrifícios.

Ao meu esposo **GERALDO ANTONIO,**

pela compreensão, apoio e incentivo.

Às minhas filhas:

DENISE CRISTINA e

DEBORA HELENA,

com amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. JOSÉ MERZEL, Professor Titular do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela orientação deste trabalho.

A **DEUS**, por me conceder capacidade física e mental para atingir os meus objetivos.

À Professora Doutora **TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELLO**, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco- Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelos conselhos e pela amizade que nos envolve.

Ao Professor Doutor **CÁSSIO ODNEI GARCIA MUNHOZ**, pela valiosa colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor **GUILHERME BLUMEN**, pelo companheirismo de várias décadas, e pela colaboração na técnica radioautográfica.

Aos Professores Doutores **MATHIAS VITTI**, **FAUSTO BÉRZIN** e **CARLOS ROBERTO HOPPE FORTINGUERRA**, pela amizade e apoio que sempre me dedicaram.

À Professora Doutora **SONIA VIEIRA**, do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela realização da análise estatística.

Aos Senhores **IVES ANTONIO CORAZZA** e **ALEXANDRE ROCHA ARBEX**, do Centro de Processamento de Dados da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo trabalho computacional e de impressão.

À Senhora **MARIA APARECIDA NALIN** e Senhorita **SUZETE REGINA DE BARROS TOBIAS**, pelos trabalhos de digitação.

À Senhorita **ELIENE APARECIDA ORSINI NARVAES** e **IVANI ODAS DEMETRIO** pela assistência junto ao Laboratório de Histologia.

À Senhora **MARIA APARECIDA VARELLA**, pela assistência junto ao Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Ao Senhor **MESSIAS SALVADOR DE LIMA**, pela cooperação junto ao biotério.

Aos Senhores **ADARIO CANGIANI** e **PEDRO SERGIO JUSTINO**, pela realização da documentação fotográfica.

Ao Senhor **MARCOS ANTONIO RAPETTI**, pela confecção dos gráficos em micro-computador.

Às Senhoras **SUELI DUARTE de OLIVEIRA SOLIANI** e **JUREMA FERRAZ CARDOSO**, pelos trabalhos de organização da bibliografia.

Ao Laboratório **ELI LILLY DO BRASIL**, pela doação da vimblastina (VELBAN).

Aos meus amigos que estiveram comigo nesta jornada e a todos que acreditam na pesquisa básica, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido graças ao auxílio da **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)** ao Dr. **JOSÉ MERZEL** (Proc. 81/0566-1 e 88-0147-0).

ÍNDICE

Página

INTRODUÇÃO 1

MATERIAL E MÉTODOS 11

Efeitos da Vimblastina na Taxa de Erupção 12

Efeitos da Vimblastina na Biossíntese de Proteínas 14

RESULTADOS 17

Taxa de Erupção 18

Incorporação de ^{3}H-Glicina 22

DISCUSSÃO 32

RESUMO 42

SUMMARY 45

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Erupção dental é um dos movimentos fisiológicos do dente caracterizado por sua migração axial, cujo mecanismo não está ainda esclarecido. As hipóteses sobre os fatores causais do processo podem ser divididas em duas categorias: a primeira associa esses fatores ao ligamento periodontal (LPD) e a segunda os relaciona com a formação e crescimento da raiz, crescimento do osso alveolar e proliferação das células pulpares (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982).

Estudos experimentais sobre erupção têm sido feitos, em sua maior parte, com dentes de crescimento contínuo, como os incisivos de roedores. A demonstração de que a remoção ou separação da porção basal ou odontogênica destes dentes não interrompe a erupção da porção distal ou incisal, chamou a atenção sobre o papel do LPD no processo eruptivo (BERKOVITZ & THOMAS, 1969; PITARU *et al.*, 1976). Várias drogas como a demecolcina, aminoacetonitrila, e hormônios como a tiroxina e hidrocortisona, têm os mesmos efeitos sobre incisivos normais ou separados de sua porção odontogênica. Em ambos os casos, as taxas de erupção são equivalentes. Sabendo-se que o crescimento da raiz, do osso alveolar e a proliferação de células pulpares dependem da porção odontogênica desses dentes, e que a erupção é independente dessa porção, pôde-se concluir que a erupção dental está fundamentalmente associada ao LPD (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982).

O processo eruptivo parece ser multifatorial. MOXHAM & BERKOVITZ (1983) descrevem 4 fatores: o mecanismo gerador da força capaz de extruir o dente; a translação desta força em movimento que deve inclusive vencer a resistência que lhe oferecem os vários tecidos do ligamento e mucosa oral; a sustentação do dente numa nova posição à medida que o movimento se desenvolve; a renovação e remodelagem dos tecidos periodontais para a manutenção da integridade do sistema.

A maioria dos estudos recentes tem-se preocupado principalmente em determinar a taxa da erupção ou a força necessária para promover a extrusão dentária, ou ainda a paralização do movimento eruptivo em condições normais e experimentais. O retardo ou aceleração da velocidade da erupção provocados pela ação de drogas, de hormônios, de vitaminas, ou ainda por modificações de estrutura dental ou periodontal foram as condições experimentais mais usadas nesses estudos, cujo principal objetivo era o de esclarecer o mecanismo gerador da força eruptiva. Três hipóteses foram propostas para explicar a origem dessa força: i) contração do colágeno do LPD; ii) motilidade dos fibroblastos do ligamento; iii) pressões hidrostática e vascular no tecido periodontal (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982). Todas apresentam evidências experimentais a favor e contra.

A hipótese de contração do colágeno como gerador da força de erupção foi desenvolvida entre outros por THOMAS (1965, 1976), que sugeriu vários mecanismos bioquímicos para essa contração. Porém, nenhum desses mecanismos conseguiu ser demonstrado, a não ser em condições não fisiológicas, como aquecimento ou gran-

des concentrações de uréia, guanidina ou brometo de lítio (BAILEY, 1968; , 1976). A carência de vitamina C e excesso de cortisona, condições que alteram a síntese do colágeno, produzem efeitos antagônicos na erupção, a primeira retardando e a segunda acelerando

Experimentos com drogas latirogênicas que alteram as ligações cruzadas da molécula de colágeno, têm apresentado resultados contraditórios em relação aos seus efeitos sobre a erupção. BERKOVITZ *et al.* (1972), entre outros, mostraram que embora os dentes pudessem ser facilmente extraídos após a administração da droga, as taxas de erupção permaneceram praticamente inalteradas. Por outro lado, MAGNUSSON (1968) e GRANT *et al.* (1972) evidenciaram em molares de ratos e dentes permanentes de saguis, respectivamente, que no início dos movimentos eruptivos as fibras colágenas do ligamento não apresentavam orientação definida. Isso mostra a impossibilidade de se produzir uma força eruptiva efetiva (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982).

NESS (1967), baseado em dados da literatura, foi o primeiro a sugerir que os fibroblastos do LPD seriam capazes de gerar forças. Tem sido demonstrado que os fibroblastos do tecido de granulação se assemelham às fibras musculares lisas tanto em seus aspectos morfológicos (GABBIANI *et al.*, 1971) quanto em sua atividade contrátil (MAJNO *et al.*, 1971). Todavia, em relação aos fibroblastos do LPD não há evidência de que eles apresentem tais características. MOXHAM & BERKOVITZ (1982) e van den BRENK & STONE (1974) não conseguiram demonstrar qualquer efeito sobre o tecido conjuntivo não lesado de drogas que agem na contração da musculatura lisa. Apesar de AZUMA *et al.* (1975) terem distin-

guido no LPD uma sub-população de fibroblastos semelhantes às células musculares lisas (miofibroblastos), seus achados não foram confirmados (TEN CATE, 1972; BEERTSEN *et al.*, 1974; GARANT, 1976; SHORE *et al.*, 1979).

Além da contratilidade, NESS (1970) e BEERTSEN *et al.* (1974) sugerem que a migração dos fibroblastos do LPD em direção oclusal tracionaria o dente através das fibras colágenas, erupcionando-o. ZAJICEK (1974), estudando a migração dos fibroblastos do LPD em faixas paralelas ao dente, demonstrou que na faixa de 10 a 20 μm do dente, esta migração era 3 vezes mais rápida do que a dos fibroblastos da faixa contígua ao dente que se moviam na mesma velocidade da erupção. Contudo, seria esta migração causa ou efeito da erupção? Segundo SHORE & BERKOVITZ (1978), ela poderia ser explicada pela deformação do ligamento durante a migração.

Segundo MOXHAM & BERKOVITZ (1982), as tentativas de apoio à hipótese da migração dos fibroblastos através do emprego de drogas antimicrotubulares como a colchicina, que retardam a erupção, mostraram-se ineficientes, uma vez que os efeitos destas drogas são múltiplos.

BELLOWS *et al.* (1983) reproduziram *in vitro* um modelo simulando a erupção dental que consistia em pequenos recipientes circulares revestidos de agarose, telinhas de arame e segmentos de raízes descalcificadas de incisivos de macacos e molares de porcos, representando respectivamente os alvéolos, osso alveolar e dente em erupção. Estes recipientes eram preenchidos com um gel contendo cultura de fibroblastos e/ou colágeno,

extraídos do LPD daqueles dentes. Desse experimento, os autores puderam observar que as forças eruptivas residem no LPD, e que a provável contração dos fibroblastos deste ligamento seria a responsável pela geração destas forças, porém, coadjuvada pela tensão produzida pelas fibras colágenas, mostrando que os movimentos eruptivos são células e fibras dependentes. Os autores ainda introduziram naquele meio de cultura drogas antimicrotubulares como a colcemida e citocalasina B, e observaram que, dependendo da concentração dessas drogas, a inibição da contração dos fibroblastos era nula, pouca ou total.

A pressão hidrostática como força eruptiva foi aventada no início do século sem qualquer base experimental. A idéia foi desenvolvida por NESS & SMALE (1959) que sugeriram como força eruptiva a pressão hidrostática do líquido tissular dos tecidos conjuntivos dentais. Este líquido está intimamente associado à substância fundamental, a qual, segundo GUYTON (1972), quando isolada e em meio eletrolítico, aumenta de volume em 30 a 50%, exercendo considerável pressão. Para consubstanciar esta hipótese, teria que haver um gradiente de pressão ao longo do ligamento para que a força resultante movesse o dente para fora do alvéolo. Porém, as pressões intrateciduais não foram suficientemente estudadas (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982). A evidência mais concreta deste gradiente é o diferencial de pressão intrapulpar entre o dente decíduo e o permanente que está erupcionando que atinge 23 ± 6 mm Hg acima da pressão atmosférica neste último, enquanto é cêrca de 10 ± 5 mm Hg acima da pressão atmosférica no primeiro, originando uma força de aproximadamente 15 g (~ 0,15 N)

(van HASSEL & McMINN, 1972).

Há ainda evidências experimentais de que os movimentos eruptivos se alteram com mudanças de pressão arterial, ou são sincrônicos com o pulso arterial (MOXHAM, 1979a).

Tanto estas indicações sobre pressão arterial, simpatectomia, bem como as de uso de drogas vaso-ativas, têm apresentado resultados contraditórios na literatura (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982). Contudo, os trabalhos de MOXHAM (1978, 1979b) & MYHRE *et al.* (1979), mostraram que em tempos curtos após a simpatectomia ou administração daquelas drogas a erupção é alterada, desde que se faça um registro contínuo do movimento.

Segundo MOXHAM & BERKOVITZ (1982) os experimentos anteriormente citados são bastante consistentes com a hipótese da pressão vascular ou tecidual como força geradora de erupção, entretanto, maiores investigações são necessárias para esclarecer o mecanismo envolvendo a fisiologia vascular, a determinação das pressões teciduais e o estudo da atividade metabólica dos tecidos dentais.

Considerando-se de um lado a existência de agentes químicos, que produzem efeitos diferentes e significantes sobre a erupção dental de incisivos de crescimento contínuo, e de outro que a erupção é resultante de um processo multifatorial, é possível assumir-se que diferentes agentes podem afetar diferentes fatores. Baseados nesta premissa, MOXHAM & BERKOVITZ (1980) tentaram averiguar se a erupção era multifatorial através de experimentos envolvendo administração combinada de drogas como a hidrocortisona, tiroxina e ciclofosfamida. Eles observaram que a

tiroxina e a hidrocortisona sozinhas aumentavam as taxas de erupção desimpedida (onde a coroa do dente é reduzida e tirada da oclusão) de incisivos de ratos, enquanto que a ciclofosfamida as decrescia. A combinação de ciclofosfamida e hidrocortisonanão produzia efeitos significantemente diferentes daqueles produzidos pela ciclofosfamida isolada. Os aumentos na taxa de erupção desimpedida associados à combinação de tiroxina e hidrocortisona bem como a associação com a ciclofosfamida, foram consistentes com a idéia de que o processo de erupção era multifatorial. Assim, a aceleração ou retardo na erupção podem não ser causados apenas pela alteração da força eruptiva. Qualquer das substâncias usadas nos estudos experimentais pode interferir nos processos ligados aos outros fatores da erupção acima descritos, podendo inclusive atuar em mais de um processo simultâneamente.

Entre as drogas usadas em experimentos sobre erupção, as antimicrotubulares como a colchicina (ou demecolcina) e a vimblastina provocam um retardo acentuado na taxa de erupção de incisivos de ratos tanto em condições normais de oclusão, denominada de erupção impedida, quanto em condições de erupção desimpedida (CHIBA *et al.*, 1980). A ação destas drogas é complexa, causando entre outras, alterações na proliferação celular e aumento da viscosidade do ácido hialurônico *in vitro* (CASTOR & PRINCE, 1964); redução da síntese do colágeno (BORNSTEIN, 1974); alteração da contratilidade do tecido de granulação (van den BRENK & STONE, 1974); e elevação da pressão sanguínea pela constrição arterial (FERGUSSON, 1952). Estas alterações podem ou servir de apoio para explicar qualquer dos hipotéticos mecanismos

geradores de força, ou então interferir nos processos ligados aos outros fatores de erupção.

Outro aspecto abordado em estudos sobre erupção é o metabolismo do colágeno do ligamento periodontal, cuja renovação é a mais rápida do organismo animal (CARNEIRO & FAVA DE MORAES, 1965; SODEK, 1977; ORLOWSKI, 1978). Fibras colágenas são os elementos mais abundantes desse tecido, e seu comportamento, como vimos, tem sido associado tanto à geração da força eruptiva quanto aos demais fatores envolvidos no processo eruptivo. Segundo RIPPIN (1978), a renovação do colágeno da região da crista óssea é acelerada em molares sem o contacto com o antagonista, cuja velocidade de erupção também é acelerada. De acordo com SODEK (1978), o metabolismo do colágeno em molares de ratos é bem mais acentuado que nos incisivos de erupção contínua, o que aparentemente contraria a sua relação com o mecanismo de erupção.

Mais recentemente, o metabolismo das proteínas não colágenas do ligamento tem atraído a atenção de vários investigadores. ORLOWSKI (1978) & SODEK (1978) mostraram que uma fração destas proteínas tem um metabolismo bastante ativo. Van den BOS & TONINO (1984) analisando bioquimicamente o conteúdo de colágeno, de glicosaminoglicanas sulfatadas e de proteínas não colágenas no LPD de incisivos de ratos em erupção impedida e desimpedida, observaram que existe uma maior quantidade de proteínas não colágenas na última condição, cuja erupção é também acelerada. TSE *et al.* (1988), através da incorporação de ^{3}H-glicina e radioautografia, mostraram um aumento da concentração de material protéico, provavelmente não colágeno, no ligamento de

incisivos de ratos com erupção retardada pela hemidescorticação.

Não foi encontrada na literatura nenhuma referência sobre estudos do metabolismo protéico em condições de erupção acelerada ou retardada por drogas ou outros agentes como hormônios e vitaminas. O presente trabalho, em que serão apresentados dados sobre a incorporação de ^{3}H-glicina visualizada através de radioautografia em dentes com erupção desimpedida e retardada pela vimblastina, faz parte de um projeto que pretende estudar sistematicamente o metabolismo protéico do ligamento em condições de erupção alterada por aqueles agentes.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

EFEITOS DA VIMBLASTINA NA TAXA DE ERUPÇÃO

Foram usados para o experimento 24 camundongos albinos Swiss machos adultos pesando entre 26,5 g e 36,0 g, e divididos por sorteio em 3 grupos de 8 animais cada, distribuídos em 3 gaiolas. Dois grupos foram tratados com vimblastina (V_1 e V_2) e o terceiro serviu de controle (C). Durante o período experimental, os animais receberam dieta sólida normal e água *ad libitum*.

Após a anestesia com hidrato de cloral a 10%, cada animal foi fixado a uma base própria, e os incisivos inferiores esquerdos (IIE) foram seccionados à altura da papila interdental por meio de um disco de carburundum, para que houvesse uma erupção desimpedida (Fig. 1).

No dia seguinte, injetou-se nos animais via intraperitoneal uma dose de 1 mg de vimblastina/Kg de peso corporal, diluída em soro fisiológico no grupo V_1, e uma dose de 2 mg/Kg de peso corporal no grupo V_2. No grupo C foi injetado 1,2 ml de soro fisiológico pela mesma via em volume aproximadamente correspondente ao aplicado nos animais tratados.

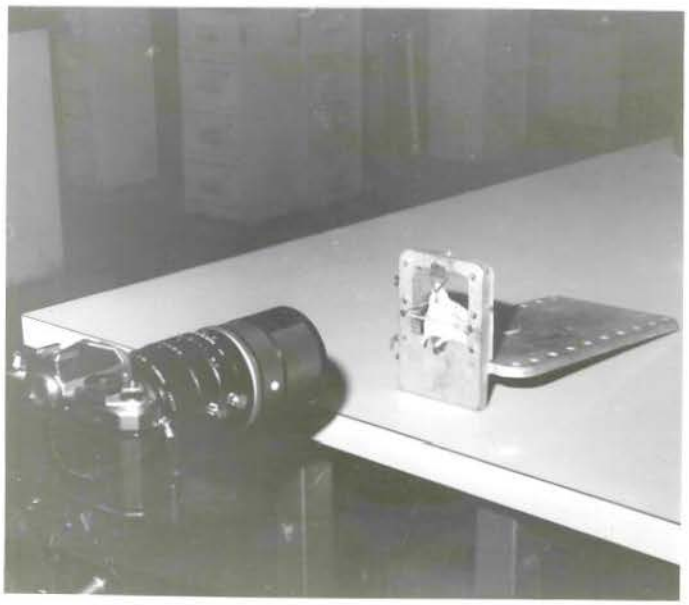


Figura 1-Dispositivo para fotografar os incisivos de camundongos composto de uma câmera Nikon com lente Medical Nikkor Auto, montado em tripé e um suporte para fixação da cabeça do animal anestesiado.

A medida da taxa de erupção foi feita através de método fotográfico semelhante ao preconizado por CHIBA *et al.* (1973). As tomadas fotográficas foram iniciadas no mesmo dia da aplicação da droga entre 8:00 h e 10:00 h, sempre com os animais sob anestesia, e repetidas 24, 48, 72 e 96 h após a injeção de vimblastina.

Os negativos foram projetados em uma tela com uma distância fixa. Tomando-se como referência a margem gengival, foi medido o comprimento do coto da coroa do IIE. A diferença do comprimento de um dia com o do dia anterior correspondeu à taxa de erupção diária.

A análise estatística foi feita através do teste de Tukey.

EFEITOS DA VIMBLASTINA NA BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS

Foram utilizados 48 camundongos albinos Swiss machos, adultos, pesando entre 22,5 g e 29,5 g.

Os animais foram pareados em gaiolas de acordo com seus pesos e em cada gaiola foi sorteado um animal controle (C) e outro tratado (T), ficando cada grupo com 24 animais. Durante todo o período experimental, os animais receberam dieta sólida normal e água *ad libitum*.

Os IIE de todos os animais foram seccionados à altura da papila interdental com um disco de carburundum para desimpedir a erupção, procedimento que foi repetido a cada 2 dias.

No quinto dia a partir do início do experimento, entre 9:00 e 10:00 h, injetou-se intraperitonealmente uma dose de 2 mg de vimblastina/Kg de peso corporal diluída em soro fisiológico nos animais do grupo T, e um volume equivalente de soro fisiológico nos animais do grupo C.

Decorrido 24 h da injeção de vimblastina, injetou-se intraperitonealmente uma dose de 5 μCi de ^{3}H-glicina/g de peso em 6 animais do grupo T e em 6 animais do grupo C, sendo 2 animais de cada grupo sacrificados 1, 3 e 6 h após a injeção do radioisótopo. Este procedimento foi repetido em 48, 72 e 96 h, respectivamente.

Sob anestesia com éter sulfúrico, os animais foram perfundidos com fixador de Karnowsky para perfusão (1965). As mandíbulas foram dissecadas, separadas em hemimandíbulas, e imersas no fixador de Karnowsky para imersão por mais 4 horas. Em seguida as peças foram lavadas e estocadas em tampão fosfato 0,2M, pH 7,2.

As hemimandíbulas esquerdas, contendo o incisivo em erupção desimpedida, foram descalcificadas em solução tamponada de EDTA (WARSHAWSKY & MOORE, 1967) com agitação constante a 4°C durante 30 dias, mantendo-se os espécimens suspensos no líquido.

Após a descalcificação as hemimandíbulas foram seccionadas transversalmente em 3 segmentos de comprimento semelhante compreendendo as porções basal, média e incisal do dente. Estes segmentos foram lavados em tampão fosfato pH 7,3; pós-fixados em ósmio a 1% em tampão fosfato; desidratados com acetona em concentrações crescentes; e incluídos em Epon 812 de modo

a obter-se cortes longitudinais.

Cortes semi-finos de 1 μm de espessura foram colhidos em lâminas e cobertos com emulsão nuclear Ilford K-5 (KOPRIWA & LEBLOND, 1962). Após exposição de 32 dias, as radioautografias foram reveladas, fixadas e coradas.

Os radioautogramas foram avaliados para determinar-se a concentração dos grãos de prata sobre fibroblastos e matriz extracelular do LPD, que em cada segmento foi dividido em 3 regiões: junto à dentina; junto ao osso alveolar; e uma região mediana entre as duas primeiras.

Seguindo-se a classificação de WARSHAWSKY & SMITH (1974), tomou-se como referência para as contagens no segmento basal as regiões do LPD situadas à altura correspondente aos ameloblastos pré-secretores e parte inicial da região de secreção do esmalte interno. No segmento médio, a contagem foi feita na região correspondente à de secreção do esmalte interno e parte do esmalte externo. No segmento incisal, a região de contagem correspondeu à da maturação do esmalte.

Com auxílio de uma ocular reticulada KPL-Zeiss de 10x10 quadrados, cada um medindo no sistema óptico utilizado 49 μm^2, contou-se 20 áreas para cada região em cada segmento.

Para controle, esta contagem foi repetida só no segmento basal em 100 áreas; nas regiões do LPD, junto à dentina e junto ao osso alveolar. Neste mesmo segmento, foram contados também os grãos de prata localizados na pré-dentina (PD) em 20 áreas de 49 μm^2. A análise estatística foi feita através do teste t de Student.

RESULTADOS

RESULTADOS

TAXA DE ERUPÇÃO

Nos grupos tratados (V_1 e V_2), houve a perda de um animal em cada grupo no 2°dia do experimento; e no controle também perdeu-se um animal no 3° dia.

Os resultados, como podem ser observados na tabela 1, mostram que a vimblastina administrada nos grupos tratados provocou um retardo na erupção dental em relação ao grupo controle.

A taxa de erupção dos animais do grupo controle mostrou-se estável nas primeiras 48 h; ligeiramente ascendente nas 72 h; e francamente ascendente nas 96 h (Fig. 2).

Os grupos tratados apresentaram um comportamento semelhante entre si. A taxa de erupção do grupo V_1 foi constante nos 4 períodos de tempo. O grupo V_2 apresentou uma pequena diminuição nas 24 e 72 h, em relação ao grupo V_1. Porém, esta diferença não apresentou valores estatisticamente significativos. A diferença entre a taxa de erupção do grupo V_1 em relação ao C só foi significante no 4° dia, enquanto que a taxa de V_2 foi também significante no 3° dia.

TABELA 1 - Taxa de erupção diária ($\bar{x} \pm s_x$) em mm do incisivo inferior esquerdo de camundongos em erupção desimpedida, vários tempos após a administração de vimblastina.

HORAS	GRUPO	TAXA DE ERUPÇÃO DIÁRIA
24	V_1 (n=8)	0,03 ± 0,012
	V_2 (n=8)	0,02 ± 0,014
	C (n=8)	0,04 ± 0,013
48	V_1 (n=7)	0,03 ± 0,021
	V_2 (n=7)	0,03 ± 0,012
	C (n=8)	0,04 ± 0,016
72	V_1 (n=7)	0,03 ± 0,013
	V_2 (n=7)	0,02 ± 0,014 *
	C (n=7)	0,05 ± 0,021
96	V_1 (n=7)	0,03 ± 0,017 *
	V_2 (n=7)	0,03 ± 0,015 *
	C (n=7)	0,07 ± 0,028

LEGENDA:

V_1 = grupo injetado com 1,0 mg de vimblastina/kg de peso corporal.

V_2 = grupo injetado com 2,0 mg de vimblastina/kg de peso corporal.

C = grupo injetado com volume correspondente de soro fisiológico.

* = valores significantes diferentes de C ($p < 0.05$).

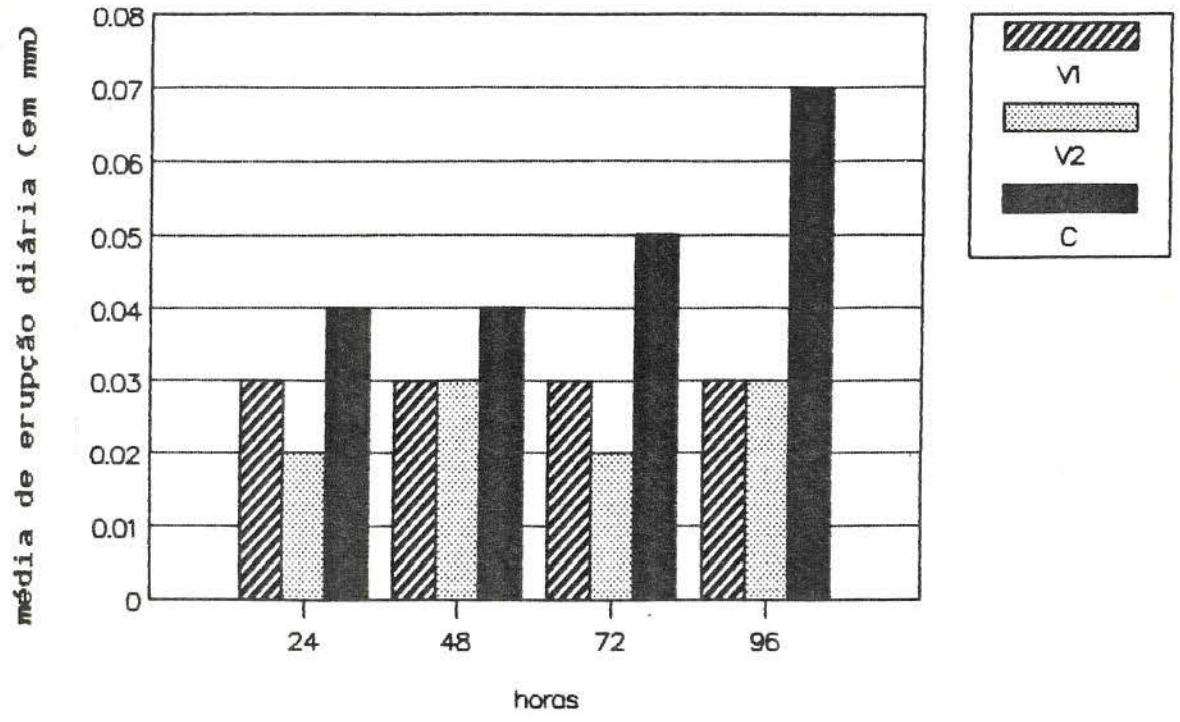


Figura 2 - Taxa de erupção em mm, do incisivo inferior esquerdo de camundongos em erupção desimpedida, vários tempos após a administração de vimblastina.

LEGENDA:

V_1 = Injetado com 1,0 mg de vimblastina/kg de peso corporal.

V_2 = Injetado com 2,0 mg de vimblastina/kg de peso corporal.

C = Injetado com sôro fisiológico em volume correspondente por kg de peso corporal.

O incisivo inferior esquerdo do grupo controle, após o período de 96 h atingiu praticamente sua altura normal, ao passo que os incisivos dos grupos V_1 e V_2 estão com a erupção retardada (Fig. 3).

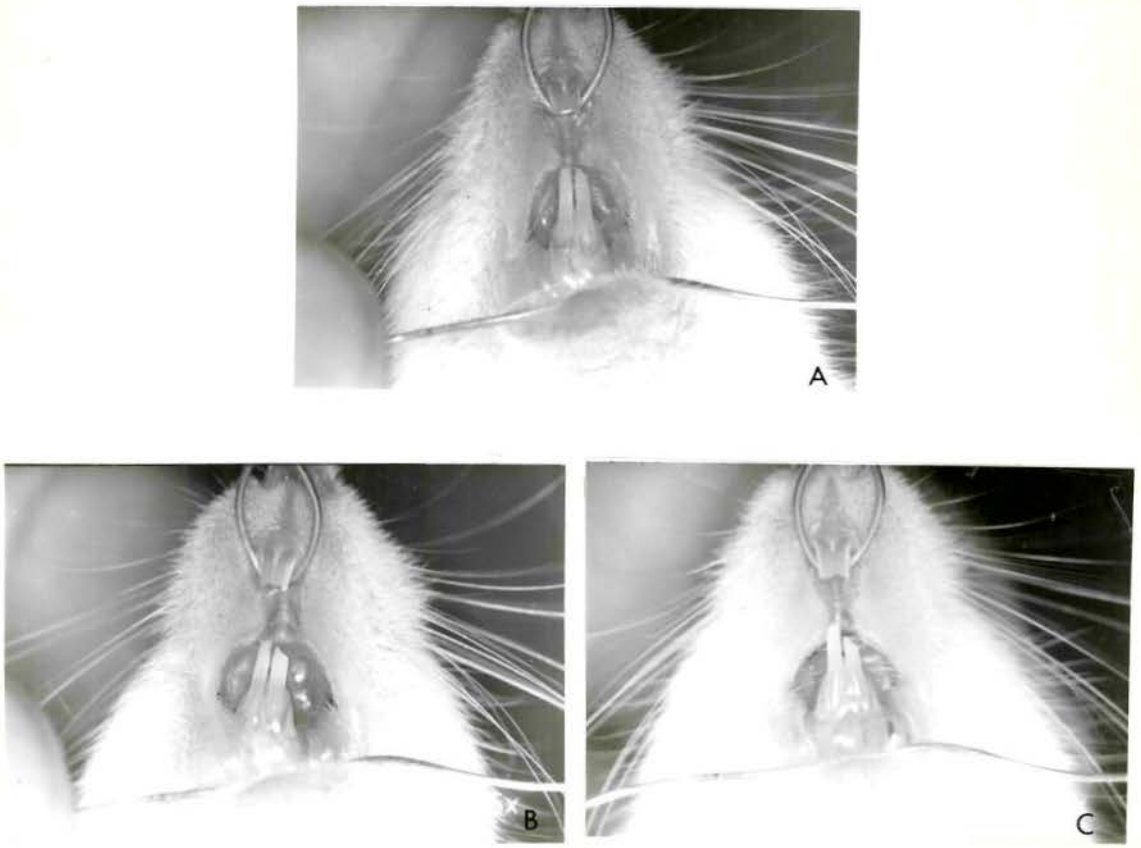


Figura 3-Incisivos inferiores de camundongos no 4º dia do experimento. Notar que o incisivo esquerdo do animal do grupo controle (A) praticamente atingiu sua altura normal enquanto os dos grupos tratados V_1 com 1 mg de Vimblastina/Kg - (B) e V_2 com 2 mg de Vimblastina/Kg - (C) estão com erupção retardada, mais acentuadamente em C. 1,5×

INCORPORAÇÃO DE ^{3}H-GLICINA

Durante o experimento foram perdidos 2 animais do grupo tratado e 1 do controle 72 h após a injeção de vimblastina, mais 1 animal em cada grupo foi perdido após 96 h.

À microscopia óptica não foi visualizada qualquer alteração morfológica das estruturas do ligamento periodontal (LPD) entre os animais tratados com vimblastina e seus controles. A disposição dos fibroblastos, bem evidenciados pelos seus núcleos, com seus longos eixos paralelos ao longo eixo do dente na região junto ao dente; oblíquos ou perpendiculares ao mesmo eixo na região junto ao osso alveolar; e elípticos e com disposição aparentemente desordenada na região intermediária, bem como a das fibras colágenas, cuja direção acompanha a dos fibroblastos, foram semelhante nos dois grupos. Da mesma forma, não foi observada qualquer alteração significativa nos vasos, que formam um rico plexo na região justa óssea.

Numa primeira análise feita após a contagem dos grãos de prata por unidade de área (980 μm^2) verificou-se que não havia diferença na concentração daqueles grãos no LPD dos animais sacrificados (1, 3 e 6 h), após a injeção do aminoácido marcado, razão pela qual os resultados obtidos das contagens destes intervalos foram agrupados para efeito de análise estatística, aumentando-se assim o número de repetições em cada tempo de ação da vimblastina.

A concentração dos grãos de prata, nas regiões junto ao dente, osso alveolar e intermediária nos três segmentos compreendendo as porções basal, média e incisal do dente (Tabela

2 - Fig.4) revelou que no tempo de 24 h após a administração de vimblastina, as médias dos 3 segmentos foi ligeiramente maior no grupo T em relação ao grupo C. Às 48 h houve uma inversão, sendo a média do grupo C ligeiramente maior. Às 72 h, a média foi maior para o grupo C somente na região junto ao dente. Às 96 h, somente a região intermediária apresentou média maior para o grupo T.

Estas diferenças entre os 4 períodos de tempo e entre os 2 grupos T e C não foram estatisticamente significativas. Pelas fotomicrografias da Figura 5, pode-se verificar também que não é possível distinguir quaisquer diferenças de localização na concentração de grãos de prata sobre as células e substância extracelular do LPD, quer entre regiões, segmentos ou grupos.

Na contagem de grãos de prata nas regiões do LPD junto ao dente e osso alveolar do segmento basal dos dois grupos, numa área 5 vezes maior (4900 μm^2), a concentração foi sempre maior na região junto ao dente (Tabela 3 - Fig. 6) nos dois grupos. Contudo, estas diferenças e as diferenças entre tempos ora predominando a concentração no grupo T ora no C, continuaram não sendo significantes estatisticamente.

TABELA 2 - Concentração de grãos de prata no ligamento periodontal (LPD) de incisivo inferior de camundongos em erupção desimpedida, injetados com ^{3}H-glicina vários tempos após a administração de vimblastina.

HORAS	GRUPO	REGIÃO (LPD)	SEGMENTOS BASAL	MÉDIO	INCISAL	LPD
24	T(n=6)	D	37,33	24,50	21,00	27,61± 8,5
		I	29,33	24,33	29,00	27,55± 2,7
		O	28,33	20,00	29,16	25,83± 5,0
	C(n=6)	D	26,66	19,33	22,00	22,66± 3,7
		I	25,16	28,33	25,50	26,33± 1,1
		O	21,33	30,16	18,66	23,38± 6,0
48	T(n=6)	D	32,50	25,66	26,16	28,08± 3,8
		I	29,16	26,00	26,33	27,71± 1,7
		O	22,33	19,66	45,16	29,66±14,0
	C(n=6)	D	33,50	30,16	23,66	29,10± 5,0
		I	31,33	33,66	21,66	28,88± 4,5
		O	28,50	34,00	29,83	31,44± 2,8
72	T(n=4)	D	33,25	14,75	16,75	21,58±10,1
		I	33,00	26,00	31,00	30,00± 3,6
		O	24,00	24,50	23,00	23,83± 0,7
	C(n=5)	D	24,60	24,00	22,00	23,53± 1,3
		I	29,60	31,00	26,40	29,00± 2,3
		O	20,00	26,40	20,20	22,20± 3,6
96	T(n=5)	D	31,00	23,20	28,40	27,53± 3,9
		I	33,20	23,40	28,00	28,20± 4,9
		O	32,40	17,20	27,60	25,73± 7,7
	C(n=5)	D	41,00	26,80	26,60	31,46± 8,2
		I	31,60	21,60	20,00	24,40± 6,2
		O	26,00	30,80	35,80	30,86± 4,9

LEGENDA:

- Os valores dos segmentos representam as médias do número de grãos de prata numa área de 980 μm^2.
- LPD é a média dos 3 segmentos $\pm$ s_x.

T - grupo tratado.
C - grupo controle.
D - região do LPD junto ao dente.
I - região do LPD intermediária ao dente e osso alveolar.
O - região do LPD junto ao osso alveolar.

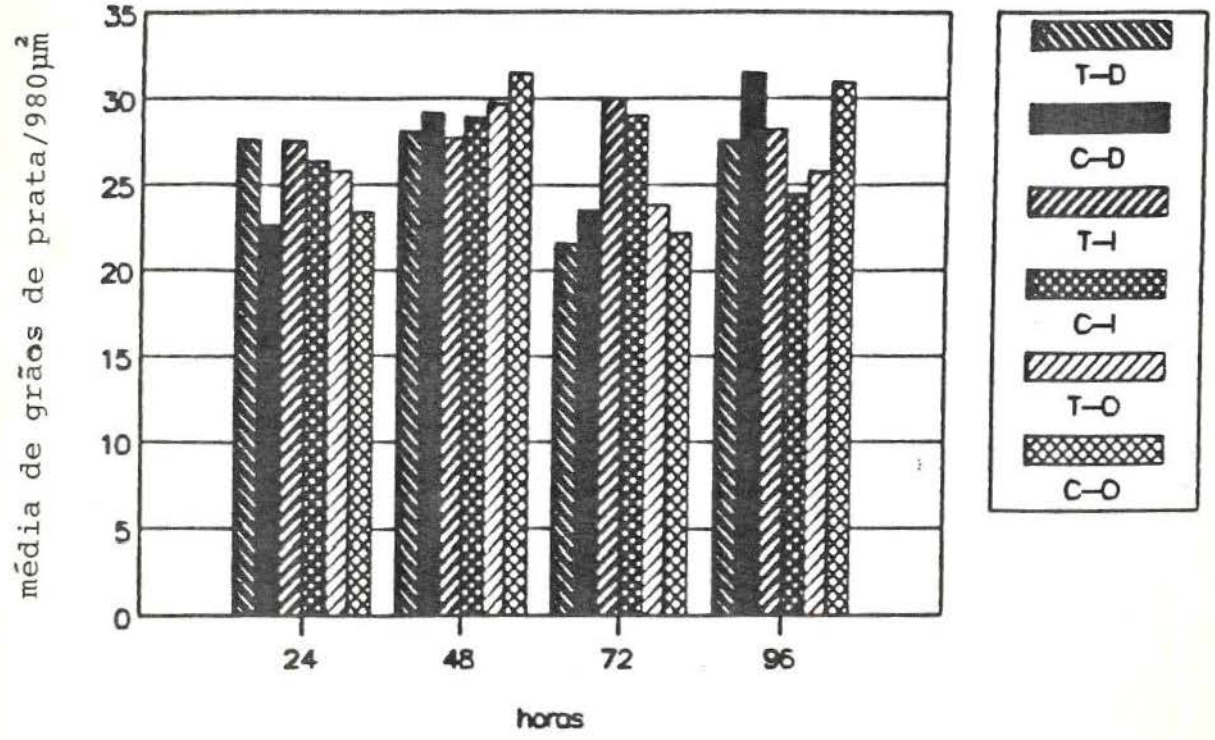
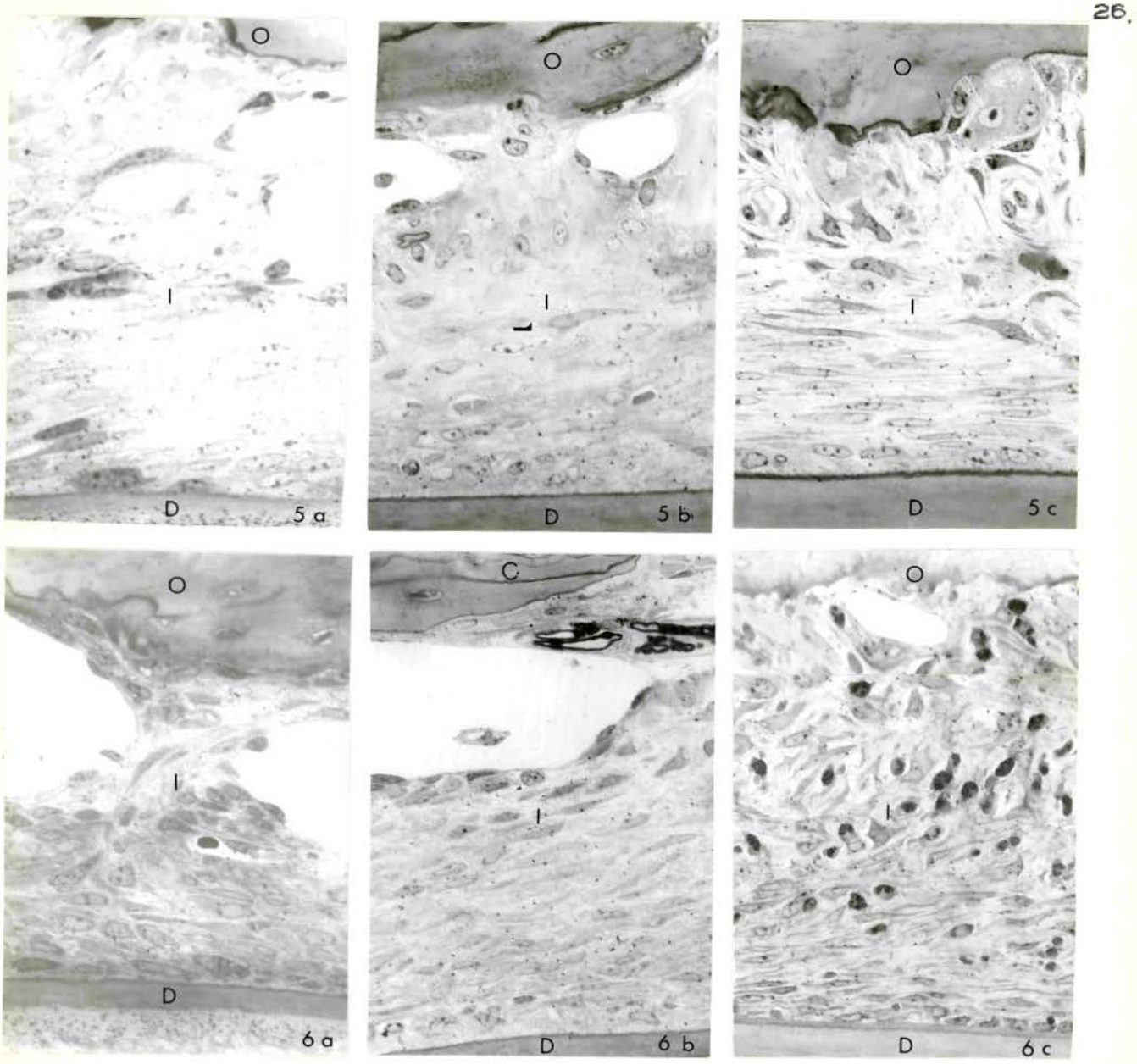


Figura 4 - Concentração de grãos de prata no ligamento periodontal (LPD) de incisivos inferiores de camundongos em erupção desimpedida, injetados com ^{3}H-glicina vários tempos após a administração de vimblastina.
As contagens de grãos de prata foram feitas nas regiões junto ao dente (D), junto ao osso alveolar (O) e numa região intermediária (I).
T = tratado; C = controle.



Figuras 5 e 6-Radioautogramas do LPD de incisivos inferiores de camundongos em erupção desimpedida injetados com ^{3}H-glicina (3 horas após). Figura 5- grupo de animais tratados com 2 mg de Vimblastina/Kg (24 horas após) Figura 6- grupo de animais controle. a, b, c, respectivamente segmentos basal, médio e incisal. Azul de Toluidina. 400 x.
As contagens dos grãos de prata foram feitas nas regiões junto ao dente (D); junto ao osso alveolar ($\overline{O}$) e numa região intermediária a ambos (I).
Nota-se que a morfologia geral do LPD e a distribuição dos grãos de prata são semelhantes nos dois grupos.

TABELA 3 - Concentração de grãos de prata no segmento basal do ligamento periodontal (LPD) de incisivo inferior de camundongos em erupção desimpedida, injetados com ^{3}H-glicina vários tempos após a administração de vimblastina.

HORAS	GRUPO	REGIÃO (LPD)	GRÃOS DE PRATA
24	T(n=6)	D	204,00 ± 46,1
		O	102,33 ± 18,0
	C(n=6)	D	185,16 ± 6,7
		O	147,00 ± 14,4
48	T(n=6)	D	178,00 ± 20,5
		O	126,33 ± 14,9
	C(n=6)	D	196,66 ± 28,9
		O	147,66 ± 25,2
72	T(n=4)	D	229,50 ± 48,4
		O	159,00 ± 36,4
	C(n=5)	D	186,20 ± 22,4
		O	147,20 ± 12,0
96	T(n=5)	D	193,40 ± 23,3
		O	135,40 ± 10,3
	C(n=5)	D	192,60 ± 19,3
		O	108,00 ± 11,5

LEGENDA:

- Os valores ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) correspondem às médias do número de grãos de prata contados em uma área de 4900μm^2.

T - grupo tratado.
C - grupo controle.
D - região do LPD junto ao dente.
O - região do LPD junto ao osso alveolar.

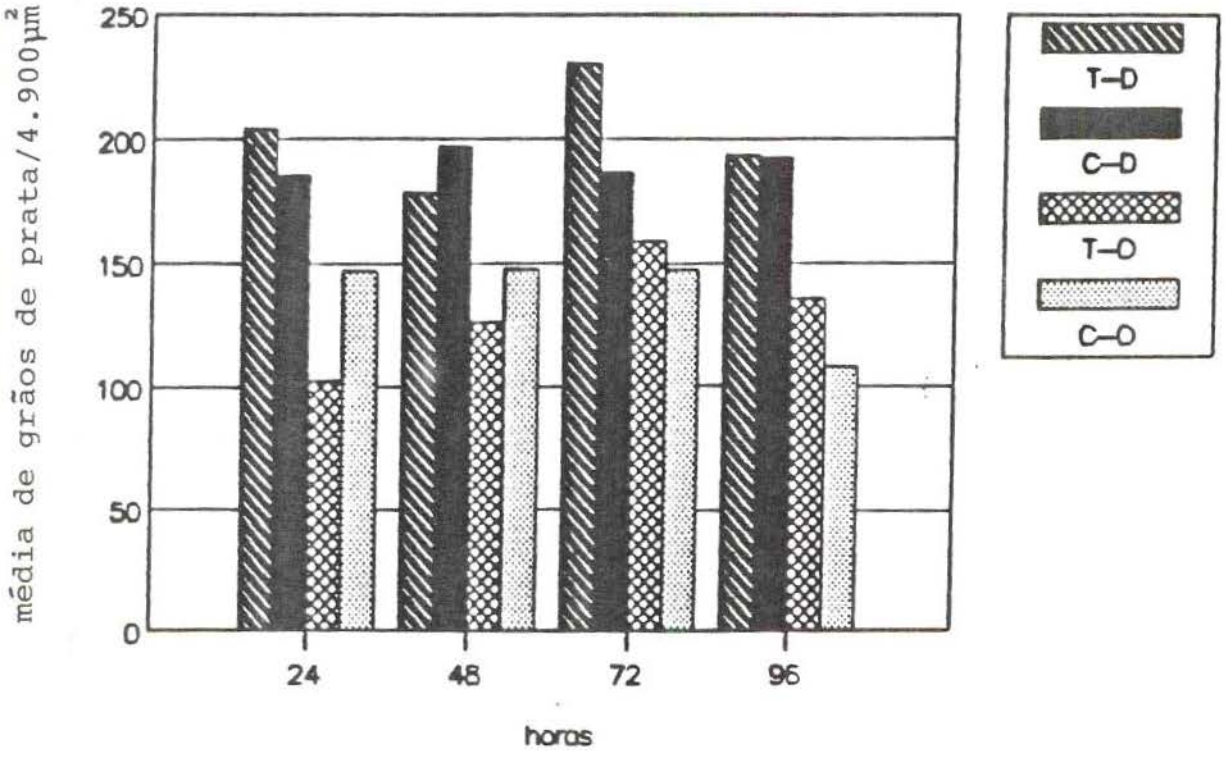


Figura 7 - Concentração de grãos de prata no segmento basal do ligamento periodontal (LPD) de incisivos inferiores de camundongos em erupção desimpedida, injetados com ^{3}H-glicina vários tempos após a administração de vimblastina.
As contagens de grãos de prata foram feitas nas regiões junto ao dente (D) e junto ao osso alveolar (O).
T = tratado; C = controle.

Da mesma forma, as diferenças de concentrações encontradas na PD (Tabela 4), embora visualmente mais expressivas (Figs. 7 e 8) não foram estatisticamente significantes. Com exceção do tempo de 48 h, o grupo T apresentou concentração de grãos de prata maior que o grupo C.

TABELA 4 - Concentração de grãos de prata na pré-dentina (PD) do segmento basal de incisivo inferior de camundongos em erupção desimpedida, injetados com ^{3}H-glicina vários tempos após a administração de vimblastina.

HORAS	GRUPO	REGIÃO	GRÃOS DE PRATA
24	T(n=6)	PD	362,50 ± 70,3
	C(n=6)	PD	333,10 ± 54,7
48	T(n=6)	PD	304,00 ± 35,3
	C(n=6)	PD	359,80 ± 96,0
72	T(n=4)	PD	450,50 ± 109,7
	C(n=5)	PD	329,00 ± 34,6
96	T(n=5)	PD	378,00 ± 63,0
	C(n=5)	PD	265,00 ± 30,1

LEGENDA:

- os valores ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) correspondem às médias do número de grãos de prata contados numa área de 900 μm^2.

T - grupo tratado.
C - grupo controle.

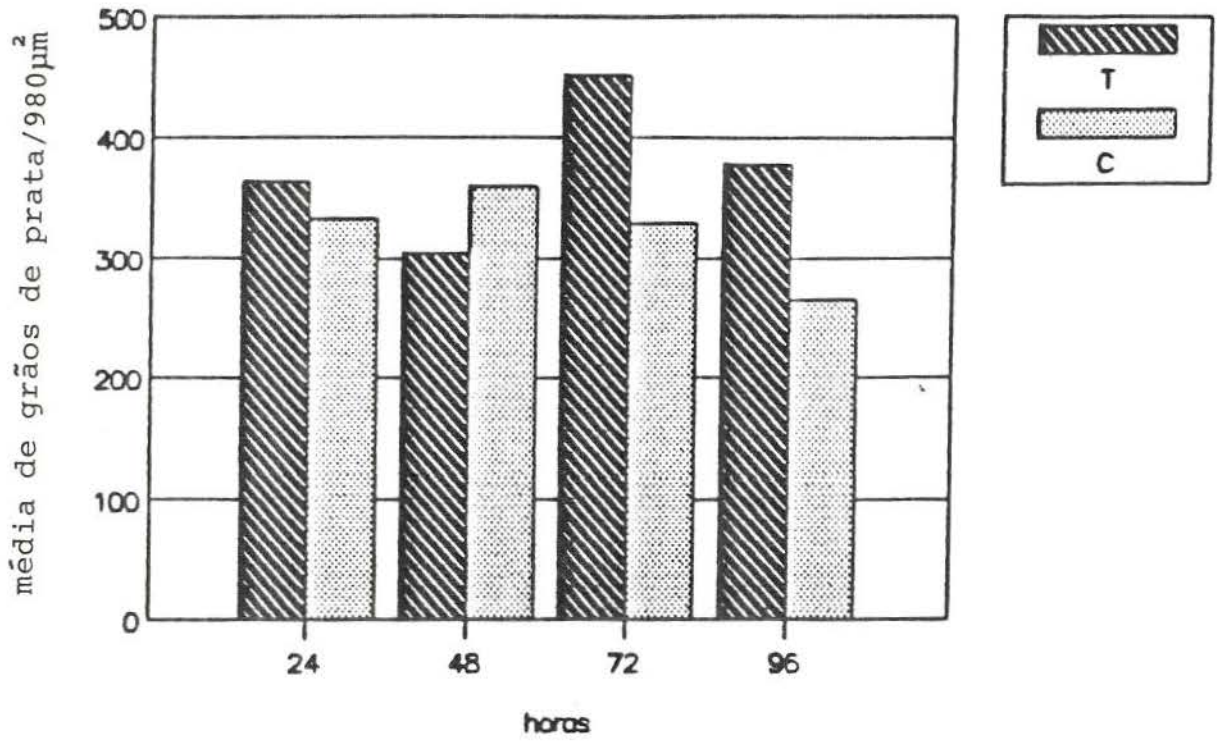


Figura 8 - Concentração de grãos de prata na pré-dentina (PD) do segmento basal de incisivos inferiores de camundongos em erupção desimpedida, injetados com ^{3}H-glicina vários tempos após a administração de vimblastina.
T = tratado; C = controle.

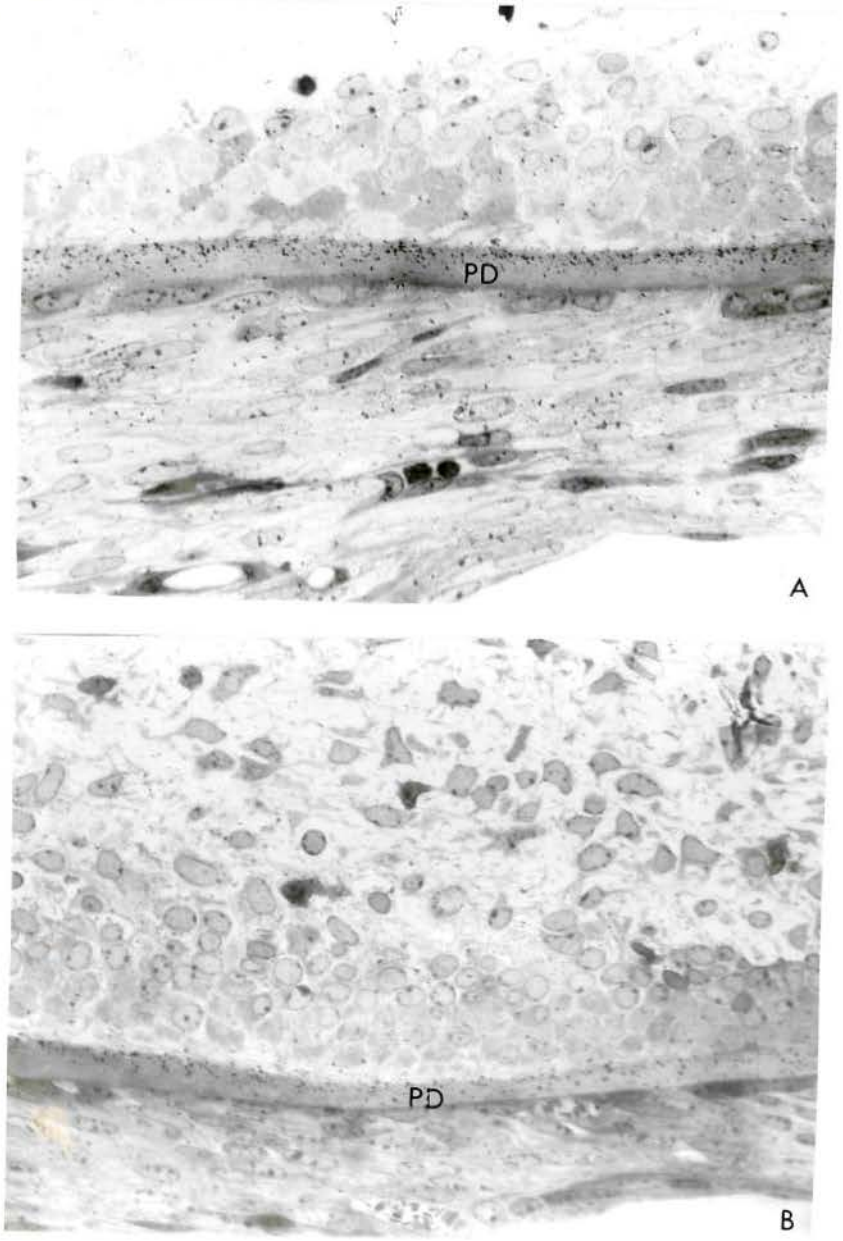


Figura 9-Radioautogramas do segmento basal de incisivos inferiores de camundongos em erupção desimpedida , injetados com ^{3}H-glicina (3 horas após). (A) grupo de animais tratados com 2 mg de Vimblastina/Kg (24 horas após). (B) grupo de animais controle.
Azul de Toluidina. 400 x.
Nota-se que a concentração de grãos de prata na pré-dentina (PD) do grupo tratado é visualmente maior que a do controle.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os resultados relativos à erupção dental assemelham-se aos de CHIBA *et al.* (1980), cujo experimento serviu de modelo para o presente estudo. O retardo foi mais efetivo com a dose de 2.0 mg/Kg de peso, dose que foi escolhida para o experimento seguinte sobre metabolismo de proteínas no LPD. Com a dose de 1 mg em ratos CHIBA *et al.* (1980) não observaram retardo significativo; com 1.5 mg o retardo só foi significativo no 1° dia após a administração da droga; com 2.0 mg a significância estendeu-se ao 2° dia e com 2.5 mg até o 3° dia, tendendo à normalidade no 4° dia. Os camundongos mesmo com a dose de 2.0 mg não apresentaram estado geral tão debilitado como o descrito pelos autores citados, que também referem-se a uma perda maior de animais. Outra diferença entre os dois resultados é que neste experimento a significância do retardo do grupo tratado em relação ao controle acentuou-se com o tempo. Essa divergência pode ser explicada ou pela diferença de animais cuja reatividade à droga pode não ser exatamente a mesma, ou pela diferença de metodologia usada para medir a erupção. Como ponto de referência, CHIBA *et al.* (1980) usaram o incisivo direito fixado à mandíbula com um pino de aço. No presente estudo o incisivo direito erupcionou normalmente em contato com o antagonista e o ponto de referência foi a margem gengival do incisivo desimpedido. Diferentes pontos de referência podem causar uma diferença nos resultados,

de acordo com ALADDIN & BURN-MURDOCH (1985).

No que se refere à biossíntese de proteínas observada através da incorporação de ^{3}H-glicina e radioautografia, os resultados indicam que os fibroblastos do LPD nos intervalos de tempo estudados após a administração de vimblastina não apresentam nenhuma diferença em relação aos respectivos controles.

Nos tempos de sacrifício, após a injeção do composto radioativo, a concentração de grãos de prata por unidade de área sobre células e substância extracelular não variou. Isso seria teoricamente esperado nos animais controle, uma vez que após 1 h todo aminoácido disponível foi utilizado pelas células para biossíntese de suas proteínas constitucionais, e aquelas exportáveis para a matriz extracelular. Além disso, 6 h após a injeção é um tempo aparentemente insuficiente para haver renovação das proteínas marcadas. Assim, embora haja uma alteração na distribuição de grãos de prata sobre células (maior no tempo mais curto) e sobre a matriz extracelular (maior no tempo mais longo), o total de material radioativo incorporado nos incisivos não variou. Justifica-se, portanto, a análise dos resultados radioautográficos em conjunto para cada intervalo de tempo após a injeção de vimblastina, independente do tempo de sacrifício após a ^{3}H-glicina.

Antes de adiantar-se qualquer interpretação destes resultados, foi preciso comprovar que a vimblastina usada no 2° experimento continuava ativa, pois apesar de ter-se usado o mesmo lote de droga nos dois experimentos eles foram realizados com um intervalo de alguns meses. Para tanto, usando-se vimblastina do mesmo lote, fez-se um rápido experimento. Um grupo de 8 camundon-

gos recebeu por via i.p. a mesma dose de 2 mg/Kg peso, e aos pares foram sacrificados 2, 6, 24 e 48 h após. Um lote com o mesmo número de animais recebeu pela mesma via uma injeção de salina em volume aproximadamente igual ao do grupo tratado. Fragmentos do jejuno foram fixados em Carnoy incluídos em parafina e cortes de 5 μm de espessura foram corados com H.E. Foram contadas as metáfases e comprovou-se o bloqueio nesta fase nos tempos de 2 e 6 h. Nos tempos posteriores o percentual de metáfases era equivalente ao dos controles. Nas 6 h após a injeção de vimblastina era notável o número de células degeneradas (efeito atenuado, mas ainda perceptível às 24 h). Estes resultados são comparáveis aos de SAMPERIZ *et al.* (1985), que mostraram em ameloblastos o efeito bloqueador da vimblastina sobre as mitoses, e que persistiu até 12 h após sua administração.

Os efeitos da vimblastina são atribuídos principalmente à sua associação com as tubulinas inibindo a organização destas proteínas em microtúbulos (WILSON *et al.*, 1974) e provocando uma série de efeitos citotóxicos, tais como: paralisação das mitoses em metáfase, desorganização do complexo de Golgi e do R.E.R. (EHRLICH *et al.*, 1974; MOSKALEWSKY *et al.*, 1975; THYBERG *et al.*, 1978) com conseqüente inibição e alteração do processo de secreção, como descrito em relação à formação do colágeno por osteoblastos e fibroblastos (EHRLICH *et al.*, 1974). MOE (1977 e 1979) e MOE & MIKKELSEN (1977a e b) descreveram os efeitos agudos e tardios da vimblastina nos ameloblastos. Em tempos curtos, a injeção da droga, além dos efeitos acima relatados, produzia ainda a exocitose do produto de secreção em lugares anômalos.

Como efeito tardio, produzia a morte de células, ao passo que as remanescentes reassumiam a atividade secretora normal. AZEVEDO *et al.* (1982) também mostraram através da incorporação de ^{35}S-sulfato que a vimblastina inibe parcialmente a biossíntese de glicosaminoglicanas e a exocitose dos produtos elaborados.

Drogas como a colchicina e demecolcina cujo efeito básico é semelhante ao da vimblastina; isto é, inibem a formação de microtúbubulos,também retardam a erupção. O retardo na erupção é mais acentuado com a colchicina do que com a vimblastina e também é dose dependente. Os efeitos gerais da droga, como perda de peso e diarréia, são menores que os da vimblastina e a recuperação é mais rápida (CHIBA *et al.*, 1980). Na secreção, AZEVEDO *et al.* (1982) mostraram que a colchicina não chega a inibir a biossíntese mas tão somente a exocitose dos produtos secretados. Em relação a estas drogas antimicrotubulares e outras drogas citostáticas e/ou citotóxicas cujo mecanismo de ação é diferente, tais como a ciclofosfamida, trietanomelamina e citocalasina, que também retardam a erupção, as seguintes hipóteses foram aventadas para explicar o seu efeito no processo eruptivo: lesão das paredes vasculares e inibição da reconstrução da rede capilar associada à erupção (SENZAKI, 1980; TAKIZAWA, 1981; ADATIA & BERKOVITZ, 1981); desintegração do cito-esqueleto dos fibroblastos devido ao desarranjo dos microtúbulos (CHO & GARANT, 1981b); despolimerização dos microfilamentos de actina (CASELLA *et al.*, 1981) interferindo na possível contração de fibroblastos e do colágeno (BELLOWS *et al.*, 1983); inibição da motilidade dos fibroblastos *in vitro* (GAIL & BOONE, 1971); aumento da viscosi-

dade do ácido hialurônico *in vitro* (CASTOR & PRINCE, 1964); diminuição da contratilidade do tecido de granulação (van den BRENK & STONE, 1974); aumento da pressão por constrição arterial (FERGUSSON, 1952); inibição da exocitose de tropocolágeno (CHO & GARANT, 1981a); inibição da agregação dos fibroblastos *in vitro* (WADDELL *et al.*, 1974).

Como vimos, o processo eruptivo é um processo complexo e, ao que tudo indica, multifatorial. Além do mecanismo gerador da força eruptiva sobre o qual há várias hipóteses explicativas, há de se considerar: a resistência dos tecidos periodontais ao movimento, a remodelação das estruturas para se adaptarem às novas posições do dente e a translação da força em movimento. Ao que parece, cada um destes fatores pode estar relacionado a diferentes componentes do sistema. Assim, alteração na taxa de erupção pode ser conseqüência de uma alteração no mecanismo gerador de força, ou no sistema de resistência dos tecidos ou ainda no sistema de renovação e remodelação dos tecidos. Drogas, hormônios ou vitaminas podem agir num destes mecanismos, ou simultaneamente em mais de um (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982).

Pelo que foi descrito acima, principalmente em relação aos efeitos da colchicina, pode-se dizer que a vimblastina, cujo efeito básico é semelhante ao da colchicina, estaria influindo tanto no mecanismo gerador da força quanto no funcionamento dos demais fatores envolvidos no processo eruptivo. A lesão de vasos ou a inibição da renovação da rede capilar, ou o aumento da viscosidade do ácido hialurônico falaria a favor da

alteração das pressões hidrostáticas atuantes (vascular e tissular) ou do aumento à resistência ao movimento. A alteração na secreção do colágeno e dos demais componentes da matriz extracelular do ligamento poderia inibir a contração do colágeno que segundo BELLOWS *et al.* (1983), em experimento *in vitro*, depende da interação de fibroblastos e colágeno.

Os resultados do presente trabalho indicam que o retardo na erupção dos incisivos de camundongos provocado pela vimblastina acentua-se 3 e 4 dias após a administração da droga, mas que 24 h após esta administração, a capacidade de biossíntese de proteínas pelos fibroblastos (que segundo dados da literatura e deste laboratório [AZEVEDO *et al.*, 1982], altera-se acentuadamente em tempos curtos) está recuperada e não difere dos controles. Com um mecanismo de ação diferente ao da vimblastina, o agente alquilante ciclofosfamida também provoca retardo que aparece 4 a 5 dias após a administração de uma dose única, quando os efeitos citotóxicos da droga já não são evidentes, e que persiste por cerca de 6 dias a mais (ADATIA & BERKOVITZ, 1981).

Se admitirmos por hipótese que o retardo na erupção provocado pela vimblastina esteja ligado à biossíntese de proteínas nos fibroblastos do LPD, o produto alterado (colágeno ou proteínas não colágenas) foi produzido antes das 24 h após a injeção da droga, daí sua não detecção no experimento aqui apresentado e possivelmente sua renovação é no mínimo maior que 96 h, já que seu efeito persistiu até este intervalo de tempo.

Os dados da literatura sobre a renovação das proteínas produzidas pelos fibroblastos do LPD são conflitantes. A

meia vida do colágeno em molares de ratos varia de 2,4 a 6,4 dias em animais jovens, e 7 a 10,8 dias em adultos (RIPPIN 1976 e 1978). Para SODEK (1977), nos mesmos dentes seria de apenas 1 dia e cerca de 3 vezes mais lento nos incisivos (SODEK, 1978). Em incisivos de ratos, ORLOWSKI (1978) calculou a meia vida em 9,5 dias e a taxa de renovação em 13,4 dias, enquanto que van den BOS & TONINO (1984) apresentaram uma meia vida de 10,5 dias para dentes em erupção desimpedida e 8,9 dias para os dentes em oclusão. Em relação às proteínas não colágenas, ORLOWSKI (1978) determinou sua meia vida em 6,5 dias e van den BOS & TONINO (1984) em 3,6 dias para os incisivos desimpedidos e 3,4 dias para os em oclusão normal. Sem apresentar dados quantitativos, SODEK (1977, 1978) concluiu que as proteínas não colágenas teriam uma fração de metabolismo rápido e outra de metabolismo lento.

Dada a multiplicidade de efeitos das drogas antimicrotubulares e dos fatores envolvidos na erupção dental os presentes resultados não são seguros para tentar-se uma interpretação mais consistente. Porém, há um indício de que a vimblastina provoca acúmulo de material protéico nos tecidos, uma vez que (embora os dados numéricos da concentração não tenham alcançado significância estatística) nota-se na pré-dentina uma quantidade maior de material radioativo nos animais tratados do que nos controles. Segundo JOSEPHSEN & WARSHAWSKY (1982) as proteínas da dentina são das mais estáveis, embora ainda sofram alguma degradação na pré-dentina. Desde que os tempos usados foram insuficientes para a observação de material marcado na dentina, as observações se restringiram à pré-dentina, onde ao contrário do

LPD parece não haver renovação proteica, daí a tendência de se manifestar um acúmulo de material protéico marcado. Tal acúmulo poderia ser explicado por uma alteração no processo de degradação dos produtos, uma vez que sua biossíntese, como vimos, apresentou-se normal.

Em relação ao colágeno, já foi referida sua eventual participação no processo eruptivo, seja na geração da força motriz, seja como fator no mecanismo de erupção.

Quanto às proteínas não colágenas do LPD, elas têm sido recentemente implicadas no processo eruptivo: van den BOS & TONINO (1984) verificaram seu aumento, sendo este a única alteração em dentes de erupção desimpedida que erupcionam numa velocidade 2 vezes maior que a dos dentes com contato oclusal. TSE *et al.* (1988) verificaram fato semelhante em erupção retardada por efeito hormonal indireto.

Se este aumento das proteínas não colágenas é efeito ou causa da erupção alterada, é impossível afirmar por enquanto. Todavia, entre estas proteínas encontram-se as fibronectinas e a porção protéica das proteoglicanas. À fibronectina é atribuído um papel na adesão de células entre si e células e fibras da matriz, bem como na migração de células através de tecidos conjuntivos, onde atuariam também as proteoglicanas (NEWGREEN & THIERY, 1980; FUJIMOTO *et al.*, 1985). Por outro lado, há indicações de que drogas antimicrotubulares alteram estas substâncias, como na inibição de contato de fibroblastos *in vitro* (WADDELL *et al.*, 1974), e aumento da viscosidade do ácido hialurônico (CASTOR & PRINCE, 1964).

Futuros experimentos poderão esclarecer se realmente a vimblastina provoca uma retenção de proteínas, e qual o tipo de proteína que eventualmente se acumula no LPD.

RESUMO

RESUMO

A taxa de erupção desimpedida de incisivos inferiores foi medida diariamente por método fotográfico durante 4 dias em camundongos machos adultos divididos em 3 grupos, dois dos quais receberam respectivamente, por via intraperitoneal, uma dose única de 1 mg e 2 mg/Kg de peso de vimblastina o terceiro grupo, que serviu de controle, recebeu um volume equivalente de soro fisiológico. A dose de 2 mg/Kg de peso de vimblastina mostrou-se mais efetiva provocando um retardo da erupção já no 1° dia do experimento, acentuando-se no 3° e 4° dias após a administração da droga.

A biossíntese de proteínas no ligamento periodontal (LPD) foi estudada num grupo de 24 camundongos machos adultos que receberam uma única dose de 2 mg/Kg de peso de vimblastina, e num grupo análogo, foi injetado volume equivalente de soro fisiológico. Após 24, 48, 72 e 96 h da administração da droga ou do soro, os animais foram injetados, intraperitonealmente com 5 μCi de ^{3}H-glicina/g de peso, sendo sacrificados em lotes de 2 tratados e 2 controles após 1, 3 e 6 horas.

O sacrifício foi feito por perfusão intracardíaca com o fixador de Karnowsky, sob anestesia com éter. As hemimandíbulas esquerdas, cujos incisivos haviam sido seccionados a cada 2 dias para manter a erupção desimpedida, foram descalcificadas com EDTA, divididas em três segmentos - basal, médio e incisal e in-

cluídas em Epon. Cortes de 1 μm de espessura foram radiautografados. A concentração de grãos de prata reduzida em cada segmento foi determinada no LPD junto ao dente; junto ao osso alveolar e numa região intermediária aos dois; no segmento basal foi determinada a concentração de grãos na pré-dentina.

Os resultados qualitativos, quantitativos e estatísticos mostraram que: 1) a biossíntese de proteínas, que de acordo com vários dados da literatura é alterada agudamente por drogas antimicrotubulares nos animais tratados com vimblastina 24 a 96 h após, não diferiu dos controles; 2) como após este período, a erupção continuou retardada, pelo menos duas hipóteses podem ser aventadas: a) o metabolismo das proteínas (colágenas ou não colágenas) produzido pelos fibroblastos do LPD é independente do mecanismo de retardo da erupção por vimblastina; b) a biossíntese dessas proteínas teria se alterado em tempos curtos após a administração da droga e/ou estas proteínas teriam seus processos de degradação e renovação alterados, participando, portanto, como causa ou efeito do mecanismo de erupção, como descrito na literatura. Esta última hipótese tem a seu favor o indício visualmente detectado de um acúmulo de proteínas marcadas na pré-dentina.

SUMMARY

SUMMARY

The unimpeded eruption rate of mandibular incisors was measured daily by a photographic method during 4 days, in male adult mice divided in 3 groups, two of which received, respectively, (i.p.v.) a single dose of 1 mg and 2 mg/Kg of body weight of vinblastine, and the third one which served as control, received an equivalent volume of saline. The dose of 2 mg of vinblastine was more effective, maintaining the decreased eruption rate up to the 4th day.

The biosynthesis of proteins in the periodontal ligament (PDL) was studied in a group of 24 male adult mice, which received a single dose of 2 mg/Kg of body weight of vinblastine. A control group of 24 animals received an equal volume of saline; 24, 48, 72 and 96 hours after, the animals were injected intraperitoneally with 5 μCi/g of body weight of ^{3}H-glycine, and sacrificied 2 in each group, 1, 3 and 6 hours after that.

The sacrifice was performed by intracardiac perfusion with Karnowsky fixative under ether anestesia. The left hemimandibles, whose incisors had been ressected every two days, in order to maintain the unimpeded eruption, were decalcified in EDTA, divided in 3 segments - basal, medium and incisal and embbeded in Epon. One μm thick sections were radioautographed. The silver grains counts in each segment were made in the

tooth-related, bone-related and in a middle region of the PDL. Silver grain counts were also made in the pre-dentine of the basal segment.

The results showed: 1) the biosynthesis of proteins accordingly to several data in the literature is altered by antimicrotubular drugs in animals treated with vinblastine did not differ from the controls within the experimental period; 2) since the eruption was decreased during that time, at least two explanations could be given: a) the protein metabolism (collagen and non collagen) produced by the PDL fibroblasts is independent of the mechanism by which vinblastine decreases the eruption rate; b) the biosynthesis of these proteins would have been altered shortly after the administration of vinblastine and/or their turnover rate would be slowed down, and thus they would participate as cause or effect of the mechanism of eruption, as described in the literature. This last hypothesis was reinforced by the increased amount of labeled proteins observed in the pre-dentine.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADATIA, A.K. & BERKOVITZ, K.B. The effects of cyclophosphamide on eruption of the continuously growing mandibular incisor of the rat. **Archs oral Biol.**, 26: 607-13, 1981.

ALADDIN, Q.I. & BURN-MURDOCH, R.A. Techniques for choosing reference points from which to measure eruption rates of rat incisors. **Archs oral Biol.**, 30(7): 531-7, 1985.

AZEVEDO, L.F.; BLUMEN, G.; MERZEL, J. The effect of colchicine and vinblastine in the mouse lower incisor as revealed by autoradiography after injection of ^{35}S-Sodium Sulphate. **J. Biol. Buccale**, 10: 45-54, 1982.

AZUMA, M.; ENLOW, D.H.; FREDRICKSON, R.G.; GASTON, L.F. A myofibroblastic basis for the physical forces that produce tooth drift and eruption, skeletal displacement of sutures, and periosteal migration. In: MACNAMARA, J.A., ed. **Determinantes of mandibular form and growth.** Ann Arbor Univ. of Michigan, 1975. p.179-207.

BAILEY, A.J. The nature of collagen. **Comp. Biochem. Physiol.**, 26: 297-423, 1968.

BAILEY A.J. In: POOLE, D.F.G. & STACK, M.V., ed. **The eruption and occlusion of teeth.** London, Butterworths, 1976. p.306-7.

BEERTSEN, W.; EVERTS, V.; Van Den HOOFF, A. Fine structure of fibroblasts in the periodontal ligament of the rat incisor and their possible role in tooth eruption. **Archs oral Biol.**, 19: 1087-98, 1974.

BELLOWS, C.G.; MELCHER, A.H.; AUBIN, J.E. An *in vitro* model for tooth eruption utilizing periodontal ligament fibroblasts and collagen lattices. **Archs oral Biol., 28(8): 715-22, 1983.**

BERKOVITZ, B.K.B. & THOMAS, N.R. Unimpeded eruption in the root-resected lower incisor of the rat with a preliminary note on root transection. **Archs oral Biol., 14: 771-80, 1969.**

BERKOVITZ, B.K.B.; MIGDALSKI, A.; SOLOMON, M. The effect of the lathyritic agent aminoacetonitrile on the unimpeded eruption rate in normal and root-resected rat lower incisors. **Archs oral Biol., 17: 1755-63, 1972.**

BORNSTEIN, P. The biosynthesis of collagen. **A. Rev. Biochem., 43: 567-603, 1974.**

CARNEIRO, J. & FAVA DE MORAES, F. Radioautographic visualization of collagen metabolism in the periodontal tissues of the mouse. **Archs oral Biol., 10: 833-48, 1965.**

CASELLA, J.F.; FLANAGAN, M.D.; LIN, S. Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. **Nature, 293: 302-5, 1981.**

CASTOR, C.W. & PRINCE, R.K. Modulation of the intrinsic viscosity of hyaluronic acid formed by human fibroblasts *in vitro*: the effects of hydrocortisone and colchicine. **Biochim. biophys. Acta, 83: 165-77, 1964.**

CHIBA, M.; TSURUTA, M.; ETO, K. A photographic method of measuring eruption rates of rat mandibular incisors. **Archs oral Biol., 18: 1003-10, 1973.**

CHIBA, M.; TAKISAWA, K.; OHSHIMA, S. Dose-response effects of colchicine and vinblastine on unimpeded eruption rates of the rat mandibular incisor. **Archs oral Biol., 25**(2): 115-9, 1980.

CHO, M-I. & GARANT, P.R. An electron microscopic radioautographic study of collagen secretion in periodontal ligament fibroblasts of the mouse: II. colchicine-treated fibroblasts. **Anat. Rec., 201**: 587-98, 1981a.

CHO, M-I. & GARANT, P.R. Role of microtubules in the organization of the Golgi complex and the secretion of collagen secretory granules by periodontal ligament fibroblasts. **Anat. Rec., 199**: 459-71, 1981b.

EHRLICH, H.P.; ROSS, R.; BORNSTEIN, P. Effects of antimicrotubular agents on the secretion of collagen. **J. Cell Biol., 62**: 390-405, 1974.

FERGUSSON, F.C.(Jr.) Colchicine, I. General pharmacology. **J. Pharmac. exp. Ther., 106**: 261-70, 1952.

FUJIMOTO, T.; YOSHINAGA, K.; KONO, I. Distribution of fibronectin on the migratory pathway of primordial germ cells in mice. **Anat. Rec., 211**: 271-8, 1985.

GABBIANI, G.; RYAN, G.B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia, 27**: 549-50, 1971.

GAIL, M.H. & BOONE, C.W. Cytochalasin effects on BALB-3T$_s$ fibroblasts: dose dependent, reversible alterations of motility and cytoplasmic cleavage. **Expl Cell Res., 68**: 226-8, 1971.

GARANT, P.R. Collagen resorption by fibloblasts. **J. Periodont., 47**: 380-90, 1976.

GRANT, D.A.; BERNICK, S.; LEVY, B.M.; DREIZEN, S. A comparative study of periodontal ligament development in teeth with and without predecessors in marmosets. **J. Periodont., 43:** 162-9, 1972.

GUYTON, A.C. Compliance of the interstitial space and the measurement of tissue pressure. **Pflügers Arch. Ges. Physiol., 336** (Suppl.): S1-S20, 1972.

JOSEPHSEN, K. & WARSHAWSKY, H. Radioautography of rat incisor dentin as a continous record of the incorporation of a single dose of ^{3}H-labeled proline and tyrosine. **Am. J. Anat., 164:** 45-56, 1982.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J Cell Biol., 27:** 137-8, 1965.

KOPRIWA, B.M. & LEBLOND, C.P. Improvements in the coating technique of radioautography. **J. Histochem. Cytochem., 10:** 269-84, 1962.

MAGNUSSON, B. Tissue changes during molar tooth eruption. **Trans. R. Schs Dent. Stockh. Umea,** (13): 1-122, 1968.

MAJNO, G.; GABBIANI, G.; HIRSCHEL, B.J.; RIJAN, G.B.; STATBOV, P.R. Contraction of granulation tissue *in vitro*: similarity to smooth muscle. **Science, 173:** 548-50, 1971.

MOE, H. On the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. **Acta path. microbiol. scand. Sect. A., 85:** 330-4, 1977.

MOE, H. Sequential ultrastructural changes in vinblastine induced cell death of secretory ameloblasts of rat incisors *in vivo*. **Acta path. microbiol. scand. Sect. A., 87:** 1-9, 1979.

MOE, H. & MIKKELSEN, H. Light microscopical and ultrastructural observations on the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. **Acta path. microbiol. scand.** Sect. A., **85**: 73-88, 1977a.

MOE, H. & MIKKELSEN, H. On the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. **Acta path. microbiol. scand.** Sect A., **85**: 319-29, 1977b.

MOSKALEWSKI, S.; THYBERG, J.; LOHMANDER, S.; FRIBERG, U. Influence of colchicine and vinblastine on the Golgi complex and matrix deposition in chondrocyte aggregates. **Expl Cell Res.**, **95**: 440-54, 1975.

MOXHAM, B.J. **An assessment of the vascular or tissue hydrostatic pressure hypotheses of eruption using a continuous recording technique for monitoring movements of the rabbit mandibular incisor.** Bristol, 1978. [Thesis (Ph.D.) Univ.].

MOXHAM, B.J. Recording the eruption of the rabbit mandibular incisor using a device for continously monitoring tooth movements. **Archs oral Biol.**, **24**: 889-99, 1979a.

MOXHAM, B.J. The effects of some vaso-active drugs on the eruption of the rabbit mandibular incisor. **Archs oral Biol.**, **24**: 881-88, 1979b.

MOXHAM, B.J. & BERKOVITZ, B.K.B. An approach to the investigation of a multifactorial basis for the mechanism of tooth eruption. **J. dent. Res.**, **59**; Special Issue D, 1840, 1980.

MOXHAM, B.J. & BERKOVITZ, B.K.B. Interactions between thyroxine, hydrocortisone and cyclophosphamide in their effects on the eruption of the rat mandibular incisor. **Archs oral Biol.**, **28**(12): 1083-7, 1983.

MOXHAM, B.J. & BERKOVITZ, B.K.B. The periodontal ligament and physiological tooth movements. In: BERKOVITZ, B.K.B.; MOXHAM, B.J.; NEWMAN, H.N. **The periodontal ligament in health and disease.** Oxford, Pergamon, 1982. p. 215-47.

MYHRE, L.; PREUS, H.R.; AARS, H. Influences of axial load and blood pressure on the position of the rabbit's incisor tooth. **Acta odont. scand., 37:** 153-9, 1979.

NESS, A.R. Eruption - a review. In: ANDERSON, D.J. EASTOE, J.E. MELCHER A.H.; PICTON D.C.A. (eds) **The mechanisms of tooth support.** Bristol, Wright, 1967. p.84-8.

NESS, A.R. Eruption '70. **Apex J. University College Hosp. dent. Sch.**, London, **4:** 23-7, 1970.

NESS, A.R. & SMALE, D.E. The distribution of mitosis and cells in the tissues bounded by the socket wall of the rabbit mandibular incisor. **Proc. R. Soc. B, 151:** 106-28, 1959.

NEWGREEN, D. & THIERY, J.P. Fibronectin in early avian embryos: Synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. **Cell Tissue Res., 211:** 269-91, 1980.

ORLOWSKI, W.A. The incorporation of ^{3}H-proline into the collagen of the periodontium of a rat. **J. Periodont. Res., 11:** 96-100, 1976.

ORLOWSKI, W.A. Biochemical study of collagen turnover in rat incisor periodontal ligament. **Archs oral Biol., 23:** 1163-5, 1978.

PITARU, S.; MICHAELI, Y.; ZAJICEK, G.; WEINREB, M.M. Role of attrition and occlusal contact in the physiology of the rat incisor: X. The part played by the periodontal ligament in the eruptive process. **J. dent. Res., 55(5):** 819-24, 1976.

RIPPIN, J.W. Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces. I. Young rat molars. **J. Periodont. Res., 11:** 101-7, 1976.

RIPPIN, J.W. Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces. II. Adult rat molars. **J. Periodont. Res., 13:** 149-54, 1978.

SAMPERIZ, M.M.F.; BLUMEN, G.; MERZEL, J. Effect of vinblastine on the cell cycle and migration of ameloblasts of mouse incisors as shown by radioautography using ^{3}H-thymidine. **Cell Tiss. Kinet., 18:** 493-503, 1985.

SENSAKI, H. A histological study of reparative dentinogenesis in the rat incisor after colchicine administration. **Archs oral Biol., 25:** 737-43, 1980.

SHORE, R.C. & BERKOVITZ, B.K.B. Model to explain differential movement of periodontal fibroblasts. **Archs oral Biol., 23:** 507-9, 1978.

SHORE, R.C. & BERKOVITZ, B.K.B. An ultrastructural study of periodontal ligament fibroblasts. **Archs oral Biol., 24:** 155-64, 1979.

SODEK, J. A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. **Archs oral Biol., 22:** 655-65, 1977.

SODEK, J. A comparison of collagen and non-collagenous protein metabolism in rat molar and incisor periodontal ligaments. **Archs oral Biol., 23:** 977-82, 1978.

TAKIZAWA, K. Effects of colchicine and vinblastine on the eruption of the rat mandibular incisor, and histological changes of the internal enamel epithelium, pulp cells and periodontal fibroblasts. **Tsurumi Univ. dent. J., 7:** 125-43, 1981.

TEN CATE, A.R. Morphological study of fibrocytes in connective tissue undergoing rapid remodeling. **J. Anat., 112:** 401-14, 1972.

THOMAS, N.R. **The process and mechanism of tooth eruption.** Bristol, 1985. [Thesis (Ph.D.) Univ.].

THOMAS, N.R. Collagen as the generator of tooth eruption. In: POOLE D.F.G. & STACK M.V. ed. **The eruption and occlusion of teeth.** London, Butterworths, 1976. p. 290-301.

THYBERG, J.; MOSKALEWSKI, S.; FRIBERG, U. Effects of antimicrotubular agents on the fine structure of the Golgi complex in embrionic chick osteoblasts. **Cell Tiss. Res., 193:** 247-57, 1978.

TSE, M.C.P.; BOAVENTURA, M.C.; FERNANDES, G.D.; MERZEL, J. The effects of cerebral hemidecortication on the eruption rate and uptake of ^{3}H-glycine by the periodontal ligament of the rat incisor. **Archs oral Biol., 33**(8): 605-11, 1988.

VAN DEN BOS, T. & TONINO, G.J.M. Composition and metabolism of the extracellular matrix in the periodontal ligament of impeded and unimpeded rat incisors. **Archs oral Biol., 29**(11): 893-7, 1984.

VAN DEN BRENK, H.A. & STONE, M.G. Actions and interactions of colchicine and cytochalasin B on contraction of granulation tissue and on mitosis. **Nature, 251:** 327-9, 1974.

VAN HASSEL, H.J. & McMINN, R.G. **Pressure differential favouring** tooth eruption in the dog. **Archs oral Biol., 17:** 183-90, 1972.

WADDELL, A.W.; ROBSON, R.T.; EDWARDS, J.G. Colchicine and vinblastine inhibit fibroblast aggregation. **Nature, 248:** 239-41, 1974.

WARSHAWSKY, H. & MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. **J. Histochem. Cytochem., 15:** 542-9, 1967.

WARSHAWSKY, H. & SMITH, C.E. Morfological classification of rat incisor ameloblasts. **Anat. Rec., 179:** 423-45, 1974.

WILSON, L.; BAMBURG, J.R.; MIZEL, S.B.; GRISHAM, L.M.; CRESWELL, K.M. Interaction of drugs with microtubule proteins. **Fedn. Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol., 33:** 158-66, 1974.

ZAJICEK, G. Fibroblast cell kinetics in the periodontal ligament of the mouse. **Cell Tiss. Kinet., 7:** 479-92, 1974.