
MARIA LUIZA OZORES POLACOW

EFEITO DA VINBLASTINA NA INCORPORAÇÃO DE ^3H -GLICINA
EM PROTEÍNAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE INCISIVOS
DE CAMUNDONGOS EM ERUPÇÃO NORMAL E DESIMPEDIDA

*Este exemplar
Por desistência corrigido
conforme resolução CCPE/036/83
07/04/08/92
[Signature]
JOSE MEZZER*

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

PIRACICABA - SP

- 1992 -

P756e

17185/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus Pais,

JOSÉ (*in Memoriam*)

e INAIR,

pelo exemplo de suas vidas.

Ao RUBENS e às nossas filhas:

PATRÍCIA, VIVIANE e FERNANDA,

dos quais me tornei grande devedora,
tentando conciliar o inconciliável. .

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor JOSÉ MERZEL, Professor Titular do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, que com atenção, disponibilidade e segurança, orientou este trabalho.

Ao Professor Doutor MATHIAS VITTI, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela solicitude e apoio.

À Professora Doutora TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELLO, Chefe do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela amizade e estímulo, inestimáveis, durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor THALES R. MATTOS FILHO, Coordenador Geral dos cursos de Pós-graduação e professora ANA MARIA COSSA DE A. OLIVEIRA, secretária do Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela atenção dispensada.

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

Ao Professor Doutor GUILHERME BLUMEN, pelo estímulo e apoio junto ao Laboratório de radioautografia.

Ao Professor Doutor CASSIO O. GARCIA MUNHOZ, pelos ensinamentos transmitidos

À Professora DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO, pela sua assistência durante o desenvolvimento deste trabalho.

As técnicas MARIA APARECIDA VARELLA, IVANI ODAS DEMÉTRIO e

Professora ELIENE APARECIDA D. N. ROMANI, pela boa vontade e apoio junto ao Laboratório de Histologia.

A senhora SUZETE REGINA TOBIAS NEDER pela assistência junto à secretaria do Departamento de morfologia.

À Professora Doutora MIRIAM RIBEIRO CAMPOS, do departamento de Ciências Biológicas da Universidade Metodista de Piracicaba, pela amizade e companheirismo.

À Professora Doutora GISLENE GARCIA FRANCO DO NASCIMENTO, Diretora do Centro de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde, da Universidade Metodista de Piracicaba - UNIMEP, pelo estímulo dado à nossa carreira docente.

Ao FAP - FUNDO DE APOIO À PESQUISA, da Universidade Metodista de Piracicaba - UNIMEP, pela bolsa de doutoramento à mim concedida durante a conclusão deste trabalho.

Aos colegas de Pós-graduação, e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido graças ao auxílio da FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP-proc. 88-0147-0) e do CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq-proc.303435/87-9) ao Prof. Dr. JOSE MERZEL.

A vimblastina (VELEAN) foi gentilmente cedida pelo Laboratório LILLY DO BRASIL.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	16
DISCUSSÃO.....	33
RESUMO.....	41
SUMMARY.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O processo da erupção dental, um dos movimentos fisiológicos do dente, ainda não tem seu mecanismo esclarecido, no sentido de identificar quem ou o que gera a força necessária para que o órgão se desloque no sentido axial e nem exatamente quais os fatores que influem no processo.

As hipóteses mais antigas, segundo as quais a erupção era devida à formação e crescimento da raiz, aposição cemento-osso na região apical ou proliferação de células pulpares foram abandonadas, desde que se demonstrou que incisivos de roedores, dentes de crescimento e erupção contínuos, separados cirurgicamente da porção odontogênica do órgão, por secção ou remoção, continuavam a erupcionar (BERKOVITZ & THOMAS, 1969; PITARU *et al.*, 1976). Segundo BERKOVITZ & THOMAS, (1969), a erupção média dos dentes seccionados e desimpedidos, alcançam valores controles poucos dias após a resecção e é mantida até o dente estar prestes a sair do alvéolo. Desde que uma variedade de agentes, como hormônios (hidrocortisona, tiroxina) e drogas (demecolcina, aminoacetoneitrila), têm o mesmo efeito sobre a erupção dos dentes normais, e naqueles separados da sua porção embrionária, o mecanismo de erupção destes dentes podem ser considerados semelhantes (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982). Estes experimentos mostraram, portanto, que a formação e crescimento de estruturas como cemento, osso e polpa não devem influir no processo, indicando que a única estrutura capaz de promover o movimento é o ligamento periodontal.

A grande maioria dos estudos relacionados ao processo, procurando esclarecer o mecanismo gerador da força eruptiva, tem usado dentes de crescimento contínuo como modelo, medindo as taxas de erupção ou as forças exercidas ou necessárias para interromper o movimento, em condições normais ou sob ação de vitaminas, hormônios, ou alterações na oclusão, que aceleram ou retardam a erupção.

Três hipóteses foram até agora formuladas para explicar a geração da força eruptiva: contração do colágeno periodontal, migração e/ou contração dos fibroblastos periodontais e a pressão hidrostática do tecido.

A hipótese da contração do colágeno periodontal foi desenvolvida por THOMAS (1965, 1976), que sugeriu uma variedade de mecanismos bioquímicos para esta contração. Porém, os mecanismos propostos não podem ser relacionados com condições fisiológicas, porque foram obtidos *in vitro*, através de aquecimento, ou através de sua suspensão em brometo de lítio, guanidina e uréia (BAILEY, 1968, 1976).

Apesar da falta de evidências para mostrar a contração do colágeno, experimentos têm sido desenvolvidos para avaliar a hipótese da contração do colágeno, usando dietas deficientes em vitamina C, hidrocortisona e drogas laticogênicas, que alteram as ligações cruzadas da molécula de colágeno. Em relação à vitamina C e cortisona, BERKOVITZ (1974) e BALL (1977) entre outros, mostraram que esta última acelera a taxa de erupção e a falta de vitamina C retarda. Desde que outros sistemas, como o vascular, por exemplo, podem ser afetados pela vitamina C e

cortisona, a interpretação destes resultados é complicada (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982). Usando drogas laticogênicas, BERKOVITZ *et al.* (1972) entre outros, mostraram que, embora os dentes pudessem ser facilmente extraídos após sua administração, as taxas de erupção permaneceram inalteradas. Alguns investigadores, como THOMAS (1976), acreditam que o processo de maturação das ligações cruzadas do colágeno pode estar relacionado com a erupção. Entretanto, o relacionamento causal entre ação dos laticogênicos e retardo na erupção não está ainda estabelecido.

Segundo MOXHAM & BERKOVITZ (1982), autores como MAGNUSSON e GRANT *et al.* evidenciaram em molares de ratos e em dentes permanentes de saguis, respectivamente, que no início dos movimentos eruptivos, as fibras de colágeno do ligamento periodontal não apresentavam orientação definida, mostrando a impossibilidade de se produzir uma força eruptiva efetiva.

Há, portanto, poucas evidências a favor e muitas contra ao conceito de que forças eruptivas são geradas por contração do colágeno no ligamento periodontal. Todavia, o colágeno pode ter papel no processo eruptivo, pela resistência às forças de erupção, ou por sua remodelação, permitindo movimentos eruptivos produzidos por outros sistemas (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982).

A possibilidade do fibroblasto do ligamento periodontal ser responsável pela força eruptiva, foi primeiramente sugerida por NESS (1967), contudo, sem observações experimentais, mas sim, pela demonstração de 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). Apesar de AZUMA *et al.* (1975) terem distinguido no ligamento periodontal 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 & BERKOVITZ, 1979).

Um modelo *in vitro*, simulando a erupção dental foi reproduzido por BELLOWS *et al.*, (1983), usando fibroblastos cultivados de ligamento e gel de colágeno como ligamento e segmentos de raízes descalcificadas. Neste experimento, os resultados endossam a possibilidade de que as forças eruptivas residem no ligamento e que a provável ação do conjunto fibroblastos-fibras colágenas deste ligamento seria a responsável pela geração destas forças, mostrando que os movimentos eruptivos são células e fibras dependentes. Quando a este meio de cultura foram introduzidas drogas como colcemida e citocalasina D, observaram que, dependendo da concentração destas drogas, a inibição da contração do sistema era nula, pouca ou total. Neste experimento, entretanto, as forças geradas pelos fibroblastos não foram medidas e portanto não ficou claro se seriam suficientes para promover a erupção. KASUGAI *et al.* (1990), observaram que 10^4 fibroblastos obtidos de cultura de ligamento de pré-molares de cão e cultivados em gel de colágeno, podem gerar forças de $5,2 \times 10^{-4}$ N que, segundo os autores, seriam suficientes para a erupção.

Tem sido proposto também, além da contração, que a migração dos fibroblastos do ligamento, em direção oclusal, tracionaria o dente através das fibras colágenas, erupcionando-o (NESS, 1970, e BEERTSEN *et al.*, 1974). O retardo da erupção por drogas antimicrotubulares, como a colchicina e demecolcina e a

vimblastina que bloqueiam as mitoses, tem sido usado como argumento a favor desta hipótese. Todavia, questiona-se se esta migração seria causa ou efeito da erupção. Mas, segundo MOXHAM & BERKOVITZ (1982), se as fibras colágenas são alteradas com o uso de latirogênicos, sem interromper a erupção, isto depõe contra esta hipótese.

Evidências que suportam o conceito da migração dos fibroblastos, podem ser obtidos do trabalho de ZAJICEK (1974), que demonstrou, em faixas paralelas ao dente, que na faixa de 20 a 30 μ m 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, SHORE & BERKOVITZ (1978), descreveram um modelo baseado na deformação das fibras colágenas no ligamento periodontal, como resultado do movimento eruptivo, o qual pode explicar diferentes taxas de migração dos fibroblastos dentro do ligamento, sem recorrer à movimentação ativa do fibroblasto.

A pressão hidrostática do líquido tissular dos tecidos conjuntivos dentais foi sugerida como força eruptiva, por NESS & SMALLE (1959). Segundo GUYTON (1972), este líquido associa-se à substância fundamental, que, quando isolada e em meio eletrolítico, aumenta de volume 30 a 50%, exercendo considerável pressão. Segundo esta hipótese, deveria existir um gradiente de pressão ao longo do ligamento para que a força resultante movesse o dente para fora do alvéolo. Porém, as pressões intrateciduals não foram suficientemente estudadas (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982). A evidência mais concreta deste gradiente, segundo Van HASSEL & McMINN (1972), é o diferencial de pressão intrapulpar entre o dente decíduo e o permanente que está erupcionando e que atinge 23 ± 6 mm Hg acima

da pressão atmosférica neste último, enquanto é cerca de 10 ± 5 mm Hg acima de pressão atmosférica no primeiro, originando uma força de aproximadamente 15 g ($\sim 0,15N$).

Segundo MOXHAM (1979a), os movimentos eruptivos são sincrônicos com o pulso arterial e se alteram com mudanças desta pressão. A participação de capilares fenestrados, neste caso, pode ter importantes implicações na fisiologia do ligamento periodontal. MOXHAM *et al.* (1985), observaram no ligamento periodontal de ratos, que capilares fenestrados são muito mais numerosos próximo à região apical da raiz. Esta distribuição pode ser relacionada com a alta taxa de erupção que tem estes dentes (dentes de crescimento contínuo), e/ou com a alta atividade metabólica do ligamento periodontal nesta região. Neste mesmo trabalho, os autores reportaram também que a vascularização do ligamento periodontal de molares de rato totalmente erupcionados (dentes de crescimento limitado) tem cerca de 4 vezes mais fenestrações do que no ligamento periodontal de incisivos. Isto sugere que a presença de fenestrações no ligamento periodontal pode não ser diretamente relacionada ao mecanismo eruptivo. Comparando-se porém, a quantidade de capilares fenestrados por unidade de área, entre ligamento periodontal de molares de rato em erupção e molares já erupcionados, que é maior no 1º caso, (MOXHAM *et al.* (1987) sugere que esta diferença nos vasos pode ser efeito e não causa da erupção.

Simpatectomia e uso de drogas vaso-ativas, têm apresentado resultados contraditórios na literatura, (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982). Contudo, os trabalhos de MOXHAM (1978, 1979b) e 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. Utilizando este recurso, MOXHAM & BERKOVITZ (1983a) observaram que a administração da droga hipotensiva hexametonio, provoca um imediato aumento na taxa de erupção de incisivos de coelhos (dentes de crescimento contínuo) mas não altera erupção de caninos de furção (dentes de crescimento limitado) quando no início da fase funcional de oclusão. No entanto, a mesma droga provoca um significativo retardo na taxa de erupção destes dentes, quando ainda em erupção (MOXHAM & BERKOVITZ, 1988). Estes resultados contraditórios podem ser reflexos de diferenças no processo eruptivo entre dentes de crescimento contínuo e limitado e demonstram mudanças morfológicas relacionadas com a fase eruptiva (MOXHAM & BERKOVITZ, 1989). Tais resultados também suportam a hipótese de que o processo eruptivo é complexo e envolve vários fatores.

Segundo MOXHAM & BERKOVITZ (1983b), o mecanismo de erupção dental parece ser um processo multifatorial, relacionado ao ligamento periodontal, envolvendo: a geração de forças capazes de extrair o dente; a translação desta força em movimento que deve inclusive vencer a resistência que lhes 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 remodelação dos tecidos periodontais para manutenção da integridade do sistema. Assim, alterações na taxa de erupção podem ser devidas a: mudanças na força eruptiva ou na resistência dos tecidos adjacentes, ou por mudanças nas características de remodelação dos tecidos periodontais. Os autores basearam estas hipóteses nos resultados de experimentos envolvendo administração isolada e combinada de drogas

e hormônios como a hidrocortisona, tiroxina e ciclofosfamida, que produzem efeitos diferentes na erupção. Observaram que a tiroxina e a hidrocortisona aceleram as taxas de erupção desimpedida de incisivos de ratos, enquanto que a ciclofosfamida as retarda. Os dois hormônios combinados produzem uma aceleração maior do que cada um isolado, enquanto que a combinação de ciclofosfamida e hidrocortisona produziu um retardo semelhante ao encontrado pela ciclofosfamida isolada, sugerindo que as ações destas substâncias se fazem em sítios diferentes e consistentes com a idéia de que o processo de erupção era multifatorial. Segundo os autores, qualquer das substâncias usadas nos estudos experimentais de erupção, pode interferir num dos fatores da erupção podendo inclusive atuar em mais de um simultaneamente. BURN-MURDOCH (1988 e 1990), usando cortisona e ciclofosfamida em ratos com incisivos em oclusão normal, em oclusão desimpedida e ainda dentes que tiveram removidas sua porção odontogênica, endossa esta hipótese de mecanismo multifatorial.

Uma outra série de trabalhos relacionados com erupção, focaliza o metabolismo protéico do ligamento periodontal particularmente do colágeno. Os trabalhos de CARNEIRO & FAVA DE MORAES (1965), DRLOWSKI (1976) e SODEK (1977), mostraram que a taxa de renovação desta proteína no ligamento é a mais rápida em relação aos demais tecidos conjuntivos. Os dados porém, não são inteiramente concordantes, devido provavelmente à metodologia usada.

RIPPIN (1976 e 1978), observou que a meia vida do colágeno em ligamento de molares de ratos varia de 2,4 a 6,4 dias em animais jovens, e 7 a 10,8 dias em adultos. Para SODEK (1978), nos mesmos dentes em ratos adultos, seria de apenas 1 dia e cerca de 3

vezes mais lentos nos incisivos. Em ligamento de incisivos de ratos, ORLOWSKI (1978) calculou a meia vida do colágeno 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 incisivos 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. SODEK (1977, 1978), concluiu que proteínas não-colágenas teriam uma fração de metabolismo rápido e outra de metabolismo lento.

Poucos porém, são os estudos do metabolismo protéico em situações de erupção alterada, e dentre estes, a maioria usou a desocclusão de dentes (occlusão desimpedida) em comparação com dentes em oclusão normal.

SLOOTWEG (1976), mostrou através de um estudo bioquímico, que não há diferenças no metabolismo ou na quantidade de colágeno no ligamento de incisivos desimpedidos de cobaia mas sim, aumento na quantidade e uma significativa diminuição na taxa de renovação de proteínas não-colágenas.

BEERTSEN & EVERTS (1977), usando ^3H -prolina em camundongos, encontraram no ligamento periodontal dos incisivos, uma taxa de renovação mais rápida em dentes desimpedidos do que durante erupção impedida.

Segundo RIPPIN (1978), a renovação do colágeno da crista óssea é acelerada em ligamento de molares sem o contacto com o antagonista (ou seja, em hipofunção), cuja velocidade de erupção também é acelerada.

Van den BOS & TONINO (1984), a partir de um estudo bioquímico, observaram um significativo aumento de proteínas não-colágenas no ligamento periodontal de incisivos de ratos com erupção desimpedida em relação a incisivos em erupção normal, sem haver nenhuma mudança na quantidade de colágeno e glicosaminoglicanas.

Usando drogas latirogênicas, TAVERNE *et al.* (1986), observaram, através de um estudo bioquímico, que no ligamento periodontal de ratos tratados houve um aumento na quantidade de colágeno solúvel.

Provocando retardo na taxa de erupção, através de um efeito hormonal indireto (hemidescorticação) em ratos e após administração de ^3H -glicina, TSÉ *et al.* (1988), mostraram no ligamento periodontal um aumento na biossíntese de proteínas, provavelmente não-colágenas. Os autores explicaram que o acúmulo destas proteínas deveu-se ao hipotireoidismo e conseqüentemente ao mixedema.

Num estudo mais recente, TOSELLO (1990), usando vimblastina para retardar a erupção e após injeção de ^3H -glicina, não verificou alteração na biossíntese de proteínas pelos fibroblastos do ligamento periodontal de incisivos de camundongos mas apontou indícios de que a vimblastina pode provocar acúmulo de proteínas na pré-dentina. Os tempos de sacrifício dos animais após a injeção do composto radioativo, no entanto, foram muito curtos, insuficientes para se avaliar a cinética das proteínas no ligamento periodontal e na dentina.

A vimblastina são atribuídos vários efeitos, em função da sua associação com as tubulinas, inibindo sua organização em microtúbulos (WILSON *et al.*, 1974). Provoca uma série de efeitos

citotóxicos, tais como: paralisação das mitoses em metáfase, desorganização do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso (ERLICH *et al.*,1974; MOSKALEWSKY *et al.*,1975; THYBERG *et al.*,1978), alterando assim o processo de secreção , como descrito em relação à formação do colágeno por osteoblastos e fibroblastos (ERLICH *et al.*,1974). Segundo MOE (1977 e 1979), e MOE & MIKKELSEN (1977 a. e b.), a vimblastina usada em tempos curtos provocou em ameloblastos, a exocitose do produto de secreção em lugares anômalos. Como efeito tardio, produziu a morte de células, ao passo que as remanescentes reassumiam a atividade secretora normal. Através de incorporação de ³⁵S-sulfato, AZEVEDO *et al.* (1982), mostraram também que nos ameloblastos a vimblastina inibe parcialmente a biossíntese de glicosaminoglicanas e retarda sua exocitose.

Este trabalho é uma ampliação do trabalho de TOSELLO (1990) e tem o objetivo de analisar o metabolismo das proteínas, marcadas por ³H-glicina e visualizadas através de radioautografia, em ligamento periodontal de incisivos de camundongos com erupção normal ou desimpedida e retardada pela vimblastina, na tentativa de contribuir para o estudo do mecanismo eruptivo.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos albinos, Swiss, machos adultos, pesando entre 23 e 39 g., foram utilizados em três experimentos sendo trinta e dois no primeiro, vinte no segundo e doze no terceiro. Nos três experimentos, 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).

Os incisivos inferiores esquerdos de todos os animais foram seccionados à altura da papila interdental para desimpedir a oclusão, procedimento repetido a cada dois dias. Os incisivos inferiores direitos permaneceram em oclusão normal, no decorrer dos experimentos.

No décimo segundo dia a partir do início do seccionamento dos incisivos, injetou-se intraperitonealmente uma dose de 2 mg /kg de peso corporal de vimblastina (Velban, Lilly) diluída em soro fisiológico nos animais tratados e um volume equivalente de soro fisiológico nos animais controles.

No primeiro experimento, duas horas após a administração de vimblastina, injetou-se, pela mesma via, 5 μ Ci /g de peso de 3 H-glicina (Amersham, Int.) em todos os animais. Dois animais tratados e dois controles foram sacrificados em cada um dos seguintes tempos : 1, 4, 12, 24, 36, 48, 72, e 96 horas após a injeção do precursor radioativo.

No segundo experimento, a mesma dose de 3 H-glicina, foi injetada 24 horas após a aplicação de vimblastina e os animais foram

sacrificados 1, 12, 24, 48 e 96 horas após a injeção do aminoácido, sendo dois animais (T) e dois (C) por tempo.

No terceiro experimento injetou-se também a mesma dose de ^3H -glicina duas horas após a aplicação de vimblastina em todos os animais, sendo que três tratados e três controles foram sacrificados 1 e 96h após a injeção do precursor radioativo.

O seccionamento dos incisivos inferiores esquerdos continuou sendo efetuado a cada dois dias até o sacrifício dos animais.

Nos experimentos 1 e 2, todos os animais, sob a anestesia com éter sulfúrico, foram perfundidos via intracardiaca durante quinze minutos, com fixador de KARNOWSKY (1965) para perfusão e as hemimandíbulas retiradas e após a remoção dos tecidos moles ao redor, foram imersas no mesmo fixador KARNOWSKY (1965) para imersão à 4°C , por mais quatro horas, sendo em seguida lavadas e estocadas em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2 à 4°C .

As hemimandíbulas foram desmineralizadas em EDTA pH 7,4 (WARSHAWSKY & MOORE, 1967), sob agitação constante a 4°C , por cerca de vinte e cinco dias. Logo após, foram seccionadas transversalmente em três segmentos de comprimento aproximadamente igual, compreendendo as porções basal, média e incisal do dente, sendo que esta última, correspondente à "coroa clinica", foi desprezada. Os segmentos basal e médio, depois de lavados em tampão fosfato pH 7,3, foram pós-fixados em ósmio a 1% em tampão fosfato pH 7,4, desidratados com acetona em concentrações crescentes e incluídas em Poly Bed, de modo a obter-se cortes longitudinais do dente. Os blocos correspondentes ao segmento médio das hemimandíbulas foram

estocados para uma futura utilização.

De cada segmento basal foram obtidos três cortes semi-finos de 1 μ m de espessura, colhidos em lâminas que foram em seguida cobertas com emulsão nuclear Ilford K-5, segundo técnica de KOPRIVA & LEBLOND (1962), e expostas durante trinta dias à 4° C. Após revelação e fixação as radioautografias foram coradas com azul de toluidina à 1%.

No terceiro experimento, sob anestesia com éter sulfúrico, as mandíbulas foram retiradas, dissecadas, separadas em hemimandíbulas e fixadas em Carnoy por 24h. Após lavagem rápida em álcool 50%, as hemimandíbulas foram desmineralizadas em solução de ácido fórmico 45% e citrato de sódio 20%, (CARNEIRO & LEBLOND, 1966), por cinco dias, após o que foram seccionadas em dois segmentos, basal e incisal, divididas na altura do primeiro molar e processados para inclusão em parafina. Para este experimento, usou-se também somente a porção basal, das quais foram obtidos cortes longitudinais de 5 μ m de espessura, colhidos em duas lâminas albuminizadas com três cortes cada uma, por dente.

Depois de desparafinadas, uma lâmina foi incubada com colagenase purificada tipo VII da Sigma, a 50^o (PEARSE, 1980) e outra foi incubada nas mesmas condições, em salina. Após várias lavagens em água destilada, todas as lâminas foram cobertas com emulsão nuclear Ilford K-5 (KOPRIVA & LEBLOND, 1962), expostas por trinta dias, quando foram reveladas, fixadas e coradas com azul de toluidina a 1%.

A concentração de grãos de prata em todas as radioautografias foi determinada em duas regiões do ligamento periodontal: junto ao dente (LP/D) e junto ao osso (LP/O),

utilizando-se para isso, uma ocular reticulada KPL-Zeiss de 10x10 quadrados, medindo cada um, $49 \mu\text{m}^2$ no sistema óptico usado, descontando-se a radiação devida ao "back ground," quantificado numa área de dentina formada antes da injeção do precursor radioativo. Tanto no LP/D como no LP/O, foi contado o número de grãos de prata em quatro áreas escolhidas ao acaso, de $245 \mu\text{m}^2$ por corte. Como controle interno, também foi determinado, em todos os cortes, a concentração de grãos de prata na pré-dentina e dentina, em quatro áreas de $49 \times n \mu\text{m}^2$ sendo n o número de quadrados necessários para cobrir toda a espessura da dentina, desde o ápice dos odontoblastos até o limite externo da marcação pelo precursor radioativo utilizado.

Os dados foram submetidos às seguintes análises estatísticas:

a) análise de variância em blocos ao acaso, após transformação dos dados em raiz quadrada, para comparar as concentrações de grãos de prata entre animais tratados e controles.

b) análise de variância inteiramente ao acaso com regressão, a partir da transformação dos dados em raiz quadrada ou em logaritmo neperiano.

RESULTADOS

RESULTADOS

A contagem de grãos de prata no ligamento periodontal junto ao dente dos incisivos esquerdos (erupção desimpedida) e direitos (erupção normal) nos camundongos do primeiro experimento, (tabela 1), revelou que nos animais sacrificados em tempos mais curtos (1h e 4h) após a injeção do composto radioativo, foi ligeiramente superior nos grupos controles que nos tratados, sendo nos incisivos esquerdos, significativamente superior no tempo de 4h. A partir das 12h a situação se inverteu, passando a ser maior nos grupos tratados, sendo estatisticamente significante na maioria destes tempos, principalmente nos incisivos direitos (em erupção normal).

Resultado semelhante foi encontrado no segundo experimento (tabela 2) onde se observou que no tempo de 1h a concentração de grãos de prata no ligamento periodontal junto ao dente não diferiu entre os animais tratados e controles, tanto nos incisivos esquerdos como nos direitos. Já no tempo de 12h foi ligeiramente maior nos tratados que nos controles, sendo que estas diferenças foram estatisticamente significantes na maioria dos tempos subsequentes.

As diferenças na concentração de grãos de prata no ligamento periodontal junto ao dente entre animais tratados e controles, nos vários tempos de sacrifício no experimento 1, podem ser facilmente observadas na figura 1.

Nas tabelas 1 e 2 , pode-se ainda observar, nos dois experimentos, que a concentração de grãos de prata nos incisivos esquerdos (mantidos em oclusão desimpedida) não diferiu significativamente da apresentada pelos incisivos direitos (oclusão impedida) nos animais tratados e controles.

Em relação à contagem dos grãos de prata no ligamento periodontal junto ao osso, tanto no 1º experimento (tabela 3) como no 2º (tabela 4), os resultados mostraram que, em média, sua concentração foi menor, se comparada ao do ligamento periodontal junto ao dente (tabelas 1 e 2). Embora não tão expressiva, a concentração radioativa no ligamento periodontal junto ao osso (tabelas 3 e 4) se comportou de modo semelhante ao ligamento periodontal junto ao dente, ou seja: nos tempos de 1h e 4h, praticamente não houve diferenças entre os animais tratados e controles. A partir das 12h, os grupos tratados passaram a apresentar maior concentração em relação aos controles, e em alguns tempos com significância estatística.

Para o ligamento de cada dente foram calculadas retas de regressão, transformando-se as concentrações de grãos de prata de cada animal em logaritmos neperianos, cujas equações e respectivos gráficos aparecem nas figuras 2 e 3.

A análise de variância dessas regressões, nos dois experimentos, foi estatisticamente significativa para a maioria dos animais controles, tanto para os dentes esquerdos quanto para os direitos. Com exceção dos incisivos direitos dos animais tratados, no ligamento junto ao dente do 1º experimento, todos os demais não apresentaram regressão estatisticamente significativa (figura 2).

No ligamento periodontal junto ao osso (figura 3) as

regressões relativas ao grupo controle foram estatisticamente significativas na maioria dos casos, ou seja, nos incisivos direitos do 1^o experimento e nos incisivos direitos e esquerdos do 2^o experimento, enquanto nos animais tratados nenhuma regressão foi significativa.

Das equações das retas das figuras 2 e 3, calculou-se a meia vida das substâncias marcadas pela ³H-glicina, relacionadas na tabela 5, onde pode-se observar que o decaimento do material radioativo foi bem mais lento no ligamento de animais tratados, resultando inclusive, em valores absurdos, quando o coeficiente b da reta não diferiu de zero (LP/D de incisivos direitos tratados por 24h e LP/D incisivos esquerdos tratados por 2h).

Na matriz dentinária foi constatado também um acúmulo de material marcado pela ³H-glicina nos animais tratados pela vimblastina, nos experimentos 1 e 2. Acompanhando-se os dados das tabelas 6 e 7 verifica-se que a faixa de maior marcação, correspondente à matriz formada durante o pulso de ³H-glicina e que atingiu o pico às 4h após a injeção do precursor, manteve-se praticamente constante nos tempos seguintes. A matriz formada após o pulso apresentou-se também levemente marcada, possivelmente devido a reutilização metabólica do precursor (JOSEPHSEN & WARSHAWSKY, 1982), marcação esta que aumentou gradativamente até as 96h, sendo este aumento maior nos dentes de animais tratados com vimblastina. Esta descrição pode também ser verificada na série de radioautografias que compõe a figura 1.

No terceiro experimento, alguns incisivos foram perdidos durante o processamento e outros foram desprezados por não

estarem bem orientados. Neste experimento os cortes foram submetidos ou não ao tratamento pela colagenase antes de serem radioautografados. Observando-se a figura 4 pode-se constatar que a enzima removeu parte substancial do material marcado pelo precursor, facilmente notado pelo desaparecimento das faixas de maior marcação, na pré-dentina e dentina, correspondente ao pulso de ^3H -glicina.

O material marcado nas radioautografias tratadas pela colagenase foi considerado proteínas não-colágenas. A diferença de concentração de grãos de prata entre as radioautografias tratadas pela colagenase e as controles, tratadas com salina, foi atribuída às proteínas colágenas. Os dados referentes as estas duas classes de proteínas, no ligamento periodontal junto ao dente (tabela 8), revelaram que, em relação às proteínas colágenas, as diferenças não foram estatisticamente significantes entre os grupos tratados e controles, nos 2 tempos utilizados e em ambos os incisivos. Quanto a distribuição de proteínas não-colágenas, no tempo de 1h após a injeção de ^3H -glicina, foi maior apenas nos incisivos esquerdos dos animais tratados com vimblastina, enquanto que após as 96h, sua concentração foi maior nos grupos tratados com vimblastina, sendo que as diferenças em relação aos controles, tanto nos incisivos direitos como nos esquerdos, foram estatisticamente significantes.

Resultados semelhantes foram observados no ligamento periodontal junto ao osso (tabela 9), somente que a diferença de concentração às 96h não foi significativa ao nível de 5%, embora o valor de F estivesse muito próximo da significância.

TABELA 1 - Concentração de grãos de prata no ligamento periodontal junto ao dente de incisivos inferiores de camundongos tratados com vioblastina (2h) e sacrificados vários tempos após a injeção de ¹²⁵I-glicina.

TEMPO h	ERUPÇÃO DESIMPEDIDA (I.E)		ERUPÇÃO NORMAL (I.D)	
	TRATADO	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE
1	12,50±1,33	15,41±1,41	15,40±1,98	16,71±4,54
4	11,67±1,83	* 19,29±1,54	15,42±0,08	16,17±2,75
12	20,00±0,92	16,33±1,83	19,04±1,88	14,75±0,08
24	* 20,67±0,75	10,50±1,00	16,21±2,54	13,00±3,67
36	* 19,29±2,88	11,16±0,16	* 19,75±4,17	8,79±0,21
48	12,00±0,17	9,26±1,24	* 16,38±4,46	8,96±2,46
72	11,38±1,12	6,67±0,42	* 11,00±1,00	4,17±0,33
96	* 10,58±1,50	5,04±3,54	* 10,79±0,04	3,71±2,04

- os valores representam a média e DPM do número de grãos de prata contados em 12 áreas de 245 μm^2 por animal e em 2 animais por tempo.

* - diferença entre tratados e controles estatisticamente significativa, (p<0,05).

TABELA 2 - Concentração de grãos de prata no ligamento periodontal junto ao dente de incisivos inferiores de camundongos tratados com vimblastina (24h) e sacrificados vários tempos após a injeção de ³H-glicina.

TEMPO h	ERUPÇÃO DESIMPEDIDA (I.E)		ERUPÇÃO NORMAL (I.D)	
	TRATADO	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE
1	7,46±1,62	9,17±0,58	8,25±4,25	8,38±3,04
12	11,83±0,08	6,54±0,13	12,38±3,63	6,58±1,58
24	* 12,25±4,08	3,70±2,05	* 11,04±3,04	3,25±2,25
48	* 9,25±0,75	4,59±0,59	9,00±0,92	3,67±0,42
96	* 6,54±0,63	2,13±0,04	* 10,33±2,00	1,92±0,33

- os valores representam a média e DPM do número de grãos de prata contados em 12 áreas de 245 μm^2 por animal e em 2 animais por tempo.

* - diferença entre tratados e controles estatisticamente significante, (p<0,05).

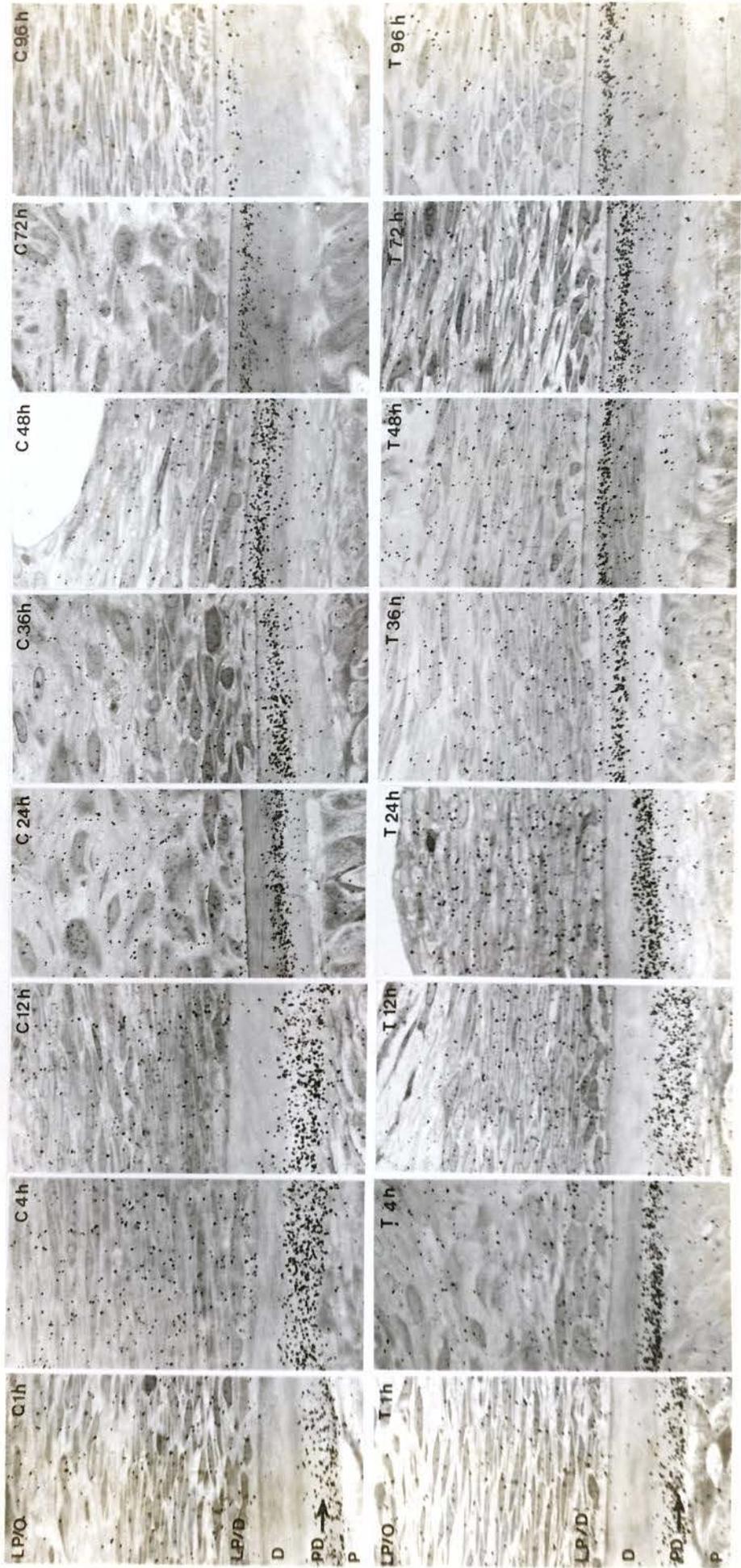


Figura 1 - Radioautografias do ligamento periodontal e dentina de incisivos inferiores de camundongos tratados com vimblastina (2h) e sacrificados vários tempos após a injeção de ^3H -glicina.

C 1h a 96h - Animais controles.

T 1h a 96h - Animais tratados com vimblastina.

Nota-se que nos tempos mais curtos (1h, 4h) a concentração de grãos de prata é aparentemente um pouco maior no ligamento periodontal (LP) dos animais controles do que nos tratados. A partir das 24h os animais tratados apresentam concentrações superiores aos controles e esta diferença acentua-se nos tempos mais longos (72h e 96h).

A faixa de maior concentração de grãos de prata na matriz dentinária produzida pelo pulso do precursor radioativo (seta), limita-se à Pré-dentina nos tempos de 1h e 4h, atingindo seu pico neste último. Gradativamente, esta faixa se afasta da camada de odontoblastos, pela produção de mais matriz dentinária que se apresenta levemente marcada até 96h após, devido a possível reutilização do precursor radioativo após o pulso. Nesta matriz, a concentração de grãos é aparentemente maior nos animais tratados em relação aos controles.

LP/D - Ligamento periodontal junto ao dente

LP/O - Ligamento periodontal junto ao osso

PD - Pré-dentina

D - Dentina

P - Polpa

Azul de Toluidina-400x.

TABELA 3 - Concentração de grãos de prata no ligamento periodontal junto ao osso de incisivos inferiores de camundongos tratados com vinblastina (2h) e sacrificados vários tempos após a injeção de ^3H -glicina.

TEMPO h	ERUPÇÃO DESIMPEDIDA (I.E)		ERUPÇÃO NORMAL (I.D)	
	TRATADO	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE
1	6,92±0,50	10,90±0,10	12,00±2,75	10,87±2,45
4	5,71±0,38	5,85±3,13	8,83±3,75	5,71±1,29
12	* 11,63±3,55	3,25±0,50	8,88±0,30	7,13±0,55
24	9,04±3,29	9,79±2,96	11,04±0,71	5,00±2,67
36	10,75±1,00	6,75±0,33	11,38±3,80	8,16±3,41
48	5,67±0,34	5,17±0,17	10,88±2,21	0,09±1,92
72	* 9,34±1,34	4,38±1,21	* 4,59±1,92	0,79±0,30
96	5,63±1,12	2,61±0,56	8,09±0,17	3,00±1,50

- os valores representam a média e DPM do número de grãos de prata contados em 12 áreas de 245 μm^2 por animal e em 2 animais por tempo.

* - diferença entre tratados e controles estatisticamente significante, ($p < 0,05$).

TABELA 4 - Concentração de grãos de prata no ligamento periodontal junto ao osso de incisivos inferiores de camundongos tratados com viablantina (24h) e sacrificados vários tempos após a injeção de ^3H -glicina.

TEMPO h	ERUPÇÃO DESIMPEDIDA (I.E)		ERUPÇÃO NORMAL (I.D)	
	TRATADO	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE
1	5,88±1,63	5,38±0,13	5,54±1,54	6,17±1,17
12	8,08±1,75	4,25±0,92	6,63±0,79	5,58±0,50
24	6,50±1,92	2,74±1,43	* 6,00±0,33	2,29±0,88
48	6,79±2,62	3,33±0,92	4,96±0,96	3,00±0,58
96	* 4,63±1,29	1,25±0,33	* 4,63±1,46	1,50±0,33

- os valores representam a média e DPM do número de grãos de prata contados em 12 áreas de 245 μm^2 por animal e em 2 animais por tempo.

* - diferença entre tratados e controles estatisticamente significante, ($p < 0,05$).

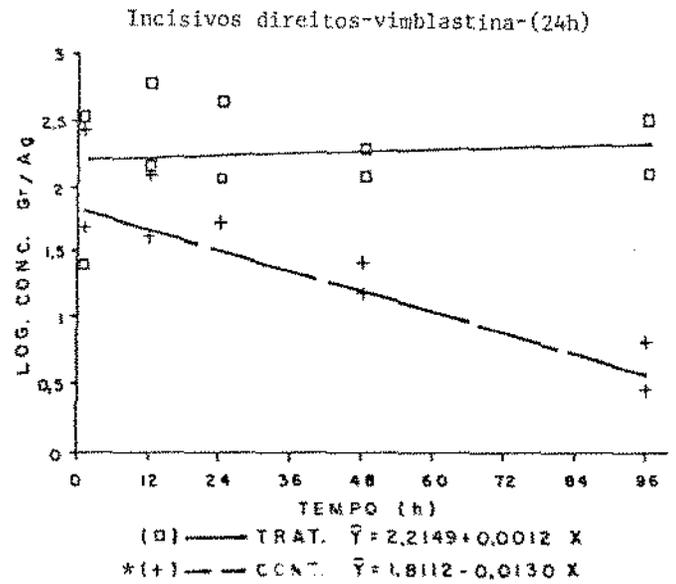
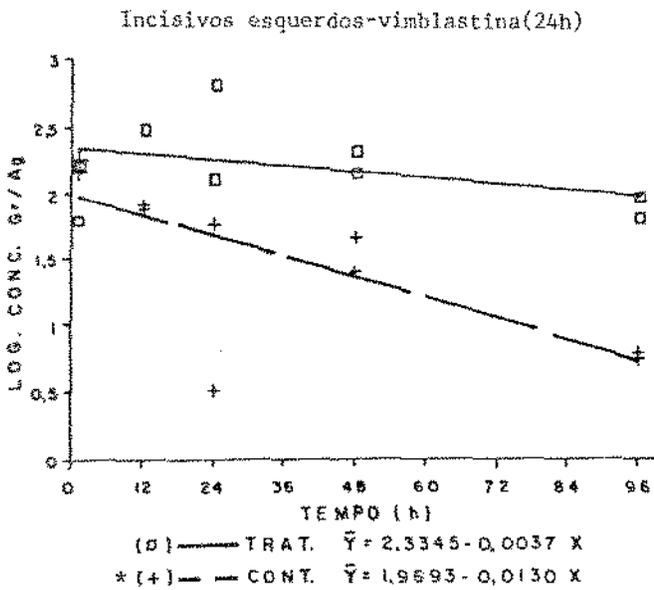
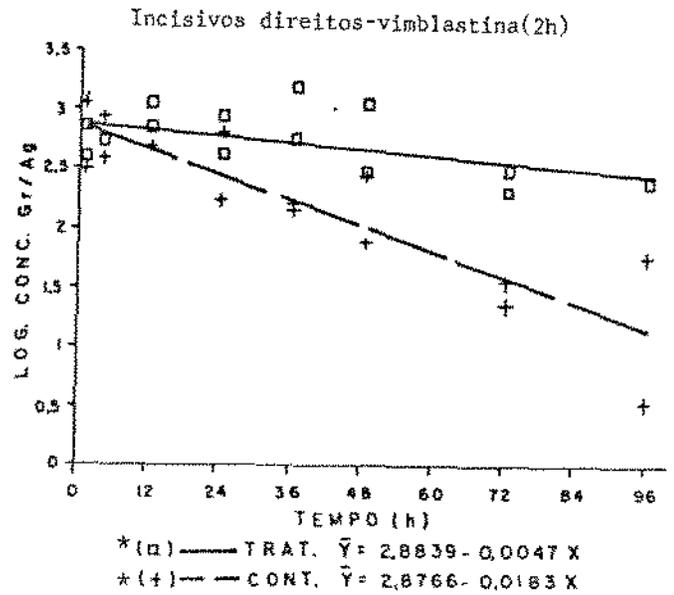
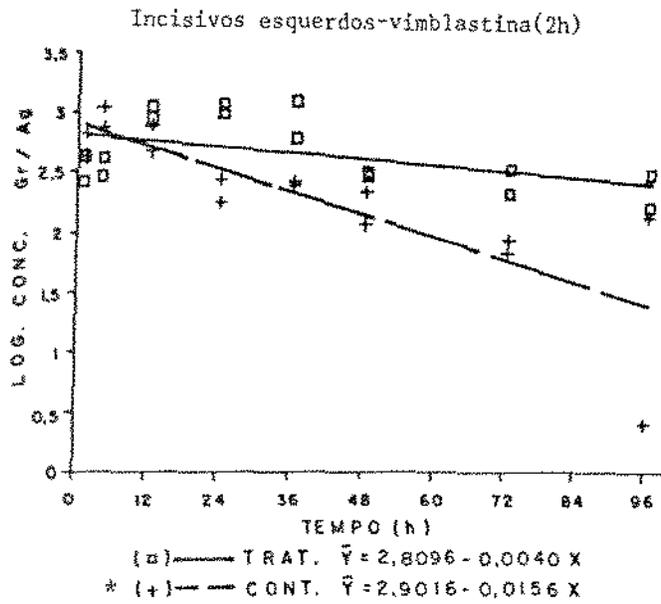


Figura 2 - Retas de regressão dos logarítmos das concentrações de grãos de prata no ligamento periodontal junto ao dente.

* - regressão linear estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

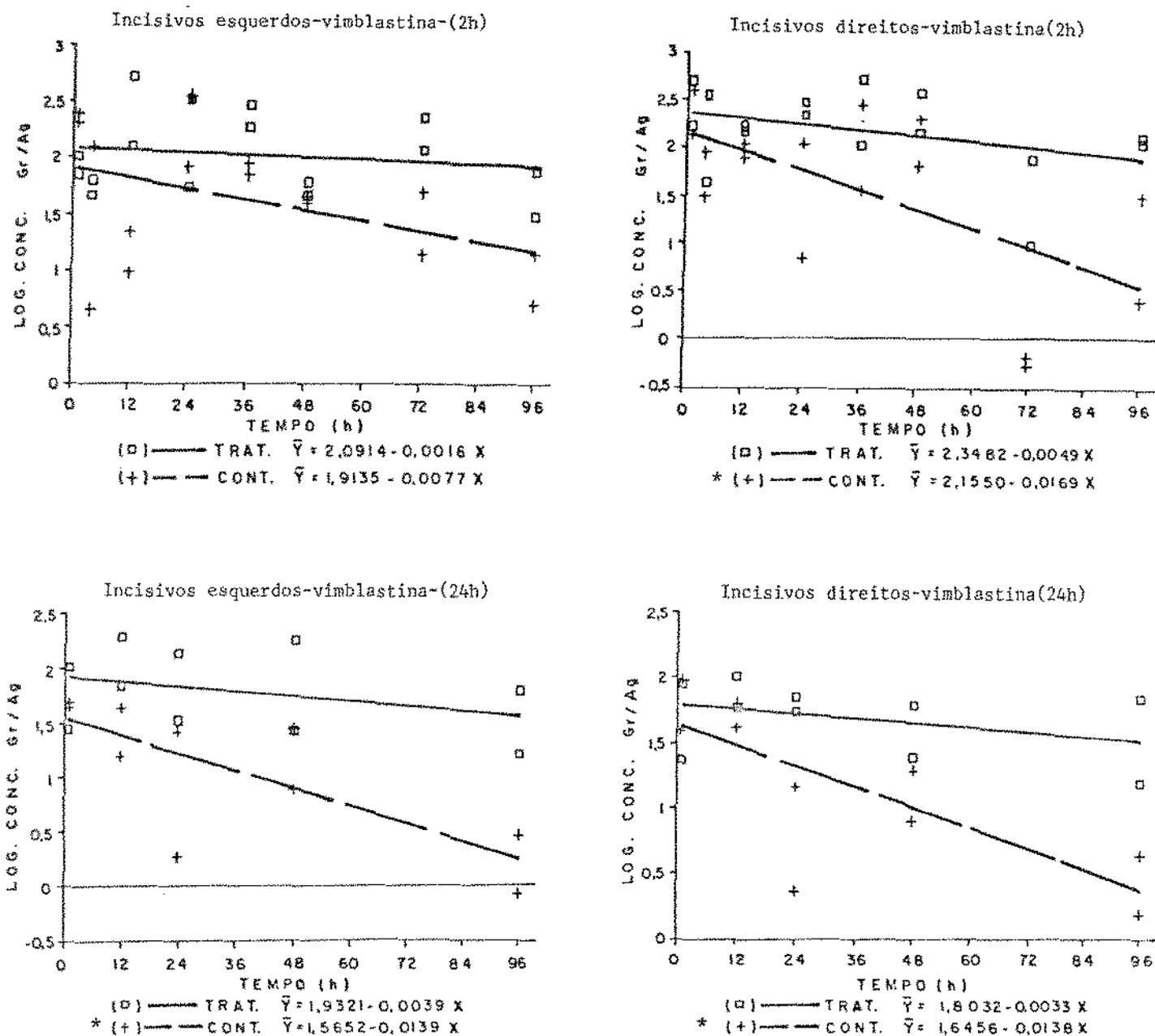


Figura 3 - Retas de regressão dos logarítmos das concentrações de grãos de prata no ligamento periodontal junto ao osso.

* - regressão linear estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

TABELA 5 - Meia vida (h) da ^3H -glicina no ligamento periodontal de incisivos inferiores de camundongos tratados com vimblastina.

VIMBLASTINA	L P / DENTE		L P / OSSO	
	INCISIVOS ESQUERDOS		INCISIVOS ESQUERDOS	
	TRATADO	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE
2h	173,2	44,4	433,1	90,0
24h	187,3	53,3	177,6	49,8
	INCISIVOS DIREITOS		INCISIVOS DIREITOS	
2h	147,4	37,8	141,4	41,0
24h	577,5	53,3	210,0	50,2

- Valores calculados a partir das retas de regressão das figuras 2 e 3.

TABELA 6 - Secreção proteica produzida pelos odontoblastos, indicada pela incorporação de ^3H -glicina na matriz dentinária de incisivos inferiores de camundongos tratados com vimblastina (2h), vários tempos após a injeção do precursor radioativo (n=2).

INCISIVOS ESQUERDOS						
HORAS	TRATADO			CONTROLE		
	AUMENTO			AUMENTO		
	2R ¹	2R+nR ²	% ³	2R ¹	2R+nR ²	% ³
4	319	319	0	336	336	0
12	298	316	6,0	320	332	3,8
24	289	310	7,3	251	271	8,0
36	332	380	14,5	285	314	10,2
48	229	276	20,5	301	339	12,6
72	234	284	21,4	210	242	15,2
96	224	284	26,8	173	204	17,9
INCISIVOS DIREITOS						
4	236	236	0	295	295	0
12	236	272	6,3	229	230	0,4
24	305	351	15,2	205	210	2,4
36	313	259	14,7	278	299	7,6
48	212	242	14,2	167	182	9,0
72	223	266	19,3	130	136	4,6
96	255	318	24,7	197	237	20,3

1 - Concentração média de grãos de prata em 2 retângulos de $196 \mu\text{m}^2$, medida em 3 cortes por animal.

2 - Concentração de grãos de prata na área equivalente a 2R, acrescida de mais retângulos de $196 \mu\text{m}^2$ sucessivos, entre a faixa de 2R e o ápice dos odontoblastos, que representam a espessura da matriz dentinária (Pré-dentina e dentina) formada a partir da 4^ah após a injeção de ^3H -glicina. As 96h a faixa de matriz dentinária marcada equivale a aproximadamente de 7 a 8R.

3 - Aumento percentual em relação à concentração da área 2R considerada como 0%.

TABELA 7 - Secreção proteica produzida pelos odontoblastos, indicada pela incorporação de ^3H -glicina na matriz dentinária de incisivos inferiores de camundongos tratados com vimblastina (24h), vários tempos após a injeção do precursor radioativo (n=2)

INCISIVOS ESQUERDOS						
HORAS	TRATADO			CONTROLE		
	2R ¹	2R+xR ²	AUMENTO ³	2R ¹	2R+xR ²	AUMENTO ³
12	180	188	4,4	111	115	3,6
24	133	143	7,5	53	58	9,4
48	121	153	26,4	93	99	6,5
96	98	130	32,7	53	65	22,6
INCISIVOS DIREITOS						
12	194	218	12,4	115	119	3,4
24	129	142	10,1	62	68	9,6
48	122	143	17,2	65	71	9,2
96	140	171	22,1	59	68	15,3

1 - Concentração de grãos de prata em 2 retângulos de $196 \mu\text{m}^2$, medida em 3 cortes por animal.

2 - Concentração de grãos de prata na área equivalente a 2R, acrescida de mais retângulos de $196 \mu\text{m}^2$ sucessivos, entre a faixa de 2R e o ápice dos odontoblastos, que representam a espessura da matriz dentinária (Pré-dentina e dentina) formada a partir da 4th após a injeção de ^3H -glicina. As 96h a faixa de matriz dentinária marcada equivale a aproximadamente de 7 a 8R.

3 - Aumento percentual em relação à concentração da área 2R considerada como 0%.

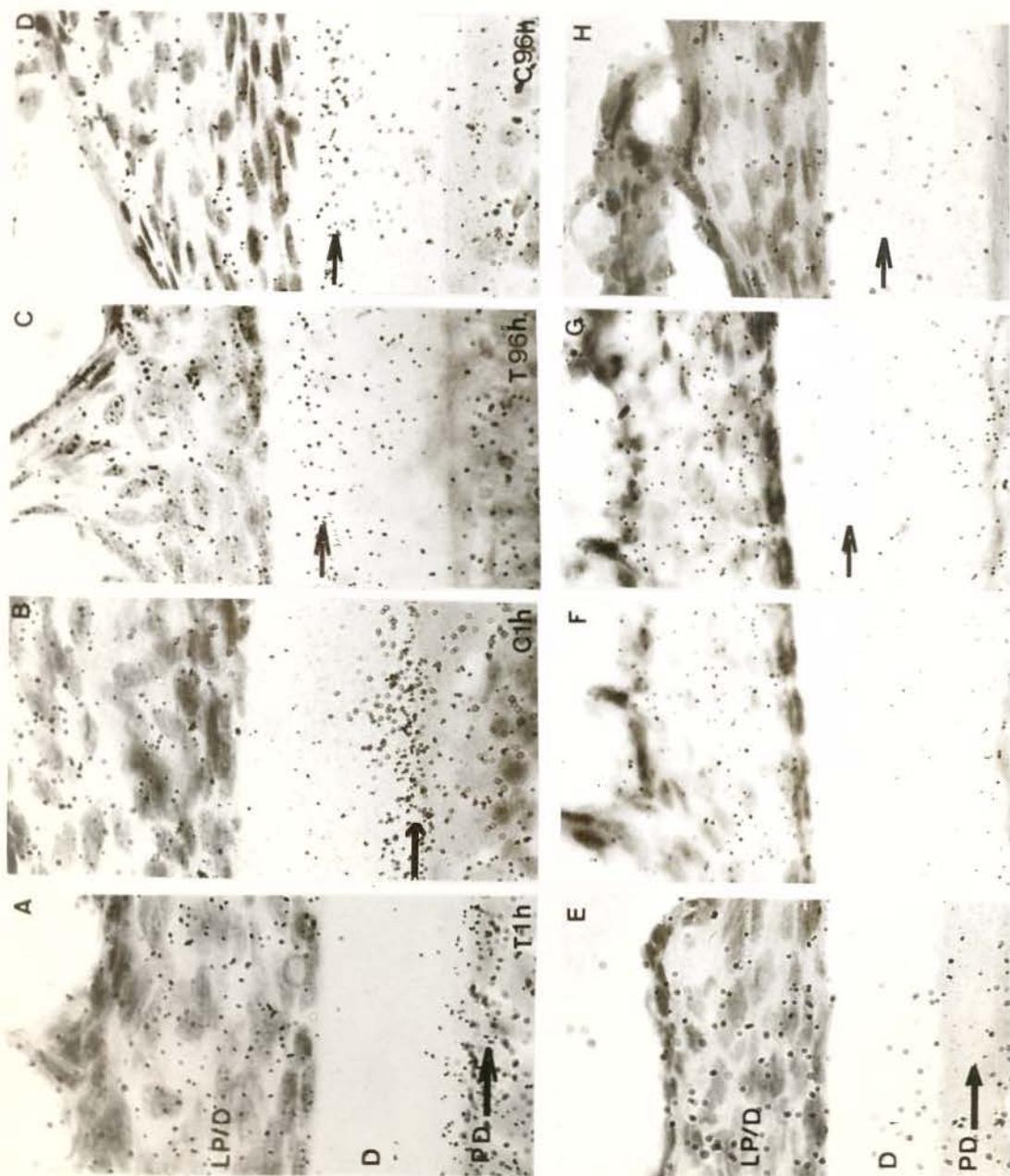


Figura 4 - Radioautografias do ligamento periodontal e dentina de incisivos inferiores de camundongos tratados com vimblastina (2h) e sacrificados 1h e 96h após a injeção de ^3H -glicina.

A a D - Radioautografias sem tratamento com colagenase.

E a H - Radioautografias com tratamento prévio pela colagenase.

T 1h e 96h - Animais tratados com vimblastina.

C 1h e 96h - Animais controles.

A colagenase provocou uma redução do número de grãos de prata, tanto no ligamento periodontal junto ao dente (LP/D), como na matriz dentinária (PD - pré-dentina, D - dentina), mais evidente na faixa de maior concentração, correspondente ao pulso do precursor radioativo (setas). Às 96h nota-se que a concentração de grãos de prata após tratamento com a colagenase é nitidamente maior no animal tratado (G) do que no controle (H).

Azul de Toluidina-400x.

TABELA 8 - Concentração de grãos de prata indicativa da distribuição de colágeno e proteínas não colágenas marcadas pela ^3H -glicina (1 e 96h após a injeção) através da ação de colagenase no ligamento periodontal junto ao dente de incisivos inferiores de camundongos tratados pela vimblastina (2h).

ERUPÇÃO DESIMPEDIDA (I.E)					
HORAS	TRATADOS		CONTROLES		
	P.NÃO COL.	P.COL.		P.NÃO COL.	P.COL.
1 (n=2)	* 55,8 (84,8%)	10,6 (16,0%)	(n=3)	39,5 (80,3%)	9,7 (19,7%)
96 (n=2)	* 23,7 (63,2%)	13,8 (36,8%)	(n=3)	9,7 (42,7%)	13,0 (57,3%)
ERUPÇÃO NORMAL (I.D)					
1 (n=2)	34,5 (81,8%)	7,7 (18,2%)	(n=3)	33,3 (77,3%)	9,8 (22,7%)
96 (n=3)	* 25,7 (72,8%)	9,6 (27,2%)	(n=2)	9,3 (56,8%)	7,3 (44,8%)

P.NÃO COL. - concentração de grãos de prata nos cortes submetidos à colagenase. *diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre tratados e controles.

P.COL. - concentração de grãos de prata igual a diferença entre cortes não tratados e tratados pela colagenase.

Os valores representam a média da contagem de grãos de prata em 12 áreas de $245, \mu\text{m}^2$ por animal, sendo n= ng de animais por tempo.

Entre parênteses estão as porcentagens relativas ao ng total de grãos de prata nos radioautogramas não tratados pela colagenase.

TABELA 9 - Concentração de grãos de prata indicativa da distribuição de colágeno e proteínas não colágenas marcadas pela ³H-glicina (1 e 96h após a injeção) através da ação de collagenase no ligamento periodontal junto ao osso de incisivos inferiores de camundongos tratados pela viablastina (2h).

ERUPÇÃO DESIMPEDIDA (I.E)					
HORAS	TRATADOS		CONTROLES		
	P.NAO COL.	P.COL.		P.NAO COL.	P.COL.
1 (n=3)	22,5 (63,0%)	13,2 (37,0%)	(n=3)	17,7 (53,0%)	15,7 (47,0%)
96 (n=2)	* 15,8 (85,0%)	2,8 (15,0%)	(n=3)	5,4 (34,8%)	10,1 (65,2%)
ERUPÇÃO NORMAL (I.D)					
1 (n=2)	15,2 (68,8%)	6,9 (31,2%)	(n=3)	14,9 (50,9%)	14,4 (49,1%)
96 (n=3)	* 15,7 (62,1%)	9,6 (37,9%)	(n=2)	5,2 (39,4%)	8,0 (60,6%)

P.NAO COL. - concentração de grãos de prata nos cortes submetidos à collagenase. * diferença estatisticamente significativa ($0,05 < p < 0,1$) entre tratados e controles.

P.COL. - concentração de grãos de prata igual a diferença entre cortes não tratados e tratados pela collagenase.

Os valores representam a média da contagem de grãos de prata em 12 áreas de $245, \mu\text{m}^2$ por animal, sendo n= nº de animais por tempo.

Entre parênteses estão as porcentagens relativas ao nº total de grãos de prata nos radioautogramas não tratados pela collagenase.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados revelaram que, nos tempos mais curtos, de 1h a 12h após a injeção de ^3H -glicina, não houve diferenças entre a concentração de proteínas marcadas no ligamento periodontal de incisivos de camundongos tratados com vimblastina, por 2h e por 24h, em relação aos animais controles. Resultados semelhantes foram encontrados por TOSELLO (1990), no ligamento periodontal de incisivos de camundongos tratados pela mesma droga por 24h, 48h, 72h e 96h e sacrificados em intervalos de tempo de 1h a 6h, após a injeção de ^3H -glicina, indicando que na região do ligamento estudada, a biossíntese proteica não foi alterada pela droga.

Usando-se porém, tempos mais longos após a injeção do composto radioativo, os resultados mostraram, que à partir de 12/24h a concentração de proteínas marcadas no ligamento periodontal de incisivos de animais tratados é maior que nos controles, indicando que a exocitose e/ou a degradação dessas substâncias foi inibida, refletindo-se no acúmulo de material protéico no tecido e no aumento da meia vida do material marcado.

O acúmulo de material radioativo pôde também ser observado na matriz dentinária. Segundo JOSEPHSEN & WARSHAWSKY (1982), uma camada de dentina formada logo após o pulso de um aminoácido marcado, atinge o máximo de concentração radioativa até as 4h após a injeção deste precursor, constituindo-se numa faixa de maior radioatividade, de espessura igual à da pré-dentina. Esta

faixa, quando se transforma em dentina permanece estável nos tempos subsequentes estudados (8 dias). Parte do material marcado usado pelos odontoblastos e provavelmente por outras células dos tecidos dentais, é metabolizado e reutilizado para síntese, resultando na marcação bem menor da matriz dentinária posterior ao pulso, marcação esta que aumenta gradualmente com o tempo. A quantidade de material reutilizado depende do precursor. Os autores citados, mostraram diferenças entre prolina e tirosina e no presente estudo também foi comprovada a reutilização de ^3H -glicina, mostrando, por outro lado, que a quantidade de precursor disponível para nova síntese foi aparentemente maior em animais tratados com vimblastina.

Embora aparentemente significativos no seu conjunto, os dados da concentração de material radioativo na dentina e pré-dentina não foram submetidos à análise estatística, pois eles podem ter sofrido alguma distorção devido à geometria dos cortes, que não foram planejados para se obter faixas de dentina homogêneas. Cortes com inclinações variáveis, resultaram em larguras diferentes da pré-dentina e da faixa de maior marcação. Razão também pela qual, a concentração da faixa de maior marcação que se mostrou aparentemente estável de 4 às 96h, confirmando os resultados de JOSEPHSEN & WARSHAWSKY (1982), não foi usada, como propuseram estes autores, como fator de correção da quantidade de precursor injetado nos diferentes animais que sabidamente está sujeita a um erro significativo.

Quanto a natureza das proteínas que se acumularam no ligamento periodontal dos incisivos dos animais tratados pela vimblastina, os resultados obtidos com tratamento dos cortes por

colagenase, antes da radioautografia, indicaram que praticamente só proteínas não-colágenas estão envolvidas neste acúmulo que aparece nitidamente às 96h após a administração da ^3H -glicina. Os resultados indicam ainda que a ^3H -glicina, embora sendo o aminoácido mais abundante no colágeno, se incorpora no ligamento em porcentual bem maior nas proteínas não-colágenas (MICKALITES & ORLOWSKI, 1977), o que parece não acontecer com a dentina onde a faixa de maior marcação desaparece quase por completo após tratamento pela colagenase.

A comparação dos presentes resultados com os da literatura será limitada, uma vez que, mesmo os estudos sobre proteínas do ligamento periodontal em condições normais não são totalmente concordantes, quer pela metodologia adotada, radioautográfica ou bioquímica, quer pelo tipo de ligamento (dentes de crescimento contínuo ou não), ou ainda e talvez principalmente, pelo fato do ligamento ser considerado como um todo homogêneo.

BEERTSEN & EVERTS (1977), usando ^3H -prolina e radioautografia em incisivos impedidos e desimpedidos de camundongos fêmeas, encontrou uma meia vida menor (entre 3,2 e 5,4 dias) nos dentes desimpedidos em relação aos em oclusão normal (entre 3,7 a 10,6 dias), nos vários compartimentos do ligamento junto ao dente dividido em 2 regiões: interna e externa e junto ao osso, fazendo determinações fotométricas das concentrações de grãos de prata de 200 em 200 μm ao longo do ligamento, e considerando os dois compartimentos junto ao dente se movendo em direção incisal, devido a erupção, enquanto o compartimento ósseo permaneceria estático.

Os animais controles no presente estudo, seriam

comparáveis aos do trabalho de BEERTSEN & EVERTS (1977), e a meia vida do material marcado não diferiu significativamente entre os incisivos esquerdos (desimpedidos) e os direitos (impedidos) em ambos os compartimentos. A divergência relacionada ao compartimento junto ao dente poderia ser explicada pelo fato de neste estudo a determinação ter sido feita numa única região, não levando em conta a erupção, nem o crescimento que é muito mais acentuado em animais machos que em fêmeas, mas não explicaria as diferenças relativas ao compartimento junto ao osso.

RIPPIN (1978), através de um estudo radioautográfico com ^3H -prolina, encontrou um aumento da meia vida das proteínas marcadas na região do ligamento periodontal próximo à crista alveolar de molares de ratos em hipofunção (por remoção do antagonista), enquanto nas demais regiões do tecido, a meia vida em relação aos controles ou a dentes em hiperfunção não se alterou.

Em estudos bioquímicos estes dados não são inteiramente confirmados. Enquanto KANOZA *et al.* (1980) encontraram um aumento de 2 vezes na taxa de renovação do colágeno em ligamento periodontal de molares de rato em hipofunção, (usando os 2/3 apicais do ligamento nos quais RIPPIN, 1978 não encontrou alteração), Van den BOS & TONINO (1984), não encontraram diferenças nas meias vidas tanto do colágeno insolúvel, das proteínas não-colágenas estruturais, bem como das GAG-sulfatadas, entre incisivos de ratos em erupção impedida ou desimpedida. A única diferença bioquímica significante assinalada por estes últimos autores é um aumento de cerca de 33% na quantidade, mas não em sua meia vida, de proteínas não-colágenas estruturais em ligamento de incisivos em erupção

desimpedida.

Talvez, a maior parte destes dados aparentemente conflitantes, esteja relacionada, como foi atrás mencionado, ao fato do ligamento periodontal ser considerado, particularmente na grande maioria dos estudos bioquímicos, como um todo homogêneo. Estudos recentes, porém, indicam que este não é o caso. KIRKHAM *et al.* (1989), mostraram que a quantidade de proteínas e dentre estas o colágeno, tem uma distribuição tipo mosaico no ligamento de incisivos de carneiros. KIRKHAM *et al.* (1991), mostraram também, no ligamento dos incisivos de rato que, em diferentes segmentos a partir da crista alveolar em direção ao ápice, a quantidade de proteínas extraíveis em pH neutro e sua cinética, através da marcação com ³H-prolina, é variável.

TSÉ *et al.* (1988), usando ³H-glicina, mostraram um aumento de síntese de proteínas no ligamento periodontal de incisivos de camundongos hemidescorticados, que apresentam um retardo na erupção. Este aumento foi mais expressivo nas regiões apicais do dente e cerca de 70% destas proteínas foram removidas pela colagenase.

MOXHAM & BERKOVITZ (1983b), postularam a erupção dental como um processo multifatorial que depende, além do mecanismo gerador da força eruptiva, de outros fatores: translação desta força em movimento, resistência dos tecidos ao movimento e ainda da remodelação destes tecidos para manutenção da integridade funcional do ligamento a cada nova posição do dente. Retardos ou acelerações da velocidade de erupção podem ser resultados da alteração de um ou vários fatores combinados.

Assim, os possíveis efeitos da vimblastina poderiam

estar associados a um ou mais destes fatores para produzir um retardo na erupção, uma vez que pode provocar morte de células, parada de mitoses, alterações do processo de secreção celular. Em relação a drogas citolíticas e/ou antimicrotubulares, cujas ações são semelhantes mas não iguais, várias explicações, não conclusivas têm sido apresentadas para explicar o retardo da erupção que provocam. Colchicina, vimblastina e ciclofosfamida produziriam lesões em paredes vasculares, podendo pois, alterar a pressão hidrostática do tecido (SENZAKI, 1980. TAKIZAWA, 1981, ADATIA & BERKOVITZ, 1981, CHISA & OSHIMA, 1985). Inibição na migração e agregação de fibroblastos foram atribuídos a colchicina e vimblastina (WADDELL *et al.*, 1974). Desintegração do citoesqueleto e redução da exocitose do colágeno foi mostrada em fibroblastos de ligamento periodontal tratado com colchicina (CHO & GARANT, 1981). Alteração da contratilidade no tecido de granulação foi evidenciada por Van den BRENK & STONE (1974), pela ação da colchicina e citocalasina B. Aumento da pressão arterial (FERGUSSON, 1952), da viscosidade do ácido hialurônico *in vitro* (CASTOR & PRINCE, 1964) e inibição da motilidade de fibroblastos *in vitro* (GAIL & BOONE, 1971), foram atribuídos à colchicina. No sistema *in vitro* de BELLOWS *et al.*, (1983), a colchicina e citocalasina inibiram a contração do conjunto fibroblastos-colágeno.

O efeito destas drogas se mostrou dose dependente. Em relação à vimblastina, CHIBA *et al.* (1980), referiram que só com a dose de 1,5 mg/kg de peso houve retardo significativo da erupção de incisivos de ratos; com 2,0 mg o efeito durou 2 dias e com 2,5 mg permaneceu até o 4^o dia. TOSELLO (1990), conseguiu retardo na

erupção de incisivos de camundongos com 1 mg e 2 mg/kg de peso de vimblastina, sendo que o retardo mais significativo ocorreu no 3^o e 4^o dias após a administração da droga, coincidente pois com o acúmulo significativo de proteínas marcadas revelado no presente estudo.

Não há, por ora, condições de inferir se o acúmulo de proteínas não-colágenas no ligamento periodontal após tratamento com vimblastina é causa ou efeito da erupção retardada, ou ainda de um epifenômeno. A hipótese deste acúmulo ser efeito da erupção retardada, parece no entanto ser a menos provável. A migração do ligamento para incisal, no processo eruptivo, parece ocorrer somente na porção junto ao dente, sendo que a porção junto ao osso é mais estável ou de migração mais lenta (ZAJICEK, 1974; BEERTSEN & EVERTS, 1977). Os resultados do presente estudo, embora não tão expressivos como no ligamento junto ao dente, indicaram também um acúmulo e uma meia vida aumentada das proteínas marcadas no ligamento junto ao osso.

Se o acúmulo de proteínas não-colágenas no ligamento está ligado à causa do retardo da erupção, é difícil, por ora, relacioná-lo com um dos mecanismos ou fatores que atuam no processo eruptivo. Aumento da síntese de proteínas colagenase-resistentes foram mostradas por TSÉ *et al.* (1988), em erupção retardada. Van den BOS & TONINO (1984), evidenciaram um aumento do teor de proteínas não-colágenas estruturais em ligamento periodontal de incisivos em erupção desimpedida e portanto acelerada.

Entre estas proteínas não-colágenas estão a fibronectina e as proteoglicanas. A fibronectina tem papel importante na adesão de células entre si e entre células e fibras da

matriz extracelular dos tecidos conjuntivos e seu papel na migração celular, em associação com as proteoglicanas, tem sido evidenciado (NEEGREEN & THIERY, 1980; FUJIMOTO *et al.*, 1985). Sua alteração poderia interferir no sistema fibroblastos-colagênio do ligamento ao qual é atribuído papel essencial na geração da força eruptiva (BELLOWS *et al.*, 1983). Por outro lado, a fluidez da matriz extracelular depende das proteoglicanas e sua alteração pode aumentar ou diminuir a resistência do tecido a movimentos, bem como modificar a pressão hidrostática do tecido, outro fator associado à geração da força eruptiva (MOXHAM & BERKOVITZ, 1982). Além das referências acima, sobre a inibição da migração e agregação de fibroblastos e aumento da viscosidade do ácido hialurônico por ação de drogas de efeitos semelhantes aos da vimblastina, são interessantes as observações de EMBERY *et al.*, (1987), sobre a modificação da motilidade de dentes de macaco associada à alteração na composição das proteoglicanas do ligamento periodontal.

Espera-se que, com o uso de outros precursores e principalmente de métodos para identificar as proteínas alteradas e, ainda, atentando para as diferenças regionais do ligamento periodontal, seja possível uma explicação mais precisa da ação da vimblastina no retardo da erupção e com isto contribuir para conhecer melhor o mecanismo da erupção dental.

RESUMO

RESUMO

O efeito da vimblastina sobre o metabolismo das proteínas do ligamento periodontal (LP) de incisivos de camundongos foi estudado radioautograficamente, através da incorporação de ^3H -glicina.

Camundongos machos adultos, com os incisivos inferiores esquerdos em erupção desimpedida e os direitos em erupção normal, receberam, intraperitonealmente, dose única de vimblastina (2mg/kg de peso), enquanto os controles pela mesma via, foram injetados com volume equivalente de soro fisiológico.

Num primeiro experimento, 2h após a injeção de vimblastina, os animais tratados e controles receberam, intraperitonealmente, 5 $\mu\text{Ci/g}$ de peso de ^3H -glicina e foram sacrificados em vários intervalos de tempo de 1 a 96h, sendo 2 animais de cada grupo, por tempo. Num segundo experimento, o mesmo procedimento anterior foi feito, 24h após a administração da vimblastina.

Sob anestesia com éter, os animais foram perfundidos, via intracardiaca, com fixador de KARNOVSKY e as hemimandíbulas removidas e desmineralizadas em EDTA. Das porções basais dos incisivos, depois de incluídas em Poly Bed, foram obtidos cortes de 1 μm de espessura, cobertos com emulsão K-5 da Ilford e após exposição conveniente, foram corados com azul de toluidina. A concentração de grãos de prata reduzida foi determinada no ligamento periodontal junto ao dente, ao osso e na matriz dentinária.

Os resultados obtidos mostraram que: 1) Nos intervalos de tempo de 1 a 12h, a concentração de grãos de prata no LP de incisivos de camundongos tratados pela vimblastina não apresentou diferenças com a dos controles, indicando que a droga não alterou a biossíntese de proteínas. 2) Nos tempos mais longos a concentração de grãos foi significativamente maior tanto no LP junto ao dente como no LP junto ao osso nos animais tratados por vimblastina, revelando um acúmulo de proteínas marcadas, provavelmente por inibição de sua exocitose e/ou degradação. 3) Nos diversos intervalos de tempo não houve diferenças significantes na concentração de grãos de prata entre os LP de incisivos em oclusão normal e desimpedida, tanto nos animais tratados como nos controles. 4) A concentração de grãos de prata na matriz dentinária mostrou uma provável reutilização maior do aminoácido marcado em animais tratados com vimblastina.

A natureza destas proteínas foi estudada num terceiro experimento onde os camundongos tiveram tratamento igual ao do primeiro e sacrificados, 3 animais para cada grupo, 1 e 96h após a injeção de ^3H -glicina. As hemimandíbulas foram removidas, fixadas em Carnoy e desmineralizadas em ácido fórmico/citrato de sódio. Após inclusão em parafina, cortes da porção basal dos incisivos foram colhidos em 2 lâminas, sendo uma delas tratada com colagenase e outra com salina e em seguida radioautografadas e coradas com azul de toluidina. A quantidade de material marcado pela ^3H -glicina removida pela colagenase, não mostrou diferenças entre tratados e controles; já a concentração de grãos correspondentes às proteínas que persistiram após a digestão pela colagenase, apresentou-se significativamente maior nos animais tratados com vimblastina,

indicando que o acúmulo de proteínas marcadas era de proteínas não-colágenas.

Não foi possível, por enquanto, inferir que este acúmulo de proteínas não-colágenas provocada pela vimblastina é causa do retardo da erupção, ou se é um epifenômeno. Porém estas proteínas, entre as quais devem estar a fibronectina e proteoglicanas, podem estar associadas a um ou mais fatores dos quais depende o processo eruptivo.

SUMMARY

SUMMARY

The effect of vinblastine on the metabolism of proteins of the periodontal ligament (PL) of mice incisors was studied through the incorporation of ^3H -glycine as revealed by radioautography.

Male, adult mice, with the left inferior incisors in unimpeded eruption and the right ones in normal eruption, received intraperitoneally a single dose of vinblastine of 2mg/kg of body weight, while control animals received, through the same via, an equivalent volume of saline.

In a first experiment, 2h after the injection of vinblastine, treated and control animals were given a single intraperitoneal injection of 5 $\mu\text{Ci/g}$ of body weight of ^3H -glycine and sacrificed in number of two per group, in several time intervals from 1 to 96h. In a second experiment, the same procedure was done, 24h after the administration of vinblastine.

Under ether anesthesia, the animals were perfused, through the left ventricle, with KARNOWSKY's fixative, after what the hemi-mandibles were removed, kept in the same fixative for additional 4h at 4°C and then demineralized in EDTA. The basal third of the hemi-mandibles was embedded in Poly Bed and 1 μm thick sections were cut, mounted on slides and dipped in Ilford K-5D emulsion. After convenient exposure, the radioautographs were developed and stained with 1% toluidine blue. The silver grains concentration was determined in areas of the tooth-related PL, bone-related PL and as an internal control in the dentine matrix.

The results showed that: 1) From 1 to 12h, there was no difference in the silver grain concentration, over both regions of the PL, between treated and control animals, showing that the drug did not alter the protein biosynthesis. 2) In later time intervals, the silver grain concentration was significantly higher over both regions of the PL of vinblastine treated animals, resulting in a longer half-life of the labeled proteins, probably due the inhibition of their exocytosis and/or degradation. 3) No significant differences between the silver grain concentrations over the PL of either normal or unimped erupting incisors of both groups were detected. 4) The silver grain concentration over the dentine matrix showed a possible higher reutilization of the labeled aminoacid in vinblastine treated animals.

The nature of these proteins was studied in a third experiment where the mice had a treatment similar to the first one, but were sacrificed 3 per group, 1 and 96h after the injection of ^3H -glycine. The hemi-mandibles were removed, fixed in Carnoy and demineralized with formic acid/sodium citrate solution. Paraffin embedded, 5 μm sections from the basal portion of the incisors were cut and collected in 2 glass slides, being one of them treated with collagenase and the other with saline solution before being dipped in nuclear emulsion.

The amount of labelled protein, removed by collagenase did not show differences between both groups, while the concentration of grains due to collagenase-resistant proteins was significantly higher in the treated animals, particularly at 96h after the injection of labelled glycine.

The relationship between this increased amount of

non-collagenous proteins in PL and the decrease in the rate of eruption caused by vinblastine cannot be established yet. However, among these proteins, fibronectin and proteoglycans are thought to be associate to one or more factors acting in the tooth eruption process.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADATIA, A.K. & BERKOVITZ, K.B. (1981) The effects of cyclophosphamide on the eruption of the continuously growing mandibular incisor of the rat. *Archs oral Biol.*, 26: 607-13.
- AZEVEDO, L.F.; BLUMEN, G.; MERZEL, J. (1982) The effect of colchicine and vinblastine on the secretory activity of ameloblasts in the mouse lower incisor as revealed by autoradiography after injection of ³⁵S-Sodium Sulphate. *J. Biol. Buccale*, 10: 45-54.
- AZUMA, M.; ENLOW, D.H.; FREDRICKSON, R.G.; GASTON, L.F. (1975) 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. *Determinants of mandibular form and growth*. Ann Arbor Univ. of Michigan, p.179-207.
- BAILEY, A.J. (1968) The nature of collagen. *Comp. Biochem. Physiol.*, 26: 297-423
- BAILEY, A.J. (1976) In: POOLE, D.F.G. & STACK, M.V., ed. *The eruption and occlusion of teeth*. London, Butterworths, p. 306-7.
- BALL, P.C. (1977) The effect of adrenal glucocorticoid administration on eruption rates and tissue dimensions in rat mandibular incisors. *J. Anat.* 124: 157-63.
- BEERTSEN, W. & EVERTS, V. (1977) The site of remodelling of collagen in the periodontal ligament of the mouse incisor. *Anat. Rec.*, 189: 479-498.
- BEERTSEN, W.; EVERTS, V.; van den HOOFF, A. (1974) 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.
- BELLOWS, C.G.; MELCHER, A.H.; AUBIN, J.E. (1983) An *in vitro* model for tooth eruption utilizing periodontal ligament fibroblasts and collagen lattices. *Archs oral Biol.*, 28 (8): 715-22.
- BERKOVITZ, B.K.B. (1974) The effect of vitamin C deficient diet on eruption rates for the guinea pig lower incisor. *Archs oral Biol.* 19: 807-11.
- BERKOVITZ, B.K.B.; MIGDALSKI, A.; SOLOMON, M. (1972) The effect of the lathyrus agent aminoacetonitrile on the unimpeded eruption rate in normal and root-resected rat lower incisors. *Archs oral Biol.* 17: 1755-63.
- BERKOVITZ, B.K.B.; THOMAS, N.R. (1969) Unimpeded eruption in the

- root-resected lower incisor of the rat with a preliminary note on root transection. *Archs oral Biol.*, 14: 771-80.
- BURN-MURDOCH, R.A. (1988) The effect of corticosteroids and cyclophosphamide on the eruption of resected incisor teeth in the rat. *Arch oral Biol.* 33(9): 661-7.
- BURN-MURDOCH, R.A. (1990) The effect of cyclophosphamide on the eruption of impeded and resected incisors in rats. *Arch oral Biol.* 35(10): 801-6.
- CARNEIRO, J. & FAVA DE MORAES, F. (1965) Radioautographic visualization of collagen metabolism in the periodontal tissues of the mouse. *Archs oral Biol.*, 10: 833-48.
- CARNEIRO, J. & LEBLOND, C.P. (1966) Suitability of collagenase treatment for the radioautographic identification of newly synthesized collagen labeled with ^3H -glycine or ^3H -proline. *J. Histochem. Cytochem.*, 14(4): 334-44.
- CASTOR, C.W. & PRINCE, R.K. (1964) 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.
- CHIBA, M. & OHSHIMA, S. (1985) Effects of colchicine and hydrocortisone on unimpeded eruption rates of root-resected mandibular incisors of rats. *Archs oral Biol.*, 30(2): 147-53.
- CHIBA, M.; TAKISAWA, K.; OHSHIMA, S. (1980) Dose-response effects of colchicine and vinblastine on unimpeded eruption rates of the rat mandibular incisor. *Archs oral Biol.*, 25(2): 115-9.
- CHO, M-I. & GARANT, P.R. (1981) An electron microscopic radioautographic study of collagen secretion in periodontal ligament fibroblasts of the mouse: II. colchicine-treated fibroblasts. *Anat. Rec.*, 201: 587-98.
- EHRlich, H.P.; ROSS, R.; BORNSTEIN, P. (1974) Effects of antimicrotubular agents on the secretion of collagen. *J. Cell Biol.*, 62: 390-405.
- EMBERY, G; PICTON, D.C.A.; STANBURY, J.B. (1987) Biochemical changes in periodontal ligament ground substance associated with short-term intrusive loadings in adult monkeys (Macaca fascicularis). *Archs oral Biol.*, 32(8): 545-9.
- FERGUSON, F.C. (Jr) (1952) Colchicine, I. General pharmacology. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 106: 261-70.
- FUJIMOTO, T; YOSHINAGA, K.; KONO, I. (1985) Distribution of fibronectin on the migratory pathway of primordial germ cells in mice. *Anat. Rec.*, 211: 271-8.
- GABBIANI, G.; RYAN, G.B.; MAJNO, G. (1971) Presence of modified

- fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27: 549-50.
- GAIL, M.H. & BOONE, C.W. (1971) Cytochalasin effects on fibroblasts: dose dependent, reversible alterations of motility and cytoplasmic cleavage. *Exp Cell Res.*, 68: 226-8.
- GARANT, P.R. (1976) Collagen resorption by fibroblasts. *J. Periodont.*, 47: 380-90.
- GUYTON, A.C. (1972) Compliance of the interstitial space and the measurement of tissue pressure. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, 336 (Suppl.): S1-S20. Apud: MOXHAM & BERKOVITZ, 1982.
- JOSEPHSEN, K. & WARSHAWSKY, H. (1982) Radioautography of rat incisor dentin as a continuous record of the incorporation of a single dose of ³H-labeled proline and tyrosine. *Am. J. Anat.*, 164: 45-56.
- KANOZA, R.J.J.; KELLEHER, L.; SODEK, J.; MELCHER, A.H. (1980) A biochemical analysis of the effect of hypofunction on collagen metabolism in the rat molar periodontal ligament. *Archs oral Biol.* 25: 663-8.
- KARNOVSKY, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 137-8.
- KASUGAI, S.; SUZUKI, S.; SHIBATA, S.; YASUI, S.; AMANO, H.; OGURA, H. (1990) Measurements of the isometric contractile forces generated by dog periodontal ligament fibroblasts *in vitro*. *Archs oral Biol.*, 35(8): 597-601.
- KIRKHAM, J.; ROBINSON, C.; SHORE, R.C. (1991) Rates of protein turnover at specific sites of the rat incisor periodontal ligament. *J. Biol. Buccale.* 19: 61-7.
- KIRKHAM, J.; ROBINSON, C.; SPENCE, J. (1989) Site-specific variations in the biochemical composition of healthy sheep periodontium. *Archs oral Biol.* 34(6): 405-11.
- KOPRIWA, B.M & LEBLOND, C.P. (1962) Improvements in the coating technique of radioautography. *J. Histochem. Cytochem.*, 10: 269-84.
- MAJNO, G.; GABBIANI, G.; HIRSCHL, B.J.; RIJAN, G.B.; STATBOV, P.R. (1971) Contraction of granulation tissue *in vitro*: similarity to smooth muscle. *Science*, 173: 548-50.
- MICKALITES, C. & ORLOWSKI, W.A. (1977) Study of the noncollagenous components of the periodontium. *J. Dent. Res* 56(8): 1023-26.
- MOE, H. (1977) On the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. *Acta path. microbiol. scand. Sect. A.*, 85: 330-4.

- MOE, H. (1979) 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.
- MOE, H. & MIKKELSEN, H. (1977a) 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.
- MOE, H. & MIKKELSEN, H. (1977b) On the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. *Acta path. microbiol. scand. Sect. A.*, 85: 319-29.
- MOSKALEWSKI, S.; THYBERG, J.; LOHMANDER, S.; FRIBERG, U. (1975) Influence of colchicine and vinblastine on the Golgi complex and matrix deposition in chondrocyte aggregates. *Expl cell Res.*, 95: 440-54.
- MOXHAM, B.J. (1978) 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, [Thesis (Ph.D.) Univ.]. Apud: MOXHAM & BERKOVITZ, 1982.
- MOXHAM, B.J. (1979a) Recording the eruption of the rabbit mandibular incisor using a device for continuously monitoring tooth movements. *Archs oral Biol.*, 24: 889-99.
- MOXHAM, B.J. (1979b) The effects of some vaso-active drugs on the eruption of the rabbit mandibular incisor. *Archs oral Biol.*, 24: 681-88.
- MOXHAM, B.J. & BERKOVITZ, B.K.B. (1982) 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, p. 215-47.
- MOXHAM, B.J. & BERKOVITZ, B.K.B. (1983a) Continuous monitoring of the position of the ferret mandibular canine tooth to enable comparisons with the continuously growing rabbit incisor. *Archs oral Biol.*, 28: 477-81.
- MOXHAM, B.J. & BERKOVITZ, B.K.B. (1983b) Interactions between thyroxine, hydrocortisone and cyclophosphamide in their effects on the eruption of the rat mandibular incisor. *Archs oral Biol.*, 28(12): 1083-7.
- MOXHAM, B.J. & BERKOVITZ, B.K.B. (1988) Continuous monitoring of the movements of erupting and newly erupted teeth of limited growth (ferret mandibular canines) and their responses to hexamethonium. *Archs oral Biol.*, 33(12): 919-23.
- MOXHAM, B.J. & BERKOVITZ, B.K.B. (1989) A comparison of the biomechanical properties of the periodontal ligaments of

- erupting and erupted teeth of non-continuous growth (ferret mandibular canines). *Archs oral Biol.*, 34(10): 763-6.
- MOXHAM, B.J.; SHORE, R.C.; BERKOVITZ, B.K.B. (1985) Fenestrated capillaries in the connective tissue of the periodontal ligament. *Microvascular Res.* 30: 116-24.
- MOXHAM, B.J.; SHORE, R.C.; BERKOVITZ, B.K.B. (1987) Fenestrated capillaries in the periodontal ligaments of the erupting and erupted rat molar. *Archs oral Biol.* 32(7): 477-81.
- MYHRE, L.; PREUS, H.R.; AARS, H. (1979) Influences of axial load and blood pressure on the position of the rabbit's incisor tooth. *Acta odont. scand.*, 37: 153-9.
- NESS, A.R. (1967) 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, p.84-8.
- NESS, A.R. (1970) Eruption '70. *Apex J. University College Hosp. dent. Sch., London*, 4: 23-7.
- NESS, A.R. & SMALE, D.E. (1959) 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.
- NEWGREEN, D & THIERY, J.P. (1980) Fibronectin in early avian embryos: Synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. *Cell Tissue Res.*, 211: 269-91.
- ORLOWSKI, W.A. (1976) The incorporation of ³H-proline into the collagen of the periodontium of a rat. *J. Periodont. Res.*, 11: 96-100.
- ORLOWSKI, W.A. (1978) Biochemical study of collagen turnover in rat incisor periodontal ligament. *Archs oral Biol.*, 23: 1163-5.
- PEARSE, A.G.E. (1980) *Histochemistry- Theoretical and Applied.* vol.1, London, Churchill Livingstone-1980, 4th ed., 292-3.
- PITARU, S.; MICHAELI, Y.; ZAJICEK, G.; WEINREB, M.M. (1976) 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.
- RIPPIN, J.W. (1976) Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces. I. Young rat molars. *J. Periodont. Res.*, 11: 101-7.
- RIPPIN, J.W. (1978) Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces. II. Adult rat molars. *J. Periodont. Res.*, 13: 149-54.
- SENSAKI, H. (1980) A histological study of reparative dentinogenesis in the rat incisor after colchicine

- administration. *Archs oral Biol.*, 25: 737-43.
- SHORE, R.C. & BERKOVITZ, B.K.B. (1978) Model to explain differential movement of periodontal fibroblasts. *Archs oral Biol.*, 23: 507-9.
- SHORE, R.C. & BERKOVITZ, B.K.B. (1979) An ultrastructural study of periodontal ligament fibroblasts. *Archs oral Biol.*, 24: 155-64.
- SLOOTWEG, R.N. (1976) Changes of collagen and non-collagenous proteins in the periodontal ligament during acceleration of the eruption. A biochemical and histological investigation in different sectors of periodontal ligament in the guinea pig incisor. Thesis. University of Utrecht. Apud: BEERTSEN & EVERTS, 1977.
- SODEK, J. (1977) 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.
- SODEK, J. (1978) A comparison of collagen and non-collagenous protein metabolism in rat molar and incisor periodontal ligaments. *Archs oral Biol.*, 23: 977-82.
- TAKIZAWA, K. (1981) 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.
- TAVERNE, A.A.R.; LEMMENS, I.G.; TONINO, G.J.M. (1986) Lathyrogens and the role of collagen in the eruption of rat incisors. *Archs oral Biol.*, 31(2): 127-31.
- TEN CATE, A.R. (1972) Morphological study of fibrocytes in connective tissue undergoing rapid remodeling. *J. Anat.*, 112: 401-14.
- THOMAS, N.R. (1965) The process and mechanism of tooth eruption. Bristol, [Thesis (Ph.D.) Univ.]. Apud: MOXHAM & BERKOVITZ, 1982.
- THOMAS, N.R. (1976) Collagen as the generator of tooth eruption. In: *The eruption and occlusion of teeth*, D.F.G. POOLE & M.V. STACK (eds.), pp. 290-301. London, Butterworths. Apud: MOXHAM & BERKOVITZ, 1982.
- THYBERG, J.; MOSKALEWSKI, S.; FRIBERG, U. (1978) Effects of antimicrotubular agents on the fine structure of the Golgi complex in embrionic chick osteoblasts. *Cell Tiss. Res.*, 193: 247-57.
- TOSELLO, D.O. (1990) Biossíntese de proteínas do ligamento periodontal de incisivos de camundongos em erupção desimpedida e retardada pela yimblastina. Estudo radioautográfico através da incorporação de ³H- glicina. Tese-mestrado, FOP. Unicamp- Piracicaba.

- TSE, M.C.P.; BOAVENTURA, M.C.; FERNANDES, G.D.; MERZEL, J. (1988) The effects of cerebral hemidecortication on the eruption rate and uptake of ^3H -glycine by the periodontal ligament of the rat incisor. *Archs oral Biol.*, 33(8): 605-11.
- Van den BOS, T. & TONINO, G.J.M. (1984) Composition and metabolism of the extracellular matrix in the periodontal ligament of impeded and unimpeded rat incisors. *Archs oral Biol.*, 29(11): 893-7.
- Van den BRENK, H.A. & STONE, M.G. (1974) Actions and interactions of colchicine and cytochalasin B on contraction of granulation tissue and on mitosis. *Nature*, 251: 327-9.
- Van HASSEL, H. J. & McMINN, R.G. (1972) Pressure differential favouring tooth eruption in the dog. *Archs oral Biol.*, 17: 183-90.
- WADDELL, A.W.; ROBSON, R.T.; EDWARDS, J.G. (1974) Colchicine and vinblastine inhibit fibroblast aggregation. *Nature*, 248: 239-41.
- WARSHAWSKY, H. & MOORE, G. (1967) A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J.Histochem. Cytochem.* 15: 542-9.
- WILSON, L.; BAMBURG, J.R.; MIZEL, S.B.; GRISHAM, L.M.; CRESWELL, K.M. (1974) Interaction of drugs with microtubule proteins. *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.*, 33(2): 158-66.
- ZAJICEK, G. (1974) Fibroblast cell kinetics in the periodontal ligament of the mouse. *Cell Tiss. Kinet.*, 7: 479-92.