

SILVANA FURLAN NUNES  
BIÓLOGA

---

**AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA ULTRAESTRUTURAL DAS  
DENSIDADES VOLUMÉTRICAS DOS FIBROBLASTOS E DO  
COLÁGENO DO LIGAMENTO PERIODONTAL DO INCISIVO DE  
RATO EM CONDIÇÕES FUNCIONAIS ALTERADAS.**

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do título de Mestre  
em Biologia e Patologia Buco  
Dental

20011025

---

PIRACICABA  
2001

i



SILVANA FURLAN NUNES  
BIÓLOGA

---

**AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA ULTRAESTRUTURAL DAS  
DENSIDADES VOLUMÉTRICAS DOS FIBROBLASTOS E DO  
COLÁGENO DO LIGAMENTO PERIODONTAL DO INCISIVO DE  
RATO EM CONDIÇÕES FUNCIONAIS ALTERADAS.**

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do título de Mestre  
em Biologia e Patologia Buco  
Dental

**Orientadora : Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Silvana P. Barros**

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Merzel

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana P. Barros

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza O. Polacow

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 25/04/01



Assinatura do Orientador

---

PIRACICABA

2001

UNIDADE OC  
 N.º CHAMADA:  
T/UNICAMP  
N922a  
 V. Ex  
 TOMBO BC/ 44723  
 PROC. 16-392/07  
 C  D   
 PREÇO R\$ 11,00  
 DATA 24/06/03  
 N.º CPD

CM00156332-5

### Ficha Catalográfica

N922a Nunes, Silvana Furlan.  
 Avaliação estereológica ultraestrutural das densidades volumétricas dos fibroblastos e do colágeno do ligamento periodontal do incisivo de rato em condições funcionais alteradas. / Silvana Furlan Nunes. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.  
 x, 60f. : il.

Orientadora : Profª Drª Silvana P. Barros.  
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Estereologia. 2. Ligamentos. 3. Dentes – Erupção. 4. Dentes – Tratamento. 5. Microscopia eletrônica. 6. Morfologia. I. Barros, Silvana P. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Janeiro de 2001, considerou a candidata SILVANA FURLAN NUNES aprovada.

1. Profa. Dra. SILVANA PEREIRA BARROS

2. Profa. Dra. MARIA LUIZA OZORES POLACOW

3. Prof. Dr. JOSÉ MERZEL

## **Dedicatória**

### **À DEUS**

*"... que incomparável na sua infinita bondade, nos deu vida, paciência, coragem, inteligência e fé, elevo meus pensamentos de gratidão e apreço, por tudo".*

### **Aos meus pais Hélio e Soni**

*" Ofereço minha gratidão, pois na validade de toda minha luta, nos méritos de minhas conquistas, há muito da presença de vocês..."*

### **Às minhas irmãs Eliana e Tatiana**

*Pelo carinho e incentivo para que eu sempre seguisse em frente...*

### **Ao meu esposo Wilton**

*Por seu amor, carinho, compreensão, apoio e incentivo que foram imprescindíveis para mais esta conquista.*

### **À minha filha Larissa**

*Por ser a luz da minha vida.....*

*"Que nossos esforços desafiem as  
as impossibilidades : lembrai-vos  
que as maiores proezas históricas  
foram conquista do que parecia  
impossível..."*

*Charles Chaplin*

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. José Merzel, meu orientador, que com atenção, disponibilidade, segurança e dedicação, orientou este trabalho. Espero perpetuar seus ensinamentos como forma de gratidão.

Ao Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, pela dedicação e auxílio, enriquecendo minha pesquisa com seus conhecimentos e experiência profissional.

À Prof. Dra. Silvana Pereira Barros, pelo incentivo, carinho e compreensão sempre presentes. Muito obrigado por repartir comigo seus conhecimentos e principalmente sua amizade.

À prof. Dra. Darcy de Oliveira Tosello, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, pela força e carinho com que conduz nosso curso e pela disponibilidade em nos atender.

Ao Prof. Dr. Fausto Bérzin, pelo incentivo e apoio sempre presentes.

À Bióloga Eliene Ap. Orsini Narvaes Romani, agradecimento especial pela grande colaboração, dedicação e auxílio no preparo do material para microscopia eletrônica.

Aos professores e funcionários da área de Anatomia, pelo carinho, apoio e incentivo sempre presentes.

Às amigas Cidinha, Ivani, Suzete e Joelma:

" O destino nos une, faz-nos conviver, faz-nos precisar uns dos outros, partilhar cada sentimento, tornar-nos amigos. O mérito deste trabalho é de todas, pois cada uma teve sua participação especial no desenvolvimento deste trabalho."

À grande amiga Miralva, que mesmo distante sempre esteve presente no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Paulinho do CRA, pela grande ajuda na preparação dos slides.

As minhas amigas do curso de Pós-Graduação, pela paciência, incentivo e amizade com que dividiram comigo as ansiedades e vitórias conquistadas. Obrigada!!

Ao CNPQ - Conselho Nacional de Pesquisa, pelo auxílio - bolsa de mestrado. Proc. nº 138202/1996/6.

Ao engenheiro Agrônomo Marcelo Alves Corrêa - Centro de Informática de Agricultura - (CIAGRI) - ESALQ/USP, pela análise estatística.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido com o auxílio da FAEP/PRPG - UNICAMP (Proc. n° 1064/99) concedido ao Prof. Dr. José Merzel.

## RESUMO

As densidades volumétricas de estruturas do ligamento periodontal foram determinadas em incisivos inferiores de ratos mantidos em diferentes condições funcionais em relação a forças mastigatórias. Nove ratos machos adultos tiveram seus incisivos inferiores esquerdos seccionados ao nível da papila interdental a cada dois dias e mantidos em erupção desimpedida (hipofuncionais), enquanto os contralaterais permaneceram em erupção impedida (hiperfuncionais) durante 7 dias. Os incisivos inferiores de outros três ratos, usados como controles, permaneceram no mesmo período, em erupção normal (normofuncionais).

Cortes ultrafinos, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo foram fotografados no aumento de 5.000x . Foram selecionadas três eletromicrografias no aumento final de 10.875x dos compartimentos junto ao dente e junto ao osso alveolar de 3 regiões do ligamento da face mesial do incisivo: R1- junto à crista alveolar, R3- à altura do 1º molar inferior e R5 à altura do 3º molar inferior. Através da volumetria por pontos determinou-se a densidade volumétrica de fibroblastos, de seus prolongamentos

citoplasmáticos e do colágeno (fibrilas mais substância interfibrilar) utilizando um retículo quadriculado, onde foram contados 100 pontos por amostra.

Não houve diferenças significativas no compartimento junto ao dente entre as densidades volumétricas de fibroblastos em cada região entre as três condições funcionais. Em cada condição, esta densidade foi significativamente maior na R5 em relação às duas regiões mais incisais. A densidade volumétrica do colágeno comportou-se de modo inverso, decrescendo da incisal para apical, não havendo diferença entre as condições funcionais. Na condição hipofuncional, a diminuição foi mais acentuada, sendo que as diferenças entre as três regiões foram significativas. Comparada à condição normofuncional, a relação fibroblasto-colágeno alterou-se para maior nas condições hiper e hipofuncionais, mais expressiva nesta última, sendo as diferenças estatisticamente significativas nas regiões 1 e 3.

Resultados semelhantes, embora não tão uniformes, foram observados no tecido conjuntivo do comportamento junto ao osso.

Em relação aos prolongamentos, seu volume relativo no compartimento junto ao dente cresceu de incisal para a apical na condição normofuncional, enquanto que nas condições alteradas este volume foi aparentemente menor e aproximadamente igual nas 3 regiões. Na R5, este

volume foi significativamente menor nas condições funcionais alteradas em relação à condição normofuncional. No compartimento junto ao osso, não foram observadas diferenças de volume relativo desta estrutura entre regiões em cada condição funcional ou entre estas condições em cada região.

As alterações volumétricas observadas, algumas comuns entre as condições funcionais alteradas, não puderam ser relacionadas ao aumento da velocidade de erupção que ocorre na hipofunção.

## ABSTRACT

The volume density of periodontal ligament structures was determined in rat lower incisors submitted to altered occlusal forces. Nine adult male rats had their left incisors sectioned at the level of the interdental papilla every second day, during 7 days. These teeth erupted unimpeded and thus were hypofunctional, while their contralateral right incisors erupted impeded and are considered hyperfunctional. The lower incisors of three rats, used as controls, remained normofuncional.

Ultrathin sections stained with uranyl acetated and lead citrate were photographed at the magnification of 5000x. Three electronmicrographs (final magnification 10.875x) of the tooth-related and alveolar bone-related compartments from 3 regions at the mesial face of the periodontal ligament were selected. Region 1 was the one close to the alveolar crest; regions 2 and 3 were at level of the 1<sup>st</sup> lower 3<sup>rd</sup> lower molar respectively. By point-counting volumetry, using a square grid with 100 intersection points, the volume density of fibroblasts, their cytoplasmic processes and of collagen (fibrils plus interfibrilar substance) was determined. In tooth-related compartment there was no significant differences between the relative volume of fibroblasts, in

each region, between the three functional conditions. In each condition, this volume was larger in the most apical region as compared to the two other more incisal regions. The volume density of collagen decreased in the incisal-apical direction and also there was no significant difference between functional conditions. However, under hypofunction, this decrease of collagen density was more marked, being the difference between the three regions statistically significant. The volumetric density relation between fibroblasts and collagen, when compared to the normal function, increased in the hiper and mainly in the hipofunctional conditions being significant the differences in regions 1 and 3 . Similar results, although not so regular, were found in the connective tissue of the alveolar bone-related compartment.

As for the fibroblast cytoplasmic processes their relative volume increased in the incisal-apical direction in normofunctional teeth while in the altered conditions their volume density was smaller and almost invariable in the three regions, being the differences in region 5 significant. No such differences were found in the alveolar bone-related compartment.

The volumetric alterations observed, some of which were common to the hyper and hypofunctional conditions, could not be related to the increase in the rate of eruption which occurs only in the unimpeded teeth.

## INTRODUÇÃO

O processo de erupção dental, um dos movimentos fisiológicos do dente, está relacionado, segundo a maioria dos autores, ao ligamento periodontal (LPD) ou ao do seu precursor o folículo dental (para uma revisão v. Moxham & Berkovitz, 1995). A remoção cirúrgica da porção odontogênica de incisivos de roedores paralisa o seu crescimento, porém não prejudica a erupção do resto do dente, sugerindo que a erupção está associada aos tecidos periodontais, pois são os únicos tecidos que permanecem viáveis no pós-operatório. ( Berkovitz & Thomas, 1969). O papel do folículo dental associado ao órgão do esmalte, foi evidenciado na fase intraossea do movimento eruptivo de dentes de crescimento limitado. ( Cahil & Marks, 1980, Marks & Cahil,1984).

O periodonto dos incisivos de roedores, tem duas partes distintas:

1) o ligamento periodontal, que é o tecido conjuntivo cujas fibras se inserem de um lado no cemento e do outro no osso alveolar e que abrange toda a face lingual , a maior parte da face mesial e aproximadamente metade da face distal da raiz anatomica do dente ; 2) o periodonto relacionado ao esmalte, tecido

conjuntivo localizado entre o órgão do esmalte e o osso alveolar ocupando toda a face labial do dente, uma parte da distal e uma porção bem menor na face mesial; as fibras colágenas deste tecido não se inserem em tecido dental, razão pela qual esta parte do periodonto não tem sido considerada como participante do processo ( Berkovitz & Shore, 1978, Moxham, 1991). Recentemente, porém, mostramos que este periodonto relacionado ao esmalte tem provavelmente a função de controlar o processo eruptivo.( Merzel *et al*, 2000 b).

O mecanismo da erupção dental é assunto ainda controverso e o processo parece ser multifatorial. Além da força geradora do movimento, a translação dessa força em movimento, a resistência dos tecidos envolvidos a sustentação do dente em cada nova posição à medida que o movimento se desenvolve e a remodelação dos tecidos de sustentação para a manutenção da integridade do sistema, são os fatores cuja alteração pode causar aceleração, retardo ou mesmo interrupção do movimento eruptivo ( Moxham & Berkovitz, 1995).

Dentre os vários estudos experimentais do processo eruptivo, uma grande parte é dedicada às alterações estruturais ou bioquímicas do ligamento

periodontal de dentes de crescimento e erupção contínuos, em condições em que a erupção é acelerada, retardada ou paralisada. Os incisivos de roedores seccionados periodicamente de modo a evitar o contato com o antagonista são denominados de desimpedidos e tem sido muito usados em estudos de erupção dental, pois expressaria o movimento eruptivo puro, não limitado pelo atrito e desgaste (Bryer,1957) . Estes dentes são hipofuncionais e sua velocidade de erupção é praticamente em torno de duas vezes aquela dos incisivos normais.

Os dentes incisivos em oclusão são , em geral, denominados de impedidos. Na literatura, porém, para o controle dos incisivos desimpedidos tem sido utilizados tanto o incisivo contralateral impedido (e.g. Burn – Murdoch,1990; Kirkhan et al, 1993) ou animais com ambos os incisivos intactos ( e.g. Chiba et al, 1976; Michaeli et al, 1986). Enquanto os incisivos intactos são normofuncionais, os contra-laterais são dentes em hiperfunção já que se atritam com os dois incisivos antagonistas, porém a taxa de erupção entre ambos não difere.

No ligamento periodontal de incisivos de ratos e camundongos, no sentido da espessura, dois compartimentos, um relacionado ao dente e outro relacionado ao osso alveolar, são facilmente identificáveis ao exame

microscópico. Sua estrutura e ultraestrutura, foi descrita entre outros por: Matena, (1973); Beertsen *et al*, (1974) ; Berkovitz e Shore, (1978); Sloan, (1978). O compartimento junto ao dente apresenta maior densidade de células e fibras colágenas, enquanto o compartimento junto ao osso tem menor quantidade de células e fibras e apresenta vasos e nervos, os quais estão ausentes no compartimento anterior. Alguns autores (e.g. Beertsen *et al*, 1974) descrevem um compartimento intermediário entre os dois citados, que não tem limites precisos e seria uma zona de cisalhamento para permitir o movimento eruptivo contínuo e cuja principal característica seria a presença no interior dos fibroblastos de uma maior quantidade de vacúolos contendo colágeno fagocitado.

Em muitos estudos experimentais relacionados à erupção dental, particularmente em trabalhos bioquímicos, o ligamento periodontal de incisivos de roedores é considerado como um todo sem distinção de compartimentos ou regiões ( e.g. Van den Bos & Tonino, 1984; e Kirkham *et al*, 1993).

Há, porém, algumas indicações de que o ligamento apresenta variações na sua extensão inciso-apical. Beertsen e Everts (1977) mostraram

que a incorporação de  $^3\text{H}$ -prolina é mais alta nos fibroblastos da região apical, na zona junto ao dente, decrescendo em direção incisal e em direção ao osso alveolar. Tse et al (1988) encontram o mesmo usando  $^3\text{H}$ -glicina. Kirkham et al (1991), relatam que a quantidade de colágeno extraível com solução salina é maior no ligamento junto a crista alveolar, diminuindo gradativamente em direção apical .

Outras indicações de que o LPD não é uniforme em sua extensão são de Blaushild et al (1992) que estudaram a área ocupada pelos vasos sanguíneos, mostrando uma variação de 4% na região incisal para 47% na região apical. Fato semelhante foi evidenciado em relação aos capilares do LPD por Moxham et al (1985). Sloan (1981) num resumo, relata que enquanto o terço incisal do osso alveolar é quase inteiramente recoberto por fibras Sharpey, os dois terços basais apresentam estas fibras como ilhas separadas por vasos e nervos.

Vários estudos morfométricos foram feitos no intuito de mostrar eventuais diferenças entre incisivos impedidos e desimpedidos comparando, porém, áreas limitadas do LPD. Assim, analisando apenas o compartimento junto ao dente à altura do 1º molar inferior, Shore et al (1982), mostram que

não houve diferença entre as densidades volumétricas de fibroblastos e de colágeno extracelular entre incisivos normais e desimpedidos, porém nos últimos houve um aumento de substância interfibrilar. Beertsen & Everts (1977) analisando compartimentos no sentido transversal do ligamento de incisivos de camundongos sem contudo diferenciar regiões do tecido no sentido longitudinal, evidenciam que o volume relativo de colágeno extracelular, aumenta progressivamente do compartimento junto ao dente em direção ao compartimento junto ao osso alveolar, enquanto que o volume relativo de fibroblastos decresceu na mesma direção. Ainda segundo esses autores, a densidade volumétrica de fibroblastos foi maior nos dentes desimpedidos do que nos dentes impedidos, o contrário ocorrendo com o colágeno extracelular.

Outros estudos morfométricos, procuram diferenciar o comportamento de várias estruturas em regiões ao longo do ligamento periodontal de incisivos. Michaeli *et al* (1986) comparam, ligamentos de dentes normais e em erupção desimpedida mostrando variações no sentido axial e transversal desse tecido. Enquanto nos dentes com erupção impedida (normofuncionais) a área de corte transversal do compartimento junto ao dente, com exceção da região mais apical, foi uniforme no resto do ligamento,

em dentes com erupção desimpedida foi consideravelmente menor na região apical, aumentando linearmente e alcançando valores do dente impedido, na região da crista alveolar. Analisando a relação fibroblasto/matriz extracelular, verificaram que esta relação também foi quase uniforme nos dentes impedidos enquanto que nos desimpedidos foi menor e variável de modo crescente da região basal para a região incisal.

Barros (1995), analisa o diâmetro de fibrilas colágenas e as áreas relativas ocupada por elas e pela substância interfibrilar no LPD de incisivos de ratos, dividido em cinco regiões, de incisal para apical; sendo cada região dividida nos três compartimentos mencionados. Verificou que os dentes desimpedidos apresentaram tendência do diâmetro de fibrilas colágenas ser menor do que nos dentes impedidos, o mesmo ocorrendo com a sua área relativa. Já a área relativa da substância interfibrilar foi maior nos dentes desimpedidos do que nos contralaterais impedidos.

Novaes (1996) usando a mesma divisão de regiões e compartimentos no LPD do incisivo inferior de ratos comparou a densidade volumétrica de fibroblastos e matriz extracelular observados ao microscópio eletrônico. Os fibroblastos e a matriz extracelular apresentaram densidades

volumétricas praticamente uniformes ao longo do ligamento nos dentes impedidos. O desimpedimento aumentou a densidade volumétrica de fibroblastos e diminuiu a densidade volumétrica da matriz extracelular, de modo significativo na região mais apical.

Em microscopia óptica, Silva (1997) analisou a densidade volumétrica de fibroblastos e matriz extracelular nas várias regiões e compartimentos da face mesial do LPD de incisivo inferior de rato e verificou, ao contrário de Novaes (1996) que nos dentes com erupção desimpedida houve uma diminuição na densidade volumétrica de fibroblastos e um aumento na densidade volumétrica da matriz extracelular .

Nos trabalhos de Shore *et al* (1982) e Michaeli *et al* (1986) foi usado como controle incisivos normais e nos trabalhos de Beertsen & Everts (1977), Barros (1995), Novaes (1996) e Silva (1997) foram usados os contralaterais impedidos. Porém, Steigman *et al* (1989), verificaram que os dados morfométricos (distâncias, áreas e volumes) do dente e do periodonto variam entre incisivos normofuncionais, hiperfuncionais e hipofuncionais. Por exemplo , a área da secção transversal do LPD nas faces mesial e distal e o volume do ligamento em relação aos dentes normofuncionais aumentou mais

nos dentes hiperfuncionais do que nos hipofuncionais.

O objetivo do presente estudo foi o de repetir parte dos trabalhos de Novaes (1996) e de Silva (1997) no que se refere a densidades volumétricas de fibroblastos e matriz extracelular. Como nos trabalhos mencionados foram usados apenas 3 animais por grupo, a avaliação da estatística foi prejudicada. Assim neste trabalho, reduzimos o número de regiões para três (3), deixamos de considerar o compartimento intermediário, cuja delimitação é arbitrária e aumentamos consideravelmente o número de repetições, incluindo ainda, um grupo de dentes normais (impedidos normofuncionais). O mesmo material foi utilizado por Silva *et al* (1998, não publicado) para avaliar o volume dos compartimentos do LPD nas três regiões e cujos resultados serão considerados na discussão.

Os resultados de Novaes (1996 ) e Silva (1997) em relação aos volumes relativos de fibroblastos de dentes impedidos e desimpedidos foram contraditórios. A diferença foi atribuída por Silva (1997) aos prolongamentos citoplasmáticos de fibroblastos, os quais por seu tamanho, só podem ser evidenciados ao microscópio eletrônico e que ao microscópio óptico, não podem ser diferenciados do colágeno. Assim resolvemos analisar também a densidade volumétrica desses prolongamentos citoplasmáticos , tendo em

vista que há na literatura indicações de que a morfologia dos fibroblastos é alterada em função de estímulos mecânicos (Pender e McCulloch, 1991; Weinreb *et .al*, 1997).

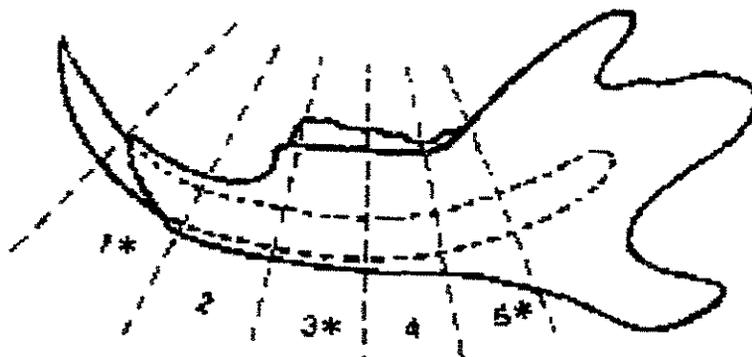
## MATERIAL E MÉTODOS

Doze ratos Wistar machos, pesando no início do experimento em média 120g, recebendo água e alimentação sólida, foram divididos em dois grupos. Um grupo de nove animais teve o incisivo inferior esquerdo seccionado à altura da papila interdental a cada dois dias, permitindo que o dente erupcionasse de modo desimpedido e portanto numa condição hipofuncional, enquanto o incisivo inferior direito permaneceu em oclusão e em condição hiperfuncional devido ao atrito deste dente com ambos incisivos superiores ( Michaeli & Weinreb, 1968) . O outro grupo, de três animais, serviu de controle, ou seja, os dentes permaneceram em condições normofuncionais de oclusão. Na literatura sobre erupção dental, os incisivos de roedores e lagomorfos em oclusão são usualmente designados de dentes impedidos ou em erupção impedida. Por facilidade de expressão, usaremos também os termos de erupção normal, erupção impedida e erupção desimpedida como sinônimos de dentes normofuncionais, hiperfuncionais e hipofuncionais respectivamente.

Os animais do grupo experimental foram sacrificados no sétimo dia, a partir do início do desimpedimento, juntamente com os animais do

grupo controle. Anestesiados com hidrato de cloral (0,4 ml/100g de peso), os animais foram perfundidos, via intracardíaca, com o fixador de Karnovsky (1965) durante 20 minutos. Em seguida, as mandíbulas foram dissecadas, divididas em hemimandíbulas, e imersas no mesmo fixador por 3 horas.

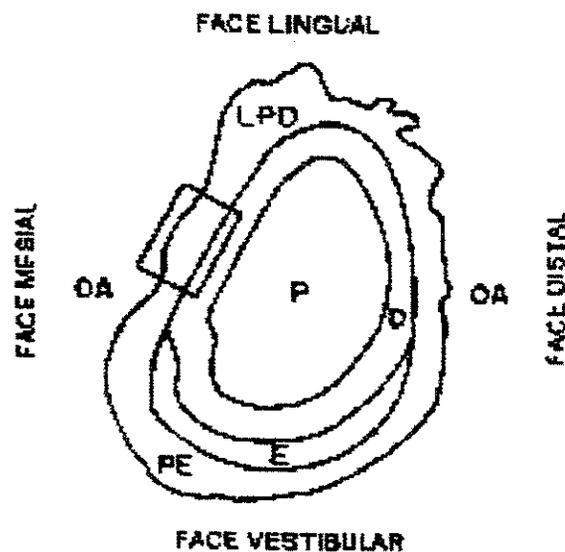
As hemimandíbulas foram desmineralizadas em EDTA 5% ( em tampão fosfato, pH 7,4) sob agitação constante por cerca de 20 dias a temperatura ambiente, sendo o término da desmineralização determinado por cortes na coroa do dente. Cada hemimandíbula foi dividida em segmentos transversais (de modo a ter suas faces o mais aproximadamente possível, perpendiculares ao longo eixo do incisivo), sendo selecionados os correspondentes indicados por R1 (junto à crista alveolar), R3 ( relacionado ao 1° molar) e R5 ( relacionado ao 3° molar), como mostrado na Fig. 1.



**Fig.1** - Esquema dos cortes transversais feitos em cada hemimandíbula mostrando os limites das regiões selecionadas, R1-R3-R5 indicadas por \*.

Os segmentos, após a lavagem em tampão fosfato pH 7,3, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M durante 2 horas e em seguida desidratados com acetona em concentrações crescentes e incluídos em araldite, de modo a obter cortes transversais do incisivo inferior e de seu ligamento periodontal.

Cortes ultrafinos foram obtidos a partir da superfície incisal de cada região, abrangendo a face mesial do ligamento (Fig 2), colhidos em grades de 300 mesh e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.



**Fig.2** - Esquema do corte transversal do incisivo, destacando-se no retângulo a região mesial da qual foram feitos cortes ultrafinos. E – esmalte jovem ou espaço ocupado pelo esmalte maduro, D - dentina, LPD - ligamento periodontal, PE -periodonto relacionado ao esmalte, P - polpa, O A- osso alveolar.

O Ligamento da face mesial de cada região foi dividido em 2 compartimentos: Junto ao Dente e Junto ao Osso Alveolar (Fig 3). O compartimento junto ao dente, é um tecido conjuntivo que apresenta uma alta celularidade, principalmente de fibroblastos. O compartimento junto ao osso alveolar, é facilmente delimitado pela presença de vasos, nervos e terminações nervosas.



**Fig. 3** - Eletromicrografia da face mesial do ligamento periodontal do incisivo inferior de rato, mostrando os compartimentos: junto ao dente (D) , junto ao osso (O), cimento (C) e osso alveolar (OA) 2000 X.

De cada compartimento, em cada região, foram fotografados 5 campos aleatórios, no aumento de 5.000x e sorteados 3 para ampliações com aumento final de 10.875x, usadas para a análise morfométrica.

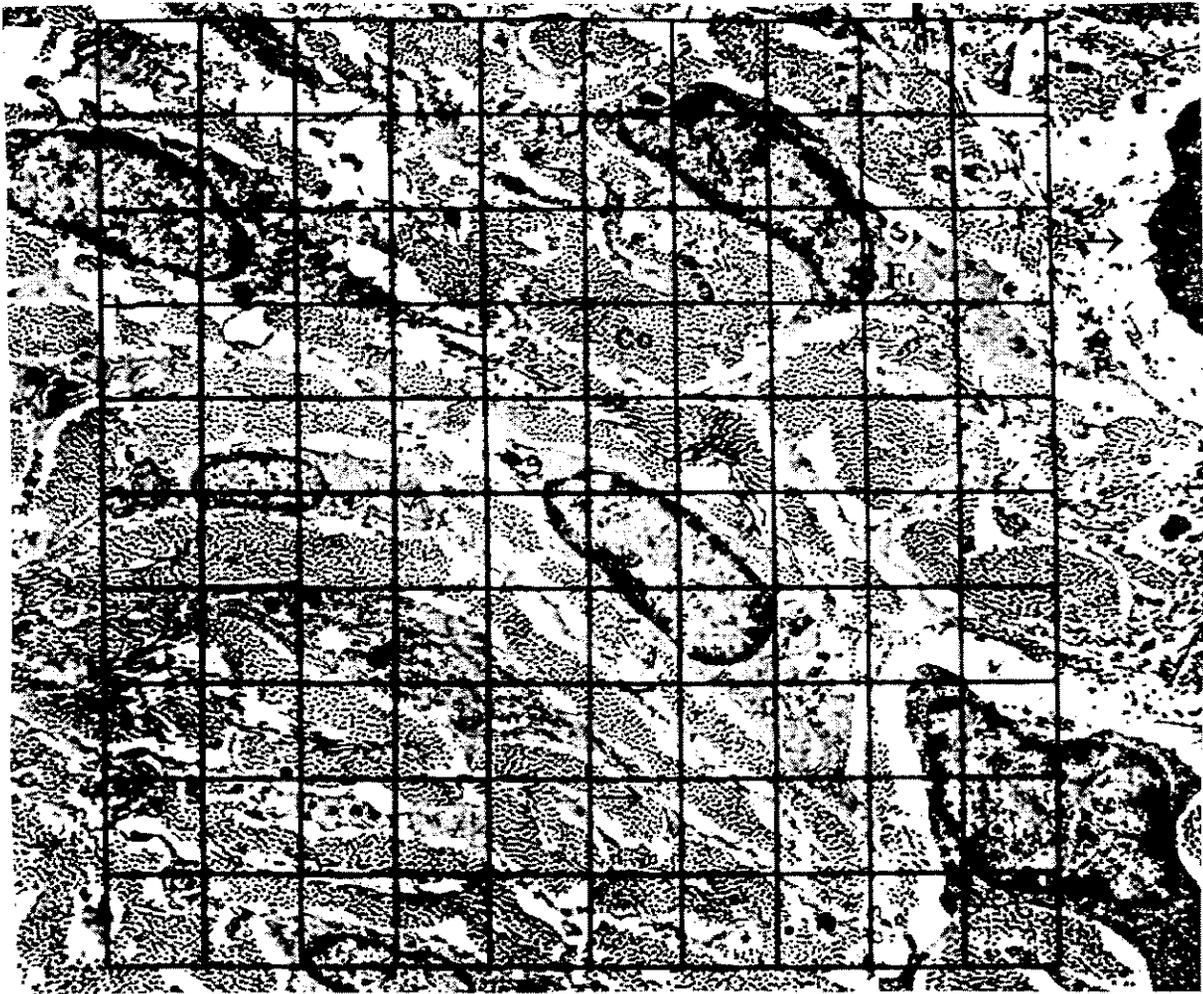
Para a determinação das densidades volumétricas, as eletromicrografias foram sobrepostas com um retículo quadriculado,

Para a determinação das densidades volumétricas, as eletronicografias foram sobrepostas com um retículo quadriculado, desenhado em transparência composto de 100 quadrados. Na ampliação usada o lado de cada quadrado correspondeu a  $1,6 \mu\text{m}$ . Assim, cada ponto de intersecção equivale a  $1,6^2 = 2,56 \mu\text{m}^2$  e a  $1,6^3 = 4,096 \mu\text{m}^3$ . (Weibel, 1969). Foram anotados, em cada foto, os impactos dos pontos de intersecção do retículo (Weibel, 1969) com as seguintes estruturas: fibroblastos e prolongamentos citoplasmáticos de fibroblastos e o colágeno da matriz extracelular. No caso do colágeno, é de se ressaltar que, na ampliação utilizada, não foi possível diferenciar com precisão as fibrilas de colágeno da substância interfibrilar rica em glicoproteínas e proteoglicanas. (Fig 4).

A média do número de pontos de impacto (P) destas estruturas em cada compartimento e região corresponde à fração de volume de cada estrutura em relação ao número total de pontos da área teste (100), ou seja, a densidade volumétrica expressa no caso por :

$$V_v = P. x 4.096 \mu\text{m}^3 / 4.096 x 10^2 \mu\text{m}^3$$

ou por uma relação percentual de volume da estrutura em relação ao volume.



**Fig 4** - Eletronmicrografia do ligamento periodontal de incisivo inferior de rato com sobreposição do reticulo usado para morfometria. (F) fibroblasto, (Co) colágeno, (seta inferior) prolongamento citoplasmático (seta superior) indica célula adjacente ao cimento tomada como referência para posicionamento do reticulo.

No compartimento junto ao dente o retículo foi posicionado de modo a excluir a camada de células justapostas ao cimento (fig. 4). No compartimento junto ao osso, as eletronmicrografias procuraram abranger

apenas o tecido conjuntivo, excluindo-se vasos e nervos, o que nem sempre foi possível, particularmente na região do 3º molar inferior, aqui designada de região 5. O retículo nas eletronicografias deste último compartimento, foi posicionado excluindo-se as células junto ao osso alveolar.

Os dados, foram submetidos à análise de variância ANOVA, segundo delineamento de parcela sub-subdividida inteiramente casualizada. A comparação das médias das interações foi feita através do teste t, elegendo “a priori” o nível de significância (n.m.s) de 5% para rejeição de hipótese de nulidade.

Foram também calculadas e analisadas pelo mesmo método estatístico, as relações volumétricas entre fibroblasto-colágeno e prolongamentos-fibroblastos.

Uma primeira análise abrangeu o conjunto de todos os dados, porém a constatação de interações dupla e tripla, estatisticamente significantes, entre condições de erupção, regiões e compartimentos, tornou muito difícil a interpretação dos resultados, principalmente na comparação entre os compartimentos junto ao dente e junto ao osso alveolar. Uma vez que neste último compartimento o número de pontos em muitas fotos ficou aquém dos 100 disponíveis pela presença de vasos e nervos, o que poderia ter influenciado

numa maior variabilidade dos dados, resolveu-se separar a análise para cada compartimento utilizando o seguinte quadro de ANOVA:

Causas de variação	GL
Foto	2
Erupção	2
Resíduo (A)	4
Região	2
Erupção X Região	4
Resíduo ( B)	192
Total	206

Além de gráficos, o comportamento das densidades volumétricos foi representado através de curvas de regressão polinomiais quadráticas usadas na interpolação dos pontos observados.

O uso de unidades “dente” e/ou corte como repetições não é aceito por muitos estatísticos. Fizemos uma outra análise com alguns parâmetros onde a repetição considerada foi a hemiarcada do animal, ou seja, os incisivos direitos hiperfuncionais ( n=9) e os esquerdos hipofuncionais (n=9) foram comparados aos respectivos dentes normofuncionais (n=3).

O quadro da análise é o seguinte:

Causas de variação	GL
Normalidade (N)	1
Resíduo (a)	10
Ratos	11
Lados (L)	1
L x N	1
Resíduo (b)	10
Dentes	23
Regiões (R)	5
R x N	5
R x L	5
Resíduo (c)	99
Total	143

## RESULTADOS

As tabelas 1 e 2 mostram as densidades volumétricas médias, expressas em porcentagem, de fibroblastos, de seus prolongamentos citoplasmáticos, do colágeno e das relações destas densidades entre fibroblastos/colágeno e prolongamentos/fibroblastos nos diferentes compartimentos e regiões da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de rato e nas condições funcionais estudadas.

A comparação destas medidas e a significância estatística das diferenças encontradas estão apresentadas nos gráficos das figuras 5 a 9. Nos dois compartimentos estes gráficos demonstram que houve algumas diferenças estatisticamente significantes dos volumes relativos das estruturas analisadas entre regiões do LPD em cada condição funcional particularmente quando se compara a região 1 com a região 5. Porém entre as condições funcionais em cada região do ligamento, as diferenças foram poucas e inconstantes (fig. 5 e 6).

Na comparação do índice entre densidades volumétricas de fibroblastos e colágeno nas diferentes condições funcionais, as diferenças entre regiões não foi significativa embora aparentemente a região 5 apresente

maior índice pelo aumento do volume relativo dos fibroblastos e diminuição do colágeno. Entre as condições funcionais há diferenças significativas entre o ligamento de dentes normofuncionais e os de condição funcional alterada nas regiões 1 e 3 (fig.7).

Em relação aos prolongamentos fibroblásticos, as diferenças de seu volume relativo entre regiões na condição normofuncional desaparecem nas condições funcionais alteradas (fig.8), e na relação prolongamentos/fibroblastos a diminuição do índice é significativa nas regiões 3 e 5 dos dentes hiper e hipofuncionais em relação aos normofuncionais (fig.9).

Contudo, pode haver uma tendência de comportamento das densidades volumétricas, que são melhor visualizadas nas curvas de regressão apresentadas nas figuras 10 e 11. Pode se observar que a densidade volumétrica dos fibroblastos no compartimento junto ao dente (fig 10), tende a aumentar da incisal (região 1) para apical (região 5) nas três condições de erupção e, também, que ela é, de modo geral, maior na erupção desimpedida seguida da erupção impedida e ambas maiores que a da erupção normal. O inverso parece ocorrer em relação ao colágeno, que diminuiu da incisal para apical, nas três condições de erupção, e que a

densidade volumétrica desta estrutura não difere entre as condições normal e impedida, ambas maiores que na condição desimpedida. Em relação aos prolongamentos citoplasmáticos há indicação de que seu volume aumenta da incisal para apical e que somente na região mais apical, este volume na erupção impedida e desimpedida diminui visivelmente em relação a erupção normal.

No compartimento junto ao osso (fig. 11), as curvas não indicam diferenças de densidades volumétricas das estruturas em questão tanto entre regiões como entre condições funcionais.

**Tabela 1** – Densidades Volumétricas de fibroblastos e de seus prolongamentos citoplasmático , matriz extracelular (colágeno) e das relações fibroblasto/colágeno e prolongamentos/fibroblastos, do compartimento **junto ao dente** das regiões 1, 3 e 5 da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de ratos, nas condições de erupção : N-normal (n=6), I-impedida (n=9) e D-desimpedida (n=9).

Estruturas	Região 1			Região 3			Região 5		
	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>D</u>
Fibroblastos	32.88 ± 7.50	37.48 ± 10.15	37.37 ± 7.54	34.05 ± 4.43	40.70 ± 9.06	46.83 ± 10.76	43.61 ± 6.91	45.66 ± 16.03	50.88 ± 12.75
prolongamentos	4.66 ± 2.95	4.29 ± 2.78	5.58 ± 2.84	7.38 ± 3.44	4.66 ± 2.96	7.00 ± 5.09	10.00 ± 5.88	5.5 ± 4.04	3.88 ± 4.23
Matriz extracelular									
colágeno	50.61 ± 10.44	50.48 ± 8.79	48.08 ± 7.50	50.38 ± 7.49	48.14 ± 9.96	38.58 ± 10.64	35.27 ± 7.80	37.12 ± 13.30	26.74 ± 13.33
Relação fib/colág.	0.69 ± 0.29	0.78 ± 0.33	0.80 ± 0.23	0.69 ± 0.15	0.90 ± 0.36	1.37 ± 0.69	1.31 ± 0.47	1.78 ± 2.13	2.33 ± 1.67
Relação prol/fibrob.	0.13 ± 0.08	0.11 ± 0.08	0.14 ± 0.07	0.21 ± 0.10	0.11 ± 0.08	0.15 ± 0.11	0.23 ± 0.15	0.13 ± 0.11	0.07 ± 0.08

**Tabela 2** – Densidades Volumétricas de fibroblastos e de seus prolongamentos citoplasmáticos, matriz extracelular (colágeno) e das relações fibroblasto/colágeno e prolongamentos/fibroblastos , do compartimento **junto ao osso** das regiões 1, 3 e 5 da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de ratos, nas condições de erupção : N-normal (n=6), I-impedida (n=9) e D-desimpedida (n=9).

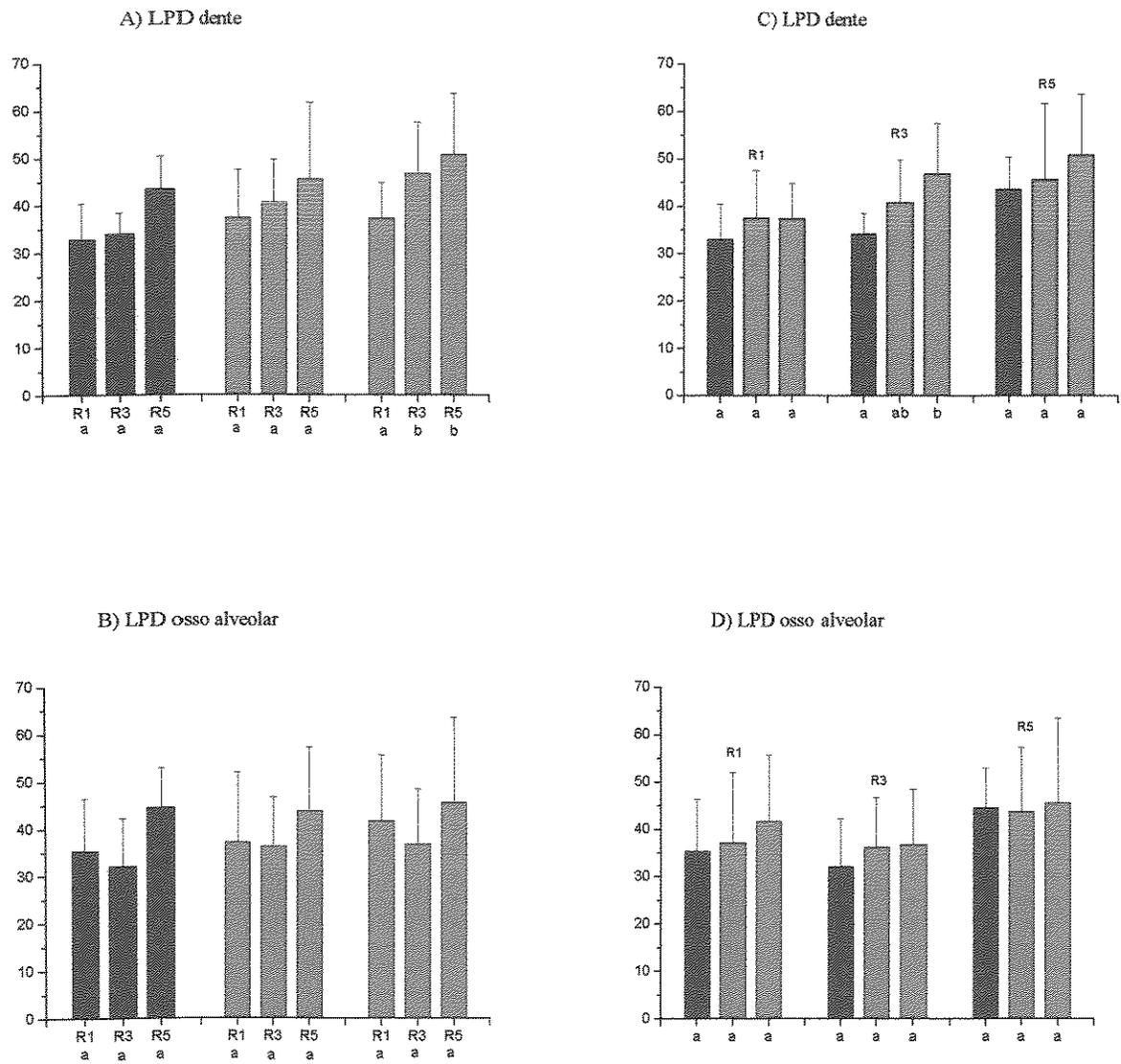
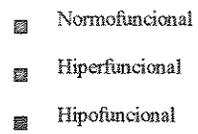
Estruturas	Região 1			Região 3			Região 5		
	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>D</u>
Fibroblastos	35.44 ± 11.04	37.22 ± 14.77	41.83 ± 13.80	32.11 ± 10.20	36.33 ± 10.44	36.79 ± 11.77	44.61 ± 8.39	43.79 ± 13.53	45.66 ± 17.94
. prolongamentos	3.44 ± 2.77	4.85 ± 3.67	3.95 ± 2.69	3.33 ± 3.28	3.92 ± 2.90	5.25 ± 3.62	4.16 ± 3.76	3.91 ± 3.77	2.70 ± 4.11
Matriz extracelular									
. colágeno	39.66 ± 11.40	45.92 ± 13.31	35.79 ± 12.27	47.5 ± 12.30	44.37 ± 11.89	47.29 ± 9.61	21.27 ± 12.75	34.04 ± 16.62	29.73 ± 19.12
Relação fib/colág.	1.02 ± 0.61	1.02 ± 0.90	1.45 ± 1.15	0.77 ± 0.43	0.92 ± 0.51	0.85 ± 0.53	2.38 ± 1.64	1.73 ± 1.88	2.03 ± 2.42
Relação prol/fibrobl.	0.09 ± 0.08	0.15 ± 0.13	0.09 ± 0.06	0.11 ± 0.11	0.11 ± 0.09	0.14 ± 0.09	0.09 ± 0.09	0.10 ± 0.11	0.06 ± 0.12

### **Legenda das figuras 5 à 9:**

**Fig. 5, 6 e 8** - Comparação das densidades volumétricas ( em % de volume em relação à área teste  $\pm$  desvio padrão) das estruturas da face mesial do Ligamento periodontal de incisivos inferiores de ratos, nos compartimentos junto ao dente e junto ao osso alveolar, entre regiões (A e B) e entre condições funcionais (C e D) nas diferentes regiões ( R1, R3 e R5) e condições de erupção: N - normal, I - impedida, D - desimpedida. As figuras 5a, 6a e 8a apresentam as comparações estatísticas de acordo com o 2º esquema de análise de variância.

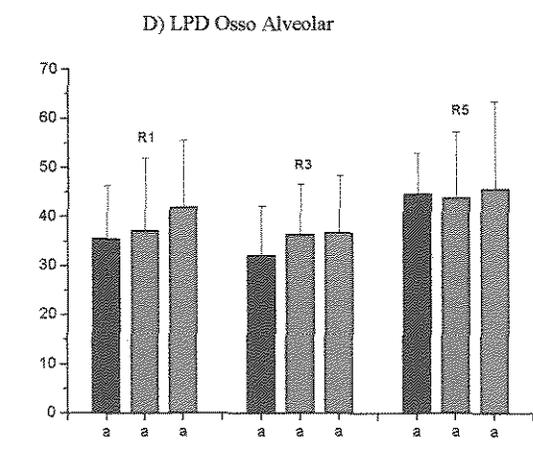
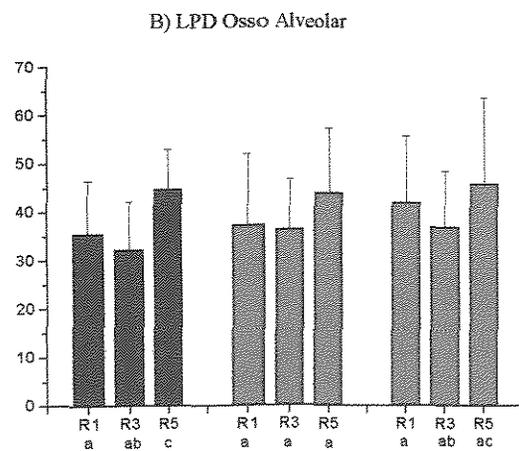
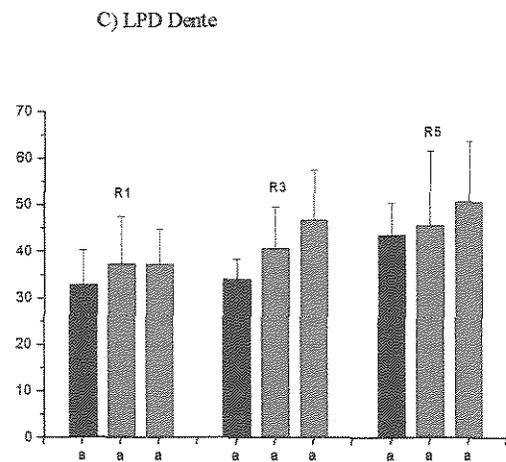
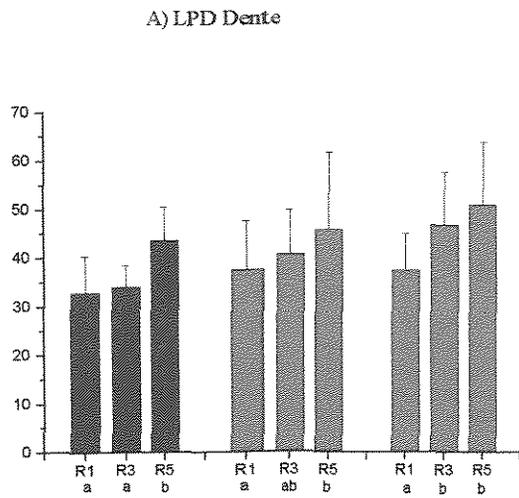
**Fig. 7 e 9** - Comparação das relações das densidades volumétricas de fibroblasto/colágeno e prolongamentos/fibroblastos .

Entre cada grupo de barras, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa,  $p < 0,05$ .

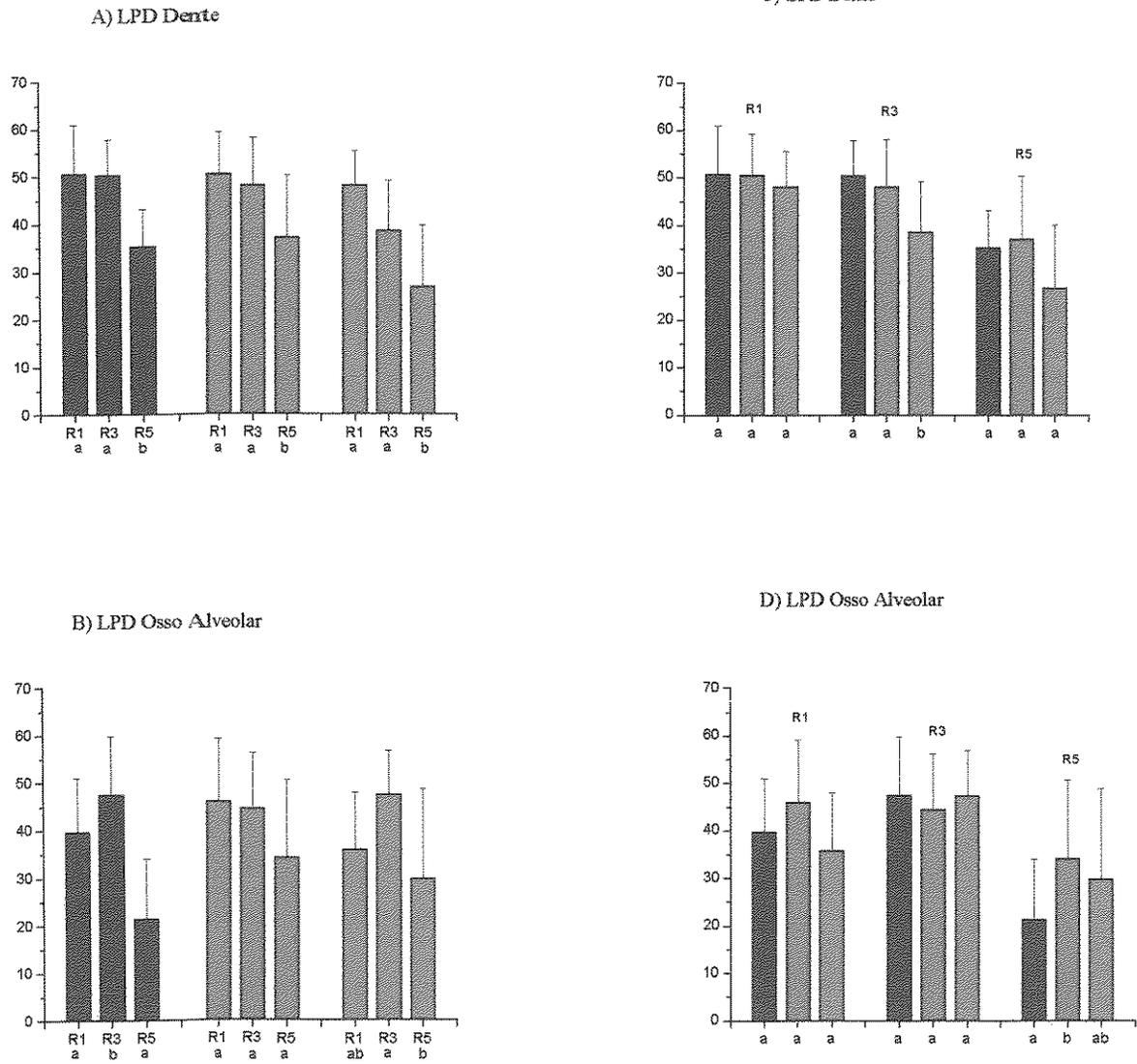
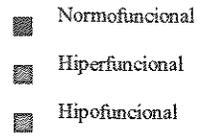


**Fig. 5 – Densidade Volumétrica de fibroblastos.**

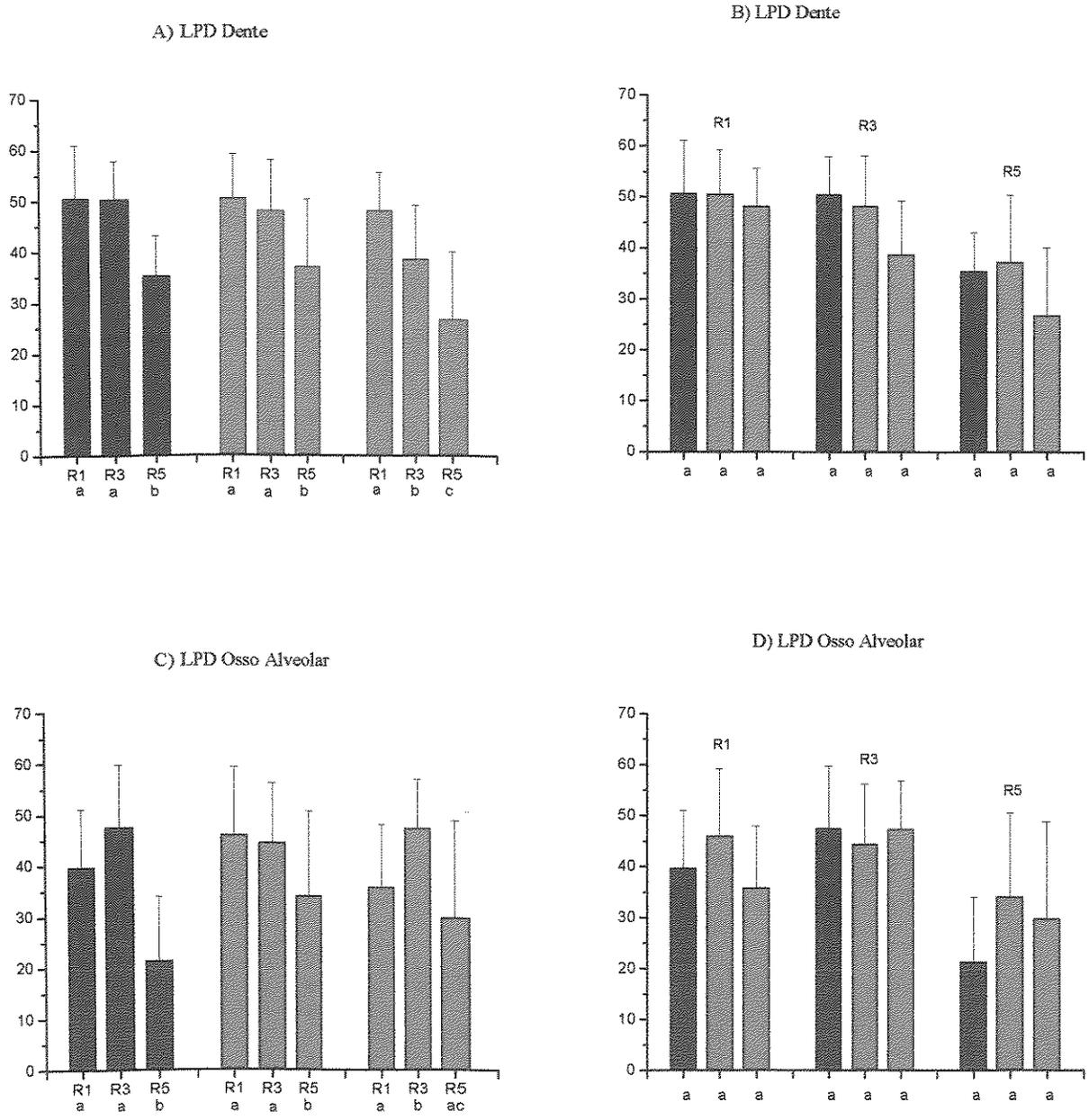
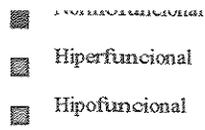
- Normofuncional
- Hiperfuncional
- Hipofuncional



**Fig. 5a – Densidade Volumétrica de fibroblastos.**

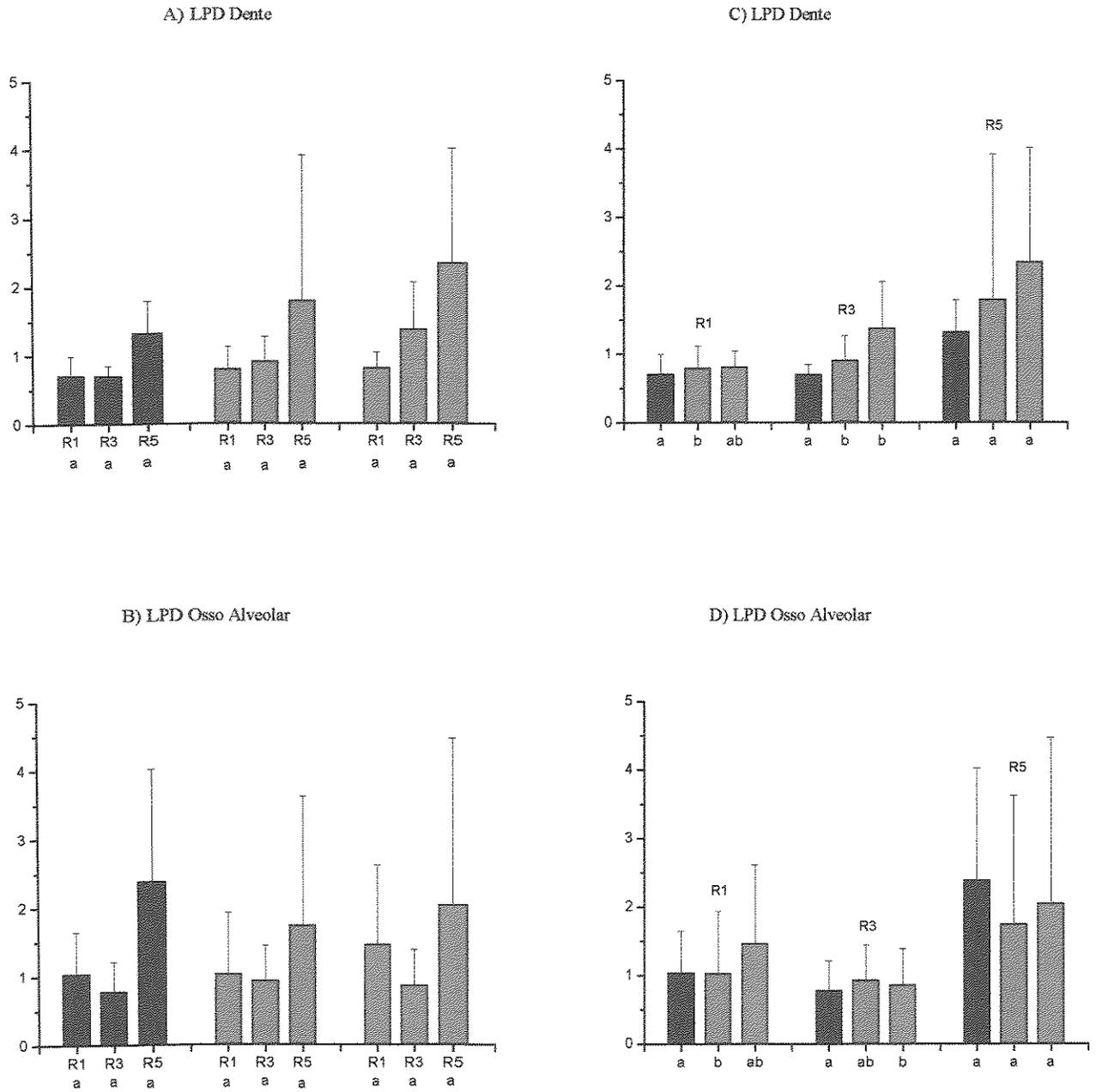


**Fig. 6 - Densidade Volumétrica de colágeno**



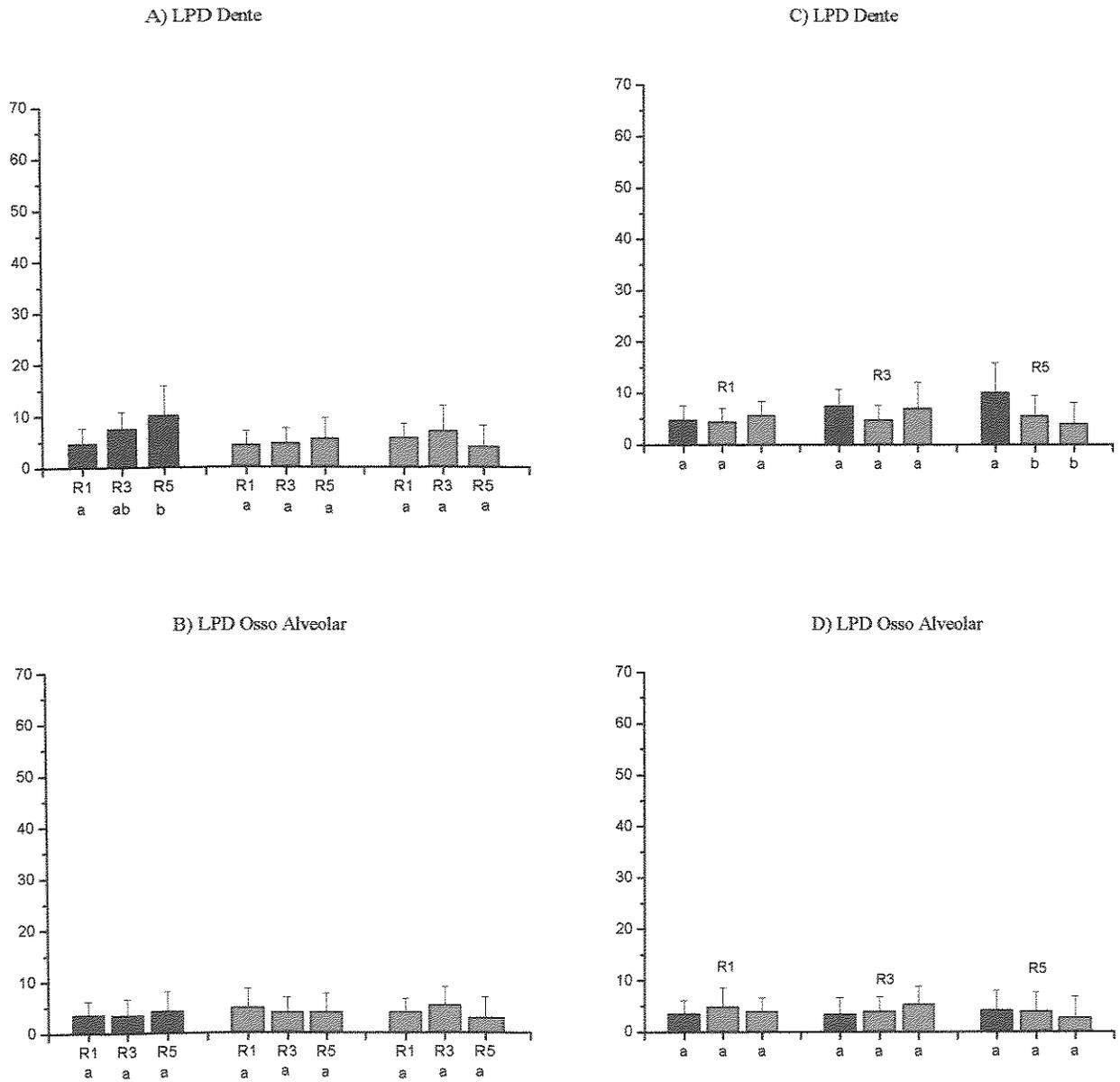
**Fig 6a – Densidade Volumétrica de colágeno**

- Normofuncional
- ▨ Hiperfuncional
- ▩ Hipofuncional



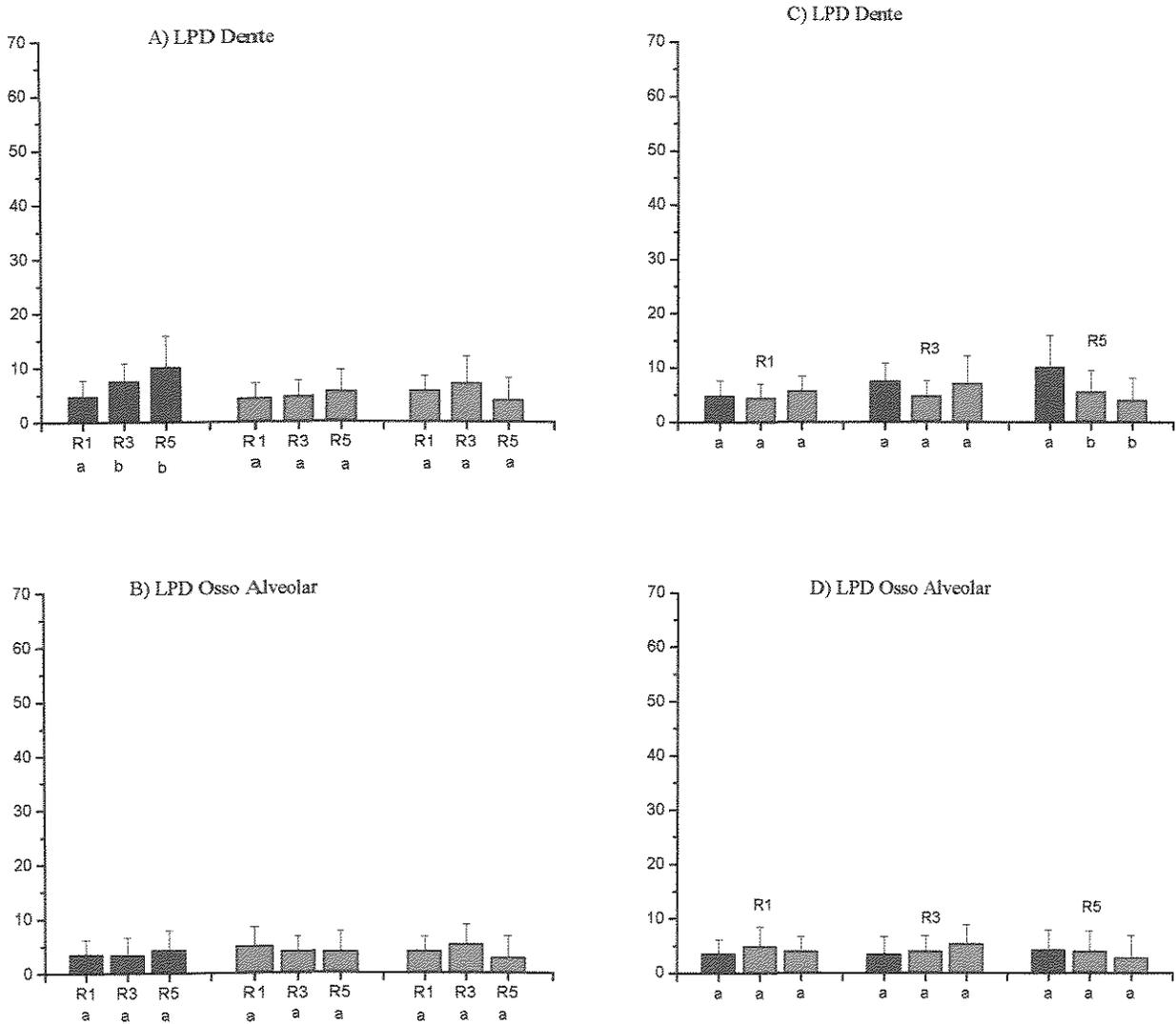
**Fig. 7 – Relação fibroblasto/colágeno**

- Normofuncional
- Hiperfuncional
- Hipofuncional



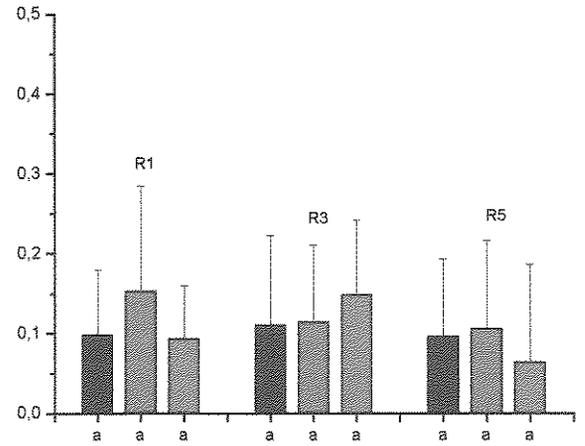
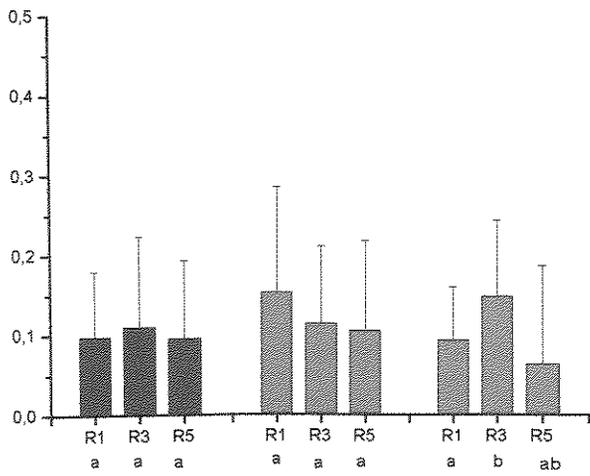
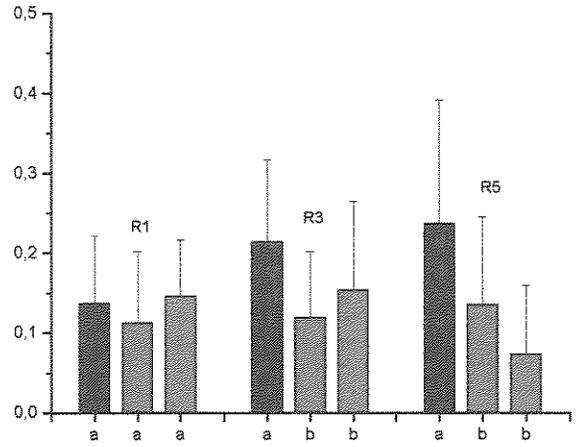
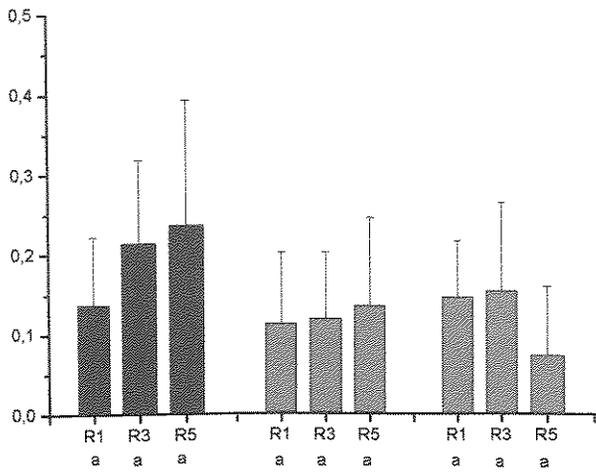
**Fig. 8 – Densidades Volumétricas de prolongamentos de fibroblastos.**

- Normofuncional
- Hiperfuncional
- Hipofuncional



**Fig. 8a – Densidade Volumétrica de prolongamento de fibroblastos**

- Normofuncional
- Hiperfuncional
- Hipofuncional



**Fig. 9 – Relação prolongamento/ fibroblasto**

**Fig. 10 e 11 -** Gráficos mostrando as curvas de regressão quadrática das densidades volumétricas de fibroblastos, colágeno e prolongamentos de fibroblastos nos compartimentos junto ao dente e junto ao osso alveolar da face mesial do ligamento periodontal de incisivos de ratos em diferentes condições funcionais.

Fibroblasto

Colágeno

Prolongamentos de Fibroblasto

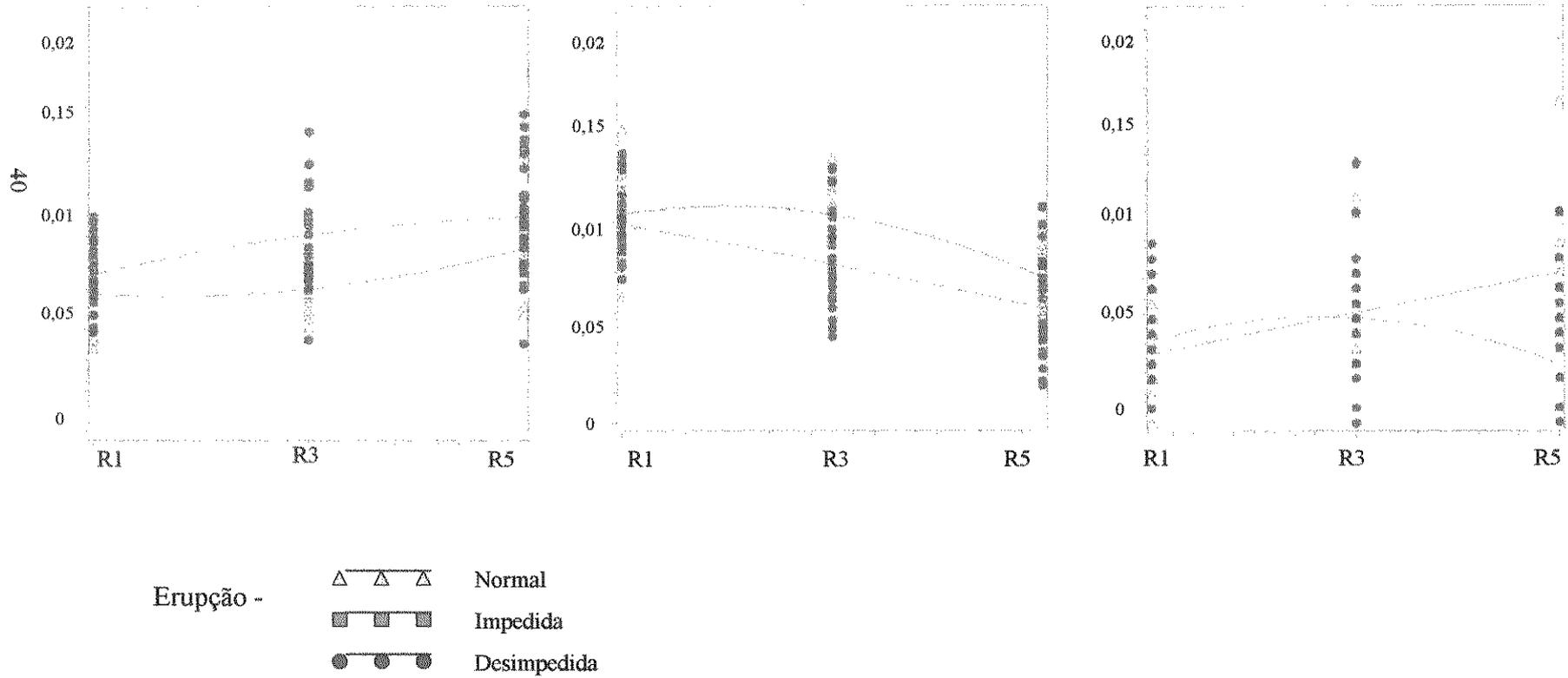
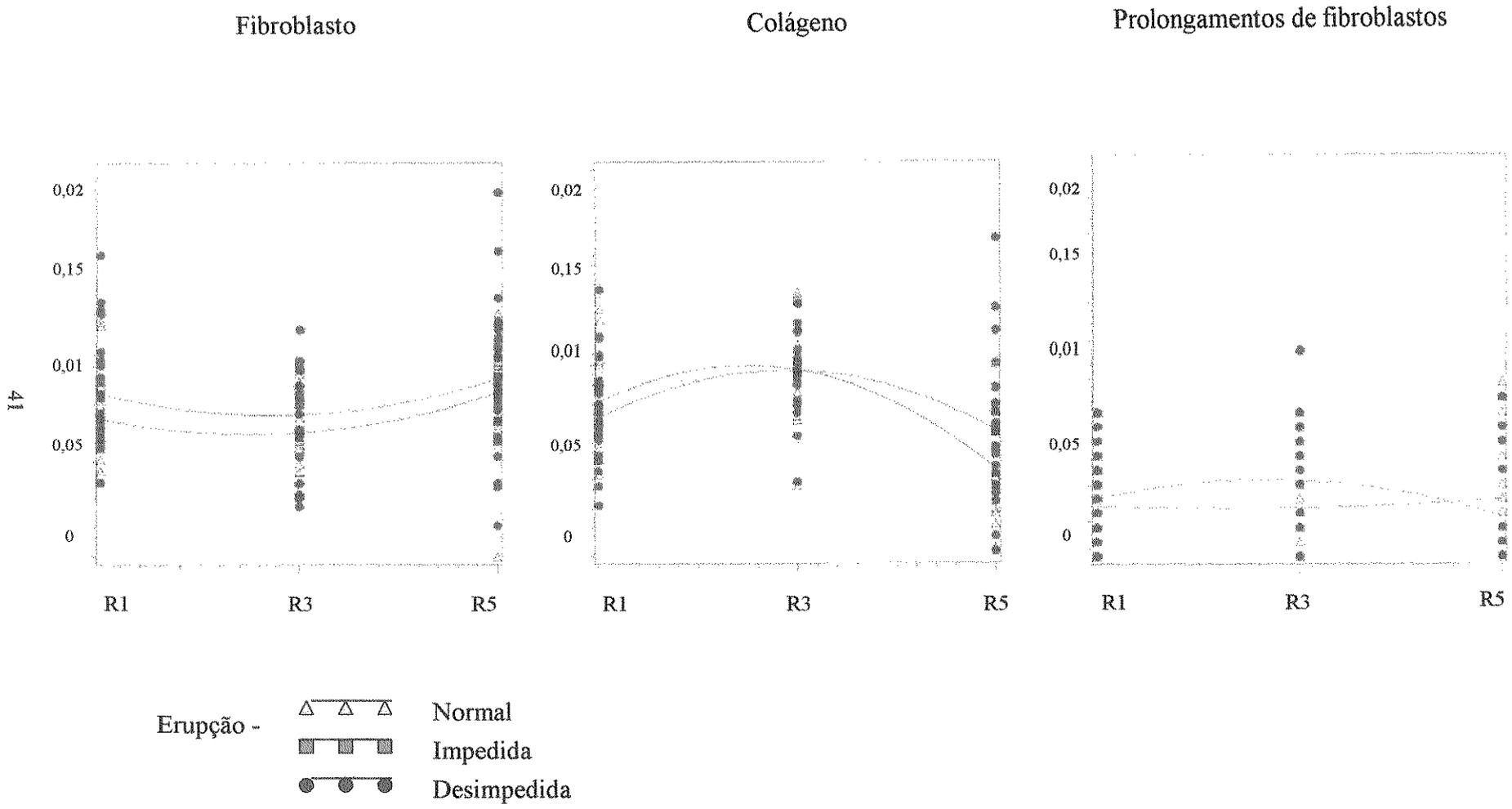


Fig.10 - Compartimento junto ao dente.



**Fig. 11- Compartimento junto ao osso.**

## DISCUSSÃO

Antes de discutir os resultados deste trabalho, é preciso comentar sobre o método estereológico empregado. A determinação da densidade volumétrica pela intersecção de pontos de uma área teste (retículo) é um método seguro quando aplicado à estruturas denominadas isotrópicas – aquelas que independente do sentido ou orientação dos cortes, a proporção das estruturas não varia, tendo como exemplo clássico o parênquima hepático. Nestes casos não há nenhuma restrição a não ser o tamanho da amostra, e eventualmente o número e o número de pontos a serem contados por amostra.

Em estruturas denominadas anisotrópicas, a proporção dos elementos que as compõe varia com o sentido do corte, caso por exemplo da pele e das mucosas. O ligamento periodontal dos incisivos de roedores enquadra-se neste tipo de estrutura, com uma particularidade de que, para distinguir com segurança seus dois compartimentos, é preciso que o corte contenha as estruturas vizinhas – cemento e osso-alveolar. Para tais estruturas, há métodos recomendados para se obter cortes aleatórios, sendo o que mais se aplicaria ao ligamento periodontal é o denominado de cortes verticais proposta

por Braddley *et al* (1986). O difícil é aplicá-lo a uma estrutura que tem cerca de 300  $\mu\text{m}$  de espessura divididas em regiões de 2 a 4 mm de extensão.

Optamos então em obter cortes com orientação definida. De um só bloco por região, usou-se somente a face mesial do ligamento, posicionando-se a grade como indicado, de modo a excluir as células cementogênicas e osteogênicas. Assim procedendo, pode-se estimar que a falta de aleatoriedade foi igual para todos os animais nas diferentes regiões e compartimentos. O número de pontos, 300 por amostra, pode ser considerado exagerado para o compartimento junto ao dente tanto pela fórmula de Hally segundo Mandarim-de-Lacerda (1995) ou de acordo Gundersen & Jensen (1987) e Gundersen *et al* (1999). Os coeficientes de variação encontrados porém, variando de médios a muito altos (no caso dos prolongamentos citoplasmáticos), indicam que o desenho experimental possa e deva ser modificado. Contudo, os resultados em relação ao compartimento junto ao dente, pareceram mais consistentes devido sua composição homogênea de fibroblastos e matriz extracelular. O mesmo não pareceu acontecer com ao compartimento junto ao osso onde, devido a presença de vasos e nervos, era preciso “ procurar ” áreas de tecido conjuntivo principalmente na região 5 e às vezes na região 3.

Primeiramente os resultados aqui apresentados devem ser analisados em relação aos obtidos no mesmo material sobre o volume relativo dos compartimentos do ligamento da face mesial do dente usando cortes semi-finos (1µm de espessura) corados com azul de toluidina ( Silva *et al* 1998, dados não publicados), cujos dados passamos a resumir.

As densidades volumétricas do ligamento como um todo e do compartimento junto ao dente não variaram entre as regiões R1 e R3, mas diminuíram significativamente na região R5 nos dentes normofuncionais. Nos dentes hiper e hipofuncionais, as densidades volumétricas diminuíram da incisal para a apical com diferenças significativas entre as três regiões.

No compartimento junto ao osso, avaliou-se separadamente o tecido conjuntivo e os vasos mais nervos ( ou terminações nervosas) . O tecido conjuntivo comportou-se como o compartimento junto ao dente nos incisivos normofuncionais e nos de função alterada. Os vasos apresentaram uma densidade volumétrica crescente da incisal para apical com diferenças significativas entre as 3 regiões e nas 3 condições funcionais. No conjunto o compartimento junto ao osso tem seu volume crescente de incisal para apical não sendo a diferença entre R1 e R3 significativa nos normofuncionais,

enquanto que nos hiper e hipofuncionais as diferenças foram significantes entre as três regiões.

Nas comparações entre condições funcionais, o ligamento como um todo e seus dois compartimentos foram sempre maiores nos dentes de função alterada em relação aos correspondentes normais, com diferenças significativas variáveis mais freqüentes em relação à região 1 do compartimento junto ao dente e aos vasos e nervos. O volume relativo do tecido conjuntivo do compartimento junto ao osso, foi menor nos dentes hiperfuncionais e maior nos dentes hipofuncionais em relação aos normofuncionais. As densidades volumétricas dos hiperfuncionais foram significativamente maiores no compartimento junto ao dente e menores no compartimento junto ao osso como um todo e no seu tecido conjuntivo em relação aos dentes hipofuncionais.

Em relação aos nossos resultados, o aumento dos volumes relativos do ligamento, no compartimento junto ao dente e tecido conjuntivo do compartimento junto ao osso nos incisivos com funções alteradas, pode ser relacionado com aumento da proporção de densidade volumétrica fibroblasto/colágeno que apresentou valores significantes nas regiões 1 e 3. O aumento deste índice se deveu tanto pela diminuição do volume relativo do

colágeno como pelo aumento deste volume dos fibroblastos mais acentuada nos dentes hipofuncionais que nos hiperfuncionais.

Estes resultados concordam com os dados morfométricos esparsos na literatura como os de Beertsen e Everts (1977), Michaeli *et al* (1986), Shore *et al* (1982), Steigman *et al* (1989) e Novaes (1996) referidos na introdução. Nos parece oportuno, porém, destacar as semelhanças dos dados deste trabalho e também os de Silva *et al* (1998) com os obtidos por Michaeli *et al* (1986) que usaram metodologia bem diversa da aqui utilizada. No trabalho desses autores, limitado ao compartimento junto ao dente em toda a extensão do ligamento de incisivos de ratos, nos dentes normofuncionais a área desta estrutura na série de cortes aumenta nos primeiros milímetros da porção apical e depois é praticamente constante até a região incisal. O mesmo resultado apresentado por Silva *et al* (1998) e também evidenciada pela densidade volumétrica dos dois principais compartimentos desta estrutura ( perfazendo mais de 80% do volume do tecido) cujas diferenças foram significantes entre a região mais apical e as duas regiões mais incisais.

Nos dentes hipofuncionais, Michaeli *et al* (1986) mostram o compartimento junto ao dente com áreas crescentes de apical para incisal, alcançando valores iguais aos dos normais próximo a crista alveolar. O mesmo

comportamento foi mostrado por Silva et al (1998) e encontra correspondência com as diferenças mais acentuadas de densidades volumétricas de fibroblastos e principalmente de colágeno. Outro dado é a diminuição do que os autores citados Michaeli et al (1986), denominam de “espaço vital” do fibroblasto ou a proporção de células em relação à matriz extracelular . Este espaço diminui na hipofunção atribuído pelos autores a um aumento do número de células por unidade de área . O que em relação aos nossos dados corresponderia a um aumento da densidade volumétrica dos fibroblastos, e uma diminuição desta densidade no colágeno.

Quanto aos prolongamentos dos fibroblastos, eles também não apresentaram diferença nas regiões e compartimentos entre as três condições funcionais. Entre regiões, só na condição normal no compartimento junto ao dente, a densidade volumétrica desta estrutura apresentou diferenças significativas. Já na relação prolongamento/fibroblasto, foi verificada a diminuição significativa nas regiões 3 e 5 nas condições de hiper e hipofunção, o que poderia explicar as diferenças de resultados entre Silva (1997) e Novaes (1996), o que contra indica estudos estereológicos desta estrutura ao microscópio de luz onde estes prolongamentos não podem ser diferenciados da matriz extracelular.

As observações de Pender *et al* (1991) em relação a polimerização de actina em fibroblastos gengivais e de ligamento que diminui com o aumento da força a que foram submetidos *in vitro*, parecem corroborar os nossos dados, uma vez que a forma da célula depende de seu citoesqueleto. Weinreb *et al* (1997) por sua vez mostraram que em incisivos desimpedidos, a morfologia do núcleo (alongamento) e a mudança de orientação, se altera.

Em geral, os autores que estudaram morfometricamente o ligamento periodontal de incisivos de roedores, como Beertsen e Everts (1997), Michaeli *et al* (1986), Steigman *et al* (1989) e Weinreb *et al* (1997) tendem a correlacionar as alterações descritas com o processo eruptivo, ou ainda que tais alterações demonstram a participação do ligamento periodontal no processo. A única exceção é o trabalho de Shore *et al* (1982) que atribui as alterações do desimpedimento – aumento de microtúbulos e da substância interfibrilar – ao aumento do metabolismo dos fibroblastos. Neste sentido parece ser a explicação mais plausível para o aumento do número de células, resultado da aceleração do crescimento e da erupção do dente desimpedido (Michaeli *et al*, 1986), o que se traduz em nossos resultados num aumento da densidade volumétrica dos fibroblastos. Nos dentes hiperfuncionais onde não ocorre alteração na taxa de erupção, o mesmo quadro se apresenta em relação

as densidades volumétricas analisadas e que também é relatado por Steigman *et al* (1989).

É de se ressaltar, que todas as alterações descritas, só foram evidenciadas algum tempo após o estabelecimento da hipofunção ( de 7 dias no caso deste trabalho e em tempos variáveis de 14 dias a 3 meses no caso dos autores citados), enquanto o aumento da velocidade da erupção se instala num período inferior a 24 hs. (Chiba *et al*,1976). No mesmo sentido podem ser interpretados os dados bioquímicos relativos a proteínas não colágenas (Van den Bos e Tonino,1984) e de glicosaminoglicanas ( Kirkham *et al* 1993), cujo aumento em dentes desimpedidos ocorrem após 14 e 21 dias de hipofunção.

As diferenças entre as densidades volumétricas de células e colágeno das regiões mais incisais em relação à região mais apical do ligamento periodontal dos incisivos , parecem estar de acordo com o conceito que o ligamento amadurece, em relação à função de sustentação, de apical para a incisal, conforme as observações de Sloan (1981) e também de Silva (informação pessoal) que descrevem um aumento de fibras de Sharpey no osso alveolar de apical para incisal.

Por outro lado, a teoria do ligamento periodontal como tecido responsável pelo processo eruptivo está sendo questionada com a evidência

que dentes sem raiz ou réplicas de dente erupcionam na ausência de ligamento (Marks et al, 1984). Em relação aos incisivos de ratos há indicação de que o ligamento mais maduro, próximo da crista alveolar não participa do processo eruptivo (Merzel et al, 2000 a) e que lesões parciais deste ligamento não alteram o processo eruptivo (Merzel et al, 2000 b).

Em conclusão, os nossos resultados indicam uma diferença em relação às densidades volumétricas de fibroblastos e do colágeno (fibrilas mais substância interfibrilar), particularmente no compartimento junto ao dente, entre a região junto à crista alveolar (onde o ligamento é mais maduro no sentido de sustentação) e a região apical (onde o ligamento é imaturo). Esta diferença se acentua nas condições de hiper e hipofunção do incisivo. Nas condições funcionais alteradas parece haver também um aumento do volume relativo de fibroblastos e uma diminuição do colágeno mais acentuados na condição hipofuncional.

Contudo é possível que um outro desenho experimental para a avaliação estereológica desta estrutura resulte em dados mais seguros. Nesse sentido, seguindo as recomendações de Gundersen e Osterby (1981) devemos aumentar o número de amostras – particularmente dos animais normofuncionais, tornando o experimento balanceado; provavelmente

aumentar o número de blocos por região, não seria difícil subdividir cada região em 2 blocos e, para compensar, poderíamos até diminuir o número de pontos por amostra. Poderemos tentar também associar as determinações do volume relativo das estruturas ao uso de cortes sistemáticos para determinação do volume real do tecido em estudo, segundo as indicações de Gundersen e Jensen (1987) e Gundersen *et al* (1999).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baddeley, A.J., Gundersen, H.J.G. and Cruz-Orive, L.M., 1986. Estimation of surface area from vertical sections. *J. of Microsc* 142: 259-276.

Barros, S.P., 1995. Estudo morfométrico ultraestrutural da matriz extracelular do ligamento periodontal do incisivo inferior de ratos, em diferentes regiões e zonas, nas condições de erupção impedida, desimpedida e retardada pela vimblastina. Tese de Doutorado , FOP - UNICAMP, Piracicaba.

Beertsen, W. and 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. and Van den Hoof, 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: 1087-1098.

Berkovitz, B.K.B. and Thomas, N. R., 1969. Unimpeded eruption in root-resected lower incisor of the rat with a preliminary note on root transection. *Archs.oral Biol.* 14: 771-780.

Berkovitz, B.K.B and Shore R.C., 1978. The ultrastructure of the enamel aspect of the rat incisor periodontium in normal and root-resected teeth. *Archs.oral Biol.* 23: 681-689.

Blaushild, N., Michaeli, Y. and Steigamn, S., 1992. Histomorphometric Study of the Periodontal Vasculature of the Rat Incisor. *J.Dent.Res.* 71:1908-1912.

Bryer, L.W., B.A., B.Sc., B.D.S., 1957. An experimental evaluation of the physiology of tooth eruption. *Int. Dent.J.* 7: 432-478.

Cahill, D.R. and Marks, S.C.Jr., 1980. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J. Oral Pathol.* 9,189-200.

Chiba,M., Tashiro,T., Tsuruta, M. and Eto, K., 1976. Acceleration and circadian rhythm of eruption rates in the rat incisor. Archs oral Biol. 21:269-271.

Gundersen, H.J.G and Jensen, E.B., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. J. Microsc . 147: 229-263.

Gundersen, H.J.G and Osterby, R., 1981. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or “Do more less well”. J. Microsc. 121: 65-73.

Gundersen, H.J.G., Jensen, E.B.V., Kiêu, K. & Nielsen, J., 1999. The efficiency of systematic sampling in stereology – reconsidered. J. Microsc 193:199-211.

Karnovsky, M. J., 1965. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27: 137-138.

Kirkham, J., Robinson, C. and Shore, R. C., 1991. Rates of protein turnover at specific sites of the rat incisor periodontal ligament J. Biol.Buccale. 19: 61-67.

Kirkham, J., Robinson, C., Phull, J.K., Shore, R.C., Moxham, B.J., Berkovitz, B.K.B.,1993. The effect of rate of eruption on periodontal ligament glycosylaminoglycan content and enamel formation in the rat incisor. Cell Tissue Res 274: 413-419.

Marks, S.C. and Cahill, D.R., 1984. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. Archs oral Biol. 29: 311-322.

Matena, V., 1973. Periodontal ligament of a rat incisor tooth. J. Periodont. 44, 629-635.

Merzel, J., Novaes, P.D., Furlan, S., 2000 a. A histological study of root-resected and root-transected rat incisors when eruption ceases, shortly before they are exfoliated from the socket. Arch. oral Biol. 45, 315-322.

Merzel, J., Novaes, P.D., Furlan, S., 2000 b. The effects of local trauma to the enamel-related periodontal tissues in the eruption of the rat incisor. *Arch oral Biology* 45, 323-333.

Michaeli, Y and Weinreb, M.M., 1968. Role of attrition and occlusal contact in the non articulating incisor. *J. Dent. Res.* 47, 633-640.

Michaeli, Y., Steigman, S., Yitschaky, M. and Weinreb, M., 1986. The response of the fibroblast population in the periodontal ligament of rat incisors to altered eruption rates. *J. Periodont. Res.* 21: 86-94.

Moxham, B. J. and Berkovitz, B. K. B., 1995. The periodontal ligament and physiological tooth movements. In : *The Periodontal Ligament in Health and Disease* ( eds Berkovitz B. K. B ; Moxham B. J. and Newman H.N.), pp. 183 - 214. Mosby - Wolf, London.

Moxham, B.J., Shore, R.C and Berkovitz, B.K.B., 1985. Fenestrated capillaries in the connective tissues of the periodontal ligament . *Microv. Res.* 30: 116-124.

Moxham, B.J., Shore, R.C and Berkovitz, B.K.B., 1991. A quantitative study of the ultrastructure of the fibroblasts within the enamel-related connective tissue of the rat incisor. *J.Biol.Buccale* 19: 135-140.

Murdoch, B.R.A., 1990. The effect of cyclophosphamide on the eruption of impeded and resected incisors in rats. *Archs oral Biol.* 35: 801-806.

Novaes, P. D.,1996. Efeitos da erupção alterada por desimpedimento e pela vimblastina, nos fibroblastos de regiões e compartimentos do ligamento periodontal de incisivos de ratos. Estudo morfométrico ultraestrutural. Tese de Doutorado, FOP-UNICAMP, Piracicaba.

Pender, N. and MacCulloch, C.A.G.,1991. Quantitation of actin polymerization in two human fibroblast sub-types responding to mechanical stretching. *J. Cell Sci.* 100: 187-193.

Shore, R.C., Moxham, B.J. and Berkovitz, B.K.B.,1982. A quantitative comparison of the ultrastructure of the periodontal ligaments of impeded and unimpeded rat incisors. *Archs.oral Biol.* 27: 423-430.

Silva, M.A.J., 1997. Estudo morfométrico dos compartimentos de várias regiões do ligamento periodontal de incisivos de ratos em condições de erupção alterada pelo desimpedimento e pela vimblastina. Tese de Mestrado, FOP - UNICAMP, Piracicaba.

Sloan, P., 1981. Some comparative observations on the distribution and form of alveolar Sharpey fibres in rat, rabbit, macaque and man. *J. Dent. Res.* 60: 119.

Sloan, P., 1978. Scanning electron microscopy of the collagen fibre architecture of the rabbit incisor periodontium. *Archs. oral, Biol.* 23: 567-572.

Steigman, S., Michaeli, Y., Yitzhaki, M. and Weinreb, M., 1989. A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor. *J.Dent.Res.* 68: 1269-1274.

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  $^3\text{H}$ -glycine by the periodontal ligament of the rat incisor. *Archs.oral Biol.* 33: 605-11.

Van den Bos, T. and 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 : 893-897.

Weibel, E.R., 1969. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.* 26: 235-302.

Weinreb, M., Gal.D, Weinreb, M.M. and Pitaru, S. 1997. Changes in the Shape and Orientation of Periodontal Ligament Fibroblasts in the Continuously Erupting Rat Incisor Following Removal of the Occlusal Load. *J. Dent Res.* 76 (10): 1660-1666.