

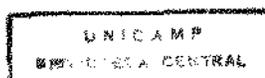
EDGARD GRANER

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL
DA GENGIVA DA FACE DISTAL DO INCISIVO INFERIOR DE RATO

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biologia e
Patologia Buco-Dental (Área
de Patologia), Faculdade de
Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

PIRACICABA - S.P.

-1993-



EDGARD GRANER 4/762

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL
DA GENGIVA DA FACE DISTAL DO INCISIVO INFERIOR DE RATO

Orientador: Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA †

*Este exemplar foi
devidamente corrigido
conforme resolucao CCPG/036/93*

*Almeida
28/10/93*

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biologia e
Patologia Buco-Dental (Área
de Patologia), Faculdade de
Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

PIRACICABA - S.P.

-1993-

Aos meus pais
MURILO e ELISABETE,

que atentos acompanham
cada passo de minha vida.

A
RENATA,

pelo incentivo, apoio e
valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr.

OSLEI PAES DE ALMEIDA, da área de
Patologia Bucal da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP, pelos ensinamentos
científicos e humanos e,
sobretudo, pela amizade.

Ao Prof. Dr. SÉRGIO ROBERTO PEREZ
LINE, pela amizade e orientação
nos trabalhos realizados no
Laboratório de Imunohistoquímica
da Disciplina de Patologia Bucal
da Faculdade de Odontologia de
Piracicaba - UNICAMP.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **MATHIAS VITTI**, coordenador geral dos cursos de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

Ao Prof. Dr. **JOSÉ FRANCISCO HÖFLING**, coordenador do curso de pós-graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

Aos professores da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba: Prof. Dr. **APARECIDO DO NASCIMENTO**, Prof. Dr. **ANTONIO WILSON SALLUM**, Prof. Dr. **SERGIO DE TOLEDO**, Prof. Dr. **ANTONIO FERNANDO MARTORELLI DE LIMA** e Prof. **ENILSON ANTONIO SALLUM**, pelo incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. **LOURENÇO BOZZO**, da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

Ao amigo **JACKS JORGE JÚNIOR**, professor da disciplina de Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela grande atenção dedicada ao início de minha carreira.

Aos professores **MÁRCIO AJUDARTE LOPES** e **ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA**, da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelo grande apoio e amizade.

À SILVIA MARIA PIACENTINI PAES DE ALMEIDA, pela dedicação e esmero nas preparações para microscopia eletrônica.

Aos amigos da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP: MARIA HELENA DE VASCONCELOS PERON, ANA CRISTINA DO AMARAL GODOY, ADRIANO LUIS MARTINS e ROSA MARIA FORNASIER e à ADNELLE A. TEIXEIRA PARANHOS, pela indispensável ajuda durante a confecção deste trabalho.

A SUELI DUARTE DE OLIVEIRA SOLIANI, pela revisão das referências bibliográficas.

Ao ELISEO APARECIDO BERTTI, desenhista da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

SUMARIO

INTRODUÇÃO01
REVISÃO DA LITERATURA	03
MATERIAL E MÉTODOS23
RESULTADOS25
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES49
RESUMO50
SUMMARY	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS52

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O incisivo inferior de rato, por ser de crescimento contínuo, é bastante usado em modelos experimentais de amelogenese e erupção dentária. A gengiva dos incisivos de rato está aderida ao esmalte na face vestibular e ao cimento nas faces proximais e lingual. O epitélio sulcular é queratinizado e forma, em direção ao conjuntivo, uma projeção chamada de papila circundental. De acordo com ANDERSON e STERN (1966) o epitélio juncional é formado por células que migram da papila circundental.

As células do epitélio juncional estão unidas à superfície dentária pela lâmina basal interna (KOBAYASHI e cols., 1976; STERN, 1981; MARIKOVA, 1983), cuja composição molecular ainda não foi bem determinada devido à sua íntima relação com uma superfície mineralizada e consequentes dificuldades na purificação de seus componentes. Ainda não está bem estabelecida a presença de laminina na junção dento-gengival, embora ela seja considerada a molécula de adesão das células epiteliais às membranas basais. Segundo TERRANOVA e MARTIN (1982), culturas de células epiteliais provenientes da pele aderem melhor sobre superfícies raspadas de dentes extraídos do que em superfícies não raspadas, sendo esta adesão mediada pela laminina. SALONEN e SANTTI (1985) observaram a presença de laminina na junção dento-gengival humana; colágeno tipo IV não foi detectado. Resultado

semelhante foi descrito por SAWADA e cols. (1990) na junção dento-gengival de molares de rato, ou seja, presença de laminina e ausência de colágeno tipo IV. Não há estudos sobre a presença de laminina e colágeno tipo IV na gengiva do incisivo inferior de rato, particularmente na junção dento-gengival e papila circundental.

Este trabalho descreve os aspectos morfológicos da gengiva da face distal do incisivo inferior de rato, em microscopia de luz e eletrônica de transmissão, assim como a presença de laminina e colágeno tipo IV, na junção dento-gengival e papila circundental.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão descreve as principais características morfológicas da gengiva de rato, enfatizando a junção dento-gengival. Para facilidade de comparação, é feita inicialmente uma descrição sucinta da gengiva e da junção dento-gengival humana. Por último é considerada a presença de laminina e colágeno tipo IV nos tecidos gengivais do rato e do homem.

GENGIVA HUMANA

A gengiva pode ser dividida em duas partes: junção dento-gengival e mucosa mastigatória.

A mucosa mastigatória, voltada para a cavidade oral, é revestida por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado ou paraqueratinizado (epitélio gengival oral), com cerca de 250 micrómetros de espessura, tendo as camadas basal, espinhosa, granulosa e córnea bem definidas. O tecido conjuntivo subjacente é denso, com longas e estreitas projeções interepiteliais e irrigado por alças capilares com numerosas anastomoses (TEN CATE, 1989).

A junção dento-gengival é formada pelos epitélios sulcular e juncional (EJ). O epitélio sulcular é contínuo e estruturalmente semelhante ao epitélio gengival oral, porém

não queratinizado e com uma interface plana com o tecido conjuntivo subjacente (TEN CATE, 1989). O epitélio juncional apresenta-se como uma fina camada que forma a interface entre a gengiva e o dente, único local do corpo onde epitélio entra em contato direto com tecido mineralizado, estando em continuidade com o epitélio sulcular (ALTMAN e cols., 1988). O tecido conjuntivo subjacente à junção dento-gengival difere do subjacente ao epitélio gengival oral por possuir menor quantidade de fibrilas de colágeno e estar infiltrado por células inflamatórias, predominantemente neutrófilos, que penetram entre as células dos epitélios juncional e sulcular, chegando eventualmente ao sulco gengival. Próximo ao epitélio juncional existe rica rede de capilares (TEN CATE, 1989).

No final da fase de maturação do esmalte os ameloblastos reduzidos desenvolvem hemidesmosomas e sintetizam uma lâmina basal que adere firmemente à superfície do esmalte, formando a adesão epitelial primária (SCHROEDER e PAGE, 1981; TEN CATE, 1989). Quando o dente emerge na cavidade bucal as células basais do epitélio oral proliferam e migram em direção apical sobre os ameloblastos reduzidos que, sem capacidade de divisão, adquirem características de epitélio escamoso estratificado. Simultaneamente, as células mais externas do epitélio reduzido do órgão do esmalte também se transformam em células escamosas, porém conservando a capacidade de divisão, substituindo gradualmente os ameloblastos reduzidos e formando a adesão epitelial secundária (SCHROEDER e PAGE, 1981; TEN CATE 1989).

O epitélio juncional, logo abaixo do sulco gengival, tem de 15 a 30 células em espessura, divididas em camadas basal, formada por células cuboidais ou ligeiramente achatadas, e suprabasal, com células bastante achatadas, núcleos alongados e paralelos à superfície dentária e com grandes espaços intercelulares, ocupados frequentemente por neutrófilos. As células se originam na camada basal e permanecem imaturas, havendo constante migração em direção à superfície do dente (LUKE, 1992). O epitélio juncional fica mais delgado à medida que se aproxima da região cervical do dente, até se transformar numa camada celular única.

As células do epitélio juncional que estão diretamente em contato com o dente sintetizam e mantêm as estruturas de adesão da gengiva à superfície dentária, morfológicamente formadas pelos hemidesmosomas e lâmina basal (GOLDMAN e COHEN, 1980). A lâmina basal, denominada de lâmina basal interna (LBI), é o sítio de inserção de filamentos provenientes dos hemidesmosomas das células do epitélio juncional. O conjunto de estruturas, epitélio juncional, lâmina basal interna e hemidesmosomas, recebeu a denominação de "Completa Unidade de Adesão" (KOBAYASHI e cols., 1976).

GENGIVA DE RATO

O rato tem um incisivo e três molares em cada quadrante da boca. Os incisivos são de crescimento contínuo e os molares são de crescimento semelhante aos dentes humanos permanentes.

Os incisivos não têm raiz, sendo formados por um cone curvo de dentina achatado no sentido médio-lateral. A coroa é revestida por esmalte na porção labial, e por cimento na lingual e laterais (proximais). A disposição anatômica do esmalte e do cimento confere ao incisivo duas junções cimento-esmalte que se dirigem lateralmente para a base do dente.

Devido as diferenças morfológicas, a gengiva dos molares e dos incisivos de rato são descritas separadamente.

GENGIVA DE MOLARES DE RATO

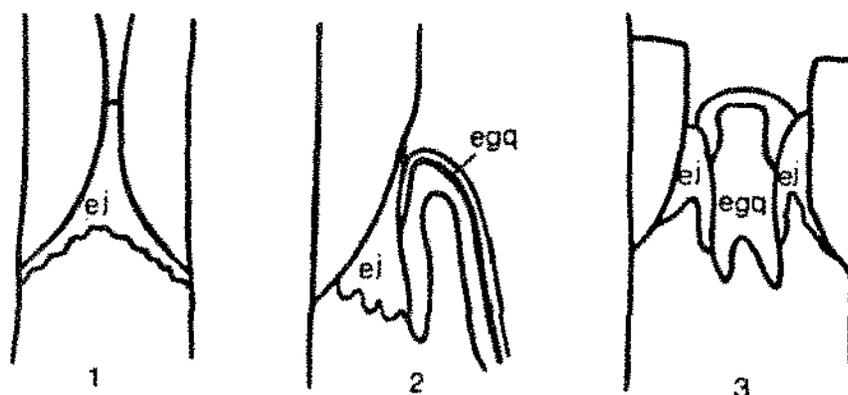
A gengiva de molares de rato é semelhante à encontrada nos dentes humanos (SKILLEN, 1930; LISTGARTEN, 1975; AMSTADI-JOSSI e SCHROEDER, 1978; YAMASAKI e cols., 1979; EGGERT e cols., 1980; LUKE, 1992).

A mucosa mastigatória é revestida por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com a queratina mais espessa na margem gengival. A medida que se afasta da margem

gengival, em direção apical, o epitélio torna-se gradativamente menos queratinizado, formando o epitélio sulcular (LISTGARTEN, 1975).

O tecido gengival de roedores como o rato, o camundongo e o hamster é semelhante e EGGERT e cols. (1980) descreveram os aspectos morfológicos da junção dento-gengival nas diferentes áreas dos molares: 1- porção interdental, formada por epitélio juncional, com células espaçadas entre si e proeminentes junções intercelulares; 2- regiões vestibular e lingual, mesial dos primeiros e distal dos terceiros molares, caracterizadas por uma prega de epitélio gengival queratinizado que penetra lateralmente e em direção apical ao epitélio juncional, com sulco gengival raso; e 3- zona de transição, observada nas porções periféricas da papila interdental, em cortes mesio-distais, caracterizada por epitélio queratinizado - que não cruza a gengiva interdental - circundado por epitélio juncional (Fig. I).

O epitélio juncional é formado por camadas de células epiteliais achatadas, frouxamente arranjadas, não queratinizadas, dispostas paralelamente à superfície do dente e entremeadas por moderado número de neutrófilos (LISTGARTEN, 1975). Está aderido ao dente através de hemidesmosomas e da lâmina basal interna e tem como limite apical a região próxima à junção cimento-esmalte, contrastando com o epitélio sulcular queratinizado adjacente com grande quantidade de grânulos de queratohialina (LISTGARTEN, 1975; YAMASAKI e cols., 1979; MARIKOVA, 1983).



egq - epitélio gengival queratinizado
 ej - epitélio juncional

Fig. 1 - Junção dento-gengival de molares de roedores: 1- porção interdental formada por epitélio juncional, 2- faces vestibular e lingual de todos os molares, mesial dos primeiros e distal dos terceiros molares, 3- zona de transição na porção periférica da papila interdental - plano méσιο-distal (EGGERT e cols., 1980).

THILANDER (1961) e NAVIA (1977), comparando a junção dento-gengival humana com a de rato, apontaram a queratinização do epitélio sulcular deste último como a mais evidente diferença morfológica. LISTGARTEN (1975) considerou como diferença importante a relação entre epitélio sulcular e epitélio juncional: no rato, o epitélio sulcular penetra apicalmente e se une com a porção coronária do epitélio juncional, nas superfícies bucal e lingual dos molares. As células do epitélio juncional, não queratinizadas, estão unidas através de desmosomas ao epitélio sulcular

queratinizado. Este mesmo autor sugeriu que a presença de uma fenda, frequentemente observada separando estes dois epitélios na parte coronária, é artefato de técnica e pode ser evitada com cuidadoso processamento do material.

Segundo BEAGRIE E SKOUGAARD (1962), em estudo realizado em camundongos, o ciclo de vida das células do epitélio juncional varia de vinte e quatro horas a cinco dias, enquanto que as células dos epitélios sulcular e gengival oral têm duração entre dez a doze dias (HIRT e cols., 1955; GREULICH, 1961), mostrando a rápida renovação do epitélio juncional.

As células da camada basal do epitélio juncional são cubóides ou levemente achatadas, com núcleos grandes e nucléolos evidentes. Ultraestruturalmente exibem quantidade variável de mitocôndrias, escasso retículo endoplasmático granular, complexo de Golgi em posição justanuclear, delgados tonofilamentos, muitos poliribosomas livres, gotículas de lipídio e grânulos de moderada eletrondensidade semelhantes a lisosomas. O envelope nuclear é interrompido por muitos poros e o núcleo contém eucromatina dispersa (GARANT, 1976; YAMASAKI e cols, 1979). Os espaços intercelulares na camada basal são semelhantes aos observados nas demais áreas do epitélio gengival, sendo irregulares e contendo numerosos microvilos (McDOUGALL, 1970).

A camada intermediária do epitélio juncional é caracterizada por células estruturalmente semelhantes às da camada basal, porém mais achatadas, com poucos desmosomas, e grandes espaços intercelulares contendo processos

citoplasmáticos semelhantes à microvilos, podendo apresentar quantidade variável de granulação de moderada eletrondensidade. Tonofilamentos e desmosomas são ligeiramente mais abundantes nesta região, assim como o número de grânulos semelhantes à lisosomas e de vacúolos intracitoplasmáticos com material similar ao encontrado nos espaços intercelulares, principalmente nas células localizadas mais superficialmente (GARANT, 1976; YAMASAKI e cols., 1979).

Na porção coronária do epitélio juncional existem poucas camadas de células extremamente achatadas, com poucos contatos celulares (desmosomas) e aspecto degenerativo como condensação do nucleoplasma, acúmulo de tonofilamentos, destruição de estruturas membranosas e aumento da quantidade de gotículas de lipídio e de vacúolos autofágicos. Poucas células relativamente intactas persistem em contato com o dente através de resíduos da lâmina basal interna e de alguns hemidesmosomas. As células do epitélio juncional justapostas ao esmalte dentário são morfologicamente semelhantes às da camada basal (YAMASAKI e cols., 1979).

A lâmina basal interna (Fig. II) foi descrita, à nível ultraestrutural, em macacos Rhesus, como uma faixa de 80 a 120 nm de espessura, subdividida em lâminas lúcida (LL) e densa (LD) e sublâmina lúcida (SLL), estando ligada ao epitélio juncional por hemidesmosomas (KOBAYASHI e cols., 1976).

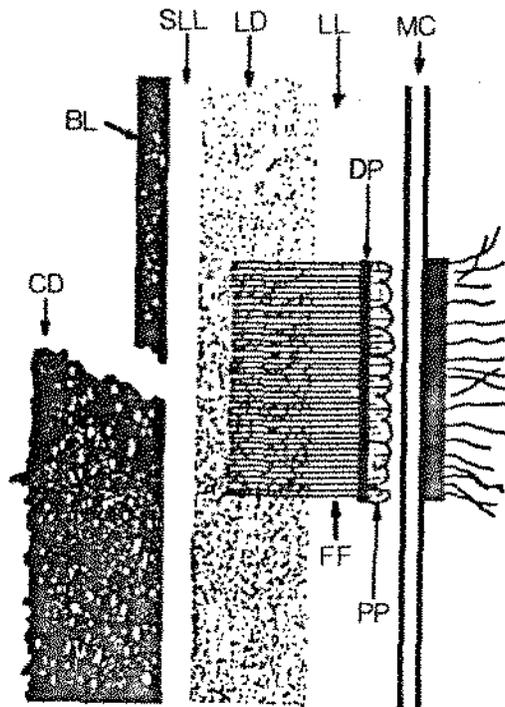


Fig. II - Completa Unidade de Adesão: membrana celular (MC), partículas piramidais (PP), densidade periférica (DP), filamentos finos (FF), lâmina lúcida (LL), lâmina densa (LD), sublâmina lúcida (SLL), borda linear (BL) e cutícula dental (CD) (KOBAYASHI e cols., 1976).

A lâmina lúcida encontra-se adjacente à membrana da célula epitelial, a sublâmina lúcida em contato com a superfície dentária e a lâmina densa entre a lâmina lúcida e a sublâmina lúcida. Uma camada eletrondensa relativamente homogênea, pouco granular, pode estar presente entre o cimento afibrilar (às vezes presente sobre o esmalte dentário) e o epitélio juncional, denominada de cutícula dental. Quando o epitélio juncional está em contato direto com o esmalte dentário ou com cimento afibrilar existe uma linha eletrondensa chamada de borda linear, que corresponde à superfície destas estruturas (KOBAYASHI e cols., 1976).

Os hemidesmosomas são formados por placa de inserção, onde se ancoram as tonofibrilas das células epiteliais, e por partículas piramidais e densidade periférica, de onde partem delgados filamentos que atravessam a lâmina lúcida e se inserem na lâmina densa (Fig. II).

A junção dento-gengival de molares de rato é semelhante à descrita por KOBAYASHI e cols. (1976) em macacos. MARIKOVA (1983) observou a sublâmina lúcida em ratos normais e após cicatrização de lesões periodontais induzidas por ligadura de seda, descrevendo também a formação de adesão epitelial sobre a superfície de cálculos dentários.

A lâmina própria da gengiva de molares de rato é formada por fibras colágenas delgadas, situadas entre o epitélio e as fibras do ligamento transeptal, com grandes espaços intersticiais ocupados por substância fundamental amorfa, alojando ainda quantidade variável de células inflamatórias como neutrófilos, linfócitos e monócitos. As fibras transeptais são bem organizadas e formam uma barreira separando a lâmina própria da gengiva do ligamento periodontal e osso alveolar subjacentes, sendo entremeadas por fibroblastos e ocasionais neutrófilos (GARANT, 1976).

A vascularização da região adjacente ao sulco gengival dos molares de rato foi estudada por WEEKES e SINS (1986) através da injeção de resina de metil-metacrilato na circulação e análise em microscopia eletrônica de varredura. Segundo estes autores, a morfologia destes vasos é semelhante ao redor de todo o dente, seja superior ou inferior, sendo

descritos como uma rede capilar achatada que se comunica com o plexo do ligamento periodontal e com vasos profundos do tecido gengival, formando alças espirais compostas por capilares e vênulas pós-capilares dirigindo-se para o epitélio sulcular. Os vasos subjacentes ao epitélio juncional são os responsáveis pela formação do fluido gengival, apresentando as junções interendoteliais abertas (ALMEIDA e BÖHM, 1978). Na região do "col" foram observadas estruturas vasculares semelhantes à glomérulos, formadas por arteríolas provenientes da porção vestibular ou lingual da papila gengival, com alças vasculares no interior de projeções de tecido conjuntivo muito próximas ao epitélio. A papila gengival é atravessada, no sentido vestibulo-lingual, por vênulas de 30 a 40 μm de diâmetro. TANAKA (1984) observou, em microscopia eletrônica de transmissão, a penetração de vasos sanguíneos entre as células do epitélio juncional, alguns deles contendo neutrófilos.

GENGIVA DE INCISIVOS DE RATO

A gengiva dos incisivos de rato é a delgada faixa de tecido situada acima da crista óssea alveolar, formando entre os dois incisivos uma longa papila interdental. Nos inferiores, a crista alveolar está localizada próxima à margem gengival, com grande extensão de tecido aderido ao dente em direção incisal, enquanto que nos superiores a crista óssea

está relativamente aquém da margem gengival, com grande parte do espaço supraalveolar preenchido por músculo (MATENA, 1972).

Devido às características morfológicas particulares do incisivo, na face labial a gengiva está aderida ao esmalte e, nas faces laterais e lingual, ao cimento.

O epitélio gengival oral reveste a porção externa da gengiva e está em continuidade com o epitélio da cavidade oral. MARTINEZ (1971), comparando à nível ultraestrutural o epitélio gengival oral da gengiva dos incisivos e dos molares, sugeriu que na região dos incisivos ele é mais resistente, provavelmente devido ao tipo de mastigação dos roedores. Segundo este autor, as células basais do epitélio gengival oral dos incisivos têm citoplasma eletrondenso, espessos feixes de tonofilamentos, além de desmosomas e hemidesmosomas maiores e mais numerosos que as células basais da gengiva dos molares, com a lâmina basal mais eletrondensa e homogênea. As células das camadas espinhosa e granulosa apresentam desmosomas maiores e em maior quantidade e mais tonofilamentos que as camadas correspondentes do epitélio gengival oral dos molares; os grânulos de queratohialina da gengiva dos incisivos são irregulares e aumentam de tamanho à medida que as células se aproximam da superfície, em contraste com os grânulos arredondados ou ovais vistos na gengiva dos molares. A camada córnea é composta por células achatadas, com pequenos espaços intercelulares e formato regular, diferentes das células irregulares com grandes espaços intercelulares da

camada córnea do epitélio gengival oral dos molares.

A gengiva justaposta ao cimento foi descrita por ANDERSON e STERN (1966): da crista gengival inicia-se o epitélio sulcular que é queratinizado e forma, em direção ao conjuntivo, uma proeminente projeção denominada papila circundental, limite inferior do sulco gengival (Fig. III). Estes mesmos autores demonstraram, através de radioautografia, que as células da papila circundental migram em direção à superfície do dente, formando o epitélio juncional. Estas células tornam-se especializadas em aderir à superfície dentária, e perdem a capacidade de divisão enquanto migram em direção à cavidade bucal com velocidade semelhante à da erupção do incisivo. NOVAES (1990) observou a presença de grandes espaços intercelulares no epitélio juncional da face distal do incisivo de rato, ocupados por neutrófilos e bactérias. Estas também foram encontradas no interior de neutrófilos e de células epiteliais.

Segundo SCHELLENS e cols. (1979), o tecido conjuntivo gengival das faces recobertas por cimento de incisivos de camundongo é dividido em duas zonas, a primeira, adjacente ao dente e em continuidade com o ligamento periodontal, e a segunda, formada pela lâmina própria da gengiva que, ao contrário da primeira, é ricamente vascularizada. Estes mesmos autores observaram também que os fibroblastos do tecido conjuntivo gengival relacionado com o dente são muito semelhantes aos do ligamento periodontal.

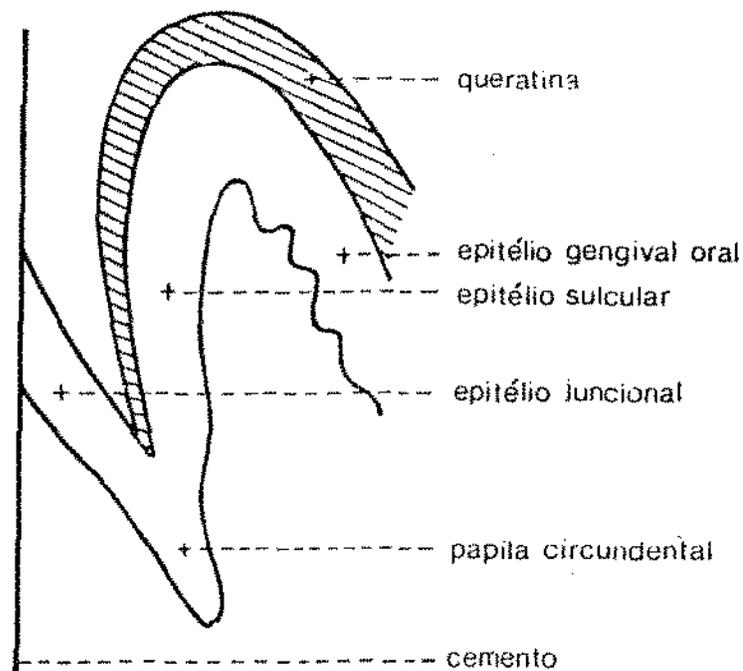


Fig. III - Incisivo de rato. Organização do epitélio gengival na superfície recoberta por cimento (ANDERSON e STERN, 1966).

O conjuntivo imediatamente abaixo do epitélio juncional é sítio de intenso processo de degradação de colágeno do ligamento periodontal, que migra em direção incisal devido à contínua erupção do dente. Foram observados, nesta área (SCHELLENS e cols., 1979) corpúsculos homogêneos e arredondados, Feulgen positivos, provavelmente vacúolos heterofágicos, dentro de células morfológicamente semelhantes a fibroblastos, sugerindo a participação destes na fagocitose e degradação de estruturas do tecido conjuntivo desta área. Corpúsculos semelhantes também foram vistos nos espaços intercelulares, provavelmente relacionados com a degradação

extracelular do colágeno. A nível ultraestrutural, alguns fibroblastos apresentam vacúolos contendo estruturas celulares parcialmente degradadas (mitocôndrias e cisternas do retículo endoplasmático granular) e, às vezes, material eletrondenso semelhante a cromatina condensada. Fibrilas de colágeno intracelular estão presentes dentro de vacúolos alongados com material eletrondenso homogêneo ou de vacúolos preenchidos por material eletronlúcido. Material homogêneo, de moderada eletrondensidade, entremeado por fibrilas colágenas foi observado logo abaixo do epitélio juncional, enquanto que material semelhante, sem fibrilas colágenas, foi encontrado entre as células deste epitélio. A camada basal do epitélio gengival apresenta hemidesmosomas associados a uma lâmina basal nítida, exceto na região adjacente a área de degradação de colágeno, onde o número de hemidesmosomas é reduzido e a lâmina basal ausente. Algumas células do epitélio juncional apresentam vacúolos com material parcialmente degradado. Em contraste com a rápida redução da quantidade de colágeno extracelular, no conjuntivo subjacente ao epitélio juncional, observou-se aumento do número de vacúolos contendo fibrilas colágenas nos fibroblastos da área (SCHELLENS e cols., 1982).

Na face labial do incisivo de rato, o epitélio juncional é formado por ameloblastos reduzidos, continuamente produzidos na base do dente, que promovem a união entre a gengiva e o dente após completarem as fases de secreção, mineralização e pigmentação, sendo substituídos à medida que descamam na cavidade bucal (STERN, 1981). Após a secreção da matriz do

esmalte os ameloblastos elaboram uma camada de material PAS positivo, semelhante à lâmina basal. Esta camada de glicoproteínas está intimamente relacionada com a superfície do esmalte e aderida através de hemidesmosomas aos ameloblastos (WARSHAWSKY, 1971).

MATENA (1972) considerou o órgão de esmalte, na face labial do incisivo, como parte integrante do periodonto, envolvido por uma estreita faixa de fibras colágenas transversais rica em arteriolas, que se adelgaça em direção incisal juntamente com a progressiva redução do órgão de esmalte. O mesmo autor descreveu uma segunda faixa de fibras colágenas, mais espessa, localizada paralelamente ao longo eixo do dente e adjacente ao osso alveolar.

LAMININA

A laminina é uma glicoproteína com peso molecular de 850 kD, abundante em membranas basais, onde se encontra ligada a colágeno tipo IV, proteoglicanas, nidogênio e a outras moléculas de laminina. A laminina também pode se ligar a moléculas de superfície celular, que atuam como receptores específicos de alta afinidade (67 kD), e a outras moléculas como heparan sulfato, gangliosídeos e sulfatídeos (MARTIN e TIMPL, 1987). A laminina foi inicialmente isolada de camundongos portadores do tumor Engelbreth-Holm-Swarm, que

produz grande quantidade de membrana basal (TIMPL e cols., 1979).

A molécula da laminina é formada por três grandes cadeias polipeptídicas denominadas A, B1 e B2, que através de ligações dissulfeto intra e inter-cadeias, formam uma estrutura em forma de cruz com três braços curtos e um longo (MARTIN e TIMPL, 1987) (Fig. IV).

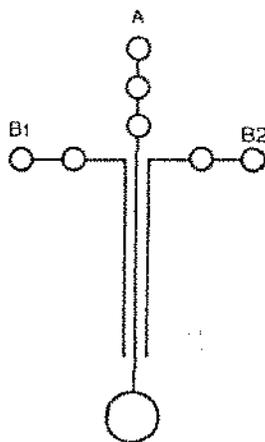


Fig. IV - Modelo da molécula de laminina, em forma de cruz, com as cadeias A, B1 e B2.

Recentemente foram identificadas formas variantes da laminina, constituídas por diferentes cadeias polipeptídicas, como a laminina S, em junção neuromuscular (HUNTER e cols., 1989), a laminina isolada de coração de camundongo, que apresenta cadeia extranumerária de 300 kD associada covalentemente às cadeias A e B (PAULSSON e SALADIN, 1989) e uma forma na qual ocorre associação das cadeias B1 e B2 com cadeias polipeptídicas antígenicamente distintas da cadeia A (EDGAR e cols., 1988).

COLÁGENO TIPO IV

O colágeno tipo IV (180 kD) é o maior componente estrutural das membranas basais, às quais confere estabilidade mecânica e alta insolubilidade. É formado por três cadeias polipeptídicas (2 cadeias $\alpha 1$ e 1 cadeia $\alpha 2$) arrançadas em forma de hélice tripla descontínua, com cerca de 390 nm de comprimento. A molécula do colágeno tipo IV (Fig. V) apresenta numa das extremidades o domínio terminal 7s, capaz de se ligar a quatro outras moléculas idênticas, e na outra o domínio globular NC1, que pode interagir com a mesma região de outra molécula, formando uma rede poligonal irregular. O colágeno tipo IV pode também se ligar a moléculas de laminina, proteoglicanas e nidogénio (TIMPL, 1989).

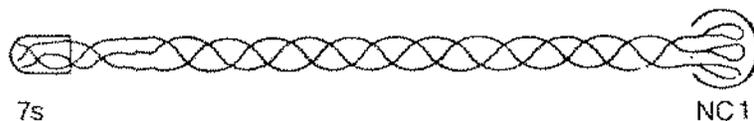


Fig. V - Modelo da molécula de colágeno tipo IV, em tripla hélice, com os domínios terminais 7s e NC1.

LAMININA E COLAGENO TIPO IV NA JUNÇÃO DENTO-GENGIVAL

O epitélio juncional está aderido ao dente pela lâmina basal interna, cuja ultraestrutura e composição molecular ainda não foi bem determinada, devido à sua íntima relação com uma superfície mineralizada e conseqüentes dificuldades na purificação de seus componentes.

A laminina parece ser a molécula de adesão das células epiteliais às membranas basais, através de sítios de ligação específicos localizados na membrana celular (TERRANOVA e cols., 1980; HOGAN, 1981; TERRANOVA e cols., 1983). SENGUPTA e cols. (1991) identificaram estes receptores em células do epitélio juncional de bovinos como uma proteína de 67 kD.

Segundo TERRANOVA e MARTIN (1982), culturas de células epiteliais provenientes da pele têm melhor adesão sobre superfícies previamente raspadas de dentes que não erupcionaram ou que foram extraídos devido à doença periodontal, que em superfícies dentárias não raspadas de amostras semelhantes, sendo esta adesão mediada pela laminina e mais forte na raiz que no esmalte.

SALONEN e SANTTI (1985) observaram a presença de laminina na porção apical da junção dento-gengival de dentes humanos como uma fina linha, ocasionalmente descontínua, ao longo da superfície do esmalte ou do cimento. O colágeno tipo IV estava presente somente na interface entre epitélio e tecido conjuntivo (lâmina basal externa), o que sugeriu a existência

de diferenças na composição molecular entre lâmina basal interna e externa.

SAWADA e cols (1990) demonstraram, à nível de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, em junção dento-gengival de molares de rato, reação imunohistoquímica positiva para laminina na lâmina basal interna e negativa para colágeno tipo IV. O colágeno tipo IV foi identificado na lâmina basal externa e na lâmina basal do epitélio oral, sendo que nestes locais moderada reação positiva para laminina também ocorreu, juntamente com a lâmina basal dos capilares da região.

A presença da laminina e colágeno tipo IV no epitélio gengival oral foi confirmada por ROMANOS e cols. (1991), em amostras de gengiva da região de molares de rato, de macaco e do homem, através de imunofluorescência indireta.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Oito incisivos inferiores de quatro ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso entre 200 e 220g, alimentados com ração e água "ad libitum", foram usados para as observações em microscopia de luz.

Os animais foram mortos por inalação de éter etílico e as mandíbulas, após fixação em formol a 10% por 6 horas, foram descalcificadas em ácido tricloroacético a 6% por 4-5 dias. A face distal dos incisivos foi removida com o auxílio de uma lâmina de barbear, juntamente com o tecido gengival adjacente, e incluída em parafina. Cortes longitudinais semi-seriados de 7 micrômetros de espessura foram corados pela hematoxilina e eosina. Para comparação com os incisivos, quatro primeiros molares inferiores de ratos de peso semelhante foram processados e cortados no sentido vestibulo lingual.

A cada série de 8 cortes, 2 cortes de 4 micrômetros de espessura foram usados para estudos imunohistoquímicos. Inicialmente, para inativação da peroxidase endógena os espécimes foram lavados em solução a 3% de H₂O₂ em metanol; a seguir incubados a 37° em solução a 0,4% de pepsina em HCL 0,01 N por 1 hora e então imersos em solução a 5% de albumina sérica bovina (BSA) em salina tamponada com fosfato (PBS). Os cortes foram então incubados, por 2 horas em câmara úmida, com antisoro anti-laminina ou anti-colágeno tipo IV na diluição de 1:100 em solução a 0,3% de BSA em PBS. Os espécimes usados

como controle negativo foram incubados como descrito com soro normal de coelho.

Em seguida todos os cortes, após lavagem em PBS, foram incubados por 2 horas com o anticorpo secundário conjugado com biotina (Sigma Chemical Company -USA), diluído na proporção de 1:500 em solução a 0,3% de BSA em PBS, por 2 horas, e com solução de avidina-peroxidase (Sigma), na mesma concentração, por 1 hora. Para revelar a enzima peroxidase foi utilizada solução a 0,04% de diaminobenzidina (DAB) em PBS, acrescida a solução 1:1000 de H₂O₂ 30%, e solução a 0.6% de cloro-naphtol em metanol, diluída a 1:10 em água destilada, por 3 e 5 minutos respectivamente.

Os antisoros anti-laminina e anti-colágeno tipo IV foram produzidos em coelho a partir de laminina e colágeno tipo IV isolados do tumor murino EHS (LINE e cols., 1990).

Para observações em microscopia eletrônica de transmissão, quatro incisivos inferiores, de outros dois ratos, foram imersos em solução de glutaraldeído a 2,5% e descalcificados em EDTA de acordo com WARSHAWSKY e MOORE (1967). Após a descalcificação, uma fatia da face distal dos incisivos foi removida e seccionada em quatro segmentos, que foram então pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%. Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina e os ultrafinos com acetato de uranila e citrato de chumbo. As observações e documentações foram feitas num microscópio Zeiss EM-10 da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

RESULTADOS

RESULTADOS

MICROSCOPIA DE LUZ

As observações foram feitas na face distal dos incisivos inferiores de rato, que é recoberta por cemento acelular com espessura de aproximadamente 3 μ m. Os cortes semi-seriados foram feitos no sentido mésio distal, da face labial para a lingual. Os aspectos morfológicos da gengiva e periodonto foram semelhantes, exceto a papila circundental.

A gengiva da face distal dos incisivos pode ser dividida em seis regiões (Fig. 1): epitélio gengival oral, conjuntivo subjacente ao epitélio gengival oral, epitélio sulcular, papila circundental, conjuntivo subjacente à papila circundental e epitélio juncional.

1. EPITÉLIO GENGIVAL ORAL

O epitélio gengival oral é do tipo pavimentoso estratificado queratinizado, com cerca de seis camadas de células. As camadas granulosa e de queratina são mais espessas na margem gengival, formando pequena projeção em direção incisal. A interface entre o epitélio gengival oral e o conjuntivo subjacente é pobre em interdigitações (Fig. 2).

2. CONJUNTIVO SUBJACENTE AO EPITÉLIO GENGIVAL ORAL

O conjuntivo subjacente ao epitélio gengival oral é denso, com feixes de fibras colágenas entremeadas por fibroblastos e estruturas vasculares de pequeno calibre (Fig. 2).

3. EPITÉLIO SULCULAR

O epitélio sulcular é queratinizado, estando em continuidade com o epitélio gengival oral na região de margem gengival. A partir da porção apical do sulco gengival o epitélio sulcular posiciona-se lateralmente ao epitélio juncional, tendo, à medida que se projeta em direção ao conjuntivo, a camada de queratina gradativamente reduzida em espessura e emitindo uma longa projeção em direção apical, chamada de papila circundental (Figs. 2 e 5).

4. PAPILA CIRCUNDENTAL

A papila circundental é uma extensão do epitélio sulcular, dividindo o tecido conjuntivo gengival em dois compartimentos. O primeiro localizado entre a superfície do

cimento e a face interna da papila, correspondendo ao ligamento periodontal em processo de reabsorção. O segundo compartimento está situado entre a face externa da papila circundental e o epitélio gengival oral, contendo o conjuntivo gengival propriamente dito (Figs. 2, 3, e 4).

Células basais revestem a superfície externa da papila circundental, tornando-se mais achatadas à medida que se aproximam da extremidade da mesma. A face interna é formada por células achatadas, dispostas paralelamente à superfície do cimento (Fig. 6). Nos cortes mais próximos à superfície labial do incisivo a papila circundental tem cerca de 600 μm de comprimento e aproximadamente 6 camadas de células, com a extremidade apical ultrapassando a junção cimento-esmalte (Fig. 2). Em direção à face lingual há redução gradativa do comprimento da papila circundental, tendo na região adjacente à face lingual aproximadamente 150 μm de comprimento e 4 camadas de células de espessura. As figuras 2, 3, e 4 mostram os aspectos da papila circundental quando próxima à face labial ou lingual do incisivo inferior do rato.

A medida que se aprofunda no conjuntivo, a papila torna-se delgada chegando a ter apenas uma ou duas células na extremidade. Em alguns casos a papila circundental mostrava-se bifurcada na extremidade, ou com formação de "ilhas" de células epiteliais (Fig. 9).

5. CONJUNTIVO SUBJACENTE A PAPILA CIRCUNDENTAL

O ligamento periodontal de incisivos de rato é formado por duas camadas. A camada interna tem as fibras colágenas e fibroblastos orientados perpendicularmente à superfície do cimento. A externa tem as fibras com orientação paralela ao longo eixo do dente. Vasos sanguíneos se encontram principalmente na interface entre estas duas camadas.

A porção do ligamento periodontal localizada próxima a papila circundental tem as fibras colágenas da camada interna orientadas obliquamente ao cimento, em direção apical, estando separada do mesmo por um espaço revestido por fibroblastos achatados (Figs 3 e 6). Quando esta separação não está presente as fibras e células da região estão paralelas ao dente. A área subjacente ao epitélio juncional geralmente está hialinizada, contendo corpúsculos arredondados e intensamente basófilos (Figs. 6 e 7).

6. EPITÉLIO JUNCIONAL

O epitélio juncional está aderido ao cimento e justaposto ao epitélio sulcular, tendo como limite apical o ligamento periodontal. É formado por duas ou três camadas de células achatadas, tendo cerca de 13 μ m de espessura e comprimento

variável, com evidentes espaços intercelulares, eventualmente ocupados por neutrófilos. Células do epitélio juncional em descamação projetam-se em direção incisal, até acima da margem gengival, acompanhando a constante erupção do incisivo (Figs. 2, 3, 4 e 5).

LAMININA E COLÁGENO TIPO IV NA GENGIVA DE RATO

1. FACE DISTAL DO INCISIVO INFERIOR

Para a detecção de laminina e colágeno tipo IV no tecido gengival, a revelação da reação imunohistoquímica foi feita com DAB e com cloro-naphtol. Com cloro-naphtol as reações foram mais intensas e os resultados semelhantes aos obtidos com DAB, exceto na superfície interna da papila circundental.

As membranas basais dos epitélios gengival oral, sulcular e da superfície externa da papila circundental foram positivas para laminina e colágeno tipo IV (Figs. 8 e 10). A superfície interna da papila circundental, nos cortes em que a reação foi revelada com DAB, foi negativa na porção incisal e levemente positiva no terço apical (Fig. 10). Eventualmente pequenos acúmulos granulares foram observados nas áreas mais incisais. Quando a revelação foi feita com o cloro-naphtol a reação foi mais intensa e nítida. A superfície interna da papila

circundental foi positiva para laminina e colágeno tipo IV, principalmente no terço apical. Nas regiões mais incisais a reação foi mais fraca, mas positiva, exceto na área subjacente ao epitélio juncional. Na face interna da papila circundental a reação foi bem mais fraca do que nas outras áreas da gengiva (Fig. 8). A interface entre o cimento e o epitélio juncional (lâmina basal interna) mostrou-se negativa para laminina e colágeno tipo IV em todos os cortes estudados, com as duas substâncias reveladoras (Figs. 8 e 10).

Laminina e colágeno tipo IV de vasos sanguíneos (Figs. 8 e 10) e fibrilas nervosas foram bem evidenciados pelos métodos usados.

2. FACE VESTIBULAR DE PRIMEIRO MOLAR INFERIOR

A gengiva da face vestibular do primeiro molar inferior de rato está justaposta ao esmalte dentário (Fig. 11). Laminina e colágeno tipo IV foram detectados em toda extensão da membrana basal dos epitélios gengival oral e sulcular. Também foram positivos vasos sanguíneos e nervos do tecido conjuntivo. A lâmina basal interna do epitélio juncional foi negativa em todos os cortes examinados e a lâmina basal externa positiva, embora mais fracamente do que nas outras regiões (Fig. 12).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As observações em microscopia eletrônica de transmissão da gengiva da face distal dos incisivos de rato foram feitas nas interfaces epitélio-cimento e epitélio-conjuntivo.

1. EPITÉLIO GENGIVAL ORAL

A lâmina basal do epitélio gengival oral mostrou estrutura característica de zonas eletrólúcida e eletrondensa, unidas ao epitélio por hemidesmosomas e ao conjuntivo subjacente por fibrilas colágenas.

2. EPITÉLIO JUNCIONAL

O epitélio juncional é formado por células alongadas de contorno irregular e grandes espaços intercelulares, preenchidos às vezes por neutrófilos. As células do epitélio juncional em contato com o cimento são achatadas, acompanhando as irregularidades da superfície dentária (Fig. 13). Soluções de continuidade entre células adjacentes podem ser observadas

(Fig. 14). A membrana da célula epitelial próxima ao cimento é rica em hemidesmosomas e o espaço entre o cimento e a célula epitelial é preenchido por material amorfo e fibrilar de eletrondensidade variável. Na região mais incisal a união epitélio-cimento parece ser mais frouxa (Figs. 15 e 16). A porção apical do epitélio juncional está em contato direto com o ligamento periodontal em degradação. As células epiteliais desta porção do epitélio juncional mostraram citoplasma hialino, sugestivo de degeneração, e poucas junções intercelulares. A lâmina basal estava ausente e as projeções celulares pronunciadas (Fig. 17).

2. PAPILA CIRCUNDENTAL

A superfície externa da papila circundental é formada por células arredondadas ou cuboídais com núcleo volumoso e central, em continuidade com a camada basal do epitélio sulcular. Nos terços médio e apical estas células assumem aspecto achatado, contornam a extremidade e revestem a parte final da superfície interna. A membrana das células basais que está voltada para o conjuntivo é rica em hemidesmosomas, onde se insere grande quantidade de tonofibrilas. A lâmina basal é contínua e evidente. Células claras foram observadas entre as células desta camada (Figs. 18, 19, e 21).

A porção central da papila circundental é formada por

células achatadas, com núcleo alongado e dispostas paralelamente à superfície dentária (Fig. 18).

Os terços médio e incisal da superfície interna da papila circundental são revestidos por células menos achatadas que as da camada intermediária, eventualmente cuboidais, com citoplasma menos eletrondenso, menor quantidade de tonofibrilas e núcleos arredondados. Estas células estão em continuidade com a camada interna do epitélio juncional e a membrana celular apresenta longas projeções. Nas áreas de degradação do ligamento periodontal a lâmina basal estava ausente ou descontínua. Acúmulos irregulares de material eletrondenso próximos a superfície celular, sugestivos de resíduos de lâmina basal, com hemidesmosomas íntegros ou em processo de degradação (Figs. 22, 23 e 24).

Em algumas áreas foram observadas estruturas membranosas circulares ou semi-circulares, de diâmetro variado, formadas de camadas eletrondensa e eletronlúcida, tendo a porção central ocupada por material granular. O conjuntivo desta região apresentou aparente diminuição na densidade de fibrilas colágenas, com formação de espaços adjacentes à superfície celular das células internas (Figs. 22 e 25), região onde ocasionais polimorfonucleares neutrófilos foram encontrados (Fig. 26).

Fig. 1 -

Esquema da gengiva na face distal do incisivo inferior de rato.

- 1- dentina
- 2- cemento
- 3- epitélio juncional
- 4- células do epitélio juncional em descamação
- 5- epitélio sulcular
- 6- sulco gengival
- 7- epitélio gengival oral
- 8- papila circundental
- 9- área de degradação do ligamento periodontal
- 10- ligamento periodontal
- 11- conjuntivo gengival
- 12- crista óssea alveolar

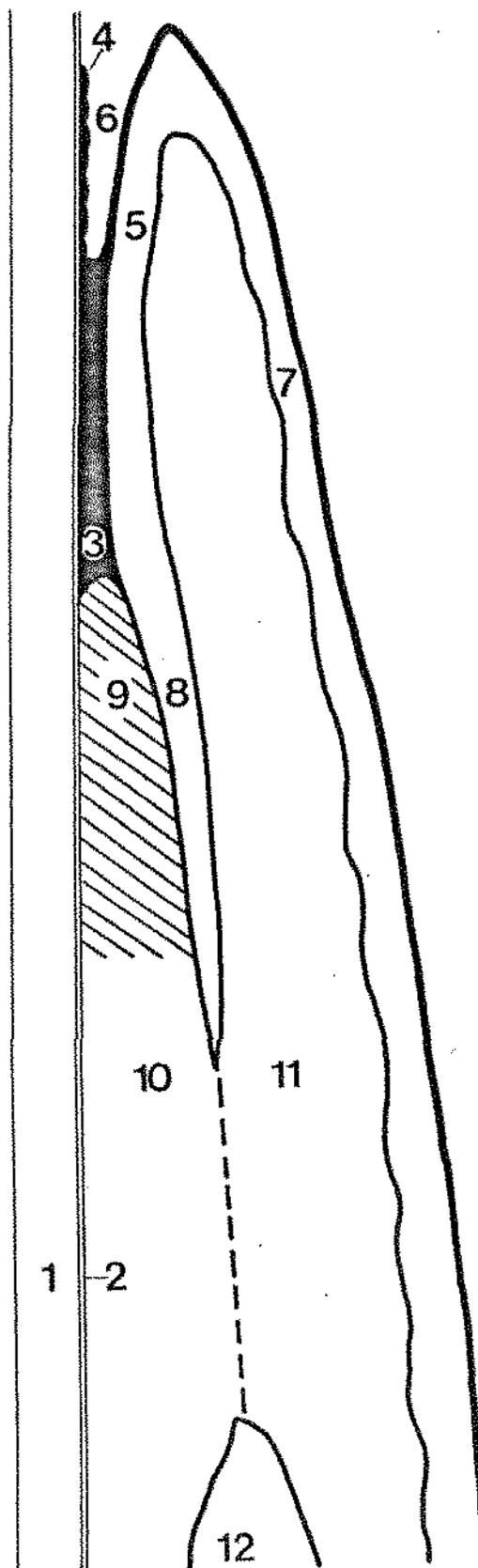


Fig. 2 - Gengiva justaposta à face distal do incisivo de rato, em corte próximo à superfície labial. O epitélio gengival oral (O) é pobre em interdigitações. O epitélio sulcular (S) penetra em direção apical paralelamente ao epitélio juncional (J). A papila circundental (P) é longa e espessa, ultrapassa a junção cimento-esmalte (seta) e separa o conjuntivo gengival (G) da área de reabsorção de ligamento periodontal (R) (160 x).

C - cimento

D - dentina

M - margem gengival

E - esmalte

* - sulco gengival

Fig. 3 - Corte aprofundado da gengiva da face distal do mesmo dente da figura anterior (próximo ao terço médio). A papila circundental (P) tem menor comprimento e extremidade delgada. Evidentes espaços intercelulares estão presentes no epitélio juncional (setas). A separação entre o cimento e o conjuntivo (*) é artefato frequente nestes preparados (160 x).

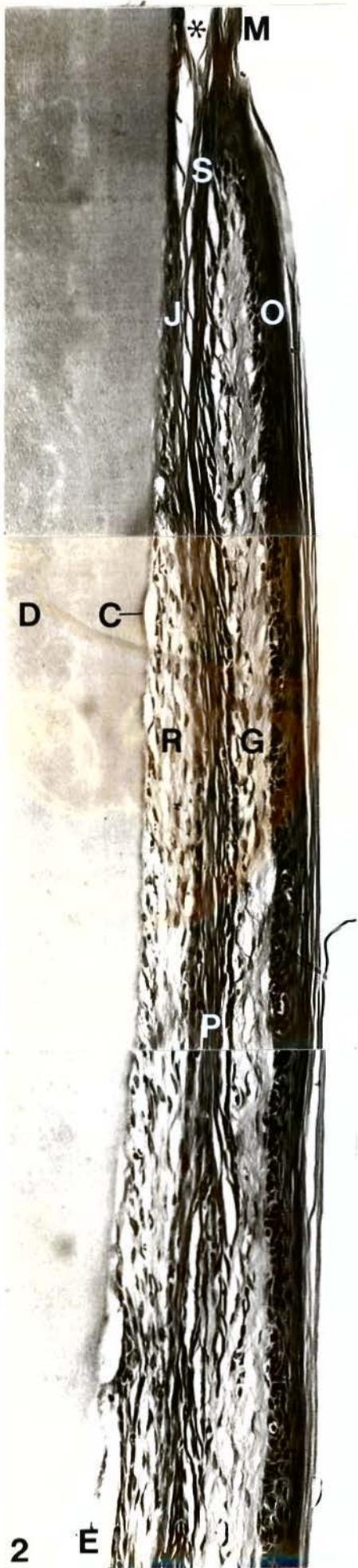


Fig. 4 - Terço lingual da face distal do incisivo inferior de rato mostrando a papila circundental (P) curta (160 x).

Fig. 5 - Detalhe do sulco gengival, mostrando o epitélio sulcular queratinizado (S) e o epitélio juncional (J) justaposto ao cimento (C). A seta indica células do epitélio juncional em descamação para o meio bucal (400 x).

Fig. 6 - Maior aumento da área de reabsorção do ligamento periodontal (R). Observa-se separação entre conjuntivo e cimento, parte do epitélio juncional (J) e superfícies interna (I) e externa (E) da papila circundental (400 x).

Fig. 7 - Ligamento periodontal localizado logo abaixo do epitélio juncional apresentando intensa hialinização (*) e corpúsculos basófilos (setas) (400 x).

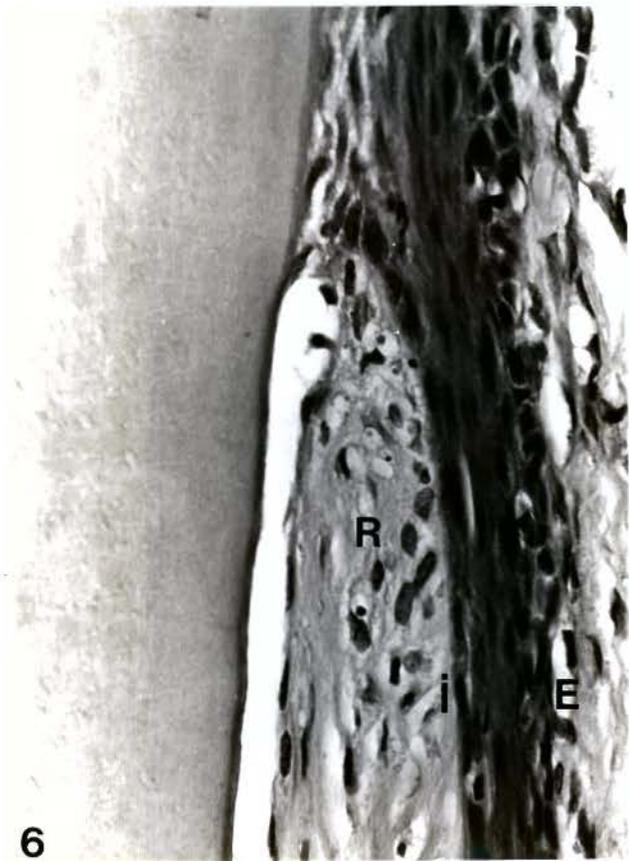
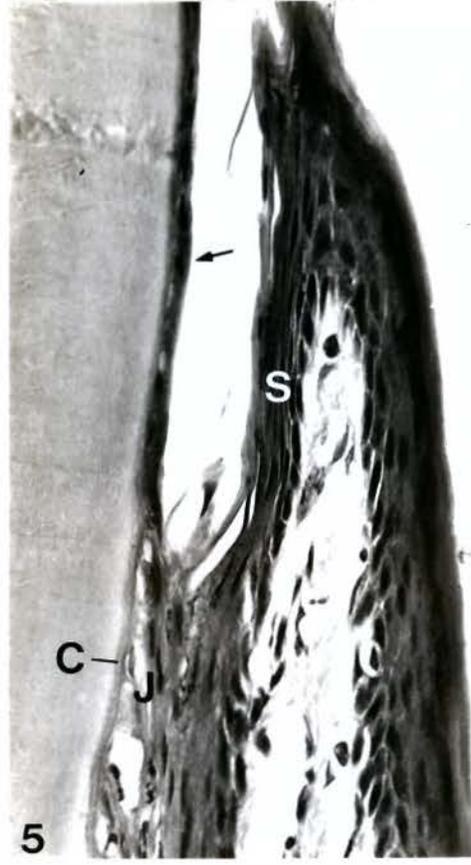
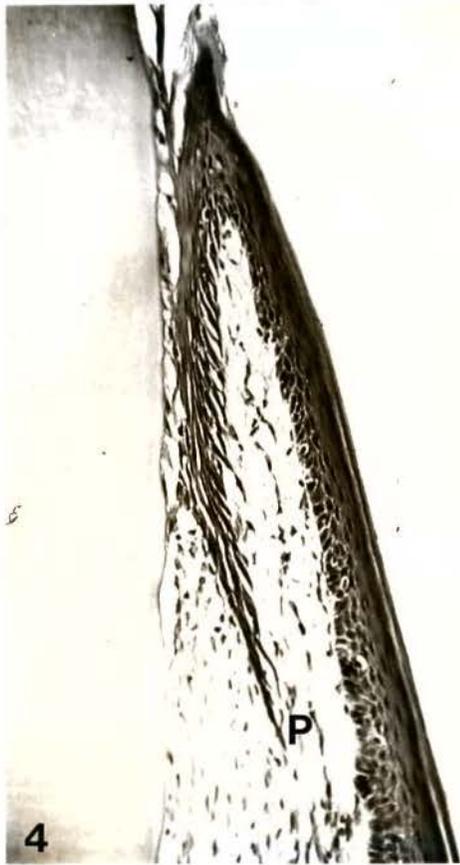


Fig. 8 -

Reação imunohistoquímica para evidenciação de laminina na gengiva da face distal do incisivo inferior de rato, revelada com cloro-naphtol. A marcação é positiva na membrana basal dos epitélios gengival oral (O) e sulcular (S), assim como na superfície externa e porção apical da superfície interna da papila circundental (P). A positividade é menor nos terços médio e incisal da superfície interna da papila circundental (setas curtas) e a reação negativa na área imediatamente abaixo do epitélio juncional e na interface entre epitélio juncional (J) e cimento (C) (setas longas) (160 x).

v: vasos sanguíneos

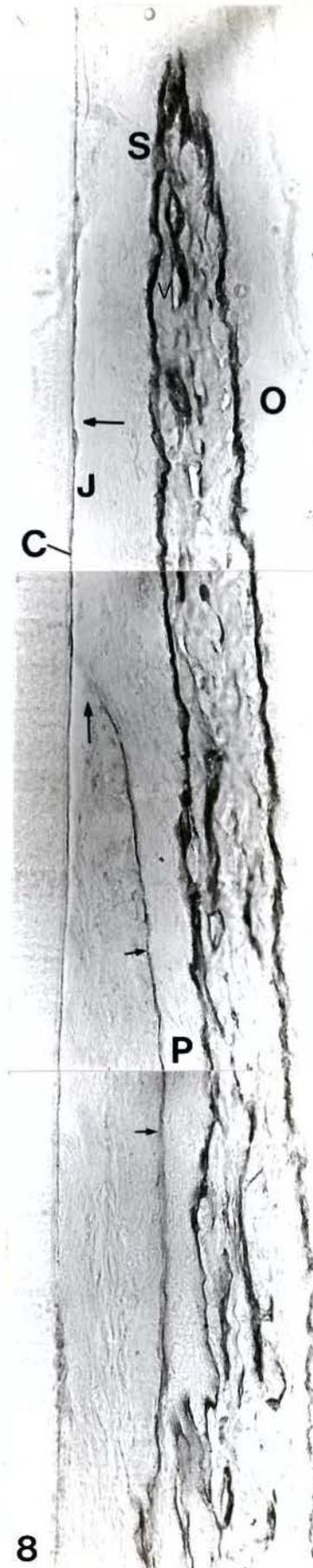


Fig. 9 - Perda de continuidade da papila circundental (P), com formação de "ilha" epitelial (seta) (120 x).

Fig. 10- Reação imunohistoquímica para evidenciação de colágeno tipo IV na gengiva da face distal de incisivo inferior de rato, revelada com DAB. A marcação é positiva na região de membrana basal dos epitélios gengival oral (O) e sulcular (S), assim como na superfície externa e porções média e apical da superfície interna da papila circundental (P). A reação é fraca no terço médio da superfície interna da papila circundental (setas curtas) e negativa na interface entre epitélio juncional (J) e cemento (C) (setas longas) (120 x).

v: vasos sanguíneos

*: separação entre dente e epitélio juncional - artefato de técnica

Fig. 11- Gengiva da face vestibular do primeiro molar inferior de rato corada pela HE (120 x).

O - epitélio gengival oral

S - epitélio sulcular

J - epitélio juncional

D - dentina

C - cemento

E - esmalte

Fig. 12- Laminina na gengiva da face vestibular de primeiro molar inferior de rato. A marcação é positiva na região de membrana basal dos epitélios gengival oral (O) e sulcular (S). A reação na membrana basal externa do epitélio juncional foi menos intensa (setas curtas). Na lâmina basal interna foi negativa (setas longas) (120 x).

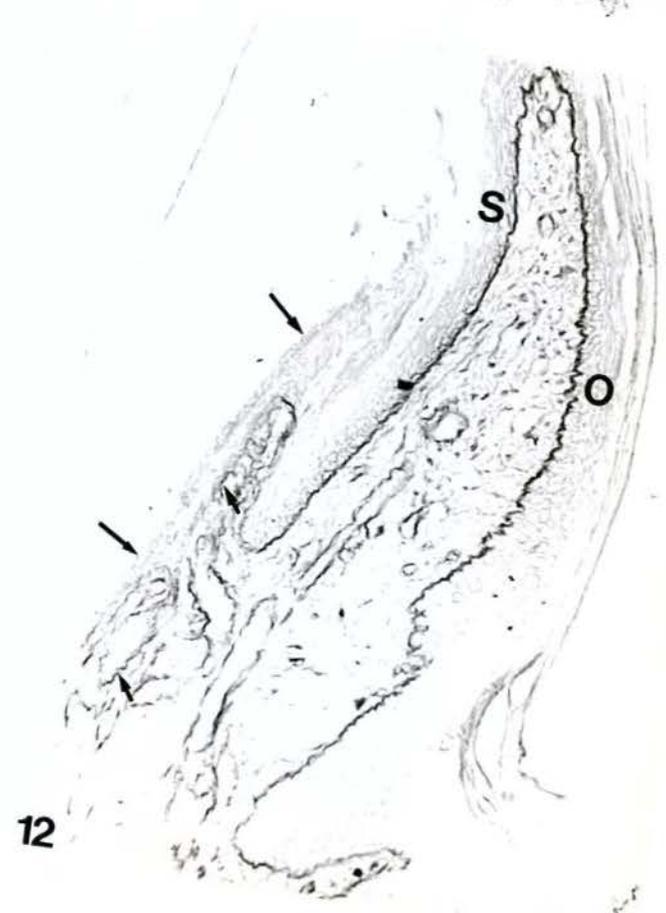
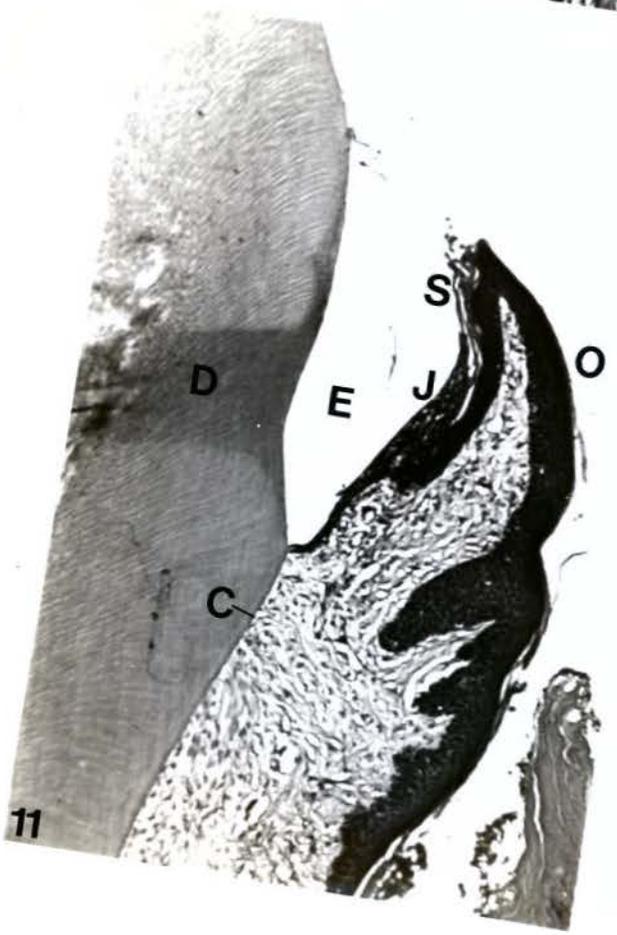
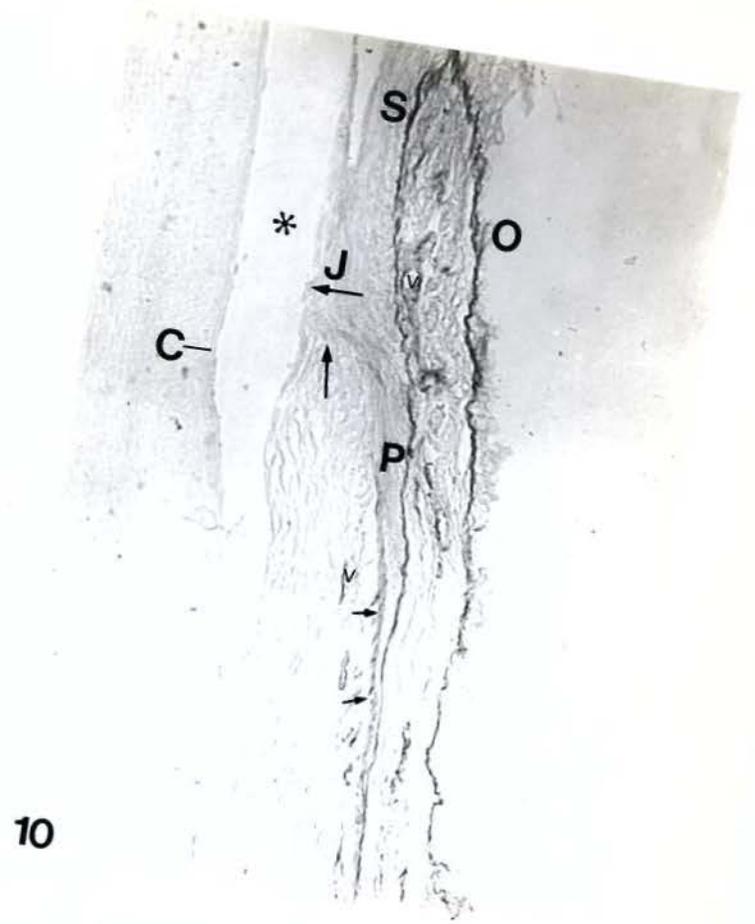


Fig. 13- Microscopia eletrônica do epitélio juncional da face distal do incisivo inferior de rato. Observa-se células achatadas justapostas ao cimento e grandes espaços intercelulares (*) com polimorfonucleares neutrófilos (setas) (1800 x).

C - cimento

D - dentina

Fig. 14- Espaço entre duas células da camada interna do epitélio juncional ocupado por material de aspecto granular (*). Parte do cimento não está recoberta por epitélio (9000 x).

D - dentina

C - cimento

Fig. 15- Microscopia eletrônica de célula da camada interna do epitélio juncional em contato com o cimento (C). Observa-se hemidesmosomas na membrana celular (setas longas), material amorfo e fibrilar (*) entre a célula epitelial e o cimento e superfície eletrondensa do cimento (setas curtas) (14000 x).

D - dentina

Fig. 16- Parte da última célula do epitélio juncional em direção incisal (J). Acima dela observa-se material amorfo e restos celulares (*) (11000 x).

D - dentina

C - cimento

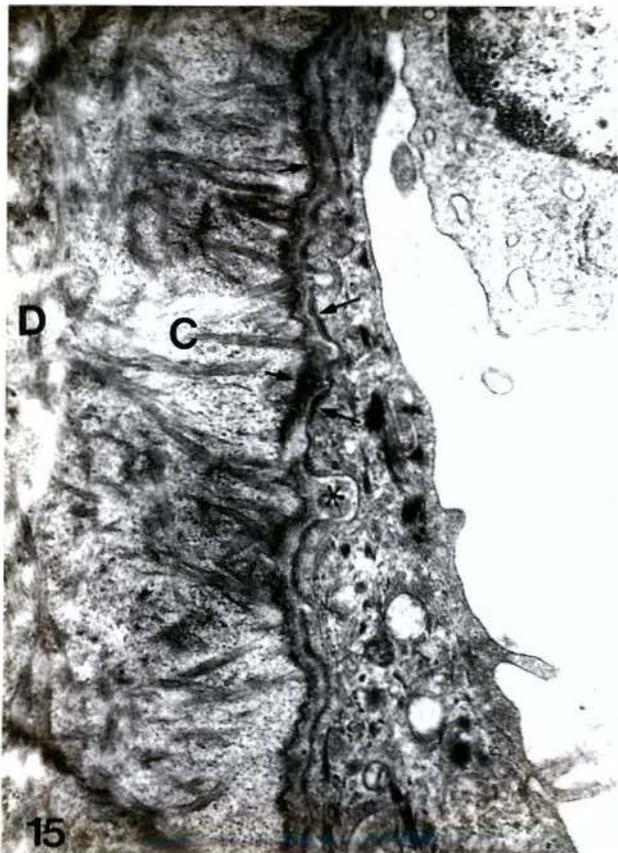
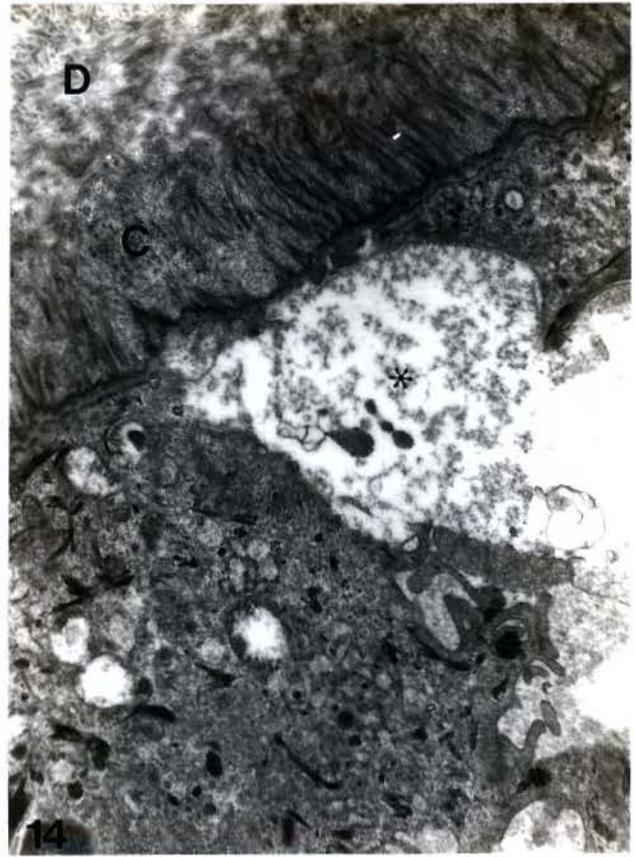


Fig. 17- Porção apical do epitélio juncional (J). Observa-se colágeno hialinizado na área de degradação do ligamento periodontal (*) (4300 x).

Fig. 18- Porção terminal da papila circundental. Os aspectos são semelhantes na superfície interna (I) e externa (E), com células epiteliais recobertas por membrana basal (1800 x).

E - superfície externa

I - superfície interna

Fig. 19- Maior aumento da figura anterior mostrando a lâmina basal (setas) nos dois lados da papila circundental (9000 x).

C - célula clara

Fig. 20- Maior aumento da figura anterior. Observa-se nitidamente os hemidesmosomas (HD) e a lâmina basal subdividida em lâminas lúcida (LL) e densa (LD) (28000 x).

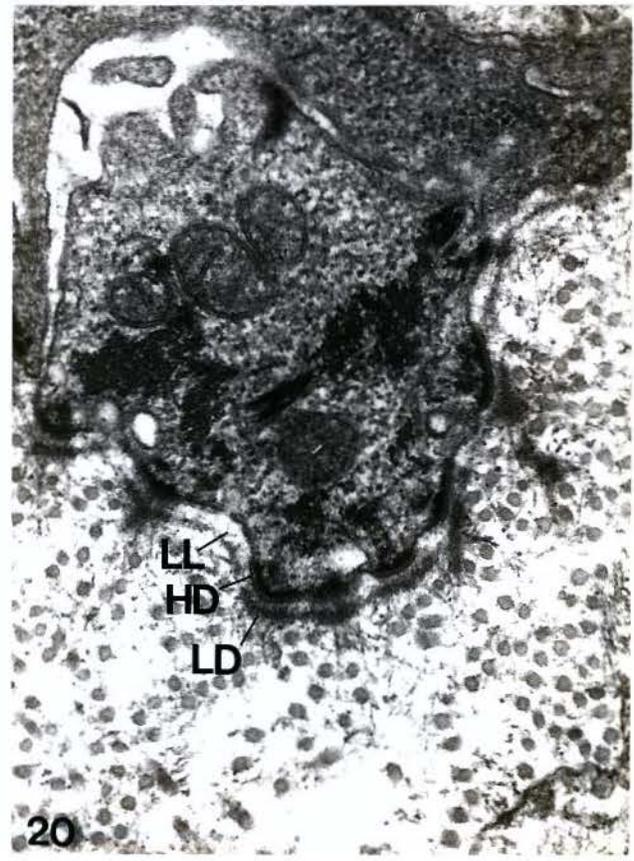
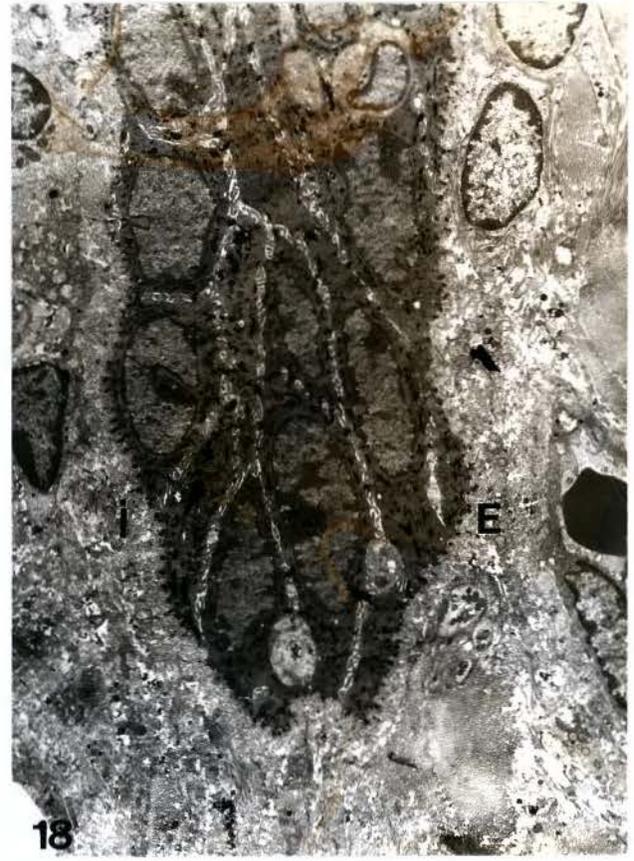
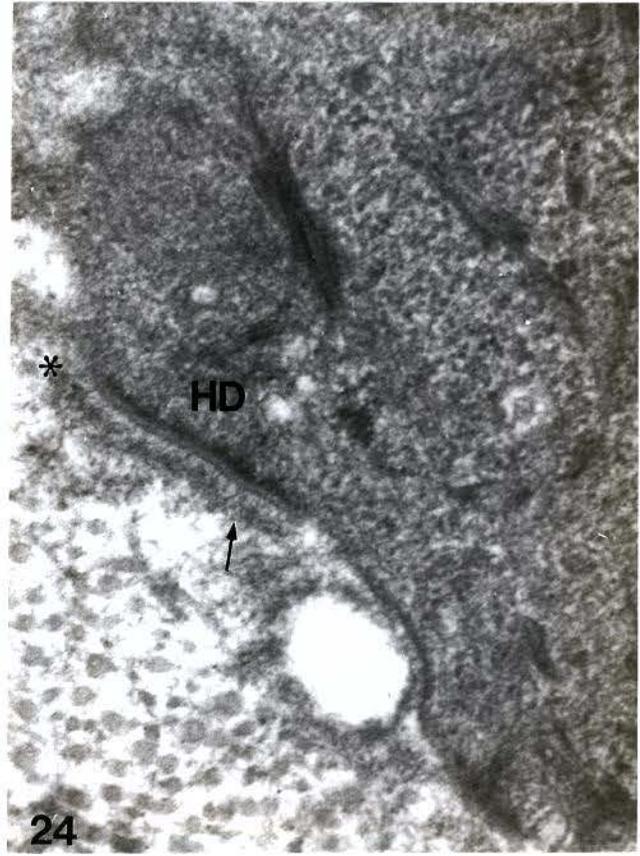
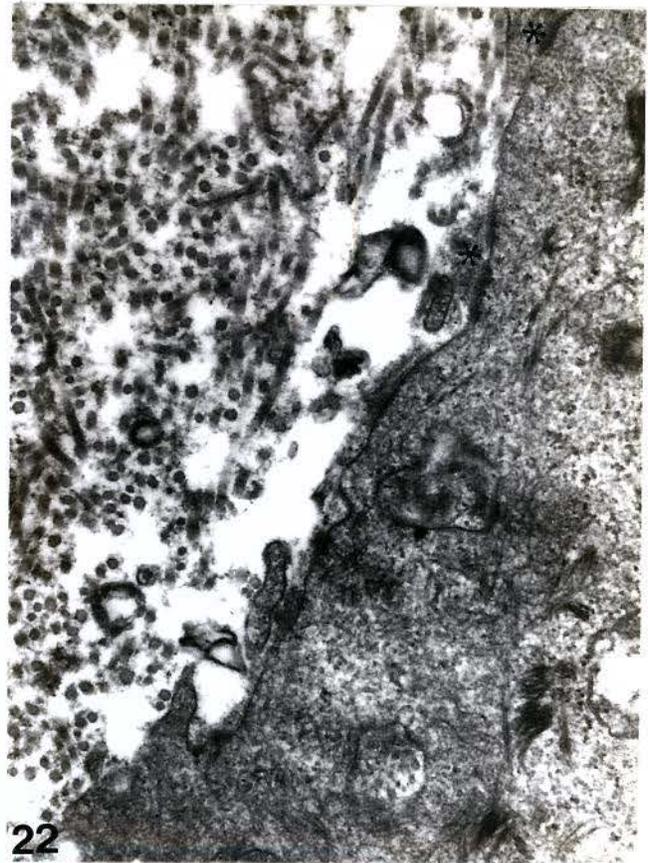
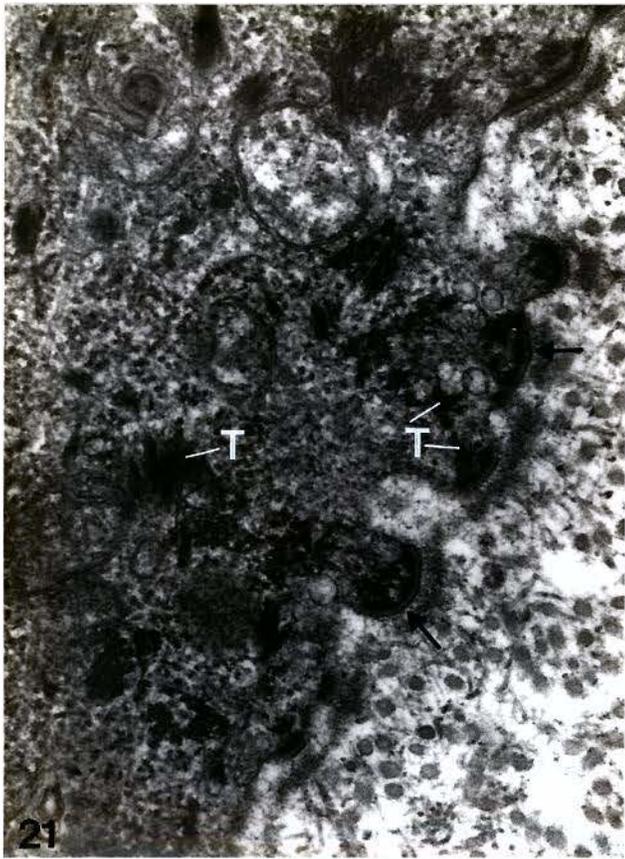


Fig. 21- Célula basal da superfície externa da papila circundental, com tonofibrilas (T) esparsas no citoplasma e inseridas nos hemidesmosomas (setas). A lâmina basal é evidente (18000 x).

Fig. 22- Célula epitelial da camada interna da papila circundental adjacente à área de degradação de colágeno do ligamento periodontal. Observa-se acúmulo de material granular junto à superfície celular (*) (22000 x).

Fig. 23- Célula da camada interna da papila circundental destituída de lâmina basal, com projeções digitiformes (setas) (18000 x).

Fig. 24- Célula epitelial da camada interna da papila circundental, adjacente à área de degradação de colágeno. Observa-se lâmina basal (seta) adjacente ao hemidesmosoma (HD). Parte da superfície celular está destituída de lâmina basal (*) (45000 x).



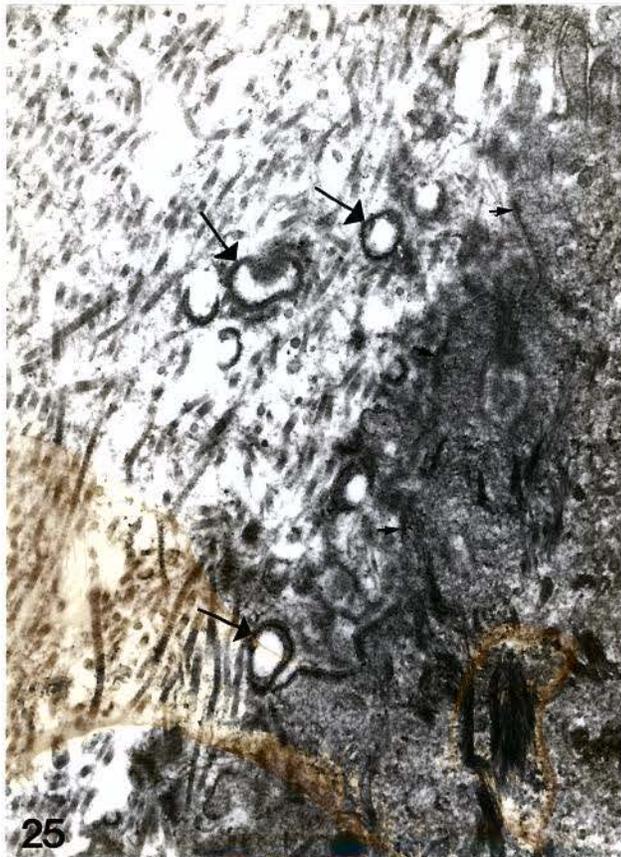


Fig. 25- Interface entre célula da camada interna da papila circundental e área de degradação do ligamento periodontal. Observa-se estruturas membranas circulares e semi-circulares no conjuntivo adjacente à célula epitelial (setas longas), resíduos de hemidesmosomas (setas curtas). A lâmina basal está ausente (9000 x).

Fig. 26- Polimorfonuclear neutrófilo (*) entre células da superfície interna da papila circundental (5000 x).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A gengiva dos molares de rato (LISTGARTEN, 1975) é bem descrita na literatura, sendo extensivamente utilizada como modelo experimental no estudo da doença periodontal (JORDAN, 1971). Segundo LISTGARTEN (1975), a única diferença entre a junção dento-gengival de molares de rato e a do homem está na posição do epitélio sulcular, lateralmente ao juncional e aderido a este por desmosomas. Outros autores discordam, destacando a presença de queratina no epitélio sulcular do rato, o que não ocorre no homem (THILANDER, 1961 e NAVIA, 1977).

Poucos trabalhos descrevem a gengiva dos incisivos de rato, que, por serem de erupção contínua, constituem um modelo interessante para o estudo da junção dento-gengival em constante reorganização (ANDERSON e STERN, 1966; MARTINEZ, 1971; SCHELLENS e cols., 1979; STERN, 1981).

A gengiva adjacente à face distal dos incisivos de rato difere da gengiva dos molares por apresentar um prolongamento do epitélio sulcular em direção apical, denominado por ANDERSON e STERN (1966) de papila circundental. A papila circundental parece ter como função principal separar o conjuntivo da gengiva das fibras do ligamento periodontal, que se move em conjunto com o dente em direção incisal e é degradado logo abaixo do epitélio juncional.

Os cortes semi-seriados em microscopia de luz mostraram uma papila circundental longa na região próxima à face labial do incisivo, diminuindo gradativamente em direção à face lingual. Esta variação provavelmente ocorreu devido à incidência dos cortes histológicos, pois a margem gengival é convexa em relação ao bordo incisal destes dentes, resultando também em sobreposição da papila circundental com a camada de ameloblastos, observada nos cortes iniciais. Portanto a papila circundental deve formar uma interface contínua e de comprimento semelhante por toda superfície distal, separando o conjuntivo gengival do ligamento periodontal.

A imunohistoquímica mostrou que a membrana basal da face interna da papila circundental possui menor quantidade de laminina e colágeno tipo IV que as demais regiões do epitélio gengival, particularmente na região imediatamente abaixo do epitélio juncional, onde laminina e colágeno tipo IV não foram detectados. Estas observações estão de acordo com SCHELLENS e cols. (1979) que, estudando em microscopia eletrônica de transmissão a região de degradação do ligamento periodontal de incisivos de camundongos, não detectaram lâmina basal no epitélio desta área, apesar da presença de hemidesmosomas. Neste trabalho, as observações em microscopia eletrônica sugerem fragmentação da lâmina basal na superfície interna da papila circundental, com acúmulos de material eletrondenso granular próximos aos hemidesmosomas, intactos ou desorganizados. A membrana destas células epiteliais destituidas de lâmina basal apresentava longas e irregulares

projeções digitiformes, sugerindo a participação da lâmina basal na manutenção da normalidade da membrana celular, ou seja, interface epitélio-conjuntivo relativamente plana. Esta tendência pode também ser observada nas áreas em que a quantidade de hemidesmosomas e desmosomas é menor, como no epitélio juncional. Quanto às estruturas circulares e semi-circulares, observadas na região de degradação do ligamento periodontal, por apresentarem morfologia algumas vezes semelhante aos hemidesmosomas, podem estar relacionadas com o processo de degradação destes juntamente com a lâmina basal.

Ultraestruturalmente a papila circundental mostrou-se formada por células basalóides na superfície externa, extremidade e terço final da superfície interna. As células do restante da superfície interna são achatadas, menos eletrondensas e estão em continuidade com a camada interna do epitélio juncional. Segundo ANDERSON e STERN (1966), estas células migram em direção à superfície dentária para formar o epitélio juncional, com velocidade semelhante a de erupção do incisivo, permitindo deste modo uma união relativamente forte com o cimento. Levando-se esta dinâmica em consideração, as células da superfície interna da papila circundental perderiam inicialmente a lâmina basal na região de reabsorção do ligamento periodontal. Ao entrarem em contato com a superfície do cimento, fazendo parte da junção dento-gengival, sintetizariam nova lâmina basal, chamada de lâmina basal interna. De acordo com estas possibilidades, a superfície

interna da papila circundental pode ser um modelo interessante para o estudo da síntese e degradação de hemidesmosomas e lâmina basal.

Enquanto nos incisivos de rato o epitélio juncional se movimenta em conjunto com o dente, o mesmo não ocorre nos molares. BEAGRIE e SKOUGAARD (1962) observaram migração de células do epitélio juncional de molares de camundongo ao longo da superfície do esmalte em direção coronária. A descamação epitelial, segundo estes autores, seria resultado de migração celular da camada basal para as camadas superficiais e de migração ao longo da superfície dentária.

STERN (1962 e 1963) observou, em microscopia eletrônica da junção dento-gengival de incisivos de rato, a presença de lâmina basal entre a camada de ameloblastos e a superfície do esmalte e entre o epitélio juncional e o cemento, unida às células epiteliais por meio de hemidesmosomas. A ultraestrutura da lâmina basal interna foi demonstrada por KOBAYASHI e cols. (1976) em junção dento-gengival de macaco e por MARIKOVA (1983) em molares de rato. Considerando-se que a laminina é uma glicoproteína constituinte da lâmina lúcida (FOIDART e cols., 1980; MADRI e cols., 1980; COURTOY e cols., 1982) e que o colágeno tipo IV está presente na lâmina densa (YAIOTA e cols., 1978; BORNSTEIN e SAGE, 1980; COURTOY e cols., 1982), ambas deveriam ser componentes da junção dento-gengival. SALONEN e SANTTI (1985) detectaram laminina, através de imunohistoquímica, na lâmina basal interna da junção dento-gengival humana, enquanto SAWADA e cols. (1990)

descreveram o mesmo em molares de rato. Segundo estes autores, colágeno tipo IV não foi detectado.

Em microscopia eletrônica, a interface entre a camada interna do epitélio juncional, rica em hemidesmosomas, e a superfície do cimento da face distal do incisivo de rato estava ocupada por material eletrondenso amorfo e fibrilar. Entretanto, em algumas áreas, estrutura morfológicamente compatível com lâmina basal pôde se observada.

Em nenhum dos cortes estudados, da gengiva de incisivos ou molares, laminina e colágeno tipo IV foram observados na junção dento-gengival (lâmina basal interna). Os resultados divergentes com relação a laminina podem ser devido a variações na metodologia usada, sendo necessários estudos mais extensivos. Entretanto é possível que a lâmina basal interna, principalmente no incisivo de rato, tenha composição molecular particular. Por exemplo, no teratocarcinoma de camundongo a matriz extracelular é semelhante a membrana basal, porém destituída de colágeno tipo IV (BRAUER e cols., 1989). A presença de heparan-sulfato na lâmina basal interna de molares de rato foi descrita por OYARZÚM-DROGUETT (1992), considerada como possível participante da adesão entre epitélio juncional e superfície dentária.

As diferenças observadas no padrão de marcação da laminina e do colágeno tipo IV nas reações imunohistoquímicas reveladas com DAB e cloro-naphtol estão possivelmente relacionadas com a sensibilidade destes marcadores. O cloro-naphtol, provavelmente mais sensível, marcou os resíduos

da lâmina basal adjacentes às áreas de degradação do ligamento periodontal, evidenciando-os mais fracamente do que nas regiões onde a lâmina basal estava intacta. A porção localizada imediatamente abaixo do epitélio juncional foi negativa com as duas substâncias reveladoras, indicando ausência de laminina e de colágeno tipo IV. Entretanto na microscopia eletrônica fragmentos de estruturas compatíveis com lâmina basal foram encontrados. Para melhor esclarecer os achados em microscopia eletrônica e imunohistoquímica pretendemos detectar laminina e colágeno tipo IV pela imunohistoquímica à nível de microscopia eletrônica.

Concluindo, a composição molecular da lâmina basal interna precisa ser melhor determinada, assim como a dinâmica de formação e degradação da lâmina basal da superfície interna da papila circundental dos incisivos inferiores de rato.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1- Ultraestruturalmente, a lâmina basal do epitélio da superfície interna da papila circundental da gengiva do incisivo inferior de rato apresenta-se fragmentada ou ausente, principalmente na região imediatamente abaixo do epitélio juncional.

2- A interface cimento-epitélio juncional (junção dento-gengival) da face distal do incisivo inferior de rato está ocupada por material eletrondenso amorfo e fibrilar e, em algumas áreas, por estrutura compatível com lâmina basal.

3- As reações imunohistoquímicas mostraram que laminina e colágeno tipo IV estão presentes nas áreas onde a lâmina basal do epitélio gengival do incisivo inferior de rato possui estrutura normal. Laminina e colágeno tipo IV não foram detectados na porção imediatamente abaixo do epitélio juncional, enquanto que na superfície interna da papila circundental a marcação é menos intensa.

4- Laminina e colágeno tipo IV não foram detectados na junção dento-gengival da face distal do incisivo inferior de rato.

RESUMO

RESUMO

O incisivo de rato é de crescimento contínuo, fazendo com que haja concomitantemente à erupção dentária a reorganização do epitélio juncional. O incisivo também apresenta a papila circundental, que é uma projeção epitelial em continuidade com o epitélio sulcular. A porção interna da papila circundental está em contato com a porção cervical do ligamento periodontal, em processo de reabsorção. Este trabalho descreve os aspectos ultraestruturais e a presença de laminina e colágeno tipo IV na junção dento-gengival e papila circundental na face distal do incisivo inferior de ratos. No epitélio juncional, através de anticorpos policlonais e imunoperoxidase, não detectou-se a presença de laminina e colágeno tipo IV. As células justapostas ao cimento são ricas em hemidesmosomas, com material granular e fibrilar fazendo união com a superfície do cimento. Na papila circundental as reações para laminina e colágeno tipo IV foram mais intensas nas faces externa e terço mais apical da interna, e negativas ou fracamente positivas no terço mais próximo ao epitélio juncional. Nas áreas positivas para laminina e colágeno tipo IV a lâmina basal apresentava-se na microscopia eletrônica com estrutura normal, com as lâminas lúcida e densa características. Nas regiões onde a positividade foi menor ou ausente foram observados hemidesmosomas sem a correspondente lâmina basal ou fragmentos de estruturas compatíveis com lâmina basal. As células epiteliais destituídas de lâmina basal apresentavam projeções digitiformes em relação ao conjuntivo adjacente. Estes dados indicam que no incisivo inferior de rato a laminina e o colágeno tipo IV não participam da junção dento-gengival, e que a lâmina basal está ausente ou fragmentada nas células da papila circundental adjacentes às áreas de reabsorção de colágeno do ligamento periodontal. A papila circundental do incisivo de rato pode ser um bom modelo para o estudo da degradação da lâmina basal.

SUMMARY

SUMMARY

The continuous growth of the rat incisor is associated with a constant reorganization of the junctional epithelium. The gingiva of the rat incisor presents the circumferential papilla, corresponding to a projection of the sulcular epithelium in to the subjacent connective tissue. The internal surface of the circumferential papilla contacts the cervical part of the periodontal ligament, that in the rat incisor suffers resorption. This work describes the ultrastructural aspects and the presence of laminin and type IV collagen in the dento-gingival junction and in the circumferential papilla of the distal surface of the lower rat incisor. On the junctional epithelium, using polyclonal antibodies and immunoperoxidase techniques, laminin and type IV collagen were not detected. On the electron microscope, the cells juxtaposed to the cementum were rich in hemidesmosomes with granular and fibrillar materials between the cell and cementum surfaces. The immunochemical reaction for laminin and type IV collagen, in the circumferential papilla, was intense on the external surface and deeper internal portion. On the cervical portion subjacent to the junctional epithelium the reactions were negative or faintly positive. On the regions positive for laminin and type IV collagen the basement membrane ultrastructure was normal, with the typical lamina lucida and densa. On the regions where the reaction was negative or faint, hemidesmosomes were found, but usually without the corresponding basal lamina. The epithelial cells not covered by the basal lamina showed intense interdigitation with the underlying connective tissue. These data indicate that on the lower rat incisor laminin and type IV collagen are not components of the dento-gingival junction. It was also concluded that basal lamina is absent or fragmented on the cell surface of the circumferential papilla adjacent to the areas of collagen resorption.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALMEIDA, O.P. & BÖHM, G.M. Vascular permeability in the rat gingiva. A model of vessel response in chronic inflammation. *J. Pathol.*, 127: 27-34, 1978.
- 2- ALTMAN, L.C.; NELSON, C.L.; POVOLNY, B.; FLECKMAN, P.; DALE, B.A.; MAIER, R.V.; SODERLAND, C.; BAKER, C. Culture and characterization of rat junctional epithelium. *J. Periodont. Res.*, 23: 91-9, 1988.
- 3- AMSTAD-JOSSI, M. & SCHROEDER, H.E. Age related alterations of periodontal structures around the cemento-enamel junction and of gingival connective tissue composition in germ-free rats. *J. Periodont. Res.*, 13: 76-90, 1978.
- 4- ANDERSON, G.S. & STERN, I.B. The proliferation and migration of the attachment epithelium on the cemental surface of the rat incisor. *Periodontics*, 4: 115-23, 1966.
- 5- BEAGRIE, G.S. & SKOUGAARD, M.R. Observations on the life cycle of the gingival epithelial cells of mice as revealed by autoradiography. *Acta odont. scand.*, 20: 15-31, 1962.
- 6- BORNSTEIN, P. & SAGE, H. Structurally distinct collagen types. *A. Rev. Biochem.*, 49: 957-1003, 1980.
- 7- BRAUER, P.R. & KELLER, J.M. Ultrastructure of a model basement membrane lacking type IV collagen. *Anat. Rec.*, 223: 376-83, 1979.

- 8- COURTOY, P.J.; TIMPL, R.; FARQUHAR, M.G. Comparative distribution of laminin, type IV collagen and fibronectin in the rat glomerulus. *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 874-86, 1982. Apud SALONEN, J. & SANTTI, R. op. cit. ref. 34.
- 9- EDGAR, D.; TIMPL, R.; THOENEN, H. Structural requirements for the stimulation of neurite outgrowth by two variant of laminin and their inhibition by antibodies. *J. Cell Biol.*, 106: 1299-306, 1988.
- 10- EGGERT, F.M.; GERMAIN, J.P.; COHEN, B. The gingival epithelium of rodent molars with limited eruption. *Acta Anat.*, 107: 297-306, 1980.
- 11- FOIDART, J.M.; BERE, E.W. Jr.; YAAR, M.; RENNARD, S.I.; GULLINO, M.; MARTIN, G.R.; KATZ, S.I. Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. *Lab. Invest.*, 42: 336-42, 1980. Apud SALONEN, J. & SANTTI, R. op. cit. ref. 34.
- 12- GARANT, P.R. An electron microscopic study of the periodontal tissues of germfree rats and rats monoinfected with *Actinomyces Naeslundii*. *J. Periodont. Res.*, 15 (suppl.), 1976.
- 13- GOLDMAN, H.M. & COHEN, D.W. *Periodontia*. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1986.
- 14- GREULICH, R.C. Epithelial DNA and RNA synthetic activities of the gingival margin. *J. dent. Res.*, 40; 682, 1961. [IADR, 118].

- 15- HIRT, C.M.; HARTLE, S.; MUHLEMANN, H.R. The distribution of mitosis in the epithelium of interdental papillae of the rat molar. *J. Periodont.*, 26: 229, 1955.
- 16- HOGAN, B. Laminin and epithelial cell attachment. *Nature*, 290: 737-8, 1981.
- 17- HUNTER, D.D.; PORTER, B.E.; BULOCK, J.W., ADAMS S.P.; MERLIE, J.P.; SANES J.R. Sequence of a motor neuron-selective adhesive site in the synaptic basal lamina protein S-laminin. *Cell*, 59: 905-13, 1989.
- 18- JORDAN, H.V. Rodent model systems in periodontal disease research. *J. dent. Res.*, 50 (Suppl. 2): 236-42, 1971.
- 19- KOBAYASHI, K.; ROSE, G.G.; MAHAN, G.J. Ultrastructure of the dento-epithelial junction. *J. Periodont. Res.*, 11: 313-30, 1976.
- 20- LINE, S.R.P.; SABBAGA, J.; VEIGA, S.S.; POTOENJAK, P.; BRENTANI, R.R. Identification and characterization of highly conserved antigenic determinants in the laminin molecule. *Braz. J. med. biol. Res.*, 23: 841-55, 1990.
- 21- LISTGARTEN, M.A. Similarity of epithelial relationship in the gingiva of rat and man. *J. Periodont.*, 46: 677-80, 1975.
- 22- LUKE, D.A. The structure and functions of the dento-gingival junction and periodontal ligament. *Br. dent. J.*, 172: 187-90, 1992.

- 23- Mc DOUGALL, W.A. Pathways of penetration and effects of horseradish peroxidase in rat molar gingiva. *Archs oral Biol.*, 15: 621-33, 1970.
- 24- MADRI, J.A.; ROLL, J.; FURTHMAYR H.; FOIDART, J.M. Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in the basement membranes of murine kidney. *J. Cell Biol.*, 86: 682-87, 1980.
- 25- MARIKOVA, Z. Ultrastructure of normal and newly formed dento-epithelial junction in rats. *J. Periodont. Res.*, 18: 459-68, 1983.
- 26- MARTIN, G.R. & TIMPL, R. Laminin and other basement membrane components. *A. Rev. Cell Biol.*, 3: 57-85, 1987.
- 27- MARTINEZ, Jr.I.R. The ultrastructure of the keratinizing epithelia of the incisor and molar gingivae of albino rat: similarities and differences. *Anat. Rec.*, 170: 1-29, 1971.
- 28- MATENA, V. The periodontium of the enamel aspect of the rat incisor. *J. Periodont.*, 43: 311-5, 1972.
- 29- NAVIA, J.M. Animal models in dental research. Alabama, Univ. Alabama, 1977. p. 315-23.
- 30- NOVAES, P.D. Placa dental de incisivo inferior de rato: observações em microscopia de varredura e de transmissão. Piracicaba, 1990. [Tese (Mestrado) - FOP-UNICAMP].

- 31- OYARZUN-DROGUETT, A. Ultracytochemical localization of basal lamina anionic sites in the rat epithelial attachment apparatus. *J. Periodont. Res.*, 27: 256-63, 1992.
- 32- PAULSSON, M. & SALADIN, K. Mouse heart laminin. Purification of the native protein and structural comparison with Engelbreth-Holm-Swarm tumor laminin. *J. Biol. Chem.*, 264: 18726-32, 1985.
- 33- ROMANOS, G.; SCHROTER-KERMANI, G.; HINZ, N.; BERNIMOULIN, J.P. Immunohistochemical distribution of the collagen types IV, V, VI and glycoprotein laminin in the healthy rat, marmoset (*Callithrix jacchus*) and human gingivae. *Matrix*, 11: 125-32, 1991.
- 34- SALONEN, J. & SANTTI, R. Ultrastructural and immunohistochemical similarities in the attachment of human oral epithelium to the tooth *in vivo* and to an inert substrat in an explant culture. *J. Periodont. Res.*, 20: 176-84, 1985.
- 35- SAWADA, T.; YAMAMOTO, T.; YANAGISAWA, T.; TAKUMA, S.; HASEGAWA, H.; WATANABE, K. Electron-immunocytochemistry of laminin and type IV collagen in the junctional epithelium of rat molar gingiva. *J. Periodont. Res.*, 25: 372-6, 1990.
- 36- SCHELLENS, J.P.M.; EVERTS, V.; BEERTSEN, W. Quantitative analysis of connective tissue resorption in the supra-alveolar region of the mouse incisor ligament. *J. Periodont. Res.*, 17: 407-22, 1982.

- 37- SCHELLENS, J.P.M.; EVERTS, V.; BEERTSEN, W. Resorption of connective tissue in the gingiva of the mouse incisor. *Anat. Rec.*, 195: 95-108, 1979.
- 38- SENGUPTA, S.; SCHOVLIN, F.E.; SLOMIANY, A.; SLOMIANY, B.L. Identification of laminin receptor in gingival tissue and its interaction with tooth-cementum laminin. *Int. J. Biochem.*, 23: 115-21, 1991.
- 39- SCHROEDER, H.E. & PAGE, R.C. O periodonto normal. In: SCHLUGER, S.; YUODELIS, R.A.; PAGE, R.C. *Periodontia: fenômenos básicos, tratamento e inter-relações oclusais e restauradoras*. Rio de Janeiro, Interamericana, 1981. p. 5-53.
- 40- SKILLEN, W.G. The morphology of the gingivae of the rat molar. *J. Am. dent. Ass.*, 17: 645-68, 1930.
- 41- STERN, I.B. Current concepts of the dento-gingival junction: The epithelial and the connective tissue attachments to the tooth. *J. Periodont.*, 52: 465-76, 1981.
- 42- TANAKA, T. Transport pathway and uptake of microperoxidase in the junctional epithelium of healthy rat gingiva. *J. Periodont. Res.*, 19: 26-39, 1984.
- 43- TEN CATE, A.R. *Oral histology: development, structure and function*. 3.Ed. Toronto, The C. V. Mosby Company, 1989.
- 44- TERRANOVA, V.P. & MARTIN, G.R. Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth structure. *J. Periodont. Res.*, 17: 530-3, 1982.

- 45- TERRANOVA, V.P.; ROHRBACH, D.H.; MARTIN, G.R. Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell*, 22: 719-26, 1980.
- 46- TERRANOVA, V.P.; RAO, C.N.; KALEBIG, T.; MARGULIES, I.M.; LIOTTA, L.A. Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 444-8, 1983.
- 47- THILANDER, H. Periodontal disease in the white rat. *Trans. R. Schs Dent. Stockh. Umea*, 6: 1961. Apud EGGERT, F.M.; GERMAIN, J.P.; COHEN, B. *op. cit. ref.* 10.
- 48- TIMPL, R.; ROHDE, H.; ROBEY, P.G.; RENNARD, R.I.; FOIDART, J-M.; MARTIN, G. Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J. biol. Chem.*, 254: 9933-7, 1979.
- 49- TIMPL, R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem.*, 180: 487-502, 1989.
- 50- WARSHAWSKY, H. A light and electron microscopic study of the nearly mature enamel of the rat incisors. *Anat. Rec.*, 169: 559-84, 1971.
- 51- WARSHAWSKY, H. & MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 15: 542-9, 1967.
- 52- WEEKES, W.T. & SIMS, M.R. The vasculature of rat molar gingival crevice. *J. Periodont. Res.*, 21; 177-185, 1986.

53- YAIOTA, H.; FOIDART, J.M.; KATZ, S. Localization of the collagenous component in skin basement membrane. J. Invest. Dermat., 70: 191-3, 1978. Apud SALONEN, J. & SANTTI, R. op. cit. ref. 34.

54- YAMASAKI, A.; NIKAI, H.; NIITANI, K.; IJUHIN, N. Ultrastructure of the junctional epithelium of germfree rat gingiva. J. Periodont., 50: 641-8, 1979.