



**SIMONE DE CÁSSIA PORTELA BARBOSA**

**Frequência de fibroblastos ciliados no  
ligamento periodontal dos incisivos  
inferiores de rato em condições de  
erupção hipo, hiper e normofuncional.**

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do Título de  
DOUTOR EM BIOLOGIA  
BUCO - DENTAL,  
Área de Histologia e Embriologia.

**PIRACICABA-SP  
2004**

**SIMONE DE CÁSSIA PORTELA BARBOSA**

**Frequência de fibroblastos ciliados no  
ligamento periodontal dos incisivos  
inferiores de rato em condições de  
erupção hiper, hipo e normofuncional.**

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do Título de  
DOUTOR EM BIOLOGIA  
BUCCO - DENTAL,  
Área de Histologia e Embriologia

*Orientador: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes*  
*Co-orientador: Prof. Dr. José Merzel*

***Banca examinadora:***

*Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum*  
*Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello*  
*Profa. Dra. Miralva Aparecida de Jesus da Silva*  
*Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis*  
*Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes*

**PIRACICABA-SP**  
**2004**

### Ficha Catalográfica

B234f      Barbosa, Simone de Cássia Portela.  
Frequência de fibroblastos ciliados no ligamento periodontal dos incisivos inferiores de rato em condições de erupção hipo, hiper e normofuncional. / Simone de Cássia Portela Barbosa. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.  
xvi, 70f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes.  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

**1. Fibroblasto. 2. Ciliado. 3. Tecido conjuntivo. 4. Metabolismo. 5. Dentes – Erupção. I. Novaes, Pedro Duarte. 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



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2004, considerou a candidata SIMONE DE CÁSSIA PORTELA BARBOSA aprovada.

1. Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES

2. Profa. Dra. MIRALVA APARECIDA DE JESUS DA SILVA

3. Prof. Dr. NORAIR SALVIANO DOS REIS

4. Prof. Dr. ANTONIO WILSON SALLUM

5. Profa. Dra. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO

## *Dedico:*

A Deus, por iluminar o meu caminho e permitir mais esta dádiva em minha vida, e me mostrar que, mais importante do que ter fé, é confiar.

*“E o Senhor te guiará continuamente e fartará a tua alma em lugares secos, e fortificará os teus ossos, e será como um jardim regado, e como um manancial cujas águas nunca faltam”..*

*Isaiás 58-11*

*“Se cada um de nós se der ao cuidado de examinar as circunstâncias da nossa vida, haverá de reconhecer que apesar das lutas, dificuldades, desencantos, diversidades, ainda temos muito a agradecer a Deus.”*

*Samuel Smiles 1812-1904*

*Escritor escocês*

Ψ À minha mãe, Maria Aparecida Portela Barbosa, e ao meu pai, Vlademir Barbosa, pelos exemplos de educação, honestidade e luta, que recebi, pelo apoio às minhas decisões e pelo amor sem limites.

*“Ainda que falasse a língua dos  
homens  
e falasse a língua dos anjos, sem amor  
eu nada seria.”  
Renato Russo*

Ψ Aos meus irmãos, José Guilherme Portela Barbosa e Cristiane Regina Portela Barbosa Alexandre, pelo apoio, agradável convivência e pelo companheirismo que nos une.

*“A família é o elo mais importante da  
corrente da vida.”  
G.C.Souares*

Ψ Aos parentes e amigos, próximos e distantes, pelos momentos de alegria e de união e, em especial, à minha querida Tia Eufrazia Portela Baptistella pelo exemplo de vida.

*“Tudo o que o mundo precisa são de exemplos  
e não de opiniões.”  
Paulo Coelho*

Ψ À minha avó, Jacyra Portela, (*in memoriam*) e ao meu Tio Efraim Portela (*in memoriam*) que, apesar de suas partidas, sempre estiveram presentes em nossas vidas.

*“ Não somos seres humanos, vivendo uma  
experiência espiritual, somos seres espirituais  
vivendo uma experiência humana”  
Autor desconhecido*

Ψ Ao meu amado filho, Bruno Henrique Barbosa da Silva, e ao meu amado companheiro, José Francisco dos Santos, que me mostram, a cada dia, que vale a pena ir em busca de um sonho.

*“.....com você por perto,  
vou mais longe ainda.....  
..... sob seu domínio,  
sou mais forte ainda;  
não tem nada fora de lugar.”  
Renata Arruda*

*“Um lar é muito mais do que uma casa.....  
Dialogar é muito mais do que contar o que se  
Passa conosco.....  
Reunir-se é muito mais do que estar junto.....  
Viver é muito mais do que estar contente.....”  
Juan Carlos Pisano*

*“Onde achará o homem doçura maior  
que em seu lar e em seus parentes”.  
Homero*

*“Para ser feliz, o maior segredo é  
estar bem consigo mesmo”.  
Jean de La Fontaine (1621-1625)  
Fabulista francês*

## *Ofereço:*

Ao professor Doutor Pedro Duarte Novaes, Prof. Associado da Disciplina de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela orientação, atenção, exemplos de sensatez e disponibilidade.

Meu eterno carinho, respeito, admiração e gratidão pela confiança e pela influência decisiva em minha vida.

*“Sábio não é quem dá as verdadeiras respostas,  
mas, quem formula as verdadeiras questões”  
Thomas Davis (1814-1842)*

*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade  
porque se tornará uma máquina utilizável e não  
uma personalidade.  
É necessário que adquira um sentimento, um  
Senso prático daquilo que vale a pena ser  
Compreendido, daquilo que é belo  
e moralmente Correto”.  
Albert Einstein*

*“A mais pura glória do Mestre não consiste,  
em formar discípulos que o sigam, mas em  
formar sábios que o superem”.  
Ramon y Cajal*

Ao Prof. Dr. José Merzel, em especial, por atuar como co-orientador deste trabalho e por estar sempre presente e pronto a ajudar, com sua experiência científica, correções e sugestões que foram indispensáveis.

*“ Ser mestre não é apenas lecionar  
Ensinar não é apenas transmitir a matéria,  
Ser Mestre é ser um instrutor e amigo,  
Guia e companheiro.  
Ser mestre é ser exemplo.  
Exemplo de dedicação, de doação de dignidade  
Pessoal e sobre tudo de amor”  
Minha Eterna Gratidão.*

*“ No caminho da sabedoria te ensinei  
E pelas veredas da retidão te fiz andar  
Em andando por elas não se embarçarão  
Se correres, não tropeçarás.”  
Provérbios de Salomão 4. 11-12*

## *Agradecimentos aos professores:*

O presente trabalho foi fruto de um grande esforço, em conjunto, de um grupo de pessoas, às quais quero externar os meus mais profundos agradecimentos:

À UNICAMP, na pessoa do Magnífico Sr. Reitor, Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Junior.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas do Diretor, o Prof. Dr. Thales Mattos Rocha e do Vice – Diretor, Prof. Dr. Mario Fernando Goes, por terem dado oportunidades ao crescimento técnico - científico e cultural.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação da FOP – UNICAMP, Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho e Profa. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano.

À coordenadora do Programa de Biologia Buco – Dental, Profa. Dra. Silvana Pereira Barros.

Aos Professores do Departamento de Morfologia na Área de Anatomia, Prof. Dr. Fausto Berzin, Prof. Dra Heloisa Amélia de Lima Castro, pelo estímulo profissional e, em especial, ao Prof. Dr. Carlos Roberto Hoppe Fortinguerra (*in memoriam*), por ter deixado exemplos em nossa memória.

Aos professores que participaram do Programa de Pós – Graduação em Biologia Buco Dental da FOP - UNICAMP, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

Ao ex - professor da FOP, Luís Fernando Beraldo, que deixou ensinamentos e muitas saudades.

Aos professores da PUCCAMP, Prof. Dr. Francisco Borba Ribeiro Neto e à Prof. Dra Luíza Ishikawa Ferreira, pela ajuda e força durante a vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique F. Caria e à Profa. Dra Silvana Pereira Barros, pela valiosa participação no exame de qualificação.

Ao Engenheiro Agrônomo Marcelo Alves Corrêa do Centro de Informática de Agricultura – CIAGRI – ESALQ/USP, pela análise estatística.

À Profa. de Português, Maria Beatriz Bragotto Barros de Pareja, pela valiosa correção, dedicação e amizade.

Aos professores da banca examinadora desta Tese: Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello, Profa. Dra. Miralva Aparecida de Jesus Silva e Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis, que tanto ajudaram com suas sugestões.

Aos professores suplentes: Prof. Dra. Maria Luiza Polacow e ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, pela simplicidade, lição de vida e estímulo profissional.

*“Aqueles que se entregam à prática  
sem ciência são como o navegador que  
embarca em um navio sem leme nem bússola.  
Sempre a prática deve fundamentar a boa teoria”  
Leonardo da Vinci*

*“Existem homens que pesquisam, meditam, refletem  
e sonham com um ideal a realizar, um trabalho a ser  
elaborada uma obra a ser executada. Estes sonhos pré  
cogitados geram o desejo, o entusiasmo, a criatividade,  
a força, a vontade de vencer obstáculos gerando  
realidades futuras...”  
Freitas, J.A.S.*

*“A pesquisa enriquece e atualiza o professor,  
porque ele, para fazer suas pesquisas, tem que  
estar sempre se renovando. Sem isso ele fica  
um repetidor, não sente o prazer da ciência,  
transmite para os alunos uma ciência de terceira mão.”  
José Reis*

## *Agradecimentos especiais:*

*“(....) aprendi que se depende sempre, de tanta muita diferente gente. Toda pessoa sempre é as marcas de lições diárias de outras tantas pessoas. É tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente, onde quer que a gente vá. É tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho, por mais que pense estar (....)”*  
*Gonzaguinha, Caminhos do coração*

À Técnica do laboratório de Histologia, Maria Santiago Varella, à técnica – aposentada, Ivani Odas Demétrio, e ao Gustavo Narvaes Guimarães pelo auxílio e por constituírem a minha família piracicabana.

À técnica e Bióloga do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Eliene Aparecida Orsini Narvaes Romani, pelo auxílio no preparo do material, pelos cortes, pela amizade e por tantas coisas, que não caberiam nesta página.

*“A gentileza não custa nada e mesmo assim, compra coisas de valor incalculável”*  
*Muito obrigada*

Ao Bioterista, Wanderlei Francisco de Oliveira da FOP – UNICAMP, pela valiosa colaboração no tratamento e manejo dos animais durante toda a fase experimental do trabalho.

À Secretaria da Morfologia, na pessoa da Sra. Suzete Regina Tobias Neder e à Srta. Joelma Aparecida Macchi e à Valquíria de Godoi Baltieri, pela boa vontade demonstrada.

À Secretaria Geral da Pós-Graduação, na pessoa da Srta. Érika Alessandra Pinho e Sra. Sônia Maria Lordello Arthur pela amizade e apoio constantes.

Às Bibliotecárias, Heloísa Maria Ceccoti e Marilene Girello, pela formatação do trabalho e revisão de referências bibliográficas.

A todos os funcionários da FOP- UNICAMP, de outros Departamentos e setores que sempre me atenderam com atenção, respeito e que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

*“Cada pessoa que passa em nossa vida é  
única, sempre deixa um pouco de si e leva  
um pouco de nós.....”*

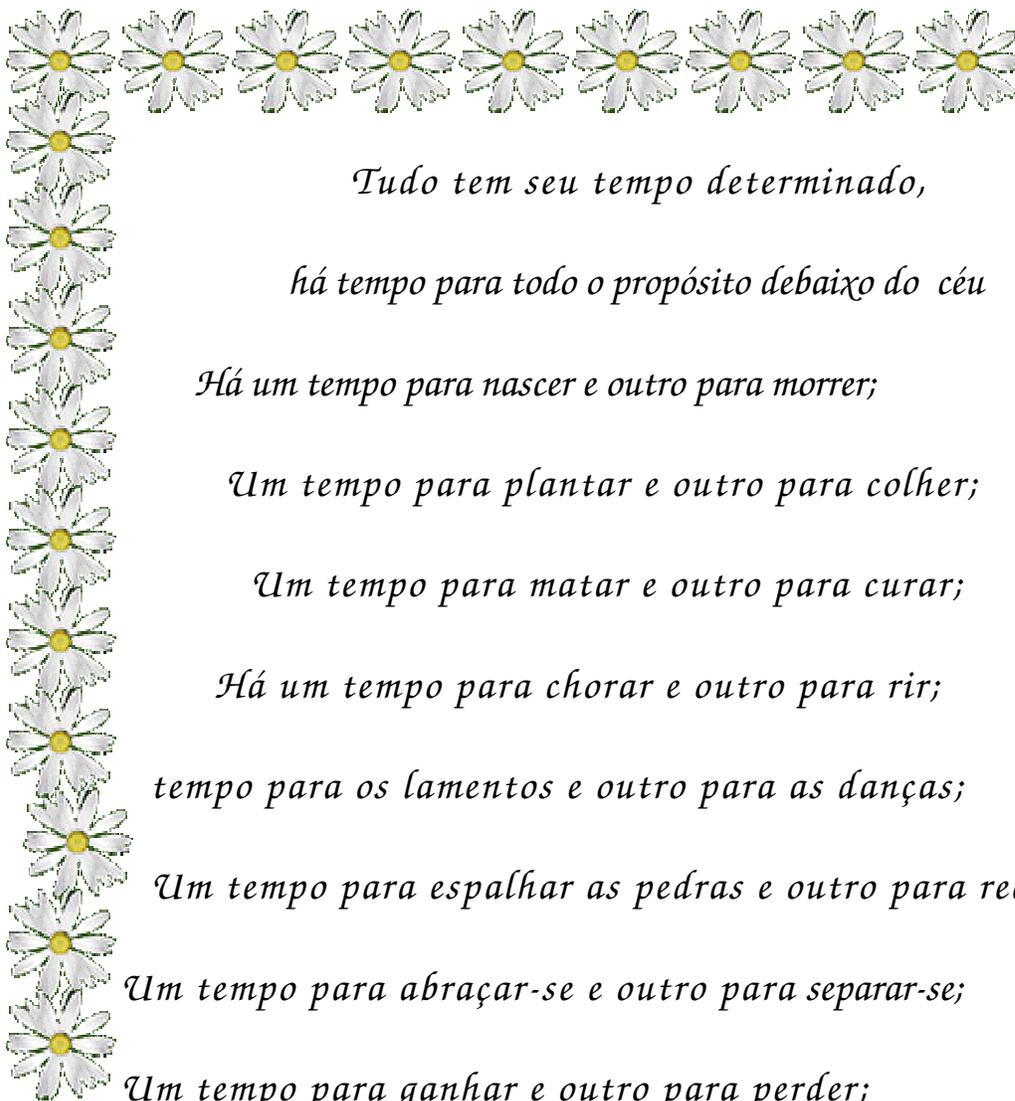
Aos colegas alunos e ex-alunos de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação FOP - UNICAMP, Ana Paula, Paula, Carlos, Regina, Luciana, Rui, Raquel, Raquelzinha, Gláucia, Silvaninha, Edvaldo, Paulo, Ricardo, Roselaine, Roseli, Maria Luiza, Mariliane, Manzi, Fabrício, Alexandre, Isabela, Marco Antonio, Marcelo e tantos outros que, cruzaram esse caminho pelo crescimento mútuo, pelo companheirismo, solidariedade, e, em especial às companheiras Cristiane Salmon e Silvana Pasetto pela colaboração, convivência diária dividindo alegrias e ensinamentos e pela família que formamos, enquanto trabalhamos juntas.

*“A cooperação não é a ausência de conflito e  
sim um meio de lidar o conflito”  
Deborah Tannen*

*“Tem-se muitos amigos, mas nas diversidades  
conhece-se os verdadeiros”.  
Autor desconhecido*

A todos, que participaram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho, em especial, a você, prezado leitor, que é o principal motivo de inspiração do presente trabalho.

*O tempo não é  
algo  
Que possa voltar para  
trás  
Portanto, plante seu  
jardim  
E decore sua alma, ao  
Invés de esperar que  
Alguém lhe traga flores  
Shakespeare*



*Tudo tem seu tempo determinado,  
há tempo para todo o propósito debaixo do céu  
Há um tempo para nascer e outro para morrer;  
Um tempo para plantar e outro para colher;  
Um tempo para matar e outro para curar;  
Há um tempo para chorar e outro para rir;  
tempo para os lamentos e outro para as danças;  
Um tempo para espalhar as pedras e outro para recolhe-las  
Um tempo para abraçar-se e outro para separar-se;  
Um tempo para ganhar e outro para perder;  
  
Um tempo para falar e outro calar ;  
  
Um tempo para amar e outro para odiar;  
  
Um tempo para a guerra e outro para a paz;  
  
Um tempo para destruir e outro para construir*

*Eclesiastes 3, 1-8*

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	01
LISTA DE ABREVIATURAS.....	06
RESUMO.....	07
ABSTRAT.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3. RESULTADOS.....	22
4. DISCUSSÃO.....	36
5. CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXOS.....	63

## LISTAS DE ESQUEMAS, ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Fig. 1 - Esquema do segmento transversal ao corpo da mandíbula.....19  
correspondente ao primeiro molar.

A- ligamento periodontal do incisivo

Fig. 2 – Eletromicrografia de um cílio projetando-se para o .....23  
meio extracelular, evidenciando fibras colágenas cortadas  
transversalmente (*FC*). O cílio está acompanhado pelo  
corpúsculo basal e encontra-se próximo ao núcleo da  
célula. Note que o citoplasma do fibroblasto é constituído  
pelo Complexo de Golgi (*G*), Retículo endoplasmático  
Rugoso (*RER*), mitocôndria (*M*) e microtúbulos bem  
desenvolvidos, compondo a coluna ciliar (→).

Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

Fig. 3 – Cílio primário intracitoplasmático próximo ao núcleo e.....23  
à invaginação da membrana plasmática (→). Note a presença  
de muitos microtúbulos ( • ) dispostos no citoplasma e o  
“pé-basal” ou “satélite” (*S*) formado por microtúbulos que se  
estendem do corpúsculo basal e compõem a coluna ciliar  
( • ). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

Fig. 4 – Cílio primário extracitoplasmático, onde se observa a presença.....24  
de fibrilas colágenas (*FC*) e fibras oxitalânicas (*FO*), está  
acompanhado pelo corpúsculo basal e seu diplossomo

que é fracamente evidenciado pela posição do corte ( → ).

Barra = 0,28 μm.

Fig. 5 – Cílio cortado longitudinalmente, acompanhado pela.....24

invaginação da membrana plasmática (→) localizado no citoplasma de uma célula, próximo ao núcleo e membrana plasmática. Encontram-se microtúbulos (•) dispersos no citoplasma e “pé-basal” ou “satélites”( S). Note a presença de centríolo ( ∇ ).

Barra = 0,28 μm.

Fig. 6 – Cílio longitudinal emergindo para o meio extracelular,.....25

apresentando uma pequena coluna ciliar. Observe a invaginação da membrana plasmática (→).

Barra = 0,28 μm.

Fig. 7 – Cílio projetando-se em direção ao compartimento.....25

extracelular, de tamanho reduzido, acompanhado pela invaginação da membrana plasmática (→) e um discreto corpúsculo basal ( • ).

Barra = 0,28 μm.

Fig. 8 – Cílio cortado obliquamente ao seu eixo, emergindo de.....26

uma evaginação da membrana plasmática (→).

Barra = 0,28 μm.

Figs. 9 e 10 – Cílios primários em corte transversal, de um fibroblasto,.....27

apresentando o arranjo microtubular de nove duplas periféricas e nenhum central, '9+0' (→). O citoplasma está constituído por mitocôndrias (*M*), e Retículo Endoplasmático Rugoso (*RER*). Nota-se grande quantidade de microtúbulos (•) orientados paralelamente ao cílio.  
Barra = 0,28 µm.

Fig. 11a – Cílio primário de arranjo '9+0', note a dupla (→).....28  
de microtúbulos periféricos que tende a movimentar-se da posição periférica para a posição central.  
b – Secção transversal de um cílio '8+2'. c -d-e- cortes em várias posições ao longo da coluna ciliar, cada vez mais próximos à ponta do cílio.  
Barra = 0,28 µm.

11f-g – Padrão microtubular irregular, por apresentarem um.....29  
microtúbulo da dupla periférica ausente (→).  
h – Arranjo microtubular irregular '8+2'.  
Barra = 0,28 µm.

Fig. 12 - Corpúsculo basal acompanhado pela vesícula ciliar (→).....30  
Note o citoplasma constituído por núcleo (*N*), Complexo de Golgi (*G*).  
Barra = 0,28 µm.

Fig. 13 – Vesícula ciliar envolvendo o corpúsculo basal que constitui.....30  
o diplossomo disposto em corte tangencial (→).

Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

Fig. 14 – Corpúsculo basal associado à membrana plasmática ( $\rightarrow$ ) da.....31  
célula próximo ao núcleo (*N*).

Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

Fig. 15 - Secção longitudinal de um centríolo acompanhado por raiz.....32  
( $\rightarrow$ ). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

Fig. 16 – Par de centríolos seccionados longitudinalmente dispostos.....32  
paralelamente em relação ao outro. ( $\rightarrow$ ).

Barra = 0,28 mm.

Fig. 17 – Par de centríolos seccionados tangencialmente, dispostos.....33  
em ângulo reto, acompanhados pelos microtúbulos no  
citoplasma ( $\bullet$ ) e pela raiz, e suas estriações ( $\rightarrow$ ).

Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

Fig. 18 – Centríolo em secção transversal, evidenciando o arranjo de.....33  
nove grupos de três microtúbulos periféricos ( $\rightarrow$ ). Observe

a presença de microtúbulos no citoplasma do fibroblasto

( $\bullet$ ). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

Tabela 1 - Número de estruturas celulares no ligamento periodontal dos.....35  
incisivos inferiores de rato submetidos às condições de  
hiperfunção, hipofunção e normal. (n= 7).

Tabela 2 - Frequência e cálculos estimativos, em (%) do número real.....35  
de fibroblastos ciliados do ligamento periodontal dos  
incisivos inferiores de rato submetidos às condições de  
hiperfunção, hipofunção e normal.

## LISTAS DE ABREVIATURAS

% = por cento

Fig.= Figura

µm = micrometro

X = vezes

*et al.*, = e outros colaboradores ( ‘*et alli*’)

ESALQ= Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’

FOP = Faculdade de Odontologia de Piracicaba

IFT = Transporte Intraflagelar

PUCCAMP = Pontifícia Universidade Católica de Campinas

UNICAMP = Universidade Estadual de Campinas

## RESUMO

Cílios e flagelos são normalmente encontrados na superfície livre da célula e demonstram um padrão microtubular "9+2". Um cílio incomum tem sido identificado em algumas células e tecidos, onde normalmente não são esperados. Estes apresentam um padrão microtubular "9+0", e nem sempre se encontram na superfície livre das células.

Foi sugerido que a frequência de fibroblastos ciliados poderia estar relacionada ao metabolismo. Para analisarmos esta suposição, a frequência de fibroblastos ciliados foi determinada no ligamento periodontal do incisivo de rato sob diferentes condições funcionais de erupção.

Foram utilizados quatorze ratos, Wistar, pesando 150-200g, foram usados, sete ratos, tiveram seus incisivos inferiores esquerdos seccionados na altura da papila gengival, com uma broca diamantada, a cada dois dias, por um período de 90 dias. Com esse procedimento o incisivo inferior esquerdo foi mantido desimpedido (fora de oclusão – hipofuncional), enquanto o incisivo direito permaneceu impedido (em oclusão – hiperfuncional). Os outros 7 animais foram mantidos em condições normais de erupção (normofuncional).

Os animais foram anestesiados com Ketamina (80mg /Kg) e Xylasina (8mg/ Kg) e mortos por perfusão intracardíaca de 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 por 15 minutos.

As amostras de ligamento periodontal do incisivo foram fixadas em glutaraldeído e incluídas em araldite. Secções de (60-90 nm) foram coletadas em grade "single slot" (2mm x 0,5mm) cobertas com uma fina camada de Formvar e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.

Foram contados 600 fibroblastos por tecido em cada animal, totalizando 4200 células por tecido, no aumento de 16.000x ao microscópio eletrônico de transmissão. Todos os fibroblastos ciliados, encontrados foram fotografados no mesmo aumento.

Os cílios encontrados demonstraram um padrão microtubular "9+0" indicando que estes não estejam associados à motilidade.

Os resultados indicaram que a presença dessa estrutura não está associada à atividade metabólica dos tecidos analisados. Não encontramos diferença na frequência de cílio entre as condições de erupção do incisivo, porém sua ocorrência no ligamento periodontal foi significativamente alta. Assim, podemos sugerir uma função sensorial, transmitindo sinais do meio extracelular para o intracelular.

## ABSTRACT

Cilia and flagella are generally located in the free surface of the cell and show a microtubule pattern "9+2". An unusual cilia has been identified in some cells and tissues, where they would not be expected. These cilium possess microtubule pattern "9+0" and they are not necessarily found on free surface of the cells.

It has been suggested that frequency of ciliated fibroblasts could be related to the metabolism. Analysing these supposition, the ciliated fibroblasts frequency was determined in the periodontal ligament of the rat incisor under different functional conditions of eruption.

Fourteen rats Wistar weighting 150-200g had been used. Seven rats had its left lower incisors trimmed to the gingival margin with a diamond-coated wheel to eliminate occlusion with the opposite tooth, for 90 days.

The left lower incisor was kept (unimpeded teeth - hypofunctional) while the right incisor remained (impeded - hiperfunctional). The others 7 animals had been kept in normal conditions of eruption (normofunctional).

The animals were anaesthetized with Ketamine (80 mg/Kg) and Xylazine (8 mg/Kg) and they were killed by an intracardiac perfusion of 2,5% glutaraldehyde in 0,1M phosphate buffer pH 7,3 for 15min.

The samples of periodontal ligament of the incisor was been fixed in glutaraldehyde and embedded in araldite. The sections (60-90 nm) were collected on

single slot grids (2 mm x 0,5 mm) coated with a thin Formvar film and contrasted with uranyl acetate and lead citrat.

The amount of 600 fibroblasts for tissue in each animal had been counted, totalizing 4200 cells for tissue, in the magnification of 16.000x at the transmission electron microscope of transmission (TEM). All ciliated fibroblasts found had been photographed in the same magnification.

These cilium apresented a microtubule pattern '9+0' indicates that these are not associated to motility function.

These results had indicated that the presence of this organele is not associated to metabolical activity of the tissue analyzed. We did not find difference in the frequency of cilia among the conditions of eruption of the incisor, however its occurrence in the periodontal ligament was high. Thus, we can suggest a sensory function, signaling from the extracellular to the intracellular spaces.

## 1. INTRODUÇÃO

Cílios e Flagelos são estruturas encontrados na superfície de alguns organismos unicelulares como protozoários e em células eucarióticas, como os cílios encontrados no epitélio da traquéia humana. Em células epiteliais são processos filiformes que se projetam em feixes paralelos a partir do ápice dessas células, medem cerca de 7–10  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, envolvidos por uma evaginação da membrana plasmática, atuam como remos, movendo fluido e partículas nas vias respiratórias.

Outras células, como os espermatozoides, são propulsores por flagelos que constituem a sua cauda, e de forma geral a função de motilidade é desempenhada por meio dos batimentos.

Cílios e flagelos constituem-se por 20 microtúbulos formados por subunidades protéicas conhecidas como  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina e braços de dineína, ligados por pontes de nexinas dispostos em um par central e nove pares periféricos. A interação dessas proteínas, resulta em um movimento que pode ter uma rapidez de 600 a 1300 batimentos por minuto.

Kohl *et al.*, (2003), propuseram em seu estudo com o *Trypanosoma brucei*, que o tamanho dos flagelos poderia estar associado com o tamanho e com a forma das células e, ao mesmo tempo, com o processo de divisão celular.

Para os autores, células que possuem um pequeno flagelo são menores, o que

mostra uma relação direta entre o comprimento do flagelo e o tamanho da célula. Em seu experimento, quando a formação de flagelo é completamente bloqueada, observaram células pequenas, pois, perderam sua forma, sua polaridade e não se dividiriam.

A formação e a manutenção dessas estruturas estariam associadas ao sistema de transporte intraflagelar (IFT), bem caracterizado nas algas unicelulares *Chlamydomonas* (Kozminski *et al.*, 1993). Esse transporte é caracterizado por um movimento rápido de partículas de proteína ao longo dos microtúbulos flagelar. Para o autor todos os flagelos maduros são submetidos ao turnover de proteínas o que explica a importância funcional desse transporte.

Bastin *et al.*, (1999) citaram que uma série de proteínas, são sintetizadas distantes de cílios e flagelos, e por estes não possuírem ribossomos, essas proteínas estariam sujeitas a um transporte intraflagelar (IFT), que levam essas proteínas para os cílios e flagelos para sua manutenção.

Os microtúbulos possuem função organizacional em todas as células eucarióticas, são tubos longos e relativamente rijos. Em uma célula animal típica, crescem a partir do centrosomo, estendendo-se para a periferia, criam um sistema de trilhos no interior da célula sobre os quais vesículas e outros componentes celulares podem locomover-se, nos axônios de neurônios. Particularmente são destacados pela velocidade de  $5\mu\text{m/s}$  permitindo atravessarem uma distância de 1 metro em aproximadamente 1 dia (Junqueira & Carneiro, 1990). Participam da

formação do fuso mitótico e também podem formar cílios e flagelos, estruturas que se destacam pelos seus movimentos rítmicos. O alinhamento e posicionamento do complexo de Golgi e retículo endoplasmático, depende dos microtúbulos, por esse motivo, quando uma célula é tratada com colchicina, seus microtúbulos são desagregados e observa-se uma drástica alteração na localização dessas organelas (Alberts *et al.*, 1999).

Cílios em células que normalmente não os apresentam, foram descritos pela primeira vez por Zimmerman, (1898) no túbulo renal do coelho e vesícula seminal humana, desde então foram observados em diversos tecidos de aves e mamíferos.

Estes cílios foram observados em células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans de rato, Munger (1958), em carcinoma renal de rato (Latta *et al.*, 1961), pele humana (Wilson & Mc Whorter, 1963), em tumor do cérebro humano (Schuster, 1964), no baço de rato (Bari & Sorensen, 1965), em condrócitos embriológicos do rádio de rato (Scherft & Daems, 1967), em células da adenohipófise de camundongo (Dahl, 1967; Dingemans, 1969), na musculatura cardíaca embriogênica de camundongos e coelhos (Rash *et al.*, 1969), em osteócitos da calvária fetal de ratos (Federman & Nichols, 1974), em células do túbulo proximal e distal do néfron de rato (Webber & Lee, 1975), em tumor benigno e maligno do nervo periférico (Park *et al.*, 1988), e no músculo liso do útero de rato (Goranova & Chaldakov, 1989).

A presença dessas estruturas em fibroblastos tem sido relatada, em cultura de células (Stubblefield & Brinkley, 1966; Wheatley, 1969, 1971, 1972; Archer &

Wheatley, 1971), e em fibroblastos endometriais por Maraspin & Boccabella, (1971), fibroblastos da polpa dos dentes caninos de cães por Kubota, (1977), fibroblastos do ligamento periodontal de incisivo de camundongo por Bertseen *et al.*, (1975) e mais recentemente em fibroblastos da derme, gengiva, periodonto relacionado ao esmalte e ligamento peridontal de incisivo e molar de camundongo por Barbosa, (1999); Barbosa *et al.*, (2003).

Estes cílios são considerados anômalos, embora apresentem algumas características semelhantes aos cílios normais de padrão microtubular ‘9+2’, geralmente não se encontram morfológicamente normais em relação aos microtúbulos que os compõem, além de serem encontrados na maioria das vezes de forma solitária. Kubota, (1977) descreveu o padrão ‘9+0’ de microtúbulos em fibroblastos da polpa do canino de cães e terceiro molar humano. Este padrão foi descrito também por outros autores, que demonstraram sua ocorrência numa larga variedade de células (Munger, 1958; Latta *et al.*, 1961; Wilson & Mc Whorter, 1963; Schuster, 1964; Bari & Sorensen, 1965; Scherft & Daems, 1967; Dahl, 1967; Dingemans, 1969; Rash *et al.*, 1969; Federman & Nichols, 1974; Kubota, 1977; Tucker, *et al.*, 1983; Barbosa, 1999; Barbosa *et al.*, 2003).

Sorokin, (1968), comparando o processo de ciliogênese do cílio ‘9+0’ com os cílios ‘9+2’ nas microvilosidades de traquéia e brônquios pulmonares, não encontrou diferenças, porém, observou que no epitélio fetal de rato o desenvolvimento do cílio ‘9+0’ ou ‘solitário’ ocorreu antes da formação das

microvilosidades, e por esse motivo poderia também ser chamado de cílio ‘primário’.

Pouco é conhecido a respeito de seu desenvolvimento e sua significância funcional, que é apenas especulativa, assim a função desses cílios permanece desconhecida, embora tenha sido consideradas algumas hipóteses, como a de terem: 1- Função sensorial (Zimmerman, 1898; Barnes, 1961; Sorokin, 1962); 2- Quimiorreceptora (Munger, 1958); 3- serem um resto evolutivo (Latta *et al.*, 1961); 4- uma estrutura rudimentar sem qualquer finalidade (Bari & Sorensen, 1965; Overton, 1965; Dahl, 1967); 5- ou apenas serem um produto acidental (Zeigel, 1962).

Beertsen *et al.*, (1974) relataram que os fibroblastos do ligamento periodontal relacionado ao dente em incisivos de rato, migram durante o movimento eruptivo, enquanto os fibroblastos do ligamento que estão relacionados ao osso alveolar, permanecem estacionários. Esses mesmos autores, em 1975, analisaram o ligamento periodontal relacionado ao dente e ao osso, pois suspeitavam que essa estrutura poderia estar envolvida no movimento eruptivo do dente. A estimativa do número real de fibroblastos ciliados encontrado por eles foi de 70%, embora, não houvesse diferença na quantidade de fibroblastos ciliados no ligamento periodontal relacionado ao dente e ao osso alveolar, o que indicou que essas estruturas não estariam envolvidas na locomoção da célula.

Em nosso trabalho publicado em 2003 (Barbosa, *et al.*, 2003), fruto da tese de

mestrado, realizamos uma quantificação dessa estrutura em diferentes tecidos conjuntivos do camundongo (derme, gengiva, periodonto relacionado ao esmalte e ligamento periodontal do incisivo e molar) e encontramos uma relação entre a frequência e o metabolismo dos tecidos estudados.

Foi obtido, como resultado, que tecidos de maior metabolismo como o ligamento periodontal do incisivo e molares foram os que apresentaram maior número de fibroblastos ciliados, enquanto a gengiva ocupou posição intermediária e a derme que apresenta menor atividade metabólica, foi a que apresentou menor quantidade de fibroblastos ciliados. Diferenças no metabolismo do colágeno entre os fibroblastos dos diferentes tecidos conjuntivos, foram descritas por Sodek, (1977), e mostrou que são maiores no ligamento periodontal do incisivo e dos molares e menor na derme, ficando a gengiva em posição intermediária.

Neste estudo, planejamos então determinar a frequência de fibroblastos ciliados em um mesmo tecido que pudéssemos alterar a taxa metabólica. Uma das razões por decidirmos utilizar o ligamento periodontal do incisivo de rato, é por ser um dente de erupção contínua, e podermos alterar a taxa de erupção por indução química como o uso de drogas ou hormônios, ou por meios mecânicos como a desoclusão que acelera a velocidade de erupção ou fixação do dente ao osso que paralisa a erupção. Para esse estudo, o procedimento empregado foi o mecânico por desoclusão dos dentes. Neste caso, tivemos um dente em hipofunção, e a velocidade de erupção dobrada para 900  $\mu\text{m}$  / dia contra os 450  $\mu\text{m}$  /dia (Michaeli & Weinreb,

1968) nos dentes com erupção normal ou mesmo hiperfunção, no caso dos contralaterais.

Nos incisivos com a taxa de erupção acelerada (hipofuncional), alguns autores descrevem que o aumento no processo eruptivo se deve ao aumento na produção celular do ligamento periodontal (Zajicek, 1974) e o aumento na densidade celular (Michaeli *et al.*, 1986 e 1994).

Beertsen & Everts, (1977) encontraram também uma diminuição de colágeno extracelular do ligamento periodontal do incisivo hipofuncional em relação ao seu contralateral hiperfuncional. Trabalhos bioquímicos mostraram que no ligamento periodontal do incisivo hipofuncional, aumenta o teor de proteínas não colágenas (Van den Bos & Tonino, 1984) e glicosaminoglicanas sulfatadas (Kirkham *et al.*, 1993), indicando um aumento na atividade metabólica do tecido.

E a outra razão por escolhermos o ligamento periodontal do incisivo de rato, foi por ele estar confinado em uma pequena área entre o dente e o osso alveolar, e pelos fibroblastos estarem bem orientados em uma só direção, facilitando o estudo em microscopia eletrônica de transmissão, no sentido de obtermos cortes no mesmo plano.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Quatorze ratos macho, Wistar, pesando 150-200g, foram utilizados, 7 animais selecionados tiveram seus incisivos inferiores esquerdos seccionados na altura da papila gengival a cada dois dias com a utilização de uma broca diamantada em alta rotação, por um período de 90 dias.

Esse procedimento manteve o incisivo inferior esquerdo desimpedido (fora de oclusão-hipofuncional) enquanto o incisivo direito permaneceu impedido (em oclusão-hiperfuncional) os outros 7 animais foram mantidos em condição normal de erupção (normofuncional).

Os ratos foram anestesiados com Ketamina (80 mg/Kg) e Xylasina (8 mg/Kg), (Francotar e Verbaxyl, Virbac, Brasil), via intramuscular e perfundidos via intracardíaca, no ventrículo esquerdo utilizando o fixador (Karnovsky, 1965) durante 15 minutos.

As mandíbulas foram removidas, dissecadas e separadas em hemimandíbulas e imersas no mesmo fixador por mais 3 horas a temperatura ambiente.

Em seguida as peças foram descalcificadas em EDTA a 5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 a temperatura ambiente, por um período de 55 dias, com trocas diárias.

Após a desmineralização, cada hemimandíbula foi subdividida em 3 segmentos transversais iguais, na região, correspondente ao 1º molar. (Fig.1)

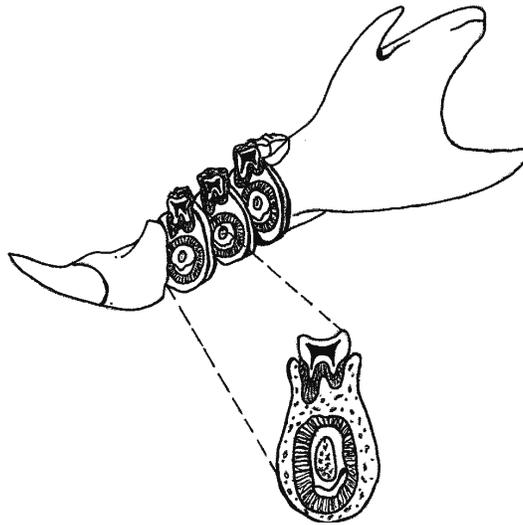


Fig. 1 - Esquema do segmento transversal ao corpo da mandíbula correspondente ao primeiro molar.  
A- ligamento periodontal do incisivo

As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 por 3 horas, lavadas em tampão fosfato 0,1M, desidratadas com acetona e incluídas em araldite.

Cortes de 1 $\mu$ m de espessura foram obtidos, corados com azul de toluidina e usados para orientação na execução dos cortes ultrafinos.

Em seguida, foram feitos cortes ultrafinos (60 a 90 nm) no ultramicrotomo MT 2C e foram coletados em grade de furo único (single slot 2 x 0,5mm), cobertas com fina camada de Formvar.

Cada grade recebeu um corte com um distanciamento de 10  $\mu$ m entre um e outro evitando-se assim que fosse feita a contagem dos cílios de um mesmo corte. Estes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

No aumento de 16.000x no microscópio eletrônico de transmissão EM 10 Zeiss, foram contados 200 fibroblastos por amostra, somando 600 fibroblastos por animal e totalizando 4.200 células por tecido.

Todas as células em que foram identificados cílios, corpúsculos basais e centríolos foram fotografadas no mesmo aumento acima citado. Como na microscopia eletrônica, os cortes são extremamente finos, não podemos afirmar que uma célula observada não apresente cílio apenas porque não são vistos. O cílio pode estar em outro plano de corte. Por isso, além do cálculo de porcentagem por meio da contagem de células, que apresentavam cílio e células que não os apresentavam, realizamos também cálculos estimativos do número real de fibroblastos ciliados, como fizeram alguns autores (Beertsen *et al.*, 1975; Archer & Wheatley, 1971 e Wheatley, 1971 e 1972). Assim, além do número de cílios, foram também contados o número de corpúsculos basais, centríolos e os pares: corpúsculo basal-centríolo e centríolo-centríolo. Foram também contados os corpúsculos basais e centríolos cortados longitudinalmente além dos corpúsculos basais associados ou não com cílios.

Para obtermos os cálculos estimativos do número real de fibroblastos ciliados no ligamento periodontal nas diferentes condições de erupção, utilizamos as seguintes fórmulas segundo alguns autores:

- Beertsen *et al.*, (1975)

$$\frac{\text{Número de pares de corpúsculo basal e centríolo}}{\text{Número de pares de centríolo + Número de pares de corpúsculo basal e centríolo}} \times 100 = \%$$

- Archer & Wheatley, (1971) e Wheatley, (1972)

$$\frac{\text{Número de cílio + corpúsculo basal}}{\text{Complexo centriolar}} \times 100 = \%$$

- Wheatley, (1971)

$$\frac{\text{Corpúsculo basal com cílio}}{\text{Corpúsculo basal e centríolo em cortes longitudinais}} \times 100 = \%$$

$$\frac{\text{Corpúsculo basal com cílio + Corpúsculo basal sem cílio}}{\text{Corpúsculo basal e centríolo em cortes longitudinais}} \times 100 = \%$$

Os resultados dos índices, acima relacionados, foram analisados estatisticamente pela análise de variância, teste de comparação de múltiplas médias de Tukey. Os intervalos de confiança foram estabelecidos com nível de significância de 5%.

### 3. RESULTADOS

As características ultraestruturais do cílio primário foram similares as descritas pela maioria dos autores, solitário e dependendo da secção, associado ao corpúsculo basal (Figs. 2 e 3) e diplossomos (Figs. 4 e 5), e acompanhados pela invaginação da membrana plasmática (Figs. 3, 5, 6, 7 e 8) .

Cílios que foram cortados longitudinalmente, quase sempre estavam na superfície da célula, projetando-se para o meio extracelular (Figs. 2, 4, 6 e 7) ou inseridos no citoplasma (Figs. 3, 5 e 8). Esses não apresentavam características ultraestruturais normais em relação aos descritos na literatura como funcionais.

As características ultraestruturais dos fibroblastos ciliados e cílios analisados, aparentemente não foram diferentes em relação às condições funcionais a que o ligamento periodontal foi submetido.

A maioria desses cílios foi encontrada próxima ao núcleo e seu comprimento foi diverso. (Figs. 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

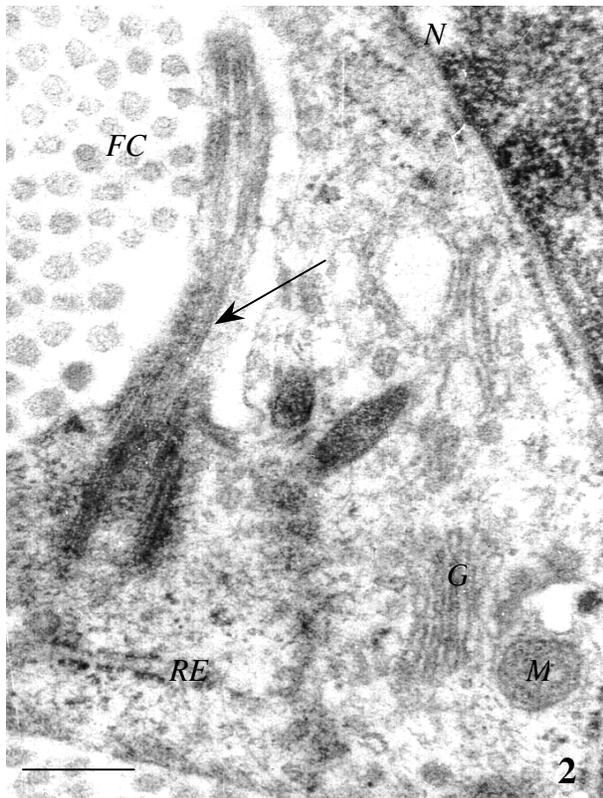


Fig. 2 – Eletromicrografia de um cílio projetando-se para o meio extracelular, evidenciando fibras colágenas cortadas transversalmente (*FC*). O cílio está acompanhado pelo corpúsculo basal e encontra-se próximo ao núcleo da célula. Note que o citoplasma do fibroblasto é constituído pelo Complexo de Golgi (*G*), Retículo endoplasmático Rugoso (*RER*), mitocôndria (*M*) e microtúbulos bem desenvolvidos, compondo a coluna ciliar (→). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

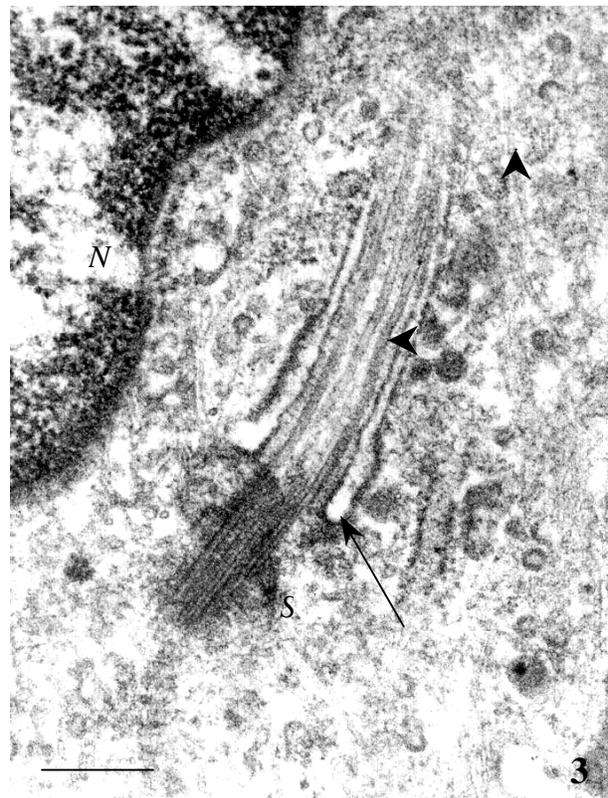


Fig. 3 – Cílio primário intracitoplasmático próximo ao núcleo e à invaginação da membrana plasmática (→). Note a presença de muitos microtúbulos (•) dispostos no citoplasma e o “pé-basal” ou “satélite” (*S*) formado por microtúbulos que se estendem do corpúsculo basal e compõem a coluna ciliar (•). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

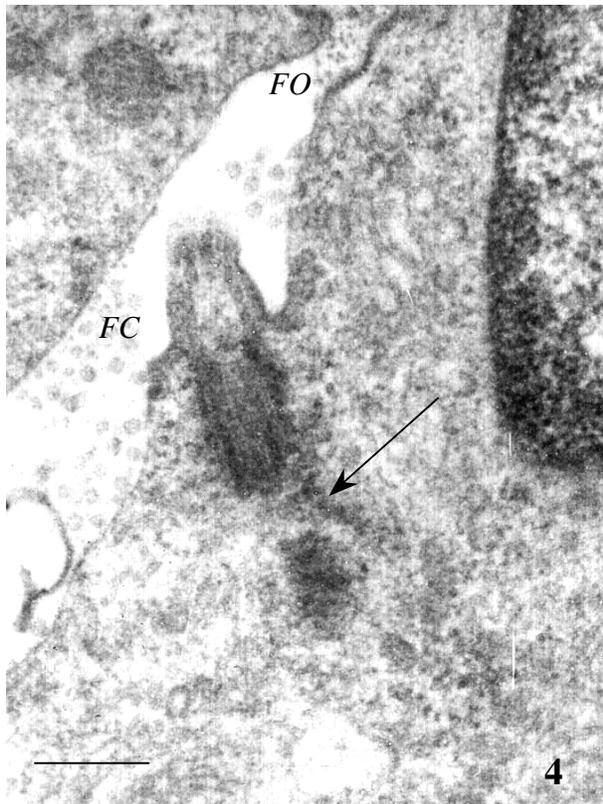


Fig. 4 – Cílio primário extracitoplasmático, onde se observa a presença de fibrilas colágenas (*FC*) e fibras oxitalânicas (*FO*), está acompanhado pelo corpúsculo basal e seu diplossomo que é fracamente evidenciado pela posição do corte ( → ). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

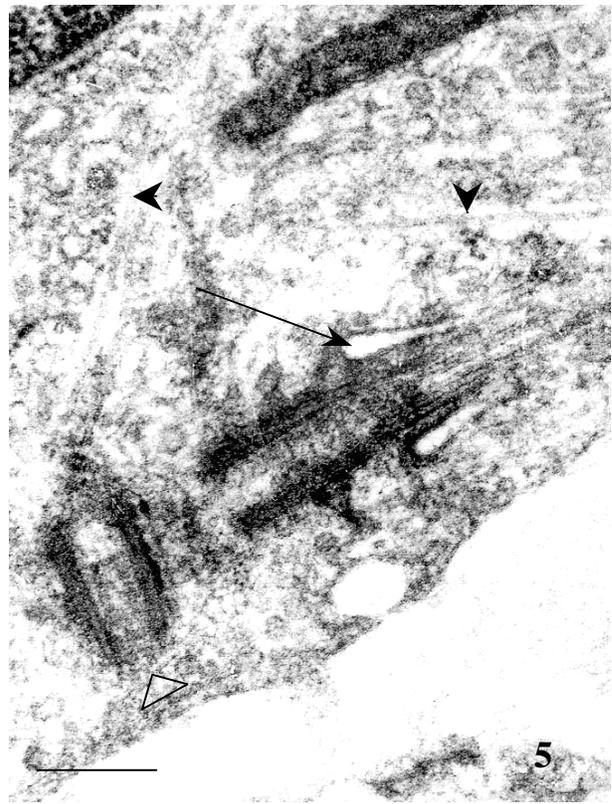


Fig. 5 – Cílio cortado longitudinalmente, acompanhado pela invaginação da membrana plasmática (→) localizado no citoplasma de uma célula, próximo ao núcleo e membrana plasmática. Encontram-se microtúbulos (•) dispersos no citoplasma e “pé-basal” ou “satélites” (*S*). Note a presença de centríolo ( ∇ ). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

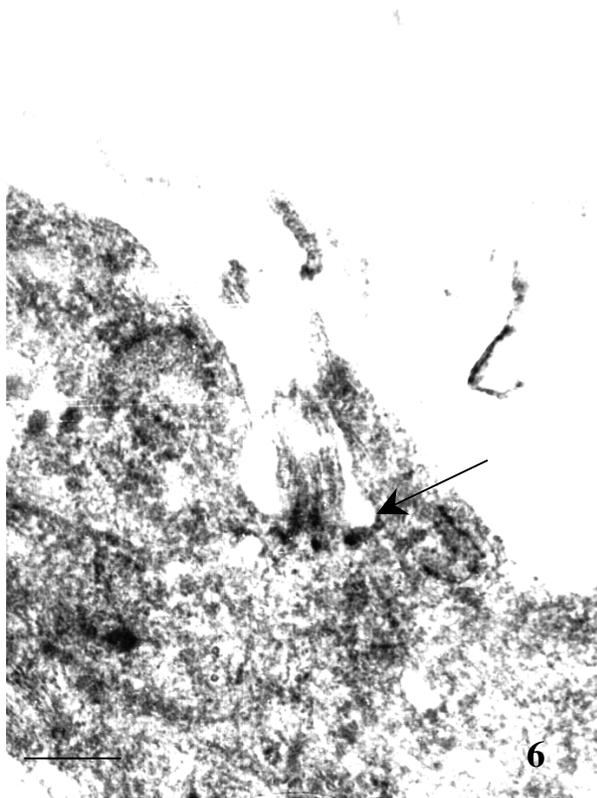


Fig. 6 – Cílio longitudinal emergindo para o meio extracelular, apresentando uma pequena coluna ciliar. Observe a invaginação da membrana plasmática (→). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .



Fig. 7 – Cílio projetando-se em direção ao compartimento extracelular, de tamanho reduzido, acompanhado pela invaginação da membrana plasmática (→) e um discreto corpúsculo basal (•). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

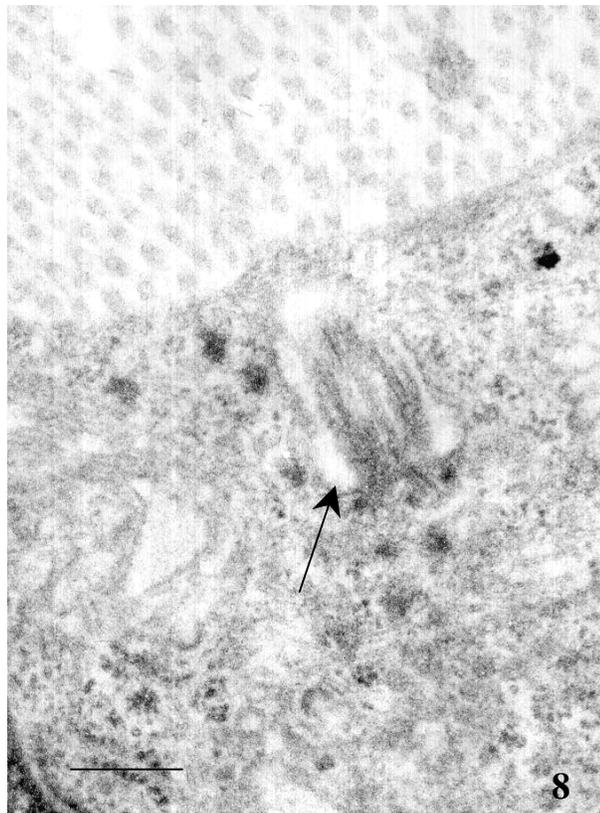
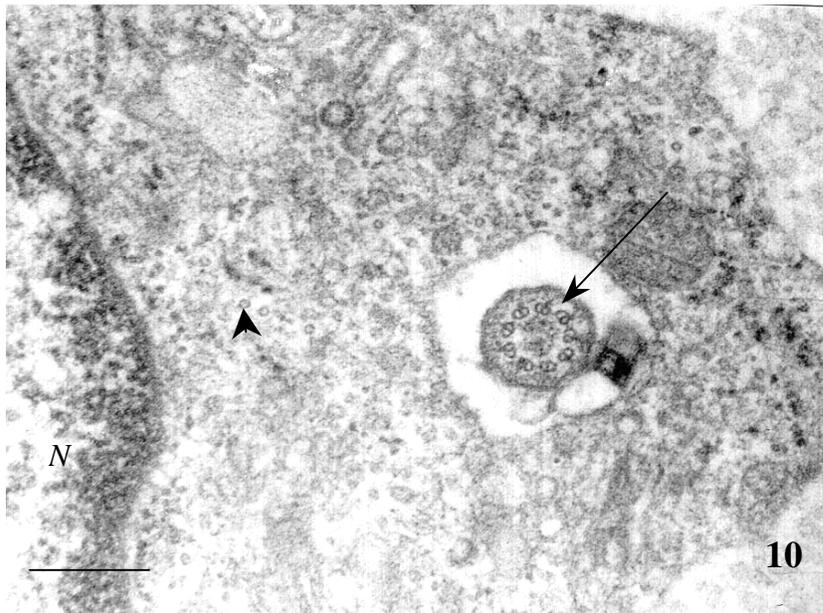
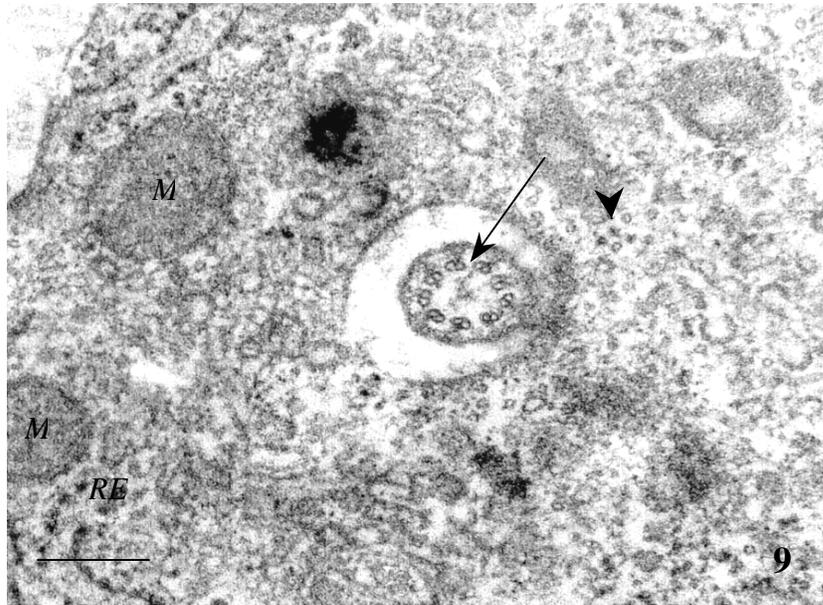


Fig. 8 – Cílio cortado obliquamente ao seu eixo, emergindo de uma evaginação da membrana plasmática (→).

Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

Nas secções transversais, observamos com maior frequência o padrão microtubular ‘9+0’ (Figs. 9, 10 e 11a), e algumas vezes, constatamos a presença de cílios com arranjo microtubular variado como: ‘8+2’, ‘6+2’, ‘7+2’, ‘4+0’, (Fig. 11b, c, d, e h), outros se apresentavam irregulares por não possuírem um dos microtúbulos que compõem a dupla periférica (Fig. 11 f, g ).

Foram observados um grande número de microtúbulos que se encontravam compondo a coluna ciliar (Figs. 2 e 3) ou próximos ao corpúsculo basal, inseridos no citoplasma (Figs. 5, 9 e 10).



Figs. 9 e 10 – Cílios primários em corte transversal, de um fibroblasto, apresentando o arranjo microtubular de nove duplas periféricas e nenhuma central, ‘9+0’ (→). O citoplasma está constituído por mitocôndrias (*M*), e Retículo Endoplasmático Rugoso (*RER*). Nota-se grande quantidade de microtúbulos (•) orientados paralelamente ao cílio. Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

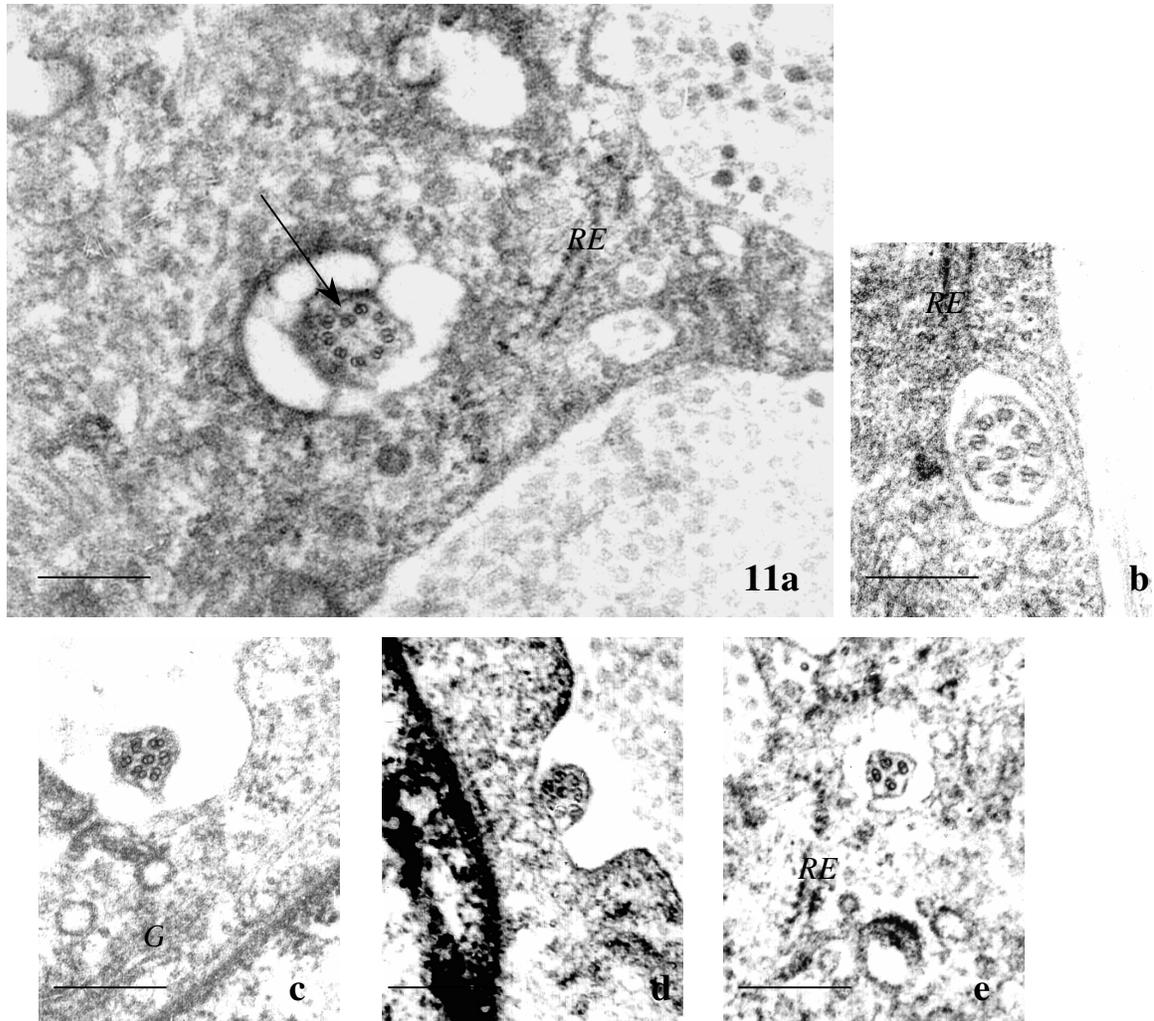
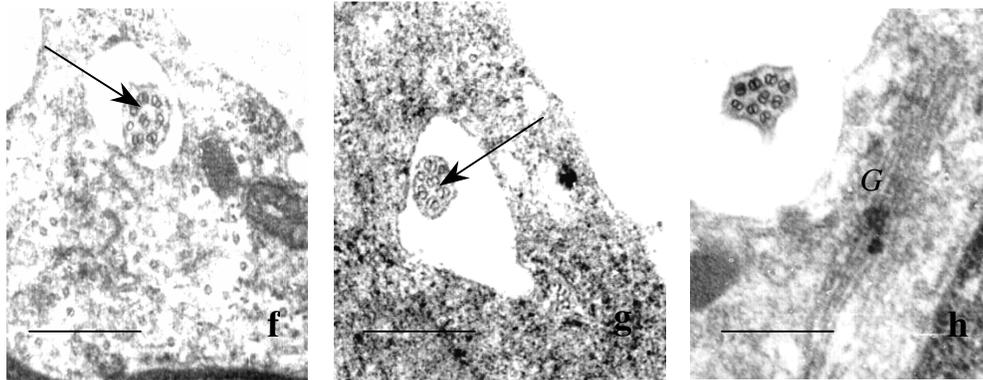


Fig. 11a – Cílio primário de arranjo ‘9+0’, note a dupla de microtúbulos (→) que tende a movimentar-se da posição periférica para a posição central. b – Secção transversal de um cílio ‘8+2’. c -d-e – Cortes em várias posições ao longo da coluna ciliar, cada vez mais próximos à ponta do cílio. Barra = 0,28  $\mu\text{m}$



11f-g – Padrão microtubular irregular, por apresentarem um microtúbulo da dupla periférica ausente (→). h – Arranjo microtubular irregular “8+2”.

Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

Os corpúsculos basais observados, foram assim identificados por localizarem-se na base do cílio, (Figs. 2, 3, 4 e 5) serem constituídos por 9 duplas de microtúbulos periféricos, por estarem acompanhados de uma vesícula ciliar (Figs. 12 e 13) ou emergindo acoplados a membrana plasmática da célula ( Fig. 14).

Em algumas secções longitudinais, foram encontradas, projeções descritas como ‘pés -basais’ ou ‘satélites’ (Figs. 3 e 5). Eram únicas, e possuíam forma de cunha, com a sua porção mais larga em junção com o corpúsculo basal. Estas projeções não foram encontradas em secções transversais.



Fig. 12 - Corpúsculo basal acompanhado pela vesícula ciliar (→). Note o citoplasma constituído por núcleo (*N*), Complexo de Golgi (*G*). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

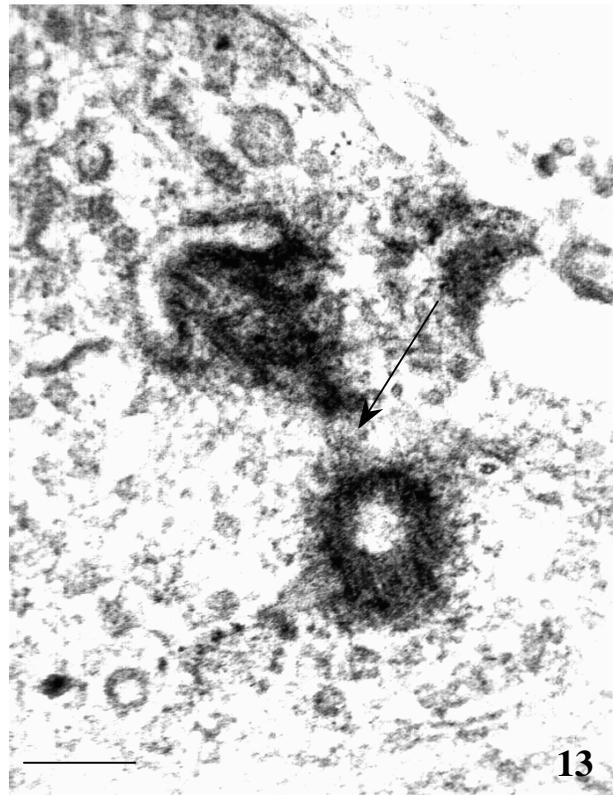


Fig. 13 - Vesícula ciliar envolvendo o corpúsculo basal que constitui o diplossomo disposto em corte tangencial (→). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

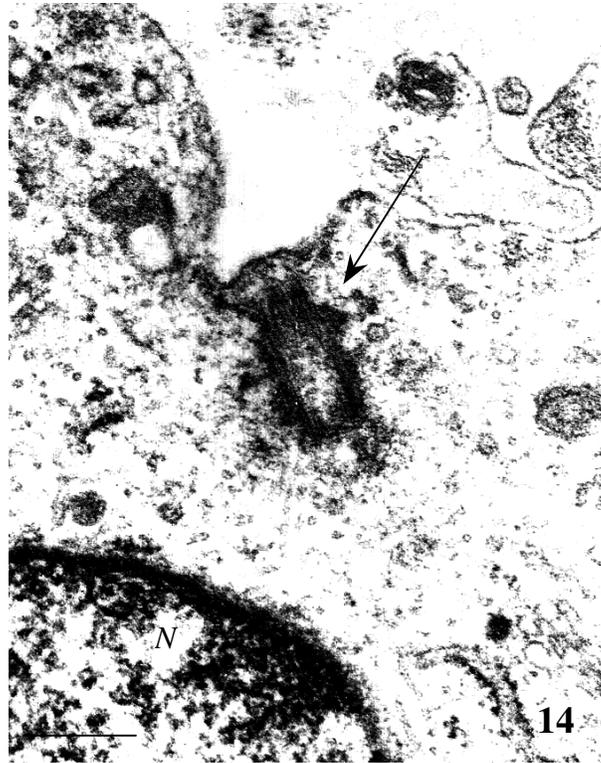


Fig. 14 – Corpúsculo basal associado à membrana plasmática (→) da célula próximo ao núcleo (*N*). Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

Centríolos foram seccionados longitudinalmente (Figs. 5, 15 e 16) transversalmente (Fig. 18) e diagonalmente (Figs. 13 e 17) mostrando-se individuais ou em duplas que dispõem-se paralelamente ou formando ângulo reto um em relação ao outro (Figs. 15, 16 e 17).

A raiz do centríolo encontrada, foi representada por estriações (Figs. 15 e 17) e sugerem uma associação estrutural do cílio por meio do centríolo, com o complexo de Golgi.

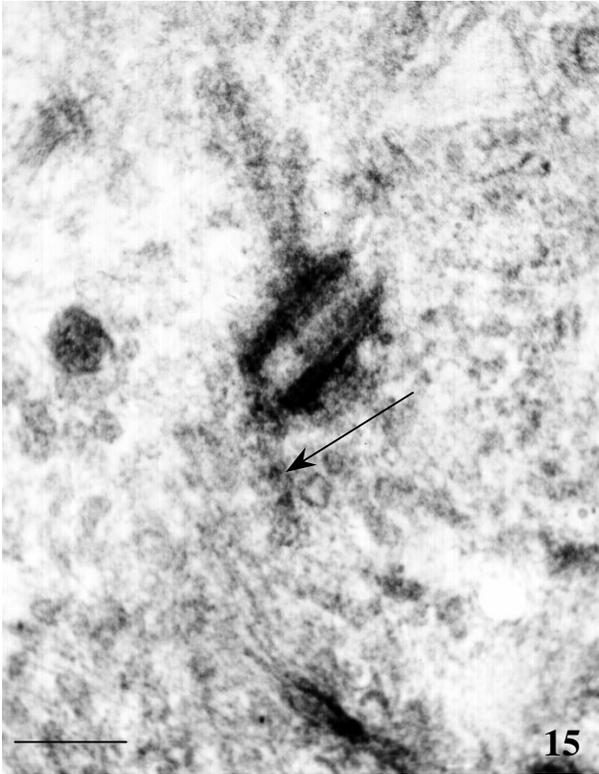


Fig. 15 - Secção longitudinal de um centríolo acompanhado por raiz (→).  
Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

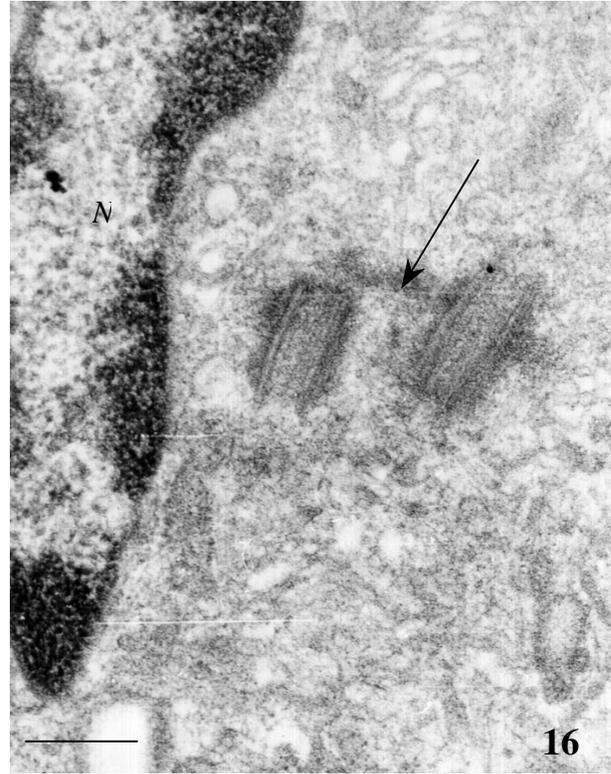


Fig. 16 - Par de centríolos seccionados longitudinalmente dispostos paralelamente em relação ao outro. (→).  
Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

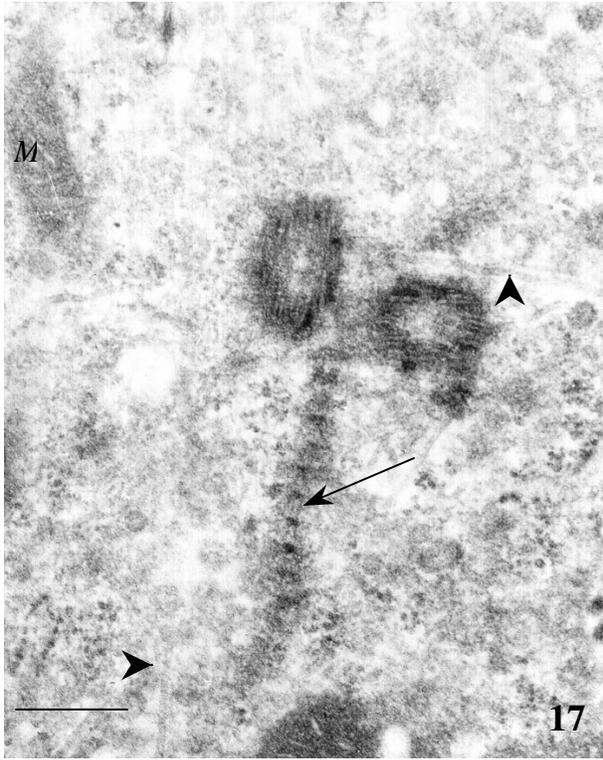


Fig. 17 – Par de centríolos seccionados tangencialmente, dispostos em ângulo reto, acompanhados pelos microtúbulos no citoplasma (•) e pela raiz, e suas estriações (→).

Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

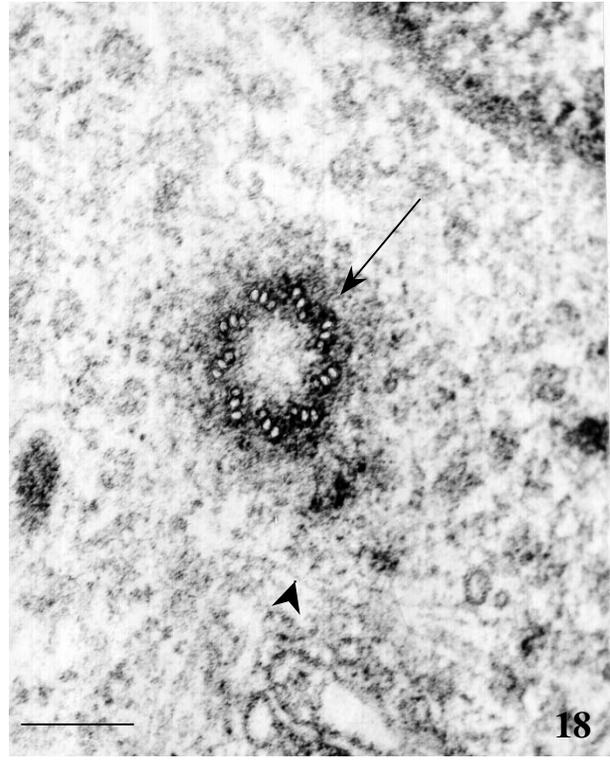


Fig. 18 – Centríoio em secção transversal, evidenciando o arranjo de nove grupos de três microtúbulos periféricos (→). Observe a presença de microtúbulos no citoplasma do fibroblasto (•).

Barra = 0,28  $\mu\text{m}$ .

Estes centríolos foram constituídos por 9 grupos de três microtúbulos periféricos dispostos em anel (Fig. 18). Todos os cílios observados foram do tipo solitário, embora alguns autores citaram a existência de células biciliadas.

O número de estruturas contadas por tecido está demonstrado na Tabela 1, e as respectivas freqüências porcentuais, são demonstradas respectivamente na tabela 2.

Estes resultados indicaram que não houve diferença significativa na freqüência de fibroblastos ciliados entre as condições funcionais de erupção a que o ligamento periodontal do incisivo de rato foi submetido.

Tabela 1. Número de estruturas celulares no ligamento periodontal dos incisivos inferiores de rato submetido às condições de hiperfunção, hipofunção e normal. (n= 7).

CONDIÇÃO DE ERUPÇÃO	A COMPLEXO CENTRIOLAR	B CORPÚSCULO BASAL	C CÍLIO	D PAR DE CORPÚSCULO BASAL-CENTRÍOLO	E PAR DE CENTRÍOLO	F CORPÚSCULO BASAL E CENTRÍOLO LONGITUDINAL	G CORPÚSCULO BASAL C/ CÍLIO	H CORPÚSCULO BASAL S/ CÍLIO
<b>HIPER</b>	255	26	113	18,0	16,0	66	15	26
<b>HIPO</b>	293	19	121	16,0	22,0	59	20	19
<b>NORMO</b>	268	11	121	14,5	13,5	59	21	11

Tabela 2. Frequência e cálculos estimativos, em (%) do número real de fibroblastos ciliados do ligamento periodontal dos incisivos inferiores de rato submetidos às condições de hiperfunção, hipofunção e normal.

CONDIÇÃO DE ERUPÇÃO	FREQÜÊNCIA	CÁLCULOS ESTIMATIVOS			
	CÍLIO	BEERTSEN (1975)	ARCHER & WHEATLEY (1971) WHEATLEY (1972)	WHEATLEY (1971)	WHEATLEY (1971)
		D/E + D . 100	C+B / A . 100	G / F . 100	G + H / F . 100
<b>HIPER</b>	2,8	53,0	54,5	22,0	62,0
<b>HIPO</b>	3,3	42,0	48,0	34,0	66,0
<b>NORMO</b>	3,3	52,0	49,0	36,0	54,0

#### 4. DISCUSSÃO

Cílios são estruturas anteriormente encontradas apenas em algumas células, como protozoários, onde possuem função de captar partículas de alimento e locomoção, em seres humanos, localizam-se em tecidos como: traquéia e brônquios, onde executam a função de movimentar o fluído sobre a superfície celular, nas tubas uterinas e no epidídimo são responsáveis por propelir células isoladas, por meio de um fluído. (Gibbons, 1971; Bretscher, 1983; Alberts *et al.*, 1999).

Estes cílios e flagelos eucarióticos, descritos como dotados de motilidade, são acompanhados do padrão microtubular ‘9+2’, projetam -se na superfície celular, onde desempenham seus movimentos em forma de ‘onda’ ou ‘chicotada’ (Sorokin, 1968; Alberts *et al.*, 1999).

Em estudos do movimento ciliar, foram encontradas células alteradas geneticamente, com diversas deficiências na estrutura do axonema. Do ponto de vista médico, estes estudos têm grande significado, no que se relaciona a Síndrome de Kartagener, caracterizada por apresentar espermatozóides imóveis, bronquite crônica e sinusite, e têm sido demonstrado que essa síndrome é resultado de uma mutação envolvendo braços de dineína, proteína que faz parte do axonema.

Esse fenômeno da imotilidade, é caracterizado por defeitos geneticamente determinados, específicos, que inclui a falta de dineína, prejudicando assim a movimentação ciliar, que pode levar à infertilidade masculina e causar doenças respiratórias (Lazarides & Revel, 1979).

A presença de um tipo ciliar descrito como “primário” ou “solitário”, por muitos autores e neste trabalho, confirma que a capacidade de formação de cílio é comum a todas as células (Stubblefield & Brinkley, 1966).

Tucker *et al.*, (1983) citaram em seu trabalho que todas as células de mamíferos poderiam dar origem a cílios a partir de seu centríolo.

Há hipóteses de que os cílios solitários estariam distribuídos em todos os tecidos, células maduras e neoplásicas, tendo como exceção, apenas o tecido sanguíneo (Munger, 1958; Rash *et al.*, 1969), ou linfóides e mielóide, hepatócitos (Wheatley *et al.*, 1996) e células de origem epitelial que, normalmente expressam cílio “9+2” (Wheatley, 1995).

Algumas anormalidades como a degeneração da retina e doenças que causam cegueira em seres humanos citadas por Bastin *et al.*, (1999) e doença policística caracterizada pela presença de cílios imóveis no rim e degeneração retinal como nas Síndromes Sênior, Jeune & Badet citadas por Afzelius, (1979); Moyer *et al.*, (1994) e Barr & Sterberg, (1999), têm sido associadas a deficiências em proteínas motoras do transporte intraflagelar (IFT), que é um sistema no qual grandes complexos de proteínas, chamadas de partículas do transporte intraflagelar, são transportados entre a membrana flagelar e os microtúbulos de cílios e flagelos. Este processo de transporte depende de microtúbulos, que são provavelmente essenciais para a manutenção de flagelos móveis e cílios imóveis (Cole *et al.*, 1998).

Os cílios solitários diferem-se dos presentes nas células epiteliais pela

quantidade (mais de 1 bilhão /  $\text{cm}^2$ , em células que revestem o trato respiratório humano), (Alberts *et al.*, 1999), e pelo comprimento que estes apresentam, 7 a 10  $\mu$  por 0,2  $\mu$ , enquanto os cílios solitários possuem 2 $\mu$  x 0,25 $\mu$ , (Wilson & McWhorter, 1963), e não estão necessariamente no ápice celular.

A variação do padrão microtubular encontrada em nosso trabalho foi também descrito na polpa dental por Kubota, (1977), que associou o padrão à origem da célula. Células epiteliais apresentariam o padrão microtubular ‘9+2’, enquanto as mesenquimais poderiam apresentar-se com padrões variados (7+2; 9+0; 8+1; 8+0; 7+1; 7+0).

Observamos que nos fibroblastos do ligamento periodontal do incisivo de rato, que é um tecido de origem ectomesenquimal, a maioria dos cílios apresentava um padrão diplossomal ‘9+0’, e geralmente, apenas um por célula, como relata Barnes, (1961) em células da hipófise do camundongo, embora, alguns autores afirmam, que podem ser encontrados mais de um em uma única célula (Bari & Sorensen, 1965), em células da hipófise do rato.

Essas irregularidades no padrão microtubular foram observadas também por Satir, (1965) em brânquias de mexilhões que normalmente possuem um padrão microtubular ‘9+2’, demonstrando que o padrão irregular de microtúbulos pode estar presente também em cílios normais se forem cortados próximos à sua extremidade apical, admitindo também, que em algumas espécies, os filamentos centrais poderiam terminar antes dos filamentos periféricos, explicando, portanto, a

ausência do par central.

Não foi encontrado cílio “9+0” nas células em mitose (Stubblefield & Brinkley, 1966; Rash *et al.*, 1969; Dingemans, 1969; Wheatley, 1971), provavelmente porque, os centríolos estariam atuando no processo de formação do fuso mitótico durante a divisão celular e como dão origem aos corpúsculos basais e conseqüentemente aos cílios, não poderiam estar se expressando simultaneamente, por isso a determinação da multiplicação celular poderia ser medida pela freqüência ciliar segundo Dingemans (1969).

Estruturas como “raízes” e “pés basais” ou “satélites” são descritas em cílios funcionais de padrão “9+2” porém, foram presentes em nossas observações.

Os “pés-basais” ou “satélites”, segundo Boisvieux -Ulrich *et al.*, (1990), estudando células do oviduto, citam que poderiam coordenar o movimento do cílio, pelo rearranjo ou rotação do corpúsculo basal, em alguma direção.

Chailley *et al.*, (1989) propuseram que estas estruturas, estejam envolvidas com a coordenação do movimento do cílio, oferecendo resistência e suporte na contração do cílio na borda ciliada do oviduto.

No cílio primário, as “raízes” estariam envolvidas numa relação estrutural entre o cílio primário e o complexo de Golgi, para Tenkova & Chaldakov, (1988), essa relação facilitaria a secreção, como a produção de humor aquoso pelos fibroblastos do estroma no olho de coelho.

Poole *et al.*, (1997), relataram que, em cultura, a relação entre essas estruturas

com células do tecido conjuntivo é extremamente importante para determinar a polaridade da secreção de macromoléculas para a matriz. Estudos radioautográficos e imunohistoquímicos desses mesmos autores indicaram que o agrecan recentemente sintetizado pelos condrócitos, células que também apresentam cílio primário, é secretado e seqüestrado, em regiões preferenciais do microambiente pericelular.

Enquanto um papel para o cílio primário na orientação e direção na migração em cultura de células tem sido proposto (Albrecht-Buehler & Bushnell, 1979), seu potencial envolvimento em funções sensoriais vem sendo reconhecido (Poole *et al.*, 1985; Roth *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1997; Wheatley, 1995; Wiederhold, 1976).

Os fibroblastos do ligamento periodontal de incisivo de rato, migram durante o movimento eruptivo, e estão orientados perpendicularmente ao dente e paralelamente às fibras colágenas produzidas por eles. Apesar de não encontrarmos diferenças na frequência de cílios, nas diferentes condições funcionais a que o ligamento periodontal foi submetido, sua ocorrência nesse tecido é significativamente alta, cerca de 61% observado por nós no rato, e 70% por Beertsen *et al.*, (1975) no camundongo, assim talvez pudéssemos especular relacionando as funções sensoriais para a organização do ligamento periodontal, com a frequência de cílios primários. O cílio poderia estar funcionando como uma “antena” transmitindo sinais do meio extracelular para o interior da célula.

Como a função de movimentação do cílio primário, é pouco provável, em virtude das características ultraestruturais que apresentam no ligamento periodontal,

podemos acreditar que “satélites” ou “pés -basais” e “raízes” possam facilitar a execução da função sensorial, como a recepção de informações necessárias. Nos fibroblastos ciliados do ligamento periodontal essas estruturas também foram vistas.

Os cílios solitários poderiam participar de um mecanismo de armazenamento de cálcio, visto que a diminuição da concentração dessa substância teria causado o encurtamento no tamanho dos cílios primários, descritos por Tucker *et al.*, (1983) e Parker & Quarmby, (2003).

Em nosso trabalho, apesar de não ser nosso objetivo principal, não encontramos nenhuma modificação ultraestrutural aparente no cílio ou nas células, nas diferentes condições de erupção à que o ligamento periodontal foi submetido, porém Tyler *et al.*, (2001) estudando o ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*, que é um parasita, causador de doenças, associou a forma e o tamanho da célula, às mudanças do tamanho do flagelo, assim células com flagelos mais curtos quando passavam pela divisão celular, dariam origem a células menores, porém no caso desse protozoário, esse comportamento poderia ocorrer devido a necessidade adaptativa, uma vez que alteram o ciclo vital entre o hospedeiro que é o homem e o vetor que é o inseto. O autor cita também que o cílio poderia estar associado à citoquinese, pois observaram que o estrangulamento do citoplasma ocorre onde o cílio está localizado.

As diferenças nos tamanhos dos cílios foram relacionadas ao processo de divisão celular e estágio de desenvolvimento ciliar. Indicando um mecanismo rápido

de montagem e reabsorção dos cílios. Cílio primário é sempre perdido por reabsorção quando a célula entra em mitose, mas aparece novamente tão logo após, na fase G1 do ciclo celular.

Nesse presente estudo, foram quantificados os fibroblastos ciliados no ligamento periodontal do incisivo de ratos nas condições de erupção hiper, hipo e normofuncional, estabelecendo-se uma análise comparativa em relação às condições de erupção. Assim após a coleta dos dados, foram comparadas as médias dos fibroblastos ciliados para cada condição de erupção. Nossos resultados foram 2,8%, 3,3% e 3,3% no hiperfuncional, no hipofuncional e no normofuncional, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre às diferentes condições de erupção. Realizamos também os cálculos estimativos do número real de fibroblastos ciliados, por métodos baseados em probabilidade de observar um corpúsculo basal com relação às outras estruturas centriolares como fizeram alguns autores. Beertsen *et al*, (1975) basearam-se na probabilidade de encontrar um corpúsculo basal e centríolo ou pares de centríolo-centríolo no ligamento peridontal do incisivo do camundongo, e de acordo com eles nossos resultados foram 53%, 42% e 52% no hiper, hipo e normofuncional, respectivamente.

Archer & Wheatley, (1971) e Wheatley, (1972) basearam-se na probabilidade de observar, um cílio ou um corpúsculo basal, comparado a um complexo centriolar em cultura de células. Seguindo esse mesmo raciocínio nossos resultados foram 54,5 %, 48% e 49% no hiper, hipo e normofuncional, respectivamente.

Wheatley, (1971), baseou-se na probabilidade de observar um corpúsculo basal, associado ou não ao cílio, comparando com os corpúsculos basais e centríolos cortados, longitudinalmente, também em cultura de células. Seguindo o mesmo cálculo desse autor, encontramos 62%, 66% e 54,5% nos hiper, hipo e normofuncional respectivamente.

Todos esses resultados são encontrados na tabela 2.

No ligamento periodontal encontramos a maior freqüência de cílio cerca de 61%. Quando utilizamos os cálculos de Wheatley (1971), onde encontramos o maior número de corpúsculo basal cortados longitudinalmente, provavelmente, porque os fibroblastos foram cortados no seu longo eixo, indicando que os cílios estão preferencialmente paralelos a este eixo.

Em nenhum desses cálculos obtivemos diferença estatística na freqüência de fibroblastos ciliados entre as condições funcionais de erupção as quais o ligamento periodontal do incisivo de rato foi submetido.

Uma alta freqüência de cílios foi também encontrada em algumas linhagens de fibroblastos “in vitro” (Archer & Wheatley, 1971; Wheatley, 1971 e 1972). Essa freqüência foi confirmada em culturas pela imunofluorescência por meio do anticorpo  $\alpha$ - tubulina detyrosinated (ID-5), (Wheatley, 1994).

Wheatley, (1971) explicou que em cultura de células, algumas linhagens de células parecem ser destituídas de cílio primário (ex. L – 929), algumas apresentam baixa incidência (ex. fibroblastos de hamster chinês), e outras têm uma alta

frequência de cílio (cultura de fibroblastos em camundongo). Porém os motivos são obscuros.

Ele também verificou a frequência ciliar nas culturas de 2 a 7 dias de duas maneiras, associando o corpúsculo basal com e sem cílio com o número de secções longitudinais dos centríolos e corpúsculos, os quais indicaram os seguintes valores: 41,0% a 83% e 50,0% a 83%.

Embora nossos cálculos não fossem significantes de acordo com a condição de erupção a que o ligamento periodontal foi submetido, observamos nestes cálculos, os maiores índices percentuais obtidos, sugerindo um cílio para mais da metade das células dos ligamentos periodontais analisados, portanto, uma frequência significativamente alta para esse tecido.

Wheatley, (1971) verificou que a frequência de cílio seria inversamente proporcional à atividade mitótica, assim células que passam rapidamente pela mitose têm menos oportunidade de expressar cílio, do que células altamente diferenciadas e que possuem uma fase G<sub>1</sub> prolongada, essa relação inversa entre a atividade proliferativa e a expressão do cílio tem sido discutida por Stubblefield & Brinkley, (1966) Dingemans, (1969) e Rash *et al.*, (1969).

Wilson & Mc Whorter, (1963) sugeriram que a presença desses cílios indicaria um mecanismo de controle mitótico, que funcionaria da seguinte maneira: a produção de cílio indica o bloqueio da mitose e a reabsorção do cílio poderia indicar o retorno à atividade mitótica. Talvez o cílio exerça uma influência

regulatória. Boquist, (1968), citou que a reabsorção do cílio, provavelmente, poderia indicar uma reserva extra de microtúbulos para a mitose.

Park *et al.*, (1988) encontraram mais cílios solitários em tumores malignos onde a atividade proliferativa é maior do que tumores benignos, que apresentavam menor atividade proliferativa, nessas circunstâncias esse fato parece contraditório, mas, Sorokin, (1968) observou que os cílios primários expressam-se mais significativamente em células com características imaturas, ou seja, quando a cromatina está mais descondensada no núcleo, e apresentam muitos ribossomos e triglicérides no citoplasma, comparando com as células que já haviam completado sua diferenciação. O ligamento periodontal do incisivo submetido a hipofunção também apresenta maior atividade proliferativa, e entretanto não encontramos diferença significativa quando comparado ao hiper e normofuncional.

Strugnell *et al.*, (1996) na tentativa de correlacionar algumas patologias da pele, como quelóides e cicatrizes, citaram que necessariamente não há uma relação entre a atividade proliferativa, e a frequência ciliar, uma vez que células tumorais já são conhecidas por possuírem cílios, e por outro lado, existem hepatócitos e linfócitos que são células conhecidas pela alta atividade proliferativa e não se tem registro da presença de cílio primário.

A geração de uma nova célula durante a mitose, tem sido associada ao processo de migração. No ligamento dois compartimentos são reconhecidos: o progenitor (formador de fibroblastos) que migram com maior velocidade e o

compartimento de maturação (associado à diferenciação dos fibroblastos), onde a velocidade de migração é menor. (Zajicek, 1974).

O que faz as células migrarem, é um processo desconhecido, mas, existem evidências que poderiam ser coordenado pela função dos cílios que atuam como um mecanorreceptor, ou receptor e distribuidor de sinais específicos que iniciam ou interrompem a proliferação e a diferenciação da célula.(Pazour & Witman, 2003).

A incidência de cílios em diferentes tecidos tem trazido muita discussão em relação à função, que estes estariam desempenhando:

Munger, (1958) encontrou esses cílios nas ilhotas de Langerhans, em específico nas células  $\beta$ , e Goranova & Chaldakov, (1989), encontraram no músculo liso do útero de ratas, para esses autores a explicação seria atribuída à função de quimiorrecepção por estarem em tecidos envolvidos com hormônios.

Handel *et al.*, (1999) citaram esses cílios como receptores de somatodenina por serem encontrados no cérebro.

Wolfrun & Schmitt, (2000) atribuíram a esse cílio a função de conector dos fotorreceptores da retina e transporte de rodopsina.

Sorokin, (1962) considerou a presença desse cílio, poderia ser uma questão evolutiva, representando vestígios de uma herança unicelular, sendo considerado resto evolutivo, o que poderia explicar a presença hereditária dessas estruturas em cultura de fibroblastos descrita por Wheatley, (1972).

Existe uma importância em elucidar a evolução desse cílio bem como a sua

significância funcional. Dahl, (1967) relatou que embora, possa ser uma estrutura rudimentar, para ele o arranjo “8+1”, poderia ser uma adaptação, como resultado de alguma nova função requerida, ou apenas um vestígio inativo de algum estágio de diferenciação.

Outros descreveram essa estrutura como rudimentar e sem qualquer finalidade (Bari & Sorensen, 1965; Overton, 1965).

Zeigel, (1962), citou que as “circunstâncias - acidentais” poderiam explicar a presença desse cílio, para o autor o contato ao acaso do centríolo com a membrana plasmática poderia resultar na formação de um cílio primário acidentalmente.

Schuster, (1964) interpretou como difícil de imaginar que um cílio “bruto” e “não refinado” fosse funcional, principalmente, por serem atípicos, para ele o cílio poderia indicar uma característica potencial do centríolo e que poderiam expressar-se principalmente em células embriogênicas, cultura de células e células tumorais. A versatilidade que os centríolos possuem também é citada por Latta *et al.*, (1961).

Kubota, (1975) compreende ser improvável sua função de motilidade, por causa de seu arranjo e a falta dos braços de dineína.

Webber & Lee, (1975) descreveram como improvável que eles possam ter função propulsiva, principalmente por estarem em pequena quantidade, comparado aos animais que os possuem em grande quantidade, e que levaria a crer na hipótese de uma estrutura vestigial, porque são encontrados em grande número em outras espécies. Porém, os autores, não descartaram a possibilidade desses cílios

monitorarem a função sensitiva, por apresentarem uma ocorrência muito difundida nos tecidos animais.

Poole *et al.*, (1997) estudaram as relações entre os cílios solitários com o complexo de Golgi dos fibroblastos mostrando que a posição dos cílios, pode estar relacionada com um mecanismo de feedback funcional, para facilitar a secreção direcionada de macromoléculas recém sintetizadas.

Alguns autores descreveram hipóteses onde esses cílios teriam movimento:

Latta *et al.*, (1961) explicaram que, possivelmente, o cílio solitário poderia criar uma turbulência prevenindo o refluxo laminar do fluído tubular no néfron de rato.

Federman & Nichols, (1974) estudando osteócitos, mencionaram que poderiam participar do movimento dos fluídos por meio do sistema canalicular do osso, transportando cálcio e outros íons, participando do processo de homeostase, segundo ele o fenômeno poderia ser entendido, pela rapidez com que íons sódio, chegam a circulação.

Tucker *et al.*, (1983) em seu trabalho com células Balb /C 3T3, indicaram que o cílio poderia estar associado com o fluxo de cálcio, e, provavelmente, com o encurtamento do cílio primário, em algumas situações experimentais.

Porém os detalhes dessa relação são obscuros, e não são bem esclarecidos pelos autores.

Neste estudo, a frequência de fibroblastos ciliados no ligamento periodontal,

não parece estar associada diretamente ao fator metabolismo.

Embora, a frequência desses cílios, não fossem significativamente diferentes de acordo com a condição de erupção, as quais o ligamento periodontal foi submetido, a frequência dessa estrutura, obtida pelos cálculos estimativos, foi significativamente alta, sugerindo que possam executar uma função específica no ligamento periodontal.

A recepção de sinais específicos que levem à proliferação e à diferenciação celular poderia explicar a função desse cílio no ligamento periodontal. A hipótese dessa função, pode ser reforçada pela presença de “satélites” ou “pés -basais” e “raízes”, pois, propõem um ajuste no posicionamento do cílio para a recepção de sinais como hormônios,  $Ca^{+}$  etc.

A frequência de cílios nos fibroblastos endometriais, variou de acordo com as fases do ciclo estral (Goranova & Chaldakov, 1990), e nos mesmos fibroblastos, Maraspin & Boccabella, (1971) mostraram que a formação dos cílios foi inibida dependendo da dose de estradiol, enquanto que a progesterona não teve efeito.

Baseado em todos esses achados, seria contra o princípio da “economia celular”, uma célula produzir uma estrutura que não fosse imprescindível para a existência e a do organismo hospedeiro. A expressiva ocorrência de cílio primário, inclusive no ligamento periodontal, e a sua relação como o complexo de Golgi, fazendo comunicação com o meio extracelular, reforçam a sua importância, ainda que sua função não tenha sido totalmente esclarecida. O ligamento periodontal é um

tecido altamente dinâmico em seu metabolismo e sua proliferação celular, e ainda está constantemente submetido às forças mastigatórias.

Em nosso estudo não encontramos diferenças na frequência de fibroblastos ciliados entre o ligamento periodontal do incisivo hipofuncional, hiperfuncional e normal, mas se admitirmos que o cílio pode exercer, alguma função sensorial, poderíamos talvez encontrar uma diferença nas características ultraestruturais como: posição e comprimento do cílio, e sua associação com outras organelas, nesse tecido com atividade metabólica acelerada. A comparação da ultraestrutura nas diferentes condições de erupção não foi feita, pois nosso objetivo foi apenas determinar a frequência, entretanto, como o cílio é uma estrutura filiforme, se torna difícil determinar seu comprimento em microscópio eletrônico de transmissão, mas achamos que estas questões, merecem ser estudadas com mais cuidado, utilizando métodos mais adequados, por exemplo, microscopia confocal, microscopia eletrônica de alta voltagem e imunofluorescência.

## **CONCLUSÕES:**

- A frequência de fibroblastos ciliados no ligamento periodontal dos incisivos de rato, não parece estar associada à atividade metabólica;
- A expressiva ocorrência dessa estrutura no ligamento periodontal, sugere que possa executar uma função sensorial.

## REFERÊNCIAS\*

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K et al. *Fundamentos da Biologia celular – Introdução a biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul; 1999.

Albrecht-Buehler G, Bushnell A. The orientation of centrioles in migrating 3T3 cells. *Exp Cell Res*, 1979; 120: 111-18.

Afzelius BA. The immotile-cilia syndrome and other ciliary diseases. *Int Rev Exp Pathol*, 1979; 19:1-43.

Archer FL, Wheatley DN. Cilia in cell-cultured mouse fibroblasts. Incidence in mitotic and post-mitotic BHK 21 – C13 fibroblast. *J Anat*, 1971; 277-92.

Bari WA, Sorensen GD. Ciliated cells of the spleen of adult rats. *Anat Rec*, 1965; 152: 481-6.

Barnes BG. Ciliated secretory cells in the pars distalis of the mouse hypophysis. *J Ultrastruct Res*, 1961; 453-67.

Barbosa SCP. *Frequência de fibroblastos ciliados nos diferentes tecidos conjuntivos do camundongo* [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas / FOP, 1999.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP / FOP, baseada no modelo Vancouver dos periódicos em conformidade com o Medline.

Barbosa SCP, Merzel J, Novaes PD. Ciliated fibroblasts in mouse connective tissues: a comparison between methods for estimating their frequency. *J. Submicrosc Cytol Pathol*, 2003; 35(1): 83-89.

Barr MM, Sternberg, PW. A polycystic kidney-disease gene homologue required for male mating behaviour in *C. elegans*. *Nature*, 1999; 401:386-89.

Bastin P, MacRae TH, Francis SB, Matthews KR, Gull K. Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. *Mol Cell Biol*, 1999; 19 (12): 8191-200.

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

Beertsen W, Everts V, Houtkooper JM. Frequency of occurrence and position of cilia in fibroblasts of the periodontal ligament of de incisor. *Cell Tiss Res.*, 1975; 163: 415-31.

Beertsen W, Everts V. The site of remodeling of collagen in the periodontal ligament or the mouse incisor. *Anat Rec*, 1977; 189: 479-98.

Boisvieux-Ulrich E, Laine MC, Sandoz D. Cytochalasin D inhibits basal body migration and ciliary elongation in quail oviduct epithelium. *Cell Tissue Res*, 1990; 259 (3): 443-54.

Bretscher A. Microfilament organization in the cytoskeleton of the intestinal brush border. *Cell Muscle Motil*, 1983; 4: 239-68.

Chailley B, Nicolas G, Laine MC. Organization of actin microfilaments in the apical border of oviduct ciliated cells. *Biol Cell*, 1989; 67 (1): 81-90.

Cole DG, Diener DR, Himelblau AL, Beech PL, Fuster JC, Rosenbaum JL. *Chlamydomonas* Kinesin-II-dependent Intraflagellar Transport (IFT): IFT Particles Contain Proteins Required for Ciliary Assembly in *Caenorhabditis elegans* Sensory Neurons *J Cell Biol*, 1998;141(18): 993-1008.

Dahl HA. On the cilium cell relationship in the adenohypophysis of the mouse. *Z Zellforchs*, 1967; 83: 169-77.

Dingemans KP. The relation between cilia and mitoses in the mouse adenohypophysis. *J Cell Biol*, 1969; 43: 361-7.

Federman M, Nichols GJr. Bone cell cilia: vestigial or functional organelles? *Calcif Tiss Res*, 1974; 17: 81-5.

Gibbons IR. Cilia and Flagella of eukaryotes. *J Cell Biol*, 1971; 88: 107-13.

Goranova V, Chaldakov GN. Ciliated fibroblasts and smooth muscle cells in the rat uterus. *Experientia*, 1989; 46: 488-9.

Handel M, Schulz S, Stanarius A, Schreff M, Erdtmann-Vourliotis M, Schmidt H, et al. Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience*, 1999; 89:909-26.

Junqueira LC, Carneiro J - **Histologia básica**, 7<sup>a</sup> Edição, Rio de Janeiro: Editora Ganabara Koogan; 1990.

Karnovsky MJA. Formadehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolarity use in electron microscopy. *J Cell Biol*, 1965; 27: 137-8.

Kirkham J, Robinson C, Phull, JK, Shore RC, Moxham BJ, Berkovitz BKB. The effect of rate of eruption on the periodontal ligament glycosylaminoglicans content and enamel formation in the rat incisor. *Cell Tissue Res*, 1993; 274: 413-19.

Kohl L, Robinson D, Bastin P. Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *Eur Mol Biol Org*, 2003; 22 (20) 5336-46.

Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P, Rosenbaum JL. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 5519-23.

Kubota K, Malloy JJ, Low FN. An Unusual type of cilium. *Am J Anat*, 1975; 144: 119-24.

Kubota K. Comparative study of the single cilium of dental pulp cells. *J Nihon Univ Sch Dent*, 1977; 11: 11-5.

Latta H, Maunsbach AB, Madden SC. Cilia in different of the rat nephron. *J Biophy Biochem Cytol*, 1961; 11: 248-52.

Lazarides E, Revel JP. The molecular basis of cell movement. *Sci Am*, 1979; 240: 100-30.

Maraspin LE, Boccabella AV. Solitary cilia in endometrial fibroblasts. *J Reprod Fert*, 1971; 25: 343-7.

Michaeli, Y, Weinreb, MM. Role of attrition and occlusal contact in Physiology of the rat incisor. III: Prevention of attrition and occlusal contact in the nonarticulating incisor. 1968; *J Dent Res*, 47: 633- 40.

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

Michaeli Y, Shamir D, Weinreb M, Steigman S. Effect of loading on the migration of periodontal fibroblasts in the rat incisor. **J Periodontal Res**, 1994; 29 (1): 25-34.

Moyer JH, Lee-Tischler MJ, Kwon HY, Schrick JJ, Avner ED, Sweeney WE, et al. Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. **Science**, 1994; 264 (27): 1329-33.

Munger BL. A light and electron microscopic study of cellular differentiation in the islets of mouse. **Amer J Anat**, 1958; 103: 275-311.

Overton J. Changes in cell fine structure during lens regeneration in *Xenopus Laevis*. **J Cell Biol**, 1965; 24: 211-222.

Park P, Manabe S, Ohno T. Incidence and ultrastructure of rudimentary cilia in benign and malignant peripheral nerve tumores. **Ultrastruct Path**, 1988; 407-18.

Parker JD, Quarmby LM. Chlamydomonas fla mutants reveal a link between deflagellation and intraflagellar transport. *BMC Cell Biol*, 2003; 4(1):11.

Pazour GJ & Witman GB. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr Opin Cell Biol*, 2003; 15(1):105-10.

Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Analysis of the morphology and function of primary cilia in connective tissue: A cellular cybernetic probe? *Cell Motil*, 1985; 5: 175-94

Poole CA, Jensen CG, Snyder JA, Gray CG, Hermanutz VL, Wheatley DN. Confocal analysis of primary cilia structure and colocalization with the Golgi apparatus in chondrocytes and aortic smooth muscle cells. *Cell Biol Internat*, 1997; 21: 483-494.

Rash JE, Shay JW, Biesele JJ. Cilia in cardiac differentiation. *J Ultrastruct Res*, 1969; 29: 470-84.

Roth KE, Rieder CL, Bowser SS. Flexible-substratum technique for viewing cells from the side: some *in vivo* properties of primary (9+0) cilia in cultured kidney epithelia. *J Cell Sci*, 1988; 89: 457-66.

Satir P . Examination of the distal region of the ciliary shaft and role of the filaments in motility. *J Cell Biology*, 1965; 26: 805-34.

Scherft JP & Daems WT. Single cilia in chondrocytes. *J Ultrastruct Res*, 1967; 19: 546-55.

Schuster FL. Ciliated fibroblasts from a human brain tumor. *Anat Rec*, 1964; 150: 417-22.

Schwartz EA, Leonard ML, Bizios R, Bowser SS. Analysis and modeling of the primary cilium bedding response to fluid shear. *Am J Physiol (Renal Physiology)*. 1997; 272: 132-38.

Sodek JA. Comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Arch Oral Biol*, 1977; 22: 655-65.

Sorokin S. Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cell. *J Cell Biol*, 1962;15: 363-77.

Sorokin S. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mamalian

lungs. *J Cell Sci*, 1968; 207-30.

Stubblefield E, Brinkley BR. Cilia formation in chinese hamster fibroblasts in vitro as a response to colcemid treatment. *J Cell Biol*, 1966; 30: 647-52.

Strugnell GE, Wang AM, Wheatley DN. Primary cilium expression in cells from normal and aberrant human skin. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1996; 28(2): 215-25.

Tenkova T, Chaldakov GN. Golgi-cilium complex in rabbit ciliary process cells. *Cell Struct Funct*, 1988; 13(5): 455-8

Tucker RW, Meade-Cobun S, Jayaraman S, More NS. Centrioles, primary cilia and calcium in the growth of Balb/C 3T3 cells. *J Submicrosc Cytol*, 1983; 15: 139-43

Tyler KM, Matthews KR, Gull K. Anisomorphic cell division by African trypanosomes. *Protist*, 2001; 152 (4): 367-78.

Van Den Bos, Tonino GJM. Comparision and metabolism of the extracellular matrix in the periodontal ligament of impeded and unimpeded rat incisors. *Archs Oral Biol*, 1984; 39: 893-97.

Webber WA, Lee J. Fine structure of mammalian renal cilia. *Anat Rec*, 1975; 182: 339-44.

Wiederhold ML. Mechanosensory transduction in "sensory" and "motile" cilia. *Annu Rev Biophys Bioen*, 1976; 5: 39-62.

Wheatley DN. Cilia in cell-cultured fibroblasts. I. On their occurrence and relative frequencies in primary cultures and established cell lines. *J Anat*, 1969; 105: 351-62.

Wheatley DN. Cilia in cell-cultured fibroblasts. II. Relationship between mitotic activity and cilium frequency in mouse 3T6 fibroblasts. *J Anat*, 1971; 110: 367-82.

Wheatley DN. Cilia in cell-cultured fibroblasts. IV. Variation within the mouse 3T6 fibroblastic cell line. *J Anat*, 1972; 113: 83-93.

Wheatley, DN, Feilen ZY, Wheatley SP. Primary cilia in cultured mammalian cells: detection with a antibody against detyrosinated  $\alpha$  - tubulin (ID5) and by electron microscopy. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1994; 26: 91-102.

Wheatley DN. Primary cilia in normal and pathological tissues. *Pathobiology*,

1995; 63: 222-38.

Wheatley DN, Wang AM, Strugnell GE. Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biology International*, 1996; 20: 73-83.

Wilson RB, Mc Whorter CA. Isolated flagella in human skin. *Lab Invest*, 1963; 12: 242-49.

Wolfrum U, Schmitt A. Rhofppsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Mot Cytoskel*, 2000; 46: 95-107.

Zajicek G. Fibroblast Cell Kinetics in the Periodontal Ligament of the mouse. *Cell Tissue kinet*, 1974; 7: 479-92.

Zeigel RF. On the occurrence of cilia in several cell types of the chick pancreas. *J Ultrastuct Res*, 1962; 7: 286-92.

Zimmerman KW. Beiträge zur Kenntnis einiger Drüsen und Epithelien. *Arch Mikrosk Anat*, 1898; 52: 552-706.

## ANEXO 1

J. SUBMICROSC. CYTOL. PATHOL., 35 (1), 83-89, 2003

# Ciliated fibroblasts in mouse connective tissues: a comparison between methods for estimating their frequency

S.C.P. BARBOSA, J. MERZEL and P.D. NOVAES

Department of Morphology, Faculty of Odontology of Piracicaba, State University of Campinas (Unicamp), Piracicaba, SP, Brazil

**SUMMARY** - The frequency of ciliated fibroblasts in skin, gingiva, molar and incisor periodontal ligaments and incisor enamel-related periodontium of the mouse was estimated by straight counting or by methods based on the probability of observing a basal body in relation to other cell structures. Transmission electron microscopy of ultra thin sections mounted in single slot grids was used. The results obtained with these methods differed, but indicated that periodontal ligament fibroblasts from molars or incisors generally had a higher ciliation index than the fibroblast from skin and gingiva. These differences may not be real since the detection of cilia and/or centriolar structures seem to depend very much upon the plane of sectioning relative to the long axis of the fibroblasts, a situation which favours the more regularly arranged periodontal fibroblasts. This arrangement makes the periodontal tissues, particularly those of rodent incisors, a valuable model for studying ciliation *in vivo* because of the prompt response to experimental manipulation.

**KEY WORDS** *primary cilia - fibroblasts - periodontal tissues - gingiva - skin*

### INTRODUCTION

Primary, solitary or 9 + 0 cilia were first described in human seminal vesicle and rabbit renal epithelium (Zimmermann, 1898), and since then have been found in almost all types of mammalian and avian cells (Scherft and Daems, 1967). Indeed, only a few cell types (hepatocytes, differentiated cells of myeloid or lymphoid origin and cells that normally express 9 + 2 cilia) lack such cilia (Wheatley, 1995).

Primary cilia have been extensively studied in some cell types (reviewed in Wheatley, 1995) particularly in connective tissues fibroblasts (Sorokin, 1962; Maraspin and Boccabella, 1971; Beertsen *et al.*, 1975; Kubota, 1977; Goranova and Chaldakov, 1990) and *in vitro* in primary cultures (Strugnell *et al.*, 1996) or established cell lines (Stubblefield and Brinkley, 1966; Wheatley, 1969, 1971, 1972; Archer and Wheatley, 1971; Wheatley *et al.*, 1994).

Regardless of the cell type, primary cilia show some common features, including a lack of the central pair of micro-

tubules seen in 9 + 2 cilia and the lack of dynein arms in the nine doublets at periphery. At their emergence these cilia are surrounded by a deep invagination of the cell membrane and, as in 9 + 2 cilia, they are associated with a basal body. Although usually single, cells with more than one cilium are described in fibroblasts (Wheatley, 1971; Beertsen *et al.*, 1975) and myoblasts (Zeytinoglu *et al.*, 1996).

The significance and function of primary cilia are still a matter of speculation. Because of their extensive distribution, high frequency in many cell types and their relationship to the Golgi apparatus, centrosome and extracellular environment, most authors suggest that these cilia have a sensorial function (see Wheatley, 1995 and Wheatley *et al.*, 1996 for a review). Primary cilia would act as sensory probes (Poole *et al.*, 1985) or cellular flowmeters to receive transduce and conduct extracellular stimuli to intracellular organelles (Bowser and Leonard, 1992; Schwartz *et al.*, 1997). For one kind of primary cilia, the connecting cilia of mammalian photoreceptor cells, there is sound evidence of their role in transporting rhodopsin from the inner to the outer segment of such cells (Wolfrum and Schmit, 2000).

Determining the frequency of primary cilia in a cell population is an important step when studying their behaviour under normal and experimental conditions. The detection of these structures by immunostaining and light microscopy

*Mailing address:* Prof. Pedro Duarte Novaes, Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidad Estadual de Campinas (Unicamp), P.O. Box 52, 13414-018 Piracicaba, SP, Brazil; e-mail: novaes@fop.unicamp.br

(Wheatley *et al.*, 1994) allows the estimations of their frequency by simple counting the cells with and without cilia, which is much easier and faster than their observation by electron microscopy. Immunostaining works well for whole cells in culture but is not available yet for routinely fixed and sectioned tissues. Attempts have been made to apply this method to frozen tissue sections in conjunction with confocal microscopy (Poole *et al.*, 1997, 2001).

However, for most cell types *in vivo* transmission electron microscopy is still the method of choice for estimating primary cilia, either by straight counting or based on the probability of finding a basal body relative to other cell organelles. The aim of this study was to use these methods to compare the frequency of primary cilia of skin, gingiva and periodontal tissues fibroblasts, cells which have different metabolic and proliferative rates.

#### MATERIALS AND METHODS

Seven adult male mice (25-30 g) were anaesthetised with ketamine (80 mg/Kg) and xylazine (8 mg/Kg) (Francotar and Verbaxyl 2%, Virbac, Brazil) and killed by an intra-cardiac perfusion of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2-7.4) for 15 min. The mandibles, divided in hemimandibles, fragments of gingiva associated with the molar teeth and samples of dorsal skin were dissected and immersed in the same fixative for additional 4 h. The hemimandibles were demineralized with a solution of 5% EDTA and 2.5% glutaraldehyde in the same phosphate buffer for 45 days and then sliced at the level of the first lower molar with each slice comprising the molar root and a transversal section of the lower incisor. Skin and gingiva were cut in slices perpendicular to their surface. Three samples of each tissue were post-fixed in 1% osmium tetroxide in phosphate buffer for 1 h, dehydrated in graded acetone and embedded in araldite. Sections 1  $\mu\text{m}$  thick stained with 1% toluidine blue were used for orientation and, in the case of the hemimandibles, to select successively areas of the molar and incisor periodontal ligaments and the enamel-related periodontal tissue of the incisor (Fig. 1).

Sections with silver or grey interference colours (60-90 nm) and at least 10  $\mu\text{m}$  from each other were picked up on single slot grids (2 mm  $\times$  0.5 mm) coated with a thin Formvar film (2-3 sections per grid) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. At the magnification of 16,000 $\times$ , using a Zeiss EM-10 electron microscope, 600 fibroblasts per tissue (200 per tissue sample) were counted and the number of cells with nucleus was recorded. The number of sections required to count 200 fibroblasts varied from 3 to 6 for the incisor periodontal ligament, 9 to 17 for skin and 3 to 9 for the other tissues.

All cells with cilia, basal bodies or centrioles were photographed at the same magnification and the number of

these organelles was counted. A centriole was identified as a basal body when it was associated with a ciliary shaft or, when not, it was seen protruding into a vesicle or an invagination of the plasma membrane (Fig. 5). The number of centriolar complexes (any number or combination of centrioles, basal bodies or cilia; Archer and Wheatley, 1971), of basal body-centriole and centriole-centriole pairs, of cilia with and without basal bodies, of basal bodies with and without cilia and of basal bodies cut longitudinally were also recorded.

The length and width of basal bodies and centrioles cut longitudinally were measured and their mean diameter was calculated. The mean diameter of fibroblast nuclei was determined in 1  $\mu\text{m}$ -thick sections by measuring 50 nuclei per tissue using light microscopy at a magnification of 1,000 $\times$ . The simplest method for estimating the frequency of ciliated fibroblasts is the relationship between their number and the number of cells counted per tissue. The method of Dingemans (1969) is based on the probability of observing the nucleus and the basal body in a section, which in turn is related to their size. The size was estimated by the number of sections needed to cover the mean diameter of a nucleus and of a basal body. The other methods are based on the expectancy with which one may detect basal body-centriole or centriole-centriole pairs (Beertsen *et al.*, 1975), a cilium and/or a basal body compared to a centriolar complex (Archer and Wheatley, 1971; Wheatley, 1972) and a basal body associated or not with a ciliary shaft compared to longitudinally sectioned basal bodies or centrioles (Wheatley, 1971).

Since the variances of the data were not homogeneous (precluding ANOVA) we used the less powerful method of Friedman and a nonparametric multiple comparisons test to detect significant differences ( $p < 0.05$ ) between tissues (Jones and Kenward, 1989).

#### RESULTS

The observed cilia in all fibroblasts were similar to those described by most authors, *i.e.*, single and, depending on the plane of the section, they were seen associated with a basal body (Figs. 2 and 3). In cross section, the ciliary shaft showed nine doublet arrangements of microtubules at the periphery with none at the centre (9 + 0, Fig. 4). The cilium or the basal body emerged from the bottom of a deep invagination of the plasma membrane, dilated at the base (Figs. 2 and 3).

The number of organelles counted per tissue is shown in Table 1. The total number of cilia (column A) corresponds to the cilia, which were or were not associated with basal bodies plus the basal bodies not associated with a ciliary shaft.

Table 2 shows the estimated frequencies of ciliated fibroblasts based on the various methods that gave quite different values. The frequencies estimated by straight counting were

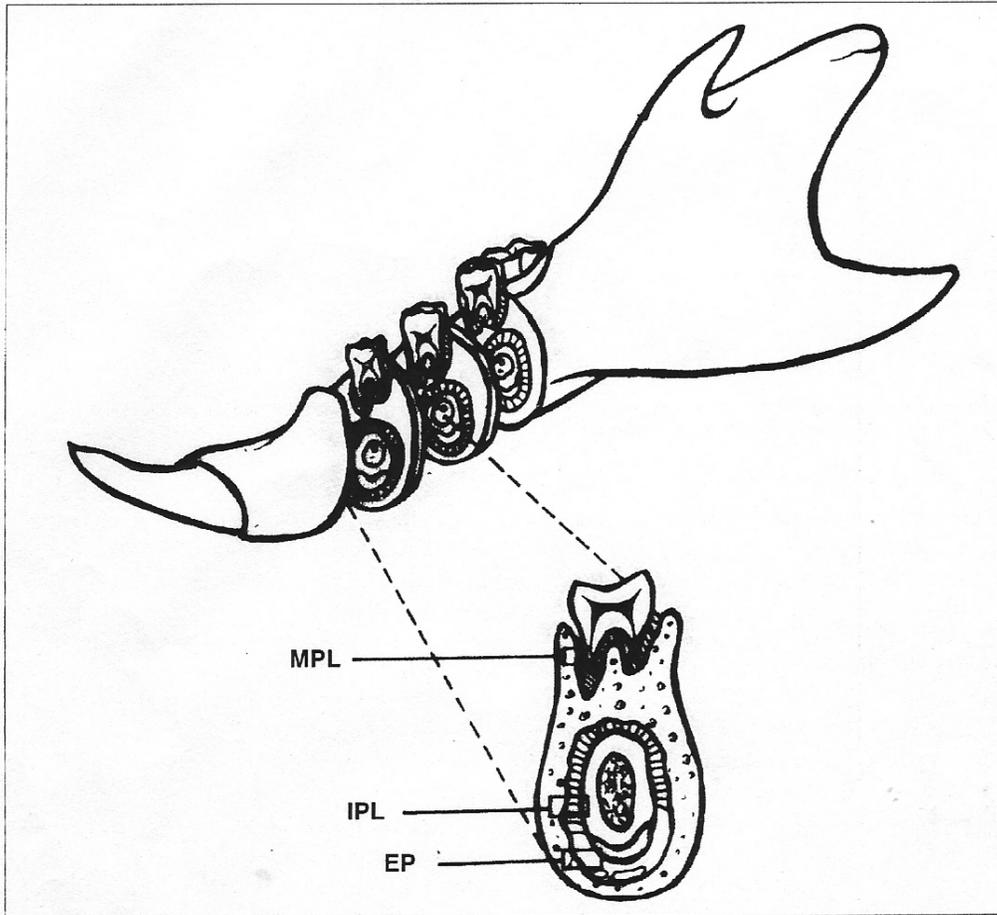
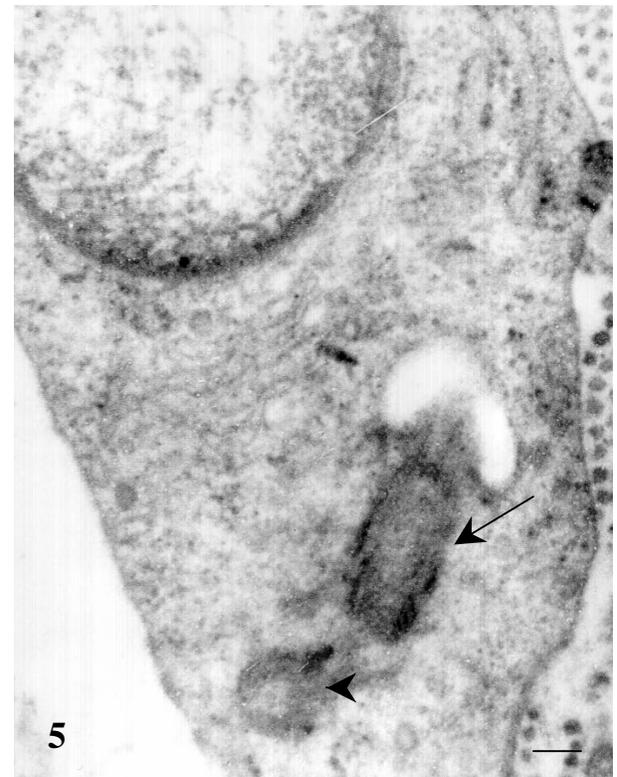
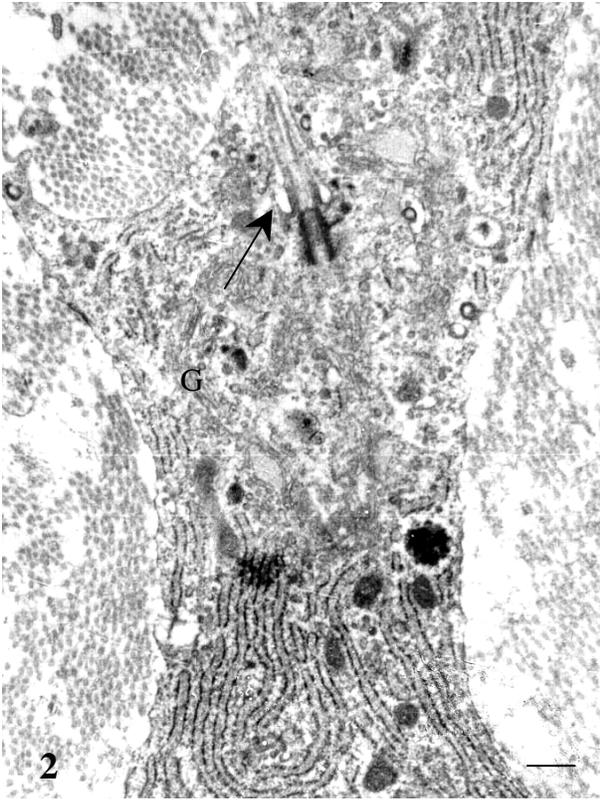


FIGURE 1 Schematic drawing of the mouse hemimandible showing a frontal slice at the level of the 1st molar and the regions from which samples of periodontal tissues were taken. MPL: molar periodontal ligament; IPL: incisor periodontal ligament; EP: incisor enamel-related periodontium.

the lowest (column J) whereas those based on the expectancy in detecting centriolar structures (columns L, M, N and O) were the highest ones. For the Dingemans (1969) method, the mean diameter of the nuclei and basal bodies had to be determined. Basal bodies and centrioles have the same dimensions (Beertsen *et al.*, 1975) and their length and width were measured using the 56 organelles cut longitudinally (column G, Table 1) to obtain a mean diameter of 0.294  $\mu\text{m}$ . This value was very close to the one reported by Beertsen *et al.* (1975) and a little higher than the values of 0.225  $\mu\text{m}$  to 0.265  $\mu\text{m}$  provided by Dingemans (1969). While there was no detectable variation in the size of the basal bodies and centrioles among the different tissues, the mean diameter of the nuclei varied considerably, probably because of the orientation of the cells in the plane of section: skin -5.71  $\mu\text{m}$ , gingiva -5.61  $\mu\text{m}$ , enamel related periodontium -4.06  $\mu\text{m}$ , incisor periodontal ligament -4.33  $\mu\text{m}$  and molar periodontal ligament: -6.57  $\mu\text{m}$ . The mean diameter of all 250 nuclei measured

was 5.22  $\mu\text{m}$ . Assuming that the sections had a mean thickness of 0.075  $\mu\text{m}$ , on average a basal body would be enclosed in 3.9 sections and a nucleus in 69.7 sections. The probability of observing a nucleus and a basal body in the same cell was thus 3.9/69.7 or 0.0562. If each nucleus were accompanied by a basal body, the number of nuclei counted (column B, Table 1) multiplied by 0.0562 would be the estimate of the number of basal bodies expected. The ratio between the number of basal bodies actually observed (column D, Table 1) and the number of basal bodies expected (Table 2, values in parentheses 1 in column K) gives the estimated frequency.

When the estimates were based on finding pairs (column L) or on longitudinally sectioned centriolar structures (columns N and O) there were some considerable differences between the values when the data for each rat were considered ( $n = 600$  fibroblasts/tissue) or after pooling ( $n = 4,200$  fibroblasts/tissue). Most methods could not be applied when no basal body was identified as in skin.



BARBOSA S.C.P.,MERZEL J. and NOVAES P.D.

TABLE 1  
Number of cell structures in mouse connective tissues fibroblasts (n=4,200)

Tissue	A Cilia	B Nuclei	C Centriolar complexes	D Basal bodies	E Pairs of basal bodies - centrioles	F Pairs of centrioles	G Basal bodies and centrioles in longitudinal section	H Basal bodies with ciliary shaft	I Basal bodies without ciliary shaft
Skin	7 [0-4]	1112	15 [1-3]	0	0	2 [0-1]	2 [0-1]	0	0
Gingiva	13 [0-4]	1813	53 [2-16]	5 [0-3]	1 [0-1]	7 [0-3]	7 [0-3]	1 [0-1]	4 [0-2]
Enamel related periodontium	41 [4-10]	2239	120 [9-31]	14 [1-3]	4 [0-1]	9 [0-4]	16 [0-6]	6 [0-2]	8 [0-3]
Incisor periodontal ligament	70 [6-15]	1762	101 [8-22]	12 [0-2]	2 [0-1]	3 [0-1]	8 [0-2]	4 [0-1]	8 [0-2]
Molar periodontal ligament	31 [0-7]	1816	108 [3-25]	26 [0-6]	8 [0-3]	11 [0-4]	23 [0-7]	11 [0-4]	15 [0-4]

In brackets the minimum and maximum number of structures counted per animal (n=600).

TABLE 2  
Frequency (%) of ciliated fibroblasts in mouse connective tissues

Tissue	J A/4,200.100	K D/(1).100	(1)	L E/F.100	M A/C.100	N H/G.100	O H+I/G.100
Skin	0.2 ± 0.2a	0 a	(62.5)	0 a	46.7 [47.6 ± 50.4]ab	0 a	0 a
Gingiva	0.3 ± 0.2a	4.9 [0.8 ± 1.4]ab	(101.9)	14.3 [4.8 ± 12.6]a	24.5 [23.2 ± 14.2]a	14.3 [4.8 ± 12.6]a	71.4 [42.9 ± 53.5]a
Enamel related periodontium	1.0 ± 0.3ab	11.1 [1.6 ± 0.6]ab	(125.8)	44.4 [57.1 ± 53.4]a	34.2 [36.2 ± 10.8]ab	37.5 [35.7 ± 39]a	87.5 [85.7 ± 74.8]a
Incisor periodontal ligament	1.7 ± 0.7b	12.1 [1.7 ± 0.8]ab	(99.0)	66.7 [28.6 ± 48.8]a	69.3 [69.8 ± 8.1]b	50.0 [42.8 ± 45]a	150.0 [85.7 ± 69]a
Molar periodontal ligament	0.7 ± 0.5ab	25.4 [3.6 ± 2.4]b	(102.1)	72.7 [78.6 ± 121.9]a	28.7 [25.3 ± 15.8]ab	47.8 [45.8 ± 30]a	113.0 [96.5 ± 47.3]a

Letters A to I: columns in Table 1. J: straight counting; K: according to Dingemans (1969); in parentheses (1) the expected number of cilia (see text). L: according to Beertsen *et al.* (1975). M: according to Archer and Wheatley (1971) and Wheatley (1972). N and O: according to Wheatley (1971). In brackets the mean ± SD per animal (n=600); in column J the means are the same in both situations. Different lower case letters in each column indicate statistically significant difference (p < 0.05).

FIGURE 2 Fibroblast showing a primary cilium connected to a basal body arising from a deep invagination of the cell membrane (arrow). G: Golgi apparatus. Incisor periodontal ligament. Bar=0.2 µm.

FIGURE 3 Fibroblast showing a diplosome formed by a centriole (arrowhead) and a basal body connected to a primary cilium emerging at the cell surface (arrow). Incisor periodontal ligament. Bar=0.1 µm.

FIGURE 4 A cross-sectioned ciliary shaft showing the 9 + 0 arrangement of the doublets at the periphery and the absence of dynein arms and the central pair of microtubules. Incisor periodontal ligament fibroblast. Bar=0.1 µm.

FIGURE 5 Diplosome of a gingival fibroblast with a centriole (arrowhead) and a basal body (arrow) protruding into an invagination of the plasma membrane. Bar=0.1 µm.

## DISCUSSION

The frequency of ciliated fibroblasts found by straight counting in all tissues was much lower than 3.7 to 10.2% for endometrial fibroblasts reported by Goranova and Chaldakov (1990). Dingemans (1969) estimated that 70% of adenohipophysal cells bore a cilium. The mean diameter of spherical nuclei was probably a more accurate measure of their size than in the case of irregular fusiform nuclei of fibroblasts. The frequency of 66.7% for ciliated fibroblasts in the mouse incisor periodontal ligament (column L, Table 2) was very close to that found by Beertsen *et al.* (1975) in the same tissue by pooling the data of all animals, but the percentage was quite lower when calculated for each animal. The high frequencies of ciliation in several lines of fibroblasts *in vitro* (Archer and Wheatley, 1971; Wheatley, 1971, 1972) were confirmed by straight counting of cilia following immunofluorescence using an antibody against detyrosinated  $\alpha$ -tubulin (ID-5) (Wheatley *et al.*, 1994). In the tissues we studied the methods based on the probability of finding a basal body and/or a cilium in relation to other centriolar structures also yielded high estimated frequencies of ciliated fibroblasts. The frequency of primary cilia in skin fibroblasts could only be estimated by two of the methods, with quite different results. However, in primary cultures of human skin fibroblasts 90 to 95% of the cells bear a cilium and, according to Strugnell *et al.* (1996), it is highly improbable that non-ciliated fibroblasts occur *in vivo*.

Most methods indicated that periodontal ligament fibroblasts had a greater ciliation index than gingival and skin fibroblasts. If confirmed, this variation may be related to functional differences among the tissues. The half-life of mature collagen is 15 days in derma, 5 days in gingiva and 1 day in molar periodontal ligament of the rat; for newly synthesised collagen, the half-lives are 360, 80 and 40 min, respectively (Sodek, 1977). The rate of incorporation of [ $^3$ H]-proline into mature collagen is three times faster in molar periodontal ligament than in incisor, but there is not such difference when non-collagenous proteins are considered (Sodek, 1978). Accordingly, the structural relationship between primary cilia and Golgi apparatus (Poole *et al.*, 1997, 2001) seems to be in agreement with the relationship between these organelles and cell secretion. Ciliation in endometrial fibroblasts, but not in smooth muscle cells, varies according to the phases of the estral cycle (Goranova and Chaldakov, 1990). In the same fibroblasts, Maraspin and Boccabella (1971) showed that ciliation was dose-dependently inhibited by estradiol, while progesterone had no effect.

The renewal rates of fibroblasts in the tissues used vary, being fastest in the incisor periodontal ligament (from 0.87 to 1.9 days in the mouse tooth-related compartment and up to 136.2 days in alveolar bone-related compartment; Zajicek, 1974), slower in gingiva (64 to 241 days in the rat, calculated

from the data by Pender *et al.*, 1988) and slowest in skin (90 to 240 days in the rat abdominal derma; Ruchti *et al.*, 1983). Although a decrease in ciliation has been related to an increase in mitotic activity (*e.g.*, Dingemans, 1969, for TSH cells in the adenohipophysis) this apparently does not occur *in vitro* where the ciliation index was related to an increase in the degree of fibroblasts confluence (Wheatley, 1971; Archer and Wheatley, 1971).

A major factor that could contribute to variation in the estimated frequency of cilia may be the orientation of the cells in tissue sections. Longitudinally sectioned basal bodies are more frequent in sagittal than in frontal (cross) sections of the tooth-related compartment of rodent incisor periodontal ligament where the fibroblasts are mostly bipolar and their major axis is parallel to the tooth surface. No such difference is seen in the alveolar bone-related compartment where most of the cells are multipolar and do not have a definite orientation in relation to the tooth (Beertsen *et al.*, 1975). We observed the highest frequency of longitudinally cut basal bodies in frontal sections of the molar periodontal ligament where the fibroblasts were more often sectioned through their major axis, indicating that the cilia are mostly parallel to this axis. Preferential orientation of primary cilia is also seen in other cells, such as renal proximal tubule epithelial cells (Roth *et al.*, 1988) and corneal endothelial cells (Doughty, 1998). In cultures of 3T3 fibroblasts the cilia are directed towards the substrate and confluent cultures show twice as many cilia under the nucleus compared to sparse cultures (Wheatley *et al.*, 1994). In skin and gingiva, the fibroblasts show no preferential orientation. Thus, it seems unwise to compare the incidence of ciliated fibroblasts between different tissues using random sectioning. To compare the effect of different functional or experimental conditions in a given tissue, any of the methods for estimating the frequency of primary cilia could be used, provided that a convenient plane of sectioning is chosen. For tissues like skin and gingiva probably two or three axis of orientation would be necessary.

Immunostaining for the quantitative evaluation of primary cilia is currently limited to whole preparations of cell cultures providing good estimates based on simple counting of the structures (Wheatley *et al.*, 1994). This method has been applied to frozen sections of some tissues (*e.g.*, retina, renal proximal tubule epithelium, cartilage) combined with either epifluorescence or confocal microscopy, but no quantitative data has been presented (Wheatley, 1995; Poole *et al.*, 1997). Recently, Poole *et al.* (2001) were able to identify a primary cilium per chondrocyte in chick embryo. Cilia have been quantified in corneal endothelium using scanning electron microscopy (Doughty, 1998), but this method can only be applied to suitable cell populations.

For most tissues, transmission electron microscopy is still the method of choice for quantifying primary cilia. Although requiring long preparation steps, the time needed to exam-

ine the cells and to record the centriolar structures can be minimised by using single slot grids and choosing suitable orientations for sectioning. Cell cultures have the advantage of providing a better control of many factors (Wheatley *et al.*, 1996), but their results cannot be extrapolated directly to *in vivo* conditions where the cells are in an environment of a functioning tissue. In that case, the fibroblasts of the rodent incisor periodontal ligament provide a valuable model. The tooth-related compartment of this tissue is confined to a small area, and most of the cells are well oriented fibroblasts. This tissue responds promptly to several experimental stimuli such as mechanical stress (occlusive and eruptive forces) and metabolic alterations induced by hormones (T3, T4, hydrocortisone), vitamin C and various drugs.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mrs. Eliene A.O.N. Romani for technical assistance and Dr. Glauca M.B. Ambrosano for statistical advice.

#### REFERENCES

- ARCHER E.L. and WHEATLEY D.N., 1971. Cilia in cell-cultured fibroblasts. II. Incidence in mitotic and post-mitotic BHK 21/C13 fibroblasts. *J. Anat.*, **109**, 277-292.
- BEERTSEN W., EVERTS V. and HOUTKOOPE J.M., 1975. Frequency of occurrence and position of cilia in fibroblasts of the periodontal ligament of the mouse incisor. *Cell Tissue Res.*, **163**, 415-431.
- BOWSER S.S. and LEONARD M.L., 1992. Properties of primary (9+0) cilia in cultured kidney epithelial cells. *Anat. Rec.*, **232**, 14A.
- DINGEMANS K.P., 1969. The relation between cilia and mitoses in the mouse adenohypophysis. *J. Cell Biol.*, **43**, 361-367.
- DOUGHTY M.S., 1998. Changes in cell surface primary cilia and microvilli concurrent with measurements of fluid flow across the rabbit corneal endothelium *ex vivo*. *Tissue Cell*, **30**, 634-643.
- GORANOVA V. and CHALDAKOV G.N., 1990. Ciliated fibroblasts and smooth muscle cells in the rat uterus. *Experientia*, **46**, 488-489.
- JONES B. and KENWARD C., 1989. Design and analysis of cross over trials. Chapman & Hall, London, pp. 340.
- KUBOTA K., 1977. Comparative study of the single cilium of dental pulp cells. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.*, **11**, 11-15.
- MARASPIN L.E. and BOCCABELLA A.V., 1971. Solitary cilia in endometrial fibroblasts. *J. Reprod. Fertil.*, **25**, 343-347.
- PENDER N., HEANEY T.G., PYCOCK D. and WEST C.R., 1988. Progenitor connective tissue cell populations in the gingival papilla of the rat. *J. Periodont. Res.*, **23**, 175-181.
- POOLE C.A., FLINT M.H. and BEAUMONT B.W., 1985. Analysis of the morphology and function of primary cilia in connective tissues: a cellular cybernetic probe? *Cell Motil. Cytoskeleton*, **5**, 1975-1993.
- POOLE C.A., JENSEN C.G., SNYDER J.A., GRAY C.G., HERMANUTZ V.L. and WHEATLEY D.N., 1997. Confocal analysis of primary cilia structure and colocalization with Golgi apparatus in chondrocyte and aortic smooth muscle cells. *Cell Biol. Int.*, **21**, 483-494.
- POOLE C.A., ZHANG Z.J. and ROSS J.M., 2001. The differential distribution of acetylated and detyrosinated alpha-tubulin in the microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. *J. Anat.*, **199**, 393-405.
- ROTH K.E., RIEDER C.L. and BOWSER S.S., 1988. Flexible-substratum technique for viewing cells from the side: some *in vivo* properties of primary (9+0) cilia in cultured kidney epithelia. *J. Cell Sci.*, **89**, 457-466.
- RUCHTI C., HALLER D., NUBER M. and COTTIER H., 1983. Regional differences in renewal rates of fibroblasts in young adult female mice. *Cell Tissue Res.*, **232**, 625-636.
- SCHERFT J.P. and DAEMS W.T., 1967. Single cilia in chondrocytes. *J. Ultrastruct. Res.*, **19**, 546-555.
- SCHWARTZ E.A., LEONARD M.L., BIZIOS R. and BOWSER S.S., 1997. Analysis and modelling of the cilium response to fluid shear. *Am. J. Physiol.*, **272**, 132-138.
- SODEK J., 1977. A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Arch. Oral Biol.*, **22**, 655-665.
- SODEK J., 1978. A comparison of collagen and non-collagenous protein metabolism in rat molar and incisor periodontal ligaments. *Arch Oral Biol.*, **23**, 977-982.
- SOROKIN S., 1962. Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cell. *J. Cell Biol.*, **15**, 363-377.
- STRUGNELL G.E., WANG A.M. and WHEATLEY D.N., 1996. Primary cilium expression in cells from normal and aberrant skin. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **28**, 215-225.
- STUBBLEFIELD E. and BRINKLEY B.R., 1966. Cilia formation in Chinese hamster fibroblasts *in vitro* as a response to Colcemid treatment. *J. Cell Biol.*, **30**, 645-652.
- WHEATLEY D.N., 1969. Cilia in cell-cultured fibroblasts. I. On their occurrence and relative frequencies in primary cultures and established cell lines. *J. Anat.*, **105**, 351-362.
- WHEATLEY D.N., 1971. Cilia in cell-cultured fibroblasts. III. Relationship between mitotic activity and cilium frequency in mouse 3T6 fibroblasts. *J. Anat.*, **110**, 367-382.
- WHEATLEY D.N., 1972. Cilia in cell-cultured fibroblasts. IV. Variation within the mouse 3T6 fibroblastic cell line. *J. Anat.*, **113**, 83-93.
- WHEATLEY D.N., 1995. Primary cilia in normal and pathological tissues. *Pathobiology*, **63**, 222-238.
- WHEATLEY D.N., FEILEN E.M., YIN Z. and WHEATLEY S.P., 1994. Primary cilia in cultured mammalian cells: detection with an antibody against detyrosinated  $\alpha$ -tubulin (ID5) and by electron microscopy. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **26**, 91-102.
- WHEATLEY D.N., WANG A.M. and STRUGNELL C.E., 1996. Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol. Int.*, **20**, 73-81.
- WOLFRUM U. and SCHMITT A., 2000. Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Mot. Cytoskel.*, **46**, 95-107.
- ZAJICEK G., 1974. Fibroblast cell kinetics in the periodontal ligament of the mouse. *Cell Tissue Kinet.*, **7**, 479-492.
- ZEYTIINOGLU M., RITTER J., WHEATLEY D.N. and WARN R.N., 1996. Presence of multiple centrioles and primary cilia during growth and early differentiation in the myoblast CO25 cell line. *Cell Biol. Int.*, **20**, 799-807.
- ZIMMERMANN K.W., 1898. Beiträge zur Kenntnis einiger Drüsen und Epithelien. *Arch. Mikrosk. Anat.*, **52**, 552-706. In: Wilson R.B. and McWhorter C.A., 1963. Isolated flagella in human skin. Electron microscopic observations. *Lab. Invest.*, **12**, 242-249.

## ANEXO 2



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **544-2**, sobre "**FREQUÊNCIA DE FIBROBLASTOS CILIADOS EM LIGAMENTO PERIODONTAL DE RATOS EM CONDIÇÕES DE ERUPÇÃO HIPER, HIPO E NORMOFUNCIONAL**" sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes/Simone de Cássia Portela Barbosa** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 1º. de Agosto de 2003.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **544-2**, entitled "**FREQUENCY OF CILIATED FIBROBLASTS IN RAT LOWER INCISOR PERIODONTAL LIGAMENT (PDL) UNDER NORMO, HIPER AND HYPOFUNCTIONAL CONDITIONS**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on August 1th, 2003.

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Campinas, 1º. de Agosto de 2003.

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP