

MESSIAS FRANCA DE MACEDO

Cirurgião-Dentista

**ESTUDO DESCRITIVO DO DESENVOLVIMENTO DO
LIGAMENTO PERIODONTAL EM RATOS**

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

Piracicaba

2001

UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

MESSIAS FRANCA DE MACEDO

Cirurgião-Dentista

**ESTUDO DESCRITIVO DO DESENVOLVIMENTO DO
LIGAMENTO PERIODONTAL EM RATOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Silvana P. Barros

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Adrienne Cristine Palanch

Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior

Profa. Dra. Silvana Pereira Barros

Suplente: Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello

Piracicaba

2001

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

CPG, 12/04/02



Assinatura do Orientador

NIDADE Be
º CHAMADA UNICAMP
M151e
EX
OMBO BCI 50273
ROC 16-837/02
Dx
REÇO R\$ 11,00
DATA 13/08/02
º CPD

CM00172164--B

181D 250714

Ficha Catalográfica

M151e Macedo, Messias Franca de.
Estudo descritivo do desenvolvimento do ligamento periodontal em ratos. / Messias Franca de Macedo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
viii, 64f. : il.

Orientadora : Prof^ª Dr^ª Silvana Pereira Barros.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Incisivos (Dentes). 2. Periodontia. I. Barros, Silvana Pereira. 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 MESTRADO, em sessão pública realizada em 13 de Dezembro de 2001, considerou o candidato MESSIAS FRANCA DE MACÊDO aprovado.

1. Profa. Dra. SILVANA PEREIRA BARROS

2. Profa. Dra. ADRIANNE CHRISTINE PALANCH

3. Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JR

Dedico este trabalho à minha esposa
Maria da Assunção, aos meus filhos
Alexandre, Laíla e Beatriz, e aos meus
pais Valdemir e Maria de Lourdes.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Silvana Pereira Barros, minha orientadora, pelos ensinamentos, ajuda e tolerância, fatores importantes - e decisivos - para a consecução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Line, exemplo de dedicação e compromisso, sempre receptivo às discussões.

Ao Prof. Dr. José Merzel, exemplo de sapiência, pelos valorosos ensinamentos.

À Profa. Dra. Darcy Tosello, pela amizade e confiança manifestadas, e pelos relevantes ensinamentos prestados.

Ao Prof. Pedro Novaes Duarte, exemplo de dedicação ao trabalho científico.

À Dra. Mônica Machado Duarte, paradigma de acolhida e ajuda, desde o primeiro momento.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Fortinguerra – *in memoriam* -, cidadão egrégio, que fez da docência a própria representação da sua gloriosa vida.

À Sra. Maria Aparecida Santiago Varela, e Sra. Ivani Odas Demetrio, pela amizade impulsionadora e ajuda inestimável na realização dos trabalhos em laboratório.

A todos os colegas discentes cujo convívio são marcas de um tempo.

A todos os funcionários técnico-administrativos, em particular aos da biblioteca.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, gloriosa Instituição de Ensino e Pesquisa, pela oportunidade de desfrutar de sua estrutura, construída ao longo de árduos anos de labor.

Em especial, a Deus: “...Todas essas pequenas coisas conspiram no invisível para formar o real, convergem ao âmago de nós mesmos até fazer nascer ali uma necessidade irreprimível: o desejo de realidade...”

“Só no reconhecimento franco de nossos limites e ‘idiotismos’ é que se abriga a possível auto-superação”

Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Abstract.....	2
1. Introdução	3
2. Revisão da Literatura.....	14
3. Material e Métodos.....	25
4. Resultados.....	27
5. Discussão.....	44
6. Conclusões.....	50
7. Referências Bibliográficas.....	51
Anexo.....	64

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o desenvolvimento do ligamento periodontal em dentes incisivos de ratos. Incisivos inferiores de ratos foram estudados sob microscopia de luz - corados pelo tricrômico de Mallory - , e pelo método Picrosirius-polarização. Os resultados obtidos demonstraram a presença de dois tipos de fibras colágenas: fibras delgadas, fracamente birrefringentes, reveladas por um matiz esverdeado (colágeno tipo III), e fibras espessas, fortemente birrefringentes, que se coram em amarelo e vermelho (colágeno tipo I), ambas presentes no ligamento periodontal maduro – as fibras de colágeno tipo III interpostas entre as fibras de colágeno tipo I, estas últimas representando os principais componentes fibrilares do tecido. As observações mostraram que a matriz extracelular do ligamento periodontal é composta de um plexo frouxo de fibras colágenas onduladas e que as fibras de Sharpey mostram um intenso modelo de birrefringência devido a sua organização e orientação, fascículos paralelos, que podem ser reconhecidos em ratos a partir do 21º dia de vida pós-natal, período no qual é estabelecida a oclusão funcional.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the development of periodontal ligament in rat incisors teeth. Rat lower incisors were studied by Picrosirius-polarization method. The results obtained showed the presence of mainly two types of collagen fibers, thin, weakly birefringent, greenish fibers (collagen type III) and thick, yellow or red, strongly birefringent, fibers (collagen type I), both are present in the mature ligament periodontal, where collagen the type III is interspersed among type I fibers, the major fibril component of mature periodontal ligament. The observations showed that the extracellular matrix of periodontal ligament is composed of a loose plexus of wavy collagen fibers and the Sharpey's fibers show an intense birefringence pattern due to their organization and orientation in fibrils gather in thick, parallel fascicles, that can be recognized at normal rat 21 days of age, period which the functional occlusion is established.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do desenvolvimento do ligamento periodontal desde sua gênese (primórdios) aplicado aos dentes de crescimento limitado e aos de crescimento contínuo não é conclusivo, notadamente no que se refere a uma análise descritiva seqüencial e comparativa.

O ligamento periodontal é uma massa de tecido conjuntivo altamente vascular e celular situado entre o dente e o osso alveolar, que provê funções de suporte, de fixação e sensoriais. Células, elementos vasculares, e um compartimento extracelular de matriz protéica e glicosaminoglicanas estabelecem funções biofísicas que permitem aos dentes de erupção limitada de mamíferos ajustarem suas posições enquanto permanecem firmemente unidos. De fato, algumas das mais interessantes características do ligamento periodontal são sua adaptabilidade para rapidamente modificar níveis de forças aplicadas e sua notável capacidade de renovação e reparo (LEKIC & McCULLOCH, 1996).

Considerando-se que a principal função do ligamento periodontal é ancorar a raiz dental ao osso alveolar da mandíbula e dos maxilares e distribuir estresses mecânicos multidirecionais a exemplo das forças mastigatórias, talvez não seja surpreendente que o ligamento periodontal exiba

aspectos inerentes de um sistema de absorção de choques (TAKANO-YAMAMOTO et al. 1994). Alguns desses atributos funcionais são exercidos por massas de feixes de fibras colágenas, e pela substância fundamental de aspecto gelatinoso (LEKIC & McCULLOCH , 1996).

O ligamento periodontal é derivado da camada interna do folículo dental após o início do desenvolvimento radicular. Desenvolvimento e maturação do ligamento periodontal são dependentes da formação da dentina radicular e do seu tecido mineralizado de revestimento, o cemento (TEN CATE, 1994).

Em incisivos de ratos - dentes de crescimento contínuo - , observação de um ligamento periodontal foi possível no dia seguinte ao nascimento (ECCLES, 1964). ECCLES afirma ainda que, nesses animais, o ligamento periodontal maduro de incisivos e molares difere em vários aspectos. Segundo este autor, as raízes do molar têm um acessório de união em todas as superfícies, enquanto o incisivo apresenta-o na face lingual e em trechos das faces medial e lateral - na face labial, o incisivo associa-se ao tecido periodontal relacionado ao esmalte. Durante o desenvolvimento, fibras argirófilas e algumas colágenas situam-se entre as fibras que se estendem desde o cemento e aquelas que surgem desde o osso alveolar. No incisivo elas são numerosas e estão orientadas longitudinalmente, à guisa de camadas, porém nos molares elas são poucas e sem orientação definida, exceto próximo

aos ápices radiculares. Num estágio ligeiramente posterior, as fibras cementárias e alveolares encontram-se e misturam-se para formar um plexo – plexo intermediário – que tem sido nitidamente definido nos incisivos, mas pobremente descrito nos dentes molares. No entanto, concebendo estas diferenças no ligamento periodontal plenamente maduro, existe pouca diferença no processo de desenvolvimento. Nos órgãos dentários de molares e incisivos, feixes com fibras cementárias e alveolares são formados unidos ao dente e ao osso, respectivamente, e estes alongam por adição de novas fibras.

Em comum com outros tecidos conjuntivos, as fibras do ligamento periodontal são principalmente de natureza colagenosa, embora estejam estruturalmente associadas com outras moléculas da matriz extracelular, incluindo fibronectina e tenascina. O colágeno do ligamento periodontal é preferencialmente do tipo I. Colágeno do tipo XII e uma molécula (undulina), idêntica para a região não colagenosa do colágeno tipo XIV, foram localizados no ligamento periodontal de ratos e de humanos (DUBLET et al., 1988 e ZHANG et al., 1993). O ligamento periodontal contém significativa proporção de fibrilas de colágeno do tipo III. Esta quantidade de colágeno do tipo III é incomumente alta para um tecido conjuntivo maduro (aproximadamente 20% do colágeno total), e é mais característico de tecido conjuntivo fetal (BERKOVITZ & SHORE, 1982).

Estudos comparativos não demonstraram diferenças significativas entre o diâmetro das fibrilas colágenas em dentes incisivos de crescimento contínuo (alta taxa de renovação tecidual) e molares de crescimento limitado (baixa taxa de renovação tecidual) em ratos (BERKOVITZ, 1988). Em tese, tecidos com alta taxa de renovação apresentariam fibrilas de colágeno com menor diâmetro em função de um menor período de maturação (SLOAN, 1978). Em dentes de crescimento limitado, a maioria das fibrilas colágenas apresenta-se como feixes. Nas proximidades do cemento, os feixes de fibrilas têm cerca de 3-10 μ m de diâmetro enquanto que nas proximidades do osso alveolar apresentam em torno de 10-20 μ m de diâmetro. Os feixes remanescentes no ligamento periodontal têm por volta de 1-4 μ m de diâmetro. As ramificações e o curso ondulado dos feixes são freqüentes, existindo uma predominância de fibras circunflexas em torno dos feixes neurovasculares. Estudos em microscopia de luz e em microscopia eletrônica de varredura demonstraram que o ligamento periodontal de dentes maduros de crescimento limitado é organizado em três zonas distintas durante o desenvolvimento e erupção – cemental, alveolar e intermediária (ECCLES, 1964; GRANT & BERNICK, 1972; BEERTSEN et al.).

A aparente disposição dos feixes de fibras varia de acordo com o método de preparação histológica (SLOAN, 1978). Por exemplo, as fibras

colágenas do ligamento periodontal parecem estar orientadas como ‘plexo de fibras indiferentes’ quando examinadas ao microscópio eletrônico de varredura (SHACKLEFORD, 1973; SVEJDA & SKACH, 1973). Esse achado não pôde ser correlacionado com estudos em microscopia de luz e em microscopia eletrônica de transmissão, e agora é aceito que o ‘plexo de fibras indiferentes’ é um artefato produzido pelo método de preparação, mesmo porque, em secção transversal, as fibras das zonas intermediárias preferivelmente formam uma contínua malha ramificada de feixes. Foi também sugerido que as fibras da zona média (zona intermediária) se entrelaçavam para formar o “plexo intermediário”, e que esse arranjo facilitaria a remodelação do ligamento periodontal durante a erupção. A complexa relação entre as malhas de feixes pode ser investigada usando microscópio de luz polarizada. Em secções transversais, a birrefringência do colágeno sugere que existe uma predominância de fibras radiadas que curvam em torno de feixes neurovasculares (SLOAN, 1978). Em secções longitudinais, malha sobreposta de feixes anastomosados são evidentes nos grupos de fibras horizontais, oblíquas e apicais. Essas fibras estão orientadas em relação ao longo eixo do dente, revelando birrefringência e um padrão altamente organizado.

Trabalhos de COHN (1970, 1972) demonstraram que na região interdental da mandíbula de ratos, fibras do grupo da crista alveolar dirigem-se apicalmente desde a junção cimento-esmalte do primeiro molar e passam sem interrupção na forma de uma letra V através da porção coronal da crista alveolar tornando-se contínuas com fibras similarmente orientadas do segundo molar. Nos aspectos mesial, bucal e lingual do primeiro molar, este grupo passa apicalmente desde o cimento atravessando a crista alveolar e parecendo misturar-se com o periósteo ou fibras do tecido conjuntivo da gengiva subjacente. O grupo de fibras oblíquas passa coronalmente desde o cimento do primeiro molar para atingir e penetrar o septo interdental. Neste local, essas fibras arqueiam-se, girando obliquamente para o ápice, tornando-se contínuas com fibras oblíquas orientadas de modo análogo, que estão unidas para o cimento em torno do mesmo nível do segundo molar. Na região inter-radicular, as fibras formam uma série de arcos exatamente como aqueles observados no septo interdental, porém as fibras continuam apicalmente empreendendo um curso sinuoso através do osso para unir-se em suas extremidades até o cimento de raízes adjacentes.

Próximo ao momento de ser atingida a oclusão funcional, todavia, as fibras colágenas são organizadas em feixes contínuos inseridos no cimento e no osso alveolar como fibras de Sharpey. QUIGLEY (1970) assinala que

Sharpey, em 1856, descreveu feixes de fibras de tecido conjuntivo “penetrando” as lamelas circunferenciais da superfície óssea, e que Kolliker, em 1867, parece ter sido o primeiro pesquisador a utilizar o termo fibras de Sharpey. Para QUIGLEY (1970), uma expressão mais apropriada seria “fibras perfurantes”. Este autor descreve similares fibras perfurantes do ligamento periodontal em ambos cemento acelular e celular. Relata ainda, que Stein & Weinmann, em 1925, demonstraram que as abundantes fibras de Sharpey encontradas no osso alveolar da mandíbula e dos maxilares são evidências histológicas de uma contínua migração mesial fisiológica dos dentes humanos. YAMAMOTO & WAKITA (1991) descrevem que o cemento aumenta em espessura e insere as fibras principais durante o desenvolvimento radicular, e as porções inseridas das fibras principais são referidas como fibras de Sharpey, apresentando-se orientadas grosseiramente perpendiculares à superfície cementária.

Existe geral concordância que as fibras do ligamento periodontal unem-se às superfícies em deposição por fibras de Sharpey, assim tornando-se componentes do cemento e do osso alveolar. Essas fibras são compostas de feixes de unidades de fibrilas colágenas – fibras de Sharpey estando parcialmente mineralizadas (JOHNSON, 1987). O referido autor descreve um tipo único de fibras de Sharpey, as fibras transalveolares, no interior do osso

alveolar de roedores. Essas fibras perpassam o septo interdental ininterruptamente, conectando o periodonto de dentes adjacentes, sendo supostamente importante durante o desenvolvimento da oclusão funcional.

Segundo COHN (1972), as fibras de Sharpey no cemento são mais numerosas e menores em comparado com aquelas do osso alveolar, e parecem inseridas na espessura total do tecido mineralizado.

As fibras principais do ligamento periodontal são feixes de fibras colágenas que se estendem do cemento ao osso alveolar, e desempenham papel importante na sustentação do dente. As fibras do ligamento periodontal consistem de muitos feixes de fibrilas, os quais estão parciais ou totalmente circundados por delgados processos citoplasmáticos dos fibroblastos. Fibroblastos com extensos processos citoplasmáticos estão também evidentes entre os feixes, e existe uma íntima associação entre as fibrilas individuais e as extensões citoplasmáticas dos fibroblastos, as quais podem facilitar a remodelação por degradação intracelular (YAMAMOTO et al., 1994).

Os fibroblastos são as células predominantes e desenvolvem papéis importantes no desenvolvimento, estrutura e função do aparelho de suporte do dente (TEN CATE, 1994). É estimado que os fibroblastos ocupam entre 46 a 55% do ligamento periodontal de roedores – excluindo vasculatura - (BEERTSEN et al., 1974; BERKOVITZ, 1988). Em ratos, esse amplo

percentual é produzido por entre 10.000 e 20.000 células por mm^2 - baseado em cálculo de perfis nucleares (McCULLOCH & MELCHER, 1983). Todavia, essa densidade celular pode ser alterada com a idade e função. Células mesenquimais indiferenciadas e células epiteliais podem também estar presentes, sendo que as últimas são encontradas em ligamento periodontal normal como pequenos aglomerados – os restos epiteliais de Malassez, que representam os remanescentes da bainha epitelial radicular de Hertwig. Ocasionalmente células de defesa são achadas no tecido saudável. A maioria dessas células são macrófagos, porém eosinófilos podem também estar presentes; mastócitos podem ser encontrados na vizinhança do tecido neurovascular. Em adição a essas células localizadas no ligamento periodontal, elementos citológicos que mantêm e remodelam os tecidos mineralizados nas bordas do ligamento periodontal são consideradas parte deste tecido – essas células são os cementoblastos, osteoblastos, odontoclastos, e osteoclastos (BERKOVITZ, 1988).

Os fibroblastos situam-se entre as fibras colágenas (ROSS, 1968). Em incisivos de roedores localizam-se nas áreas próximas ao dente, estando arranjados paralelos à superfície dental (BEERTSEN et al., 1974). Esta descrição é baseada no exame do ligamento periodontal seccionado exclusivamente no plano longitudinal.

Os fibroblastos produzem a matriz extracelular do ligamento periodontal, apresentando quantidade significativas de organelas envolvidas na síntese e degradação protéica. Os fibroblastos sintetizam e remodelam matrizes extracelulares incluindo fibras colágenas e elásticas, além de um amplo complemento de glicoproteínas não fibrilares. Sendo o fibroblasto o principal tipo celular do ligamento periodontal, desempenha um papel significativo na renovação tecidual normal, reparo e regeneração. Na remodelação dos tecidos conjuntivos, os fibroblastos são capazes de sintetizar e fagocitar colágenos e outros componentes da matriz extracelular, e também produzem citocinas com a capacidade para mediar destruição tecidual e estimular reabsorção óssea osteoclástica (GENCO, 1992). Essas células demonstram também contratibilidade e mobilidade, funções que contribuem para a organização estrutural do tecido, especialmente durante o desenvolvimento do ligamento periodontal (MOXHAM et al., 1991).

A presença de microfilamentos e microtúbulos nos fibroblastos do ligamento periodontal tem sido matéria de muita controvérsia sobre o possível envolvimento dessas organelas na tração fibroblástica. Microtúbulos também estão vinculados à mobilidade dos fibroblastos, apesar de evidências sugerirem que sua importância pode localizar-se na facilitação da exportação de proteínas (EHRlich & BORNSTEIN, 1972).

Uma outra característica dos fibroblastos do ligamento periodontal é a presença de numerosos contatos intercelulares, contatos normalmente não encontrados em número significativo entre fibroblastos de tecidos conjuntivos adultos. Tem sido sugerido que o não habitual alto número de contatos entre os fibroblastos do ligamento periodontal está relacionado com a geração da força eruptiva (ou por mobilidade ou contratibilidade). Em conformidade com essa hipótese, a coordenação dos processos seria realizada via junções *gap*, e a força seria transmitida via desmossomos simplificados (MOXHAM et al., 1991).

O objetivo deste estudo é analisar o desenvolvimento do ligamento periodontal em dentes de erupção contínua (incisivos de ratos) e em dentes de erupção limitada (molares de ratos), estabelecendo uma análise comparativa. Será dada ênfase ao desenvolvimento das fibras principais, incluindo as fibras de Sharpey. Este procedimento será utilizado com a finalidade de identificar e localizar sítios de formação de fibras colágenas, correlacionando sua distribuição com alterações no ligamento periodontal durante migração e erupção dentais.

Uma outra característica dos fibroblastos do ligamento periodontal é a presença de numerosos contatos intercelulares, contatos normalmente não encontrados em número significativo entre fibroblastos de tecidos conjuntivos adultos. Tem sido sugerido que o não habitual alto número de contatos entre os fibroblastos do ligamento periodontal está relacionado com a geração da força eruptiva (ou por mobilidade ou contratibilidade). Em conformidade com essa hipótese, a coordenação dos processos seria realizada via junções *gap*, e a força seria transmitida via desmossomos simplificados (MOXHAM et al., 1991).

O objetivo deste estudo é analisar o desenvolvimento do ligamento periodontal em dentes de erupção contínua (incisivos de ratos) e em dentes de erupção limitada (molares de ratos), estabelecendo uma análise comparativa. Será dada ênfase ao desenvolvimento das fibras principais, incluindo as fibras de Sharpey. Este procedimento será utilizado com a finalidade de identificar e localizar sítios de formação de fibras colágenas, correlacionando sua distribuição com alterações no ligamento periodontal durante migração e erupção dentais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Um dos primeiros autores a fornecer uma adequada descrição do ligamento periodontal foi FISCHER em 1909, que descreveu o folículo dental tornando-se mais fibroso e que duas membranas desenvolviam-se deste; a primeira, que ele denominou periodonto jovem, contém feixes de fibras distendidas e células fusiformes, distintas das células embrionárias do folículo, podendo ser acompanhadas ao longo da raiz até a extremidade em crescimento; a segunda, denominada periósteo jovem, situada ao longo das paredes da depressão óssea. Na descrição, essas duas membranas eventualmente associam-se a feixes paralelos de fibras estendendo-se desde a superfície da raiz para o osso. Deste modo uma firme, porém levemente união elástica é formada.

SICHER (1923) descreveu três zonas de fibras no ligamento periodontal de incisivos de porcos, as fibras alveolares unidas ao osso alveolar, as fibras cementárias ligadas ao dente e entre estas um plexo de fibras delgadas, o plexo intermediário.

ORBAN (1927) observou que, antes da erupção, o ligamento periodontal de dentes humanos de cães apresenta três camadas muito similares àquelas do dente de crescimento contínuo. ORBAN explicou que

esta aparência de três camadas não é um achado constante em dentes humanos e de cães, porquanto a erupção prossegue intermitentemente.

SCOTT (1953) declarou que após o início da desintegração da bainha epitelial radicular de Hertwig, as fibras mais internas do folículo dental entram em contato direto com a dentina da raiz em formação e por deposição de cimento tornam-se unidas à raiz. Simultaneamente, as camadas mais externas do folículo tornam-se unidas às bordas da depressão óssea em desenvolvimento.

ECCLES (1959) acreditava que em molar de ratos as células do folículo dental multiplicavam-se e tornavam-se orientadas obliquamente desde o dente ao osso. Feixes de fibras formam-se sobre a superfície da raiz e do osso alveolar. Estas fibras alongam-se por adição de novas fibras, finalmente encontrando e misturando-se em um plexo próximo ao centro do ligamento periodontal. Após o final do período de rápida erupção os feixes percorrem um trajeto do dente ao osso.

O mesmo ECCLES (1964), em trabalho clássico, descreve o desenvolvimento do ligamento periodontal em dentes incisivos de crescimento contínuo de ratos, comparando com o desenvolvimento deste tecido em molares de ratos, dentes de crescimento limitado. Também o ligamento periodontal de incisivos de roedores com estas três camadas bem definidas, fibras alveolares, plexo intermediário e fibras cementárias,

parece ser um útil objeto de estudo para o comportamento individual destas três camadas. Neste trabalho foram utilizados fetos de ratos e ratos com idades de 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 14 dias. ECCLES observou que em ratos com 20 dias de vida intra-uterina as fibras do ligamento periodontal não estavam unidas ao dente neste estágio, período esse que corresponde ao dia imediatamente anterior ao nascimento. Imediatamente após o nascimento, as principais mudanças estabelecidas foram: inicialmente, o início do colapso da bainha epitelial radicular de Hertwig e o aparecimento de algumas delgadas fibras inseridas na superfície radicular; posteriormente, a formação de mais e espessados feixes de fibras unidas ao osso alveolar próximo à crista. No terceiro dia de vida pós-natal, o ligamento periodontal apresentava feixes de fibras distribuídos desde o osso alveolar, dispostos em ângulos retos. Em ratos de quatro dias de vida, os feixes de fibras alveolares estavam dispostos regularmente e alinhados em ângulo reto para o osso. Mais feixes de fibras cementárias tinham sido formados e o plexo intermediário perfeitamente discernível. Após a erupção, por volta do oitavo ao décimo dia de vida, o dente continua a erupcionar e crescer por toda a vida, sendo desgastado continuamente na extremidade incisal, enquanto nova substância dental é constantemente formada na extremidade basal. O ligamento periodontal torna-se mais largo e os feixes de fibras mais espessos. ECCLES concluiu que os ligamentos periodontais

maturados de molares e incisivos de ratos diferem em vários aspectos. As raízes dos molares têm uma inserção em todos os lados, enquanto os incisivos têm somente por posterior e parcialmente nas superfícies lateral e medial. O ligamento periodontal associado ao incisivo apresenta definido plexo intermediário, ao passo que os molares não o têm. Essas diferenças podem ser razoavelmente explicadas pela maior taxa de erupção e crescimento dos incisivos em comparado aos molares.

QUIGLEY (1970) descreveu terminações de fibras do ligamento periodontal penetrando na estrutura óssea adjacente, as denominadas fibras de Sharpey, semelhantes àquelas relacionadas aos cimentos acelular e celular. O autor preconiza que o colágeno das fibras de Sharpey no osso deve ter sido formado antes ou no mínimo simultaneamente ao colágeno da matriz óssea circundante.

GRANT & BERNICK (1972), em estudos em macacos, fizeram observações sobre o desenvolvimento do ligamento periodontal de premolares. Em adição, constataram diferenças entre a formação das fibras principais do ligamento periodontal em dentes com e sem predecessores. Os autores concluíram que o desenvolvimento do ligamento periodontal parece consistir de elementos colagenosos estruturados frouxamente. As fibras foram vistas inicialmente emanando desde o cimento. A superfície óssea, embora margeada por osteoblastos, apresentava-se largamente

desprovida de extrusões fibrosas. Em seguida, as fibras de Sharpey tornam-se aparentes, emergindo do osso e estendendo-se brevemente para o dente, ramificando-se em suas terminações. A parte central do ligamento periodontal estava ocupada por elementos colagenosos arranjados frouxamente. As fibras cementárias eram curtas e espaçadas proximamente, dando a raiz uma aparência ciliada. Posteriormente, fibras ósseas estenderam-se para a raiz, obliterando a zona intermediária e associando-se às fibras cementárias, determinando uma aparente continuidade das fibras. Com a função oclusal, os feixes de fibras tornam-se mais espessos e classicamente organizados; foi intensificada a aparência de uma “contínua” fibra desde o osso ao cimento. Um “plexo intermediário” esteve aparente durante o desenvolvimento das fibras principais, porém não pode ser demonstrado após o estabelecimento da função oclusal plena. Ademais, foram constatadas diferenças na histogênese do ligamento periodontal de dentes com e sem predecessores primários. Um precoce desenvolvimento dos feixes de fibras principais parece tomar lugar em dentes sem predecessores. Além disso, essas fibras são mais longas e parecem estender-se do cimento ao osso. Essas diferenças podem ser explicadas por uma variação cronológica na seqüência da deposição do osso alveolar próprio. Em dentes sem predecessores primários, a deposição do osso alveolar próprio é completada ao longo da maior parte das paredes da loja

(depressão) óssea – com exceção das porções da crista em formação – antes do dente emergir na cavidade oral. Fibras do ligamento periodontal que se estendem do cimento ao osso tornam-se demonstráveis antes da erupção. Em contraste, os dentes sucedâneos estão completamente circundados por uma cripta óssea e erupcionam desde uma posição posterior em relação aos dentes decíduos. Durante a erupção, reabsorção das paredes ósseas (laterais e teto), assim como das raízes do dente decíduo adjacente, deve tomar lugar para permitir a passagem da coroa dental. Conseqüentemente, a formação das fibras do ligamento periodontal deve esperar a subsequente deposição de osso alveolar próprio, que é depositado sobre a crista óssea residual

COHN (1970) relatou pela primeira vez a possibilidade das fibras cimento-alveolares do ligamento periodontal atravessarem ininterruptamente através da espessura total do alvéolo circundante, ratificando o trabalho de QUIGLEY (1970), no qual utilizando digestão enzimática demonstrou que as fibras cimento-alveolares perfuravam o septo interdental.

O mesmo COHN (1972) estudando o desenvolvimento das fibras do ligamento periodontal de ratos constatou que no cimento as fibras eram mais numerosas e menores em diâmetro que aquelas relacionadas ao osso alveolar e pareciam estar inseridas através da espessura total deste tecido

mineralizado, o que corrobora com os achados de ECCLES (1964). Na região interdental, as fibras do grupo da crista alveolar descreviam uma trajetória no sentido apical desde a junção cimento esmalte do primeiro molar, passando sem interrupção através da porção coronal da crista alveolar para tornarem-se contínuas com fibras orientadas de modo similar advindas do segundo molar. Nos aspectos mesial, bucal e lingual do primeiro molar, este grupo de fibras atravessou apicalmente desde o cimento até a crista óssea alveolar, e pareceu misturar-se com o periósteo ou fibras do tecido conjuntivo da gengiva adjacente. O pequeno grupo de fibras horizontais do primeiro molar apresentava-se contínuo através do septo ósseo com fibras orientadas de modo análogo oriundas do dente adjacente. Nos aspectos bucal, lingual e mesial, as fibras deste grupo percorrem horizontalmente a espessura total da crista alveolar, parecendo misturar-se com fibras colagenosas do periósteo ou gengiva adjacente. O grupo de fibras oblíquas da região interdental não terminou em profundidades variadas à maneira de fibras de Sharpey, sob a superfície alveolar. Ao invés, essas fibras passam coronalmente desde o cimento do primeiro molar até atingir e penetrar o septo ósseo.

SODEK (1978), investigando a influência da erupção dental sobre o metabolismo protéico no ligamento periodontal, concluiu que este tecido

apresenta a mais rápida taxa de *turnover* do colágeno em tecidos conjuntivos adultos.

GARANT & CHO (1979a) observaram que os fibroblastos do ligamento periodontal e especialmente aqueles do ligamento transeptal são caracteristicamente alongados com seu longo eixo paralelo aos feixes de fibras principais. Os resultados das análises da orientação e polarização dos fibroblastos no ligamento periodontal suportam o conceito de que essas células sofrem ativa migração *in vivo*.

A partir de evidências auto-radiográficas, GARANT & CHO (1979b) constataram a manutenção de uma contínua inserção do ligamento periodontal durante o movimento dental ou inclinação. Em concordância com os trabalhos de KRAW & ENLOW (1967), os autores asseveraram, em relação às fibras de Sharpey, que o aprisionamento das fibras colágenas mais velhas (antigas) pela recém depositada matriz óssea mineralizada assegura essa contínua união. O colágeno das fibras de Sharpey foi sendo secretado simultaneamente com a deposição de um novo osso. Ademais, foi verificado que as fibras de Sharpey estendem-se além da última banda aposicional óssea, donde infere-se que a deposição de fibras colágenas prossegue em uma taxa mais rápida do que a formação óssea; ou mais provavelmente, que as células responsáveis pela secreção do colágeno das fibras de Sharpey migram distanciando-se da superfície óssea. Os

resultados desse trabalho sugerem que em adição à inserção de fibras antigas na matriz óssea, ocorre uma ativa elaboração de novas fibras colágenas por fibroblastos polarizados. Em consonância com os conceitos de contínua regeneração da inserção periodontal, estabelecidos por GARANT & CHO, os estudos de BARON (1973) constataram a reabsorção de fibras de Sharpey em sítios de atividade osteoclástica e formação de novas fibras colágenas em locais de reparo ósseo em antigas lacunas de Howship.

WANG et al. (1980) observaram que as fibras de Sharpey contêm núcleos não mineralizados, sendo que o colágeno do tipo III concentrado nestes locais impediriam a mineralização. Segundo SHACKLEFORD (1973), esses núcleos fornecem flexibilidade para as fibras de Sharpey, possivelmente absorvendo ou dissipando forças produzidas durante a oclusão.

Em estudo radioautográfico utilizando manose tritiada, CHO & GARANT (1989) constataram que os fibroblastos no recém formado ligamento periodontal apareceram plenamente diferenciados com o perfil alongado paralelo as fibras colágenas anteriormente depositada. Células do ligamento periodontal adjacentes à superfície óssea estavam freqüentemente orientadas para a superfície do osso e foram também marcadas com manose. Migração de células secretoras de colágeno em

direção às superfícies óssea alveolar e cementária conduzem a formação das fibras de Sharpey. Deposição continuada de moléculas de colágeno quando os cementoblastos atingem a superfície dentinária aumenta a espessura dessas fibras próximas aos pontos de inserção.

Em investigações realizadas em furões, BERKOVITZ & MOXHAM (1990) observaram que, nos dentes sem predecessores – e imediatamente antes da erupção -, as fibras do ligamento periodontal mostram uniões para o dente e o osso, concordando com os achados de GRANT & BERNICK (1972). Esse estudo revelou ainda que as principais alterações histológicas relacionadas à densidade e orientação do colágeno, e à espessura da inserção das fibras de Sharpey no osso alveolar ocorrem no ligamento periodontal muito rapidamente uma vez que os dentes tenham irrompido na cavidade oral.

HUANG et al. (1991) sugerem que as fibras de Sharpey relacionadas ao ligamento periodontal consistem de co-fibrilas de colágenos tipos I e III, proposição que não suporta os achados de WANG et al (1980). Nesse trabalho, HUANG e colaboradores, utilizando imunofluorescência, observaram que, nos ligamentos periodontais de molares maxilares de ratos, o primeiro aparecimento de fibras periodontais, mostrando intensa coloração para os colágenos dos tipos I e III, foi observado nas superfícies do cemento cervical e osso alveolar, treze dias após o nascimento. Nesta

região entre o cimento e o osso alveolar, uma malha de fibras delgadas apresentando marcação positiva para colágenos tipos I e III foi observado. Com o avançar a idade, o comprimento e número de fibras do ligamento periodontal aumentam acompanhando o desenvolvimento do ligamento periodontal. A presença desses tipos de colágenos foi demonstrada por HENKEL & GLANVILLE (1982) cujo estudo revelou a presença de ligações cruzadas covalentes entre moléculas de colágeno tipos I e III. Embora a distribuição do colágeno tipo III tenha sido extensivamente estudada, as funções específicas deste tipo de colágeno não estão bem elucidada. MAO et al.(1990) sugerem que o colágeno do tipo III possa desempenhar um importante papel nas organogêneses - funcionando como um patíbulo para a formação da malha de fibras colágenas, além de regular o tamanho das fibras colágenas (KONOMI et al., 1981).

As células do ligamento periodontal produzem espaços disponíveis para o desenvolvimento das fibras principais, presumivelmente secretadas por estas células. Subseqüentemente, as células do ligamento periodontal agregam as fibras principais em feixes apertados (comprimidos) e regulam a orientação das fibras. Além do mais, estas células (os fibroblastos) constantemente modificam a arquitetura das fibras principais em resposta a variadas condições fisiológicas (YAMAMOTO, 1992).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Ratos Wistar (Ratos norvegicus albinus – Rodentia mamalia), 01 a 31 dias de vida pós-natal, foram usados nos experimentos. Após anestesia com Francotar® , os animais foram decapitados. A ablação da cabeça foi realizada à altura de uma área imediatamente adjacente (e subjacente) a uma linha imaginária que une as regiões auriculares. Em seguida, fez-se a remoção da massa encefálica utilizando-se cureta de ponta ativa compatível com a área a ser manipulada. Posteriormente, as peças foram mantidas em solução tamponada de formol a 10% por 48 horas. Após a fixação, a peça foi cortada no sentido ântero-posterior na altura das comissuras labiais, e a porção superior desprezada. O material obtido de animais com idade a partir de 07 dias foi descalcificado utilizando-se solução de ácido nítrico a 10% em solução aquosa de formol a 10% por 48 a 72 horas. Na seqüência, a porção inferior associada à região mandibular foi seccionada sagitalmente a partir da linha média, resultando duas porções laterais (hemimandíbulas). Cada hemimandíbula foi seccionada transversalmente em três segmentos (figura em anexo), sendo analisados os dois cortes mais anteriores. Os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em paraplast. Foram realizados cortes de 5µm de espessura. O

material foi corado por Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Mallory para observação em microscopia de luz. Os cortes também foram submetidos ao método de Picrosirius para análise em microscopia de polarização. Esta técnica consistiu em corar o material com solução de Sirius Red 0,1% (Sirius Red F3 B200, Mobay Chemical Corporation, New Jersey, USA) em solução de ácido pícrico saturado, seguido passagem em água corrente.

4. RESULTADOS

As referências associadas às superfícies do dente em relação ao osso alveolar são mostradas na figura 1 que corresponde à corte transversal do dente incisivo de rato com 30 dias de idade.

D1R1 e DR2- Nessa fase do desenvolvimento não se observou organização de fibras em associação à estrutura dental.

D6R1 e D7R1- Foi possível registrar a presença de delgadas fibras colágenas, que aparecem coradas em verde pelo picrossirius na observação sob luz polarizada, dispostas obliquamente, localizadas nas proximidades do cimento, e dirigindo-se para o osso circundante (fig. 2).

D7R2- Esse segmento do incisivo localizado mais próximo ao folículo dental, apresentou menor densidade de fibras colágenas, quando comparado ao segmento mais próximo da superfície incisal -R1-.

D10, D11 e D13 R1 / D10, D11 e D13 R2 – Nessa fase, os segmentos mostraram um padrão semelhante de organização das fibras de colágeno que

partem do cemento, nas regiões mesial e lingual, em direção ao osso alveolar em maturação. Nas proximidades do osso alveolar foi possível se observar grande quantidade de vasos se interpondo às fibras birrefringentes com predominância de cor verde quando coradas por picrosirius e vistas sob polarização (figs. 3, 4, 5). Neste período do desenvolvimento ocorre a erupção do incisivo na cavidade oral.

D16 e D19 R1 / D16 e D19 R2- Nessa fase foi possível notar um maior desenvolvimento do ligamento periodontal na porção lingual da região mais incisal –R1-, e o espessamento dos feixes de fibras colágenas comparados às amostras anteriores. A observação das amostras coradas por picrosirius e vistas sob polarização indica uma birrefringência na qual a coloração amarela pode ser observada indicando maturação das fibras colágenas do tipo I (figs. 6, 7, 8) – a oclusão funcional dos incisivos iniciou-se a partir do décimo sexto dia de vida.

D21, D22, D25- ocorre uma organização e condensação das fibras dispostas em densos feixes, que, corados por picrosirius, revelam um predominante matiz amarelo e vermelho (figs. 9, 10, 11, 12, 13).

D30, D31 R1- Na região distal do incisivo em área próxima à superfície bucal, as fibras parecem estar mais concentradas e os espaços vasculares próximos ao osso ocupam uma área menor em comparado com as condições anteriores do desenvolvimento. Os espaços vasculares são maiores na região lingual onde não são observadas fibras de Sharpey. Quando comparada à região distal, a região mesial exibe uma maior área ocupada por vasos junto ao osso alveolar e fibras concentradas nas proximidades do dente. A região mais posterior -R2- também já se encontra organizada e, por nesta fase do desenvolvimento se encontrar mais distante do folículo dentário, não mostra aspectos de fibras imaturas (figs. 14, 15, 16, 17).

A coloração amarela e vermelha indica a presença de fibras colágenas do tipo I e, neste estágio do desenvolvimento, pôde-se ainda observar fibras delgadas de cor verde representativas de fibras de colágeno do tipo III. Nesta fase, na região mais incisal -R1-, onde o dente está sujeito às forças oclusais, as zonas relacionadas ao osso e ao dente exibiram estruturas fibrilares de orientação paralela e inserções de fibras de Sharpey no cemento e no osso alveolar, que se mostraram com maior intensidade de birrefringência, oferecendo suporte ao conceito de que força de tensão aplicada sobre o colágeno faz com que se intensifique sua birrefringência.

A zona intermediária apresenta-se com menor intensidade de birrefringência, e tem sido relatada como uma área menos madura nos dentes de crescimento contínuo. Apesar de não haver características de um arranjo alinhado de fibrilas de colágeno, o que oferece menos brilho em luz polarizada, pôde-se observar a presença de fibras colágenas do tipo I, maduras, que apareceram coradas em vermelho.

Os cortes dos diferentes estágios também foram analisados em microscopia de luz convencional e corados pelo tricrômico de Mallory (figs. 18 e 19).

Em avaliação comparativa, foi possível notar que o primeiro molar, dente de crescimento limitado, erupcionou na cavidade bucal no décimo nono(19^o) dia de idade, estabelecendo oclusão funcional aproximadamente no vigésimo quinto (25^o) dia de vida. O processo de formação radicular nesse período ainda não está concluído. Nos dentes molares não existe a denominada zona intermediária, encontrada em dentes de crescimento contínuo. As fibras colágenas se alinham em disposição oblíqua e, nos dias 30 e 31 (fig. 20), os feixes de fibras apareceram mais organizados e condensados na região próxima ao dente, segmento incisal, onde foi possível observar fibras de Sharpey.

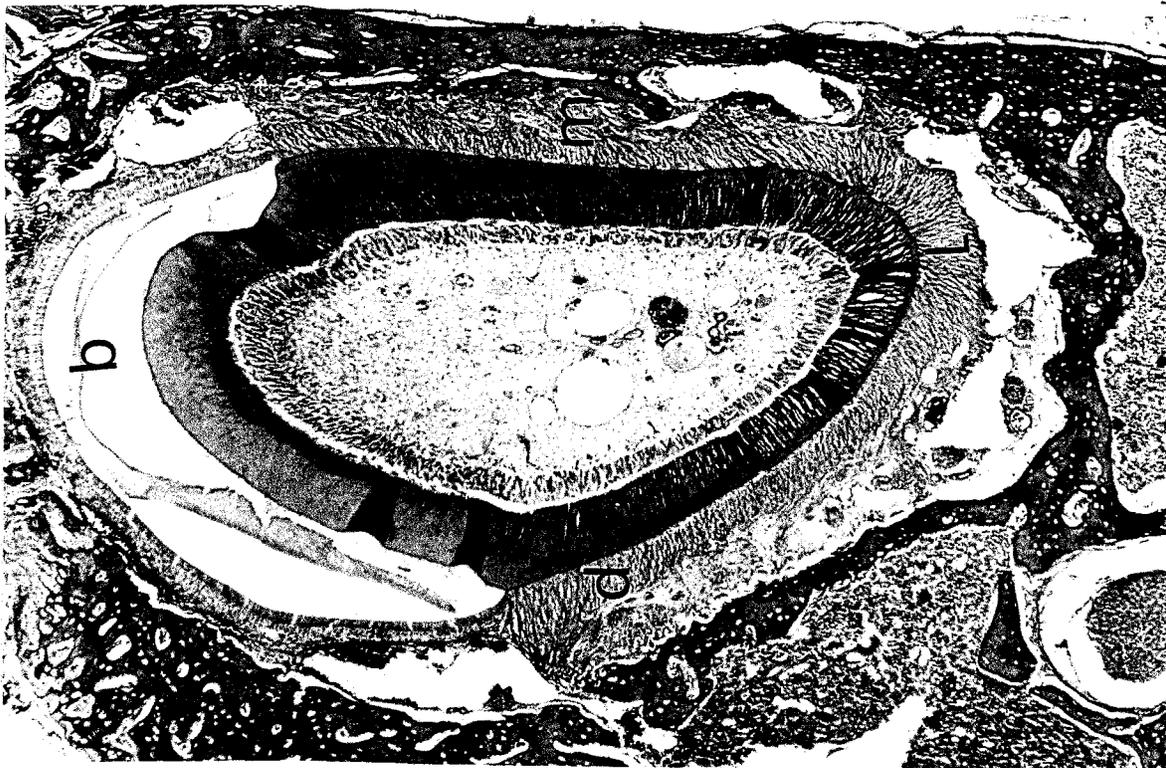


Fig. 1. Dente incisivo de rato corado por Tricômico de Mallory, em corte transversal indicando as regiões mesial (M), distal (D), bucal (B) e lingual (L). 50X

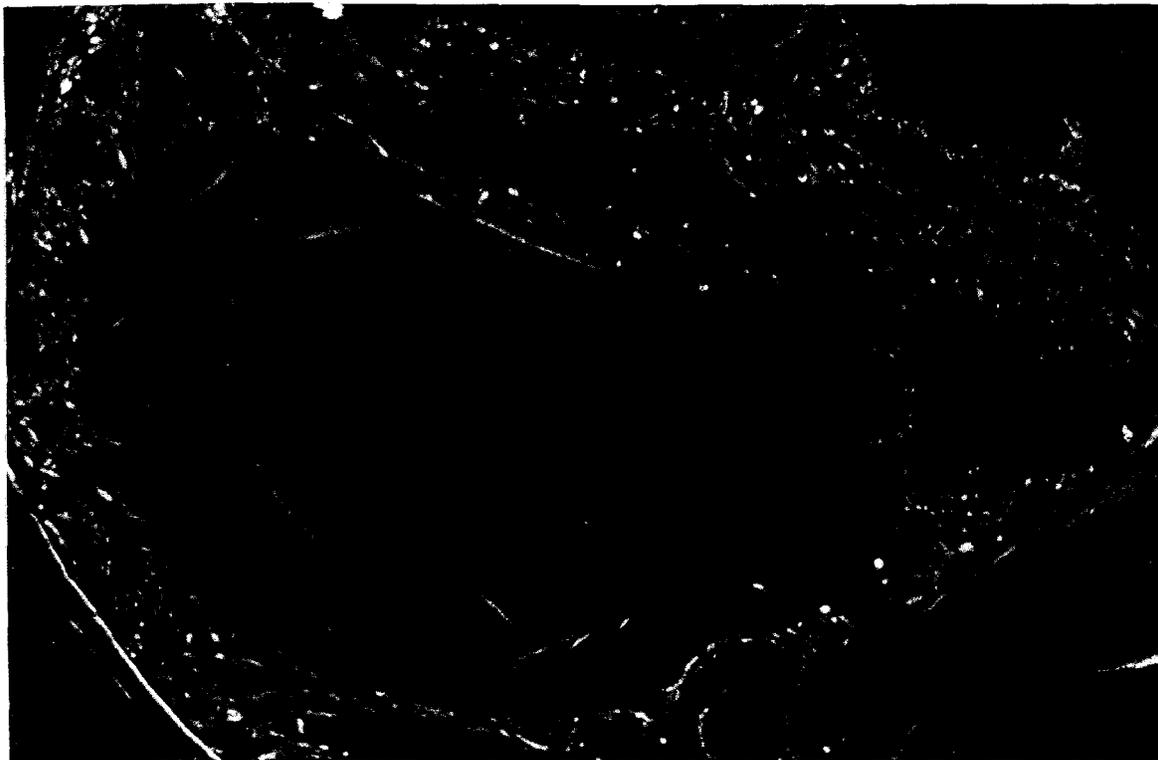


Fig. 2. Dente incisivo de rato em corte transversal, correspondente ao D7 R1, material corado com Picrosirius, onde pode-se observar escassas e delegadas fibras colágenas vistas de cor verde sob luz polarizada. 50X

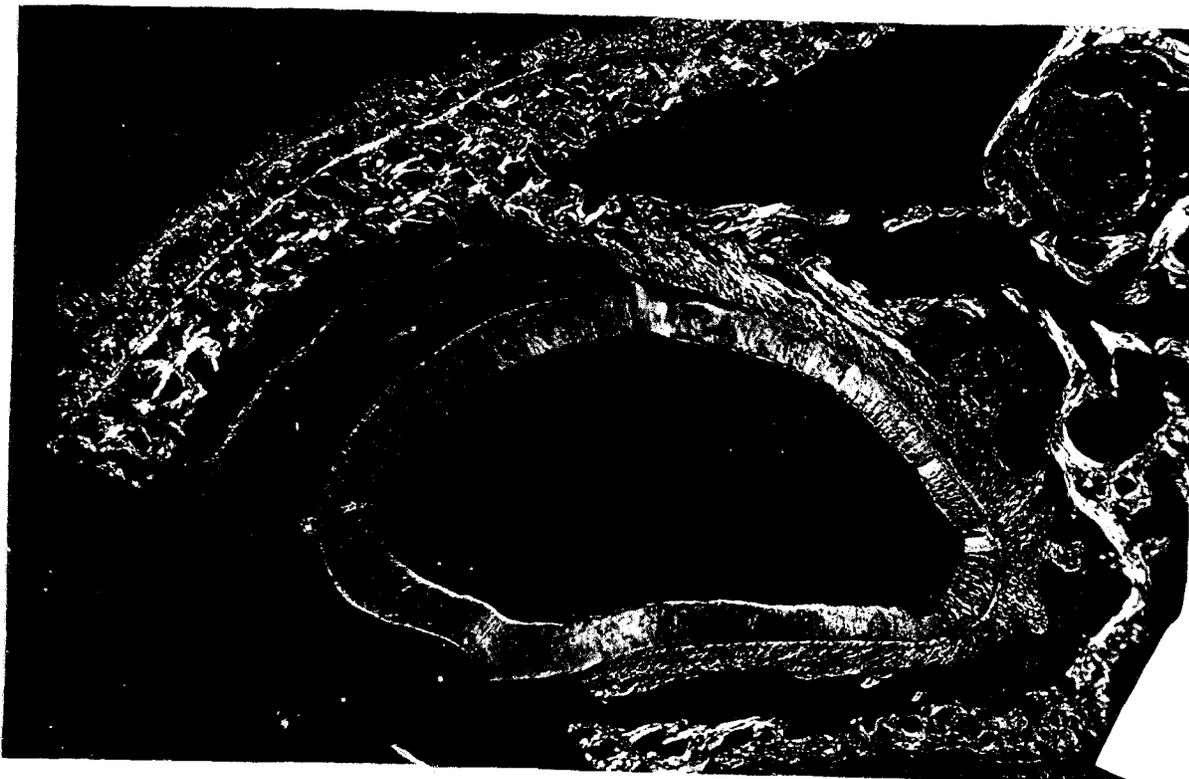


Fig. 3. Corte transversal de incisivo de rato, corado com Picrosirius, correspondente ao D11 R1, onde pode-se observar delegadas fibras estabelecendo contacto entre dente e osso alveolar na região distial. Os espaços evidentes na região lingual correspondem a vasos sanguíneos. 50X

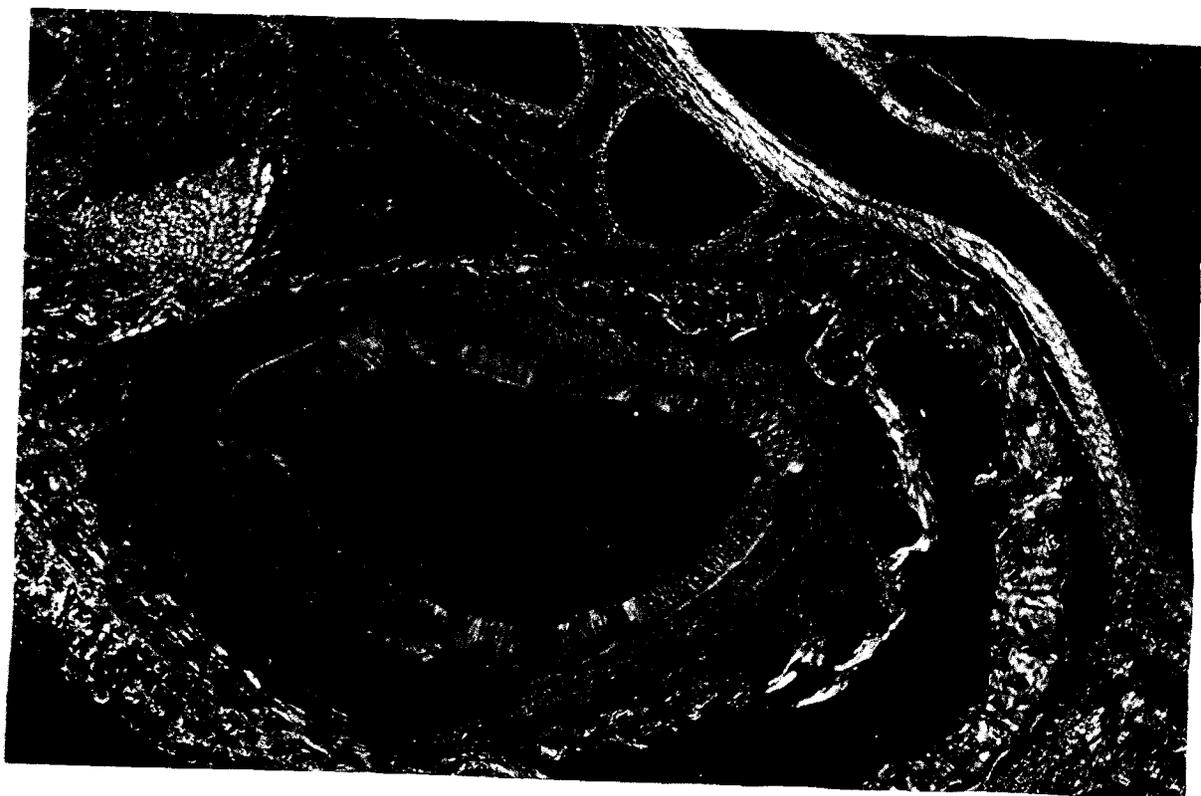


Fig. 4. Corte transversal de incisivo de rato, corado com Picrosirius, correspondente ao D11 R2, nesta região mais próxima ao folículo dental, as fibras estão mais concentradas junto ao dente sem alcançar o osso em maturação. 50X

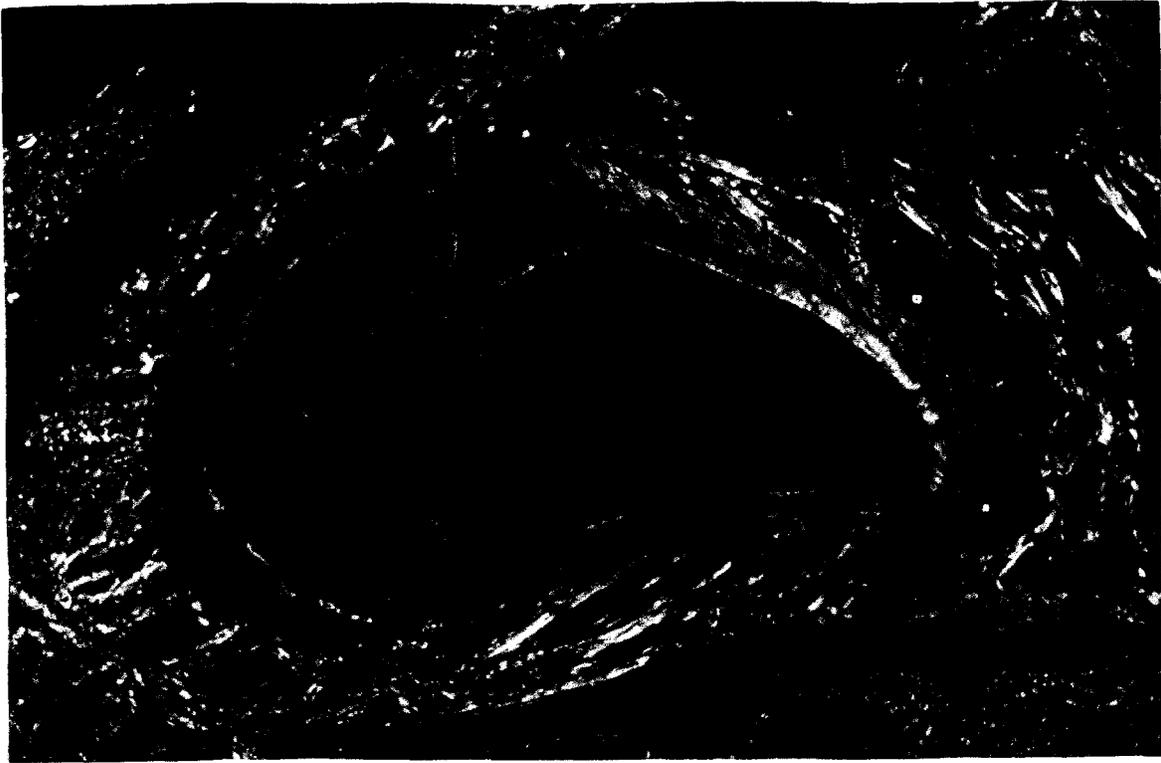


Fig. 5. Corte transversal de incisivo de rato, corado co, Picrosirius, correspondente ao D13 R1, onde pode-se observar fibras colágenas partindo das regiões mesial e distial em direção ao osso alveolar. 50X

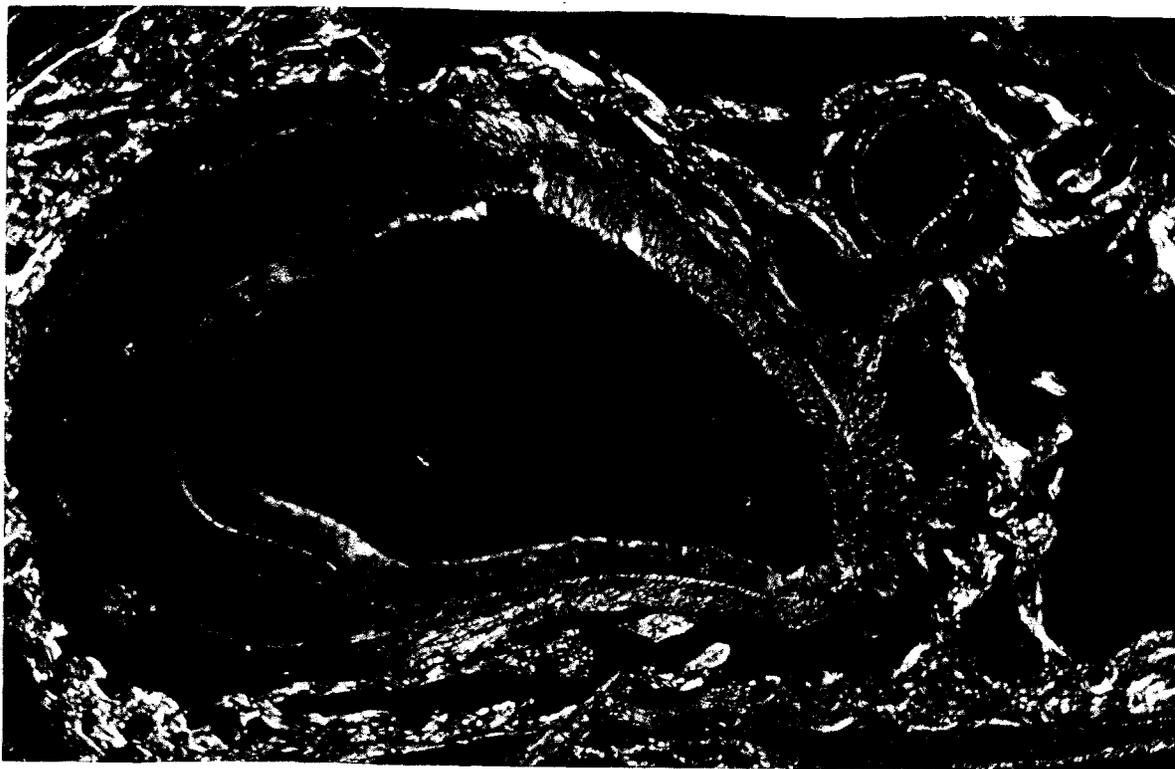


Fig. 6. Corte incisivo de rato, corado com Picrosirius, correspondente ao D19 R1, áreas de fibras colágenas aparecem cor amarela quando vistas sob luz polarizada indicando maturação do colágeno tipo I, entremeadas por fibras em verde. 50X

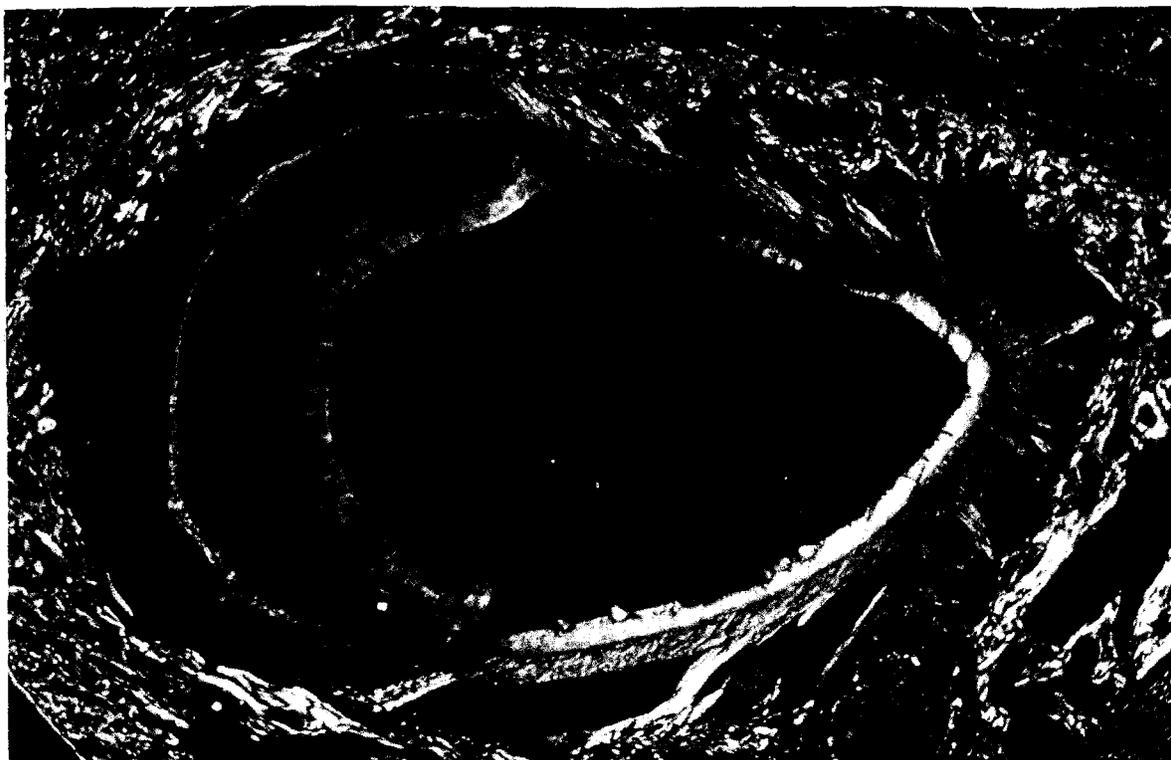


Fig. 7. Corte incisivo de rato, corado com Picrosirius, correspondente ao D19 R2. Nesta região a organização das fibras se encontra em estágio menos desenvolvido mantendo concentração de fibras colágenas próximas de dente. 50X

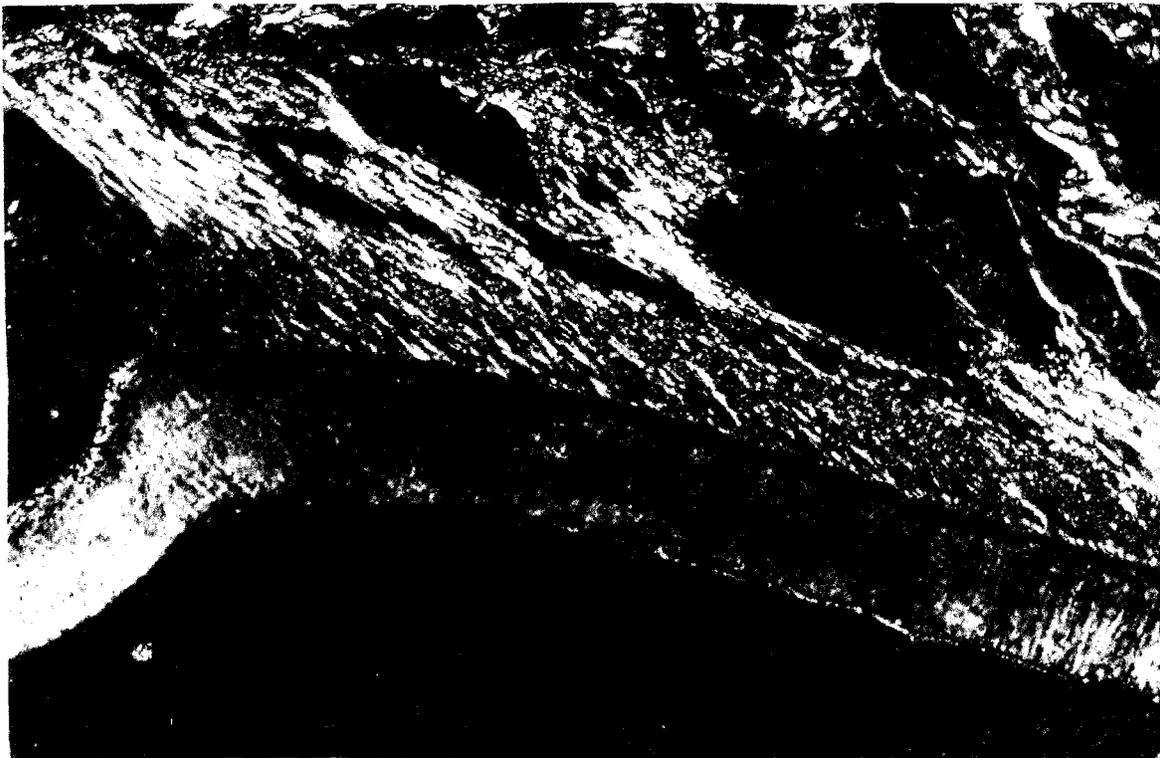


Fig. 8. Corte transversal de incisivo de rato, corado com Picrosirius, mostrando detalhe da região D19 R2 onde pode ser observada a ancoragem de feixe de fibras junto ao osso alveolar. Notar a concentração de vasos nessa região. 100X



Fig. 9. Dente incisivo de rato em corte transversal correspondendo ao D21 R1. Notar que o ligamento periodontal se encontra constituído principalmente de fibras que aparecem coradas em amarelo e vermelho indicando colágeno do tipo I, mais espessas. 50X

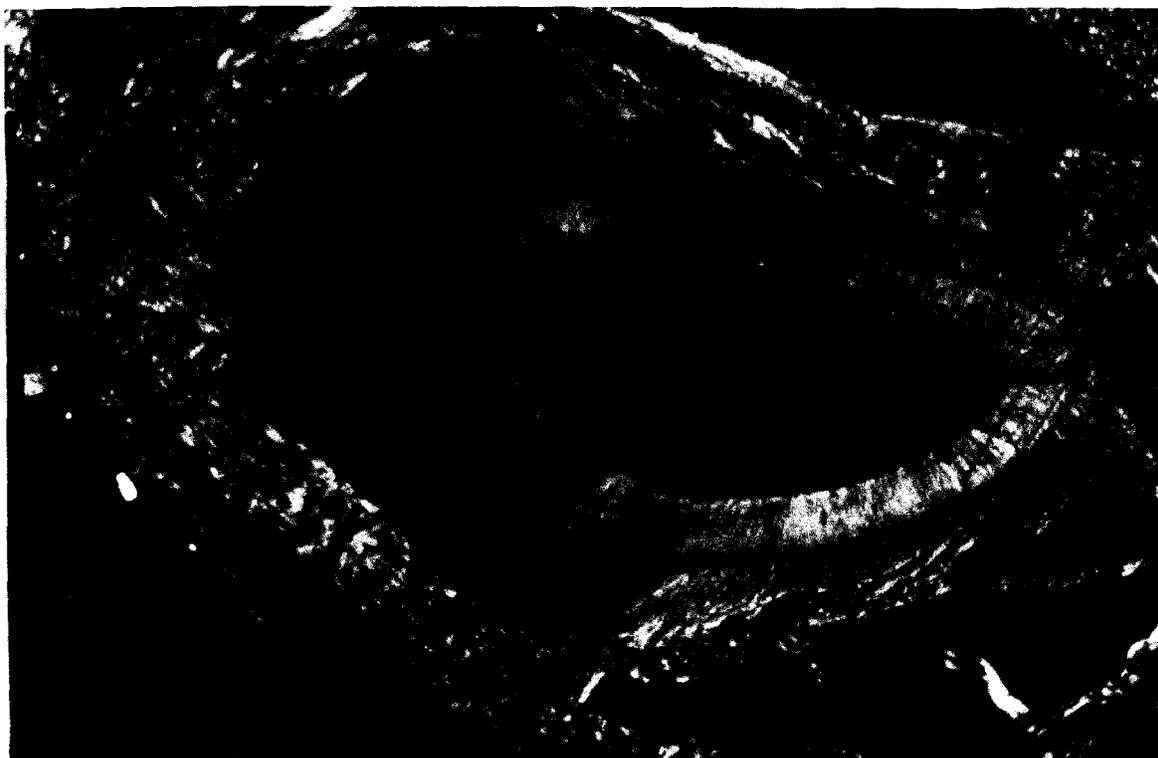


Fig.10. Dente incisivo de rato em corte transversal correspondendo ao D21 R2. As diferenças nesta fase do desenvolvimento não são tão evidentes, nesta região as fibras se encontram com padrão similar de organização às da região mais incisal. 50X



Fig. 11. Dente incisivo de rato em corte transversal corado por Picrosirius, correspondendo ao D25 R1. Nesta fase em que o dente já se encontra em oclusão funcional a direção das fibras colágenas se mostram mais bem definidas, com maior birrefringência em algumas áreas que correspondem às de fibras de Sharpey e redução dos espaços vasculares na região junto ao osso alveolar. 50X



Fig.12. Dente incisivo de rato em corte transversal corado por Picrosirius, correspondendo ao D25 R2. Nessa região mais posterior o ligamento se mostra com espaços vasculares maiores que os da região mais incisal e as fibras não exibem alinhamento de orientação. 50X

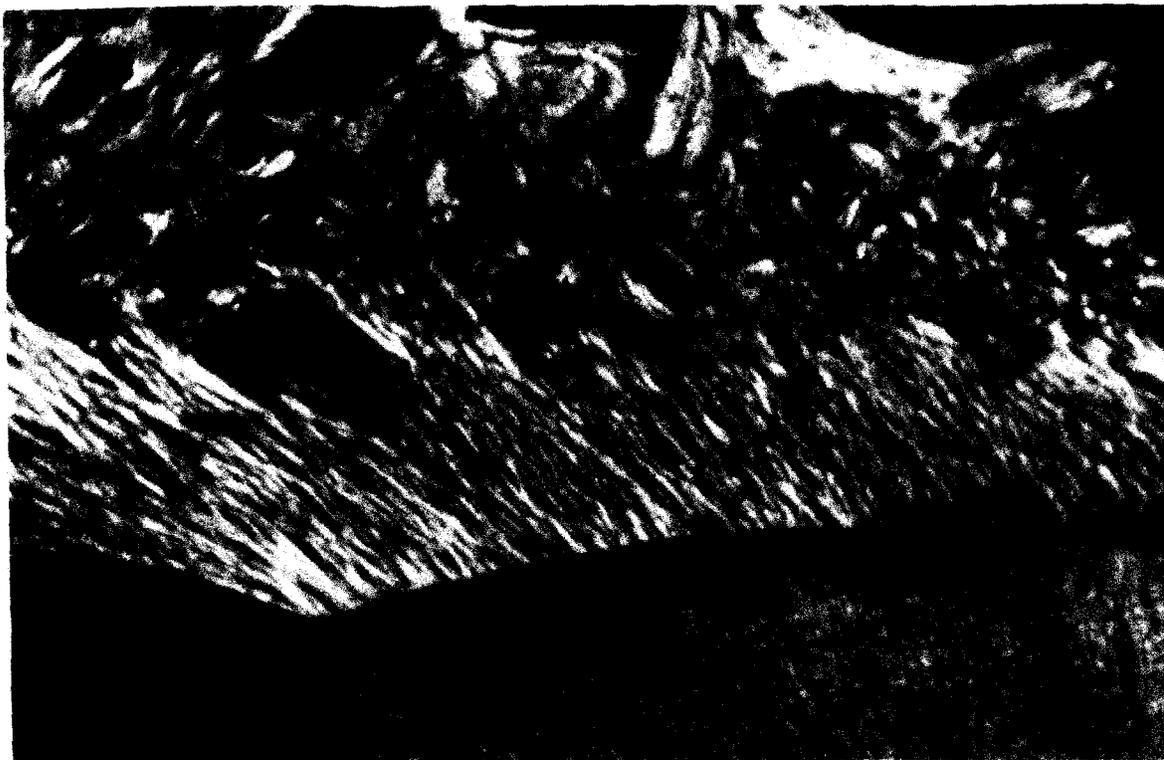


Fig. 13. Detalhe de corte transversal de dente incisivo corado por Picrosirius, correspondendo ao D25 R1. Observar padrão de orientação nas áreas de fibras e maior birrefringência nas áreas de fibras de Sharpey. O ligamento periodontal se mostra constituído principalmente por fibras colágenas espessas do tipo I. 200X



Fig. 14. Corte transversal de incisivo de rato corado por Picrosirius, correspondendo à D31 R1. As fibras colágenas do tipo I são vistas em polarização com cor avermelhada, e se alinham na região incisal em disposição oblíqua, evidenciando maior brilho nas áreas de fibras de Sharpey. Os espaços vasculares se mantêm na região junto ao osso, sendo maiores na direção lingual. 100X.

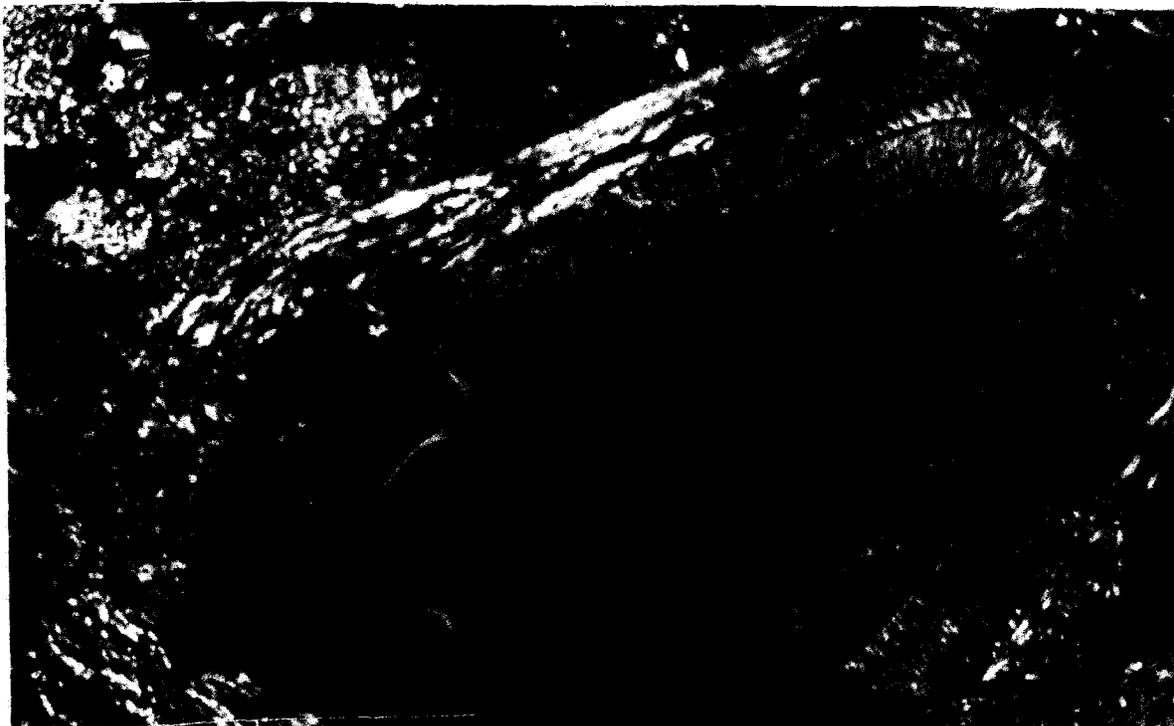


Fig. 15. Corte transversal de incisivo de rato corado por Picrosirius, correspondendo à D31 R2. O ligamento periodontal apresenta-se com fibras de colocação amarelo avermelhada, indicativo de colágeno tipo I maduro e fibras mais espessas. Contudo a área periodontal ocupada por vasos é maior que na região mais incisal (R1) e a direção das fibras não aparece bem definida. 100X

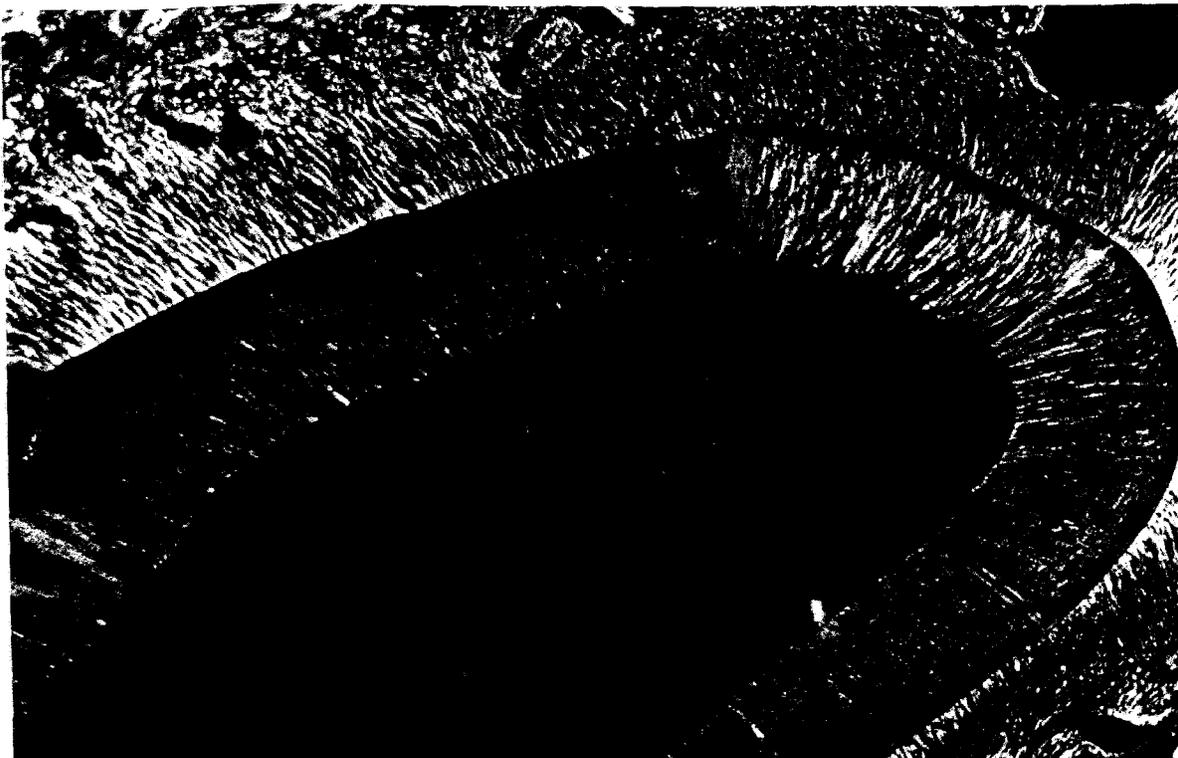


Fig. 16. Dente incisivo corado por Picrosirius. Detalhe da face mesial – D31 R1 – evidenciando fibras de Sharpey e mostrando fibras maduras na zona intermediária do ligamento. 100X

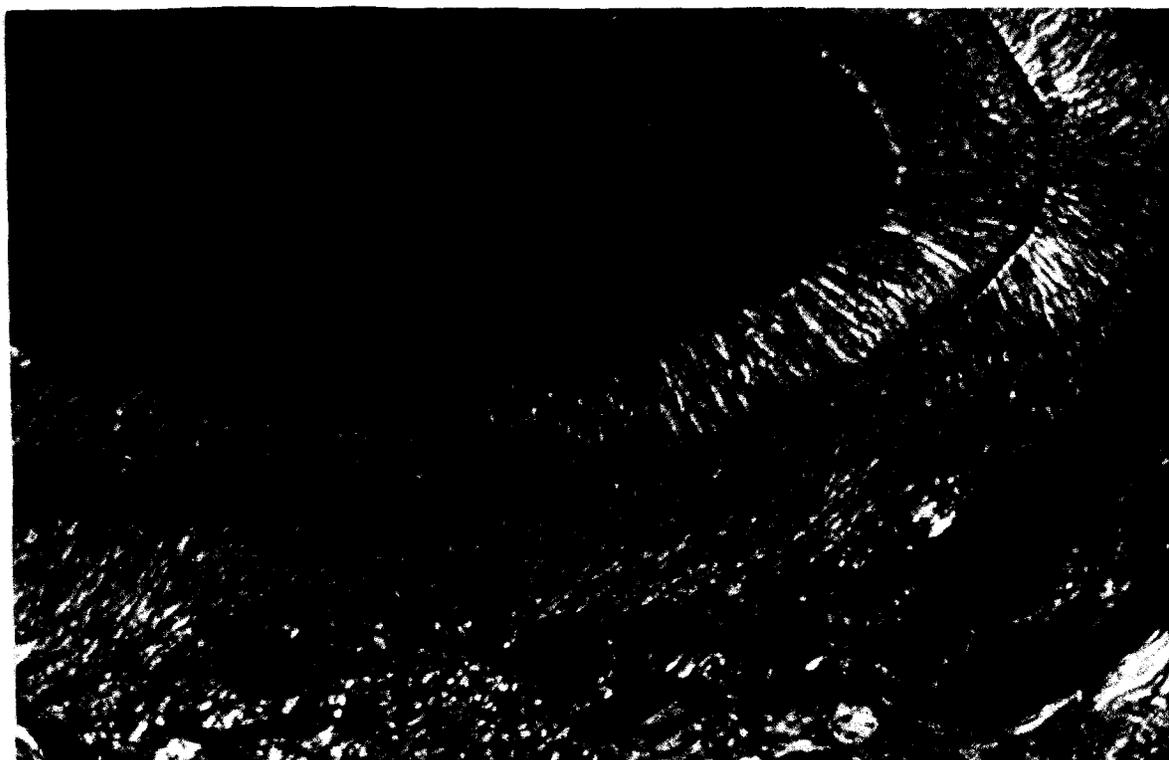


Fig. 17. Dente incisivo – D31 R2 – área mostrando grandes espaços vasculares e fibras colágenas ainda não orientadas na região posterior. 100X



Fig. 18. Corte transversal de incisivo de rato – D31 R1 – corado por Tricômico de Malorrry mostrando orientação e distribuição de fibras do ligamento periodontal. Polpa dental (P). 100X

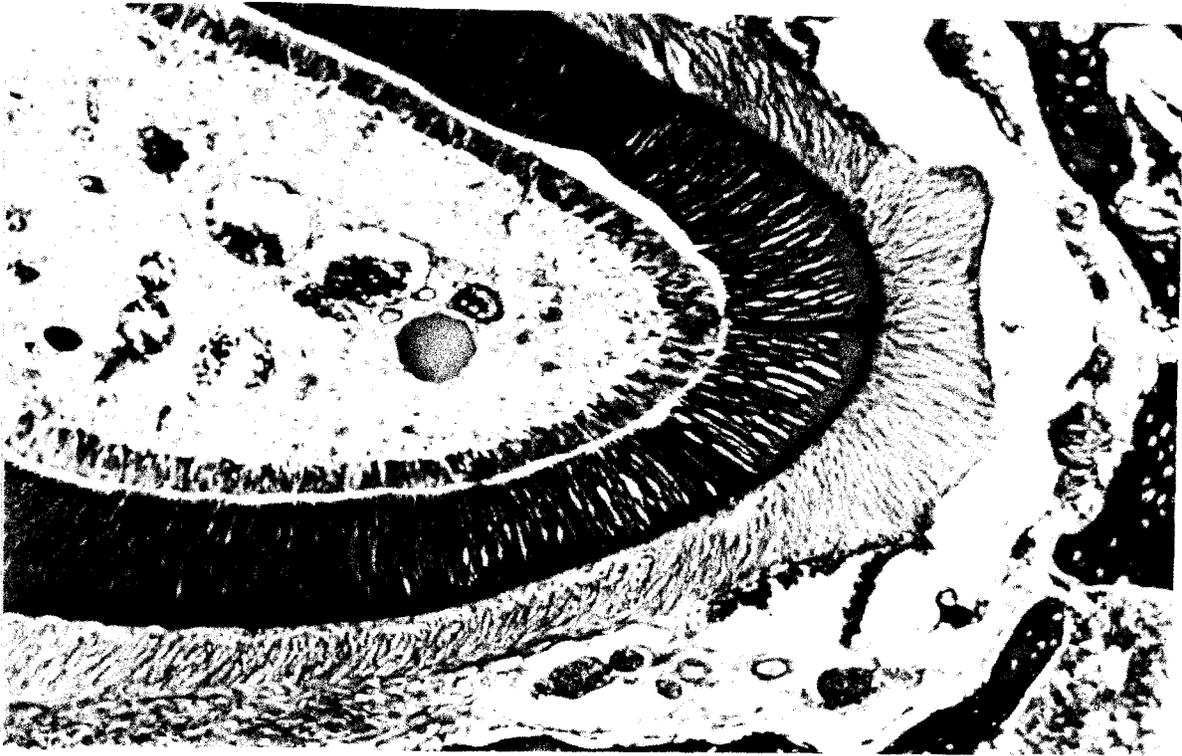


Fig. 19. Corte transversal de incisivo de rato. D31 R2 – Corado por Tricômico de Mallory, área lingual mostrando espaço vascular. 100X



Fig. 20. Corte de dente molar inferior – D31 – fibras colágenas alinhadas em disposição oblíqua e mais condensadas na região próxima ao dente no terço cervical. 50X

5. DISCUSSÃO

O tecido periodontal nos dentes de crescimento contínuo é de organização peculiar, onde o ligamento periodontal e o cemento se formam somente nas faces lingual, mesial e parte da distal do incisivo (MERZEL et al., 2000).

As estruturas que formam o tecido periodontal relacionado ao esmalte dos incisivos de ratos são similares àquelas que revestem a coroa dos dentes de crescimento limitado, tais como os molares desse mesmo animal no período de desenvolvimento. As superfícies bucal e parte da distal, cobertas por esmalte e no interior do alvéolo, são recobertas pelo órgão do esmalte e por um tecido conjuntivo originário do folículo dental (BERKOVITZ & SHORE, 1978).

CAHILL & MARKS (1980) inicialmente apresentaram evidências do folículo dental no processo de erupção dental. MARKS et al. (1983) mostraram que ocorre um acentuado fluxo de monócitos no folículo pouco antes do início da erupção. Esses monócitos se transformam em osteoclastos necessários para traçar o caminho eruptivo (WISE & FAN, 1989).

Estudando o desenvolvimento do periodonto, CHO & GARANT (1991) têm proposto a relação entre a ocorrência de sítios de ligação para fator de

crescimento epidermal (EGF) em células mesenquimais foliculares com o desenvolvimento e maturação de fibroblastos em área de ligamento periodontal.

Diversos tipos de colágeno têm sido identificados na matriz extracelular de tecidos conjuntivos (KIELTY et al., 1993) e, como na maioria dos tecidos conjuntivos, o colágeno do ligamento periodontal é predominantemente do tipo I.

Colágenos dos tipos I, III e V são moléculas que apresentam bandas com periodicidade característica de 67nm quando observada ao microscópio eletrônico, exibindo um arranjo fibrilar (BURGESON, 1988).

Uma classificação desta família de moléculas divide-as em dois grupos principais: colágenos em fibrilas e colágeno FACIT - colágenos associados a fibrilas com tríplexes hélices interrompidas - (OLSEN, 1989). O mesmo autor sugere que essas moléculas se ligam ao colágeno fibrilar e organizam a matriz extracelular. O colágeno tipo XII e uma molécula chamada undulina têm sido localizados no ligamento periodontal de ratos (DUBLET et al., 1988; ZHANG et al., 1993).

O colágeno tipo VI corresponde a uma cadeia curta de moléculas que recentemente foi localizada no ligamento periodontal e tem sido sugerido que sua função esteja relacionada com a manutenção da integridade e elasticidade

da matriz extracelular (von der MARK et al. 1984). O colágeno tipo IV não forma fibrilas e é encontrado em membranas basais de feixes neurovasculares (SLOAN et al. 1993). Embora este colágeno seja especificamente associado com membranas basais, pode desempenhar um papel estrutural na integridade do ligamento periodontal e na ancoragem do sistema elástico da vasculatura presente neste tecido (SIMS, 1983).

Em algumas espécies animais, o colágeno do ligamento periodontal se organiza em fibras nos estágios precoces do desenvolvimento tecidual (FREEMAN & TEN CATE, 1991), enquanto em outras (e. g. macacos) as fibras se desenvolvem mais tardiamente (GRANT & BERNICK, 1972).

Nossos resultados mostraram que a organização das fibrilas pôde ser notada nos primeiros estágios do desenvolvimento.

O método de coloração por Picrosirius analisado sob microscopia de polarização é um procedimento histoquímico para detecção dos colágenos que mostra diferentes interferências de cores e intensidades de birrefringência; assim este método tem se mostrado útil no estudo da distribuição dos diferentes tipos estruturais de colágeno em tecidos preparados em parafina.

Os colágenos tipos I e III, com estrutura alongada e estriação transversal característica, determinada pela sobreposição das moléculas de tropo colágeno, unidade protéica que consiste de três cadeias polipeptídicas

dispostas em hélice que se polimerizam para formar as fibrilas. O Sirius Red, corante que corresponde a uma alongada molécula altamente acídica, reage com o colágeno, acentuando a birrefringência normal deste tecido devido ao fato de que as moléculas do corante se associam às do colágeno de tal modo que seus longos eixos ficam em paralelo.

Segundo MONTES et al. (1984), fibras colágenas do tipo I apresentam um padrão de alta birrefringência de intensidade de cor variando de amarelo para vermelho, e segundo os mesmos autores o colágeno tipo III apresenta uma fraca birrefringência de cor verde. O colágeno tipo V se apresenta em fibrilas mal organizadas, vistas em polarização com fraca birrefringência (ZAMBRANO et al., 1982).

O colágeno tipo IV, que acompanha a lâmina basal e é dito apresentar fraca birrefringência, não pôde ser identificado em nossas amostras.

Essas diferenças no padrão de cores observado devido à birrefringência se deve ao modelo de agregação física das moléculas nessas diferentes fibras.

Observamos em nossos resultados que no decorrer do desenvolvimento houve um aumento das fibras caracterizadas como colágenas do tipo I, que quando maduras se mostram em feixes de espessura variada e têm como principal característica a resistência à tensão.

Fibras do tipo III também são encontradas no ligamento periodontal (SHUTTLEWORTH & SMALLEY, 1983), embora colágeno tipo III apareça co-distribuído com o colágeno tipo I formando fibrilas mistas (HENKELL & GLANVILLE, 1982), uma maior proporção do colágeno tipo III está presente nas primeiras fases de desenvolvimento (BERKOVITZ, 1990). Este resultado se apresenta de acordo com o que pudemos observar, porém deve-se considerar que, por estar em desenvolvimento, nas primeiras semanas houve uma predominância de fibras, que coradas com picrossírius e vistas em polarização, apareceram com cor verde, o que também poderia ser interpretado como fibras do tipo I ainda em organização.

Devido às suas características particulares, diversos estudos têm sido feitos utilizando dentes de crescimento contínuo (BERKOVITZ & MOXHAM, 1990; BERKOVITZ & SHORE, 1978), mostrando evidências de que os feixes de colágeno, na região intermediária do ligamento periodontal, se dispõem em arranjo característico de aspecto laminar. Estes achados foram mostrados em microscopia de polarização por SLOAN (1978) e mais recentemente confirmados por CARTER & SLOAN (1994) em microscopia eletrônica de varredura.

Assim a região intermediária do ligamento periodontal dos incisivos em oclusão mostra um padrão que, observado sob luz polarizada, revela uma

menor birrefringência em comparação com o ligamento nas áreas próximas ao osso alveolar ou ao cimento.

Fibras de Sharpey foram observadas no decorrer do desenvolvimento do ligamento periodontal. Nas suas inserções as fibras colágenas são incluídas no cimento e osso alveolar de maneira similar a um tendão se inserindo em tecido ósseo, ou seja, formando fibras de Sharpey. Com base em estudo ultraestrutural, foi mostrado que a maior parte das fibras de Sharpey que se insere no osso alveolar mantém sua região central não mineralizada e separada umas das outras por lâminas de tecido ósseo que se organizam de forma paralela (SELVIG, 1965). Em 1980 WANG e colaboradores através de estudo imunohistoquímico mostraram que as fibras de Sharpey são envolvidas por colágeno tipo III, propondo que este colágeno pode não só conferir elasticidade às fibras como também manter a distensibilidade das fibras de Sharpey inseridas em tecido mineralizado evitando sua plena mineralização. HUANG et al. (1991), estudando o desenvolvimento do ligamento periodontal em camundongos, obtiveram resultados em imunofluorescência confirmando que as fibras de Sharpey consistem de co-fibrilas compostas de, pelo menos, colágenos tipos I e III.

6. CONCLUSÕES

1- A observação de fibras no ligamento periodontal de incisivos de ratos somente foi possível a partir do 6º dia de vida pós-natal, quando as fibras se mostraram coradas em verde pelo método Picrosirius-polarização, e partindo do cemento em direção ao osso alveolar.

2- Em dentes incisivos de ratos o padrão de organização das fibras colágenas em feixes de fibras maduras, coradas principalmente em amarelo e vermelho por Picrosirius, pôde ser observada a partir do 21º dia de vida pós-natal, período coincidente com o início da oclusão funcional.

3- A região intermediária do ligamento periodontal de incisivos de ratos se mostrou menos birrefringente que as áreas próximas aos tecidos mineralizados, devido ao arranjo menos alinhado das fibras colágenas – contudo, nesta área, fibras colágenas maduras do tipo I foram também passíveis de visualização.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. BARON, R. Remaniement de l'os alveolaire et des fibres desmodontales au cours de la migration physiologique. *J. Biol. Buccale*, n.1, p.151-170, 1973.
2. BEERTSEN, W. et al. Fine structure of fibroblasts in the periodontal ligament of the rat incisor and their possible role in tooth eruption. *Arch. Oral Biol.*, v.19, p.1087-1098, 1974.
3. BERKOVITZ, B.K.B., SHORE, R.C. Ultrastructure of enamel aspect of rat incisor periodontium in normal and root-resected teeth. *Arch Oral Biol.*, v.23, n.8, p.681-689, 1978.
4. BERKOVITZ, B.K.B., SHORE, R.C. Cells of the periodontal ligament. In BERKOVITZ, B.K.B., MOXHAM, B.J., NEWMAN, H.N. *The periodontal ligament in health and disease*. Oxford: Pergamon Press, 1982. cap.1, p.25-50.

* De acordo com a NBR-6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviaturas dos períodos

5. BERKOVITZ, B.K.B. Structural observations on the periodontal ligament in relation to the eruptive mechanism. In: DAVIDOVITCH, Z. *Biological mechanisms of tooth eruption and root resorption*. Alabama: EBSCO Media, 1988, p.227-291.
6. BERKOVITZ, B.K.B., The structure of the periodontal-ligament – an update. *Eur J Orthodont*, v.12, n.1, p.51-76, Feb., 1990.
7. BERKOVITZ, B.K.B., MOXHAM, B.J. The development of the periodontal ligament with special reference to collagen fibre ontogeny. *J. Biol. Buccale*, v.18, p.227-236, 1990.
8. BURGESSON, R.E. Do banded collagen-fibers contain 2 or more collagen types. *Isi Atlas-Biochem*. v.1, n.1, p.88-91, 1988.
9. CAHILL, D.R., MARKS, S.C. Tooth eruption - evidence that the dental follicle plays a central role. *J Dent Res*, v.59, p.334-343, 1980.

10. CARTER, D.H., SLOAN, P. The fibrous architecture of the rat periodontal ligament in cryosections examined by scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol.*, v.39, p.949-953, 1994.
11. COHN, S.A. A new look at the orientation of cemento-alveolar fibers of the mouse periodontal ligament. *Anat. Rec.*, n.166, p.292, 1970.
12. COHN, S.A. A re-examination of Sharpey's fibres in alveolar bone of the mouse. *Archs oral Biol.*, London, v.17, p.255-260, 1972.
13. CHO, M., GARANT, P.R. Radioautographic study of tritiated mannose utilization during cementoblast differentiation, formation of acellular cementum, and development of periodontal ligament principal fibers. *he Anatomical Record*, New York, n.223, p.209-222, 1989.
14. CHO, M. GARANT, P.R. Occurrence of epidermal growth factor-binding sites during differentiation of cementoblasts and periodontal-ligament fibroblasts of the young-rat – a light and electron-microscopic autoradiographic study. *Anat Rec*, v.231, n.1, p.14-24, Sep., 1991.

15. DUBLET, B. et al. Bovine type XII collagen. *Federation of European Biochemical Societies*, v.223, p.177-180, 1988.
16. DUBLET, B. et al. Bovine type-XII collagen - aminoacid sequence of a 10 KDa pepsin fragment from periodontal-ligament reveals a high degree of homology with the chicken alpha-1 (XII) sequence. *Febs Lett*, v.233, n.1, p.177-180, June, 1988.
17. ECCLES, J.D. Studies in the development of the periodontal membrane: the principal fibres of the molar teeth. *Dent Practit.*, v.10, p.31-35, 1959.
18. ECCLES, J.D. The development of the periodontal membrane in the rat incisor. *Arch. oral Biol.*, Gt. Britain, v.9, p.127-133, 1964.
19. EHRLICH, H.R., BORNSTEIN, P. Microtubules in transcellular movement of procollagen. *Nature*, v.238, p.257-260, 1972.

20. FISCHER, G. In: *Bau und Entwicklung der Mundhöhle des Menschen*, cap.24, p.243, 1909. Apud ECCLES, J.D. The development of the periodontal membrane in the rat incisor. *Arch. oral Biol*, Gt. Britain, v.9, p.127-133, 1964.
21. FREEMAN, E., TEN CATE, A.R. Development of periodontium – electron microscopic study. *J Periodontol*, v.42, n.7, p.387-&, 1971.
22. GARANT, P.R., CHO, M. Cytoplasmic polarization of periodontal ligament fibroblasts. *J. Periodontal Res.*, New York, v.14, p.95-106, 1979 a.
23. GARANT, P.R., CHO, M. Autoradiographic evidence of the coordination of the genesis of Sharpey's fibers with new bone formation in the periodontium of the mouse. *J. Periodontal Res.*, New York, v.14, p.107-114, 1979 b.
24. GRANT, D., BERNICK, S. Formation of the periodontal ligament. *J. Periodontol.*, Los angeles, v.43, n.1, p.17-25, Jan. 1972.

25. GENCO, R.J. Host responses in periodontal diseases. *Current concepts. J. Periodontol.*, v.63, p.338-355, 1992.
26. HUANG, Y.H. et al. Distribution of type I and type III collagen in the developing periodontal ligament of mice. *Matrix*, v.11, p.25-35, 1991.
27. HENKEL, W., GLANVILLE, R.W. Covalent crosslinking between molecules of type I and type III collagen. The involvement of the N-terminal, nonhelical regions of the $\alpha 1$ (I) and $\alpha 1$ (III) chains in the formation of intermolecular crosslinks. *Eur. J. Biochem.*, v.122, p.205-213, 1982.
28. JOHNSON, R.B. A classification of Sharpey's fibers within the alveolar bone of the mouse: a high-voltage electron microscope study. *The Anatomical Record*, Canadá, v.217, p.339-347, 1987.
29. KRAW, A.G., ENLOW, D.H. Continuous attachment of the periodontal membrane. *Am. J. Anat.*, n.120, p.133-148, 1967.

30. KIELTY, C.M., HOPKINSON, I., GRANT, M. The collagen family: structure, assembly and organization in the extracellular matrix. In: *Connective tissue and it's heritable disorders*. New York: Wiley-Liss, 1993, p.103-147.
31. KONOMI, H., SANO, J., NAGAI, Y. Immunohistochemical localization of type I, III and IV (basement membrane) collagens in the lymph node: co-distribution of type I and III collagens in the reticular fibers. *Biomed. Res.*, v.2, p.536-545, 1981.
32. LEKIC, P., McCULLOCH, C.A.G. Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *The Anatomical Record*, v.245, p.327-341, June , 1996.
33. MAO, Y.Q. et al. Immunohistochemical study on the relationship between extracellular matrix and root bifurcation in mouse molars. *Archs. Oral Biol.*, v.35, p.583-591, 1990.

34. MARKS, S.C., CAHILL, D.R., WISE, G.E. The cytology of the dental follicle and adjacent alveolar bone during tooth eruption in the dog. *Am J Anat*, v.168, n.3, p.277-289, 1983.
35. McCULLOCH, C.A.G., MELCHER, .H. Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *J. Anat.*, v.167, p.43-58, 1983.
36. MERZEL, J., NOVAES, P.D., FURLAN, S. A histological study of root-resected and root-transected rat incisors when eruption ceases, shortly before they are exfoliated from the socket. *Arch Oral Biol*, v.45, n.4, p.315-322, Apr., 2000.
37. MONTES, G.S., BEZERRA, M.S.F., JUNQUEIRA, L.C.U. Collagen distribution in tissues. In RUGGERI, A., MOTTA, P.M.. *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*. The Hague: Martinus Nijhoff Publishers, 1984, p. 65-88.
38. MOXHAM, B.J. et al. A quantitative study of the ultrastructure of fibroblasts within the enamel-related connective tissue of the rat incisor. *J. Biol. Buccale*, v.19, p.135-140, 1991.

39. OLSEN, B.R. The next frontier – molecular biology of extracellular matrix. *Connect Tissue Res*, v.23, p.115-121, 1989.
40. ORBAN, B. In: *Die Fortschritte der Zahnheilkunde*, 1927. Apud ECCLES, J. D. Op. Cit. Ref. 10.
41. QUIGLEY, M.B. Perforating (Sharpey's) fibers on the periodontal ligament and bone. *Ala. J. Med. Sci.*, v.7, n.3, p.336-342, 1970.
42. ROSS, R. The connective tissue fiber forming cell. In: *Treatise on collagen: Biology of collagen*, v.2, p.20-28, 1968.
43. SCOTT, J.H. How teeth erupt. *Dent. Practit*, v.3, p.345-349, 1953. Apud ECCLES Op. Cit. Ref. 10.
44. SELVIG, K.A. The fine structure of human Cementum. *Acta Odont Scan*, v.23, p.423-441, 1965.

45. SHACKLEFORD, J.M. The indifferent fibre plexus and its relationship to principal fibers of the periodontium. *Am. J. Anat.*, v.131, p.427-442, 1973.
46. SHUTTLEWORTH, C.A., SMALLEY, J.W. Periodontal-ligament. *Int Rev Connect Tissue*. v.10, p.211-247, 1983.
47. SICHER, H. Bau und Funktion des Fixationsapparates der Meerschweinenmolaren. *Z. Stomat.*, v.21, p.580, 1923. Apud ECCLES Op. Cit. Ref. 10.
48. SIMS, M.R. Electron-microscopic affiliations of oxytalan fibers, nerves and the microvascular bed in the mouse periodontal-ligament. *Arch Oral Biol*, v.28, n.11, p.1017-1024, 1983.
49. SLOAN, P. *Microanatomy of the periodontal ligament in some animals possessing teeth of continuous and limited growth*. Phd thesis, University of Bristol, 1978.

50. SLOAN, P., CARTER, D.H., KIELTY, C.M. An immunohistochemical study examining the role of collagen type-VI in the rodent periodontal-ligament. *Histochem J*, v.25, n.7, p.523-530, July, 1993.
51. SODEK, J. A comparison of collagen and non-collagenous protein metabolism in rat molar and incisor periodontal ligaments. *Archs. Oral Biol.*, Toronto, v.23, p.977-982, 1978.
52. SVEJDA, J., SKACH, M. The periodontium of the human tooth in the scanning electron microscope. *J. Periodontol.*, v.44, p.478-484, 1973.
53. TAKANO-YAMAMOTO, T. et al. S. Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J. Histochem. Cytochem.*, v.42, p.885-896, 1994.
54. TEN CATE, A.R. *Histology Oral: development, structure, and function.* 4.ed., St. Louis: Mosby, 1994, 497p.

55. von der MARK, H., AUMAILLEY, M., WICK, G. Immunochemistry, genuine size and tissue localization of collagen-VI. *Eur J Biochem*, v.142. n.3, p.493-502, 1984.
56. WANG, H., et al. Specific immunohistochemical localization of type III collagen in porcine periodontal tissues using the peroxidase-antiperoxidase method. *J. Histochem. Cytochem.* v.28, p.1215-1223, 1980.
57. WISE, G.E., FAN, W. Changes in the tartrate-resistant acid-phosphatase cell-population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. *J Dent Res*, v.68, n.2, p.150-156, Feb., 1989.
58. YAMAMOTO, T., WAKITA, M. The development and structure of principal fibers and cellular cementum in rat molars. *J. Periodont. Res.*, v.26, p.129-137, 1991.
59. YAMAMOTO, T. et al. Bundle formation of principal fibers in rat molars. *J. Periodont. Res.*, Japan, v.27, p.20-27, 1992.

60. YAMAMOTO, T. et al. Site-specific expression mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin. *J. Histochem.*, v.42, p.885-896, 1994.
61. ZAMBRANO, G.S., MONTES, G.S., SHIGIHARA, K.M., SANCHEZ, E.M., JUNQUEIRA, L.C. Collagen arrangement in cartilages. *Acta Anat (Basel)*. V.113, n.1, p.26-38, 1982.
62. ZHANG, X. et al. Distribution of undulin, tenascin and fibronectin in the human periodontal ligament and Cementum; comparative immunoelectron microscopy with ultra-thin cryosections. *J. Histochem. Cytochem*, v.41, p.245-251, 1993.

