

MÔNICA MACHADO DUARTE

DISTRIBUIÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS NO LIGAMENTO
PERIODONTAL E NO PERIODONTO RELACIONADO AO ESMALTE DO INCISIVO
DE CAMUNDONGO, EM DIFERENTES CONDIÇÕES FUNCIONAIS. ESTUDO
RADIOAUTOGRÁFICO PELA INCORPORAÇÃO DE [³H]-FUCOSE.

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

PIRACICABA-SP

2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO DE...

MÔNICA MACHADO DUARTE

DISTRIBUIÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS NO LIGAMENTO
PERIODONTAL E NO PERIODONTO RELACIONADO AO ESMALTE DO INCISIVO
DE CAMUNDONGO, EM DIFERENTES CONDIÇÕES FUNCIONAIS. ESTUDO
RADIOAUTOGRÁFICO PELA INCORPORAÇÃO DE [³H]-FUCOSE.

Orientador: Prof. Dr. José Merzel

Banca examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Prof. Dr. Antônio Haddad

Prof. Dr. José Merzel

Este exemplar foi devidamente corrigido.
de acordo com a Resolução CCPG-036/R3
CPG. 21/7/04
Assinatura do Orientador

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

PIRACICABA-SP

2004

UNIDADE	SP
Nº CHAMADA	UNICAMP
	D85d
V	EX
TOMBO BC/	59621
PROC.	6.117-09
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	14,00
DATA	27.10.04
Nº CPD	

2004 13 823

Bib id 322847

Ficha Catalográfica

D85d Duarte, Mônica Machado.
 Distribuição de glicoproteínas no ligamento periodontal e no periodonto relacionado ao esmalte do incisivo de camundongo, em diferentes condições funcionais. Estudo radioautográfico pela incorporação de [³H]-Fucose. / Mônica Machado Duarte. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
 viii, 36f. : il.

Orientador : Prof. Dr. José Merzel.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Autorradiografia. 2. Proteínas. I. Merzel, José. 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 29 de Abril de 2004, considerou a candidata MONICA MACHADO DUARTE aprovada.

1. Prof. Dr. JOSÉ MERZEL

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. Merzel", written over a horizontal line.

2. Prof. Dr. ANTÔNIO HADDAD

A handwritten signature in black ink, appearing to be "A. Haddad", written over a horizontal line.

3. Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

A handwritten signature in black ink, appearing to be "S. Peres Line", written over a horizontal line.

Dedico este trabalho

Ao Professor Doutor José Merzel, Professor Titular do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP, que com dedicação, carinho e extrema paciência orientou este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Pedro Duarte Novaes, pelo auxílio no manejo com os animais e fotografia.

À Técnica Eliene Aparecida Orsini Narvaes Romani pelo auxílio no treinamento para microtomia dos cortes semifinos e pela colaboração com as fotografias.

À Aluna de pós-graduação Silvana pelos ajustes finais na correção deste trabalho.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Morfologia, que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Aos meus PAIS, Roberto e Angélica pela vida e oportunidades que me ofereceram, apoio constante na trilha da vida.

Aos meus irmãos, Ângela, Gustavo e Henrique, pelo carinho e cuidado sempre presentes.

À meu filho, Vinícius, pelo aprendizado de cada dia.

À minha cunhada, Rosana, que dedicando-se à Vinícius proporcionou-me tempo para que eu me empenhasse neste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUÇÃO.....	5
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	16
DISCUSSÃO.....	26
CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMO

Para analisar se o aumento da quantidade de proteínas não colágenas no ligamento periodontal de incisivos de ratos desimpedidos (hipofuncionais) está relacionado com o aumento da velocidade de erupção que ocorre nestes dentes, utilizamos a [³H]-fucose, precursor específico para glicoproteínas, e, através da radioautografia, observamos sua incorporação nos tecidos periodontais de incisivos de camundongos.

Camundongos fêmeas foram divididos em três grupos com 4 animais cada. Em dois grupos o incisivo inferior esquerdo foi cortado à altura da papila gengival, tornando-o hipofuncional enquanto o contralateral direito tornou-se hiperfuncional. No terceiro grupo os incisivos foram mantidos intactos e portanto normofuncionais. A [³H]-fucose foi injetada na veia caudal no seguinte esquema: 1) no primeiro grupo, 1 dia após a instalação da alteração funcional; 2) no 2º grupo 7 dias após a desocclusão do incisivo esquerdo (assim mantida com cortes a cada 48 horas) e 3) no grupo normofuncional no mesmo tempo que no grupo 2. Os camundongos foram perfundidos com fixador de Karnovsky, em grupos de dois, 8 e 96 horas após a injeção do precursor radioativo. As hemimandíbulas foram removidas, descalcificadas, divididas em segmentos transversais e incluídas em araldite. Cortes de 1µm das regiões relacionadas à crista alveolar, primeiro molar e região odontogênica, foram cobertos com emulsão nuclear Ilford K-5 e expostos durante 14 dias. As radiografias foram analisadas quantitativamente utilizando um sistema de análise de imagens, determinando-se a densidade de área de grãos de prata nos tecidos periodontais.

O exame microscópico das radioautografias mostrou que todos os tecidos dentais e periodontais do incisivo de camundongo apresentaram incorporação de [³H]-fucose, em graus variados de intensidade.

Nos tecidos periodontais houve um aumento da biossíntese de glicoproteínas fucosiladas nos dentes desimpedidos por 7 dias, comparado aos normofuncionais, hiperfuncionais e hipofuncionais de 1 dia, particularmente no periodonto relacionado ao esmalte e no ligamento periodontal relacionado ao osso alveolar. Estes resultados sugerem que o aumento da quantidade de glicoproteínas fucosiladas (entre as quais fibronectina, integrinas, receptor de EGF) nos tecidos periodontais, não está diretamente relacionado a erupção acelerada que se estabelece nos dentes hipofuncionais no 1^o dia de desoclusão. Como este aumento foi mais expressivo no tecido conjuntivo perivascular dos tecidos periodontais e ocorreu também na polpa, é possível que parte desta maior quantidade seja devida ao aumento dos receptores de EGF.

ABSTRACT

The periodontal ligament of unimpeded rat incisors show an increase in the amount of non-collagens proteins. To analyse if such increase is related to the higher eruption rate shown by those hipofunctional teeth we visualized through radiautography the uptake of ^3H -fucose by periodontal tissues.

Female mice were divided in three groups of four animals each. In two of these groups the left mandibular incisor was cut at the level of the gingival papila rendering the tooth hipofunctional while the contralateral incisor became hiperfunctional. In the third group the incisors were kept normofunctional. [^3H]-fucose was injected throug the caudal vein: 1) in the first group, 1 day after the shortening of the left incisor; 2) in the second group, 7 days after the left incisor became unimpeded (and so maintained by repeating the shortening every 48h); and 3) in the normofunctional group at same time of the second group. Two animals of each group were killed by intracardiac perfusion of Karnovsky's fixative at 8 and 96h after injection. The hemimandibules were removed, decalcified, divided in transversal segments and embedded in araldite. $1\mu\text{m}$ -thick sections of the regions related to the alveolar crest, first lower molar and odontogenic organ were covered with Ilford K-5 nuclear emulsion and exposed for 14 days. The area density of silver grains, over periodontal tissues was determined using an image analyzing system.

In different degrees of intensity all dental and periodontal tissues were labeled by ^3H -fucose. At 8h after the injection the silver grain density was markedly higher in the periodontal ligament related to the alveolar bone and in the enamel related periodontium of incisors kept unimpeded for 7 days as compared with all other groups. These results suggest that the increase of fucosileted glycoproteins (among them fibronectin, integrins

and EGF-receptor) in the periodontal tissues of unimpeded incisors is not related to the accelerated rate of the eruption which begins 1 day after their crown is shortened.

The uptake of ³H-fucose was conspicuously increased in the perivascular regions of the periodontal tissues and also in the pulp of 7 days hipofunctional incisors, indicating that the higher content of glycoproteins in these tissues may be related to the increase of EGF-receptors.

INTRODUÇÃO

Tecidos Periodontais

Os tecidos periodontais costumam ser agrupados em : 1) periodonto de proteção, formado pela gengiva e pelo epitélio juncional; 2) periodonto de sustentação, formado pelos tecidos derivados do folículo dental, que fixam os dentes à mandíbula e à maxila: osso alveolar, ligamento periodontal e cemento. Nos dentes de crescimento e erupção limitados, como os humanos e os molares de roedores, o ligamento periodontal é formado por feixes de fibras colágenas com orientação definida, que se inserem no cemento de um lado e no osso alveolar do outro através de fibras de Sharpey. Intermediando estes feixes temos um tecido conjuntivo mais frouxo, com vasos nervos e terminações nervosas.

Os incisivos de roedores são dentes de crescimento e erupção contínuos e para tanto apresentam um órgão odontogênico permanente na sua extremidade basal, responsável pela contínua formação dos tecidos dentais e paradentais. Embora inseridos num alvéolo como os dentes de crescimento e erupção limitados, os incisivos de roedores apresentam-se revestidos de cemento e ligamento periodontal (LP) somente nas faces mesial, lingual e parte da distal.

Na face labial e parte da distal os incisivos apresentam esmalte que é revestido pelo órgão do esmalte e entre este e o osso alveolar encontra-se um tecido conjuntivo, ricamente vascularizado, cujas fibras colágenas não se inserem no osso. Este tecido é denominado de periodonto relacionado ao esmalte (PE).

O ligamento periodontal dos incisivos de roedores apresenta também particularidades estruturais que o distingue do ligamento dos molares do mesmo animal. Nos incisivos o ligamento tem duas partes distintas: uma, junto ao cemento, rica em células com orientação definida e é avascular, a outra, junto ao osso alveolar, onde as

células não tem uma orientação nítida e apresenta grande quantidade de vasos. No ligamento dos molares não se observa esta divisão e os vasos parecem uniformemente distribuídos. Os feixes de fibras colágenas (fibras principais) nos molares parecem contínuos do cimento ao osso alveolar. Nos incisivos estes feixes são distintos apenas junto ao cimento e ao osso. Ao deixarem os tecidos duros onde se inserem estes feixes se dispõe em placas paralelas, interligadas entre si, quando observadas em cortes paralelos ao longo eixo do dente (Sloan, 1982).

Tanto o LP como o tecido conjuntivo do PE dos incisivos de roedores são derivados do folículo dental. Enquanto o PE pouca variação apresenta ao longo do dente, o LP apresenta uma nítida diferença de basal para incisal, notada pela organização crescente das fibras, diminuição da vascularização e aumento das fibras de Sharpey (Silva, 2002). São estes tecidos conjuntivos o objeto do presente estudo.

Constituintes do Ligamento Periodontal e do Periodonto relacionado ao Esmalte

Fibroblastos são as principais células do LP e do PE. No LP estas células tem características ultraestruturais de células bastante ativas em biossíntese (Beertsen et al., 1974). Estudo morfométrico comparativo entre fibroblastos do LP do PE não mostrou maiores diferenças na quantidade de suas principais organelas (Moxham et al., 1991).

No LP além de fibroblastos são encontradas células osteogênicas, osteoclastos e osteoblastos, junto ao osso alveolar e células cementogênicas e cementoblastos, e eventualmente cementoclastos junto ao cimento. Células osteo e cementogênicas não se distinguem morfológicamente dos fibroblastos. Células epiteliais encontram-se dispersas no LP, isoladas ou formando ilhotas e constituem os restos epiteliais de Malassez, originários da bainha epitelial do órgão do esmalte. Completam este quadro, células de defesa,

macrófagos e mastócitos, células mesenquimais indiferenciadas, vasos, nervos e terminações nervosas.

No PE não se encontram normalmente células das linhagens de osso e de cimento bem como restos epiteliais. Além das demais células encontradas em tecidos conjuntivos, junto ao osso alveolar observa-se a presença de osteoclastos, cuja quantidade aumenta de basal em direção à crista alveolar (Irie e Ozawa, 1990). Em condições experimentais, na ausência do órgão de esmalte o PE pode gerar cimento e é capaz de se transformar em LP (Merzel, observações não publicadas).

A matriz extracelular (MEC) do LP é formada principalmente por constituintes fibrosos entre os quais se destaca o colágeno tipo I. Outros tipos de colágeno encontrados são o III, V e XII que também formam fibrilas e os colágenos não fibrilares o IV e VI (Mariotti, 1993). Entre as proteínas não colágenas são descritas a fibronectina, tenascina, osteonectina, laminina e as glicosaminoglicanas: heparan sulfato, dermatan sulfato, condroitin-6 sulfato, formando as proteoglicanas versican, decorina, biglican e syndecan, como também o ácido hialurônico (Mariotti, 1993). Há ainda as proteínas do sistema elástico; apesar do LP não apresentar fibras elásticas típicas, ele contém uma quantidade apreciável de fibras elásticas consideradas imaturas: oxitalânicas e eulanínicas (Johnson e Pylipis, 1992).

Não encontramos nenhum estudo detalhando a composição da MEC do PE, mas como este tecido tem a mesma origem do LP e pode em condições experimentais se transformar em LP (Merzel, observações não publicadas), é de se supor que a maioria dos constituintes, produtos de secreção de fibroblastos, sejam os mesmos.

As proteínas mencionadas acima são quase todas glicoproteínas, assim definidas pela presença de um ou mais oligossacarídeos ligados covalentemente à cadeia protéica

(Nelson e Cox, 2000). A maioria de proteínas secretadas, como as da MEC, as do plasma sanguíneo, hormônios, enzimas, bem como as que fazem parte da membrana citoplasmática, servindo de receptores ou de moléculas de adesão são glicoproteínas (Sharon, 1974; Sharon e Lis,1993).

Funções do LP e do PE

O LP tem várias funções. A principal parece ser a de sustentação do dente, permitindo sua fixação ao mesmo tempo em que amortece as forças mastigatórias impedindo que elas afetem diretamente o tecido ósseo. Esta propriedade é exercida pelos componentes fibrosos e amorfos da matriz extracelular. As terminações nervosas presentes em grande número proporcionam a função sensorial do LP, principalmente de propriocepção. Pela presença de células específicas, o LP participa da cementogênese e da remodelação do osso alveolar.

Outra função atribuída ao LP é a de ser responsável pela erupção dental, um dos movimentos fisiológicos do dente. O processo de erupção dental, contudo, tanto por seu mecanismo como pelos tecidos envolvidos é ainda bastante controverso (Cahill et al., 1988; Moxham e Berkovitz, 1955). As evidências mais atuais indicam que o folículo dental relacionado à coroa do dente é essencial para criar, na fase intra-óssea do desenvolvimento dental, através de reabsorção óssea seletiva, a via eruptiva (Gorski e Marks, 1992). Na fase supra-óssea do desenvolvimento dental quando o dente transita pela mucosa bucal , rompendo-a até atingir o plano oclusal, é que se situam as maiores divergências entre os autores. Estas divergências em parte estão relacionadas com os modelos experimentais usualmente utilizados no estudo da erupção dental. Os autores que utilizam dentes de crescimento e erupção contínuos, como os incisivos de roedores, na sua grande maioria considera o LP como responsável pelo movimento eruptivo constante. Dois mecanismos

são sugeridos: 1) tração do dente pela contração de fibroblastos e/ou colágeno; 2) o dente seria “empurrado” pela pressão hidrostática vascular e dos tecidos moles ao redor do dente. A primeira hipótese tem hoje poucos indícios favoráveis, enquanto a segunda tem melhores evidências (Moxham, 1994; Moxham e Berkovitz, 1995). Os que utilizam dentes de crescimento e erupção limitados, como os molares de ratos e cães, sugerem que o desenvolvimento do dente e a remodelação óssea controlada pelo folículo dental explicavam o movimento eruptivo na fase supra-óssea (Marks e Schroeder, 1996).

Ao PE não foi atribuída nenhuma função além de servir de proteção ao órgão do esmalte. O PE mais o órgão do esmalte do incisivo de rato, são análogos aos tecidos que revestem a coroa dos molares em formação (estágio de coroa). O tecido conjuntivo do PE é análogo ao folículo dental descrito em molares, é porém mais vascularizado. Recentemente foi mostrado que lesões provocadas no PE retardam a erupção de incisivos de ratos, ao passo que lesões similares no LP não tem efeito no movimento eruptivo (Merzel et al., 2000 b). Dentes que tem sua porção odontogênica removida continuam a erupcionar até a base do dente atingir a crista alveolar da face labial. Nesta situação não existe mais PE, enquanto nas demais faces resta uma pequena porção do LP (Merzel et al., 2000 a). Em molares irradiados as raízes não se formam (Gowgiel, 1967), ou quando os tecidos que as formam são cirurgicamente removidos (Cahill e Marks, 1980), não havendo, portanto, formação de LP, as coroas destes dentes erupcionaram normalmente.

Metabolismo protéico do LP e PE

O ligamento periodontal é possivelmente o tecido conjuntivo com o mais alto nível de metabolismo protéico (Carneiro e Moraes, 1965) . A taxa de síntese de colágeno no LP do molar do camundongo é duas vezes mais rápida que no corion da gengiva inserida e quatro vezes mais que na derme. A meia vida do colágeno recém-sintetizado é de 24 min

no osso alveolar, 40 min no LP, 80 min na gengiva e de 360 min na derme. A meia vida do colágeno maduro é de 1 dia no LP , 5 dias na gengiva, 6 dias no osso alveolar e de 15 dias na derme. No LP de molares de rato a taxa de renovação do colágeno é cerca de três vezes maior que no LP do incisivo. Esta taxa para as proteínas não colágenas é aproximadamente igual no LP dos dois tipos de dentes (Sodek, 1977). Contudo a metodologia utilizada (análise do LP como um todo) não mostraria a real diferença (Kanoza et al., 1980) pois enquanto nos incisivos a remodelação do colágeno se daria numa estreita faixa do LP (Bertseen e Everts, 1977) nos molares ela ocorreria em toda a espessura do tecido (Bertseen et al., 1978).

Alguns estudos mostram a renovação do colágeno significativamente acelerada em dentes hipofuncionais, tanto em molares (Rippin,1978) como em incisivos de roedores (Bertseen e Everts,1977; Kanoza et al., 1980). Esta renovação acelerada do colágeno não parece estar ligada à função de sustentação do LP, uma vez que os dentes hipofuncionais perdem sustentação sendo extraídos mais facilmente que os normofuncionais (Chiba et al., 1981; Komatsu,1988). A taxa de renovação do colágeno porém, parece ter um paralelismo com a taxa de erupção. Os molares hipofuncionais tendem a erupcionar mais que os normais ultrapassando o plano oclusal. Nos incisivos hipofuncionais (ou desimpedidos, termo consagrado na literatura) a taxa de erupção duplica ou quase triplica. Há porém, relatos de resultados diferentes. Em molares de rato, a hipofunção só aceleraria a meia-vida de proteínas marcadas com prolina tritiada no LP da região próxima à crista alveolar (Rippin, 1976, 1978). Em incisivos de ratos, Van den Bos e Tonino (1984) não evidenciaram diferenças na meia-vida e na quantidade de colágeno entre os LP de dentes normo e hipofuncionais. O mesmo foi observado por Polacow e Merzel (1994) em camundongos. Em relação às proteínas não colágenas seu metabolismo parece ser

semelhante entre incisivos e molares de rato sendo uma fração de atividade metabólica baixa e outra de alta atividade (Sodek, 1977 e 1978). A quantidade de proteínas não colágenas aumenta em 33% nos incisivos desimpedidos (hipofuncionais) em relação aos normofuncionais (Van den Bos e Tonino, 1984). Um aumento expressivo de glicosaminoglicanas ocorre no LP de incisivos desimpedidos e uma diminuição acentuada ocorre em incisivos cirurgicamente paralisados (Kirkham et al., 1993).

Quanto ao PE não encontramos nenhum dado relativo ao metabolismo protéico. A única indicação que este tecido tem grande atividade metabólica é a quantidade das organelas relacionadas à secreção de seus fibroblastos, como já referido (Moxham et al., 1991), e que o folículo dental incorporara intensamente ³H-prolina (Topham et al., 1987).

Justificativa e objetivo

Os dados relativos às proteínas não colágenas e glicosaminoglicanas, acima descritas, parecem indicar uma possível relação do LP com o processo eruptivo. Seu aumento na condição hipofuncional poderia ser efeito ou causa da erupção acelerada observada nestes dentes. Os resultados em relação às glicosaminoglicanas sugerem que o aumento descrito seja um efeito. Este aumento foi observado 3 semanas após o início da hipofunção (Kirkham et al., 1993) não sendo detectado após 2 semanas de hipofunção (Van den Bos e Tonino, 1984). Um aumento de um componente tissular tanto pode ser produzido por um aumento de sua biossíntese ou uma diminuição de sua degradação e isto pode ser detectado através de um estudo cinético com o emprego de um precursor adequado.

Nos incisivos a aceleração da erupção ocorre 4 a 6 horas após a desoclusão do dente, atingindo a velocidade máxima 18 a 24 horas após (Chiba et al., 1976).

Como vimos a maioria das proteínas constituintes da MEC secretadas pelos fibroblastos e as que fazem parte de sua membrana plasmática são glicoproteínas. Os

precursores adequados para estudar seu metabolismo são tanto os aminoácidos como os monossacarídeos que as compõem. Apenas 9 monossacarídeos formam os oligossacarídeos ligados a cadeia peptídica das glicoproteínas (Sharon,1974; Haddad,1998). Destes monossacarídeos o precursor mais eficiente é a fucose, inclusive quando comparado a vários aminoácidos (Haddad, 1998). O único destino da fucose injetada no organismo animal é ser incorporada em glicoproteínas recém-sintetizadas, pois não é convertida em qualquer outro monossacarídeo e apenas 2% da dose é convertida em água e CO₂ , num período de 10 horas (Benett et al., 1974; Haddad, 1998). Nem todas as glicoproteínas, porém, contêm fucose, como é o caso do colágeno tipo I. Entre as glicoproteínas da MEC dos tecidos conjuntivos sabidamente fucosiladas são: a fibronectina (Shuttleworth et al., 1982; Fukuda et al., 1982), a p115 associada a elastina (Colombatti et al., 1988), o colágeno VI humano e o IV do camundongo (Fujiwara et al., 1991). E entre os constituintes da membrana plasmática de fibroblastos o receptor de EGF (Soderquist e Carpenter, 1984) e 50% dos oligossacarídeos de uma das integrinas, a $\alpha_5\beta_1$, são fucosilados (Nakagawa et al., 1996). Essa integrina é um dos receptores preferenciais da fibronectina (Kapila et al., 1998).

O objetivo do presente estudo foi analisar através da radioautografia a incorporação de [³H]-fucose nos tecidos periodontais de incisivos de camundongos hipofuncionais comparando-a com a de incisivos normofuncionais e hiperfuncionais. Como a aceleração dos incisivos hipofuncionais ocorre já no primeiro dia da desoclusão, a incorporação será analisada administrando-se o precursor 1 dia e 7 dias após o desimpedimento, e, assim, verificar se o eventual aumento de proteínas não colágenas pode ser relacionado com a erupção acelerada destes dentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Doze camundongos, fêmeas (Swiss), adquiridos do CEMIB-UNICAMP, pesando em média 30 ± 2 g, foram divididos em três grupos de 4 animais cada. Nos grupos 1 e 2 o incisivo inferior esquerdo foi seccionado à altura da papila gengival e o corte foi repetido em dias alternados, até o fim do experimento, mantendo estes dentes desimpedidos e portanto em condições hipofuncionais. O incisivo contralateral é sobrecarregado na mastigação é considerado hiperfuncional (Steigman et al., 1989), pois mantém contato com os dois incisivos superiores, e o comprimento da coroa clínica destes incisivos superiores se mantém inalterada. Os animais do grupo 3 foram mantidos com os incisivos em normofunção.

A [^3H]-fucose ([$5,6 \text{ } ^3\text{H}$]fucose, AE 9.08 GBq/mg, Amersham International) foi injetada via intravenosa (veia caudal) na dose de 0,481MBq/g de peso corporal. Os animais do grupo 1 receberam a fucose 1 dia após o início do desimpedimento dos incisivos e os do grupo 2, foram injetados 7 dias após. Os animais do grupo 3 foram injetados ao mesmo tempo que os animais do grupo 2.

Em cada grupo, dois animais foram sacrificados 8h e dois, 96h após a injeção do precursor radioativo. Os animais foram anestesiados com vapor de éter etílico e perfundidos por 15 minutos através do ventrículo esquerdo com fixador de Karnovsky. As hemimandíbulas foram dissecadas e, após a remoção dos tecidos moles externos, permaneceram no mesmo fixador por mais 4 horas. Após lavagem em tampão fosfato 0,1M pH 7,2-7,4 os ossos foram descalcificados em EDTA 5% no mesmo tampão fosfato.

Cada hemimandíbula foi dividida em seis segmentos, e três destes segmentos, designados de R1, R3 e R6 e relacionados respectivamente à crista alveolar, primeiro molar

e região odontogênica (fig.1), foram desidratados em concentrações crescentes de acetona e embebidos em araldite.

De cada região, dois cortes não consecutivos, com intervalo superior a $10\mu\text{m}$ entre eles, foram montados em lâminas e cobertos com emulsão nuclear Ilford K-5. As radioautografias foram reveladas com 14 dias de exposição, coradas com safranina 2%, secas e montadas com bálsamo do Canadá.

A densidade dos grãos de prata foi determinada sob objetiva de 100x, usando um sistema de análise de imagens (KS 400, Kontron Electronics, Germany). Os grãos de prata foram segmentados e a sua área foi medida num retículo de $160\mu\text{m}^2$ nos seguintes tecidos periodontais do incisivo: LP relacionado ao osso alveolar, LP relacionado ao dente (cimento) e tecido conjuntivo periodontal junto ao órgão do esmalte (PE) (fig. 2). Em cada tecido, nas três regiões os grãos de prata foram medidos em 6 áreas de $160\mu\text{m}^2$, sendo expressas em densidade de área ($\mu\text{m}^2/160\mu\text{m}^2$). As áreas, embora escolhidas ao acaso, foram demarcadas de modo a evitar tanto quanto possível vasos, que são abundantes e relativamente grandes (seios venosos) no LP junto ao osso alveolar. e no PE . Como controle interno, a densidade dos grãos de prata foi determinada em seis áreas de igual tamanho de dentina junto à polpa dental.

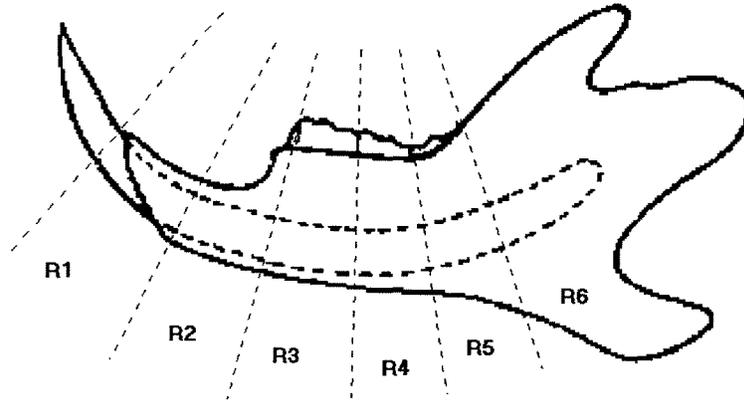


Figura 1 - Esquema mostrando hemimandíbula de rato indicando os limites dos segmentos em que a hemimandíbula foi dividida. Foram utilizadas no estudo as regiões R1, R3 e R6.

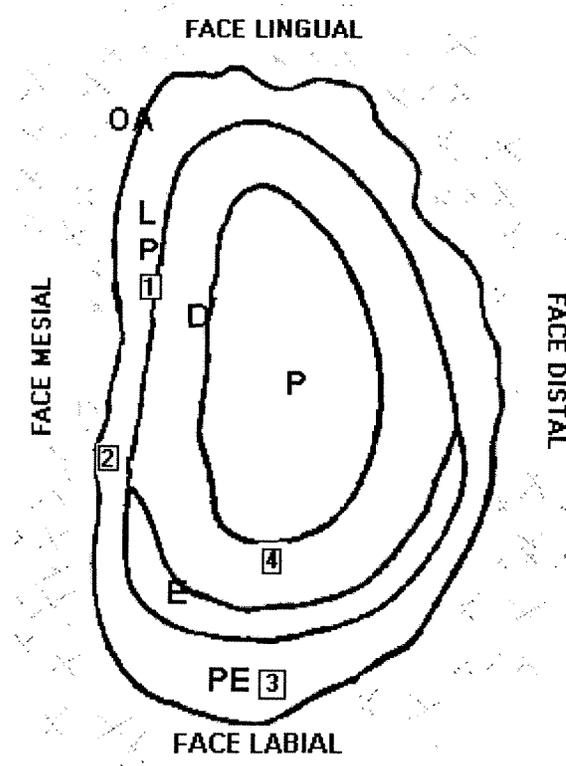


Figura 2 -Esquema de corte transversal de hemimandíbula do camundongo indicando esquematicamente suas estruturas: LP-ligamento periodontal, OA-osso alveolar, P-polpa dental, D-Dentina, E-Esmalte, PE-periodonto relacionado ao esmalte.As áreas numeradas indicam os locais onde foi feita a avaliação quantitativa da incorporação de fucose: 1 - LP junto ao dente, 2 - LP junto ao OA, 3 - PE e 4 – dentina.

RESULTADOS

O exame microscópico das radioautografias mostrou que todos os tecidos dentais e periodontais apresentaram incorporação da [^3H]-fucose, em graus variados de marcação pelos grãos de prata reduzida.

A distribuição dos grãos de prata nos tecidos periodontais de animais do grupo 1 (que receberam o precursor radioativo 1 dia após o desimpedimento dos incisivos esquerdos), aparentemente, não apresentaram diferenças visíveis entre os dentes hipofuncionais e os hiperfuncionais, bem como em relação aos dentes do grupo 3 (controle) no tempo de 8h após a injeção de ^3H -fucose (fig. 3a, 3c, 3e, e 4a, 4c, 4e). Às 96h após a injeção, em todos estes tecidos, a intensidade de reação radioativa decresceu, também sem diferenças entre as diferentes condições funcionais (compare as figuras 3a e 4a com as figuras 3b e 4b, respectivamente).

Nos animais do grupo 2 (que receberam o precursor no 7^o dia após o desimpedimento) observou-se, no PE uma nítida diferença na concentração de grãos de prata que foi maior nos incisivos esquerdos hipofuncionais do que nos contralaterais hiperfuncionais e nos incisivos controles, 8h após a injeção da fucose (compare a figura 3d com as demais, no mesmo período de tempo). A mesma diferença embora menor foi observada no LP junto ao osso alveolar, (compare as figuras 4d com as demais no mesmo período de tempo). Estas diferenças não foram aparentes no tempo de 96h após a injeção da fucose, quando a reação diminuiu em todos os tecidos periodontais. No PE de dentes hipofuncionais com 7 dias de desimpedimento o aumento da reação radioativa, 8h após a injeção do precursor, mostrou-se bem mais acentuada no tecido conjuntivo perivascular (fig. 3d). Aspecto semelhante pode ser observado no LP-O, na região 6 onde os vasos são mais abundantes (fig. 6a) e também na polpa (fig. 6b).

Na dentina, nas diferentes condições experimentais, 8h após a administração do precursor radioativo a reação ficou limitada à dentina no limite com a pré-dentina (fig. 5a, 5c e 5e). Após 96 horas (fig. 5b, 5d e 5f), a dentina apresentava uma faixa de intensa radioatividade e entre esta faixa e a pré-dentina, a reação apresentou-se difusa e de menor intensidade, de acordo com o descrito em relação à incorporação de aminoácidos (Josephsen e Warshawsky, 1982).

Os dados da quantificação da reação radioativa, estão na tabela 1 e nos gráficos das figs. 7 e 8. Embora o número de repetições usado não se preste a uma análise estatística, estes dados quantitativos confirmaram as observações qualitativas acima descritas. Permitiram mais, assinalar alguns aspectos que não puderam ser observados através da comparação qualitativa das radioautografias.

No PE (fig. 7a) a reação radioativa foi de intensidade crescente, de R1 para R6 nos incisivos normofuncionais, 8h após a injeção do precursor. O mesmo aconteceu com os hipofuncionais de 7 dias, embora a diferença entre R1 e R3 seja discreta. Neste mesmo intervalo de tempo, a reação nos hiperfuncionais de 1 e 7 dias e nos hipofuncionais de 1 dia foi menos intensa do que nos normofuncionais e nestes menos intensa que nos hipofuncionais de 7 dias (fig.7a). Na intensidade de 96h após a injeção houve uma diminuição acentuada da reação em todas as condições em relação ao tempo de 8h.

No LP-O (fig. 7b), 8h após a injeção, a quantificação mostrou praticamente a mesma tendência observada no PE. Não ocorreram porém diferenças entre os normofuncionais e as demais condições, com exceção dos hipofuncionais de 7 dias que em R1 e R6 apresentaram uma intensidade de reação nitidamente maior. Às 96h o decréscimo da reação em relação ao tempo de 8h foi generalizada com exceção provável, dos dentes hiperfuncionais de 1 dia em R1.

No LP-D (fig. 8a), 8h após a injeção, os normofuncionais, os hiperfuncionais de 7 dias e hipofuncionais de 1 dia apresentaram uma maior concentração de grãos de prata em R3 e R6 em relação a R1. Nos hipofuncionais de 7 dias, esta concentração foi maior em R1 e R6 em relação a R3, sendo maior também que todas as outras condições. Nos hiperfuncionais de 1 e 7 dias a reação foi mais intensa que a dos normofuncionais em R1 e R6. Às 96h após a injeção, a reação diminuiu com exceção dos normofuncionais em R1 e com os hipofuncionais de 1 dia em R1 e R3.

Na dentina (fig. 8b) dos normofuncionais, a R3 foi que apresentou a maior concentração de grãos de prata, seguida em intensidade pela R1 e R6, 8h após a administração do precursor. O mesmo aconteceu com os hiper e os hipofuncionais de 1 dia. Nos hiper e hipofuncionais de 7 dias, a intensidade da reação decresceu de R1 para R6. Neste tecido a tendência foi a de aumento da concentração de grãos às 96h em relação ao tempo de 8h após a injeção do precursor. Aparentemente, não houve este aumento da reação radioativa nos hiperfuncionais de 1 dia em R3, hipofuncionais de 1 dia em R3 e R6 e nos hipofuncionais de 7 dias em R6.

Tabela1- Médias (\pm EPM) das densidades de grãos de prata ($\mu\text{m}^2/160\mu\text{m}^2$), 8 e 96h após a injeção de ^3H -fucose nos tecidos periodontais e dentina de incisivos de camundongo em diferentes condições funcionais.

<u>TEMPO</u>	<u>CONDIÇÃO FUNC.</u>	<u>REGIÃO</u>	<u>PE</u>	<u>LP-O</u>	<u>LP-D</u>	<u>DENTINA</u>
8h	N	1	3,15 \pm 0,20	1,73 \pm 0,10	2,27 \pm 0,12	5,47 \pm 0,35
	Hr1		2,28 \pm 0,18	2,22 \pm 0,20	2,17 \pm 0,24	4,62 \pm 0,54
	Hr7		2,57 \pm 0,33	2,46 \pm 0,25	2,48 \pm 0,21	6,12 \pm 0,90
	Ho1		2,36 \pm 0,19	1,68 \pm 0,17	1,75 \pm 0,25	4,81 \pm 0,43
	Ho7		4,40 \pm 0,45	3,51 \pm 0,54	3,76 \pm 0,38	8,14 \pm 0,91
8h	N	3	3,87 \pm 0,26	3,41 \pm 0,19	3,68 \pm 0,26	7,40 \pm 0,58
	Hr1		3,16 \pm 0,26	2,73 \pm 0,25	3,08 \pm 0,22	6,66 \pm 0,86
	Hr7		3,27 \pm 0,33	3,47 \pm 0,29	3,60 \pm 0,41	5,11 \pm 0,66
	Ho1		2,13 \pm 0,19	2,16 \pm 0,19	3,19 \pm 0,37	7,39 \pm 0,96
	Ho7		4,74 \pm 0,60	2,68 \pm 0,32	4,10 \pm 0,49	5,17 \pm 0,68
8h	N	6	4,50 \pm 0,37	3,04 \pm 0,27	4,64 \pm 0,36	3,58 \pm 0,26
	Hr1		2,90 \pm 0,27	2,30 \pm 0,24	3,79 \pm 0,31	3,25 \pm 0,32
	Hr7		2,76 \pm 0,42	3,58 \pm 0,42	4,27 \pm 0,40	3,67 \pm 0,48
	Ho1		4,00 \pm 0,35	2,62 \pm 0,28	3,77 \pm 0,41	2,65 \pm 0,29
	Ho7		6,60 \pm 0,72	4,25 \pm 0,28	6,76 \pm 0,70	3,29 \pm 0,41
96h	N	1	1,82 \pm 0,14	1,71 \pm 0,14	1,72 \pm 0,09	8,14 \pm 0,61
	Hr1		1,81 \pm 0,20	1,53 \pm 0,14	1,86 \pm 0,21	8,51 \pm 1,02
	Hr7		0,99 \pm 0,09	1,42 \pm 0,22	1,26 \pm 0,10	12,76 \pm 2,14
	Ho1		1,39 \pm 0,12	1,73 \pm 0,18	1,36 \pm 0,15	8,15 \pm 0,88
	Ho7		1,52 \pm 0,13	2,23 \pm 0,37	1,81 \pm 0,25	12,56 \pm 0,98
96h	N	3	2,18 \pm 0,21	2,20 \pm 0,13	2,42 \pm 0,15	10,45 \pm 0,80
	Hr1		1,53 \pm 0,17	1,75 \pm 0,14	1,59 \pm 0,16	6,02 \pm 0,56
	Hr7		1,57 \pm 0,18	2,20 \pm 0,35	2,04 \pm 0,29	9,21 \pm 2,57
	Ho1		1,70 \pm 0,16	2,20 \pm 0,20	2,26 \pm 0,25	7,02 \pm 1,16
	Ho7		1,24 \pm 0,12	3,02 \pm 0,32	2,57 \pm 0,30	11,71 \pm 1,15
96h	N	6	2,67 \pm 0,16	2,15 \pm 0,16	2,99 \pm 0,24	4,26 \pm 0,38
	Hr1		2,06 \pm 0,25	1,88 \pm 0,21	1,43 \pm 0,11	3,95 \pm 0,44
	Hr7		1,62 \pm 0,16	1,60 \pm 0,15	1,94 \pm 0,15	4,96 \pm 0,84
	Ho1		1,19 \pm 0,18	2,27 \pm 0,24	1,82 \pm 0,26	1,84 \pm 0,19
	Ho7		2,70 \pm 0,28	2,04 \pm 0,22	2,20 \pm 0,32	3,25 \pm 0,51

PE- Periodonto relacionado ao esmalte

LP-D Ligamento periodontal junto ao dente

LP-O Ligamento periodontal junto ao osso N- Normofuncional

Hr1-Hiperfuncional 1

dia Hr7- Hiperfuncional 7 dias Ho1-Hipofuncional 1 dia

Ho7- Hipofuncional 7 dias.

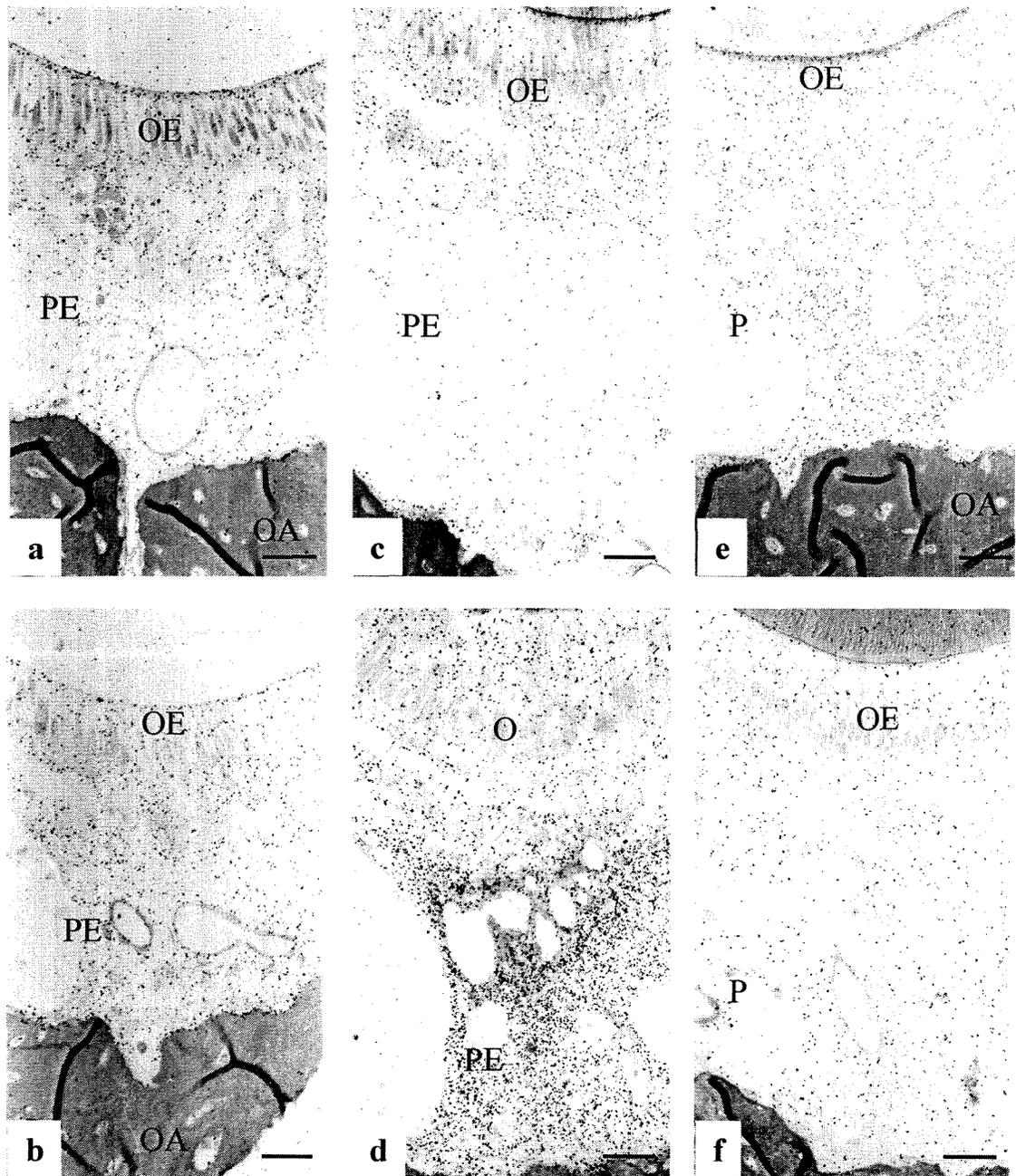


Figura 3 – Radioautografias do periodonto relacionado ao esmalte (PE) da região 3, de incisivos de camundongo, em diferentes condições funcionais: normofuncional, (a)8h e (b)96h após a injeção de $[^3\text{H}]$ -fucose; (c) hipofuncional de 1dia, (d) hipofuncional de 7 dias, (e) hiperfuncional de 1dia, e (f) hiperfuncional de 7dias, 8h após a injeção de $[^3\text{H}]$ -fucose. Note o aumento da reação radioativa no PE de incisivos hipofuncionais de 7 dias (fig. 3d), particularmente na região perivascular. OE- Órgão do esmalte, OA- Osso alveolar. Safranina 2%. Barra = 20 μm .

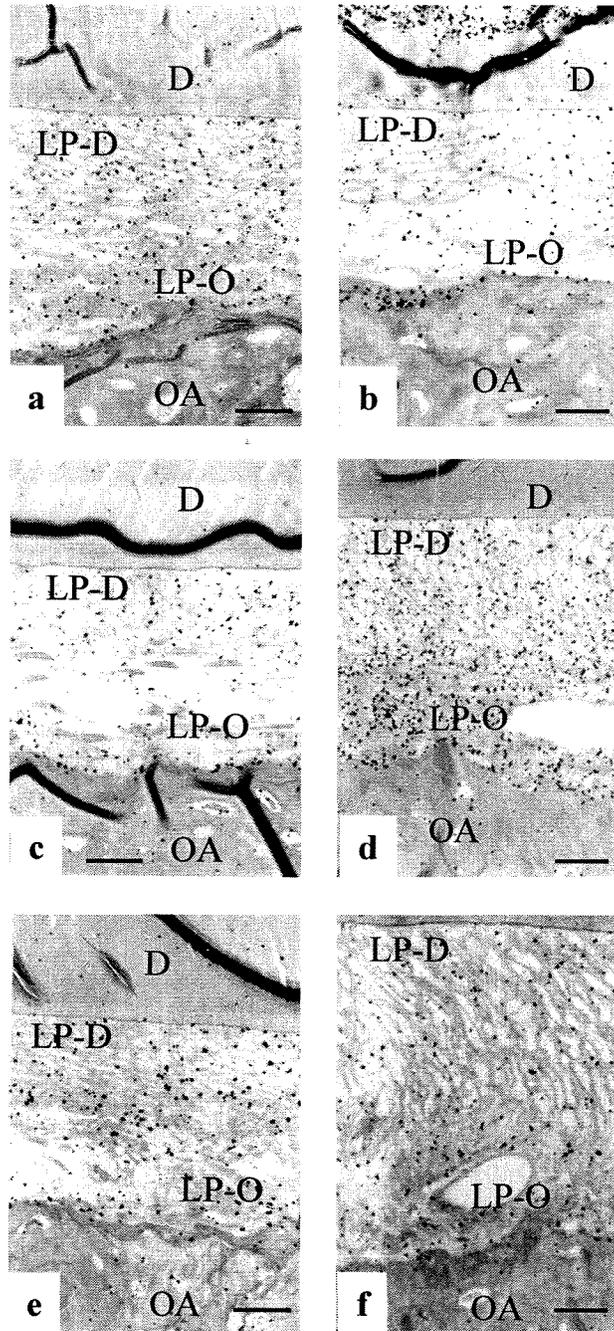


Figura 4 – Radioautografias do ligamento periodontal da região3 de incisivos de camundongo em diferentes condições funcionais: normofuncional, (a)8h e (b)96h após a injeção de $[^3\text{H}]$ -fucose; (c) hipofuncional de 1dia, (d) hipofuncional de 7 dias, (e) hiperfuncional de 1dia, e (f) hiperfuncional de 7dias, 8h após a injeção de $[^3\text{H}]$ -fucose. Note o aumento da concentração de grãos de prata no LP-O de incisivos hipofuncionais de 7 dias (fig. 4d). D-Dentina, OA-Osso alveolar, LP-O - Ligamento periodontal junto ao osso, LP-D – Ligamento periodontal junto ao dente. Safranina 2% . Barra = 20 μm .

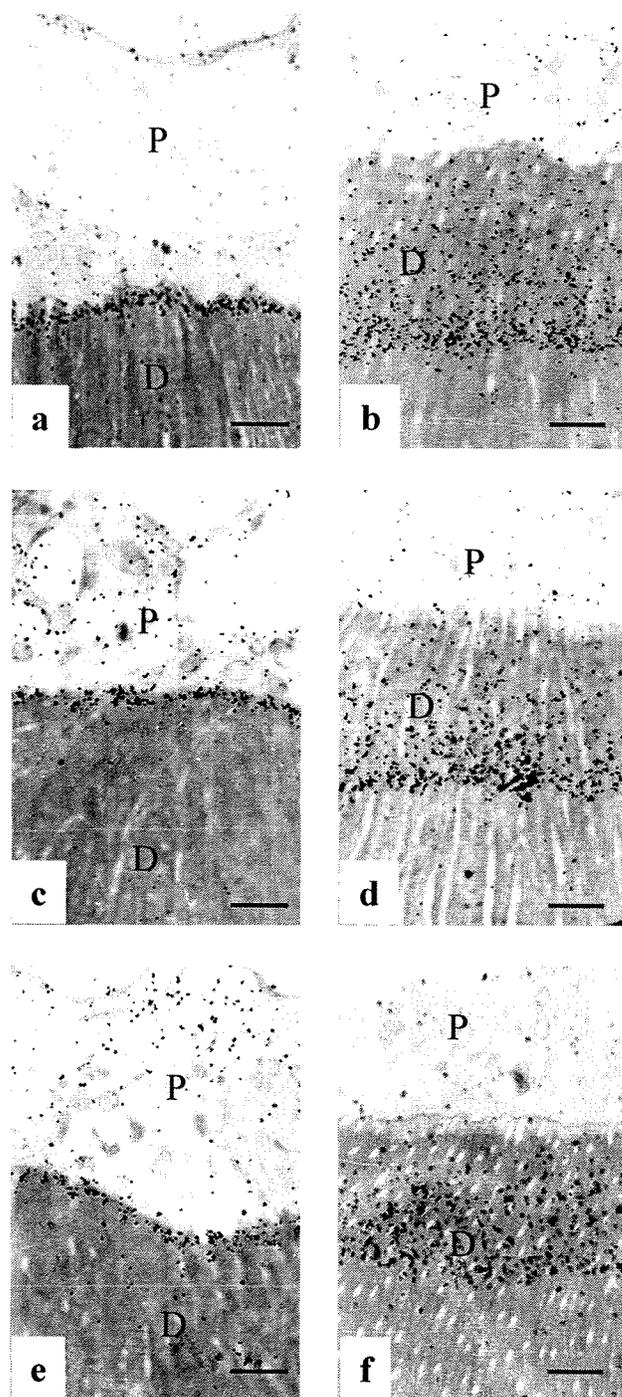


Figura 5 – Radioautografias da dentina (D) da região 1 de incisivos de camundongo em diferentes condições funcionais: (a,b) normofuncional, (c,d) hipofuncional de 7 dias, e (e,f) hiperfuncional de 7 dias, 8h (a,c,e) e 96h (b,d,f) após injeção de [^3H]-fucose . D-Dentina, OA- Osso alveolar, P- Polpa. Safranina 2%..Barra =. 20 μm .

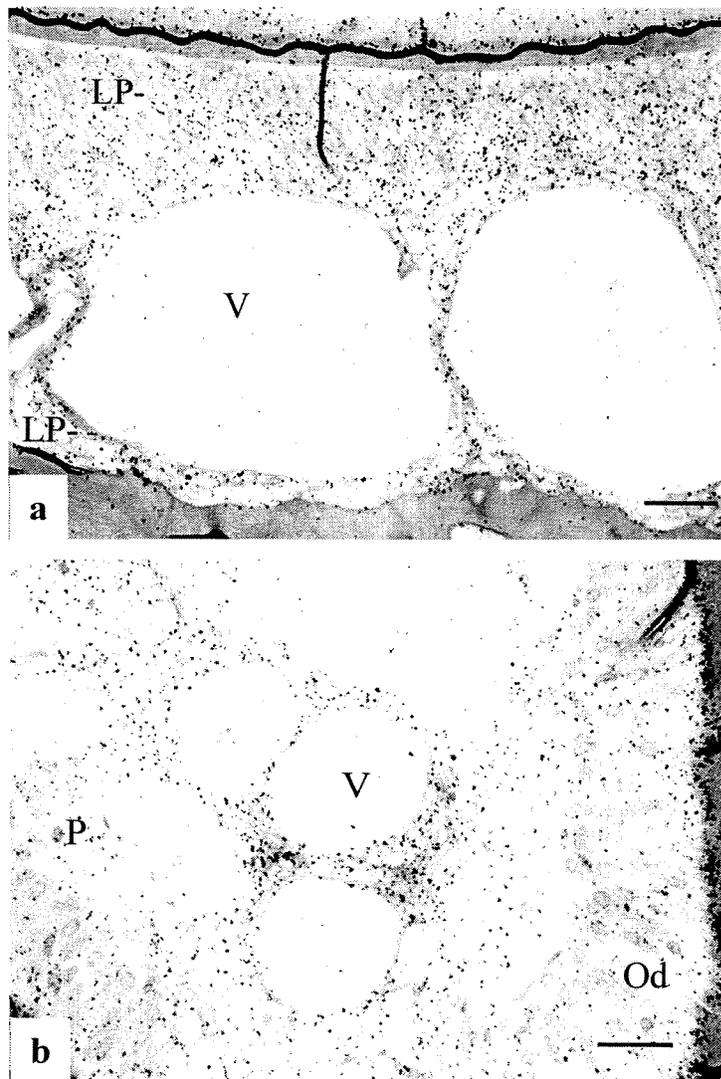


Figura 6 – Radioautografias mostrando a maior concentração de grão de prata no tecido conjuntivo perivascular do LP (a) e da polpa (b), na região 6 dos incisivos de camundongo hipofuncionais de 7 dias, 8h após a injeção de [^3H]-fucose. V-vasos, LP-D- ligamento junto ao dente, LP-O- ligamento junto ao osso alveolar, Od- Odontoblastos. Safranina 2%. Barra = 20 μm .

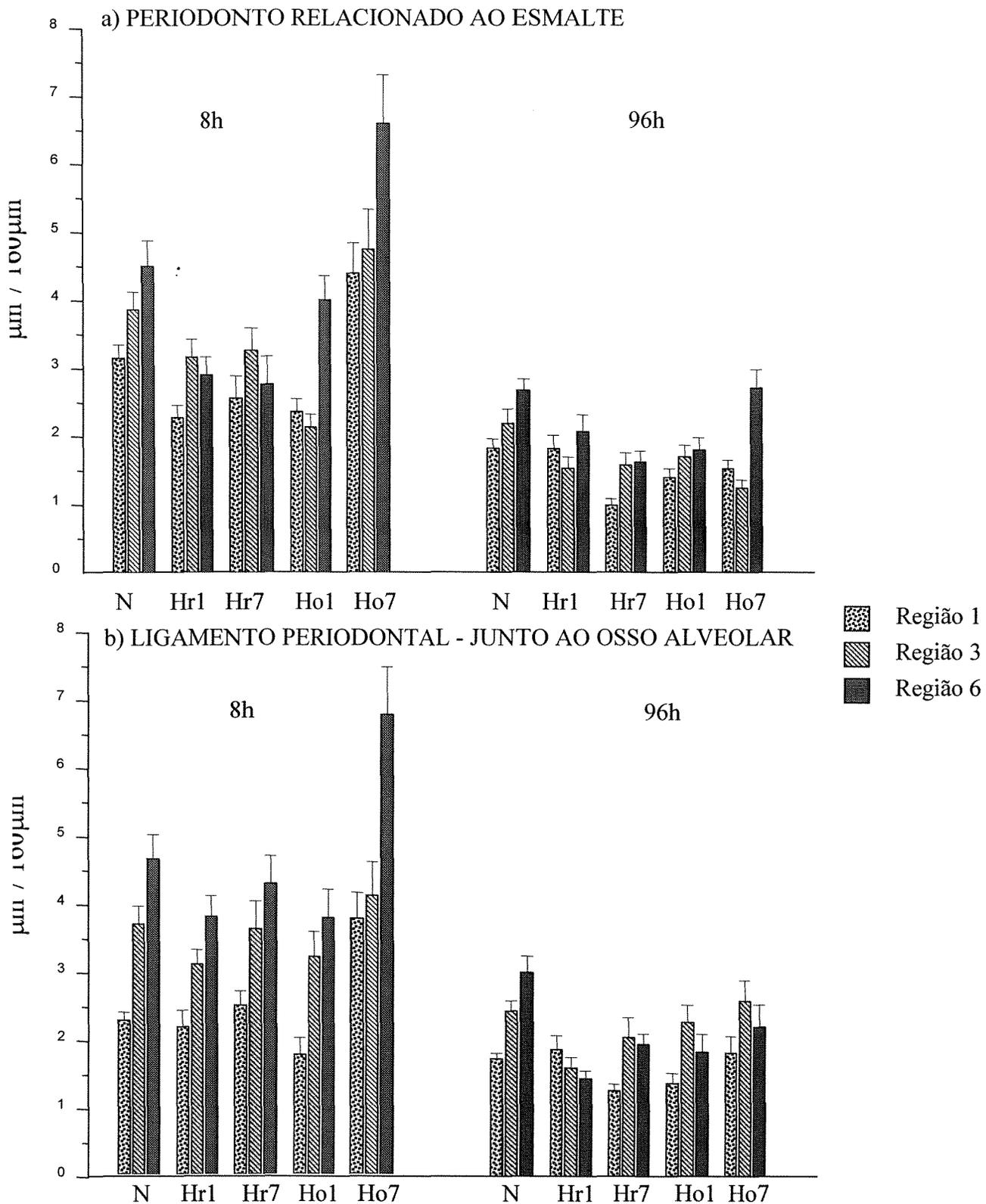


Figura 7- Médias (\pm EPM) das densidades de grãos de prata, 8 e 96h após a injeção de ^3H -fucose, em tecidos de incisivos de camundongo nas diferentes condições funcionais. N- Normofuncional, Hr1- Hiperfuncional 1 dia, Hr7- Hiperfuncional 7 dias, Ho1- Hipofuncional 1dia Ho7- Hipofuncional 7 dias.

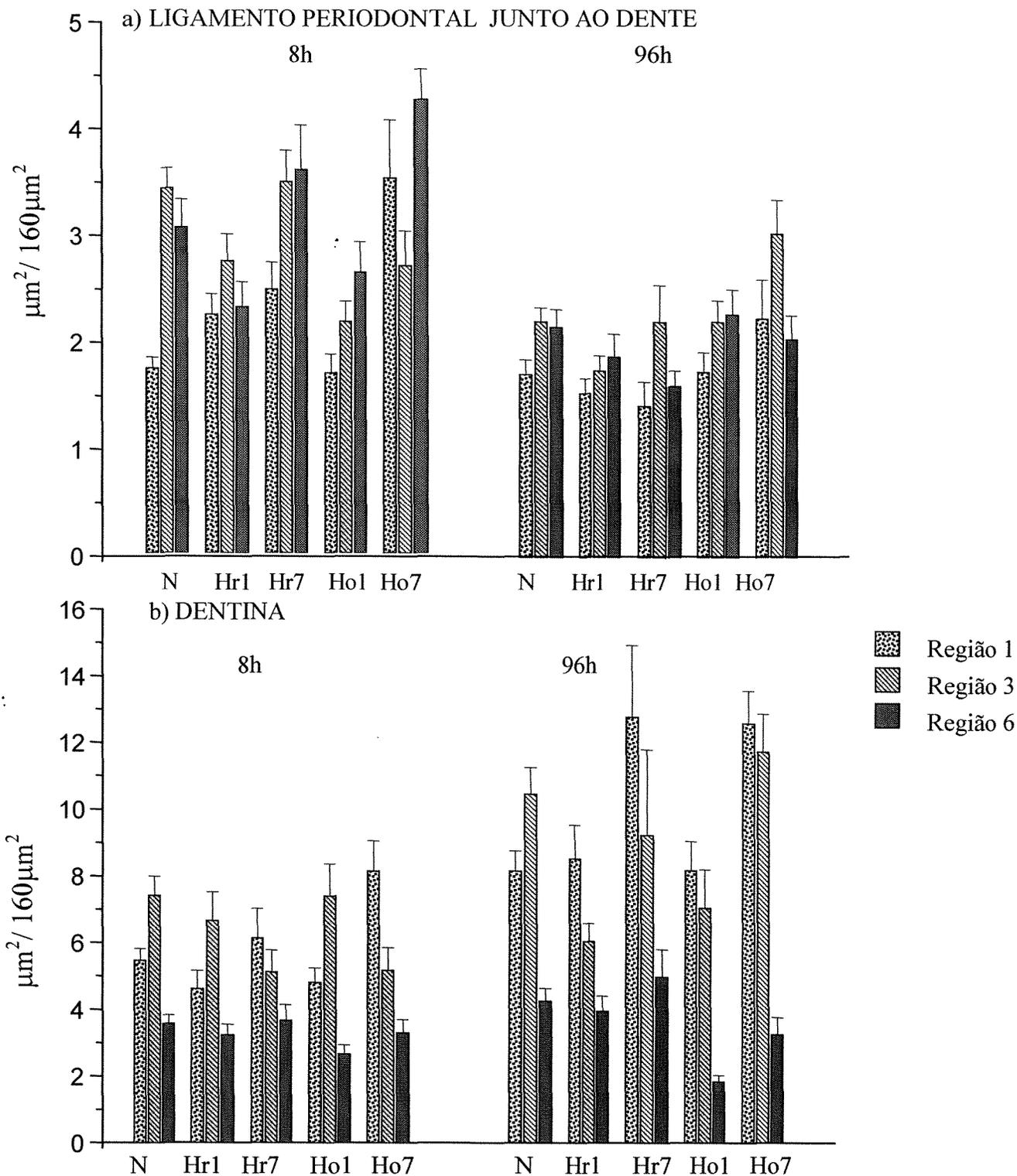


Figura 8- Médias (\pm EPM) das densidades de grãos de prata, 8 e 96h após a injeção de ^3H -fucose, em tecidos de incisivos de camundongo nas diferentes condições funcionais. N- Normofuncional, Hr1- Hiperfuncional 1 dia, Hr7- Hiperfuncional 7 dias, Ho1- Hipofuncional 1 dia, Ho7- Hipofuncional 7 dias.

DISCUSSÃO

Os resultados observados neste estudo mostram que praticamente todos os tecidos dentais e periodontais incorporaram a ^3H -fucose, o que está de acordo com dados descritos na literatura: na superfície dos fibroblastos e na MEC no ligamento periodontal de molares (Cho e Garant, 1986); no ligamento transeptal (Johnson, 1982), nos odontoblastos pré-dentina e no limite pré-dentina-dentina (Weinstok et al., 1972). Nos osteoblastos, matriz pré-óssea e limite matriz pré-óssea-óssea (Weinstok, 1979); nos ameloblastos e nos processos de Tomes (Warshawsky, 1979). Em todos estes tecidos duros citados, o tempo máximo de observação, pós-administração de fucose radioativa foi de 4h. Na dentina a imagem de 4h pós-injeção (Weinstok, 1972) é próxima à imagem que observamos às 8h (fig. 5a); no intervalo de 96h (fig. 5b) a faixa de marcação intensa está francamente na dentina e a imagem é semelhante a obtida com o uso de aminoácidos como precursores (Josephsen e Warshawsky, 1982, fig.12). No esmalte jovem 96h após a injeção a reação radioativa estendeu-se por toda a espessura da matriz, como ocorre com o uso de aminoácidos marcados (resultado não ilustrado).

Os resultados da incorporação de ^3H -fucose nas diferentes condições funcionais, indicam que houve um aumento da biossíntese de glicoproteínas fucosiladas nos tecidos de dentes desimpedidos por 7 dias, no periodonto relacionado ao esmalte e no ligamento periodontal relacionado ao osso alveolar, aumento que foi mais expressivo no conjuntivo perivascular (figs. 3d, 4d e 6a) fato que ocorreu também na polpa (fig 6b). Este aumento de glicoproteínas não colágenas está de acordo com os resultados de Van den Bos e Tonino (1984) e este aumento não pode ser atribuído à aceleração da erupção, uma vez que esta aceleração se instala nas primeiras 24 horas (Chiba et al., 1976). Como o decaimento da radioatividade no intervalo de ^3H -fucose é generalizado nos dois tecidos citados é possível

admitir que o aumento da concentração de proteínas não colágenas se deve mais ao aumento da biossíntese e não ao retardo da degradação das proteínas. No ligamento periodontal junto ao dente os resultados da incorporação parecem seguir a mesma tendência porém as diferenças entre as diferentes condições funcionais não foram expressivas. :

No processo de crescimento e erupção contínuos dos incisivos de roedores, os tecidos dentais e o cemento migram de basal para a incisal. Isto acontece também como o LP-D, mas não com o LP-O (Melcher, 1967; Bertsen, 1975) nem, provavelmente com o OA. Não há dados relativos a migração do PE.

Na comparação radioativa em diferentes intervalos de tempo, especialmente entre intervalos longos, no caso de células ou tecidos que migram este movimento tem que ser levada em conta. Nos incisivos de ratos normofuncionais a erupção, e portanto a migração dos tecidos, se dá em torno de 0,5mm/dia e nos hipofuncionais 1mm/dia, o que resulta em 96h a migração de 2 e 4mm respectivamente. Para levar em conta este movimento é necessário usar cortes longitudinais do dente, ou no caso de cortes transversais cortes seriados ou semi-seriados, para que a região analisada às 8h seja correspondente à analisada às 96h. Assim, o aumento da incorporação de fucose foi talvez melhor evidenciado no PE e LP-O pelo fato de que estes tecidos, provavelmente, não acompanhem o movimento eruptivo.

A dentina, o único tecido animal cuja matriz não é renovada mantém um registro do material radioativo incorporado logo após o pulso e do material posteriormente reutilizado, gerado pela degradação protéica que ocorre principalmente na pré-dentina. Este registro pode servir para avaliar e equalizar a dose de isótopo administrada a cada animal em determinados desenhos experimentais (Josephsen e Warshawsky, 1982). O que não é o caso do desenho adotado neste estudo. A análise da dentina, no caso, foi prevista apenas para

verificar o comportamento de um tecido diferente dos tecidos conjuntivos periodontais e que não é diretamente relacionado ao processo eruptivo. Porém tanto os tecidos periodontais como os dentais de incisivos de roedores parecem que podem ser afetados, especialmente pela hipofunção. Nessa condição, como a erupção é acelerada a formação de tecidos dentais também o é, como foi mostrado pelo aumento da extensão da zona de secreção do esmalte (Robison et al., 1988).

Com a metodologia aplicada neste estudo não é possível identificar em que glicoproteínas a fucose radioativa foi incorporada. É possível, porém, em função do que se conhece sobre as alterações que ocorrem em incisivos hipofuncionais, tecer algumas considerações, ainda que especulativas, sobre que glicoproteínas poderiam estar concorrendo para o aumento de sua quantidade nos tecidos periodontais, observado após 7 dias de hipofunção.

Nos incisivos hipofuncionais de roedores paralelamente ao aumento da taxa de erupção ocorrem um aumento da taxa de migração do LP junto ao dente (Bertsen, 1975) e um aumento da proliferação de suas células, cuja taxa triplica (Michaeli et al., 1986). O aumento do teor de proteínas não-colágenas foi observado com 14 dias de hipofunção (Van den Bos e Tonino, 1984).

Dentre as glicoproteínas fucosiladas, presentes em fibroblastos e na MEC dos tecidos periodontais, a fibronectina (FN) e as integrinas são as de distribuição mais generalizadas.

À fibronectina são atribuídas diversas funções biológicas: aderência celular, migração celular, organização da MEC, fagocitose, cicatrização (Mariotti, 1993). Em cultura de fibroblastos do LP a FN incrementa a proliferação e a quimiotaxia (Kapila et al., 1998).

Por imunohistoquímica a FN apresenta uma distribuição generalizada no LP (Luckinma et al.,1991), no folículo dental de molares em erupção (Takita et al.,1987), no LP de molares erupcionados (Pitaru et al.,1987), na interface célula fibras colágenas (Connor et al.,1984), no mesênquima de molares em desenvolvimento (Thesleff et al.,1979, 1981) e no tecido de granulação formado por lesão do LP (Matsuura et al.,1995).

As integrinas, glicoproteínas trans-membranas presentes tanto em células epiteliais como em conjuntivas, interagem de um lado com estruturas da MEC, fibronectina por exemplo, e elementos do citoesqueleto do outro. São importantes para diapedese de glóbulos brancos, migração de fibroblastos e células epiteliais durante a cicatrização, adesão celular em tumores e metástases (Mariotti,1993). Em fibroblastos de LP em cultura foram evidenciados integrinas $\alpha_5\beta_1$ um dos receptores para FN (Kapila et al.,1998).

Por suas múltiplas funções, cuja descrição provavelmente ainda é incompleta, ambas, a FN e as integrinas, poderiam ser responsáveis pelo incremento da incorporação da fucose tritiada nos tecidos periodontais de dentes hipofuncionais, devido a maior proliferação e aumento da concentração de fibroblastos no LP nesta condição.

Não encontramos nenhuma referência se a tenascina do tecido conjuntivo é fucosilada. Sabe-se porém que é uma glicoproteína, e sua distribuição é mais restrita que a FN. Localiza-se, porém, junto à zona de ancoragem de fibras colágenas em tecidos duros (fibras de Sharpey) como o cimento e o osso alveolar (Zhang et al.,1993).

A observação de que o aumento da incorporação foi particularmente marcada no tecido conjuntivo perivascular, tanto no periodonto como na polpa, pode indicar que uma das glicoproteínas fucosiladas que aumenta com o evoluir da hipofunção do dente é o receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R). A localização desse receptor nesta região em particular já foi assinalada por Cho et al. (1991). Este tecido conjuntivo

perivascular é tido como compartimento progenitor no LP de molares de camundongo (Gould et al. 1976; McCulloch e Melcher, 1983).

Os receptores devem receber as moléculas a eles destinadas, no caso, principalmente o fator de crescimento epidermal (EGF). EGF é um polipeptídeo inicialmente isolado de glândulas sub-mandibulares de camundongo e cujo primeiro efeito descrito foi de acelerar a erupção de incisivos de roedores e abertura das pálpebras (Cohen, 1962). Não encontramos nenhuma referência que o EGF seja fucosilado, mas este polipeptídeo constitui um domínio de muitas proteínas biologicamente importantes, como as do sistema de coagulação fibrinolítico (Harris et al., 1992), e das proteínas Fringe (Moloney et al., 2000). Este domínio nestas proteínas é O-fucosilado.

As atividades biológicas do EGF incluem, entre outras, o estímulo à proliferação de diversas células epiteliais e conjuntivas, *in vivo* e *in vitro*, aumento da síntese de proteínas e de RNA (v. Carpenter e Cohen, 1979 para uma revisão).

Os efeitos do EGF na proliferação, síntese de proteínas e na diferenciação em tecidos do incisivo de camundongos, entre eles o LP, foi estudado por Topham et al. (1987). O tecido periodontal que estes autores observaram e que denominaram de LP, na realidade (de acordo com a fig.5 do trabalho) corresponde ao PE – que por sua vez pode ser denominado de folículo dental (FD), pois é um tecido análogo ao FD relacionado a coroa de crescimento limitado como os molares de camundongo.

Partanen e Thesleff (1987) descrevem que a distribuição de EGF-R muda nos tecidos embrionários do dente a medida que este se desenvolve, indicando que o EGF parece inibir a morfogênese e a diferenciação celular. Na mesma linha os trabalhos de Cho e colaboradores indicam que o EGF está associado à estabilização fenotípica de fibroblastos (Matsuda et al., 1993). Mostram, ainda, que o receptor de EGF está presente em células

capazes de proliferar e diminuem gradativamente a medida que as células se diferenciam e se aproximam dos tecidos duros, estando ausentes em osteoblastos e cementoblastos (Cho e Garant, 1996).

O aumento da proliferação e da concentração de células no LP que ocorre nos dentes hipofuncionais, o que, provavelmente, pode ocorrer também no PE, exigiria um aumento de EGF-R para a manutenção de uma população de células indiferenciadas ou pouco diferenciadas e assim manter o equilíbrio necessário para a contínua remodelação do LP e do osso alveolar e da formação do cimento, processos que estão acelerados na condição hipofuncional.

Em conclusão, os resultados da incorporação de [³H]-fucose em tecidos periodontais do incisivo de camundongo sugerem que o aumento da quantidade de glicoproteínas fucosiladas, não está diretamente relacionado a erupção acelerada que ocorre nos dentes hipofuncionais. Sugerem ainda que parte desta maior quantidade seria devida ao aumento dos receptores de EGF.

CONCLUSÕES

- 1) O aumento da biossíntese de glicoproteínas fucosiladas dos tecidos periodontais não é causa da aceleração da erupção nos dentes hipofuncionais.
- 2) A incorporação de ^3H -fucose, bem maior no tecido conjuntivo perivascular dos tecidos dentais e paradentais, sugere um aumento da biossíntese de receptores de EGF nos dentes hipofuncionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beertsen W. Migration of fibroblasts in the periodontal ligament of the mouse incisor as revealed by autoradiography. *Arch Oral Biol* 1975; **20**:659-666.
- Beertsen W, Brekelmans M, Everts V,. The site of collagen resorption in the periodontal ligament of the rodent molar. *Anat Rec* 1978; **192**: 305-318.
- Beertsen W, Everts V,. The site of remodelling of collagen in the periodontal ligament of the mouse incisor. *Anat Rec* 1977; **189**:479-4798.
- Beertsen W, Everts V, Hoof, VD,. Fine structure of fibroblasts in the periodontal ligament of the rat incisor and their possible role in tooth eruption. *Archs Oral Biol* 1974; **19**; 1087-1098.
- Benett G, Leblond CP and Haddad A. Migration of glycoprotein from the golgi apparatus to the surface of various cell types as shown by radioautography after labeled fucose injection into rats. *Journal of Cell Biology*,1974; **60**: 258-284.
- Cahill DR, Marks SC, Wise GE, Gorski JP. A review and comparison of tooth eruption_ a new proposal on tooth eruption. *The Biological Mechanisms of Tooth Eruption and Root Resorption*, 1988: 1-7. EBSCO Media, Birmingham, Al. 35233.
- Cahill, DR and Marks Jr, SC. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *Journal of Oral Pathology* 1980; **9**: 189-200.
- Carneiro J and Moraes FF. Radioautographic visualization of collagen metabolism in the periodontal tissues of the mouse. *Arch Oral Biol* 1965; **10**: 833-848.
- Carpenter G and Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann Review Biochem* 1979; **48**: 193-216.
- Chiba M, Oshima S, Kuroda T, Ohkawa S. Effects of repeated shortenings and of artificial restraint on the tensile strength of the periodontium of the rat mandibular incisor. *Arch. Oral Biol* 1981; **26**:135-141.
- Chiba M, Tashiro T, Tsuruta M, Eto K. Acceleration and circadian rhythm of eruption rates in the rat incisor. *Arch Oral Biol* 1976;**21**:269-271.
- Cho MI, Garant PR.. Radioautographic of ³H-fucose utilization by fibroblasts of the periodontal ligament. *Journal of Periodontal Research* 1986;**21**:64-72.
- Cho MI, Lin WL and Garant PR. Occurrence of epidermal growth factor-binding sites during differentiation of cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts of the young rat: a light and electron microscopic radioautographic study. *The Anatomical Record* 1991; **231**:14-24.
- Cohen Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 1962;**237**:1555-1562.
- Colombatti A, Bonaldo P, Volpin D, Bressan GM. The elastin associated glycoprotein gp 115. Synthesis and secretion by chick cells in culture. *J Biol Chem* 1988;**263**:17534-40.
- Connor NS, Aubin JE and Melcher AH. The distribution of fibronectin in rat tooth and periodontal tissues: an immunofluorescence study using a monoclonal antibody. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1984;**32**:565-572.

- Fujiwara S, Shinkai H, Timpl R. Structure of N-linked oligosaccharide chains in the triple-helical domains of human type VI and mouse type IV collagen. *Matrix* 1991;**11**:307-312.
- Fukuda M, Levery SB, Hakomori SI. Carbohydrate structure of hamster plasma fibronectin. Evidence for chemical diversity between cellular and plasma fibronectins. *The Journal of Biological Chemistry* 1982;**257**:6856-6860.
- Gould TRL, Melcher HA and Brunette DM. Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. *Anat Rec* 1976;**188**:133-142.
- Gowgiel JM. Observations on the phenomena of tooth eruption. *J Dent Res* 1967;**46**:1325-1330.
- Haddad A. Radioactive fucose as a tool for studying glycoprotein secretion. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998;**31**:207-213.
- Harris RJ, Ling VT, Spellman MW. O-Linked fucose is present in the first epidermal growth factor domain of factor XII but not protein C. *The Journal of Biological Chemistry* 1992;**267**:5102-5107.
- Irie K and Ozawa H. Relationships between tooth eruption, occlusion and alveolar bone resorption: Cytological and cytochemical studies of bone resorption on rat incisor alveolar bone facing the enamel. *Arch Histol Cytol* 1990;**53**:497-509.
- Johnson RB. Distribution of ³H-fucose in the transseptal ligament of the mouse. *J Periodont Res* 1988;**23**:363-369.
- Johnson RB, Pyllypas SP. A re-evaluation of the distribution of the elastic meshwork within the periodontal ligament of the mouse. *J Periodont Res* 1992;**27**:239-249.
- Josephsen K, Warshawsky H. Radioautography of rat incisor dentin as a continuous record of the incorporation of a single dose of ³H-labeled proline and tyrosine. *The American Journal of Anatomy* 1982;**164**:45-56.
- Kanoza RJJ, Kelleher L, Sodek J and Melcher AH. A biochemical analysis of the effect of hypofunction on collagen metabolism in the rat molar periodontal ligament. *Arch Oral Biol*, 1980;**25**:663-668.
- Kapila YL, Lancero H and Johnson W. The response of periodontal ligament cells to fibronectin. *J. Periodontol*, 1998;**69**:1008-1019.
- Kirkham J, Robinson C, Phull JK, Shore RC, Moxham BJ, Berkovitz BKB. The effect of rate of eruption on periodontal ligament glycosaminoglycan content and enamel formation in the rat incisor. *Cell Tissue Res.*, 1993;**274**:413-419.
- Komatsu K. *In vitro* mechanics of the periodontal ligament in impeded and unimpeded rat mandibular incisors. *Arch. Oral Biol*. 1988;**33**:783-791.
- Lukinmaa PL, Mackie EJ, Thesleff I. Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins- tenascin and the ED-sequence-containing form of cellular fibronectin- in the human permanent teeth and periodontal ligament. *J. Dent. Res.*, 1991;**70**:19-26, January.
- Mariotti A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontology*, 1993;**3**:39-63.
- Marks SC Jr., Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *The anatomical record*, 1996;**245**:374-393.
- Matsuda N, Kumar NM, Ramakrishnan PR, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Evidence for up-regulation of epidermal growth-factor receptors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype *in vitro*. *Archs. oral Biol.*, 1993, **38**:559-569.

- Matsuura M, Yeek H, Han KY, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Immunohistochemical expresion of extracellular matriz components of normal and healing periodontal tisúes in the beagle dog. *J. Periodontol.*,1995,**66**:579-593.
- McCulloch CAG and Melcher AH. Cell migration in the periodontal ligament of mice. *Journal of Periodontal Research*,1983,**18**:339-352.
- Melcher AH. Remodeling of the periodontal ligament during eruption of the rat incisor. *Archs. oral Biol.*,1967,**12**:1649-1651.
- Merzel J, Novaes PD, Furlan S. A histological study of root-resected and root-transected rat incisors when eruption ceases, shortly before they are exfoliated from the socket. *Archs. oral Biol.*,2000 a,**45**:315-322.
- Merzel J, Novaes PD, Furlan S. The effects of local trauma to the enamel-related periodontal tissues in the eruption of the rat incisor. *Archs. oral Biol.*,2000 b,**45**:323-333.
- Michaeli Y, Steigman S, Yitschaky M, Weinreb M Jr. The response of the fibroblast population in the periodontal ligament of rat incisors to altered eruption rates. *Journal of Periodontal Research*,1986,**21**:86-94.
- Moloney DJ, Panin VM, Johnston SH, Chen J, Shao L, Wilson R, Wang Y, Stanley P, Irvine KD, Haltiwanger RS, Vogt TF. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature*, 2000,**406**:369-375.
- Moxham B J, Shore RC, Berkovitz BKB. A quantitative study of the ultrastructure of fibroblasts within the enamel-related connective tissue of the rat incisor. *J. Biol. Buccale*,1991,**19**: 135-140.
- Moxham BJ. What the structure and the biochemistry of the periodontal ligament tell us about the mechanisms of tooth eruption. *The Biological Mechanisms of Tooth Eruption, Resorption and Replacement by Implants*. Edited by Z. Davidovitch, 1994:437-450
- Moxham BJ and Berkovitz BKB. *The periodontal ligament and physiological tooth movements*,1995:183-214.
- Nakagawa H, Zheng M, Hakomori S, Tsukamoto Y, Kawamura Y and Takahashi N. Detailed oligosaccharide structures of human integrin $\alpha 5\beta 1$ analyzed by a three-dimensional mapping technique. *Eur. J. Biochem.*,1996,**237**:76-85.
- Nelson DL and Cox MM,. *Lehninger_ Principles of Biochemistry*, 3rd ed., 2000:293-323.
- Partanen AM and Thesleff I. Localization and quantitation of ^{125}I -Epidermal Growth Factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. *Developmental biology*,1987,**120**:186-197.
- Pitaru S, Aubin JE, Bhargava U and Melcher AH. Immunoelectron microscopic studies on the distributions of fibronectin and actin in a cellular dense connective tissue: the periodontal ligament of the rat. *Journal of Periodontal Research*, 1987,**22**:64-74.
- Polacow MLO, Merzel J. The effect of vinblastine on the incorporation of [^3H]-glycine into proteins of the periodontal ligament of impeded mouse incisors. *Archs. oral Biol.*,1994,**39**: 223-230.
- Rippin JW. Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces I. Young rat molar. *J. Periodont. Res.*,1976,**11**:101-107.
- Rippin JW. Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces II. Adult rat molar. *J. Periodontal Res.*,1978,**13**:149-154.

- Robinson C, Kirkham J, Nutman CA. Relationship between enamel formation and eruption rate in rat mandibular incisors. *Cell Tissue Res.*,1988,**254**:655-658.
- Sharon N and Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Amer.*, 1993,**268**:74-81.
- Sharon N. Glycoproteins. *Sci. Amer.*,1974, **230**:78-86.
- Shuttleworth C A, Berry L, Wilson N H. Biosynthesis of glycoproteins by rabbit dental pulp fibroblasts in culture. *Arch. Oral. Biol.*, 1982,**27**:645-50.
- Silva MAJ. Distribuição das fibras de Sharpey no alvéolo do incisivo de rato em condições funcionais, normal e alteradas. Estudo morfométrico ultraestrutural. *Tese de Doutorado. F.O.P. UNICAMP*, 2002.
- Sloan P. Structural organization of the fibres of the periodontal ligament. *The Periodontal Ligament in Health and Disease*,1982: 51-72.
- Sodek J. A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in the adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Archs. oral Biol.*,1977, **22**:655-665.
- Sodek J. A comparison of collagen and non-collagenous protein metabolism in rat molar and incisor periodontal ligaments. *Archs oral Biol.*,1978,**23**:977-982.
- Soderquist AM and Carpenter G. Glycosylation of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. *The Journal of Biological Chemistry*,1984,**259**:12586-12594.
- Steigman S, Michaeli Y Yitzhaki M, Weinreb M. A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor. *J. Dent. Res.*,1989,**68**:1269-1274.
- Takita K, Ohsaki Y, Nakata M and Kurisu K. Immunofluorescence localization of type I and type III collagen and fibronectin in mouse dental tissues in late development and during molar eruption. *Archs. oral Biol.*,1987,**32**:273-279.
- Thesleff I, Barrach HJ, Foidart JM, Vaheri A, Pratt RM and Martin GR. Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Developmental Biology*,1981, **81**:182-192.
- Topham R T, Chiego DJ Jr, Gattone VH II, Hinton DA, Klein RM,. The effect of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. *Development Biology*, 1987,**124**,532-543.
- Van den Bos T. and Tonino GJM. Composition and metabolism of the extracellular matrix in the periodontal ligament of impeded and unimpeded rat incisors. *Archs. oral Biol.*,1984,**29**:893-897.
- Warshawsky H. Radioautographic studies on amelogenesis. *Jour. Biol. Buccale*,1979,**7**:105-126.
- Weinstok A, Weinstok M and Leblond CP. Autoradiographic detection of ³H-fucose incorporation into glycoprotein by odontoblasts and its deposition at the site of the calcification front dentin. *Calc. Tiss. Res.*, 1972,**8**:181-189.
- Weinstok M. Radioautographic visualization of ³H-fucose incorporation into glycoprotein by osteoblasts and its deposition into bone matrix. *Calcif. Tiss. Intl.*, 1979,**27**, 177-185.
- Zhang X, Schuppan D, Becker J, Reichart P and Gerderblom H R,. Distribution of undulin, tenascin, and fibronectin in the human periodontal ligament and cementum: comparative immunoelectron microscopy with ultra-thin cryosections. *J. Histochem. Cytochem.*, 1993,**41**:245-251.