

MIRALVA APARECIDA DE JESUS SILVA

---

*Este exemplar foi devidamente  
conferido conforme resolução 0079/0306/83  
10/06/97*



**ESTUDO MORFOMÉTRICO DOS COMPARTIMENTOS DE VÁRIAS  
REGIÕES DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE INCISIVOS DE  
RATOS EM CONDIÇÕES DE ERUPÇÃO ALTERADA PELO  
DESIMPEDIMENTO E PELA VIMBLASTINA.**

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

---

PIRACICABA - S.P.

1997

Si38e

31024/BC

MIRALVA APARECIDA DE JESUS SILVA

---

**ESTUDO MORFOMÉTRICO DOS COMPARTIMENTOS DE VÁRIAS  
REGIÕES DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE INCISIVOS DE  
RATOS EM CONDIÇÕES DE ERUPÇÃO ALTERADA PELO  
DESIMPEDIMENTO E PELA VIMBLASTINA.**

Orientador: Prof. Dr. José Merzel †

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

---

PIRACICABA - S.P.  
1997

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

8818076

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	77/unicamp
	Si. 38e
V.	Er.
TIPO BC	31024
PNOC	281197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/08/97
N.º CPD	

CM-00099505-1

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

S38e

Silva, Miralva Aparecida de Jesus.

Estudo morfoométrico dos compartimentos de várias regiões do ligamento periodontal de incisivos de ratos em condições de erupção alterada pelo impedimento e pela vimblastina / Miralva Aparecida de Jesus Silva. - Piracicaba : [s.n.], 1997.

53f. : il.

Orientador : José Merzel.

Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontia. 2. Fibroblasto. 3. Microscopia óptica.

I. Merzel, José. II. Universidade Estadual de Campinas.

Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

19.CDD - 617.632

- 574.824

- 616.075 8

Índices para o Catálogo Sistemático

- |                       |           |
|-----------------------|-----------|
| 1. Periodontia        | 617.632   |
| 2. Fibroblasto        | 574.824   |
| 3. Microscopia óptica | 616.075 8 |



UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 05/06/97, considerou o candidato aprovado.

1. José Merzel

2. Norair Salviano dos Reis

3. Maria Luiza Ozores Polacow

Aos meus queridos pais Fulgêncio e Lydia  
e aos meus amados irmãos e sobrinhos  
pelo apoio, amor e carinho.

Ao Professor José Norberto Barreto, meu Mestre  
e especial amigo, pela importante participação em  
minha formação acadêmica, pelo incentivo constante  
à capacitação, pelo apoio incondicional e pela nossa  
agradável convivência.

Ao Luiz pela maneira carinhosa com que  
compartilha a vida comigo e pela  
inigualável bondade.

Dedico este trabalho

### **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao Professor Doutor José Merzel, Professor Titular do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela realização do sonho de trabalhar sob sua criteriosa, atenciosa, segura e sábia orientação.

## AGRADECIMENTOS

Ao PROFESSOR DOUTOR PEDRO DUARTE NOVAES, amigo de todas as horas, pelo competente e imprescindível auxílio em todas as fases de execução deste trabalho, pelo exemplo de sua existência, pelo carinho a mim dispensado e pelo privilégio de contar com sua valiosa amizade.

À BIÓLOGA ELIENE APARECIDA ORSINI NARVAES ROMANI, querida amiga, pelo valioso, paciente e competente auxílio junto ao laboratório de microscopia eletrônica da FOP/UNICAMP, pelo cuidadoso preparo do material fotográfico e pela felicidade de contar com sua preciosa amizade.

Aos meus queridos irmãos, ENIO, ANTONIO CARLOS, FULGÊNCIO, ARMÊNIO, ROSILDA e IVANILDA pelo incentivo e permanente auxílio, fundamentais para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao meu avô ANTONIO GOMES DE FIGUEIREDO, *in memoriam* e ao PROFESSOR JOSÉ CÉSAR GAZI, *in memoriam* pelo despertar para a vida acadêmica.

Ao querido tio HUMBERTO GOMES DE FIGUEIREDO, por toda ajuda e pela importante participação na minha formação pessoal e profissional.

Ao PROFESSOR JOSÉ EDUARDO DIOTTO, querido amigo e companheiro de mais esta jornada, pelo grande apoio em todos os momentos e pelas inúmeras viagens entre Campinas e Piracicaba.

Ao PROFESSOR DOUTOR ROMÁRIO DE ARAÚJO MELLO, meu compadre e especial amigo, pelo incentivo diário e pela disponibilidade em colaborar durante todo o desenvolvimento do presente trabalho.

À PROFESSORA ROSELI DEOLINDA RIBEIRO, querida amiga do curso de Pós-Graduação, pelo grande auxílio na manipulação dos animais na fase experimental, pela especial atenção a mim dedicada durante o difícil período de doença e convalescência e pela sua exemplar conduta científica.

À querida amiga MARIA CLARET GAVIOLI DA ROCHA, pelo apoio, boa vontade, persistente estímulo e grande ajuda em todas as fases de realização desse trabalho, especialmente, quando estive doente.

À ex-aluna e querida amiga BIÓLOGA GLÁUCIA MONTEIRO DE CASTRO, por toda a ajuda, pelo incentivo e pela introdução ao mundo da informática, imprescindível para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao PROFESSOR LUÍS FERNANDO BERALDO, querido amigo, pela preciosa ajuda na fase experimental desse trabalho, pelo otimismo ímpar e pelas incontáveis viagens entre a FOP e a estação rodoviária.

À querida amiga PROFESSORA MARIA CONCEIÇÃO BARBOSA LINARELLI, pela valiosa colaboração na reprodução das fotos e gráficos.

Ao ENGENHEIRO AGRÔNOMO MARCELO ALVES CORRÊA, da Diretoria de software e Apoio Científico do CIAGRI (Centro de Informática para a Agricultura) - ESALQ/USP, pela atenção e valiosa análise estatística.

À querida amiga IVANI ODAS DEMÉTRIO, pelo carinho, atenção e competência com que facilitou os procedimentos junto ao laboratório de microscopia óptica do Departamento de Morfologia da FOP/UNICAMP.

À querida amiga, MARIA APARECIDA SANTIAGO VARELLA, pela alegria contagiante e pelo inestimável e competente auxílio junto ao laboratório de microscopia óptica do Departamento de Morfologia da FOP/UNICAMP.

À amiga SUZETE REGINA TOBIAS NEDER, pela especial atenção junto à secretaria do Departamento de Morfologia da FOP/UNICAMP.

Ao PROFESSOR DOUTOR NORAIR SALVIANO DOS REIS, especial amigo e grande conselheiro de longos anos, pelo carinho, apoio e incentivo permanente à minha capacitação.

À PROFESSORA DOUTORA MARIA LUIZA OZORES POLACOW, pela carinhosa atenção e estímulo.

Ao PROFESSOR JOSÉ FRANCISCO BERNARDES VEIGA SILVA, Vice-Reitor para Assuntos Administrativos da PUCCAMP, pela confiança em mim depositada e pelo estímulo constante à capacitação docente.

Ao PROFESSOR NELSON EUGÊNIO LAUER, querido ex-aluno e atual Diretor do Instituto de Ciências Biológicas da PUCCAMP, pela amizade, carinho e grande incentivo.

À PROFESSORA TÂNIA MARIA PAOLIERI TORNIZIELLO, Vice-Diretora do Instituto de Ciências Biológicas da PUCCAMP, pela amizade e permanente incentivo.

À PROFESSORA DOUTORA DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO, pelo carinho e importante participação no meu exame de qualificação.

À PROFESSORA DOUTORA HELOÍSA AMÉLIA DE LIMA CASTRO, pelo carinho e estímulo.

Ao PROFESSOR DOUTOR MARCO CÉSAR SOMAZZ, pela apresentação ao Curso de Pós- Graduação, interesse e apoio em todos os momentos.

À PROFESSORA ANA LÚCIA NICOLETTI DA ROCHA, pela atenciosa revisão de vernáculo.

Aos amigos PROFESSOR DOUTOR LUIZ CARLOS SPOLIDÓRIO e PROFESSORA DOUTORA VANESSA PEDRO, pelo carinho, apoio e amizade.

À querida amiga SILVANA FURLAN, mestranda do Curso de Biologia e Patologia Bucodental, pelo carinho e incentivo.

Ao querido ex-aluno DANIEL GRABARZ, pelo incentivo e valiosa colaboração.

Ao amigos Sr. JOSÉ PEREIRA DA SILVA JÚNIOR, Sr. JOMAR PEREIRA DA SILVA e PROFESSOR JODIR PEREIRA DA SILVA, pela especial amizade, pelas importantes orientações em informática e pela doação dos Softwares imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao querido amigo PROFESSOR DOUTOR PAULO CÉSAR RIBEIRO SANCHES, pela competente conduta clínica e pelas palavras estimulantes nos momentos mais difíceis.

À querida amiga PROFESSORA DOUTORA FÁTIMA REGINA CHAVES, pela sua exemplar conduta médica e docente e pela maneira carinhosa com que cuida de minha saúde.

Às minhas cunhadas GISELE e ELAINE CRISTINA, pelo estímulo e amistosa convivência.

Aos queridos amigos CLEMENTE VONO NETO, NORMA PADULLA e APARECIDA COSMO, pelo carinho e atenção.

À PROFESSORA VÂNIA LÚCIA S. S. QUEIRÓZ, pelo incentivo e especial carinho.

À amiga ALAÍDE PEDRO, pela amizade, incentivo e colaboração permanente.

Aos queridos amigos PROFESSOR DOUTOR OSMAR HADLER DE LUCCA e ANA MARIA C. H. DE LUCCA pelo carinho especial e pela valiosa colaboração.

Ao PROFESSOR DOUTOR JOSÉ MECIANO FILHO, Coordenador do Departamento de Ciências Morfológicas do ICB/PUCCAMP, pelo permanente estímulo.

À SR<sup>a</sup>. ANA MARIA COSSA e SRT<sup>a</sup>. ÉRICA BUZZETTO, pela especial atenção e gentileza ímpar no atendimento junto à Coordenação dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

Ao querido amigo FELÍCIO DOS CÓRREGOS JÚNIOR, pelas palavras sempre otimistas proferidas nos momentos difíceis.

Às queridas ex-alunas PROFESSORA ADRIANA HELENA MOREIRA e DOUTORA MÁRCIA CARDOSO STOCCO e ao PROFESSOR CARLOS SÉRGIO STOCCO pela valiosa amizade e grande incentivo.

Às amigas DOUTORA SANDRA PEDROSO DE MORAES e ADRIANA MARIA SARTORI, pelo carinho e permanente disponibilidade.

Aos colegas da PUCCAMP: PROFESSORA OLGA NARCISA PETRONI PASCHOINI, DOUTORA MARIA RAINELDES TOSI, DOUTORA THELMA REGINA GABRIEL DA SILVA, DOUTORA MARIA JOSÉ MOURA, DOUTORA LUIZA ISHIKAWA FERREIRA, DOUTOR JOSÉ ROBERTO ORTALE, DOUTOR PEDRO PAULO BARROS E PROFESSOR ROBERTO NATALINO RICARTE, pelo carinho e permanente incentivo.

Ao amigo WILLIAM ALEXANDRE DE OLIVEIRA, pela gentil confecção dos diapositivos.

Aos colegas do Departamento de Ciências Morfológicas/PUCCAMP e do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental/FOP, que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido com o auxílio da FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP - proc. nº 93/3411-6) concedido ao Prof. Dr. José Merzel.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUÇÃO.....	5
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
RESULTADOS.....	16
DISCUSSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

## RESUMO

As densidades volumétricas de compartimentos de várias regiões da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de ratos foram analisadas nas condições de erupção impedida, desimpedida e sob ação da vimblastina. Nos vários compartimentos de cada região foi determinada também a densidade volumétrica de fibroblastos e matriz extracelular.

Nove ratos Wistar machos tiveram seus incisivos inferiores esquerdos seccionados a cada dois dias e mantidos em erupção desimpedida, enquanto os contralaterais permaneceram em oclusão. No sétimo dia, a partir do início do corte dos incisivos, 6 animais receberam, por via intraperitoneal, uma dose única de vimblastina (2 mg/kg de peso corporal) e os restantes receberam volume equivalente de salina. Três animais tratados e os do grupo controle foram sacrificados por perfusão via intracardíaca, com solução de Karnovsky, 24 horas e os outros três, 72 horas após a injeção. Após desmineralização pelo EDTA, as hemimandíbulas foram divididas transversalmente em 5 segmentos; o segmento compreendido entre a porção mais incisal da crista alveolar e a face mesial do primeiro molar foi dividido ao meio, sendo a metade incisal denominada R1 e a metade apical R2. Os outros três segmentos, denominados R3, R4 e R5 corresponderam respectivamente ao 1º, 2º e 3º molares inferiores. Os segmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato pH 7,3, desidratados com acetona, incluídos em araldite e cortes transversais de 1 µm de espessura foram corados com azul de metileno.

Para a avaliação morfométrica foram usados 3 cortes não consecutivos de cada região. No aumento de 80X foram determinadas as densidades volumétricas do ligamento periodontal ( $V_{VL}$ ) da face mesial e de seus compartimentos: junto ao dente ( $V_{VT}$ ) e junto ao osso ( $V_{VB}$ ), este último subdividido em tecido conjuntivo ( $V_{VC}$ ) e vasos + nervos ( $V_{VN}$ ). No aumento de 800X foram determinados os volumes relativos de fibroblastos ( $V_{VF}$ ) e de matriz extracelular

( $V_{VME}$ ) em cada região subdividida nos compartimentos: junto ao dente (T), junto ao osso (B) e um intermediário entre ambos (M).

No grupo controle impedido,  $V_{VL}$ ,  $V_{VT}$  e  $V_{VC}$  aumentaram de apical para incisal enquanto  $V_{V_{VN}}$  diminuiu na mesma direção. O desimpedimento promoveu, no geral, uma diminuição das  $V_{VL}$ ,  $V_{VT}$ ,  $V_{V_{VN}}$  e aumento da  $V_{VC}$ .

Não houve diferença marcante entre os dois tempos de tratamento pela vimblastina, que provocou um aumento de  $V_{VL}$  e  $V_{VT}$  nas regiões mais apicais em comparação com os respectivos controles. Em relação à porção de tecido conjuntivo do compartimento junto ao osso ( $V_{VC}$ ), a vimblastina provocou uma alteração inversa entre dentes impedidos e desimpedidos, ou seja, a  $V_{VC}$  foi, em geral, maior nos dentes impedidos e menor nos dentes desimpedidos em animais tratados com vimblastina em relação aos respectivos controles. Quanto à  $V_{V_{VN}}$ , sua tendência foi diminuir nos animais tratados, tanto nos dentes impedidos, quanto nos desimpedidos.

As densidades volumétricas de fibroblastos e matriz extracelular nos diversos compartimentos e regiões do ligamento periodontal dos incisivos controles desimpedidos diferiram do que é referido na literatura e dos resultados obtidos com o mesmo material em microscopia eletrônica. Provavelmente, ao microscópio óptico, a densidade volumétrica da matriz extracelular foi superestimada, enquanto que a dos fibroblastos foi subestimada devido aos finos prolongamentos citoplasmáticos destas células; só identificáveis ao microscópio eletrônico. Como isto ocorreu com maior frequência nos incisivos desimpedidos, é possível que o número de processos fibroblásticos tenha aumentado no ligamento destes dentes. Esta hipótese só poderá ser avaliada num futuro trabalho, o que fez com que deixássemos, por ora, de considerar os dados de  $V_{VF}$  e  $V_{VME}$ .

## SUMMARY

The volume density of the compartments of several regions at the mesial face of periodontal ligament in lower incisors of rats, was analyzed in conditions such as impeded and unimpeded eruption and after treatment with vinblastine. The volume density of fibroblast and extracellular matrix in the compartments of each region was also determined.

Nine male wistar rats had their lower left incisors sectioned each two days and kept in unimpeded eruption, while the contralateral ones were kept in occlusion. On the 7<sup>th</sup> day, six animals received intraperitoneally a single dose of vinblastine (2 mg/kg of body weight), while the three controls received an equivalent volume of saline. The animals were killed by intracardiac perfusion with Karnovsky's solution, 3 treated ones and 3 controls at 24 h, and 3 treated at 72 h after vinblastine injection. After desmineralization with EDTA, the hemimandibles were divided transversally in 5 segments: the segment between the most incisal portion of alveolar crest and the mesial face of the first molar was divided in the middle, calling the incisal half as R1 and the apical half as R2. The other 3 segments, denominated as R3, R4, R5 were respectively related to the first, second and third lower molars. The segments were post-fixed with osmium tetroxide 1% in phosphate buffer pH 7.3, dehydrated with acetone, embedded in araldite and 1  $\mu$ m-thick transversal sections were stained with methylene blue.

For the morphometric evaluation, using a grid of 100 points, three non consecutive sections of each region were analysed. The volume density of the periodontal ligament ( $V_{VL}$ ) of the mesial face and its compartments: tooth-related ( $V_{VT}$ ) and alveolar bone-related ( $V_{VB}$ ), the latter subdivided in connective tissue ( $V_{VC}$ ) and blood-vessels plus nerves ( $V_{V\&N}$ ) was determined at a magnification of x80. At magnification of x800, using 16 points of the same grid, the relative volume of fibroblasts ( $V_{VF}$ ) and extracellular matrix ( $V_{VME}$ ) was determined in

each region subdivided in the following compartments: tooth-related (T), alveolar bone-related (B) and a middle one between the two (M).

In the impeded control group,  $V_{VL}$ ,  $V_{VT}$  and  $V_{VC}$  increased from apical to incisal, while  $V_{V_{VN}}$  decreased in the same direction. In general, the unimpeded controls showed decrease of  $V_{VL}$ ,  $V_{VT}$  and  $V_{V_{VN}}$  and an increase of  $V_{VC}$  as compared to the impeded ones. There were no marked differences between the two groups of vinblastine treated animals. Vinblastine induced an increase of  $V_{VL}$  e  $V_{VT}$  in the most apical regions, as compared to the respective controls. As for  $V_{VC}$ , vinblastine caused an inverse alteration between the impeded and unimpeded teeth,  $V_{VC}$  was, in general, bigger in impeded teeth and smaller in unimpeded teeth of vinblastine-treated animals compared to the respective controls. The tendency of  $V_{V_{VN}}$  was to decrease in both impeded and unimpeded teeth of vinblastine treated rats.

Our results on the volume density of periodontal ligament fibroblasts and extracellular matrix in control unimpeded incisors were different from data related in the literature and even from the ones yield by the same material at the electron microscope level. At the light microscope the volume density of the extracellular matrix was probably superestimated, while the fibroblast volume was underestimated, probably because of the thin cytoplasmatic prolongaments of these cells, only visualized with the electron microscope. Since this was most frequent in unimpeded incisors, the number of fibroblasts processes could have increased in the periodontal ligament of these teeth. This hypothesis should be evaluated in a future work, so we decided not to consider, for the time being, the data of  $V_{VF}$  and  $V_{V_{ME}}$ .

## INTRODUÇÃO

O processo de erupção dental, segundo a maioria dos autores, está relacionado ao ligamento periodontal ou ao folículo dental. A remoção cirúrgica da porção odontogênica de incisivos de roedores interrompe o seu crescimento, porém não prejudica a erupção do resto do dente, sugerindo que a erupção está associada ao ligamento periodontal (LPD) pois é o único tecido, no pós-operatório, que permanece viável (Berkovitz & Thomas, 1969 e Berkovitz *et al*, 1980). O mesmo acontece com a transecção do dente, em dois segmentos, onde o segmento distal continua a erupcionar (Berkovitz & Thomas, 1969; Berkovitz, 1971 e Moxham & Berkovitz, 1974). Cahill & Marks (1980) usando pré-molares de cão, demonstraram a importância do antecessor do LPD, o folículo dental, no processo eruptivo, mostrando que o dente pode erupcionar sem raízes, ou seja, antes do ligamento se diferenciar. Marks & Cahill (1984) observaram que a coroa do pré-molar permanente, em desenvolvimento, quando removida cirurgicamente e reimplantada, somente erupciona se o folículo dental for mantido íntegro. Observaram, também, que a erupção ocorre quando a coroa do pré-molar é substituída por uma réplica metálica ou de silicone, se estiver associada ao folículo dental íntegro e, ainda, que se a coroa for removida, sem grande trauma para o folículo, uma via eruptiva é criada na forma de um espaço vazio no alvéolo que é translocado em direção oclusal. Segundo esses autores, o folículo dental, que nesta etapa está associado e não pode ser isolado do órgão dental (Gorski & Marks, 1992), e não o ligamento periodontal, seria o responsável pela erupção dental, pelo menos em sua fase intra-óssea, através da ação coordenada de reabsorção e deposição óssea.

Contudo, o processo de erupção dental, um dos movimentos fisiológicos do dente, ainda não está esclarecido e, seu mecanismo, principalmente o relacionado à geração da força eruptiva, é assunto bastante controverso (Moxham & Berkovitz, 1995). O processo parece ser

multifatorial. Além da força geradora do movimento, a translação desta força em movimento, a resistência dos tecidos envolvidos, a sustentação do dente em cada nova posição, à medida que o movimento se desenvolve e a remodelação dos tecidos periodontais para a manutenção da integridade do sistema são os fatores cuja alteração pode causar aceleração, retardo ou mesmo interrupção do movimento eruptivo (Moxham & Berkovitz, 1995).

Dentre os vários estudos experimentais do processo eruptivo uma grande parte é dedicada às alterações estruturais ou bioquímicas do ligamento periodontal em condições em que a erupção é acelerada, retardada ou paralisada. Neste tipo de estudo, o ligamento periodontal de incisivos de roedores é, com maior frequência, considerado como um todo sem distinção de compartimentos ou regiões, particularmente, nos trabalhos bioquímicos (e.g. Van den Bos & Tonino, 1984 e Kirkham *et al*, 1991, 1993), ou apenas um pequeno segmento ou compartimento deste dente é analisado (e.g. Shore *et al*, 1982, 1985).

Em relação a estudos de morfologia quantitativa do ligamento, só encontramos estudos em erupção alterada pelo desimpedimento (ou hipofunção) ou em erupção paralisada (pela fixação do incisivo na mandíbula ou ao contra-lateral). À microscopia eletrônica Beertsen & Everts (1977) e Shore *et al* (1982) evidenciaram alterações em fibroblastos ou na matriz extracelular provocadas pelo desimpedimento e, Shore *et al* (1985) fazem o mesmo em relação ao ligamento de dentes com erupção paralisada. À microscopia óptica Steigman *et al* (1983), Moxham *et al* (1985) e Blaushild *et al* (1992) relatam dados morfométricos do ligamento periodontal de dentes em erupção normal. Michaeli *et al* (1986) e Steigman *et al* (1989) comparam, morfometricamente, ligamentos de dentes normais e, em erupção desimpedida, mostrando variações no sentido axial e transversal desse tecido. Com exceção dos trabalhos de Tosello (1990), Polacow & Merzel (1994), Barros (1995) e Novaes (1996), feitos neste

laboratório, não encontramos nenhum estudo sobre a ação da vimblastina, que retarda o movimento eruptivo, sobre o ligamento periodontal.

O objetivo deste trabalho foi determinar, através do método de impacto de pontos de um retículo (Weibel, 1969), a densidade volumétrica dos compartimentos junto ao dente e junto ao osso, nas várias regiões da face mesial do ligamento periodontal de incisivos de ratos, nas condições de erupção impedida, desimpedida e após tratamento com vimblastina. Dentro de cada compartimento, a densidade volumétrica dos fibroblastos e da matriz extracelular também foi determinada. A metodologia utilizada difere dos trabalhos morfométricos à microscopia óptica citados acima, como também, difere a divisão regional aqui utilizada e que será discutida nos capítulos seguintes.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nove ratos Wistar machos, pesando, no início do experimento em média 120 g, recebendo água e alimentação sólida *ad libitum*, tiveram o incisivo inferior esquerdo seccionado à altura da papila interdental, a cada dois dias, permitindo que o dente erupcionasse de modo desimpedido, enquanto o incisivo inferior direito permaneceu em oclusão, portanto em erupção impedida.

No sétimo dia, a partir do início do corte dos incisivos, os animais foram divididos em três grupos de três ratos cada. Dois grupos receberam por via intraperitoneal uma dose de 2 mg/kg de peso corporal de vimblastina (Velban, Lilly) diluída em soro fisiológico, os três animais restantes que constituíram o grupo controle receberam, no mesmo dia, e pela mesma via, volume equivalente de soro fisiológico e foram sacrificados 24 horas após. Os animais dos dois grupos tratados foram sacrificados, um 24 horas e outro 72 horas após a injeção da vimblastina.

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (0,4 ml/100g de peso) a 10% e perfundidos via intracárdica com o fixador de Karnovsky (1965) durante 20 minutos. As mandíbulas foram dissecadas e divididas em hemimandíbulas que foram imersas no mesmo fixador por 3 horas.

As hemimandíbulas foram desmineralizadas em EDTA 5% (em tampão fosfato, pH 7,4), sob agitação constante, a 4°C, por 20 dias em média, sendo a desmineralização testada através de cortes feitos na coroa do incisivo. Terminada a desmineralização, as hemimandíbulas foram então divididas, transversalmente, em 5 segmentos designados regiões R1 a R5 (fig. 1). A face apical de cada uma das regiões foi marcada com um bisel para orientar a inclusão. Os segmentos, após lavagem em tampão fosfato pH 7,3, foram pós-fixados em

tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato pH 7,3 durante 2 horas a 4°C e, em seguida, desidratados com acetona em concentrações crescentes e incluídos em araldite.

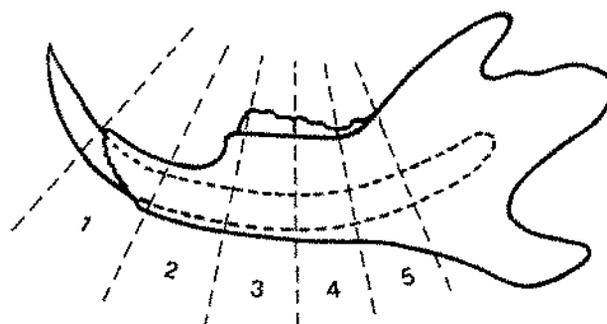


Fig. 1 - Esquema dos cortes transversais feitos em cada hemimandíbula mostrando os limites das 5 regiões do incisivo.

Cortes semifinos de 1  $\mu$ m de espessura foram obtidos da superfície incisal de cada região e colhidos em 4 lâminas de vidro de tal maneira que, em cada lâmina, tivemos 3 cortes não consecutivos (no mínimo 11  $\mu$ m distanciados entre si) de cada uma das 5 regiões de uma hemimandíbula.

Uma lâmina de cada hemimandíbula foi sorteada, corada pelo azul de metileno e submetida à análise morfométrica do ligamento periodontal da face mesial do incisivo (fig.2).

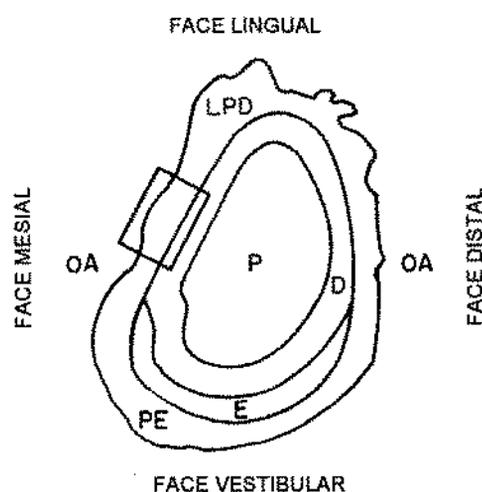


Fig. 2 - Esquema do corte transversal do incisivo, destacando no retângulo a face mesial submetida à análise morfométrica. OA - osso alveolar D - dentina P - polpa E - esmalte LPD - ligamento periodontal PE - periodonto junto ao esmalte

O tecido periodontal do incisivo inferior de rato apresenta duas porções distintas: uma relacionando o osso alveolar ao cimento e outra o osso alveolar ao esmalte. A porção relacionada com o esmalte, correspondente à face vestibular e pequena parte da face distal do dente não é considerada como ligamento periodontal, pois apesar de apresentar-se constituída por tecido conjuntivo, suas fibras colágenas não se inserem no dente.

A porção relacionada com o cimento, que corresponde à face lingual, mesial e parte da distal do dente, é a considerada como ligamento periodontal, pois além de possuir os elementos típicos do tecido conjuntivo, apresenta a inserção de fibras colágenas no cimento e no osso alveolar.

O ligamento periodontal do incisivo de roedores, quando observado à microscopia de luz, apresenta dois compartimentos facilmente identificáveis: um relacionado ao dente e outro ao osso alveolar, este último distinguindo-se pela presença de vasos e nervos que estão ausentes no primeiro (fig. 3). Vários trabalhos, em nível de microscopia óptica e eletrônica, descrevem características histológicas destes compartimentos (e.g. Matena, 1973; Berkovitz & Shore, 1978 e Sloan, 1978).

O compartimento junto ao dente é um tecido conjuntivo avascular que apresenta uma alta celularidade, principalmente de fibroblastos, além de células cementogênicas e matriz extracelular onde se destacam fibras colágenas e substância fundamental.

No compartimento junto ao osso, o tecido conjuntivo apresenta menor densidade de células (fibroblastos, células osteogênicas, osteoblastos e eventualmente osteoclastos), além de vasos, nervos e matriz extracelular constituída, principalmente, por substância fundamental e fibras colágenas as quais são denominadas fibras de Sharpey, quando inseridas no osso alveolar. A parede alveolar, na face lingual do dente, apresenta numerosos orifícios de onde emergem feixes vâsculo-nervosos (fig. 3).

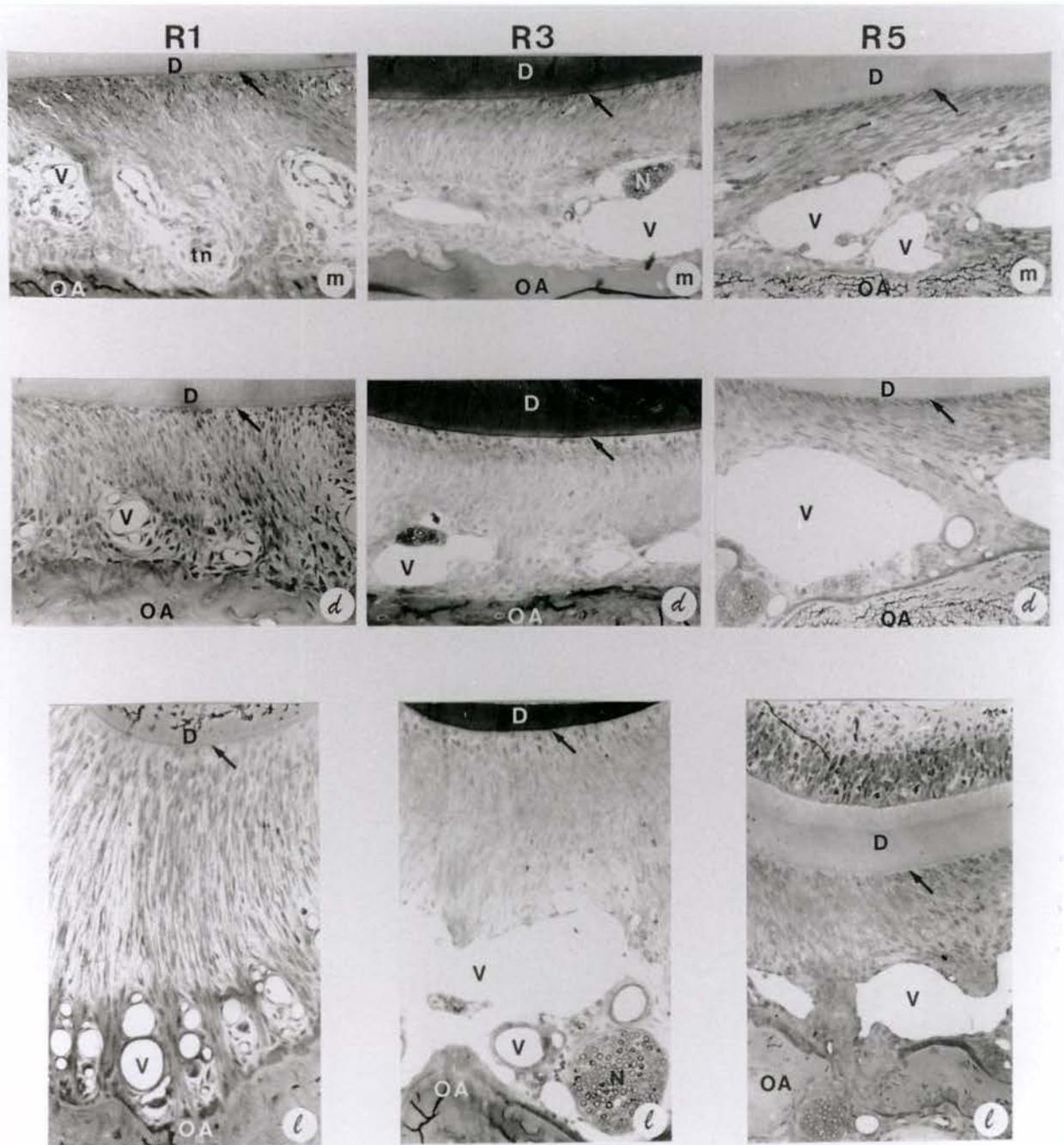


Fig.3- Fotomicrografias das várias regiões e faces do ligamento periodontal observado em cortes transversais do incisivo inferior de rato em erupção impedida.

R1 é a região cujo limite incisal é a crista alveolar; R3 e R5 estão relacionadas respectivamente ao 1º e 3º molares inferiores; M, D e L são aspectos das faces mesial, distal e lingual de cada região. O compartimento junto ao osso alveolar do ligamento é, facilmente, delimitado pela presença de vasos (V), nervos (N) e terminações nervosas (tn). O ligamento da face lingual é o mais espesso atingindo o dobro da espessura em R1 e R3. Na R1 os vasos e nervos são bem menos volumosos do que nas demais regiões e, geralmente, parecem estar em “ilhas” de tecido conjuntivo mais frouxo.

Setas - cimento

D - dentina

OA - osso alveolar

Azul de metileno, 160X

Um terceiro compartimento intermediário tem sido considerado. Os limites e a caracterização deste compartimento intermediário é controversa. Sicher (1942) o descreveu como plexo intermediário e, mais tarde, foi identificado como zona de cisalhamento (Melcher, 1967 e Beertsen, 1975), ou seja, onde ocorre a separação da porção do ligamento que migraria com o dente na erupção e a parte que permaneceria estacionária junto ao osso. Em relação às características estruturais deste compartimento, Beertsen (1973) descreve uma estreita faixa entre os compartimentos dentário e ósseo, pobre em células, e que parece corresponder à descrição de Eccles (1965) de uma região onde ocorre uma mudança na orientação das fibras colágenas e dos fibroblastos, esses últimos se dispondo em paliçada, fato que pode ser observado em cortes longitudinais do ligamento. Para Berkovitz *et al* (1980), a zona de cisalhamento estaria, praticamente, adjacente ao cemento. A delimitação aqui seguida é a mesma de Beertsen & Everts (1977). Ela se estende de uma linha imaginária que limita os vasos e nervos do compartimento junto ao osso até, aproximadamente, a metade do compartimento junto ao dente. Os limites dos três compartimentos são mostrados na figura 4.

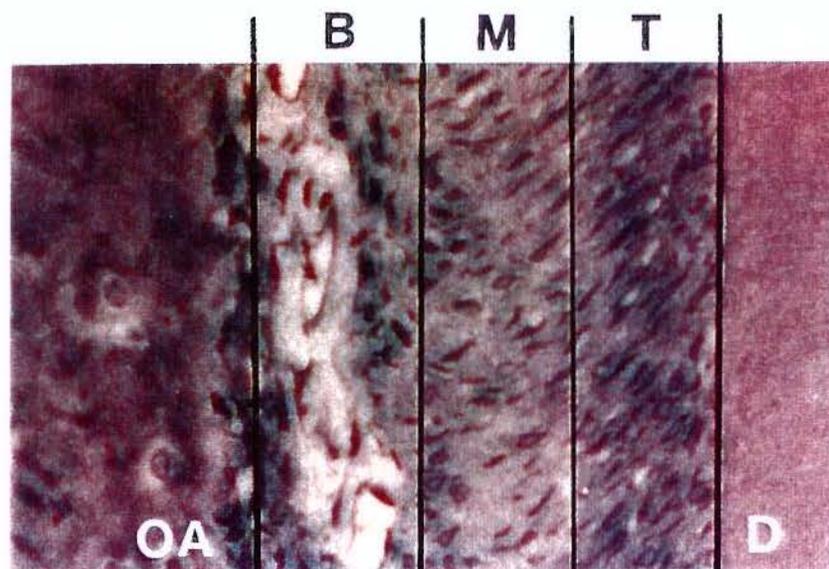


Fig. 4 - Fotomicrografia do ligamento periodontal mostrando os limites dos compartimentos B (junto ao osso), M (intermediário) e T (junto ao dente).

D = dentina    OA = osso alveolar    Azul de metileno, 380X.

A determinação da densidade volumétrica dos compartimentos e das estruturas do ligamento foi limitada à sua face mesial. Ela foi escolhida por ser a mais extensa no sentido longitudinal do dente, porque a crista alveolar, nesta face, alcança a posição mais incisal em relação às demais faces. Da face mesial, a crista diminui, gradualmente, na face lingual, alcançando uma posição mais apical na face distal. Assim, a face mesial é a única que apresenta ligamento em toda extensão da região mais incisal, neste trabalho denominada região I.

No aumento de 80X, utilizando um retículo de 100 pontos, semelhante ao preconizado por Weibel (1969), cada ponto correspondendo a  $2,16 \times 10^{-4} \text{mm}^3$ , contaram-se os pontos coincidentes com os compartimentos junto ao dente e junto ao osso, e, neste último, discriminando-se os pontos relativos ao tecido conjuntivo e estruturas vásculo-nervosas. Em cada região de cada dente, foram contados 300 pontos. Em relação à área teste (a do retículo) foram determinadas as densidades volumétricas ( $V_v$ ) destas estruturas expressas em  $\text{mm}^3 / \text{mm}^3 \times 10^{-3}$ .

No aumento de 800X, utilizando-se 16 pontos do mesmo retículo, onde cada ponto equivaleu a  $3,43 \times 10^{-7} \text{mm}^3$ , contaram-se, preliminarmente, 512 pontos distribuídos, aleatoriamente, no ligamento periodontal dos três cortes de cada região da face mesial do dente, para a determinação da densidade volumétrica de fibroblastos e de matriz extracelular, nos compartimentos: junto ao dente, intermediário e junto ao osso. No compartimento junto ao dente o retículo foi colocado com um dos lados encostado no cemento ficando padronizado que a 1ª linha do retículo fosse desprezada, evitando-se assim, as células cementogênicas. O mesmo procedimento foi repetido no compartimento junto ao osso, onde as células osteogênicas e os osteoclastos não foram computados. No compartimento intermediário o retículo foi colocado voltado para o compartimento junto ao dente, com um dos lados paralelo

a uma linha imaginária limitante aos vasos e nervos do compartimento junto ao osso. A figura 5 exemplifica a posição do retículo em cada compartimento. Desta contagem preliminar foram calculadas médias acumuladas das estruturas por compartimento em cada região, que serviram para determinação do número mínimo de pontos a serem contados, o qual foi fixado em 192, de acordo com o procedimento preconizado por Chalkley (1943).

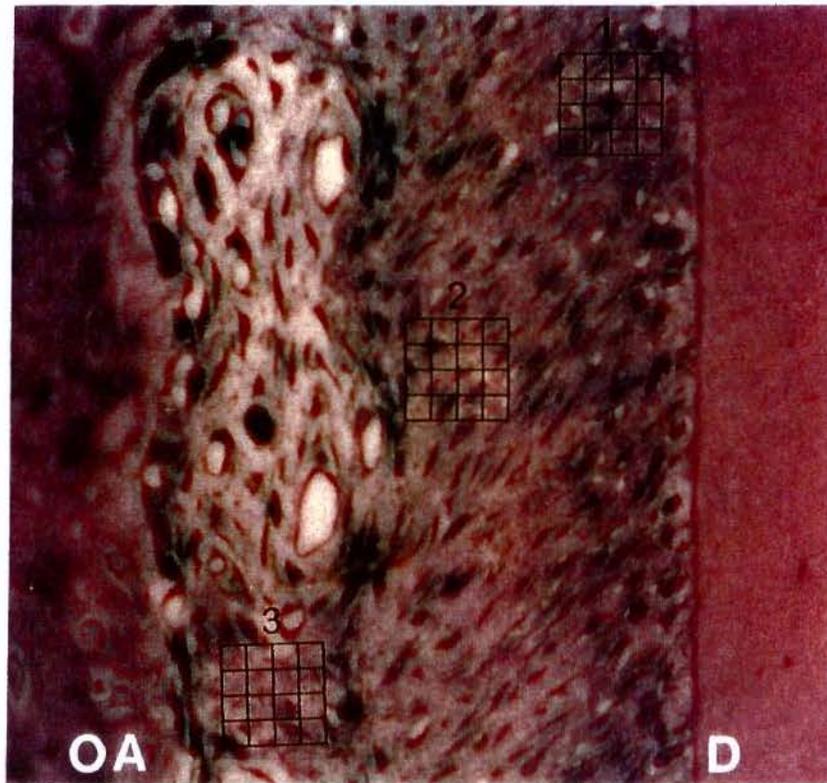


Fig. 5 - Fotomicrografia do ligamento periodontal exemplificando a orientação do retículo usado nas contagens. (1) compartimento junto ao dente, (2) compartimento intermediário e (3) compartimento junto ao osso. D = dentina OA = osso alveolar Azul de metileno, 380X.

Estabelecido o número de pontos em 192, procedeu-se a contagem sistemática de uma lâmina para cada hemimandíbula, sendo que as mesmas foram identificadas por código de maneira que as contagens fossem realizadas sem conhecimento do grupo a que pertenciam.

Os dados obtidos nas contagens no aumento de 80X foram submetidos à análise de variância para cada combinação de região e compartimento, segundo o modelo de parcelas sub-subdivididas. Regiões e compartimentos foram analisados, segundo as técnicas multivariadas de medidas repetidas e a comparação de médias de regiões e compartimentos, através da análise de um experimento em parcelas sub-subdivididas.

A comparação das médias das interações foi feita através do teste t, elegendo “a priori” o nível mínimo de significância (n.m.s.) de 5% para rejeição da hipótese de nulidade.

Os dados obtidos nas contagens no aumento de 800X foram submetidos à análise de variância através do módulo GLM (General Linear Model) do SAS (Statistical Analysis System), segundo o modelo de parcelas sub-subdivididas e comparação das médias das interações pelo teste t aplicado às médias ajustadas por mínimos quadrados, elegendo-se “a priori” o n.m.s. de 5% para rejeição da hipótese de nulidade.

O comportamento das densidades volumétricas foi também representado por curvas de regressões polinomiais quadráticas usadas na interpolação dos pontos observados.

## RESULTADOS

### 1. Densidades volumétricas dos compartimentos da face mesial do ligamento periodontal

#### 1.1. Dados

A tabela 1 mostra as densidades volumétricas médias do ligamento periodontal ( $V_{VL}$ ) e de seus compartimentos junto ao dente ( $V_{VT}$ ) e junto ao osso ( $V_{VB}$ ); do tecido conjuntivo ( $V_{VC}$ ) e de vasos e nervos ( $V_{V\text{VN}}$ ) do compartimento junto ao osso, nas cinco regiões da face mesial de incisivos inferiores de ratos nos grupos controle e tratados pela vimblastina, impedidos e desimpedidos.

#### 1.2. Controles: impedido e desimpedido

A comparação e a significância estatística entre regiões das densidades volumétricas do ligamento periodontal (L) e de seus compartimentos T e B (C + VN), nas condições de impedimento e de desimpedimento são mostradas na tabela 2.

Nos dois grupos as densidades volumétricas de ligamento periodontal ( $V_{VL}$ ) e do compartimento junto ao dente ( $V_{VT}$ ) diminuíram da região 1 em direção a região 5. A densidade volumétrica do compartimento junto ao osso ( $V_{VB}$ ) apresentou-se aumentada da região 1 para a região 5 o mesmo ocorrendo com a densidade volumétrica dos vasos e nervos ( $V_{V\text{VN}}$ ), ao passo que a densidade volumétrica de tecido conjuntivo ( $V_{VC}$ ) comportou-se como aquela do compartimento T. De modo geral, as diferenças entre uma região e a (s) seguinte (s) no sentido incisal-apical foram significantes.

Tabela 1 - Densidades Volumétricas ( Vv em  $\text{mm}^3/\text{mm}^3 \times 10^{-3} \pm$  desvio padrão ) dos compartimentos junto ao dente ( T ), junto ao osso ( B ) e do ligamento periodontal total ( L ) da face mesial de incisivos inferiores de ratos submetidos a vários tratamentos.

CONTROLE										
Compartimento	REGIÃO 1		REGIÃO 2		REGIÃO 3		REGIÃO 4		REGIÃO 5	
	Impedido	Desimpedido								
T	3,936 ± 0,946	2,760 ± 0,480	2,663 ± 0,418	2,089 ± 0,265	2,424 ± 0,386	1,441 ± 0,305	1,607 ± 0,472	1,417 ± 0,288	1,225 ± 0,483	1,009 ± 0,241
B	1,728 ± 0,445	2,041 ± 0,541	2,065 ± 0,519	2,231 ± 0,265	2,184 ± 0,228	2,426 ± 0,386	2,640 ± 0,481	2,521 ± 0,324	2,663 ± 0,507	2,616 ± 0,228
C	1,391 ± 0,308	1,704 ± 0,464	1,272 ± 0,228	1,583 ± 0,265	0,888 ± 0,169	1,417 ± 0,267	0,696 ± 0,236	1,249 ± 0,538	0,624 ± 0,274	0,719 ± 0,305
VN	0,337 ± 0,218	0,337 ± 0,157	0,793 ± 0,305	0,648 ± 0,187	1,296 ± 0,153	1,009 ± 0,374	1,944 ± 0,458	1,272 ± 0,661	2,039 ± 0,288	1,897 ± 0,301
L	5,664 ± 0,747	4,801 ± 0,371	4,728 ± 0,797	4,320 ± 0,404	4,608 ± 0,432	3,867 ± 0,566	4,247 ± 0,389	3,938 ± 0,236	3,888 ± 0,374	3,625 ± 0,401
VIMBLASTINA 24 horas										
Compartimento	REGIÃO 1		REGIÃO 2		REGIÃO 3		REGIÃO 4		REGIÃO 5	
	Impedido	Desimpedido								
T	3,216 ± 0,365	2,953 ± 0,358	2,424 ± 0,492	2,065 ± 0,326	2,856 ± 0,180	2,113 ± 0,371	2,808 ± 0,285	2,255 ± 0,267	2,305 ± 0,187	1,968 ± 0,314
B	1,991 ± 0,260	2,208 ± 0,338	1,873 ± 0,342	1,655 ± 0,374	2,519 ± 0,358	1,920 ± 0,332	3,264 ± 0,332	2,255 ± 0,288	2,905 ± 0,360	2,423 ± 0,415
C	1,367 ± 0,153	1,681 ± 0,236	1,536 ± 0,274	1,344 ± 0,281	1,823 ± 0,360	1,320 ± 0,274	1,249 ± 0,301	0,912 ± 0,370	0,600 ± 0,318	0,503 ± 0,187
VN	0,624 ± 0,228	0,527 ± 0,375	0,337 ± 0,190	0,311 ± 0,190	0,696 ± 0,180	0,600 ± 0,144	2,015 ± 0,305	1,343 ± 0,370	2,305 ± 0,241	1,920 ± 0,380
L	5,207 ± 0,476	5,161 ± 0,313	4,536 ± 0,829	3,720 ± 0,442	5,375 ± 0,228	3,983 ± 0,541	6,072 ± 0,295	4,510 ± 0,500	5,210 ± 0,500	4,391 ± 0,665
VIMBLASTINA 72 horas										
Compartimento	REGIÃO 1		REGIÃO 2		REGIÃO 3		REGIÃO 4		REGIÃO 5	
	Impedido	Desimpedido								
T	3,216 ± 0,615	2,784 ± 0,274	3,169 ± 0,358	2,329 ± 0,325	2,808 ± 0,265	2,184 ± 0,349	2,903 ± 0,391	2,521 ± 0,470	2,471 ± 0,326	2,352 ± 0,331
B	2,255 ± 0,419	1,513 ± 0,550	1,897 ± 0,504	1,583 ± 0,445	2,495 ± 0,446	1,586 ± 0,374	2,977 ± 0,636	1,920 ± 0,463	3,119 ± 0,749	2,208 ± 0,841
C	1,607 ± 0,288	1,249 ± 0,400	1,249 ± 0,618	1,151 ± 0,432	1,992 ± 0,415	1,201 ± 0,360	1,728 ± 0,638	0,864 ± 0,389	1,104 ± 0,331	0,601 ± 0,281
VN	0,648 ± 0,404	0,264 ± 0,259	0,648 ± 0,512	0,432 ± 0,190	0,503 ± 0,187	0,385 ± 0,281	1,249 ± 0,428	1,056 ± 0,463	2,015 ± 0,592	1,607 ± 0,717
L	5,471 ± 0,418	4,297 ± 0,651	5,066 ± 0,459	3,912 ± 0,586	5,303 ± 0,459	3,770 ± 0,496	5,880 ± 0,722	4,441 ± 0,666	5,590 ± 1,004	4,560 ± 0,932

C - Tecido Conjuntivo do ligamento periodontal junto ao osso.

VN - Vasos e Nervos do ligamento periodontal junto ao osso.

Regiões - secções transversais do ligamento periodontal da extremidade incisal (região 1) à face distal do 3º molar inferior (região 5).

Os valores de Vv representam a média de 3 animais e de 3 cortes por região de cada animal.

Tabela 2 - Comparação entre as densidades volumétricas do ligamento periodontal e de seus compartimentos (dados da tabela 1) nas várias regiões (R1 a R5) da face mesial do ligamento periodontal de incisivo inferior de rato nos grupos controle, impedido e desimpedido.

<b>IMPEDIDO</b>														
<b>L</b>			<b>T</b>			<b>B</b>			<b>C</b>			<b>VN</b>		
R1	>*	R2	R1	>*	R2	R1	<	R2	R1	>	R2	R1	<*	R2
R1	>*	R3	R1	>*	R3	R1	<*	R3	R1	>*	R3	R1	<*	R3
R1	>*	R4	R1	>*	R4	R1	<*	R4	R1	>*	R4	R1	<*	R4
R1	>*	R5	R1	>*	R5	R1	<*	R5	R1	>*	R5	R1	<*	R5
R2	>	R3	R2	>	R3	R2	<	R3	R2	>*	R3	R2	<*	R3
R2	>	R4	R2	>*	R4	R2	<*	R4	R2	>*	R4	R2	<*	R4
R2	>*	R5	R2	>*	R5	R2	<*	R5	R2	>*	R5	R2	<*	R5
R3	>	R4	R3	>*	R4	R3	<*	R4	R3	>	R4	R3	<*	R4
R3	>*	R5	R3	>*	R5	R3	<*	R5	R3	>	R5	R3	<*	R5
R4	>	R5	R4	>*	R5	R4	<	R5	R4	>	R5	R4	<	R5

<b>DESIMPEDIDO</b>														
<b>L</b>			<b>T</b>			<b>B</b>			<b>C</b>			<b>VN</b>		
R1	>	R2	R1	>*	R2	R1	<	R2	R1	>	R2	R1	<	R2
R1	>*	R3	R1	>*	R3	R1	<*	R3	R1	>	R3	R1	<*	R3
R1	>*	R4	R1	>*	R4	R1	<*	R4	R1	>*	R4	R1	<*	R4
R1	>*	R5	R1	>*	R5	R1	<*	R5	R1	>*	R5	R1	<*	R5
R2	>	R3	R2	>*	R3	R2	<	R3	R2	>	R3	R2	<*	R3
R2	>	R4	R2	>*	R4	R2	<	R4	R2	>*	R4	R2	<*	R4
R2	>*	R5	R2	>*	R5	R2	<	R5	R2	>*	R5	R2	<*	R5
R3	<	R4	R3	>	R4	R3	<	R4	R3	>	R4	R3	<	R4
R3	>	R5	R3	>*	R5	R3	<	R5	R3	>*	R5	R3	<*	R5
R4	>	R5	R4	>*	R5	R4	<	R5	R4	>*	R5	R4	<*	R5

**L** - ligamento periodontal

**T** - compartimento junto ao dente do ligamento periodontal

**B** - compartimento junto ao osso do ligamento periodontal

**C** - tecido conjuntivo do compartimento junto ao osso

**VN** - vasos + nervos do compartimento junto ao osso

\* - indica diferença significativa (  $p < 0,05$  )

As diferenças entre controles impedidos e desimpedidos em cada região são mostradas no gráfico da figura 6. Nos dentes desimpedidos  $V_{VL}$  e  $V_{VT}$  foram sempre menores que nos impedidos, ao passo que para  $V_{VB}$  a tendência foi o inverso. Neste compartimento junto ao osso, a densidade volumétrica do tecido conjuntivo foi maior nos desimpedidos que nos impedidos, ocorrendo o contrário com o volume relativo dos vasos e nervos. As diferenças estatísticas foram inconstantes, porém, mais frequentes nas regiões incisais para  $V_{VL}$  e  $V_{VT}$  e nas regiões apicais para  $V_{VC}$  e  $V_{VN}$ .

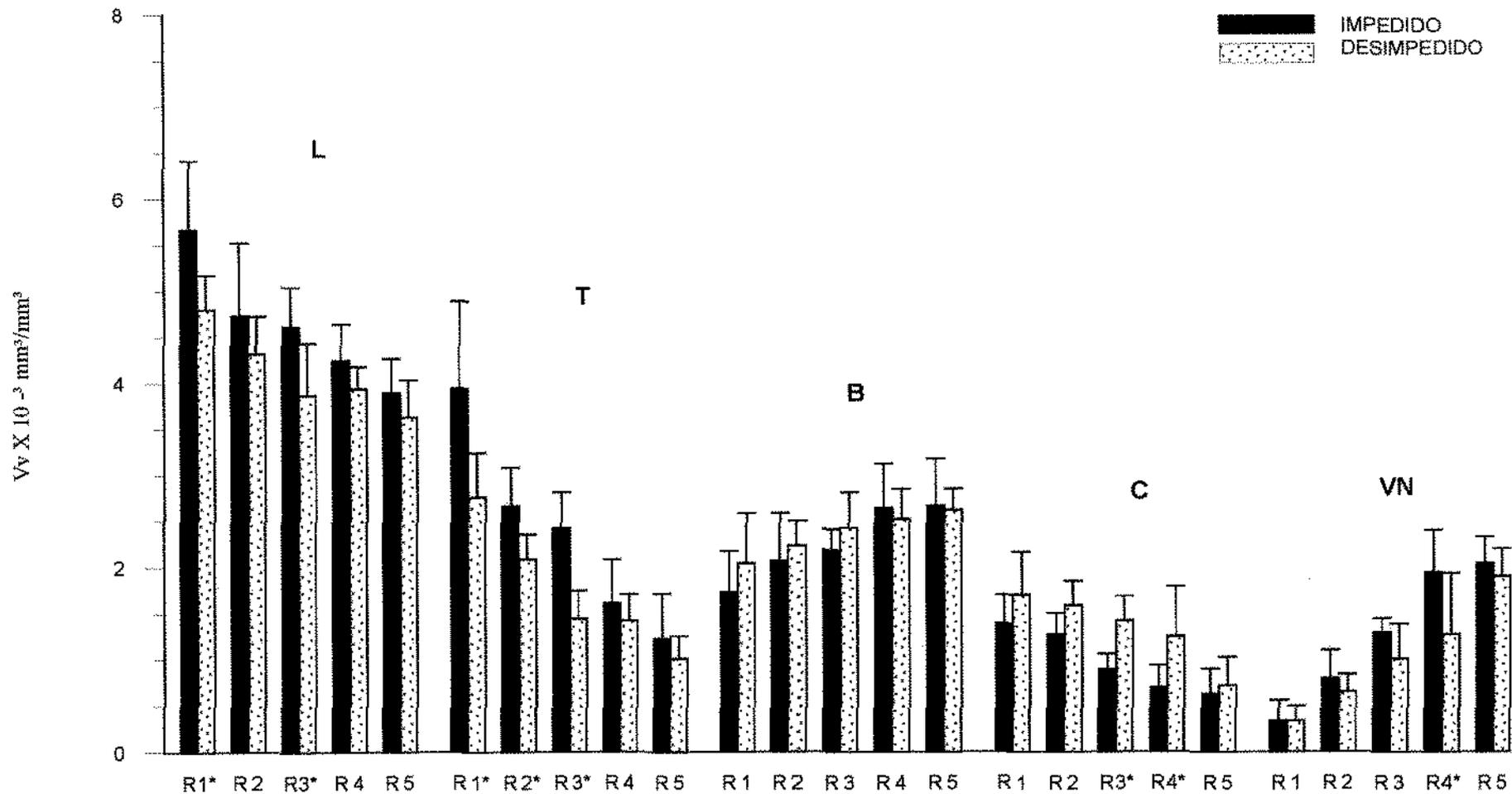


Fig. 6 - Comparação entre as densidades voluméticas (Vv) do ligamento periodontal (L), de seus compartimentos: junto ao dente (T), junto ao osso (B), tecido conjuntivo (C) e vasos + nervos (VN) do compartimento B, nas várias regiões (R1 a R5) da face mesial de incisivos inferiores de rato dos grupos controle. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre controle desimpedido e controle impedido.

### **1.3. Efeito da vimblastina nas condições de impedimento e desimpedimento**

Os resultados indicaram que não houve diferença marcante entre os dois tempos de tratamento pela vimblastina como pode ser melhor observado nos gráficos de regressão quadrática das figuras 7 a 11. Nos dois tempos de tratamento, a vimblastina provocou um aumento no volume relativo de ligamento (L) nas regiões mais apicais e no de seu compartimento junto ao dente (T) em comparação com os respectivos controles impedidos e desimpedidos. Já em relação ao compartimento junto ao osso (B) e à porção de tecido conjuntivo (C), a vimblastina provocou um comportamento inverso, quando comparados os tratados com seus respectivos controles. Em geral, nos tratados impedidos, as densidades volumétricas foram maiores, enquanto nos tratados desimpedidos foram menores que seus respectivos controles. Quanto ao volume relativo de vasos e nervos (VN) do compartimento junto ao osso, o mais comum foi sua diminuição nos animais tratados, tanto nos dentes impedidos como desimpedidos, com algumas diferenças significativas indicadas nos gráficos da figura 12.

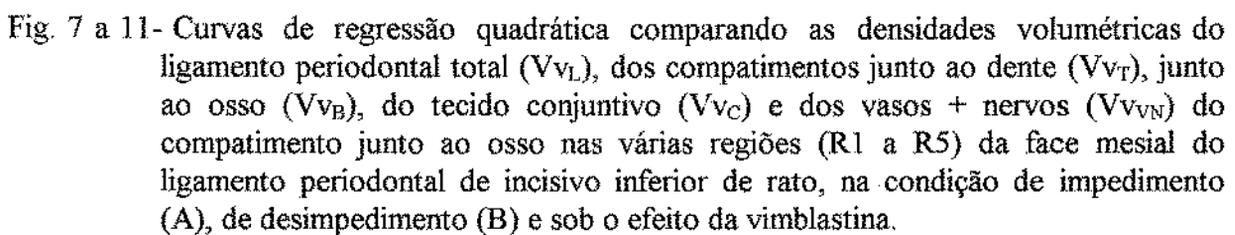
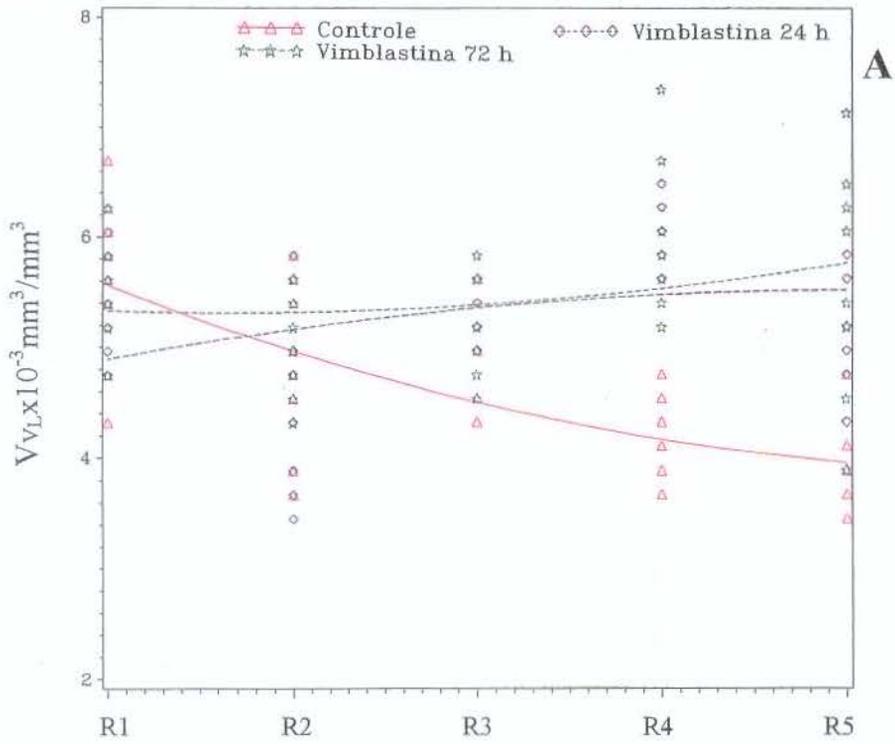


Fig. 7 a 11- Curvas de regressão quadrática comparando as densidades volumétricas do ligamento periodontal total ( $V_{VL}$ ), dos compartimentos junto ao dente ( $V_{VT}$ ), junto ao osso ( $V_{VB}$ ), do tecido conjuntivo ( $V_{VC}$ ) e dos vasos + nervos ( $V_{VVN}$ ) do compartimento junto ao osso nas várias regiões (R1 a R5) da face mesial do ligamento periodontal de incisivo inferior de rato, na condição de impedimento (A), de desimpedimento (B) e sob o efeito da vimblastina.

IMPEDIDO



DESIMPEDIDO

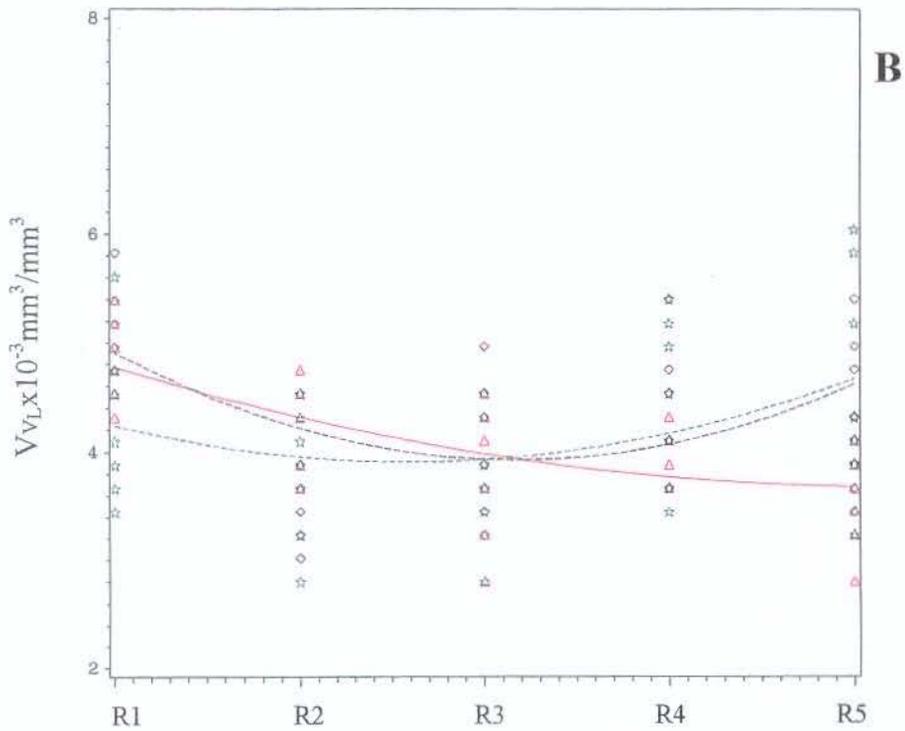


Fig. 7 - V<sub>vL</sub>

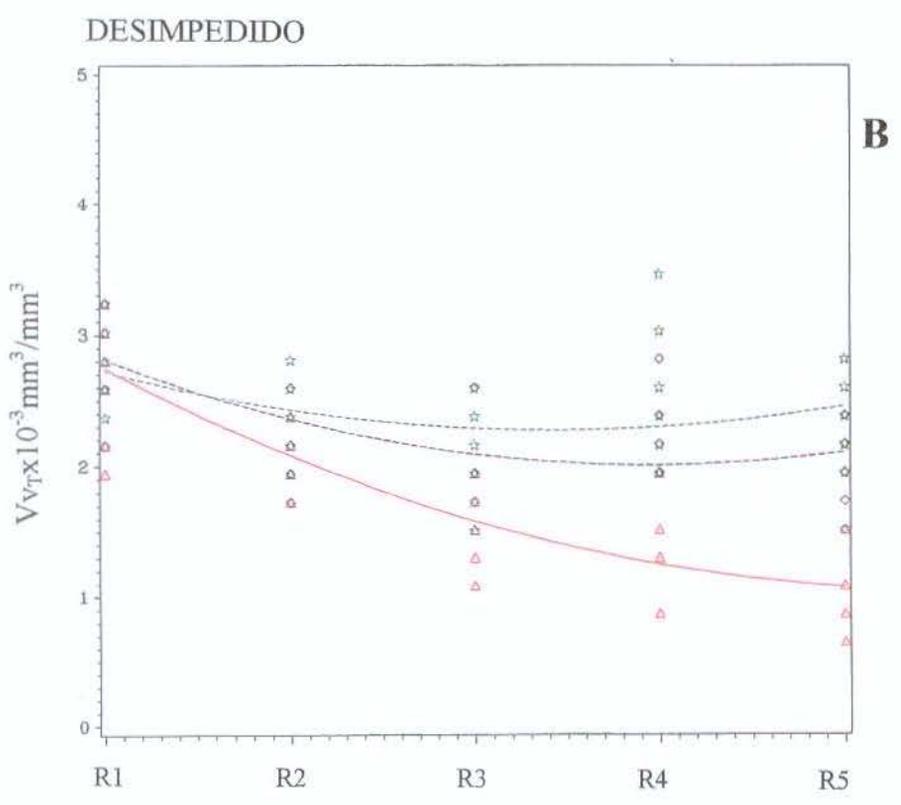
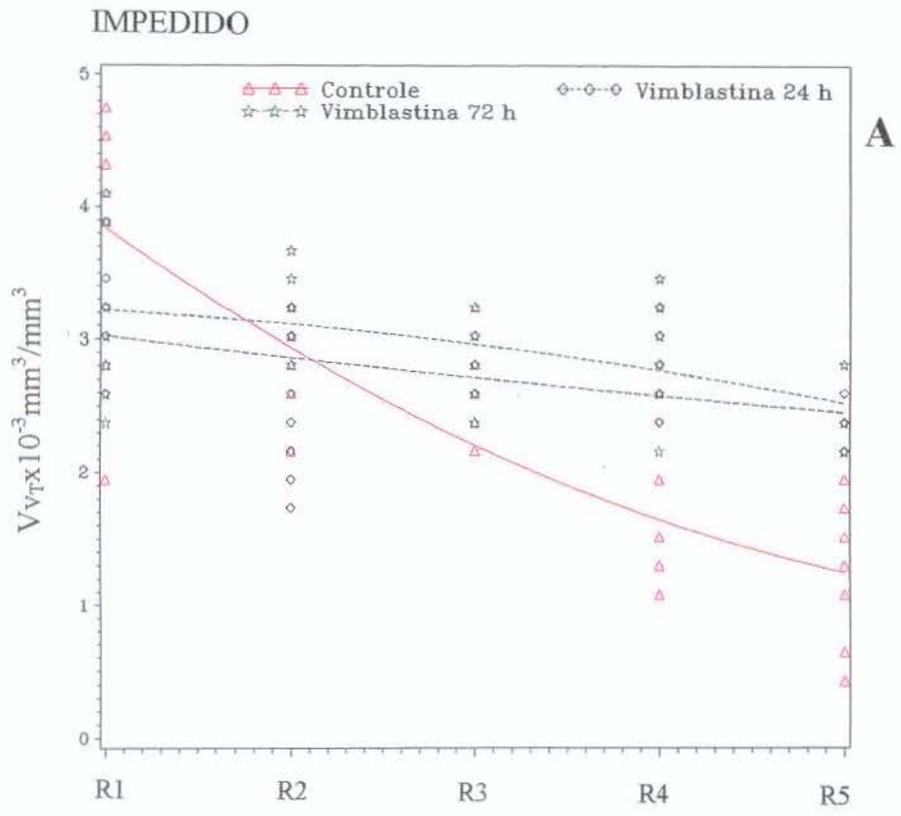
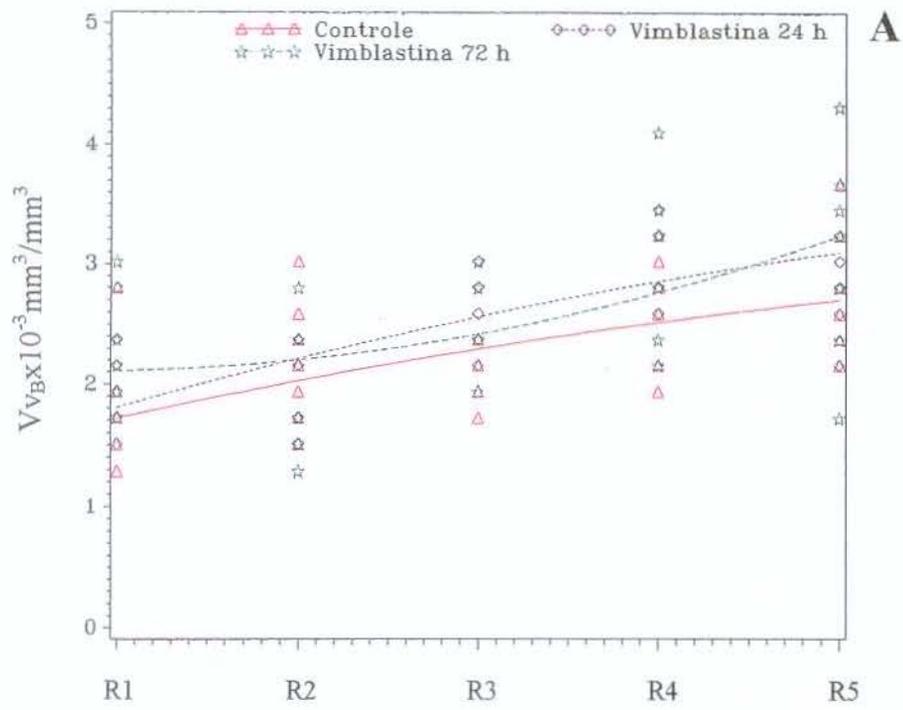


Fig. 8 -  $V_{vT}$

IMPEDIDO



DESIMPEDIDO

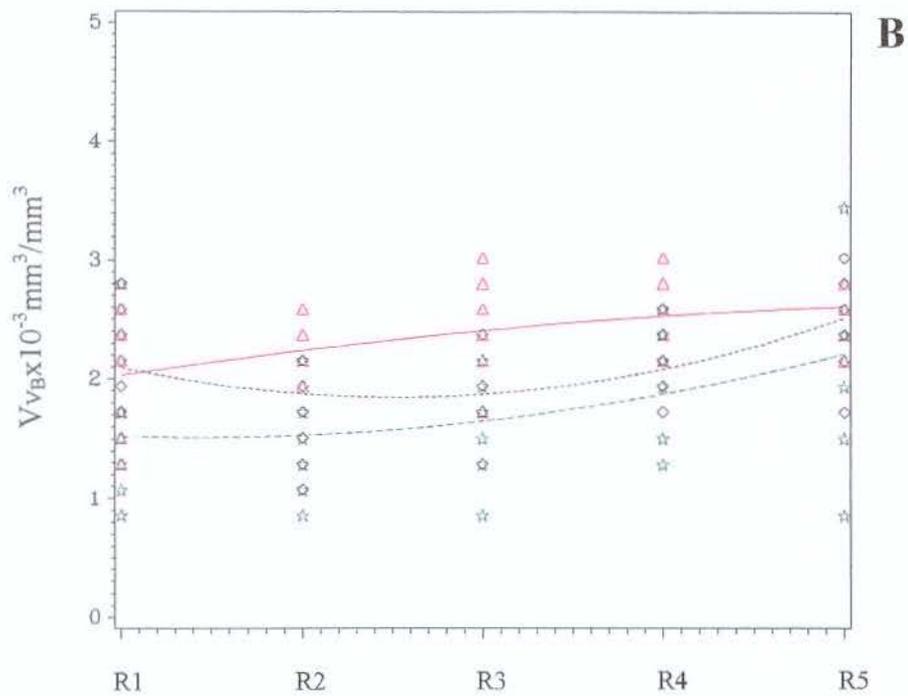
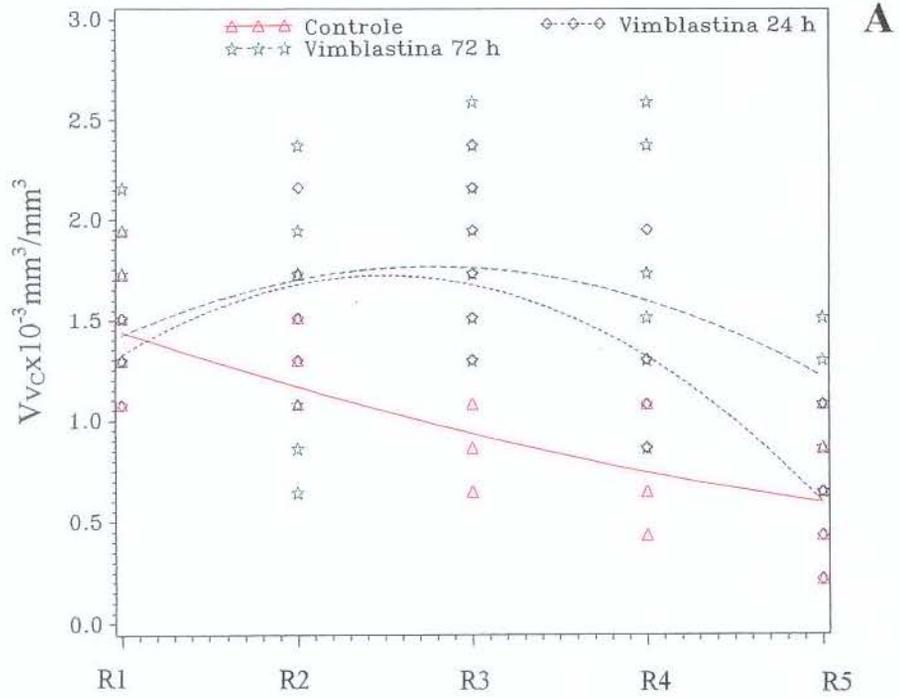


Fig. 9 -  $V_{vB}$

IMPEDIDO



DESIMPEDIDO

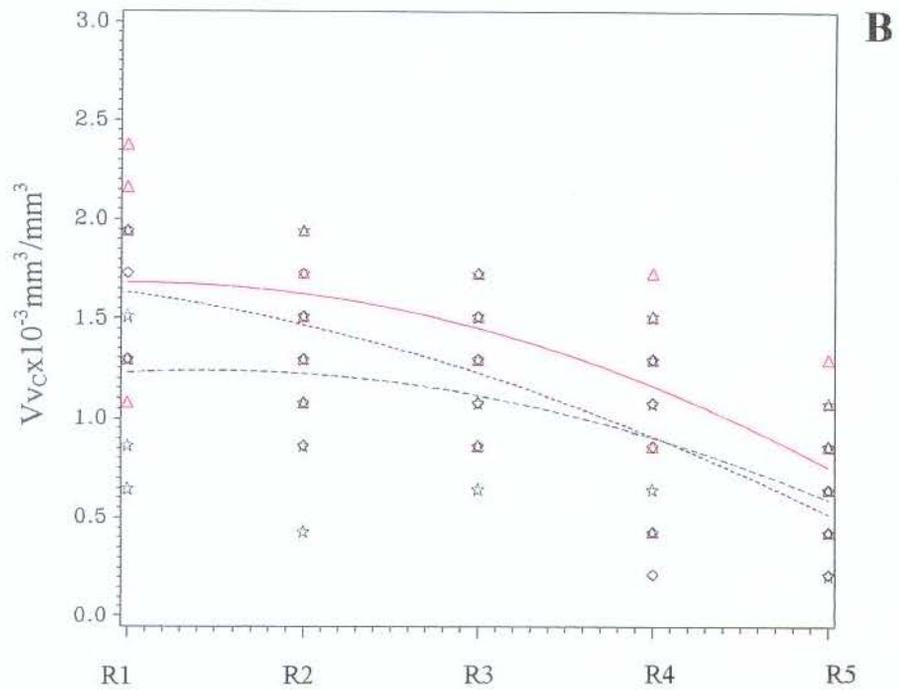
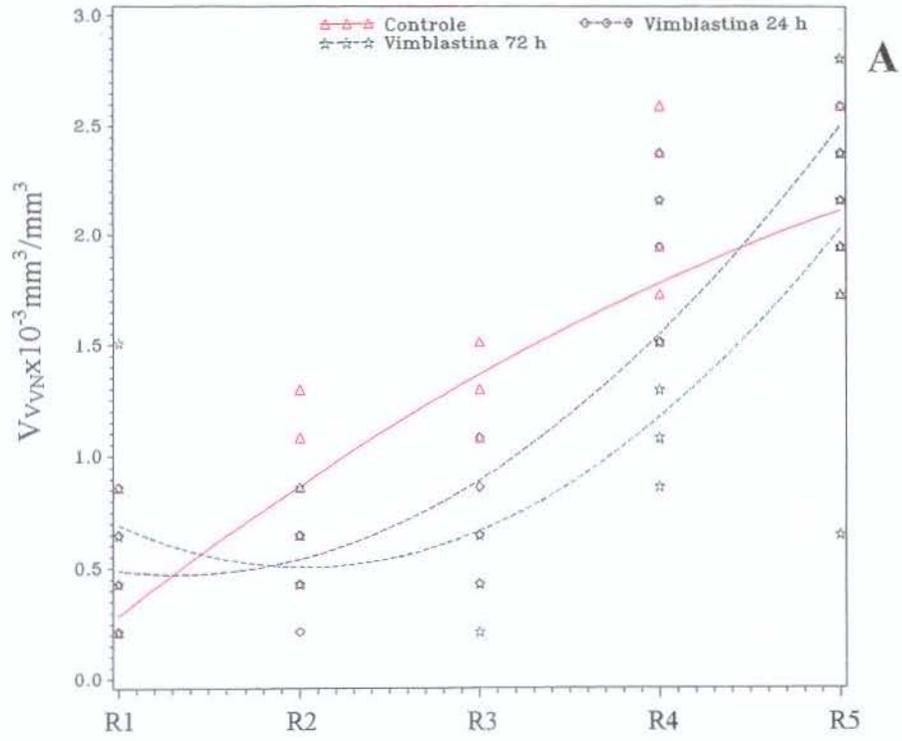


Fig. 10 -  $V_{vc}$

IMPEDIDO



DESIMPEDIDO

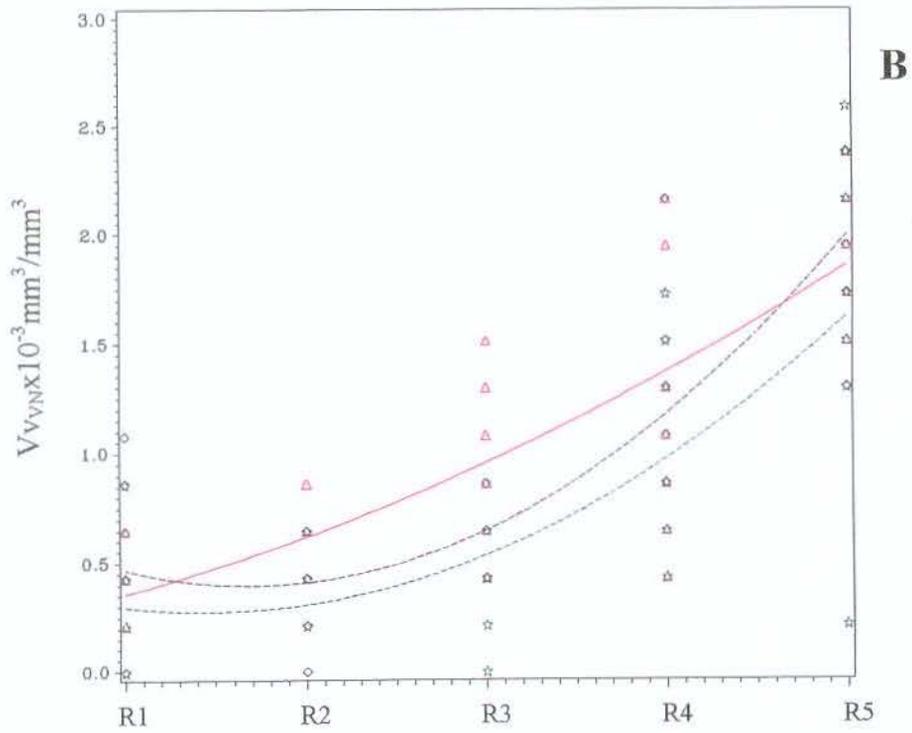


Fig. 11 -  $V_{VN}$

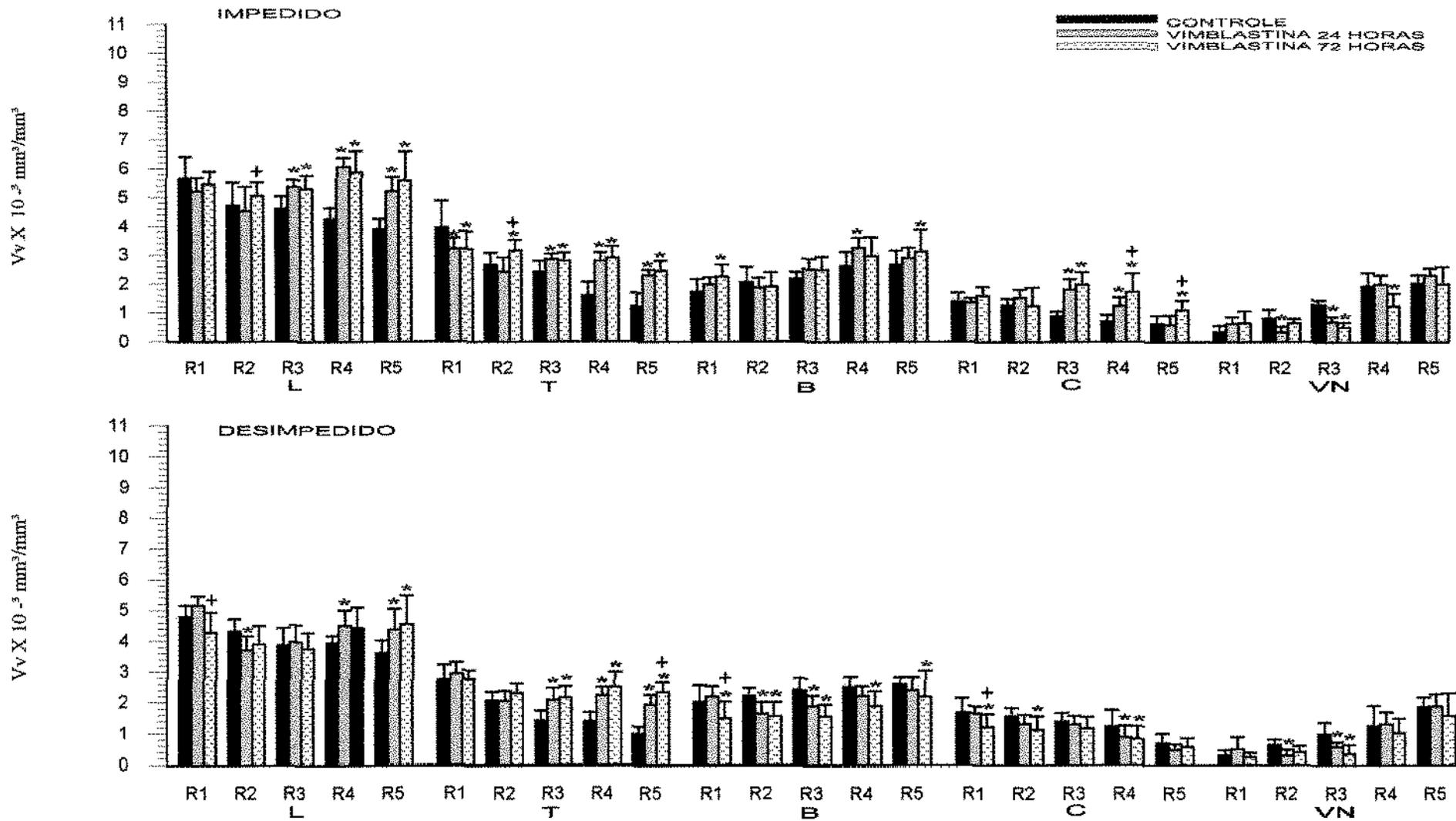


Fig 12 - Comparação entre as densidades volumétricas (Vv) do ligamento periodontal (L) e de seus compartimentos: junto ao dente (T), junto ao osso (B), do tecido conjuntivo (C) e vasos + nervos (VN) do compartimento B, nas várias regiões (R1 a R5) da face mesial de incisivos inferiores de rato dos grupos controle, vimblastina 24 horas e vimblastina 72 horas. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados e o controle. + Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois tempos de tratamento pela vimblastina.

## **2. Densidades volumétricas de fibroblastos e matriz extracelular nas várias regiões e compartimentos da face mesial do ligamento periodontal de incisivo inferior de rato.**

### **2.1. Dados**

A tabela 3 mostra as densidades volumétricas médias de fibroblastos ( $V_{VF}$ ) e de matriz extracelular ( $V_{VME}$ ) dos compartimentos: junto ao dente (T), intermediário (M) e junto ao osso (B) nas cinco regiões da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de ratos nos grupos controle e tratados pela vimblastina, impedidos e desimpedidos.

### **2.2. Controles: impedido e desimpedido**

A comparação entre as densidades volumétricas de fibroblastos e de matriz extracelular por região e em cada compartimento da face mesial do ligamento periodontal de incisivo inferior de rato, nos grupos controle e sob as condições de impedimento e de desimpedimento são mostradas na tabela 4.

O dente impedido dos animais controle mostra no compartimento junto ao dente (T) uma clara tendência de aumento na densidade volumétrica de fibroblastos da região 1 em direção a região 5, apesar de não haver diferenças estatísticas significativas. No compartimento junto ao osso (B), a densidade volumétrica de fibroblastos teve comportamento inverso, destacando-se, ainda, que a maioria das diferenças foram estatisticamente significativas. No compartimento intermediário (M), a densidade volumétrica de fibroblastos mais baixa foi observada na região 3, havendo tendência de aumento desta em direção às regiões 1 e 5, observando-se também várias diferenças com significância estatística.

No grupo controle desimpedido, a densidade volumétrica de fibroblastos dos compartimentos junto ao dente (T) e intermediário (M), em geral, apresentou comportamento inverso ao do grupo impedido, enquanto no compartimento junto ao osso (B), o comportamento foi semelhante.



Tabela 3 - Densidades Volumétricas (Vv em  $\text{mm}^3/\text{mm}^3 \times 10^{-6} \pm$  desvio padrão) de fibroblastos e matriz extracelular nos vários compartimentos e regiões da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de ratos submetidos a vários tratamentos.

<b>CONTROLE</b>											
<b>Compartimento</b>	<b>REGIÃO 1</b>		<b>REGIÃO 2</b>		<b>REGIÃO 3</b>		<b>REGIÃO 4</b>		<b>REGIÃO 5</b>		
	<b>Impedido</b>	<b>Desimpedido</b>									
<b>T</b> fibroblastos	2,287 ± 0,42	2,058 ± 0,35	2,296 ± 0,42	1,906 ± 0,45	2,315 ± 0,55	1,991 ± 0,37	2,401 ± 0,33	2,268 ± 0,43	2,325 ± 0,32	1,972 ± 0,51	
matriz extracelular	3,173 ± 0,41	3,392 ± 0,36	3,135 ± 0,43	3,525 ± 0,45	3,144 ± 0,53	3,478 ± 0,38	3,058 ± 0,34	3,182 ± 0,43	3,144 ± 0,30	3,468 ± 0,51	
<b>M</b> fibroblastos	1,877 ± 0,61	0,905 ± 0,22	1,629 ± 0,38	1,258 ± 0,46	1,391 ± 0,53	1,420 ± 0,49	1,553 ± 0,54	1,477 ± 0,42	1,867 ± 0,45	1,420 ± 0,50	
matriz extracelular	3,563 ± 0,60	4,354 ± 0,27	3,811 ± 0,39	4,173 ± 0,47	4,068 ± 0,52	4,030 ± 0,47	3,840 ± 0,52	3,945 ± 0,48	3,573 ± 0,45	4,021 ± 0,48	
<b>B</b> fibroblastos	1,248 ± 0,47	0,972 ± 0,37	0,991 ± 0,35	0,791 ± 0,34	1,153 ± 0,49	0,753 ± 0,42	0,543 ± 0,43	0,448 ± 0,52	0,305 ± 0,37	0,610 ± 0,45	
matriz extracelular	3,392 ± 1,02	4,268 ± 0,43	3,801 ± 0,50	3,259 ± 1,20	3,420 ± 0,62	3,201 ± 0,83	1,572 ± 1,40	1,096 ± 1,04	1,639 ± 1,39	1,896 ± 1,08	
<b>VIMBLASTINA 24 HORAS</b>											
<b>Compartimento</b>	<b>REGIÃO 1</b>		<b>REGIÃO 2</b>		<b>REGIÃO 3</b>		<b>REGIÃO 4</b>		<b>REGIÃO 5</b>		
	<b>Impedido</b>	<b>Desimpedido</b>									
<b>T</b> fibroblastos	1,829 ± 0,35	2,191 ± 0,39	1,856 ± 0,47	1,982 ± 0,31	1,572 ± 0,37	1,858 ± 0,37	1,725 ± 0,46	1,839 ± 0,27	1,782 ± 0,33	1,848 ± 0,30	
matriz extracelular	3,621 ± 0,34	3,259 ± 0,41	3,602 ± 0,56	3,430 ± 0,30	3,773 ± 0,38	3,459 ± 0,65	3,697 ± 0,47	3,621 ± 0,29	3,668 ± 0,34	3,544 ± 0,36	
<b>M</b> fibroblastos	1,277 ± 0,36	1,258 ± 0,32	1,181 ± 0,41	1,553 ± 0,41	1,581 ± 0,49	1,172 ± 0,40	1,096 ± 0,41	1,191 ± 0,30	1,239 ± 0,44	0,619 ± 0,21	
matriz extracelular	4,106 ± 0,39	4,154 ± 0,35	4,173 ± 0,45	3,850 ± 0,40	3,849 ± 0,53	4,230 ± 0,41	4,326 ± 0,43	4,126 ± 0,74	4,135 ± 0,46	4,688 ± 0,28	
<b>B</b> fibroblastos	1,000 ± 0,38	0,724 ± 0,33	1,086 ± 0,38	0,753 ± 0,44	0,553 ± 0,45	0,581 ± 0,26	0,353 ± 0,36	0,305 ± 0,30	0,333 ± 0,35	0,305 ± 0,33	
matriz extracelular	4,049 ± 0,50	3,868 ± 0,54	3,801 ± 0,60	3,621 ± 0,56	1,887 ± 1,60	3,440 ± 0,98	2,325 ± 1,71	1,448 ± 1,39	1,782 ± 1,14	1,467 ± 1,19	
<b>VIMBLASTINA 72 HORAS</b>											
<b>Compartimento</b>	<b>REGIÃO 1</b>		<b>REGIÃO 2</b>		<b>REGIÃO 3</b>		<b>REGIÃO 4</b>		<b>REGIÃO 5</b>		
	<b>Impedido</b>	<b>Desimpedido</b>									
<b>T</b> fibroblastos	1,686 ± 0,67	1,725 ± 0,45	1,553 ± 0,53	1,744 ± 0,49	1,563 ± 0,56	1,801 ± 0,48	1,553 ± 0,48	1,810 ± 0,54	1,639 ± 0,32	1,210 ± 0,64	
matriz extracelular	3,573 ± 0,60	3,478 ± 0,59	3,697 ± 0,51	3,525 ± 0,58	3,783 ± 0,60	3,602 ± 0,52	3,811 ± 0,55	3,430 ± 0,57	3,792 ± 0,30	4,097 ± 0,71	
<b>M</b> fibroblastos	1,439 ± 0,39	1,239 ± 0,61	1,391 ± 0,57	1,420 ± 0,52	1,496 ± 0,57	1,563 ± 0,51	1,229 ± 0,55	1,353 ± 0,48	1,058 ± 0,45	1,201 ± 0,50	
matriz extracelular	3,887 ± 0,50	3,973 ± 0,69	3,878 ± 0,51	3,887 ± 0,61	3,849 ± 0,63	3,602 ± 0,66	3,983 ± 0,65	3,621 ± 0,56	4,068 ± 0,45	4,049 ± 0,48	
<b>B</b> fibroblastos	0,838 ± 0,51	0,867 ± 0,45	0,800 ± 0,60	0,781 ± 0,58	0,905 ± 0,55	0,534 ± 0,36	0,524 ± 0,44	0,314 ± 0,41	0,238 ± 0,37	0,048 ± 0,12	
matriz extracelular	3,211 ± 0,94	3,001 ± 0,80	3,182 ± 1,20	2,944 ± 0,76	3,116 ± 1,16	3,173 ± 0,81	3,220 ± 1,62	2,334 ± 1,32	1,715 ± 1,39	0,753 ± 0,84	

T- Ligamento periodontal junto ao dente

M- Ligamento periodontal intermediário

B- Ligamento periodontal junto ao osso

Regiões - secções transversais do ligamento periodontal da extremidade incisal (região 1) à face distal do 3º molar inferior (região 5).

Os valores de Vv representam a média de 3 animais e de 3 cortes por região de cada animal.

Tabela 4 - Comparação entre as densidades volumétricas de fibroblastos e matriz extracelular (dados da tabela 3) dos compartimentos: T (junto ao dente), M (intermediário), B (junto ao osso); nas várias regiões (R1 a R5) da face mesial do ligamento periodontal de incisivo inferior de rato, nos dois grupos controle (impedido e desimpedido).

FIBROBLASTOS					
IMPEDIDO			DESIMPEDIDO		
T	M	B	T	M	B
R1 < R2	R1 >* R2	R1 >* R2	R1 > R2	R1 <* R2	R1 > R2
R1 < R3	R1 >* R3	R1 > R3	R1 > R3	R1 <* R3	R1 >* R3
R1 < R4	R1 >* R4	R1 >* R4	R1 <* R4	R1 <* R4	R1 >* R4
R1 < R5	R1 > R5	R1 >* R5	R1 > R5	R1 <* R5	R1 >* R5
R2 < R3	R2 >* R3	R2 < R3	R2 < R3	R2 < R3	R2 > R3
R2 < R4	R2 > R4	R2 >* R4	R2 <* R4	R2 <* R4	R2 >* R4
R2 < R5	R2 <* R5	R2 >* R5	R2 < R5	R2 < R5	R2 > R5
R3 < R4	R3 < R4	R3 >* R4	R3 <* R4	R3 < R4	R3 >* R4
R3 < R5	R3 <* R5	R3 >* R5	R3 > R5	R3 = R5	R3 > R5
R4 > R5	R4 <* R5	R4 >* R5	R4 >* R5	R4 > R5	R4 < R5

MATRIZ EXTRACELULAR					
IMPEDIDO			DESIMPEDIDO		
T	M	B	T	M	B
R1 > R2	R1 <* R2	R1 < R2	R1 < R2	R1 > R2	R1 >* R2
R1 > R3	R1 <* R3	R1 < R3	R1 < R3	R1 >* R3	R1 >* R3
R1 > R4	R1 <* R4	R1 > R4	R1 >* R4	R1 >* R4	R1 >* R4
R1 > R5	R1 < R5	R1 > R5	R1 < R5	R1 >* R5	R1 >* R5
R2 < R3	R2 <* R3	R2 > R3	R2 > R3	R2 > R3	R2 > R3
R2 > R4	R2 < R4	R2 > R4	R2 >* R4	R2 >* R4	R2 >* R4
R2 < R5	R2 >* R5	R2 > R5	R2 > R5	R2 > R5	R2 >* R5
R3 > R4	R3 > R4	R3 > R4	R3 >* R4	R3 > R4	R3 >* R4
R3 = R5	R3 >* R5	R3 > R5	R3 > R5	R3 > R5	R3 >* R5
R4 < R5	R4 >* R5	R4 < R5	R4 <* R5	R4 < R5	R4 <* R5

\* indica diferença significativa entre as regiões ( $p < 0,05$ ) pelo teste t.

As densidades volumétricas da matriz extracelular apresentaram, tanto nos dentes impedidos como nos desimpedidos, um comportamento inverso ao das densidades volumétricas de fibroblastos, sendo que, a maior frequência de diferenças com significância estatística foram encontradas no compartimento B do ligamento de dentes desimpedidos.

As diferenças entre as  $V_{VF}$  de ligamento de dentes impedidos e desimpedidos em cada região e compartimento são apresentadas na fig. 13. Na figura 14 o mesmo é feito em relação à  $V_{VME}$ .

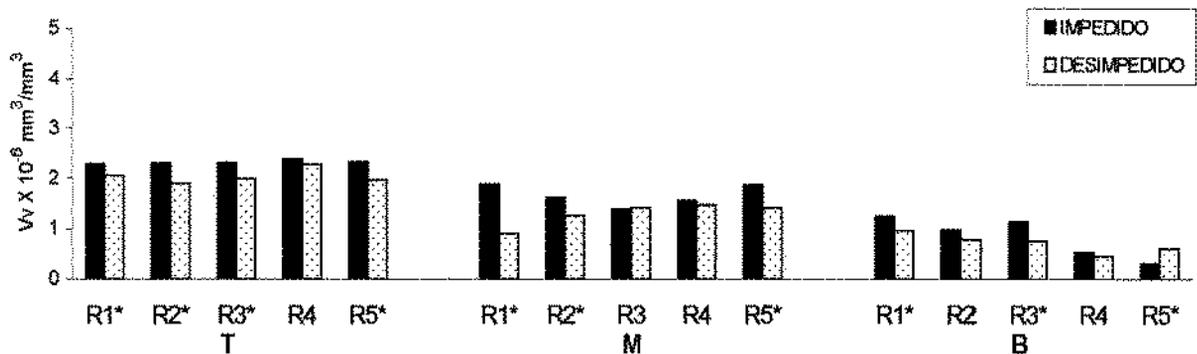


Fig. 13 - Comparação entre as densidades volumétricas ( $V_v$ ) de **fibroblastos** dos compartimentos junto ao dente (T), intermediário (M) e junto ao osso (B) nas várias regiões (R1 a R5) da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de rato dos grupos controles. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre controle impedido e controle desimpedido.

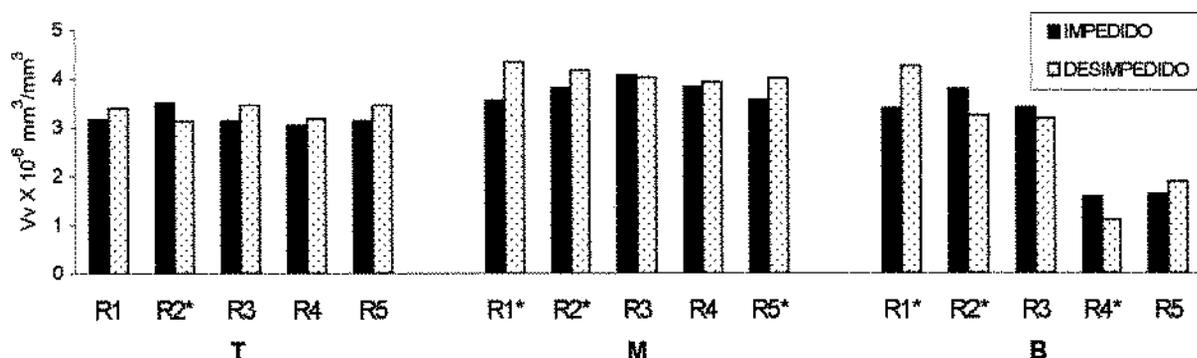


Fig. 14 - Comparação entre as densidades volumétricas ( $V_v$ ) de **matriz extracelular** dos compartimentos junto ao dente (T), intermediário (M) e junto ao osso (B) nas várias regiões (R1 a R5) da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de rato dos grupos controles. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre controle impedido e controle desimpedido.

### **2.3. Efeito da vimblastina nas condições de impedimento e desimpedimento**

Os efeitos da vimblastina sobre as densidades volumétricas de fibroblastos ( $V_{VF}$ ), nos três compartimentos: junto ao dente (T), intermediário (M) e junto ao osso (B), das cinco regiões da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de rato, nas condições de impedimento e de desimpedimento são mostrados nos gráficos da figura 15 e nas curvas de regressão quadrática da figura 16.

Nos três compartimentos dos dentes impedidos, observou-se uma diminuição do volume relativo de fibroblastos, provocada pela vimblastina em todas as regiões, exceção feita a R3 do compartimento M. Já no ligamento dos dentes desimpedidos a diminuição de  $V_{VF}$  dos tratados em relação aos controles foi menos freqüente, menos acentuada e, no compartimento M, a tendência foi de aumento de  $V_{VF}$  dos tratados.

Os efeitos da vimblastina sobre as densidades volumétricas de matriz extracelular, em geral, pode ser descrito como o contrário do que ocorreu com a densidade volumétrica dos fibroblastos, o que pode ser visto nos gráficos das figuras 17 e 18.

Das diferenças entre os dois grupos tratados com vimblastina, 24 e 72 horas após a injeção, poucas tiveram significância estatística resultando que as curvas de regressão mostram um comportamento quase sempre semelhante entre os dois grupos (fig. 18).

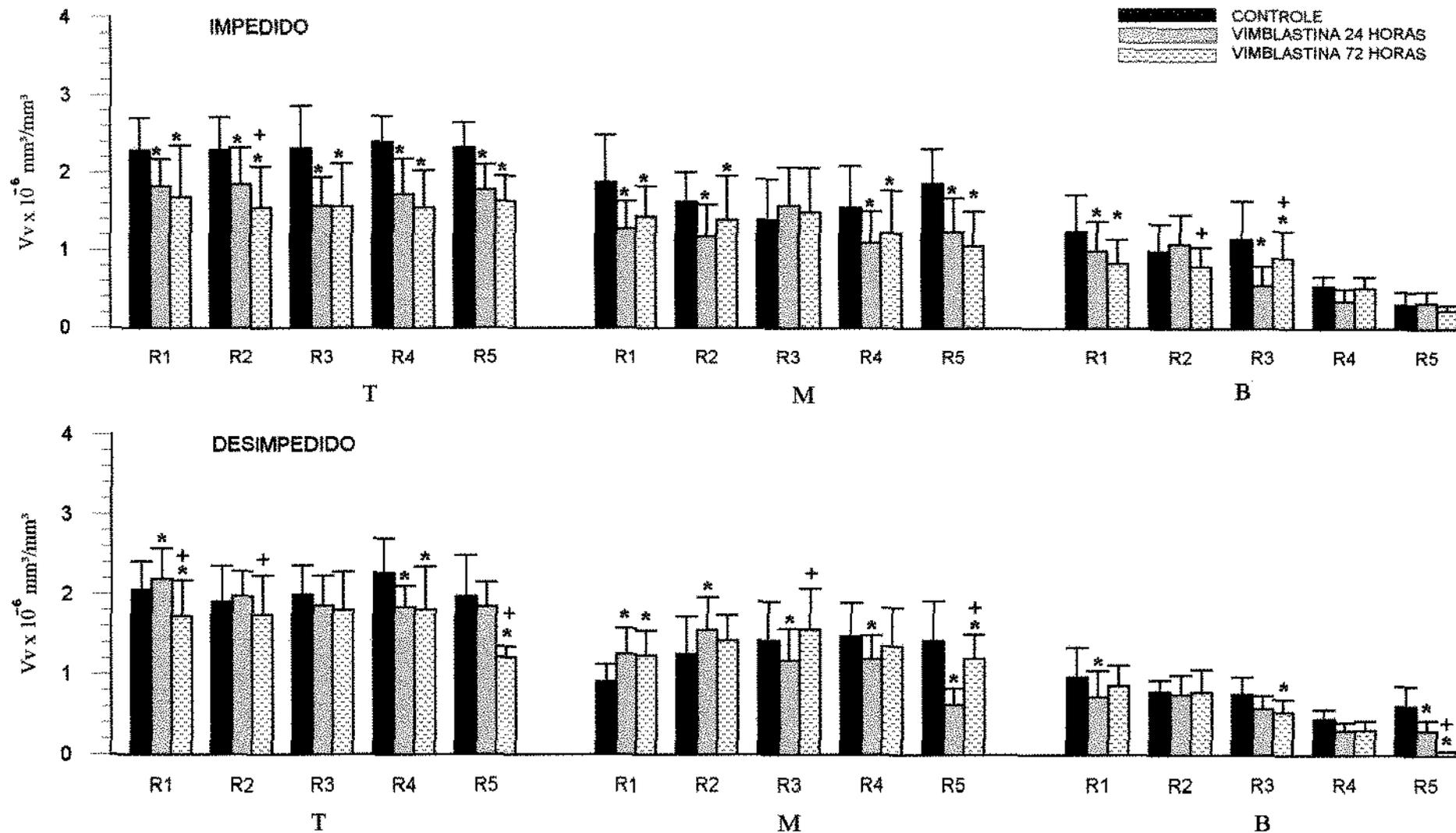
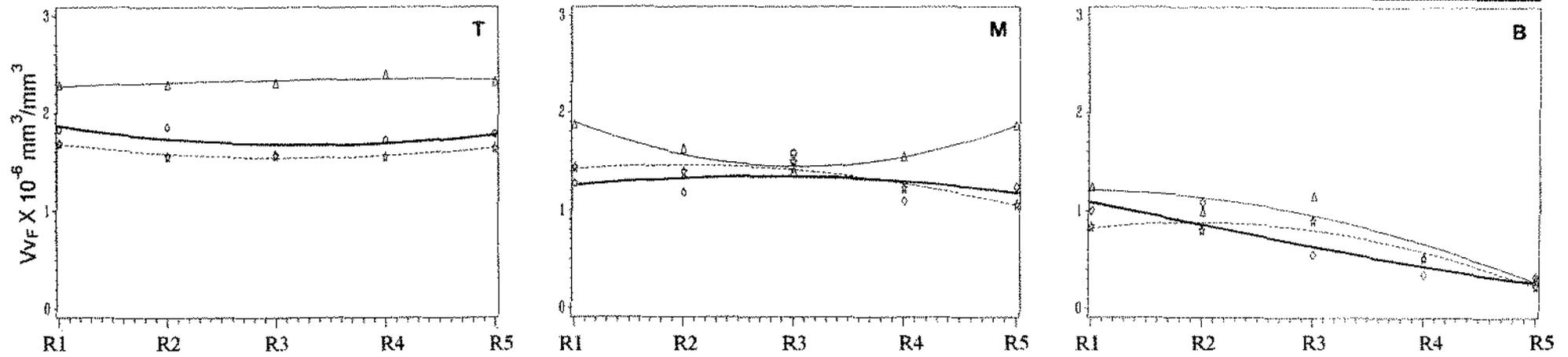


Fig 15 - Comparação entre as densidades volumétricas ( $V_v$ ) de fibroblastos dos compartimentos: junto ao dente (T), intermediário (M) e junto ao osso (B) nas várias regiões (R1 a R5) da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de rato dos grupos controle, vimblastina 24 horas, vimblastina 72 horas, nas condições de impedimento e desimpedimento. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados e os respectivos controles. + Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois tempos de tratamento pela vimblastina.

**IMPEDIDO**



**DESIMPEDIDO**

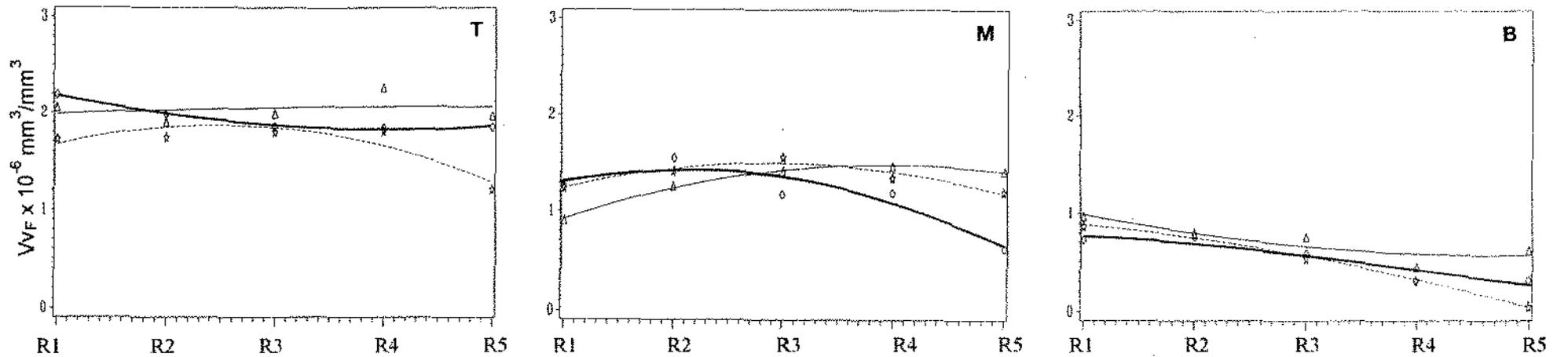


Fig 16 - Curvas de regressão quadrática comparando as densidades volumétricas de fibroblastos ( $Vv_F$ ) dos compartimentos: junto ao dente (T), intermediário (M) e junto ao osso (B) nas várias regiões (R1 a R5) da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de rato, nas condição de impedimento e desimpedimento e sob o efeito da vimblastina.

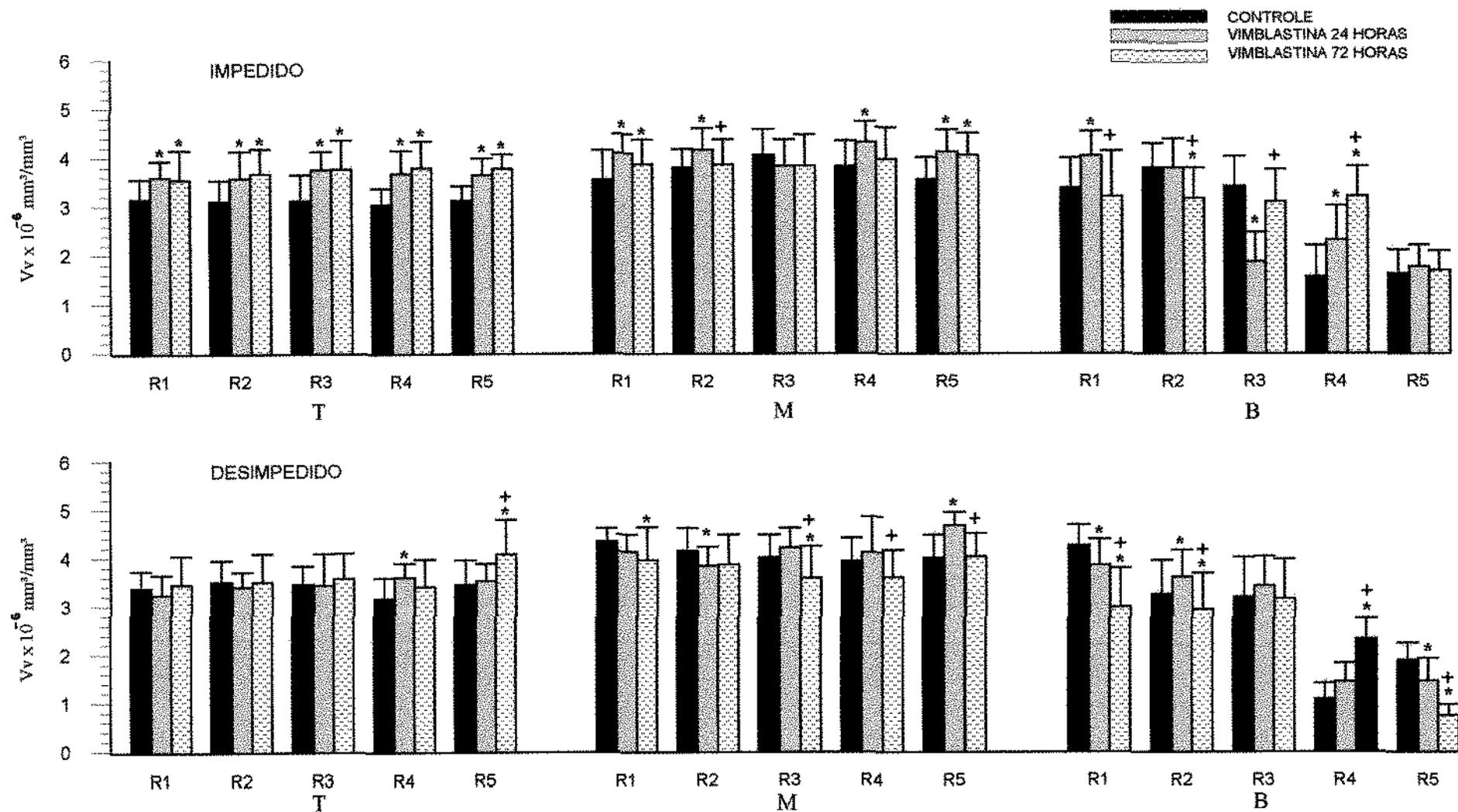


Fig 17 - Comparação entre as densidades volumétricas (Vv) de **matriz extracelular** dos compartimentos: junto ao dente (T), intermediário (M) e junto ao osso (B) nas várias regiões (R1 a R5) da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de rato dos grupos controle, vimblastina 24 horas e vimblastina 72 horas, nas condições de impedimento e desimpedimento. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados e os respectivos controles. + Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois tempos de tratamento pela vimblastina.

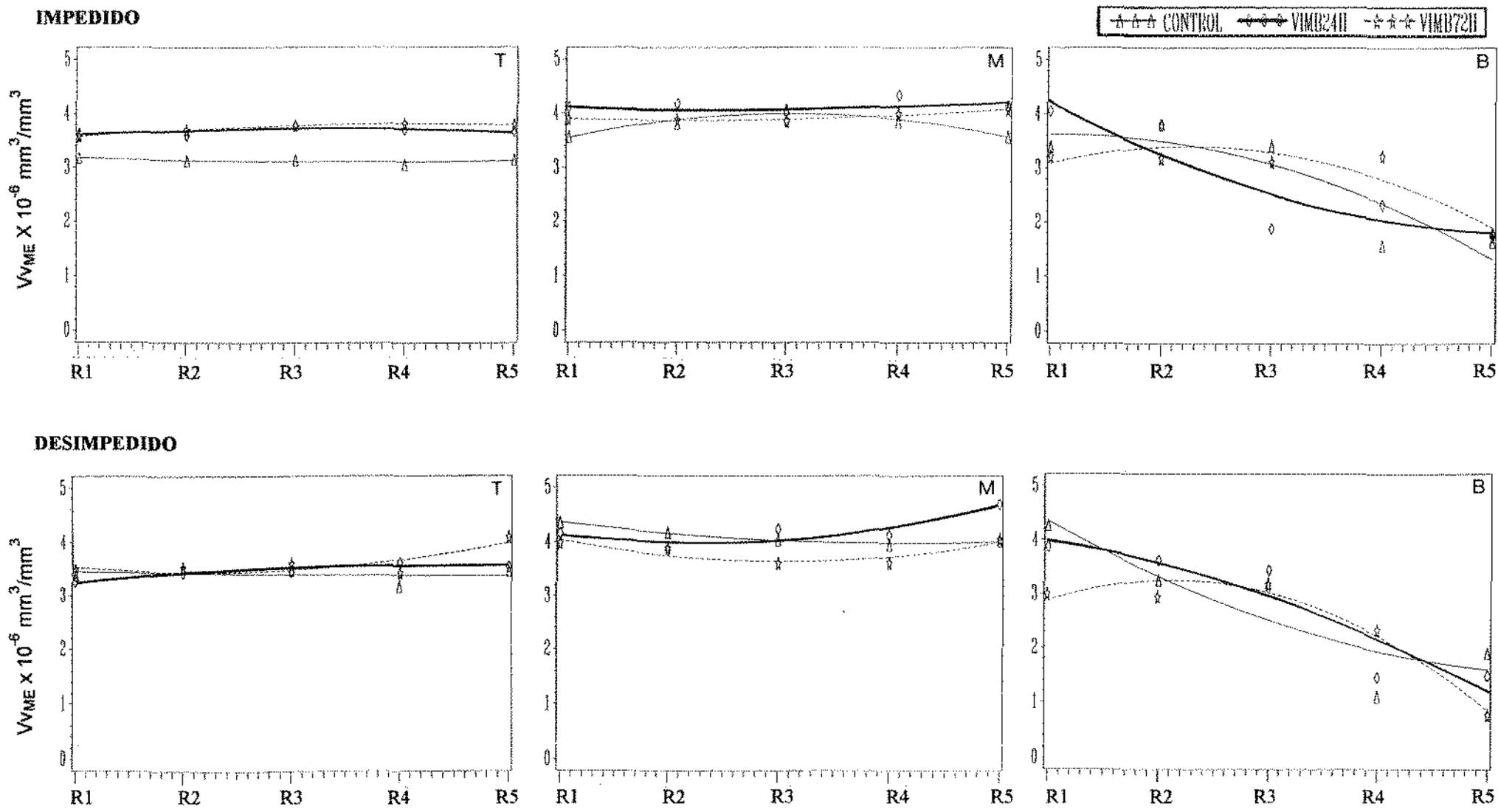


Fig. 18 - Curvas de regressão quadrática comparando as densidades volumétricas de **matriz extracelular** ( $V_{VME}$ ) dos compartimentos: junto ao dente (T), intermediário (M) e junto ao osso (B) nas várias regiões (R1 a R5) da face mesial do ligamento periodontal de incisivos inferiores de rato, nas condição de impedimento e desimpedimento e sob o efeito da vimblastina.

## DISCUSSÃO

Os incisivos desimpedidos de roedores têm sido muito usados em estudos de erupção dental, pois expressariam o movimento eruptivo puro não sujeito ao atrito e desgaste (Moxham & Berkovitz, 1995). Estes dentes são hipofuncionais e sua velocidade de erupção é, praticamente, o dobro daquela dos incisivos normais (Ness, 1964 e Michaeli & Weinreb, 1968). Os dentes em oclusão normal são, em geral, denominados impedidos e como controles dos desimpedidos, têm sido usados tanto os contra-laterais do mesmo animal como dentes normais de outros animais (i.e. de animais com os dois incisivos em oclusão). Na comparação de nossos resultados com os da literatura, referiremo-nos a dentes normais àqueles em que os incisivos, da mesma arcada, permaneceram intactos e, usaremos o termo impedido para os contra-laterais de dentes incisivos desocluídos ou desimpedidos. Esses contra-laterais são dentes em hiperfunção já que se atritam com os dois incisivos antagonistas, tanto que esses últimos não apresentam super-crescimento em períodos longos de experimentos (Michaeli & Weinreb, 1968). Como sinônimos, e talvez melhor denominação, usaremos os termos normofuncional para o dente intacto na mesma arcada e hiperfuncional para o dente contra-lateral intacto de um dente hipofuncional que foi reduzido para tirá-lo de oclusão.

Trabalhos que procuram comparar áreas, larguras ou volumes de várias regiões do LPD ao longo do dente, excluem a região mais incisal que aqui denominamos região 1 (R1) por não ter um contorno ósseo uniforme (Steigman *et al*, 1983 e Blaushild *et al*, 1992), conforme descrevemos. Por outro lado, nós não incluímos a região mais apical do dente (da face distal do 3º molar inferior para trás) considerada pelos citados autores, pois, aí temos o tecido precursor do periodonto, o folículo dental, e assim excluimos, aproximadamente, 1 mm de ligamento.

Discutiremos em primeiro lugar as densidades volumétricas do ligamento periodontal e de seus compartimentos, em relação aos dentes controles impedidos e, em seguida, analisaremos as eventuais alterações provocadas pela desoclusão (ou desimpedimento) e pela vimblastina nos dois tipos de dentes. A seguir, discutiremos os volumes relativos de fibroblastos e de matriz extracelular.

### **Densidades Volumétricas do Ligamento Periodontal (L) e de seus compartimentos (T e B)**

#### **Controle Impedido**

O volume relativo da face mesial do ligamento periodontal dos incisivos controles impedidos ou hiperfuncionais, segundo nossos resultados, parece ser diferente dos incisivos normofuncionais estudados na literatura. Enquanto nos dentes impedidos o volume do ligamento aumenta, de modo constante de apical para incisal (de R5 para R1), a área nos dentes normofuncionais tende a ser uniforme entre 7 e 15 mm a partir do ápice segundo Michaeli *et al* (1986), enquanto Blaushild *et al* (1992) mostram que esta área sofre pequena variação entre 4 e 18 mm, sendo significativamente mais ampla na região média do dente, equivalente à nossa região 3.

É preciso notar, porém, as diferentes medidas feitas. O grupo de Michaeli, Steigman e colaboradores usam as medidas da largura e calculam as áreas ou volumes por equações polinomiais. Em alguns de seus trabalhos, mostram as larguras individuais de cada face do ligamento e mostram que a face mesial é a mais estreita, enquanto que a lingual é a mais larga, ficando a distal como intermediária. Quando se referem à área, porém, consideram a área total do ligamento ou de seus compartimentos junto ao dente e junto ao osso.

Segundo Steigman *et al* (1989) a largura da face mesial, mas não da distal, aumenta, significativamente, nos dentes hiperfuncionais em relação aos normais acontecendo o mesmo com o volume total do LPD que aumenta 47% nos dentes hiperfuncionais ou impedidos.

Analisando os vários compartimentos em que o ligamento foi dividido constatamos que, segundo Steigman *et al* (1983), a porção junto ao dente na face mesial dos dentes normais, aumenta de largura dos 4 aos 8 milímetros do ápice, ficando constante dos 8 aos 18 milímetros. O mesmo foi verificado por Michaeli *et al* (1986), em relação a área do compartimento dos 7 aos 15 milímetros. Já Blaushild *et al* (1992), do mesmo grupo de pesquisadores, mostram, também, em incisivos normais, um aumento gradativo da área deste compartimento dos 4 aos 18 milímetros a partir do ápice, porém em relação à largura deste compartimento, na face mesial, ela permaneceu constante, diminuindo apenas na porção mais apical e que não foi utilizada em nosso trabalho.

Em relação ao compartimento junto ao osso, Steigman *et al* (1983) relatam que a área desse compartimento em incisivos normofuncionais apresenta tendência de similaridade, apesar dos valores divergentes ao longo do dente, enquanto nossos resultados coincidem, em parte, com os de Blaushild *et al* (1992) que referem aumento, de incisal para apical, do compartimento junto ao osso, em incisivos normofuncionais e inferem este aumento à maior quantidade de vasos sanguíneos. Mostraram também, estes autores, que a relação vasos sanguíneos / tecido conjuntivo é máxima junto ao ápice e se inverte, gradualmente, em direção incisal, o que coincide com nossos resultados em dentes hiperfuncionais.

Em relação aos vasos sanguíneos, Moxham *et al* (1985) também observaram que a porcentagem e a densidade de superfície de capilares, no ligamento periodontal em incisivo normofuncional, aumentam em direção apical.

### **Efeitos do Desimpedimento**

O desimpedimento, segundo nossos resultados, provocou diminuição no volume relativo do ligamento periodontal da face mesial em comparação com os impedidos. Steigman *et al* (1989) determinaram ser a face mesial, em relação a dentes normofuncionais, mais larga tanto em incisivos hipofuncionais quanto nos hiperfuncionais. Entre hipofuncionais e hiperfuncionais, a largura predomina nos últimos, o que coincide com os nossos resultados. Já a área do LPD só aumentou nos hiperfuncionais uma vez que não houve, praticamente, variação de largura nas várias condições na face distal. Aqueles autores sugerem que nas duas condições a demanda sanguínea está aumentada e, portanto, o aumento da face mesial poderia ser consequência do aumento da vascularização. Em nosso trabalho, observamos que a diminuição do volume relativo da face mesial nos desimpedidos foi, em geral, devida a diminuição do volume relativo do compartimento junto ao dente, mais acentuada nas regiões incisais. No compartimento junto ao osso, as diferenças não foram significativas, sendo observada uma tendência de diminuição do volume relativo de vasos (nervos) compensada pelo aumento de tecido conjuntivo.

Em relação ao compartimento junto ao dente, apesar da diferença no tipo de medida usada, nossos resultados foram semelhantes aos de Michaeli *et al* (1986) que observaram diminuição gradual da área e do volume do referido compartimento em direção apical e, também, de sua diminuição nos dentes desimpedidos em comparação com os incisivos normofuncionais.

### **Efeitos da Vimblastina**

Não encontramos, na literatura, dados sobre vimblastina e esses parâmetros morfométricos analisados neste trabalho. Porém, a correlação inversa entre impedidos e

desimpedidos sob efeito da vimblastina, observada no volume relativo do tecido conjuntivo do compartimento junto ao osso, também foi apontada por Barros (1995) e Novaes (1996), em estudos morfométricos ultraestruturais, utilizando o mesmo material deste estudo. No presente trabalho, observamos que a densidade volumétrica daquele tecido foi, em geral, maior nos dentes impedidos e menor nos dentes desimpedidos em animais tratados com vimblastina em relação aos respectivos controles. Barros (1995) descreve que, nos tratados impedidos, o diâmetro das fibrilas colágenas tem a tendência de se comportar de modo semelhante ao controle, ou seja, eles decrescem da região média do LPD (R3) em direção incisal e apical; nos desimpedidos tratados estes diâmetros aumentam da R3 em direção aos extremos do ligamento periodontal. Novaes (1996) descreve a mesma inversão de comportamento entre impedidos e desimpedidos tratados com vimblastina, em relação aos controles quanto às densidades volumétricas de citoplasma de fibroblastos, mitocôndrias, Golgi e matriz extracelular.

### **Densidades Volumétricas de fibroblastos e matriz extracelular**

As densidades volumétricas medidas em fibroblastos e matriz extracelular nos diversos compartimentos e regiões do ligamento periodontal de incisivos controles impedidos, não diferem, substancialmente, do que é referido na literatura, particularmente em relação ao compartimento junto ao dente (Shore *et al*, 1982; Beertsen & Everts, 1977 e Michaeli *et al*, 1986). Os fibroblastos correspondem a, aproximadamente, 35 a 40% do volume relativo.

Porém, quando se fez a comparação, entre dentes impedidos e desimpedidos, os nossos resultados mostraram que o desimpedimento teria provocado uma diminuição do volume relativo de fibroblastos e conseqüente aumento do volume de matriz extracelular; exatamente o contrário do encontrado por Novaes (1996) que determinou as mesmas densidades volumétricas, no mesmo material, mas ao nível ultraestrutural. Esses resultados de Novaes

(1996) estão de acordo com vários dados da literatura, que evidenciam que na hipofunção ocorre uma diminuição do volume da matriz extracelular (Beertsen & Everts, 1977; Deporter *et al*, 1982 e Beertsen, 1987) e um aumento do número de células e, conseqüentemente, de seu volume relativo (Michaeli *et al*, 1986, 1994).

A explicação desta discrepância parece estar na diferença de resolução entre as nossas medidas e as de Novaes (1996). Com efeito, ao microscópio eletrônico é possível distinguir os finos prolongamentos dos fibroblastos que, por suas dimensões, são facilmente confundíveis, na microscopia óptica, com a matriz circundante. Assim, ao microscópio óptico, a densidade volumétrica da matriz extracelular, provavelmente, foi superestimada, enquanto que a dos fibroblastos foi subestimada. Como isto ocorreu, particularmente, nos incisivos desimpedidos, é possível que o número de processos citoplasmáticos de fibroblastos tenha aumentado no ligamento destes dentes. A veracidade desta hipótese só poderá ser avaliada num futuro trabalho, o que faz com que deixemos, por ora, de considerar os dados de  $V_{VF}$  e  $V_{VME}$ .

### **Considerações finais**

As alterações morfométricas, em compartimentos do LPD, por nós descritas em incisivos impedidos hiperfuncionais de ratos, em relação a medidas feitas em incisivos em oclusão normal encontradas na literatura, não parecem estar diretamente relacionadas ao mecanismo eruptivo, uma vez que, as taxas de erupção, também referidas na literatura, nas duas condições não diferem substancialmente. Por exemplo, Michaeli *et al* (1994) referem a taxa de 499  $\mu\text{m}/\text{dia}$  para a erupção dos incisivos inferiores em oclusão normal, enquanto em dentes hiperfuncionais, Michaeli & Weinreb (1968) encontraram 531,42  $\mu\text{m}/\text{dia}$ .

Em relação a incisivos desimpedidos, constatamos a diminuição do volume relativo do ligamento em relação aos hiperfuncionais, o que está de acordo com a diminuição da largura e

da área do ligamento determinadas por Steigman *et al* (1989). Quando subdividimos o ligamento, verificamos que esta diminuição ocorre em todas regiões e compartimentos com exceção do tecido conjuntivo do compartimento junto ao osso, cujo volume relativo aumenta com o desimpedimento. Segundo Michaeli *et al* (1986), o número de células por unidade de volume aumenta cerca de 50% no ligamento de incisivos desimpedidos com diminuição consequente de matriz extracelular (denominada pelos autores de espaço vital). A mesma diminuição foi constatada por Novaes (1996) usando o mesmo material deste trabalho em nível ultraestrutural. Estudos bioquímicos mostraram que, no desimpedimento, o teor de colágeno não se altera, mas aumenta o de proteínas não colágenas (Van den Bos & Tonino, 1984) e o de glicosaminoglicanas sulfatadas (Kirkham *et al*, 1993), o que poderia estar relacionado com a diminuição de resistência deste tecido à extração do dente como mostraram Chiba *et al* (1981). Não sabemos, por ora, se tais alterações podem estar ligadas à forte aceleração de erupção apresentada por estes dentes, como está claramente estabelecido em inúmeros estudos (v. Moxham & Berkovitz, 1995). Todas as alterações acima mencionadas, bem como as descritas neste trabalho, foram observadas entre 7 e 21 dias após o desimpedimento, enquanto a aceleração de erupção, segundo Chiba *et al* (1973), se inicia no máximo 24 horas após a desocclusão dos incisivos.

O comportamento diferente entre impedidos e desimpedidos sob efeito da vimblastina, em relação ao volume relativo do tecido conjuntivo do compartimento junto ao osso, observado em nosso trabalho, também foi verificado por Barros (1995), em relação ao diâmetro das fibrilas colágenas e por Novaes (1996), em relação às densidades volumétricas de citoplasma de fibroblastos, mitocôndria, Golgi e matriz extracelular.

Algumas drogas têm mostrado ação diferente sobre a taxa de erupção em se tratando de dentes impedidos e desimpedidos. Burn-Murdoch (1990) observou que o citostático

ciclofosfamida provoca retardo na erupção apenas na condição de desimpedimento. Em dentes impedidos, ou em oclusão normal, a droga não altera tal taxa, mas se o dente for desocluido 22 dias após, o efeito retardante da droga se manifesta. Adatia & Berkovitz (1981) observaram o mesmo efeito da ciclofosfamida quando aplicada em dose única. Doses múltiplas, porém, provocam retardo na erupção de dentes impedidos mas com um período de latência maior que o manifestado em dentes desimpedidos. Segundo Berkovitz *et al* (1972), drogas latirogênicas, que alteram especificamente o colágeno, só retardam a erupção em dentes normais ou impedidos.

A vimblastina retarda a erupção dental. Entretanto, o efeito desta droga sobre a taxa de erupção, só foi determinado em dentes com erupção desimpedida (Chiba *et al*, 1980 e Tosello, 1990). Seria interessante verificar sua ação em dentes normais e hiperfuncionais, bem como aprofundar o estudo de como age no mecanismo de erupção.

A ciclofosfamida é um agente alquilante derivado da mostarda nitrogenada, obtido a partir da mecloretamina, sendo que a cisão desta molécula e a liberação da parte ativa, o bicloroetil, só ocorre *in vivo*. O mecanismo geral de ação desta droga ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que seu efeito citotóxico é exercido através da transferência de seus grupos alquila para vários componentes celulares, entre eles o DNA, através de ligações covalentes formando alcoilato. Sua interação com o DNA parece ser de grande importância para a ação citotóxica, sendo que as células em fase de replicação são as mais sensíveis à droga.

Adatia & Berkovitz (1981) observaram que a ciclofosfamida provoca hemorragias, redução na densidade de células e fibras no ligamento periodontal, além de deposição de dentina irregular, extensas áreas acelulares e hemorragia na polpa. A lesão periodontal, produzida pela ciclofosfamida, corresponde a uma área pequena e localizada inicialmente

próxima da porção odontogênica ou basal do incisivo (Adatia & Berkovitz, 1981) que, juntamente com a dentina alterada, acompanha o ligamento à medida que o dente erupciona.

Segundo Burn-Murdoch (1990), quando a ciclofosfamida é administrada antes da ressecção do dente, retarda a erupção porque provocaria uma lesão na porção basal ou proliferativa do ligamento ou na dentina. Já quando a ciclofosfamida é administrada após a ressecção da porção odontogênica do incisivo não produz nenhuma lesão, e seu efeito na erupção não se manifesta. Para explicar estas observações, este autor aventava a hipótese de que estas lesões não afetariam o mecanismo de geração de força, mas antes aumentariam a resistência do dente ao deslocamento, impondo-lhe uma velocidade máxima. Esta velocidade máxima de erupção estaria nos limites da encontrada nos dentes impedidos, daí ela não se alterar.

O mecanismo pelo qual as drogas antimicrotubulares como a colchicina e a vimblastina agem sobre a erupção dental não é conhecido: a vimblastina liga-se, especificamente, à tubulina, inibindo a sua polimerização em microtúbulos (Wilson *et al*, 1974 e Owellen *et al*, 1972). Além de seu importante papel na formação dos fusos mitóticos, os microtúbulos atuam em muitas outras funções celulares como a fagocitose, a exocitose, o transporte axonal de organelas subcelulares e alguns tipos de movimentos celulares (Chabner *et al*, 1996). A associação das drogas antimicrotubulares com a tubulina pode provocar, portanto, outros efeitos além da paralisação das mitoses, tais como: alteração do processo de secreção em fibroblastos e osteoblastos através da desorganização do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso (Ehrlich *et al*, 1974 e Cho & Garant, 1981), inibição da síntese de glicosaminoglicanas sulfatadas por ameloblastos, bem como retardo na exocitose das mesmas (Azevedo *et al*, 1982) e a exocitose da secreção dos ameloblastos em locais anômalos (Moe & Mikkelsen, 1977). A vimblastina reduz o volume relativo de microtúbulos nos fibroblastos do

LPD, tanto nos dentes impedidos como nos desimpedidos (Novaes, 1996) e, parece não alterar a capacidade biossintética destas células, mas provoca um aumento na meia-vida das proteínas não colágenas (Tosello, 1990 e Polacow & Merzel, 1994).

Chiba & Ohshima (1985) sugerem que drogas, como a colchicina e a vimblastina, retardam a erupção porque danificam as paredes dos vasos, inibem a reconstrução da rede capilar e desintegram o citoesqueleto dos fibroblastos do ligamento periodontal, interferindo na sua contração e no desenvolvimento da tensão dos mesmos e das fibras colágenas.

Esta ação sobre os vasos poderia estar relacionada com um dos mecanismos aventados para explicar a erupção - diferencial de pressão hidrostática entre a base e a extremidade incisal do dente (Moxham & Berkovitz, 1995). À microscopia óptica, não notamos tais alterações nem foram notadas hemorragias. Tanto em dentes impedidos como desimpedidos, a tendência foi a vimblastina provocar uma diminuição da densidade volumétrica de vasos, aqui computados, juntamente, com os nervos ou terminações nervosas. A diminuição da densidade volumétrica de vasos em dentes desimpedidos controles em relação aos impedidos controles, particularmente nas regiões mais apicais, poderia refletir uma vaso-constricção com conseqüente aumento do diferencial de pressão hidrostática e aceleração da erupção. Já a diminuição da mesma densidade no ligamento de animais tratados com vimblastina contraria esta hipótese.

Em relação aos parâmetros morfométricos estudados neste trabalho, a alteração mais sugestiva foi a verificada no tecido conjuntivo do compartimento junto ao osso. No caso de desimpedimento, a hipofunção, praticamente, dobra a taxa de erupção do incisivo e este tecido conjuntivo aumentou seu volume relativo, o que poderia explicar o aumento de proteínas não colágenas (Van den Bos & Tonino, 1984) e de glicosaminoglicanas (Kirkham *et al*, 1993) constatados nesta condição.

Sob ação da vimblastina, que retarda a erupção, o tecido conjuntivo do compartimento junto ao osso diminui nos dentes desimpedidos enquanto tende a aumentar nos impedidos. Se a vimblastina tiver o mesmo comportamento que a ciclofosfamida, isto é, não alterar a erupção dos impedidos, é sugestivo que este aumento do conjuntivo junto ao osso alveolar possa ter um efeito compensatório, neutralizando o retardo na erupção observado nos dentes desimpedidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adatia A. K. and Berkovitz B. K. B. (1981) The effects of cyclophosphamide on eruption of the continuously growing mandibular incisor of the rat. *Archs. oral Biol.* **26**, 607-613.
- Azevedo L. F., Blumen G. and Merzel J. (1982) The effect of colchicine and vinblastine on the secretory activity of ameloblasts in the mouse lower incisor as revealed by autoradiography after injection of <sup>35</sup>S-Sodium Sulphate. *J. Biol. Buccale* **10**, 45-54.
- Barros S. P. (1995) Estudo morfométrico ultraestrutural da matriz extracelular do ligamento periodontal do incisivo inferior de ratos, em diferentes regiões e zonas, nas condições de erupção impedida, desimpedida e retardada pela vimblastina. Tese de doutorado, FOP/UNICAMP, Piracicaba.
- Beertsen W. (1973) Tissue dynamics in the periodontal ligament of the mandibular incisor of the mouse: a preliminar report. *Archs. oral Biol.* **18**, 61-66.
- Beertsen W. (1975) Migration of fibroblasts in the periodontal ligament of the mouse incisor as revealed by autoradiography. *Archs. oral Biol.* **20**, 659-666.
- Beertsen W. (1987) Collagen phagocytosis by fibroblasts in the periodontal ligament of the mouse molar during the initial phase of hypofunction. *J. dent. Res.* **66**, 1708-1712.
- Beertsen W. and Everts V. (1977) The site of remodelling of collagen in the periodontal ligament of the mouse incisor. *Anat. Rec.* **189**, 479-498.
- Berkovitz B. K. B. (1971) The effect of root transection and partial root resection on the unimpeded eruption rate of the rat incisor. *Archs. oral Biol.* **16**, 1033-1043.
- Berkovitz B. K. B., Migdalski A. and Solomon M. (1972) The effect of the lathyrtic agent aminoacetonitrile on the unimpeded eruption rate in normal and root-resected rat lower incisors. *Archs. oral Biol.* **17**, 1755-1763.

- Berkovitz B. K. B. and Shore R. C. (1978) The ultrastructure of the enamel aspect of the rat incisor periodontium in normal and root-resected teeth. *Archs. oral Biol.* **23**, 681-689.
- Berkovitz B. K. B., Shore R. C. and Sloan P. (1980) Histology of the periodontal ligament of rat mandibular incisor following root resection, with special reference to the zone of shear. *Archs. oral Biol.* **25**, 235-244.
- Berkovitz B. K. B. and Thomas N. R. (1969) Unimpeded eruption in root-resected lower incisor of the rat with a preliminary note on root transection. *Archs. oral Biol.* **14**, 771-780.
- Blaushild N., Michaeli Y. and Steigman S. (1992) Histomorphometric study of the periodontal vasculature of the rat incisor. *J. dent. Res.* **71**, 1908-1912.
- Burn-Murdoch R. A. (1990) The effect of cyclophosphamide on the eruption of impeded and resected incisors in rats. *Archs oral Biol.* **35(10)**, 801-806.
- Cahill D. R. and Marks Jr. S. C. (1980) Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J. oral Path.* **9**, 189-200.
- Chabner B. A., Allegra C. J., Curt G. A. and Calabresi P. (1996) Agentes antineoplásicos. In: *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica* (Ed. Gilman A.G.), pp. 909-949. Mc Graw-Hill Interamericana, R. Janeiro.
- Chalkley H. W. (1943) Method for the quantitative morphologic analysis of tissue. *J. Nat Cancer Inst.* **4**, 47-53.
- Chiba M. and Ohshima S. (1985) Effects of colchicine and hydrocortisone on unimpeded eruption rates of root-resected mandibular incisors of rats. *Archs. oral Biol.* **30(2)**, 147-153.

- Chiba M., Ohshima S., Kuroda T. and Ohkawa S. (1981) Effects of repeated shortenings and artificial restraint on the tensile strength of the periodontium of the rat mandibular incisors. *Archs. oral Biol.* **26**, 135-141.
- Chiba M., Takizawa K. and Ohshima S. (1980) Dose-response effects of colchicine and vinblastine on unimpeded eruption rates of the rat mandibular incisor. *Archs. oral Biol.* **25(2)**, 115-119.
- Chiba M., Tsuruta M. and Eto K. (1973) A photographic method of measuring eruption rates of rat mandibular incisors. *Archs. oral Biol.* **18**, 1003-1010.
- Cho M-I. and Garant P. R. (1981) Role of microtubules in the organization of the Golgi complex and the secretion of collagen secretory granules by periodontal ligament fibroblasts. *Anat. Rec.* **199**, 459-471.
- Deporter D. A., Svoboda L. A., Motruk W. and Howley T. P. (1982) A stereologic analysis of collagen phagocytosis by periodontal ligament fibroblasts during occlusal hypofunction in the rat. *Archs. oral Biol.* **27**, 1021-1025.
- Eccles J. D. (1965) The effects of reducing function and stopping eruption on the periodontium of the rat incisor. *J.dent. Res.* **44**, 860-868.
- Ehrlich H. P., Ross R. and Bornstein P. (1974) Effects of antimicrotubular agents on the secretion of collagen. *J. Cell Biol.* **62**, 390-405.
- Gorsky J. P. and Marks Jr. S. C. (1992) Current concepts of the biology of tooth eruption. *Oral Biol. Med.* **3**, 185-206.
- Karnovsky M. J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**, 137-138.

- Kirkham J., Robinson C., Phull J. K., Shore R. C., Moxham B. J. and Berkovitz B. K. B. (1993) The effect of rate of eruption on periodontal ligament glycosylaminoglycan content and enamel formation in the rat incisor. *Cell Tissue Res.* **274**, 413-419.
- Kirkham J., Robinson C. and Shore R. C. (1991) Rates of protein turnover at specific sites of the rat incisor periodontal ligament. *J. Biol. Buccale* **19**, 61-67.
- Marks Jr. S. C. and Cahill D. R. (1984) Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *Archs. oral Biol.* **29**, 311-322.
- Matena V. (1973) Periodontal ligament of a rat incisor tooth. *J. Periodont.* **44**, 629-635.
- Melcher A. H. (1967) Remodelling of the periodontal ligament during eruption of the rat incisor. *Archs. oral Biol.* **12**, 1649-1651.
- Michaeli Y., Shamir D., Weinreb Jr. M. and Steigman S. (1994) Effect of loading on the migration of periodontal fibroblasts in the rat incisor. *J. periodont. Res.* **29**, 25-34.
- Michaeli Y., Steigman S., Yitschaky M. and Weinreb Jr. M. (1986) The response of the fibroblast population in the periodontal ligament of rat incisors to altered eruption rates. *J. periodont. Res.* **21**, 86-94.
- Michaeli Y. and Weinreb M. M. (1968) Role of attrition and occlusal contact in the physiology of the rat incisor: III. Prevention of attrition and occlusal contact in the non articulating incisor. *J. dent. Res.* **47**, 633-640.
- Moe H. and Mikkelsen H. (1977) Light microscopical and ultrastructural observations on the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. *Acta path. microbiol. scand. Sect. A.* **85**, 73-88.
- Moxham B. J. and Berkovitz B. K. B. (1974) The effects of root transection on the unimpeded eruption rate of the rabbit mandibular incisor. *Archs. oral Biol.* **19**, 903-909.

- Moxham B. J. and Berkovitz B. K. B. (1995) The periodontal ligament and physiological tooth movements. In: *The Periodontal Ligament in Health and Disease* (eds Berkovitz B. K. B. Moxham B. J. and Newman H. N.), pp. 183-214. Mosby-Wolfe, London.
- Moxham B. J., Shore R. C. and Berkovitz B. K. B. (1985) Fenestrated capillaries in the connective tissues of the periodontal ligament. *Microv. Res.* **30**, 116-124.
- Ness A. R. (1964) Movement and forces in tooth eruption. In: *Advances in Oral Biology* (ed. Staple P.H.), pp. 33-75, Academic Press, London.
- Novaes P. D. (1996) Efeitos da erupção alterada, por desimpedimento e pela vimblastina, nos fibroblastos de regiões e compartimentos do ligamento periodontal de incisivos de ratos. Estudo morfométrico ultraestrutural. Tese de doutorado, FOP/UNICAMP, Piracicaba.
- Owellen R. J., Owens Jr. A. H. and Donigian D. W. (1972) The binding of vincristine, vinblastine and colchicine to tubulin. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **47**, 685-691.
- Polacow M. L. O. and Merzel J. (1994) The effect of vinblastine on the incorporation of [<sup>3</sup>H]-glycine into proteins of the periodontal ligament of impeded and unimpeded mouse incisors. *Archs. oral Biol.* **39**, 223-230.
- SAS Institute Inc., SAS/Stat. (1989) User's guide, version 6, fourth edition, vol 1, p. 943.
- Shore R. C., Moxham B. J. and Berkovitz, B. K. B. (1982) A quantitative comparison of the ultrastructure of the periodontal ligaments of impeded and unimpeded rat incisors. *Archs. oral Biol.* **27**, 423-430.
- Shore R. C., Berkovitz B. K. B. and Moxham, B. J. (1985) The effects of preventing movement of the rat incisor on the structure of its periodontal ligament. *Archs. oral Biol.* **30**, 221-228.

- Sicher H. (1942) Tooth eruption: the axial movement of continuously growing teeth. *J. dent. Res.* **21**, 201-210.
- Sloan P. (1978) Scanning electron microscopy of the collagen fibre architecture of the rabbit incisor periodontium. *Archs. oral Biol.* **23**, 567-572.
- Steigman S., Michaeli Y., Weinreb Jr. M. and Zajicek G. (1983) Three-dimensional reconstruction of the rat incisor by means of computerized histomorphometry. *Anat. Rec.* **205**, 455-461.
- Steigman S., Michaeli Y., Yitzhaki M. and Weinreb M. (1989) A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor. *J. dent. Res.* **68**, 1269-1274.
- Tosello D. O. (1990) Biossíntese de proteínas do ligamento periodontal de incisivos de camundongos em erupção desimpedida e retardada pela vimblastina. Estudo radioautográfico através da incorporação de <sup>3</sup>H-glicina. Tese de mestrado, FOP/UNICAMP, Piracicaba.
- Van den Bos T. and Tonino G. J. M. (1984) Composition and metabolism of the extracellular matrix in the periodontal ligament of impeded and unimpeded rat incisors. *Archs. oral Biol.* **29(11)**, 893-897.
- Weibel E. R. (1969) Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.* **26**, 235-302.
- Wilson L., Bamburg J. R., Mizel S. B., Grisham L. M. and Creswell K. M. (1974) Interaction of drugs with microtubule proteins. *Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol.* **33**, 158-166.