

ESTUDO RADIOAUTOGRÁFICO DA SÍNTESE DE DNA DO EPITÉLIO GENGIVAL DE CAMUNDONGOS *Mus musculus*. III. INFLUÊNCIA DA FACE GENGIVAL

Zuleice Viana da Silveira TARELHO*
Sebastião HETEM*

RESUMO: Foi estudada a frequência de células que sintetizam DNA na camada basal do epitélio gengival da região do primeiro molar inferior de camundongos jovens e adultos, utilizando-se timidina triciada e técnica radioautográfica. Os valores obtidos através das proporções de células marcadas foram analisados e foi verificada diferença estatisticamente significante na frequência de células marcadas entre as faces gengivais apenas nas fêmeas adultas, sendo maior o número na face lingual o qual ocorreu em função dos valores encontrados na inserção epitelial.

UNITERMOS: Síntese de DNA; radioautografia; timidina triciada; epitélio gengival.

INTRODUÇÃO

Estudos sobre o ciclo celular, bem como sobre o índice radioativo em camundongos^{1,3} e sagüis^{8,9,10} e da atividade mitótica em ratos^{7,13}, demonstraram que a proliferação celular na inserção epitelial é mais intensa que nas outras regiões do epitélio gengival. Baseados nas conclusões de HIRT *et alii*⁶ sobre a distribuição de mitoses no epitélio gengival de rato, BEAGRIE & SKOUGAARD³ adotaram a mesma nomenclatura e divisão em três áreas desse epitélio do camundongo: epitélio bucal, epitélio crevicular e inserção epitelial por considerarem que há semelhança no epitélio gengival nestes dois gêneros de roedores.

Uma vez que foram verificadas influências da idade¹¹ e do sexo¹² na frequência de células que sintetizam DNA na camada basal do epitélio gengival de ca-

mundongos com o emprego da técnica radioautográfica, é objetivo deste trabalho estudar, através da mesma técnica, na região do primeiro molar inferior de camundongos, a influência da face gengival na frequência de células marcadas com timidina triciada no epitélio gengival como um todo e nas suas três áreas, em função da idade e do sexo.

MATERIAL E MÉTODOS

O material e método utilizados no presente trabalho foram os mesmos descritos anteriormente¹¹ e constaram, basicamente, do seguinte: administração às 10,00 horas da manhã, de timidina triciada, pela via intraperitoneal, na dosagem de 2 MCi/g (Ameshan Searle, Co.) de peso, em 10 camundongos adultos, 5 de cada sexo, e 6 camundongos jovens, 3 de cada sexo, sacrifício uma hora após a injeção do

* Departamento de Morfologia — Faculdade de Odontologia — UNESP — 16100 — Araçatuba — SP.

isótopo radioativo, obtenção das peças interessando a região dos molares inferiores, fixação em líquido de Bouin, descalcificação em ácido fórmico-citrato de sódio, inclusão em parafina, obtenção de cortes frontais com 6 μ m de espessura, cobertura com emulsão fotográfica, deixados em exposição durante 30 dias, revelados e corados pela hematoxilina e eosina.

Das lâminas obtidas de cada animal, foi sorteada uma e desta 3 cortes que foram utilizados para a contagem do número de células da camada basal, marcadas e não marcadas com o precursor radioativo. O epitélio gengival foi dividido em três áreas de acordo com BEAGRIE & SKOUGAARD³: epitélio bucal, epitélio crevicular e inserção epitelial (Figs. 1 e 2). Com os valores obtidos foi determinada a proporção de células marcadas (Fig. 3) para as faces vestibular e lingual para cada animal, quer agrupando-se as três áreas do epitélio gengival quer para cada uma das áreas separadamente.

Para a análise estatística dos dados foram utilizados três testes de significância diferentes: test t de Student, análise de variância em duas vias, com interação e teste de Scheffé. Para o emprego dos dois últimos testes o tamanho das amostras, foi igualado, sorteando-se entre os animais adultos, lâminas contendo cortes histológicos de 3 machos e 3 fêmeas.

RESULTADOS

Verificou-se, através do test t, que em animais jovens, tanto nos machos quanto nas fêmeas, as frequências de células marcadas com timidina triciada no epitélio gengival, somando-se valores obtidos para as três áreas em estudo, não diferem estatisticamente quando se comparam as faces gengivais entre si (Tabela 1). Nos animais adultos, as diferenças nas frequências de células marcadas comparando-se os resultados obtidos para as duas faces são estatisticamente significantes ($P < 0,05$), em ambos os sexos (Tabela 2).

O estudo da influência da face gengival na frequência de células marcadas em cada uma das áreas através de análise de variância mostrou que nos animais machos, jovens e adultos, a interação entre as duas variáveis, face gengival e áreas do epitélio gengival, não é estatisticamente significativa (Tabelas 3 e 4). Por outro lado, verificou-se, através deste mesmo teste de significância, que nos animais fêmeas, a interação entre área e a face gengival ao contrário do que ocorreu nos animais jovens do mesmo sexo (Tabela 5) foi estatisticamente significativa somente nos animais adultos ($P < 0,05$ — Tabela 6).

A análise dos dados obtidos em fêmeas adultas através do teste de Scheffé, permitiu determinar que a área do epitélio gengival que apresenta diferença estatisticamente significativa quanto ao número de células marcadas é a inserção epitelial. A frequência de células marcadas foi maior na face lingual.

DISCUSSÃO

As diferenças verificadas através do test t entre as frequências de células marcadas no epitélio gengival das faces vestibular e lingual apenas nos animais adultos, sugerem influências devidas à atividade mastigatória. Entretanto, se este evento estivesse mesmo ocorrendo, era de se esperar que a face vestibular apresentasse frequência maior que a face lingual. Este fato, entretanto, só foi verificado nos machos, pois, nas fêmeas a maior frequência de células marcadas ocorreu na face lingual.

Por outro lado a demonstração, através da análise de variância, da existência de inserção entre a face e área do epitélio gengival confirma o efeito da face gengival restrito à idade e ao sexo, no presente caso, fêmeas adultas. Nas fêmeas jovens e nos machos, tanto quanto adultos, a interação entre a face e áreas do epitélio gengival é não significativa.

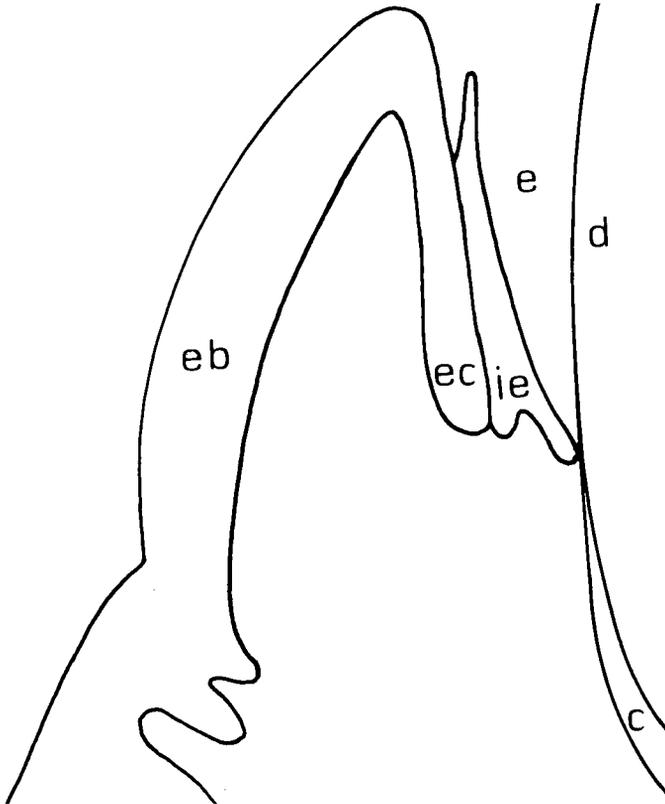


FIG. 1. Esquema de BEAGRIE & SKOUGAARD³ modificado mostrando as áreas do epitélio gengival do primeiro molar inferior do camundongo *Mus musculus*, que foram estudadas: eb = epitélio bucal; ec = epitélio crevicular; ie = inserção epitelial; e = espaço do esmalte; d = dentina; c = cimento.

Nossos resultados em animais jovens de ambos os sexos confirmam os descritos por GREULICH⁵ em epitélio gengival de ratos e por BEAGRIE² em camundongos machos com 60 dias de idade onde a frequência de células marcadas com timidina triciada no epitélio da inserção epitelial é maior que a das demais regiões do tecido gengival. Neste trabalho, nos animais adultos, tal característica só foi verificada nas fêmeas, na face lingual. Esses resultados nas fêmeas adultas de camundongos reforçam a hipótese de TARELHO & HETEM¹² sobre o efeito hormonal na proliferação das células do epitélio gengival e

sugerem que, além da influência do hábito alimentar é possível que o estrógeno tenha um efeito local estimulando as células do epitélio gengival a sintetizarem DNA, possivelmente agindo ao nível do fator inibidor da mitose específico do tecido gengival denominado chalone⁴.

Considerando os resultados do presente trabalho bem como dos anteriormente apresentados, torna-se mais evidente a necessidade do controle além de fatores como a idade¹¹ e o sexo¹² dos animais, também a face gengival considerada quando da realização de estudos desta natureza.

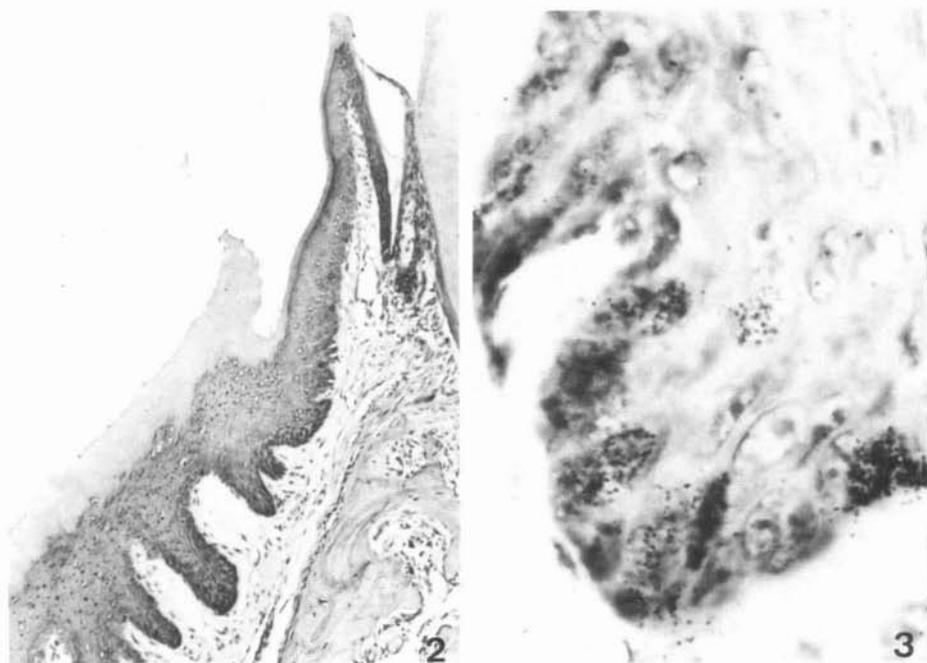


FIG. 2. Corte histológico de uma área correspondente à mostrada na Figura 1. H-E. 10X.

FIG. 3. Corte histológico de uma área correspondente à mostragem na Figura 2, onde aparecem células marcadas com timidina triциada, nas camadas basal e espinhosa. H-E. 100X.

CONCLUSÕES

Os nossos resultados sobre a influência da face gengival na frequência de células marcadas com timidina triциada na camada basal do epitélio gengival de camundongos, permitiram as seguintes conclusões:

1. A diferença estatisticamente significativa na frequência de células marcadas entre as faces gengivais apenas nos animais adultos sugere que esta seja devida à atividade mastigatória.

2. A diferença estatisticamente significativa na frequência de células marcadas com timidina triциada apenas na inserção epitelial nas fêmeas adultas, quando se analisa a influência da face gengival reforça a hipótese da ação do estrógeno no estímulo da proliferação celular.

3. É necessário o controle da variável face gengival além da idade e do sexo dos animais, na realização de trabalhos desta natureza.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina do Campus de Ribeirão Preto (USP) nas pessoas do Prof. Dr. A. Haddad e do Técnico de Laboratório, Herculano S. Reis Filho, pelas facilidades criadas para a realização da técnica radioautográfica; ao Setor de Computação de Dados do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina do Campus de Ribeirão Preto (USP) na pessoa da Técnica de Computação, Sra. Libertad

M. Nali, pela análise estatística dos dados; ao Prof. Dr. Mauro Airton Rulli, pela leitura e críticas do manuscrito; ao Sr. Gilmar Martins de Oliveira, ex-Auxiliar de Laboratório da disciplina de Biologia, pela colaboração no processamento histológico e na confecção da Figura 1; à Srta.

Shirleni Cantieri, pelo trabalho datilográfico; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo — FAPESP —, pela concessão de auxílio financeiro que suportou parcialmente a execução deste trabalho (Proc. 74/1262).

TABELA 1 — Proporção de células marcadas com timidina triциada na camada basal do epitélio gengival de camundongos jovens, de ambos os sexos, nas faces vestibular e lingual.

| Sexo | Face | Proporção de células marcadas x 100 ± SE | Significância |
|-------|------------|--|---------------|
| macho | vestibular | 10,0 ± 0,01 | NS |
| | lingual | 10,9 ± 0,01 | |
| fêmea | vestibular | 10,3 ± 0,02 | NS |
| | lingual | 10,4 ± 0,01 | |

TABELA 2 — Proporção de células marcadas com timidina triциada na camada basal do epitélio gengival de camundongos adultos, de ambos os sexos, nas faces vestibular e lingual.

| Sexo | Face | Proporção de células marcadas x 100 ± SE | Significância |
|-------|------------|--|---------------|
| macho | vestibular | 18,8 ± 0,03 | P < 0,05 |
| | lingual | 13,3 ± 0,02 | |
| fêmea | vestibular | 21,4 ± 0,03 | P < 0,05 |
| | lingual | 25,4 ± 0,01 | |

TABELA 3 — Proporção de células marcadas com timidina triциada na camada basal de diferentes áreas do epitélio gengival de camundongos machos jovens, nas faces gengivais bem como um resumo da análise estatística.

| Área (a) | Face (f) | Proporção de Células em S x 100 | | | Média x 100 |
|--------------------------|------------|---------------------------------|------|------|-------------|
| | | | | | |
| epitélio bucal (eb) | vestibular | 10,4 | 11,5 | 4,7 | 8,9 |
| | lingual | 6,3 | 8,5 | 3,2 | |
| epitélio crevicular (ec) | vestibular | 26,4 | 7,6 | 15,5 | 16,5 |
| | lingual | 12,6 | 7,0 | 16,5 | |
| inserção epitelial (ie) | vestibular | 30,3 | 12,0 | 12,5 | 18,3 |
| | lingual | 12,3 | 11,8 | 9,2 | |

Média Total = 12,1

Médias de a x 100 = 7,4 (eb); 14,3 (ec); 14,7 (ie) Médias de f x 100 = 14,5 (vestibular); 9,7 (lingual)

TARELHO, Z.V. da S. & HETEM, S. — Estudo radioautográfico da síntese de DNA do epitélio gengival de camundongos *Mus musculus*. III. Influência da face gengival. *Rev. Odont. UNESP*, São Paulo, 14 (1/2): 59-67, 1985.

Análise de Variância

| Varição | + Soma dos quadrados | Grau de Liberdade | + Variância | F | Signifi- cância |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------|------|--------------------|
| Total | 8,1 | 17 | — | — | |
| Entre áreas (a) | 2,0 | 2 | 1,0 | 2,48 | NS |
| Entre faces (f) | 1,1 | 1 | 1,1 | 2,63 | NS |
| Interação a/f | 0,14 | 2 | 0,1 | 0,17 | NS |
| Erro + x 100 | 4,9 | 12 | 0,41 | — | |

TABELA 4 — Proporção de células marcadas com timidina triciada na camada basal de diferentes áreas do epitélio gengival de camundongos machos adultos, nas faces gengivais, separadamente, bem como um resumo da análise estatística.

| Área (a) | Face (f) | Proporção de Células em S x 100 | | | Média x 100 |
|--------------------------|------------|---------------------------------|------|------|-------------|
| | | | | | |
| epitélio bucal (eb) | vestibular | 23,2 | 22,3 | 23,3 | 22,9 |
| | lingual | 19,3 | 14,1 | 13,5 | 15,6 |
| epitélio crevicular (ec) | vestibular | 20,8 | 16,7 | 18,2 | 18,5 |
| | lingual | 8,3 | 14,9 | 8,6 | 10,6 |
| inserção epitelial (ie) | vestibular | 21,7 | 9,4 | 7,2 | 12,7 |
| | lingual | 15,3 | 1,2 | 8,1 | 8,2 |

Média Total x 100 = 14,8

Médias de a x 100 = 19,3 (eb); 14,6 (ie); 10,5 (ie) Médias de f x 100 = 18,0 (vestibular); 11,5 (lingual)

Análise de Variância

| Varição | + Soma dos quadrados | Grau de liberdade | + Variância | F | Signifi- cância |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------|------|--------------------|
| Total | 7,17 | 17 | — | — | |
| Entre áreas (a) | 2,33 | 2 | 1,16 | 5,02 | p < 0,05 |
| Entre faces (f) | 1,90 | 1 | 1,96 | 8,46 | p < 0,05 |
| Interação a/f | 0,1 | 2 | 0,05 | 0,21 | NS |
| Erro + x 100 | 2,78 | 12 | 0,23 | — | |

TABELA 5 — Proporção de células marcadas com timidina triciada na camada basal de diferentes áreas do epitélio gengival de camundongos fêmeas jovens, nas faces gengivais, separadamente, bem como um resumo da análise estatística.

| Área (a) | Face (f) | Proporção de Células em S x 100 | | | Média x 100 |
|--------------------------|------------|---------------------------------|------|------|-------------|
| | | | | | |
| epitélio bucal (eb) | vestibular | 7,8 | 7,7 | 10,3 | 8,6 |
| | lingual | 10,4 | 11,4 | 8,3 | 10,0 |
| epitélio crevicular (ec) | vestibular | 17,2 | 12,7 | 20,0 | 16,6 |
| | lingual | 14,6 | 14,3 | 15,1 | 14,7 |
| inserção epitelial (ie) | vestibular | 18,4 | 11,8 | 4,9 | 11,7 |
| | lingual | 14,8 | 19,0 | 12,0 | 15,3 |

Média Total x 100 = 12,8
Médias de a x 100 = 9,3 (eb); 15,7 (ec); 13,5 (ie)
Médias de f x 100 = 12,3 (vestibular); 13,3 (lingual)

Análise de Variância

| Variação | + Soma dos quadrados | Grau de liberdade | + Variância | F | Significância |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------|------|---------------|
| Total | 3,06 | 17 | — | — | |
| Entre áreas (a) | 1,24 | 2 | 0,62 | 4,87 | P < 0,05 |
| Entre faces (f) | 0,05 | 1 | 0,05 | 0,36 | NS |
| Interação a/f | 0,23 | 2 | 0,12 | 0,92 | NS |
| Erro | 1,53 | 12 | 0,13 | — | |

+ x 100

TARELHO, Z.V. da S. & HETEM, S. — Estudo radioautográfico da síntese de DNA do epitélio gengival de camundongos *Mus musculus*. III. Influência da face gengival. *Rev. Odont. UNESP, São Paulo*, 14 (1/2): 59-67, 1985.

TABELA 6 — Proporção de células marcadas com timidina triciada na camada basal de diferentes áreas do epitélio gengival de camundongos fêmeas adultas, nas faces gengivais, separadamente, bem como um resumo da análise estatística.

| Área (a) | Face (f) | Proporção de Células em S x 100 | | | Média x 100 |
|--------------------------|------------|---------------------------------|------|------|-------------|
| epitélio bucal (eb) | vestibular | 31,0 | 28,4 | 17,7 | 25,7 |
| | lingual | 27,7 | 20,5 | 17,0 | 21,7 |
| epitélio crevicular (ec) | vestibular | 23,4 | 24,4 | 34,3 | 27,4 |
| | lingual | 32,6 | 25,3 | 29,5 | 29,1 |
| inserção epitelial (ie) | vestibular | 27,3 | 17,2 | 20,4 | 21,6 |
| | lingual | 40,7 | 37,1 | 38,3 | 38,7 |

Média Total = 27,4

Médias de a x 100 = 23,7 (eb); 28,2 (ec); 30,2 (ie)

Médias de f x 100 = 24,9 (vestibular); 29,9 (lingual)

Análise de Variância

| Variação | + Soma dos quadrados | Grau de liberdade | + Variância | F | Significância |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------|------|---------------|
| Total | 9,16 | 17 | — | — | |
| Entre áreas (a) | 1,31 | 2 | 0,66 | 2,47 | NS |
| Entre faces (f) | 1,11 | 1 | 1,11 | 4,18 | NS |
| Interação a/f | 3,55 | 2 | 1,78 | 6,68 | P < 0,05 |
| Erro | 3,19 | 12 | 0,27 | — | |

+ x 100

TARELHO, Z.V. da S. & HETEM, S. — Radioautographic study of DNA synthesis on gingival epithelium of mice *Mus musculus*. III. Effects of gingival side. *Rev. Odont. UNESP, São Paulo*, 14(1/2):59-67, 1985.

ABSTRACT: The frequency of DNA-synthetizing cells in the basal layer of the gingival epithelium of the first lower molar region of young and adult mice of both sexes was studied using ^3H -thymidine and radioautography. The frequency of labeled cells and their proportions were determined and the data statistically analysed. An influence of the gingival side on the frequency of labeled cells was found only in the epithelial attachment of the adult female animals, in which the values were higher at the lingual face.

KEY-WORDS: DNA syntyesis; radioautography; ^3H -thymidine; gingival epithelium.

TARELHO, Z.V. da S. & HETEM, S. — Estudo radioautográfico da síntese de DNA do epitélio gengival de camundongos *Mus musculus*. III. Influência da face gengival. *Rev. Odont. UNESP*, São Paulo, 14 (1/2): 59-67, 1985.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEAGRIE, G. S. — An autoradiographic study of gingival epithelium of mice and monkeys with thymidine-³H. *Dent. Practnr. dent. Rec.*, 14: 18-26, 1963.
2. BEAGRIE, G. S. — Observations on cell biology of gingival tissues of mice. *Br. dent. J.*, 121: 417-20, 1966.
3. BEAGRIE, G. S.; SKOUGAARD, M. R. — Observations on the life cycle of the gingival epithelial cells of mice as revealed by autoradiography. *Acta odont. scand.*, 20: 15-31, 1962.
4. BULLOUGH, W. S. — The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biol. Rev.*, 37: 307-42, 1962.
5. GREULICH, R. C. — Epithelial DNA and RNA synthetic activities of the gingival margin. *J. dent. Res.*, 40: 682, 1961.
6. HIRT, C. M.; HARTLE, S. & MÜHLEMANN, H. R. — The distribution of mitoses on the epithelium of the interdental papillae of the rat molar. *J. Periodont.*, 26: 229-32, 1955.
7. KARRING, T. & LOE, H. — The effect of age on mitotic activity in rat oral epithelium. *J. Periodont. Res.*, 8: 164-70, 1973.
8. SKOUGAARD, M. R. — Duration of DNA synthesis in the gingival epithelial cells of marmosets. *Acta odont. scand.*, 23: 615-22, 1964.
9. SKOUGAARD, M. R. — Cell renewal, with special reference to the gingival epithelium. *Advanc. oral Biol.*, 4: 261-88, 1970.
10. SKOUGAARD, M. R. & BEAGRIE, G. S. — The renewal of gingival epithelium in marmosets (*Callithrix jacchus*) as determined through autoradiography with thymidine-³H. *Acta odont. scand.*, 20: 467-87, 1962.
11. TARELHO, Z. V. S. & HETEM, S. — Estudo radioautográfico da síntese de DNA no epitélio gengival de camundongos *Mus musculus*. I. Influência da idade. *Rev. Odont. UNESP*, 13: 105-108, 1984.
12. TARELHO, Z. V. S. & HETEM, S. — Estudo radioautográfico da síntese de DNA no epitélio gengival de camundongos *Mus musculus*. II. Influência do sexo. *Rev. Odont. UNESP*, 13: 109-111, 1984.
13. TROTT, J. R. & GORENSTEIN, S. L. — Mitotic rates in the oral and gingival epithelium of the rat. *Arch. oral Biol.*, 8: 425-34, 1963.

Recebido para publicação em 04.03.85.