

## ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DO FIBROBLASTO DO LIGAMENTO PERIODONTAL

FERNANDO FERREIRA\*, NUNO SAMPAIO\*, CRISTINA MANZANARES\*\*

### RESUMO

*Os autores descrevem as principais alterações ultraestruturais encontradas ao nível dos fibroblastos do ligamento periodontal, a partir de colheitas efectuadas no desmodonto. Os cortes ultraestruturais evidenciam as diferenças entre as várias fases do ciclo vital da célula, bem como a sua heterogeneidade. Foram encontradas várias inclusões ao nível do núcleo e do citoplasma, estas últimas, de tipo lipoproteico e associadas a uma bordadura de polissomas. Neste estudo, foram ainda identificados miofibroblastos.*

**Palavras-chave:** Fibroblasto, Periodontal, Ultraestrutura

### ABSTRACT

*The principal ultrastructural alterations in periodontal fibroblasts, from desmodont are described in this study. The ultrastructural specimens show some differences between cells in different stages of cell cycle and their heterogeneity. Both cytoplasm and nucleus present a wide range of inclusions. The cytoplasm inclusions are constituted by lipoproteic material with polysoms. We have also identified some myofibroblasts.*

**Key-words:** Fibroblast, Periodontal, Ultrastructure

### INTRODUÇÃO

Por definição, o periodonto é um órgão de tecido conjuntivo, que liga os dentes aos maxilares proporcionando uma adaptação contínua. O ligamento periodontal é a estrutura de tecido conjuntivo que circunda a raiz do dente e a une ao osso, sendo contínuo com o tecido conjuntivo da gengiva e comunicando-se com os espaços medulares ósseos através de canais vasculares.<sup>(1)</sup>

O periodonto é constituído por células capazes de originarem diferentes linhagens de tecido conjuntivo. A sua capacidade de reparação e regeneração está directamente rela-

cionada com os fenótipos celulares existentes. As principais células envolvidas nestes processos são os cementoblastos, os fibroblastos, os osteoclastos e seus precursores.<sup>(2)</sup>

Em termos biológicos, o periodonto é bastante susceptível à agressão da placa bacteriana e seus produtos, que originam uma inflamação aguda. Após esta fase inicial, segue-se a inflamação sub-aguda e/ou crónica, causando reconhecimentos imunitários e a destruição dos elementos do tecido conjuntivo importantes no suporte dentário. No âmbito do processo inflamatório assistimos, primeiramente, a um infiltrado de células hematopoiéticas fagocíticas. No estado saudável, o fibroblasto é a célula-chave controlando a manutenção e reparação do tecido conjuntivo. No entanto, não é ainda claro de que modo se relaciona com as células T e B do sistema imune. Actualmente, podem

\*Assistente de Morfologia Oral do Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte e aluno de Doutoramento na Universidade de Barcelona.

\*\*Professora Titular de Anatomia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Barcelona.

ser caracterizados dois tipos de fibroblastos consoante a sua localização: fibroblastos do ligamento periodontal e fibroblastos gengivais. Os primeiros asseguram a ligação do dente ao alvéolo (através do principal elemento estrutural do ligamento periodontal – o colagénico), os segundos, constroem o material que rodeia o osso alveolar. Ambos, asseguram a síntese e manutenção dos componentes da matriz extracelular. <sup>(3)</sup>

A produção local de mediadores informativos de relativa especificidade, solúveis, aumenta nos processos inflamatórios. O aumento das interleucinas e do factor de necrose tumoral alfa e beta, suportam actualmente o conceito segundo o qual as células gengivais mononucleares formam uma rede redutora de citocinas – cytokine network, aumentando selectivamente os mediadores mais importantes em cada instante. Os fibroblastos gengivais, os granulócitos, os linfócitos e os monócitos/macrófagos estão directamente implicados como fontes fornecedoras de citocinas. Os fibroblastos gengivais produzem também elevados níveis de interleucina-6, quando estimulados pela interleucina 1- $\beta$ . A interleucina 1- $\beta$  por sua vez tem ainda a capacidade de aumentar a produção de metaloproteinasas, estimular a formação e activação de osteoclastos, promover a reabsorção óssea e activar as células T e os neutrófilos. <sup>(4)</sup>

O ligamento periodontal é sem dúvida um tecido muito particular, bastante heterogéneo e sujeito a múltiplas interferências dos meios interno e externo. Como resultado, directo ou indirecto, dessas interferências, assistiremos a uma mutação dinâmica dos seus diferentes componentes, e em particular ao nível dos fibroblastos. Estes, como células de síntese que são por excelência, requerem um microambiente exigente, rico em neuropéptidos e factores de crescimento. O fibroblasto, do ponto de vista embrionário, origina-se a partir de células mesenquimatosas indiferenciadas; podendo também originar-se a partir de células menos indiferenciadas, como os pericítos, que se encontram aderidos aos pequenos vasos sanguíneos. <sup>(5)</sup>

Como célula, o fibroblasto assume um destaque central ao nível do desenvolvimento, estrutura e sustentação do dente. Uma das suas principais funções é sem dúvida a síntese de fibras extracelulares, como o procolagénico, os glicosaminoglicanos, a proelastina ou as proteínas microfibrilares; mas o seu âmbito é mais vasto, sendo igualmente capaz de produzir a substância fundamental que envolve as fibras ou tornar-se numa célula contráctil, provavelmente decisiva na erupção dentária. É essencialmente uma célula de síntese e secreção, mas também uma célula de degradação e catabolismo. <sup>(6)</sup>

O fibroblasto, é uma célula única no que diz respeito à interacção com a sua matriz, influencia-a e é por ela influenciado. A expressão de proteínases pelo fibroblasto é um exemplo típico de dependência directa da matriz extracelular. <sup>(7)</sup>

Os fibroblastos periodontais são sem dúvida células particularmente versáteis, com um enorme poder adaptativo e com múltiplas expressões morfológicas. São células enigmáticas, surpreendentes, muitas vezes difíceis de interpretar à luz do nosso parco conhecimento. Do ponto de vista científico, são um desafio apaixonante e inacabado. Do ponto de vista pedagógico, são sem dúvida uma lição sempre incompleta sobre o potencial da realidade adaptativa da vida em desequilíbrio.

Finalmente, para que seja compreendida a dinâmica destas células, torna-se indispensável o conhecimento da sua anatomia microscópica, permanentemente adaptada às leis e às exigências da sua biologia. Tal como referiu Faucett em 1966, “se o estudante de hoje pretender ler a literatura do futuro com uma compreensão crítica, deverá ter suficiente experiência na interpretação da microfotografia eletrónica”.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram efectuadas quatro colheitas em quatro indivíduos de raça caucasiana, um do sexo feminino e três do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 17 e os 76 anos, dos quais três apresentavam lesão parodontal evidente. Em

cada paciente foram colhidos dois fragmentos por biópsia, segundo a técnica de descolamento e levantamento da mucosa vestibular, seguida da trepanação da tábua óssea vestibular para permitir o acesso e colheita do fragmento de tecido parodontal.

As colheitas foram feitas no âmbito da consulta da Clínica Integrada do I.S.C.S.-N. (Director: Dr. Fernando Figueira).

Os fragmentos foram fixados em glutaraldeído a 3% e cacodilato de sódio a 0,2M, durante 3 h a 4°C. Em seguida, foram lavados durante 2 h a 4°C e pós-fixados numa solução de tetróxido de ósmio a 2% e cacodilato de sódio 0,2M, durante 2 h à mesma temperatura. Depois de desidratados numa série crescente de concentração de etanol e óxido de propileno, o material foi embebido em Epon. Os cortes ultrafinos foram feitos com uma faca de diamante e contrastados com soluções aquosas de acetato de uranilo e citrato de chumbo, para serem depois observados no microscópio electrónico de transmissão JEOL 100 CXII a 60Kv.

## RESULTADOS e DISCUSSÃO

Em microscopia electrónica, o fibroblasto aparece como uma célula tipicamente alongada (pese embora o facto de não raras vezes assumir aspectos morfológicos incaracterísticos e bizarros). (Fig. 1) Os aspectos morfológicos observados em microscopia electrónica, ilustram não raras vezes, configurações específicas do estado metabólico celular, particularmente no que diz respeito à sua termodinâmica. A célula curva-se sobre si própria formando dois estrangulamentos, caprichosamente desenhados também ao nível do seu núcleo. A vesiculação é abundante, os perfis mitocondriais apresentam aspectos de algum sofrimento traduzidos pelo apagamento das cristas e distorção da membrana interna.

A ultraestrutura do fibroblasto activo apresenta uma distribuição de organelos citoplasmáticos em quantidades muito aumentadas, vários complexos de Golgi, abundante retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e vesículas de secreção. Toda esta estrutura é indicativa de

função activa do fibroblasto de tipo secretor ou sintetizador. No citoplasma dos fibroblastos pode ser demonstrado um sistema tubular e filamentoso, mediante o uso de técnicas e colorações especiais. <sup>(6)</sup>

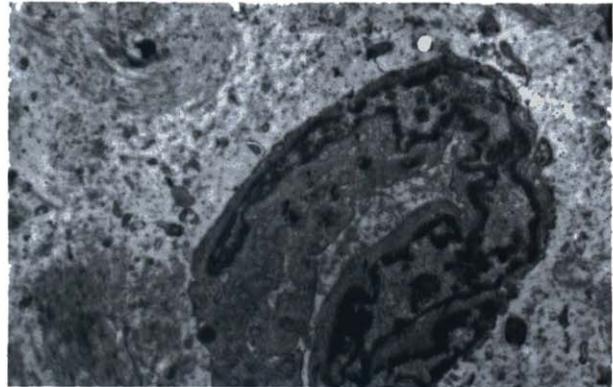


Figura 1(X4.000)

Frequentemente, observamos uma célula envolvida num estroma de fibras orientadas de modo diverso, mantendo com elas uma íntima relação e deixando transparecer quadros preciosos da sua biologia. A matriz extracelular é rica e abundante, sendo constituída por fibras extracelulares cortadas longitudinal e transversalmente, sempre envolvidas por grande quantidade de substância intersticial e glicoproteínas. As principais fibras encontradas são sem dúvida as fibras de colagéneo, embora se observe em microscopia electrónica de varrimento um segundo grupo de fibras, que correspondem às que são descritas por Berkowitz, basicamente com funções de suporte e características contrácteis, designadas por oxitalânicas. (Fig. 2). <sup>(8,9,10)</sup>



Figura 2 (X2.800)

Como se observa na Fig. 3 na sua fase activa e normal, a célula apresenta um número extremamente elevado dos diferentes organelos citoplasmáticos. As mitocôndrias podem aparecer com perfis arredondados ou ovalados consoante o corte, mas sempre mantendo a conservação das cristas. Os complexos de Golgi podem ser mais ou menos exuberantes e o retículo é anormalmente abundante e típico. Nesta imagem, pode atestar-se a intensa actividade nuclear ilustrada pelos numerosos corpos fibrilares ao nível do nucléolo. Do ponto de vista energético, esta célula apresenta um conjunto de mitocôndrias activas, com conservação das cristas e da membrana interna. De salientar ainda a presença de numerosas vesículas, rodeadas por retículo rugoso ou simplesmente por ribossomas, sempre em quantidade exuberante e atestando uma forte actividade metabólica.

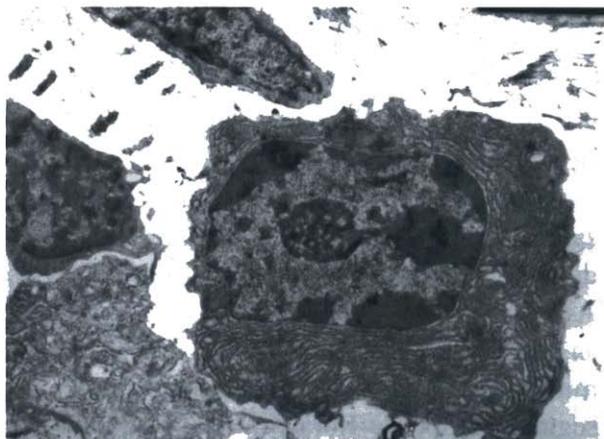


Figura 3 (X2.300)

Na Fig 4 observa-se uma íntima relação com as fibras de colagénio, fortemente agrupadas em diversas orientações, para além da habitual riqueza em mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. Assistimos ainda à presença de numerosos corpos vesiculares intracitoplasmáticos e a um núcleo activo, alongado e com uma condensação periférica de cromatina.

O miofibroblasto constitui um elemento central de atenção no âmbito da heterogeneidade celular. (Fig. 5) É sem dúvida um fibroblasto muito especial, com marcadas características contrácteis das células musculares lisas e com uma fisiologia extremamente específica, em grande parte ainda por revelar. O miofibroblasto parece

desempenhar um importante papel na erupção dentária bem como ao nível dos processos de reparação. Em processos tumorais o miofibroblasto desempenha ainda um importante papel quer no desenvolvimento do seu estroma, quer na transdiferenciação do processo de fibrose. <sup>(11,12)</sup>

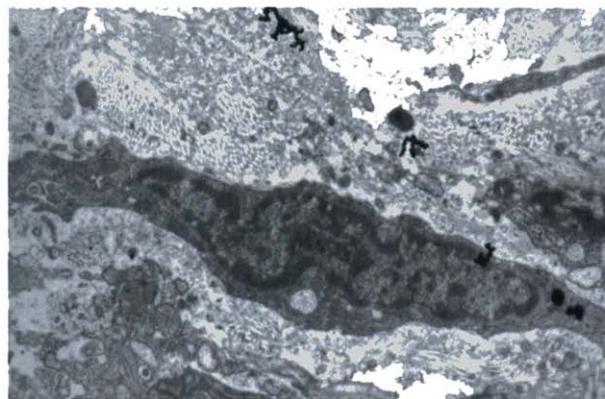


Figura 4 (X5.300)



Figura 5 (X8000)

Ao nível do tecido de granulação, encontramos o miofibroblasto composto quase exclusivamente por alfa-actina das células musculares lisas, para além de elevados teores de biglicanos, fibromodulina e procologénio tipo I e III. <sup>(13,14)</sup>

Genericamente o miofibroblasto revela-se como uma célula importante na influência que assume na reacção do estroma; por exemplo no cancro da mama, em todo o processo de reparação e mesmo em reacções de tipo fibrótico. A forte presença da alfa-actina parece desempenhar uma função de imobilização celular. <sup>(15)</sup>

Nas Fig. 6 e 7, poderemos observar em maior ampliação os poros nucleares em íntima relação com o material citoplasmático e em particular

com os polirribossomas. Do ponto de vista bioquímico e termodinâmico, aventou-se a hipótese de existir uma orientação específica, na saída do material nuclear, ao nível dos poros. Pese embora o facto de as imagens não confirmarem tal hipótese, há a salientar a íntima relação dos polissomas com os poros nucleares bem como o seu paralelismo relativamente à membrana nuclear. <sup>(9)</sup>

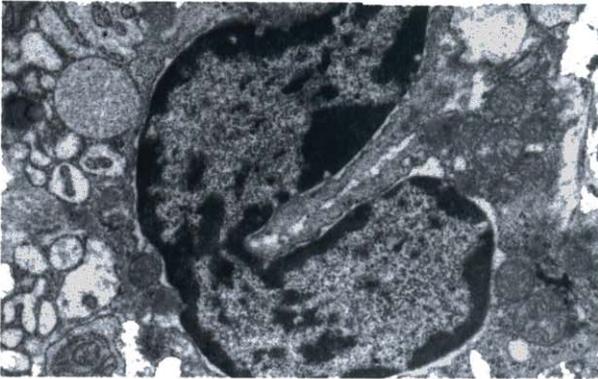


Figura 6 (X8.000)



Figura 7 (X50.000)

Do ponto de vista morfológico, confirma-se a saída de material nuclear pelos poros e a sua relação com estes.

O fibroblasto periodontal apresenta uma forte riqueza em alfa-actina sendo negativo para a desmina. Relativamente à miosina, o fibroblasto periodontal apresenta marcação positiva, assim como para a vimentina, F-actina e citoqueratina 19. <sup>(16,17)</sup>

Relativamente às inclusões citoplasmáticas, é igualmente uma célula rica, podendo estas apresentar diferentes tamanhos e composições. Na Fig. 8, pode observar-se uma inclusão de tamanho considerável cujas características ultrastru-

rais são compatíveis com uma inclusão de tipo lipoproteico. <sup>(18,19)</sup> Nesta célula torna-se igualmente relevante a forte presença de polissomas que contornam a referida inclusão para além de inúmeros corpos vesiculares secundários, envolvidos por um citoplasma fortemente rendilhado e associado a um padrão de mitocôndrias parcialmente preservadas. O núcleo, com a presença de corpos fibrilares desenha em si mesmo um quadro de boa actividade. O espaço extracelular, apresenta-se rico e abundante em colagénio.

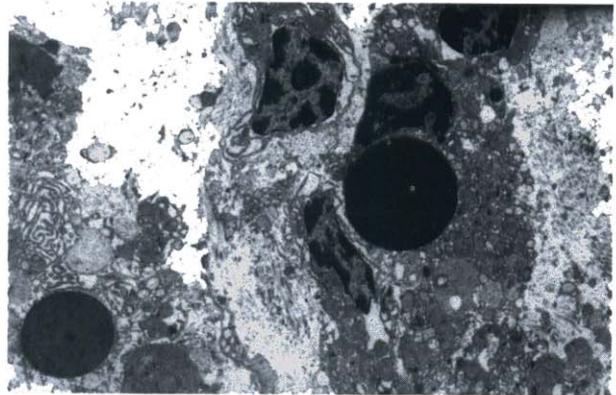


Figura 8 (X5300)

Na Fig. 9 observa-se uma ampliação da imagem anterior, onde se enfatiza a bordadura de polissomas em redor da inclusão lipoproteica.

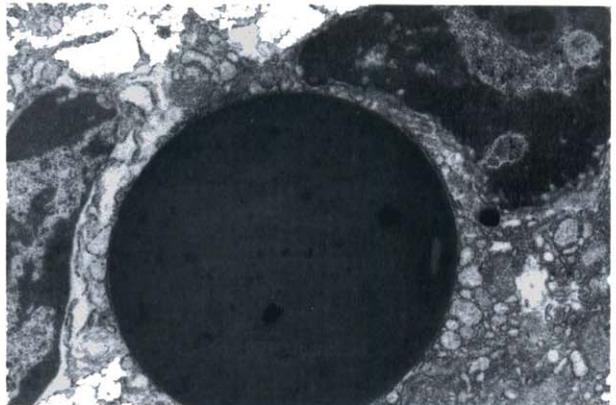


Figura 9 (X8.000)

Ao nível do citoesqueleto, poderão ser observados microtúbulos ou filamentos. Relativamente aos primeiros, são estruturas proteicas com diâmetros elevados, na ordem dos 240 nm; relativamente aos segundos, são habitualmente designados por microfilamentos (com menos de 80 nm de diâmetro) ou filamentos intermediários

(entre 80 e 120 nm de diâmetro). Os microfilamentos são compostos por proteínas contrácteis do tipo actina ou miosina, sendo os filamentos intermediários normalmente compostos por vimentina.

Os sistemas filamentosos do fibroblasto possuem um importante papel na estruturação da sua forma e no movimento dentário. <sup>(6,20)</sup>

A importância dos microtúbulos na locomoção celular é incerta. Em células pequenas não são essenciais para a sua motilidade, enquanto que em células maiores, como os fibroblastos, parecem ser absolutamente necessários. Pelo menos em parte, a motilidade celular parece estar proporcionalmente relacionada com o número de microtúbulos. <sup>(18)</sup>

De um modo sintético podemos dizer que o sistema microtubular controla a organização morfológica do fibroblasto e não apenas o seu citoesqueleto. <sup>(19)</sup>

Os fibroblastos periodontais constituem uma população bastante diversificada, apresentando mesmo populações fenotipicamente diferentes. Em alguns aspectos específicos da biopatologia tecidual, encontramos um tipo específico de fibroblasto, fenotipicamente bem definido. É o caso dos fibroblastos encontrados no tecido de granulação. São células únicas e de grande especificidade quer no processo de reparação quer mesmo no desencadeamento de toda a inflamação crónica do tecido conjuntivo. Em processos deste tipo é justamente a alteração fenotípica quem regula o tipo de matriz a produzir. <sup>(21)</sup>

A idade revela-se um factor preponderante nas alterações intracelulares dos fibroblastos periodontais em ratos. <sup>(20)</sup>

## CONCLUSÕES

Neste estudo pode atestar-se a heterogeneidade dos fibroblastos do ligamento periodontal, quer ao nível do citoplasma, quer ao nível do seu núcleo e nucléolo. Como corolário desta heterogeneidade, aparece o miofibroblasto, uma célula híbrida com marcadas características das células musculares lisas, com uma especificidade autêntica e uma fisiopatologia

ainda pouco conhecida. É evidente a estreita relação das células com a matriz envolvente, demonstrando um comprometimento dinâmico e de permanente dependência.

## BIBLIOGRAFIA

1. Carranza, F.A., 1990. O ligamento periodontal. In: Periodontia clínica, sétima edição, Guanabara Koogan, pp. 31-39
2. Carnes, D.; Maeder, C.; Graves, D. 1997. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. J. Periodontol., 68:701-707
3. Semopowski, G.; Chess, P.; Moretti, ; Padilla, J.; Phipps, R.; Blieden, T. 1997. J. Periodontol., 68:284-292.
4. Czuszac, C.A.; Sutherland, D.E.; Billman, M.A.; Stein, S.H. 1997. Prostaglandin E2 potentiates interleukin-1 induced interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. J. Clin. Periodontol., 23:635-640.
5. Ferreira, F. 1996. Influência dos factores de crescimento nos fibroblastos do ligamento periodontal. Tese de proficiência: 8-11.
6. Tem Cate. 1986. Histologia oral. Panamericana. 6:121-135
7. Lorimier, S., Gillery, P., Hornebeck, w., Chastang, F., Laurent, M., Bouthors, S., Droulle, C., Potron, G., Maquart, F. X. 1996. Tissue origin and extracellular matrix control neutral proteinase activity in human fibroblast three-dimensional cultures. J. Cell Physiol. 168:188-98.
8. Mailhot, J. M., Schuster, G.S., Garnick, J.J., Hanes, P. J., Lapp, A. and Lewis, J. B., 1995. Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF-beta 1 stimulation. J. Clin. Periodontol., 22(9): 679-685.
9. Avery, J. 1994. Oral development and histology. Thieme. 2th edition. 159.
10. Gomez de Ferraris, Campos Munoz. Histologia y embriologia bucodental, 1999. Panamericana.
11. Berndt, A.; Hyckel, P.; Kosmehl, H. 1998. 3-dimensional in vitro invasion model for oral squamous epithelial carcinomas. Evaluation of tumor and stromal cell proliferation as well as extracellular matrix. Mund Kiefer Gesichtschir Sep.; 2(25):256-60.
12. Ng, Y; Huang T.; Yang, W; Chen, Z; Yang, A.; Um, W.; Nikolic, Paterson, D.; Atkins, R.; Lan, H. 1998. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. Kidney Int.; Sep.; 54:3, 864-76.
13. Hakinen, L.; Westermarck, J.; Kahari, V.; Larjava, H. 99 6. Human granulation-tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF-beta 1. J. Dent. Res. 75:1767-78.
14. Luciano Fonzi, Ricardo Garberoglio, Carlo Zerosi.

Anatomia microscopica del dente e del parodonto, 114. 1991. Piccin.

15. Ronnov, J., Peterson, O. W. 1996. A function for filamentous alpha-smooth muscle actin: retardation of mobility in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 134:67-80.
16. Giannopoulou, C.; Cimasoni, G. 1986. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J. Dent. Res.* 75:895-902.
17. Liao, G.; Nagasaki, T.; Gundersen, G. G. 1995. Low concentration of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J. Cell Sci.* 108:473-83.
18. Domnina, L. V.; Ivanova-Oiu; Vasil'ev-luM. 1996. The effect of microtubules on the morphology of a fibroblast monolayer and its extracellular matrix. *Tsitologija.* 38:300-4.
19. Goteborg. Odontogenesis and craniofacial development. June, 1997; 380-381.