

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Ligamento Periodontal e Síntese de Colagénio
estudo experimental



Orientador: Professor Doutor António Silvério Cabrita

Co-Orientador: Dr. Rodrigo Farinha

Autor: Nuno Daniel Esteves Varanda

Coimbra 2010

Índice

Agradecimentos	3
Resumo.....	4-5
Abstract	6
Intrdução	7-17
Morfofisiologia do Periodonto	7-10
Etiopatogenia e resposta do hospedeiro na doença periodontal.....	11-12
Metabolismo do colagénio	13-14
Latirismo.....	15-17
Objectivos	18
Material e Métodos	19-20
Resultados.....	21-25
Discussão	26-28
Conclusão	29
Bibliografia	30-33

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor António Silvério Cabrita, pela orientação dada, pelos ensinamentos transmitidos e por me dar a oportunidade de trabalhar com tão ilustre personalidade na faculdade que eu tanto adoro.

Ao meu Co-orientador, Dr. Rodrigo Farinha, pela orientação dada, pela paciência de me aturar quando o procurei, pela amizade. Sem dúvida um grande amigo que fica para a vida. O meu sincero agradecimento.

A todos os meus professores, que me ensinaram ao longo deste curso tudo o que sei hoje de medicina dentária...

Resumo

O periodonto compreende todos os tecidos que suportam o dente: gengiva, osso alveolar, cemento radicular e o ligamento periodontal. O ligamento periodontal é uma estrutura de tecido conjuntivo que sustenta o dente no alvéolo. O principal constituinte desta estrutura são as fibras de colagénio, denominadas fibras de Sharpey, divididas em grupos, de acordo com a sua orientação e inserção. As funções principais do ligamento periodontal são, para além da sustentação do dente no alvéolo e da função sensorial, pela sua abundante inervação, a transmissão de forças oclusais ao osso alveolar de suporte, formação de células e nutrição deste, bem como do cemento e da gengiva.

Quando o ligamento apresenta patologias como a periodontite, estas funções ficam comprometidas, com conseqüente extensão aos dentes suportados. As patologias do ligamento periodontal estão relacionadas fundamentalmente com situações infecciosas bacterianas.

O latirismo é uma patologia que cursa com envolvimento do ligamento periodontal, condição patológica originada pela ingestão de sementes de leguminosas da espécie *Latirus sativus*. Esta doença é rara, sendo mais comum em países como a Etiópia e a Índia.

O neurolatirismo é provocado por neurotóxicos (ácido L-3-oxalilamino-2-aminopropiónico (ODAP ou BOAA)), que lesionam os neurónios pela sua sobre estimulação, que culmina em morte neuronal. O osteolatirismo é provocado por agentes como o aminoacetónitrilo, beta-aminopropionitrilo e cisteamina, inibindo a formação de reticulados de colagénio, pela inibição da enzima lisil-oxidase, responsável pelas ligações cruzadas de colagénio e elastina.

Para estudar os efeitos do latirismo no ligamento periodontal, foram utilizados 30 ratos Wistar macho com quatro semanas de idade divididos em três grupos. O grupo controlo foi alimentado com ração padronizada. Os grupos II e III, foram alimentados com ração em que foi incorporada semicarbazida nas doses de 3g/kg e 6g/kg, respectivamente. Todos os animais foram sacrificados ao fim de quatro semanas de ensaio. Para cada um dos indivíduos foi realizada a análise histopatológica e morfométrica do ligamento periodontal.

Concluimos que não se observa uma diferença estatisticamente significativa entre o valor da área de ligamento periodontal entre os diversos grupos, apesar de se observar uma diminuição desta área nos grupos em que foi administrada semicarbazida, em relação aos animais do grupo controlo. Observa-se ainda a acumulação de hialina no ligamento periodontal dos animais dos grupos teste. A quantidade deste depósito quando comparado

com a área do ligamento periodontal, não apresenta diferença estatisticamente significativa entre o grupo II e o grupo III. No entanto, observámos uma maior heterogeneidade entre os diferentes casos no grupo III, quando comparada a distribuição da área de hialina de cada um dos casos.

Abstract

The periodont is constituted by the tooth supporting tissues: gingiva, alveolar bone, radicular cementum and periodontal ligament. Periodontal ligament is a connective tissue that maintains the tooth inside the socket. The main constituents of this structure are collagen fibers also called Sharpey fibers, divided into two groups according to their insertion and orientation. Besides supporting the tooth, periodontal ligament is also responsible for sensitive response due to it's innervation, to the occlusal force resorption from the tooth to the bone, cells formation and nutrition of itself, as to cementum and gingiva. In pathologies like periodontitis, mainly caused by bacterial infections, restrictions of those functions will compromise the ligament and the tooth, by consequence.

Latirism is one pathology that affects periodontal ligament, caused by the ingestion of vegetable seeds from the *Latirus sativa* species. It is a rare disease, more common in countries such as Ethiopia and India. Neurolatirism can be induced with neurotoxics ((L-3-oxalilamino-2-aminopropiónic acid (ODAP or BOAA), which injures the neurons by over stimulating them and causing their death. Osteolatirism, caused by agents like aminoacetrinil, beta aminopropionitril and cisteamin, compromises the collagen reticulation, by inhibiting lisil-oxidize enzyme, responsible by elastin to collagen coupling.

To study the effects of the latirism in the periodontal ligament, thirty male Wistar rats, 4 weeks old, where divided into three groups. The control group was kept with food and water *ad libitum* and the test groups II and III where fed using food with semicarbazide incorporated in the doses of 3g/kg and 6g/kg, respectively. All the animals were killed after 4 weeks. Histopathological and morfometrics evaluation were conducted on the periodontal ligament of each subject.

We observed no significant differences between the areas of the periodontal ligament of the test groups, although they revealed some reduction of this area, when compared with control one. The hyaline areas differences, on the periodontal ligament of test groups weren't statistically significant, but the distribution of the hyaline among the subjects of group III demonstrated more heterogeneity.

Introdução

MORFOFISIOLOGIA DO PERIODONTO

O periodonto compreende todos os tecidos que suportam o dente, ou seja, a gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar e cemento radicular. O cemento e o osso alveolar servem de inserção às fibras de colagénio do ligamento periodontal (fibras principais), separadas por tecido conjuntivo laxo que contém vasos sanguíneos, linfáticos e nervos.

O periodonto desenvolve-se no embrião a partir da ectoderme (epitélio) e da mesoderme (tecido conjuntivo da gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar). Na evolução da odontogénese, o saco dentário organiza-se dando as células da sua porção externa origem ao osso alveolar, as da sua porção interna aos cementoblastos responsáveis pela síntese de cemento e aos fibroblastos que se diferenciam e organizam as fibras do ligamento periodontal.

A gengiva divide-se em várias partes: gengiva livre ou marginal, sulco gengival e gengiva aderida ou fixa. A gengiva livre corresponde à região terminal que contorna os dentes. Estende-se desde a margem gengival até ao fundo do saco gengival. A sua largura varia de 0,5 a 2mm. É coberta por epitélio pavimentoso, estratificado queratinizado ou paraqueratinizado.

O sulco gengival é um espaço estreito que rodeia o dente, limitado internamente por este e externamente por epitélio da margem livre da gengiva. A profundidade de sondagem clínica normal varia de um a três milímetros. O epitélio do sulco gengival é fino e não queratinizado.

A gengiva aderida estende-se deste o sulco gengival até à linha muco gengival. Encontra-se firmemente aderida ao perióstio do osso alveolar e ao cemento radicular por fibras de colagénio. A sua largura pode variar de nove milímetros na face vestibular dos incisivos até um milímetro na zona dos pré-molares e caninos. Tal como na gengiva livre, o epitélio da gengiva aderente é pavimentoso, estratificado queratinizado ou paraqueratinizado.

Como verificámos anteriormente, a gengiva encontra-se em íntimo contacto com o dente, mantendo o selamento epitelial através de fibras gengivais. Estas fibras são agrupadas da seguinte forma: fibras gengivais livres que vão desde o cemento até à gengiva livre; fibras papilares, desde o cemento até à extremidade das papilas; fibras transeptais, que se estendem no espaço interproximal interdentário, por cima da crista óssea; fibras circulares,

que rodeiam o dente; fibras cemento alveolares, desde o cemento até ao osso alveolar; fibras alveologengivais; fibras verticais e fibras dentogengivais.

As células do tecido conjuntivo que estão presentes na gengiva em maior abundância são os fibroblastos, responsáveis pela síntese de novas fibras de colagénio. Na gengiva normal e saudável, existe uma pequena quantidade de células plasmáticas, linfócitos e neutrófilos.

Um outro constituinte do periodonto é o cemento. É um tecido mesenquimatoso calcificado que recobre a face externa da raiz. Não tem inervação, aporte sanguíneo directo, nem drenagem linfática. Não é tão duro como a dentina, mas tem as mesmas características minerais e cristalinas que o osso e a dentina. As fibras de colagénio, conhecidas como fibras de Sharpey incorporam-se no cemento durante a formação dentária.

Existem dois tipos de cemento radicular: acelular ou primário e celular ou secundário. O cemento acelular é transparente e amorfo, produzido por cementoblastos. Contudo, não ocorre a inclusão destes no cemento, como acontece no cemento celular. O cemento acelular recobre a porção cervical da raiz, mas por vezes pode até cobrir a raiz por completo. Através de microscopia electrónica e microrradiografia pode-se observar que o cemento acelular contém muito menos cálcio do que o cemento celular e observam-se fibras de colagénio compactadas de modo denso com as típicas bandas de colagénio entre as fibras adjacentes, representando a continuação das fibras de Sharpey.

O cemento celular recobre a porção média e apical da raiz do dente. Este é constituído por cementoblastos, que depois da calcificação do cemento ficam retidos em lacunas, designando-se por cementócitos. Os seus prolongamentos citoplasmáticos anastomosam-se entre si.

Uma das funções do cemento, é a transmissão das forças oclusais ao ligamento periodontal. As fibras de colagénio aderidas no cemento e os cementoblastos possuem um elevado nível de renovação quando estimuladas por forças oclusais. A reabsorção cementária patogénica também pode ser provocada pelo movimento ortodôntico, quistos, tumores, dentes sem antagonista assim como em doenças periodontais e periapicais. A hipercementose também pode surgir em situações de grandes cargas funcionais.

O osso alveolar forma os alvéolos dentários, é constituído pela parede interna; a lâmina cribiforme, formada por osso compacto; osso de sustentação, formado por osso esponjoso trabecular e pelas tábuas ósseas vestibulares e palatinas. É formado por uma matriz calcificada com osteócitos encerrados em espaços que se designam de lacunas, desde o

qual se estendem prolongamentos citoplasmáticos em canalículos, formando um sistema que se anastomosa entre si na matriz intercelular. Este sistema canalicular tem uma grande importância no transporte de oxigénio e nutrientes e eliminação de substâncias catabólicas. A lâmina cribiforme é formada por osso laminado e fasciculado que limita o ligamento periodontal e contém uma grande quantidade de fibras de Sharpey. O osso alveolar é o menos estável dos tecidos periodontais, estando sujeito a períodos constantes de formação e reabsorção, regulado por factores locais e gerais. Os processos de reabsorção ocorrem em áreas de pressão e forma-se em áreas de tensão. É constituído por uma matriz orgânica e mineralizada. A matriz orgânica é constituída pela rede de osteócitos, osteoblastos, osteoclastos e matriz extracelular. A porção mineralizada ou inorgânica é constituída por cálcio, fosfato e cristais de apatite.

O ligamento periodontal é constituído sobretudo por tecido conjuntivo rico em fibras que sustentam o dente no alvéolo e mantêm-no unido ao osso alveolar. O colagénio representa aproximadamente 50% do peso do todo o ligamento periodontal. Black (1887, 1889) descreveu pela primeira vez a organização destas fibras de colagénio: fibras que passavam directamente do dente para o osso, designadas como fibras principais. Mais tarde, Shicher (1923, 1942) propôs que as fibras principais não passavam directamente do dente para o osso, com locais de união a meio do ligamento. (Sloan 1979) Zwarych e Quigley e Ciancio sugeriram que o plexo intermédio era um artefacto histológico que surge como resultado do plano de corte oblíquo. Contudo, as fibras do ligamento periodontal podem ser estudadas com microscopia electrónica de varrimento (Sloan 1979), que permite observar e classificar as fibras principais em vários grupos: 1) Grupo da crista alveolar, desde a crista alveolar até à área cervical da raiz; 2) Grupo horizontal, constituído por fibras horizontais que se estendem desde o dente até ao osso alveolar; 3) Grupo oblíquo, fibras orientadas de modo oblíquo com inserção no cemento. Existe maior quantidade destas fibras na região oclusal do osso alveolar, perfazendo dois terços do total das fibras nesta região. 4) Grupo apical, fibras que se disseminam no ápex do dente até ao osso. As fibras de colagénio estão desenhadas para suportar as forças aplicadas nos dentes. Crumley (1964) verificou que no rato o ligamento periodontal possui uma elevada taxa de produção de colagénio associado à sua renovação constante. Os estudos efectuados por Selvig (1963-1964) demonstraram que as fibras de Sharpey, tanto no osso alveolar como no cemento celular terminam sob a forma de um núcleo não calcificado, rodeado por uma bainha calcificada. (Genco 1993) Bernick estudou, em 1977 a trajectória das fibras entre dentes adjacentes em cortes de mandíbula de macaco, corados com nitrato de prata. Observou no osso interseptal, períodos de reabsorção e aposição óssea, ao mesmo tempo que se verificava a perda de fibras de colagénio para se formarem novas fibras. (Genco 1993)

À medida que a idade avança, existe uma alteração na profundidade de penetração óssea das fibras alveolares do ligamento periodontal. A adesão das fibras alveolares ao osso, restringe-se a uma pequena área, sem se estender pelos sistemas haversianos. No cemento, as fibras periodontais aparecem sob a forma múltiplos prolongamentos relativamente delgados divididos pelos seus elementos celulares.

O ligamento periodontal é também constituído por tecido conjuntivo laxo, o qual contém vasos sanguíneos, linfáticos e a cadeia nervosa do ligamento. A maior parte dos vasos sanguíneos do ligamento surgem a partir da medula óssea do osso de suporte e também de prolongamentos dos vasos periapicais. Os vasos linfáticos conduzem a linfa para o canal dentário inferior da mandíbula, ao canal infraorbitário no maxilar superior e ao grupo submaxilar de gânglios linfáticos. O ligamento periodontal é inervado por ramos do nervo trigémio. As terminações nervosas encontram-se entre as fibras do ligamento periodontal. Permitem a localização de estímulos da mastigação, ao mesmo tempo que emitem estímulos que permitem o controlo dos músculos da mastigação e da força exercida. São muito sensíveis à dor. No tecido conjuntivo do ligamento periodontal, encontramos ainda alguns elementos celulares: cementoblastos, cementoclastos, fibroblastos, osteoclastos, osteoblastos, células do sistema imunológico como macrófagos e mastócitos e restos epiteliais de Malassez.

As funções do ligamento periodontal são a transmissão das forças oclusais ao osso através do sistema principal de fibras, formativa, nutritiva e sensorial. A resposta do ligamento periodontal está relacionada com a função oclusal. Quando as forças de oclusão excedem a capacidade de defesa do ligamento, surgem lesões morfológicas associadas ao trauma oclusal. As células presentes no ligamento periodontal actuam na formação e reabsorção deste tecido. Esta estrutura é responsável pela nutrição do cemento, osso e gengiva, pela sua rica vascularização. Tem ainda função sensorial relacionada com a abundante inervação, que lhe confere uma extrema sensibilidade táctil e propioceptiva.

ETIOPATOGENIA E RESPOSTA DO HOSPEDEIRO NA DOENÇA PERIODONTAL

Do curso das doenças periodontais consta uma sequência de processos até ao surgir de lesões características, incluindo a formação de bolsas periodontais, perda de inserção da gengiva, perda de tecido conjuntivo periodontal e reabsorção do osso alveolar. A doença periodontal tem um forte carácter infeccioso, com invasão dos tecidos periodontais por microrganismos que se instalam no ligamento periodontal e permanecem nas bolsas gengivais. Considera-se que as bactérias são o agente patológico primário das gengivites e da periodontite. As bactérias que provêm da placa dentária podem provocar gengivite incipiente e também periodontite, quando estão presentes em grande quantidade. As principais espécies de bactérias que estão na génese das doenças periodontais são a *Wolinella recta*, *Bacterioides forsythus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, espécies de *Eubacterium*, *Peptostreptococcus micros*, *Capnocytophaga*, espiroquetas, *B. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*. Estas bactérias não são preponderantes na flora oral normal e por isso, quando estão presentes em elevadas quantidades, podem funcionar como indicador de uma possível periodontite. Quando ocorre infecção no ligamento periodontal há uma resposta do hospedeiro de modo a combater os microrganismos e evitar que estes se disseminem para o resto do organismo. Os *A. actinomycetemcomitans* podem provocar abscessos cerebrais e endocardite bacteriana subaguda. As infecções sistémicas graves causadas por bactérias periodontais não são frequentes se a resposta do hospedeiro for efectiva, limitando-se assim à destruição periodontal local.

A histopatologia das lesões periodontais tem sido amplamente estudada em seres humanos. Os tecidos periodontais são considerados normais quando o sulco gengival se encontra com pouca placa bacteriana, o número de leucócitos no sulco gengival, epitélio de união e tecido conjuntivo gengival subjacente é baixo e quando o sulco gengival é pouco profundo (menos de um milímetro). O epitélio de união saudável não apresenta prolongamentos digitiformes e está bem suportado por fibras, bem orientadas. (Genco, 1993)

Na fase inicial da gengivite, o epitélio de união apresenta os primeiros sinais de doença, com vasculites do plexo dos vasos laterais. Este epitélio apresenta-se infiltrado por um grande número de neutrófilos que migram dos vasos sanguíneos subjacentes, alguns macrófagos e linfócitos que se estendem ao tecido conjuntivo gengival. (Genco 1993) Nesta etapa inicial também se perde grandes quantidades de colagénio (Genco 1993), a gengiva endurece, há hemorragia e tumefacção que constituirá o uma das principais manifestações clínicas de gengivite. Histologicamente, os tecidos caracterizam-se pela acumulação de um infiltrado celular inflamatório no tecido conjuntivo gengival subjacente ao epitélio de união. (Genco, 1993) Nestas lesões iniciais os linfócitos, integram 75% do total do infiltrado

inflamatório do tecido conjuntivo gengival. A maior parte dos linfócitos são T e entre 5 a 10% são linfócitos B. A zona infiltrada pode ocupar 5 a 15% do tecido conjuntivo da margem gengival (Genco, 1993), e a perda de colagénio pode alcançar 60 a 70% nesta zona. A par desta resposta, surgem alterações fibroblásticas: núcleos electrolúcidos, mitocôndrias edemaciadas e vacuolização do retículo endoplasmático com ruptura da membrana celular (Genco, 1993). Nesta fase da inflamação gengival observa-se um aumento do fluxo do líquido crevicular com migração de leucócitos para o interior do sulco, na sua maior parte neutrófilos.

A gengivite crónica difere da situação aguda na predominância de células plasmáticas no infiltrado inflamatório do tecido conjuntivo gengival, com a inflamação ainda limitada aos tecidos moles. Não existe evidência de perda óssea ou da migração do epitélio de união. Nesta altura, as lesões gengivais são reversíveis, sendo fundamental a consciencialização do doente e o reforço dos hábitos de higiene oral (Genco 1993).

A periodontite surge quando há migração apical do epitélio de união, com perda de inserção do tecido conjuntivo e reabsorção do osso alveolar. A periodontite apresenta estadios de destruição activa e de remissão. O processo pode avançar de uma maneira episódica durante meses ou anos, ou pode ser agressiva e avançar muito rapidamente num período de alguns meses. Clinicamente verifica-se a perda de inserção periodontal, mobilidade, migração patológica dos dentes com aumento dos espaços entre eles, que pode mesmo avançar mesmo até à esfoliação dentária. Também se podem observar abscessos periodontais em zonas de formação de bolsas periodontais graves. O infiltrado celular inflamatório adjacente às zonas de perda de inserção periodontal e reabsorção óssea, contém principalmente células plasmáticas, macrófagos e poucos linfócitos. Também há uma reduzida quantidade de neutrófilos no tecido conjuntivo. Há uma redução da quantidade de colagénio no tecido conjuntivo gengival nas paredes da bolsa. Macroscopicamente, é habitual verificar-se a reabsorção na superfície radicular adjacente às bolsas periodontais. As lesões no tecido conjuntivo da gengiva marginal e do ligamento periodontal são graves, com redução da matriz de colagénio solúvel e um aumento das quantidades de colagénio sem a formação de ligações cruzadas adequadas, perdendo o tecido conjuntivo da gengiva a sua integridade e facilitando a invasão de bactérias patogénicas.

METABOLISMO DO COLAGÉNIO

O colagénio pode ser encontrado em todos os tecidos conjuntivos, ossos, derme, tendões, ligamentos assim como no ligamento periodontal e contribui para a integridade estrutural de todos os órgãos. É uma proteína amplamente distribuída pelos organismos e representa uma das mais abundantes proteínas naturais à face da terra.

Há aproximadamente vinte tipos diferentes de colagénio no corpo humano. Os principais são os primeiros cinco tipos de colagénio e o mais abundante é o tipo I. Representa 90% do total de colagénio existente no corpo humano. Cada proteína de colagénio tipo I é constituída por três cadeias de proteínas, e cada proteína corresponde a uma cadeia alfa. As duas primeiras cadeias alfa são muito semelhante e designadas de alfa-I. A terceira cadeia é um pouco diferente e é designada por alfa-II. As três cadeias encontram-se enroladas em si mesmas, formando uma estrutura tripla helicoidal a que se chama monómero de colagénio tipo I. Esta configuração confere à proteína estabilidade e resistência.

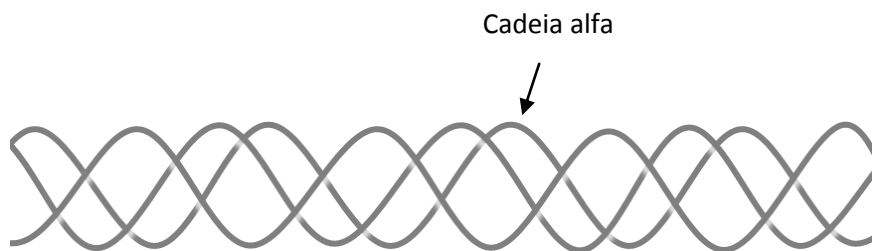


Figura n.º 1- Tripla cadeia helicoidal da molécula de colagénio.

O colagénio tipo II é encontrado exclusivamente nos tecidos cartilagosos e a sua principal função é absorver choques nas articulações e vértebras. O colagénio tipo III encontra-se na pele, paredes de vasos sanguíneos e órgãos internos e confere flexibilidade à pele e vasos sanguíneos. O colagénio tipo IV encontra-se na membrana basal. A membrana basal da cápsula do cristalino do olho desempenha um papel fundamental na filtração e interpretação da luz. No rim, a membrana basal participa no processo de filtração do sangue. O colagénio tipo V é encontrado em quase todos os tecidos e está associado aos tipos I e II.

A via responsável pela produção de colagénio é muito complexa. Cada tipo específico de colagénio é codificado por um gene específico que se encontram dispersos em vários cromossomas. A primeira etapa de produção de colagénio é a transcrição, com produção das cadeias de mRNA a partir do DNA. Depois ocorre a produção das cadeias pro-alfa no retículo endoplasmático rugoso. O precursor do colagénio é designado procolagénio. O

procolagénio contém extensões proteicas nos terminais designados de amino ou carboxi procolagénio ligados por ligações dissulfídicas. A forma não helicoidal é muito solúvel, o que permite que a proteína se movimente facilmente no interior da célula e um correcto alinhamento das três cadeias de procolagénio para posterior formação da estrutura helicoidal, com correcto enrolamento das três cadeias.

O segundo passo da formação da proteína de colagénio é a hidroxilação da prolina e da lisina, através de enzimas específicas designadas por hidroxilases, formando assim a hidroxilisina e a hidroxiprolina. As hidroxilases são enzimas que têm como cofactores a vitamina C e o ferro. Nos pacientes com défice em vitamina C esta reacção não ocorre, o que impede a formação da estrutura tridimensional, helicoidal da molécula de colagénio, sendo esta molécula de procolagénio destruída mais rapidamente devido ao seu enfraquecimento estrutural. É esta situação que constitui a base molecular do escorbuto.

A hidroxilisina é glicosilada através da adição de açúcares como a galactose e glicose. As enzimas que catalisam a etapa da glicosilação são a galactose transferase e glicose transferase que têm como cofactor o manganésio (Mn^{+2}). A molécula de procolagénio é transportada para o espaço extracelular através de microtúbulos. As extensões terminais de péptidos do procolagénio são removidas por uma enzima designada por procolagénio proteinase. Parte destas extensões removidas re-entram dentro da célula, regulando a síntese de novas moléculas de procolagénio, constituindo assim um mecanismo de auto-regulação. Neste momento a molécula produzida é já designada por colagénio.

No espaço extracelular, a molécula de colagénio sofre nova modificação, com formação de ligações cruzadas entre o colagénio e a elastina, promovidas pela lisil-oxidase. Este é um passo crítico, pois confere resistência à molécula de colagénio.

Normalmente, o colagénio é renovado de forma muito lenta e controlada. No entanto, durante o crescimento rápido e em algumas doenças, como na artrite e em doenças oncológicas, a degradação do colagénio pode ser bastante mais rápida. Em condições normais apenas as collagenases que pertencem à família das metaloproteínases (MMPs) podem degradar a molécula de colagénio. Possuem capacidade de síntese de MMPs os fibroblastos, os macrófagos, os neutrófilos, os osteoclastos e algumas células tumorais. Uma das razões porque os tumores podem ser tão invasivos está relacionada com a produção de collagenases que degradam o colagénio saudável, podendo mesmo romper a membrana basal dos vasos sanguíneos e contribuindo assim para a metastização.

LATIRISMO

As expectativas actuais apontam para um aumento da utilização das sementes de leguminosas em alimentação animal e humana como fonte de proteínas. (Hanbury 2000) No entanto é necessário ter cuidados com este tipo de alimentação, pois podemos encontrar factores antinutricionais nas sementes das leguminosas tais como: inibidores da tripsina, inibidores da quimiotripsina, inibidores da amilase, alcalóides, taninos, fitatos, oligossacarídeos e latirogénicos, potencialmente patológicos. (Grela 2001; Hanbury 2000) As sementes das espécies *Lathyrus*, contêm compostos latirogénicos.

Capaz de originar uma série de alterações patológicas multiorgânicas genericamente designadas por latirismo, (Grela 2001; Hanbury 2000) estas espécies de leguminosas são resistentes a condições meteorológicas adversas, ausência de fertilizantes e pesticidas, (Fernandez 1992; Siebald 2003; Yubero 2009; Getahun 2000) o que as torna muito baratas. Por isso, fazem parte integrante da dieta em países como a Índia, Etiópia e América do sul que apresentam história do maior número de pessoas com latirismo. São conhecidos também alguns casos em algumas regiões da Espanha. (Grueso 2006; Getahun 2000)

Os efeitos tóxicos só aparecem quando este alimento representa uma parte importante da dieta (mais de 30% do total) durante um período de um a três meses. (Fernandez 1992; Getahun 2000) No rato, os efeitos da doença no osso e ligamento periodontal aparecem ao fim de 3 semanas, independentemente da dosagem. (Keles 2006)

De uma forma genérica, os sintomas clínicos e alterações histológicas característicos do latirismo incluem: diminuição da taxa de crescimento, deslocação das articulações, deformação do úmero e do fémur, hemartroses, aneurisma com ruptura da aorta, degeneração dos discos vertebrais, alargamento e rompimento das epífises dos ossos longos, osteoporose, atrofia óssea por desuso, perda e reinserção dos tendões dos ossos longos, artrite degenerativa e substituição da cartilagem articular por tecido conjuntivo. (Gardner e Weinmann 1958, Liener 1983)

As sementes da espécie *Lathyrus sativus*, podem originar duas formas de latirismo: o neurolatirismo e o osteolatirismo.

O neurolatirismo é provocado por neurotóxicos que estão presentes nesta espécie de leguminosas, particularmente o ácido L-3-oxalilamino-2-aminopropionico (ODAP ou BOAA), que mimetiza o glutamato como neurotransmissor excitatório. (Siebald 2003) O ODAP lesiona os neurónios ao provocar a sua sobre estimulação, que culmina na morte neuronal.

O quadro clínico do neurolatirismo inicia-se com sintomas de câimbras nos membros inferiores e algumas vezes também podem aparecer nos membros superiores, fraqueza progressiva dos músculos das pernas, ocasionalmente pode-se observar tremores que não afectam a cabeça nem a língua, movimentos involuntário dos membros superiores, sensação de formigueiro nos membros inferiores e nas costas, micção frequente e urgente, espasmos vesiculares e esfínterianos e disfunção eréctil. (Spencer 1987) Os sintomas vão-se instalando progressivamente, surgindo paralisia com espasticidade, hiperreflexia tendinosa e reflexos plantares extensores. Estes sintomas podem estabilizar quando se suspende o agente causal. Nas crianças o crescimento é afectado. Se não for suspensa a ingestão do agente causador, as lesões observadas podem agravar-se e conduzir à morte. (Siebald 2003; Fernandez 1992; Grueso 2006)

O osteolatirismo é produzido por agentes latirogénicos como aminoacetonitrilo, o beta-aminopropionitrilo e a cisteamina, inibindo a formação da estrutura terciária da molécula de colagénio, pela inibição da enzima lisil-oxidase, responsável pelas ligações cruzadas de colagénio e elastina, diminuindo a resistência e a elasticidade da molécula. Estas toxinas produzem alterações ósseas e cartilagosas e fragilidade muscular, conduzindo a deformidades corporais e envolvimento das paredes dos vasos sanguíneos. (Dawson 2002; Siebald 2003; Fernandez 1992; Grueso 2006)

O aminoacetonitrilo e o beta-aminopropionitrilo interferem no desenvolvimento do gémem dentário (Hetem 1988), embora seja compatíveis com odontogénese. Existe uma concentração mínima de aminoacetonitrilo e β -aminopropionitrilo, em meio de cultura, suficiente para provocar efeitos deletérios no desenvolvimento e interferir na morfogénese dentária.

No rato sujeito a uma dieta latirogénica, ocorre maior susceptibilidade à formação de cálculo dentário, explicado por alterações metabólicas dos mucopolissacarídeos e mucoproteínas da saliva. Observam-se também alterações funcionais das glândulas salivares no rato (Devoto e Abramovich 1969)

A ingestão de legumes da espécie *Lathyrus* durante várias semanas, é responsável por defeitos na síntese de colagénio, nomeadamente a inibição da lisil oxidase, com a não das ligações cruzadas das moléculas de colagénio. Esta alteração da estrutura do colagénio afecta a resistência e tensão das fibras do ligamento periodontal (Taverne AA, Lemmens IG, Tonino GJ; 1986)

No rato em que foi induzido o latirismo crónico, através da administração de β -aminopropionitrilo durante 6 semanas, surgem lesões do ligamento periodontal típicas. Observa-se aumento da vascularização em especial da região apical, zonas de hialinização e calcificação das fibras transeptais, reabsorção do cemento e osso alveolar, formação típica de zonas de hialina cercadas por fibroblastos atípicos a que se dá o nome de corpos latíricos e um aumento do número de mastócitos. A acumulação de hialina está relacionada com a agressão directa ou indirecta ao ligamento periodontal, seguida da tentativa da sua reparação, com aumento da actividade fibroblástica. (Baden e Bouissou 1983; Shore 1984)

No rato latírico, observa-se uma diminuição da largura do ligamento periodontal em 11% relativamente aos animais de controlo. (Gardner 1958) Ao fim de uma semana de alimentação com sementes latirogénicas foram encontradas zonas do ligamento com hialinização parcial. Os fibroblastos apresentam-se edemaciados e delimitam as zonas de hialina, dando ao ligamento um aspecto estriado. Estas zonas de hialinização vão aumentando ao longo das semanas. Algumas das trabéculas ósseas ficam delimitadas por osteoclastos, o que indica reabsorção óssea activa. (Gardner 1958; Gardner 1960; Shore 1984)

A indução de defeitos periodontais através da colocação de uma membrana em volta dos dentes e os seus efeitos, é comparável aqueles observados aquando da indução do latirismo utilizando β -aminopropionitrilo durante 40 dias, em termos de evolução do processo inflamatório. (Keles 2005) Observam-se níveis comparáveis de IL-1 β e IL-6 nas duas situações, bem como semelhanças no número e tipo de populações celulares do processo inflamatório observado, que apresentam uma predominância de linfócitos e de macrófagos. (Keles 2005)

OBJECTIVOS

Pretendemos com este trabalho o estudo do latirismo, as suas consequências a nível sistémico e repercussões na estrutura dentária e seus tecidos adjacentes; através da revisão da bibliografia disponível.

Neste estudo foi efectuado um trabalho experimental com o objectivo de verificar as alterações que o latirismo provoca no ligamento periodontal, através da análise histopatológica e morfométrica, com quantificação das áreas de hialinização em indivíduos expostos à semicarbazida em duas doses diferentes.

Material e Métodos

PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 30 ratos Wistar macho, com quatro semanas de idade no início do ensaio, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Antes de iniciar o estudo todos os animais foram submetidos a uma semana de quarentena.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente por três grupos com igual número de indivíduos: o grupo controlo (Grupo I) e os grupos teste (Grupos II e III), cada um com 10 animais. Os animais de cada grupo foram distribuídos por gaiolas com três elementos. Os grupos II e III foram submetidos à administração de semicarbazida incorporada na dieta nas doses de 3g/kg e 6g/kg respectivamente.

MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os ratos foram mantidos nas condições padrão do biotério: temperatura de 22 °C e 60-65% de humidade, com regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Os animais do grupo controlo, foram mantidos com água *ad libitum* e ração standardizada durante quatro semanas, findas as quais foram sacrificados todos os animais. Os elementos dos grupos teste, foram mantidos com água *ad libitum* e a ração modificada durante quatro semanas, após as quais foram sacrificados.

A vigilância para rastreio de alterações patológicas foi diária, com observação dos seus hábitos alimentares.

SACRIFÍCIO, COLHEITAS E REGISTOS

Todos os animais foram eutanasiados ao fim de quatro semanas de estudo e necropsiados. A eutanásia foi realizada por sobredosagem anestésica utilizando a associação cetamina 50mg/ml (Ketalar®, Pfizer) e clorpromazina 50mg/2ml (Largatil IV, Lab. Victória) por injeção intramuscular.

Na necrópsia foram registados os dados referentes à observação do hábito externo, observação detalhada do hábito interno e fragmentos de tecidos colhidos e respectiva finalidade, em modelo próprio em utilização no Instituto de Patologia Experimental.

Em todos os animais foram colhidos para histopatologia de rotina as hemimandíbulas direita e esquerda.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Todos os fragmentos colhidos para histopatologia de rotina, depois de descalcificados em solução de EDTA, foram incluídos em parafina e foram realizados cortes no micrótopo com quatro micrómetros de espessura. Destas amostras foi feito o estudo histológico de rotina, usando a metodologia padrão para coloração de Hematoxilina e Eosina.

Para cada hemimandíbula de cada indivíduo, foram realizadas 2 fotografias dos cortes histológicos transversais corados com Hematoxilina e Eosina.

A análise morfométrica foi realizada com o auxílio do programa SigmaScan Pro®, que permitiu a medição das áreas de hialinização e do ligamento periodontal, com cada uma das fotografias em pixel.

Para que seja possível a comparação entre os diferentes casos, estudamos um rácio R, em que comparamos a área de hialinização com a área de ligamento periodontal ($R = \text{área total de hialinização} / \text{área do ligamento periodontal}$).

Resultados

GRUPO CONTROLO

No grupo controlo não se observam zonas de hialinização.

A área de ligamento periodontal varia entre 232 928,84 e 328 265,38, para um intervalo de confiança de 95% ($280 597,11 \pm 118 964,32$).

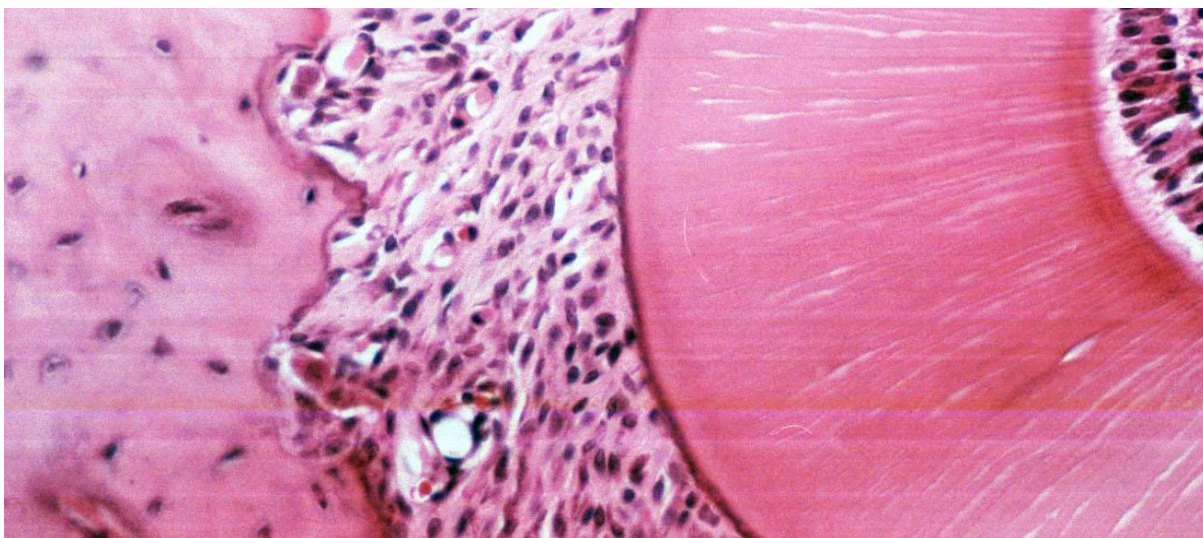


Figura n.º 2 - Microfotografia de um corte de ligamento periodontal. Grupo controlo, HE.

GRUPOS TESTE

Nos grupos II e III, observa-se a acumulação de um material homogéneo eosinófilo localizado principalmente na região central do ligamento periodontal, delimitado por tecido conjuntivo. Em algumas regiões, esta substância adquire um aspecto osteóide. Observam-se células com núcleo basófilo intensamente corado e com uma posição excêntrica. Algumas destas células apresentam uma morfologia em anel, com vacuolização citoplasmática. Observam-se algumas células macrofágicas, osteoclastos e cementoclastos com regiões de reabsorção óssea e do cimento.

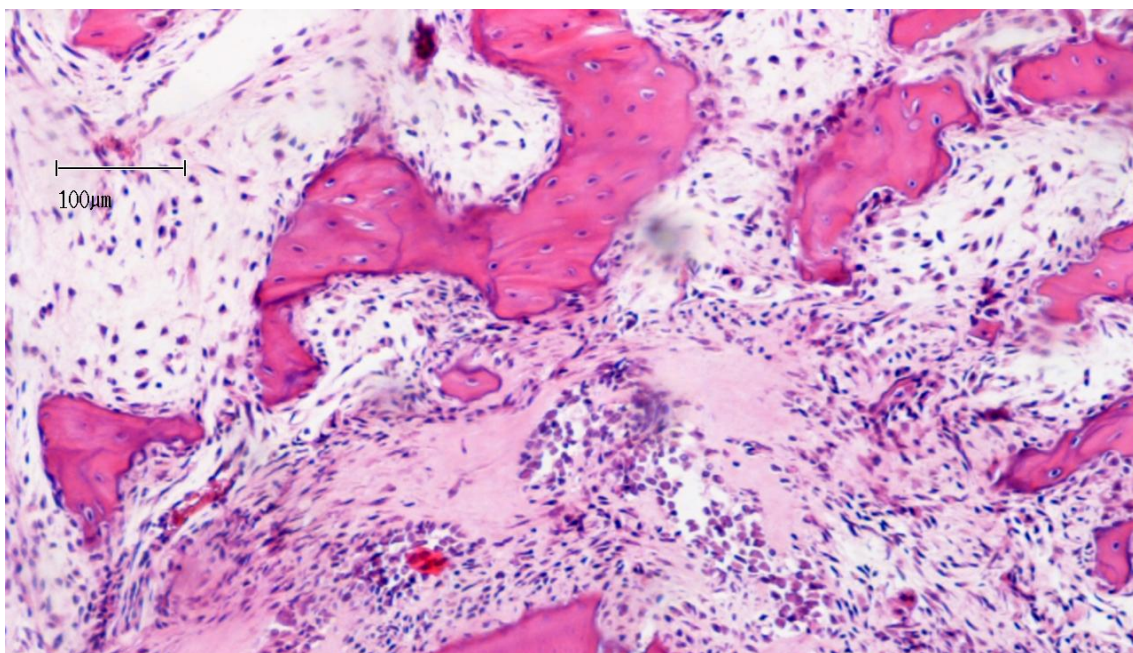


Figura n.º 3 - Microfotografia de um corte de ligamento periodontal. Grupo II, HE.

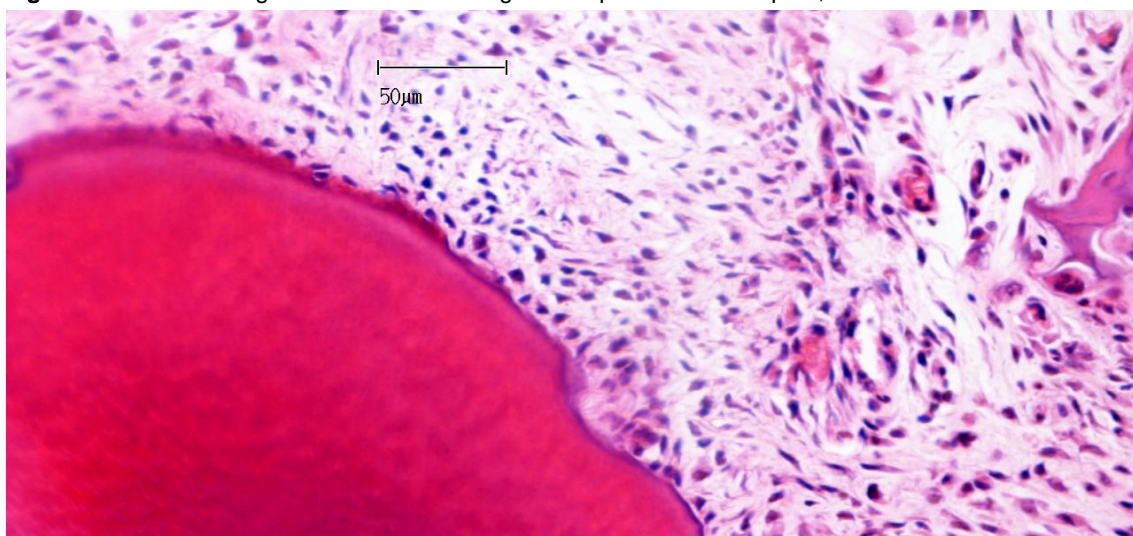


Figura n.º 4 - Microfotografia de um corte de ligamento periodontal. Grupo II, HE.

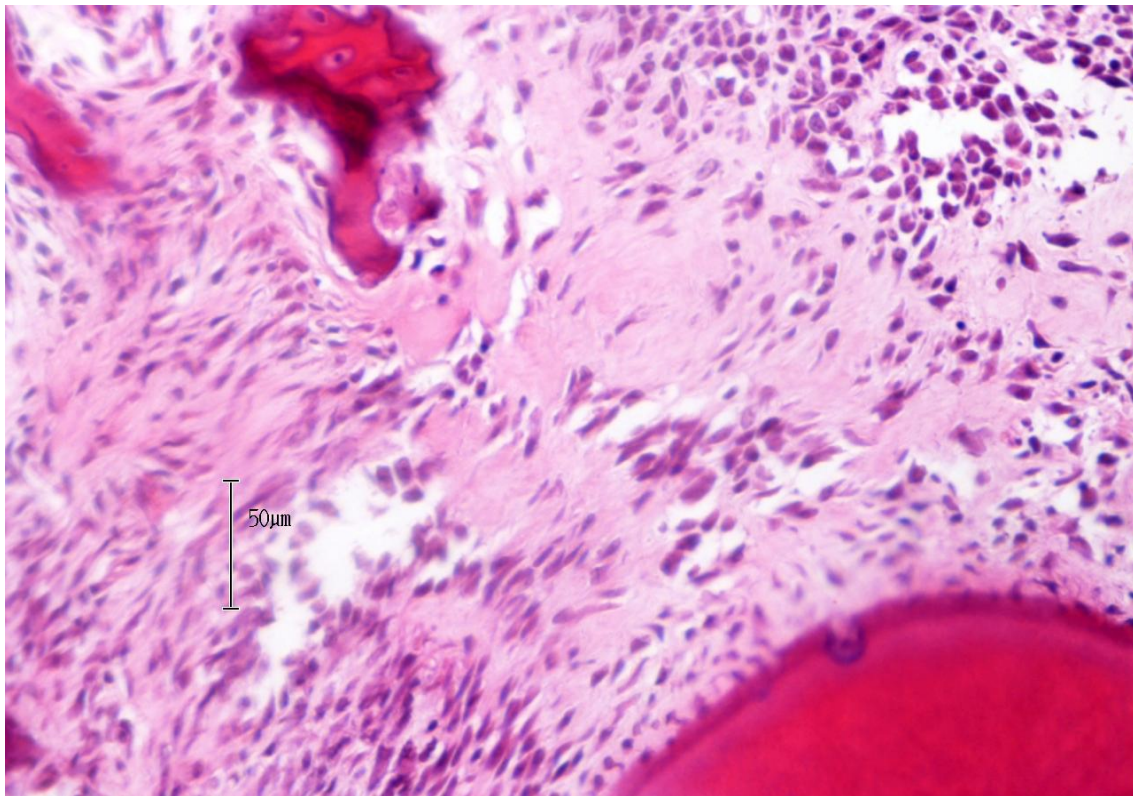


Figura n.º 5 - Microfotografia de um corte de ligamento periodontal. Grupo II, HE.

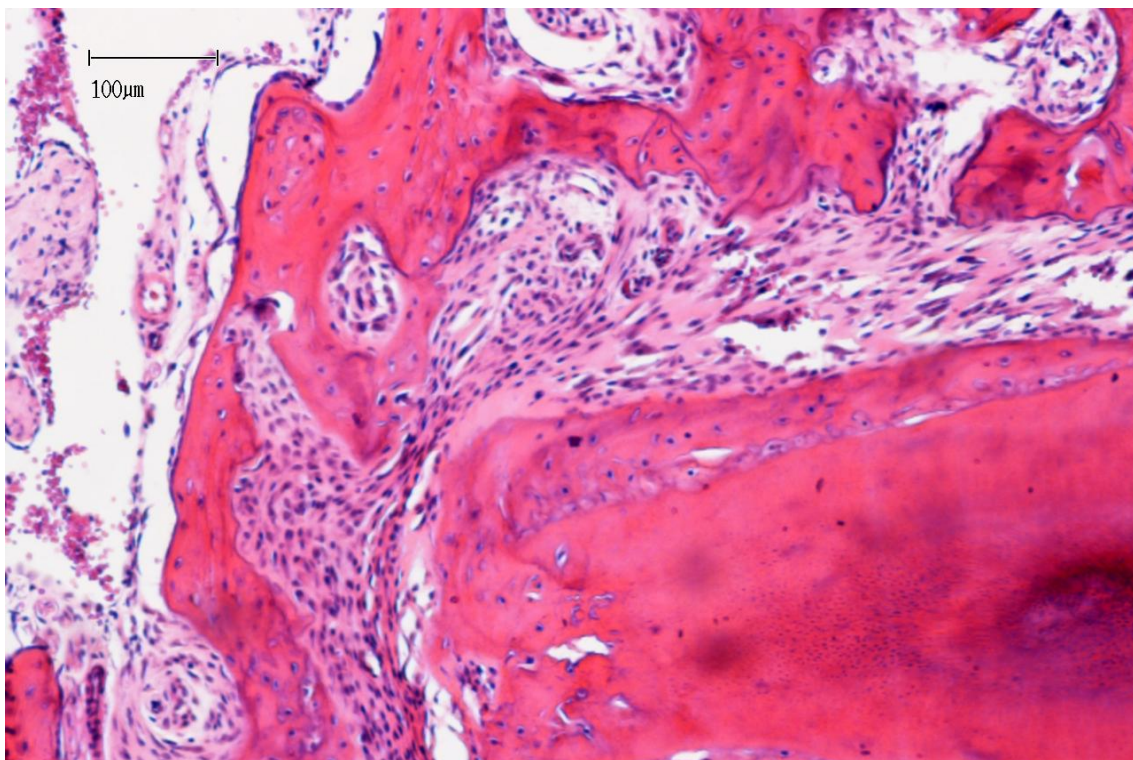


Figura n.º 6 - Microfotografia de um corte de ligamento periodontal. Grupo III, HE.

No grupo II, em que foi feita uma administração de 3 g/kg de semicarbazida, a área total de hialinização varia entre 8 521,07 e 11 170,71, para um intervalo de confiança a 95% ($9\ 845,89 \pm 2\ 136,80$). Se calcularmos o valor de R (em que $R = \text{área de hialinização} / \text{área do ligamento periodontal}$), temos para o grupo II que R varia entre 0,089 e 0,117, para um intervalo de confiança a 95% ($0,103 \pm 0,022$). A área de ligamento periodontal varia entre 8 3447,15 e 11 1783,07 ($97\ 615,11 \pm 22\ 851,55$), para um intervalo de confiança a 95%.

No grupo III, em que foi feita uma administração de semicarbazida na dose de 6g/kg, a área total de hialinização varia entre 15 348,55 e 24 229,15, para um intervalo de confiança de 95% ($19\ 788,85 \pm 8\ 984,13$). Se calcularmos o valor de R, temos para o grupo III, R que varia entre 0,080 e 0,155, para um intervalo de confiança a 95% ($0,118 \pm 0,076$). A área de ligamento periodontal varia entre 159 565,03 e 275 892,20 ($217\ 728,62 \pm 117\ 683,38$), para um intervalo de confiança a 95%.

Ao realizar a distribuição do valor de R, de acordo com cinco classes criadas com base na média e desvio padrão, verifica-se a presença no grupo II de 22% de regiões de hialinização com uma área pequena; 56% de regiões de hialinização com uma área média e 22% de regiões de hialinização com uma área grande. Não se observam casos que se enquadrem nas categorias de regiões com uma área de hialinização muito pequena ou muito grande.

No grupo III, observa-se a presença de 15% de regiões de hialinização com uma área muito pequena; 15% de regiões de hialinização com uma área pequena; 46% de regiões de hialinização com uma área média; 8% de regiões de hialinização com uma área grande e 15% de regiões de hialinização com uma área considerada muito grande.

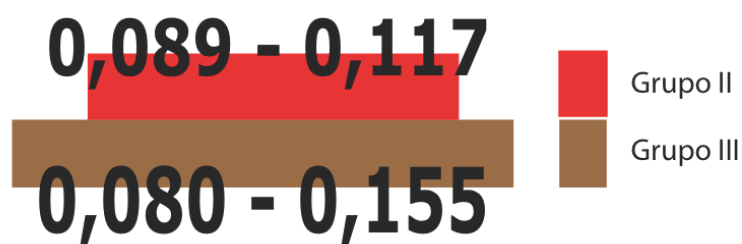


Figura n.º 7 - Representação esquemática da variação do valor de R para um intervalo de confiança a 95% dos grupos II e III.

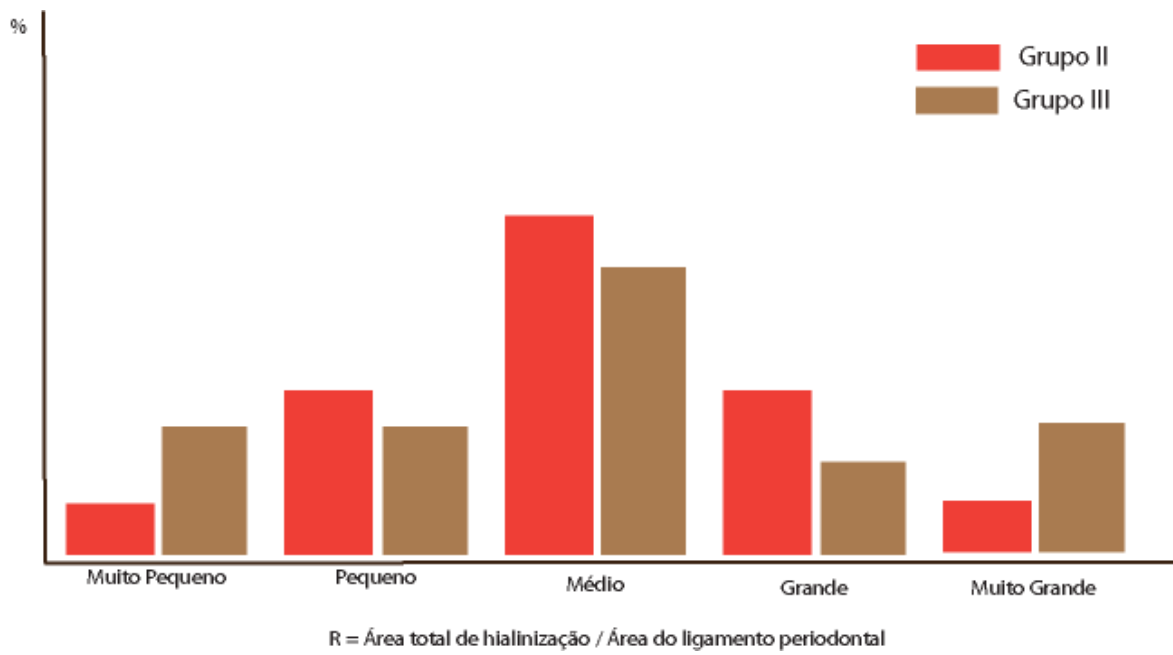


Figura n.º 8 - Representação esquemática da distribuição do valor de R dos animais dos grupos teste.

Discussão

O latirismo é uma doença causada pela ingestão de leguminosas da espécie *Lathyrus sativus* que possuem na sua constituição toxinas como aminoacetonitrilo, beta-aminopropionitrilo e cisteamina. Para além dos compostos destas sementes existem outros compostos com igual efeito como é o caso da semicarbazida, um agente latirogénico com acção semelhante à beta-aminopropionitrilo (Chowdhury e Davis, 1998). Os sinais e sintomas do osteolatrismo aparecem normalmente ao fim de quatro a seis semanas, sendo que a ingestão periódica das sementes não provocam a doença. Os efeitos tóxicos inibem a enzima lisil-oxidase responsável pelas ligações cruzadas do colagénio e elastina. (Dawson 2002; Siebald 2003; Fernandez e tal 1992; Grueso 2006)

A semicarbazida incorporada na ração dos animais constitui um dos modelos clássicos de indução do latirismo pela sua acção semelhante ao beta-aminopropionitrilo. Pode ser encontrada em alimentos embalados em frascos de vidro com tampa de metal embalada a vácuo. As quantidades que foram encontradas nos alimentos vão desde doses tão baixas que são indetectáveis a 20 microgramas por quilograma de alimento. A semicarbazida surge nos alimentos embalados a vácuo devido à degradação da azodicarbonamida utilizada para vedar as juntas das tampas de metal dos frascos de vidro. (EFSA 2003; Who 2005) A semicarbazida pertence à família das hidrazinas que são conhecidas pelo seu potencial carcinogénico em animais, responsáveis pela formação de neoplasias pulmonares e vasculares. Esta substância tem a capacidade de induzir danos cromossómicos, ao ser provocar danos nos fragmentos de DNA com timina e citosina. Contudo ainda não existem dados disponíveis sobre a indução de mutações genéticas ou aberrações cromossómicas em células de mamíferos. Em doses de 25 a 100mg/dia, no rato, é capaz de provocar a morte do feto e fenda palatina em fetos sobreviventes e em alguns casos morte da fêmea gávida. Pelo contrário, em doses de 5 ou 10 mg/dia não se observam efeitos adversos, no rato. A semicarbazida, pelas suas propriedades latirogénicas, foi comparada com outras substâncias por Dawson (2002), que encontrou o mesmo efeito tóxico e capacidade de induzir osteolatrismo que a tiosemicarbazida, beta-aminopropionitrilo e aminoacetonitrilo. (EFSA 2003)

Vários são os modelos para a indução do latirismo em animais não humanos. Chowdhury e Davis induziram esta patologia em galinhas com semicarbazida numa dose de 0,3 ou 0,6g/kg e β -Aminopropionitrilo de 0,5 ou 0,6g/kg. (Chowdhury 1998) Ramamurti produziu lesões esqueléticas com o composto latirogénico, semicarbazida, misturando 0,3% deste composto na dieta diária do rato.

Keles induziu latirismo no grupo experimental de ratos adultos do sexo masculino através da administração subcutânea de β -Aminopropionitrilo em dose de 5mg de β -Aminopropionitrilo e 0,4ml de água destilada por 100g de peso corporal durante 40 dias. (Keles 2005 e Keles 2006)

Um outro modelo experimental para provocar osteolatrismo, foi utilizado por Fry em 1962, onde foram utilizados ratos albinos fêmeas virgens com 6 a 7 semanas de idade. Foi feita uma administração de farinha produzida com sementes de ervilha doce (*Lathyrus odoratus*). (Fry 1962) A incorporação deste tipo de sementes na dieta já tinha sido utilizada por Gardner em 1958 (GARDNER, 1958).

Os efeitos produzidos pela semicarbazida incorporada na dieta do rato Wistar, enquanto agente latirogénico, são semelhantes aos conseguidos utilizando β -aminopropionitrilo misturado com água ou na ração, tal como a utilização de sementes de *Lathyrus odoratus*.

Tal como descrito na literatura consultada, particularmente por Barben e Gardner, observam-se nos cortes histológicos de ligamento periodontal corado com Hematoxilina e Eosina, a presença de corpos latíricos, substanciados na presença de regiões de acumulação de hialina e de fibroblastos cujo núcleo se encontra polarizado, dispostos em paliçada. Por outro lado, observa-se um aumento do número das células do sistema imunitário (macrófagos, linfócitos e mastócitos), com o objectivo de reparar as estruturas lesadas. (Keles 2005 e Keles 2006). Observámos ainda a presença de osteoclastos junto ao osso alveolar e cementoclastos junto à raiz do dente, com regiões de reabsorção óssea e de cimento, tal como descrito por Gardner e mais tarde por Baden.

Devoto descreveu um aumento da quantidade de cálculo dentário nos animais alimentados com ração suplementada com sementes *Lathyrus odoratus*, relacionado com alterações metabólicas das glândulas salivares. (Devoto 1969) No nosso ensaio não observámos maior acumulação de cálculo dentário nos animais dos grupos teste em relação aos animais do grupo controlo, devendo este aspecto ser esclarecido aquando da utilização da semicarbazida como agente indutor de latirismo e seu potencial efeito sobre as glândulas salivares.

A área do ligamento periodontal do grupo controlo é maior, do que nos grupos teste, de acordo com o descrito por Gardner (Gardner 1958). No entanto, a diferença encontrada no nosso ensaio não é estatisticamente significativa.

Não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos II e III no que respeita ao valor de R (área total de hialinização em relação à área total ocupada pelo ligamento periodontal). A distribuição dos diferentes casos do grupo III de acordo com as classes criadas de acordo com a normalização concordante com a média e desvio padrão do grupo II, mostrou uma maior heterogeneidade nas áreas de hialinização no grupo III, com aumento do número de casos muito grandes e muito pequenos em detrimento das classes em que o valor de R é médio, pequeno ou grande.

Conclusão

O presente trabalho permite concluir que:

1. O modelo utilizado para indução do latirismo utilizando a semicarbazida, permite a indução desta patologia eficazmente.
2. Observam-se no ligamento periodontal as alterações descritas na literatura, nos grupos sujeitos à administração de dieta suplementada com semicarbazida.
3. Não existe diferença estatisticamente significativa entre o valor da área de ligamento periodontal, apesar de se observar uma diminuição desta área em relação aos animais do grupo controlo.
4. Observa-se a acumulação de hialina no ligamento periodontal dos animais dos grupos teste. A quantidade deste depósito quando comparado com a área do ligamento periodontal, não apresenta diferença estatisticamente significativa entre o grupo II e o grupo III. No entanto, observámos uma maior heterogeneidade entre os diferentes casos no grupo III, quando comparada a distribuição da área de hialina de cada um dos casos.

Bibliografia

Baden E, Bouissou H; The effect of chronic beta-aminopropionitrile intoxication on the periodontium of the rat. A light microscopic and histochemical study with review of the literature. (1983) *Surg Oral Med Oral Pathol*: 34-46.

Carranza FA; *Periodontología Clínica de Glickman*, (1993) 7ª Edição; Interamericana.

Chowdhury SD e Davis RH; Influence of dietary osteolathyrogens on the eggshell quality of layinghens, (1998) *Br Poult Sci*, 39: 497-499.

Dawson DA et al; Biochemical and toxicological evaluation of agent-cofactor reactivity as a mechanism of action for osteolathyrim; (2002) *Toxicology*; 267-284.

Devoto FCH e Abramovich A; Dental Calculis in Lathyrict Rats, (1969) *J Dent Res* 48; 966.

Diegelmann FR; Collagen Metabolism, (2001) *Wounds* 13(5)

EFSA; Advice of the ad hoc expert group set up to advise the European Food Safety Authority (EFSA) on the possible occurrence of semicarbazide in packaged foods: (2003) AFC/adhoc SEM/1

EFSA; Statement of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food updating the advice available on semicarbazide in packaged foods: (2003) AFC 1 Oct. Updating advice on SEM.

Fernandez C. I. e Gabarba R. F. Latirismo. *Ver Esp Cir Osteoart*; (1992) 27:329-340.

Fry P. et. Al. Mechanical properties of tissues of lathyric animals. (1962) Department of Physiology, University College London.

Gardner A. F.; et al.; Masticatory Apparatus of Albino Rats in Experimental Lathyrim; (1958) *J DENT RES*: 37;492.

Gardner A. F.; Morphologic Study of Oral Connective Tissues in Lathyrim: (1960); *J DENT RES*: 39;24.

Genco J. R. et al. *Periodoncia*. (1993). 1ª Ed. Interamericana.

Getahun H. Lathyrism in Ethiopia: an unaddressed problem. : (2000).; Lathyrus Lathyrism Newsletter 1.

Glickman I. et. Al. Systemic Factors That Influence the Manifestations of Osteolathyrism in the Periodontium: (1963) *J DENT RES* 42; 835.

Grela E.R., Studzioski T. e Matras J. Antinutritional factors in seeds of *Lathyrus sativus* cultivated in Poland. (2001) *Lathyrus Lathyrism Newsletter*, 2: 101-104.

Han YP, et al; Essential role of matrix metalloproteinases in interleukin-1-induced myofibroblastic activation of hepatic stellate cell in collagen (2004) *The Journal of Biological Chemistry*; 279(6);4820-4828

Hanbury C. D., White C. L., Mullan B. P. e. Siddique K. H. M. A review of the potential of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. grain for use as animal feed. *Animal. (2000) Feed Science and Technology*, 87: 1-27.

Hetem, S., et. Al.; Estudo do desenvolvimento de germens dentais de camundongos submetidos à ação transplacentária de aminoacetona. (1988); *Ver. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.17, n.1/2, 63-72.

Hetem, S., et. Al.; Efeitos do aminoacetona e do beta-aminopropionitrila sobre o desenvolvimento do germe dental de molar in vitro; (2002); *Rev. Odontol. UNESP, São Paulo*, 31(2): 179-190.

Keles G, et. al. Periodontal and systemic bone change in rats with experimental lathyrism; (2006); *Indian J Med Res* 123, 541-546.

Keles G, et. al. Determination of systemically and locally induce periodontal defects en rats; (2005); *Indian J Med Res* 121, 176-184.

Lindhe J. *Periodontología clínica*. (1992).; : 2ª Edição Panamericana.

Liener IE; Naturally occurring toxicants in foods and their significance in human diet, (1983) *Arch Toxicol Suppl*; 6:153-166

Martínez A. B. *Periodoncia Basica*. : (1992).; 1ª Edição Ediciones Avances.

Marvin L., et. Al.; Collagen metabolism in the normal and lathyric chick; (1963) Department of Medicine, Harvard Medical School.

Ramamurti P. e Taylor H. E. skeletal lesions produced by semicarbazide and experimental analysis of the action of lathyrogenic compounds; (1959); the journal of bone and joint surgery.: VOL. 41 B, NO. 3.

Rose L., Genco R., Mealey B., Cohen D. W. Medicina Periodontal. (2002).; : 1ª Edição Livraria Santos Editora.

Shore RC, Berkovitz BK, Moxham BJ; Histological study, including ultrastructural quantification, of the periodontal ligament in the lathyritic rat mandibular dentition; (1984) Arch Oral Biol; 29(4):263-273

Shore RC, Moxham BJ, Berkovitz BK; Changes in collagen fibril diameters in a lathyritic connective tissue; (1984); 12(3-4):249-255

Sloan P., Collagen fibre architecture in the periodontal ligament. : (1979); Journal of the Royal Society of Medicine Volume 72

Sun XM, et al; Detection of type IV collagenase activity in malignant ascites (2003) World J Gastroenterol; 9(1):2592-2595

Taverne AA, Lemmens IG, Tonino GJ.;Lathyrogens and the role of collagen in the eruption of rat incisors; (1986); Arch Oral Biol; 31(2):127-131)

Woessner JF; Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling (1991) Faseb Journal; 5,2145-154

Endereços da Internet Consultados

Bioquímica dos alimentos, Latirismo; 2010; Consultado em 04 de Janeiro de 2010

<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/toxico/latirismo.html>

El Latirismo. Enfermedad producida por envenenamiento alimentício. 2009; Consultado em 04 de Janeiro de 2010

<http://lanaveva.wordpress.com/2009/08/22/el-latirismo-enfermedad-producida-por-enevenamiento-alimenticio/>.

Latirismo 2003; Consultado em 04 de Janeiro de 2010;

<http://escuela.med.puc.cl/publ/cuadernos/2004/Latirismo.html>.

Proceso a Las Gachas. 01-2009; Consultado em 04 de Janeiro de 2010;

http://montalbo.localtic.net/pub/documentos/documentos_PROCESO_A_LAS_GACHAS_db50ad6a.pdf.

Who, (2005); Semicarbazide., Consultado em 16 de Fevereiro de 2010;

<http://www.who.int/foodsafety/chem/sem/en/index.html~>