**EFEITOS DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES FATORES DE
CRESCIMENTO (PDGF-BB, IGF-1 E TGF- β 1) ISOLADOS OU
COMBINADOS NA TAXA DE PROLIFERAÇÃO E NA ADESÃO DE
FIBROBLASTOS DERIVADOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL
HUMANO A FRAGMENTOS RADICULARES TRATADOS OU NÃO COM
ÁCIDO CÍTRICO E TETRACICLINA APÓS A RASPAGEM**

ADRIANA CAMPOS PASSANEZI SANT'ANA

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU, DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, COMO
PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM ODONTOLOGIA,
ÁREA DE PERIODONTIA

EDIÇÃO REVISADA

**BAURU
2001**

**EFEITOS DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES FATORES DE
CRESCIMENTO (PDGF-BB, IGF-1 E TGF- b1) ISOLADOS OU
COMBINADOS NA TAXA DE PROLIFERAÇÃO E NA ADESÃO DE
FIBROBLASTOS DERIVADOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL
HUMANO A FRAGMENTOS RADICULARES TRATADOS OU NÃO COM
ÁCIDO CÍTRICO E TETRACICLINA APÓS A RASPAGEM**

ADRIANA CAMPOS PASSANEZI SANT'ANA

*Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da
Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de
Periodontia*

ORIENTADORA:
PROF^a. DR^a. MÁRCIA MARTINS MARQUES JAEGER

(EDIÇÃO REVISADA)

**BAURU
2001**

Sant'Ana, Adriana Campos Passanezi

Sa59e

Efeitos da aplicação de diferentes fatores de crescimento (PDGF-BB, IGF-1 e TGF- β 1) isolados ou combinados na taxa de proliferação e na adesão de fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano a fragmentos radiculares tratados ou não com ácido cítrico e tetraciclina após a raspagem / Adriana Campos Passanezi Sant'Ana. - - Bauru, 2001.

144p. : il. ; 30 cm

Tese. (Doutorado) - - Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Márcia Martins Marques Jaeger

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor: _____

Data: _____ / _____ / _____ .

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Protocolo de pesquisa nº 203/01.

Dedicatória

*Vocês são o sol e a lua da minha vida...
Por vocês consegui superar os obstáculos e chegar até aqui.
Obrigada por entenderem minha ausência, por aliviarem meus medos e minha angústia nos
momentos em que mais precisei...*

*A o meu marido Eduardo
e
A o meu filho João Eduardo*

*"Por todos os momentos em que vocês estiveram ao meu lado
Por todas as verdades que me fizeram enxergar
Por toda a alegria que deram à minha vida
Por tudo de errado que tornaram certo
Por cada sonho tornado realidade
Por todo o amor
Eu serei eternamente grata....
Vocês me deram asas e me fizeram voar,
Tocaram minha mão para que eu pudesse alcançar o céu
Perdi a fé, e vocês me trouxeram de volta
Sou grata por cada dia que vocês me deram
Eu sou o que sou pelo seu amor..."*

*Dedico este trabalho e todo
meu amor para sempre*

Agradecimentos especiais

A OS MEUS PAIS, EULOIR E SELMA, POR SUA PRESENÇA E SEU CARINHO CONSTANTES, SEU APOIO INCONDICIONAL E PELO SEU AMOR. VOCÊS SÃO MEU PORTO SEGURO....

"Felizes os que conseguem interpretar com benevolência as atitudes dos outros, mesmo contra as aparências: serão considerados ingênuos, mas este é o preço da caridade..."

Aos meus irmãos Ricardo e Gustavo, por estarem sempre comigo, me estimularem a seguir em frente mesmo diante de obstáculos que pareciam intransponíveis e à minha cunhada Dani, pela sua ternura e meiguice, meu carinho especial...

"Que bom seria se pudéssemos ser novamente crianças e passar todo o nosso tempo juntos..."

À querida Dani, por ter sido minha força quando fui fraca, por ter sido a minha voz quando eu não podia falar, por ter sido meus olhos quando não podia enxergar, por estar comigo este tempo todo, pela sua amizade e o seu carinho.que me estimulam a crescer....

"A amizade genuína requer tempo, esforço e trabalho para ser mantida. A amizade é algo profundo. De fato, é uma forma de amor..."

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Márcia Martins Marques J aeger pelo seu exemplo profissional, pela confiança em mim depositada, por ter me acolhido em um momento tão importante da minha vida e ter, então, guiado meus passos com segurança e sabedoria, o meu eterno muito obrigada.

À querida Emildre, que dividiu comigo todos os medos, angústias e as alegrias deste trabalho. Sem você nada disso seria possível. Descobri em você uma amiga maravilhosa, compreensiva, prestativa, acolhedora. À você também dedico este trabalho, porque esta vitória também é sua....

“A amizade é mais que afinidade e envolve mais que afeição. As exigências da amizade – franqueza, sinceridade, aceitação das críticas e dos elogios, lealdade incondicional e auxílio a ponto do sacrifício – são estímulos poderosos para o amadurecimento moral e o enobrecimento.”

Aos meus sogros, Guiomar e Sebastião, às minhas cunhadas F ernanda (pelo auxílio imprescindível !) e B iba, ao meu cunhado R afael e ao meu sobrinho R aphael, meu muito obrigada pelo carinho com que vocês me acolheram...

Ó Deus,
T u nos criaste pelo sopro de T eu Espírito,
T u nos resgataste pelo sopro T e teu Espírito
T u nos santificas na tua I greja pelo sopro do T eu Espírito.
Para que sejamos homens desse sopro,
Para que nossa carne e nosso sangue,
Para que nossa vida, nossas atividades e nossos sofrimentos,
Sejam apenas uma inspiração constante do sopro de T eu Espírito Santo,
N ão para nós, mas para a salvação do mundo.
N ós não somos chamados a permanecer preguiçosamente em ti,
A nos escondermos em T i,
N ós somos chamados a estar no T eu amor .
Para que T u nos faças extravasar, para que tu nos dispenses ao vento,
Para que tu nos lances como uma tempestade aos quatro cantos do mundo,
Ó Senhor, é preciso que venhas com toda impetuosidade,
Ó Senhor, é preciso que venhas com todo o teu poder
Ó Senhor, faça vir sobre nós o Pentecostes!
E por isso Senhor te rendemos graças,
Quando começamos a sentir T eu Espírito,
Que clama e age, que quer nos forçar, quer nos empurrar,
E que, impetuosamente, vem nos carregar!
Senhor, mesmo que a angústia nos queime,
Mesmo que a covardia se faça lancinante, nós te suplicamos,
A rrebata-nos por inteiro, arrebatá-nos carne e sangue,
A rrebata-nos corpo e alma, toma-nos corpo e espírito!
A rrebata-nos por inteiro no teu furacão sagrado!
Para que ele nos seja dado soprar, espalhar e iluminar
T eu santo A mor!"

Erik Przywara

Agradeço ainda de forma especial,

À Irvânia pelo inestimável auxílio com o preparo dos fragmentos, pela amizade, prestatividade e carinho com que sempre me tratou.,

Aos professores da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Profs. Drs. Deoclécio Nahás e Sebastião Luiz Aguiar Greghi pelos conhecimentos transmitidos e, principalmente, pela sua presença em momentos tão difíceis para todos,

Aos Profs. Drs. Ney Soares de Araújo e Vera Soares de Araújo por terem aberto as portas de sua disciplina de forma tão incondicional.

Às alunas e funcionárias da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo pelo seu auxílio e apoio, em especial às alunas Neusa, Sueli e Carolina e às funcionárias Patrícia, Edna e Zilda.

Aos funcionários da disciplina de Periodontia, Edilaine, Marcos e Neusa, pela sua amizade, respeito e prestatividade.

À Ângela, pela sua ajuda inestimável, pelo seu respeito e carinho.

À Cris, por ter me acompanhado com tanta disponibilidade quando precisei e por cuidar com tanto carinho do João na minha ausência.

À Eliane, por manter minha casa em ordem quando não pude estar presente

Muito obrigada!

“Tenho amigos que não sabem que são meus amigos.

Não percebem o amor que lhes devoto e a absoluta necessidade que tenho deles.

Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se tivessem morrido todos os meus amigos!

Até mesmo aqueles que não percebem o quanto são meus amigos e o quanto minha vida depende de suas existências...

Alguns deles não procuro, basta-me saber que existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida. Mas, porque não os procuro com assiduidade, não posso dizer-lhes o quanto gosto deles. Eles não iriam acreditar! Muitos estão lendo este texto e não sabem que estão incluídos na sagrada relação de meus amigos.

Mas é delicioso que eu saiba e sinta que os adoro, embora não declare e não os procure. E às vezes, quando os procuro, noto que eles não tem noção de como me são necessários e indispensáveis ao meu equilíbrio vital, porque fazem parte do mundo que eu trêmula e construí e se tornaram alicerces do meu encanto pela vida... Se alguma coisa me consome e envelhece é que a roda furiosa da vida não me permite ter sempre ao meu lado, morando comigo, falando comigo, vivendo comigo todos os meus amigos e, principalmente, aqueles que só desconfiam ou talvez nunca vão saber que são meus amigos...”

Aos meus amigos queridos Roberta, Cristiana, Sylvia, Marinelle, Eduardo, tia Yone, Marina, Rodrigo e Fabíola, tia Regina, tio Sylvio, Tuca, César, Renato, Marisa e Paulo, Flávia e Roberto, Júlio e Ligiane.

Aos casais amigos da Equipe de Nossa Senhora do Bom Parto: Érica e Luis Henrique,

Atílio e Rosemara, Cláudia e Fernando, Neusa e Lui, Fernando, Flávia e Roberto,

Vocês são minha segunda família e moram no meu coração...

Outros agradecimentos...

Aos colegas de Mestrado e Doutorado e Estagiários da disciplina de Periodontia, em especial à Maria do Carmo, Ana Lúcia, Mari, Ana Cláudia, Elonice, Patrícia e Fábio.

Aos professores, funcionários e estagiários da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucal-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Bauru, pela ajuda com a coleta dos dentes e pelo seu apoio, em especial ao Prof. Dr. Osny Ferreira Júnior pela sua amizade, ao Luis Fernando e Fernando pelo auxílio na coleta dos dentes, à Josiane e à Camila.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Pegoraro, Coordenador da Pós-Graduação e aos funcionários da Sessão de Pós-Graduação, em especial à Giane e ao Aurélio, pelos inestimáveis auxílios prestados.

À Faculdade de Odontologia de Bauru na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. Aymar Pavarini, que tão brilhantemente a vem conduzindo, meu agradecimento pelo financiamento parcial deste projeto e pela minha formação.

Aos funcionários da Biblioteca, pela atenção tão prontamente oferecida sempre que solicitado, em especial à Cibele e à Vera.

Aos professores da disciplina de Periodontia do curso de Odontologia da UNIP – Campus Bauru, Sérgio Kiyoshi e José Elias Nêder, que cobriram e entenderam minhas ausências.

Ao Coordenador do Curso de Odontologia da UNIP – Campus Bauru – Prof. Dr. José Valdez Conti pela confiança e pela oportunidade a mim concedida.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

Aos professores que não souberam exercer a arte de ensinar e não puderam seguir os preceitos de honestidade e generosidade, que Deus os retribua segundo as suas obras...

“O trabalho é o esforço aplicado; é qualquer coisa a que nos dedicamos, qualquer coisa em que gastamos energia para conquistar ou adquirir algo. O sentido fundamental do trabalho não é aquilo que **por que** lutamos para viver, mas o que fazemos **com** a nossa vida.

A felicidade, como A ristóteles disse há muito tempo, reside na atividade, tanto física como mental. R eside em fazer coisas de que se possa orgulhar por fazer bem e, portanto, se tenha prazer em fazer”.

DADOS CURRICULARES

Nome	<i>Adriana Campos Passanezi Sant'Ana</i>
Nascimento:	10/02/72
Formação Universitária	<p>Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, no período de 1990 a 1993, concluído em 04 de dezembro de 1993, colação de grau a 11 de dezembro de 1993.</p> <p>Curso de Pós-Graduação em Odontologia, a nível de Mestrado em Periodontia, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, no período de 1994-96.</p> <p>Curso de Pós-Graduação em Odontologia, a nível de Doutorado em Periodontia, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, de 1996 - 2001.</p>
Formação Profissional	Professora Adjunta I e Responsável pela disciplina de Periodontia da Universidade Paulista (UNIP), campus de Bauru, a partir de agosto de 1999.
Associações de Classe	APCD – Regional Bauru IADR – Sessão Brasil APG – FOB-USP

RESUMO:

A utilização de fatores de crescimento no tratamento periodontal tem sido amplamente estudada. No entanto, sua aplicabilidade no tratamento de seres humanos ainda não foi estabelecida. Os objetivos deste trabalho foram determinar os efeitos da aplicação de PDGF-BB, IGF-1, TGF- β 1 e sua combinação na proliferação de células cultivadas originadas do ligamento periodontal de humano (células FL2). Além disso, analisou-se a adesão dessas células a fragmentos radiculares periodontalmente comprometidos tratados previamente ou não por associação de ácido cítrico e tetraciclina após a raspagem. Para tanto, foi estabelecida cultura primária de fibroblastos obtidos de 3º molares retidos e/ou impactados extraídos de pacientes saudáveis. Para analisar a taxa de proliferação celular, foram plaqueadas 72 placas de Petri contendo inicialmente 10^3 células aleatoriamente divididas em 4 grupos que receberam a adição de PDGF-BB (grupo 1), TGF- β 1 (grupo 2), IGF-1 (grupo 3) ou de sua combinação (grupo 4) ao meio de cultura e 2 grupos controle (sem adição de fatores de crescimento) e contadas em triplicatas após 1, 3, 5 e 7 dias. Paralelamente, foram obtidos 30 fragmentos de dentes extraídos de 14 pacientes com perda de inserção à sondagem ≥ 6 mm aleatoriamente distribuídos em 10 grupos de acordo com o tratamento: raspagem (grupo 1), raspagem e aplicação dos fatores de crescimento isolados ou em combinação (grupos 2-5), raspagem e condicionamento ácido (grupo 6) ou raspagem, condicionamento ácido e aplicação dos fatores de crescimento isolados ou em combinação (grupos 7-10). Os resultados obtidos foram estatisticamente avaliados pelo teste ANOVA e por métodos descritivos. Os resultados demonstraram que o TGF- β 1 apresentou os melhores efeitos na proliferação de células do ligamento periodontal em cultura, enquanto que na adesão das células aos fragmentos a combinação dos três fatores apresentou resultados mais favoráveis, com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação aos grupos tratados sem o condicionamento ácido radicular, com exceção do grupo tratado através da combinação. Esses dados sugerem que a aplicação de fatores de crescimento, especialmente do TGF- β 1 associado ou não ao PDGF-BB e IGF-1, poderia ser favorável à regeneração dos tecidos periodontais perdidos com o processo de doença periodontal.

SUMÁRIO

RESUMO	X
1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISTA DE LITERATURA	5
3 PROPOSIÇÃO	67
4 MATERIAL E MÉTODOS	69
5 RESULTADOS	86
6 DISCUSSÃO	98
7 CONCLUSÕES	118
ANEXOS	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ABSTRACT	144

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

O sucesso da terapia periodontal regenerativa é dependente da proliferação, migração, diferenciação e síntese de matriz protéica por células viáveis presentes ao redor da ferida cirúrgica^{49,60,68,89,115,119,190}. Para que ocorra regeneração dos tecidos periodontais, ou seja, formação de novo osso, novo cemento e novo ligamento periodontal funcional, as células que ocupam a área da ferida cirúrgica devem ser do mesmo tipo e orientadas da mesma maneira que as células originalmente presentes¹¹⁵.

Vários métodos foram propostos para promover a regeneração periodontal, incluindo, entre outros, o condicionamento ácido da superfície radicular, regeneração tecidual guiada e enxertos com materiais autógenos, aloplásticos e alogênicos^{24,49,89}. Entretanto, nenhuma dessas técnicas ainda apresenta prognóstico previsível, podendo resultar em cicatrização por regeneração ou reparo, ou seja, substituição dos tecidos perdidos por outro originalmente existente sob condições distintas, por exemplo: anquilose, preenchimento ósseo, inserção conjuntiva longa ou epitélio juncional longo¹⁴⁵.

O condicionamento ácido da superfície radicular foi introduzido por REGISTER & BURDICK^{155,156}. Este tratamento apresenta efeitos na remoção da camada de smear-layer e desobliteração dos túbulos dentinários^{33,71,73,144,202}, exposição de fibras colágenas do tipo I^{83,99,194,202} que apresentam quimiotaxia para fibroblastos^{60,188,192}, e se unem às novas fibras colágenas formadas^{74,160,173} e aumento da rugosidade da superfície radicular^{101,143}, retardando a migração de epitélio juncional^{142,74,96}.

Os eventos necessários à regeneração periodontal são semelhantes àqueles necessários ao processo normal de cura das feridas e ao desenvolvimento do periodonto. Considera-se que os processos celulares necessários à regeneração/reparo são regulados por fatores de crescimento polipeptídicos^{04,27,68,114,115}, liberados por diversas células e tecidos. Atualmente, vários trabalhos de pesquisa clínica e laboratorial têm se preocupado em avaliar o papel dos fatores de crescimento utilizados sozinhos ou em combinação na cicatrização da ferida periodontal. A associação entre diferentes fatores de crescimento tem se mostrado favorável ao processo regenerativo, visto que diferentes fatores podem apresentar efeito sinérgico ou complementar^{27,35,36,44,61,103,105,106,112,129,170}. Dentre estas, a associação entre PDGF-BB E IGF-1^{82,103-6,112,129,170} parece demonstrar melhores taxas de sucesso, embora alguns

trabalhos indiquem o tratamento com TGF- β sozinho¹¹⁰ ou em associação com PDGF-BB^{44,138} ou ainda deste sozinho^{25,35,109}.

Apesar do uso de fatores de crescimento no tratamento periodontal ter sido bastante estudado sobre vários aspectos tanto *in vitro* como *in vivo*, características essenciais a sua utilização em humanos ainda estão por ser estabelecidas, tais como: concentração, tempo de aplicação, possíveis efeitos colaterais e efeitos desses fatores na proliferação, quimiotaxia, mitogênese e síntese protéica.

Baseados no exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de alguns fatores de crescimento (PDGF-BB, IGF-1, TGF- β 1 e a combinação dos mesmos) sobre a proliferação de células originadas de ligamento periodontal humano. Adicionalmente, analisaremos a adesão dessas células sobre superfícies radiculares tratadas por raspagem manual acompanhada ou não por condicionamento ácido e pela aplicação dos fatores de crescimento mencionados. Neste estudo será utilizada para o condicionamento ácido radicular a associação entre ácido cítrico e tetraciclina em forma de gel, conforme tem sido utilizado na disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

2- REVISTA DE LITERATURA

Para fins didáticos, esta Revista de Literatura será dividida em tópicos abordando os diferentes fatores de crescimento utilizados no estudo, bem como considerações quanto aos conceitos fundamentais da regeneração periodontal, caracterização do ligamento periodontal e desmineralização da superfície radicular.

2.1- FATORES DE CRESCIMENTO

2.1.1- FATOR DE CRESCIMENTO INSULÍNICO – I (IGF-I)

O fator de crescimento insulínico foi primeiramente descrito na literatura em 1976 por RINDERKNECHT & HUMBEL^{158, 159}, que demonstraram a homologia de dois polipeptídeos derivados do plasma humano com a cadeia de insulina.

Os mesmos autores¹⁵⁷ em 1978 descreveram a sequência amino-ácida do fator de crescimento insulínico I (IGF-I) e identificaram sua semelhança estrutural e funcional com a pró-insulina. O IGF-I foi descrito como uma cadeia polipeptídica simples de 70 resíduos aminoácidos ligados por três pontes dissulfídicas e peso molecular de 7649.

Em 1980, VAN WYK, SVOBODA & UNDERWOOD¹⁹⁸ sugeriram, através da realização de testes de ligação radioativos, que a somatomedina -C apresentava composição estrutural similar ao IGF-I, sendo que ambas diferiam das demais somatomedinas.

Neste mesmo ano, CANALIS²⁹ avaliou os efeitos do IGF-I na formação óssea através de análise da síntese de DNA e de proteínas colágenas e não colágenas em cultura de células derivadas de calvária de ratos fetais, comparando seus efeitos com aqueles obtidos com a insulina, triiodotironina (T3) e hormônio paratireoideano. Os resultados demonstraram que o IGF-I causou estímulo dose-dependente na incorporação de timidina radioativa no DNA em concentrações de 0.1 – 100 nM. Houve aumento no conteúdo de DNA e efeito estimulatório na incorporação de prolina radioativa em proteínas colágenas na concentração de 30 nM,

notando-se ainda efeito estimulatório sobre proteínas não colágenas, embora de menor proporção. Em cultura de células ósseas com periósteo os efeitos foram semelhantes. Houve também aumento do número de mitoses, conforme visto em cortes histológicos de espécimes cultivados na presença de IGF-1. Assim, sugeriu que o IGF-I estimulou a síntese de DNA e proteínas colágenas e não-colágenas ósseas, enquanto que a insulina apresentou os mesmos efeitos estimulatórios, porém sob concentrações não fisiológicas. O paratormônio apresentou efeitos estimulatórios sobre proteínas colágenas e inibitórios sobre proteínas não colágenas e a triiodotironina estimulou a síntese de proteínas colágenas sem afetar a síntese de proteínas não colágenas.

Esta metodologia foi novamente apresentada em 1988 por HOCK, CENTRELLA & CANALIS⁸⁰, acrescido de análise da incorporação de prolina e timidina radioativa na matriz e núcleo de células ósseas usando radioautografias de cortes sagitais de calvária de ratos fetais. Os resultados apresentados confirmaram os achados anteriores, identificando ainda marcação positiva de 8 vezes na região de células osteoprogenitoras, 4 vezes na região de osteoblastos e 2 vezes na zona fibroblástica do periósteo de espécimes tratados com IGF-I comparativamente a espécimes não tratados.

O IGF obtido do meio condicionado destes experimentos foi isolado e caracterizado por CANALIS, McCARTHY & CENTRELLA³¹ neste mesmo ano, utilizando diálise, liofilização, filtração em gel de eletroforése e nova purificação. A composição amino-ácida foi compatível com IGF-I, assim como a sequência amino-terminal. Sua concentração na cultura foi de 1nM e foi suprimida pela adição de ciclohexamida. Quando a substância foi adicionada à cultura em monocamada de células parietais ricas em osteoblastos obtida de ratos fetais, houve aumento da síntese de DNA e colágeno em, respectivamente, 42% e 26%, indicando que, sob estas condições, o IGF-I sintetizado por estas células apresentaria a capacidade de regular a formação óssea.

A mesma equipe¹¹³ demonstrou em 1989 os efeitos regulatórios exercidos pelos IGF-I e -II na síntese de colágeno ósseo por estas células e nos níveis de transcrição de colágeno tipo I em cultura de células enriquecidas com osteoblastos de osso parietal de ratos fetais. Seus achados demonstraram que ambos apresentaram ações similares, embora o IGF-I estimulasse a síntese de colágeno em 10nM e o IGF-II em 30nM. Ambos também

aumentaram a incorporação de prolina em colágeno tipo I sem diminuir sua taxa de degradação.

Considerando os efeitos mitogênicos exercidos pelo IGF-I sobre fibroblastos de diferentes origens e evidências de que o hormônio do crescimento (HC) regula a concentração plasmática dessa substância, BLOM, HOLMSTRUP & DABELSTEEN¹⁷ em 1992 avaliaram o efeito da adição das duas substâncias em cultura de células derivadas de ligamento periodontal de ratos relativamente à morfologia, padrão de crescimento e síntese de DNA e descreveram a expressão de receptores para IGF-I e HC. A análise de fotografias revelou que as duas substâncias não alteraram a morfologia celular ou o padrão de crescimento. Houve, porém, maior incorporação de timidina – H3 no DNA celular nas amostras tratadas com IGF-I, enquanto que o HC sozinho ou em combinação não produziu resposta dose-dependente. O efeito máximo na síntese de DNA foi de 171% com o IGF-I e 91% com o HC. Os efeitos mitogênicos do IGF-I foram ligeiramente diminuídos na presença do HC e ligação específica aos receptores de IGF-I apenas. Esses achados demonstraram que o IGF-I poderia estimular a síntese de fibroblastos de ligamento periodontal através da união a receptores de superfície de alta afinidade, não influenciada pelo HC.

Neste mesmo ano, MOCHIZUKI et al.¹²¹ observaram em cultura de células ósseas sobre fragmentos de dentina ação indutora da atividade de osteoclastos influenciada pelo IGF-I mas não pelo IGF-II. Em testes utilizando blastócitos na presença de vitamina D3, observaram estímulo da reabsorção óssea osteoclástica por ação direta ou indireta do IGF-I.

2.1.2- FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR-BETA (TGF- β)

O primeiro trabalho que descreveu os fatores de crescimento transformadores foi publicado em 1980 por ROBERTS et al.¹⁶³, quando isolaram polipeptídeos de células transformadas quimicamente e por vírus. Posteriormente, a equipe caracterizou duas classes de fatores de crescimento transformadores de tecidos neoplásicos e não neoplásicos¹⁶². Ainda no mesmo ano, CHILDS et al.³⁴ identificaram a presença de fator transformador no plasma humano.

A seguir, ASSOIAN et al.⁰⁸ demonstraram que as plaquetas humanas continham outros fatores de crescimento além do fator de crescimento derivado de plaquetas e propuseram, utilizando testes de purificação e caracterização, que as plaquetas seriam a principal fonte dos fatores de crescimento transformadores.

Por este motivo, SPORN et al.¹⁸³ também em 1983, após o isolamento em larga escala de TGF na glândula salivar e fígado bovinos, sugeriram a participação dessa classe de polipeptídeos no processo de cura das feridas. Para tanto, implantaram câmaras de cicatrização subcutaneamente no dorso de ratos e injetaram diariamente 0.1 ml de TGF em 3 das câmaras associadamente com pequenos níveis de EGF para potencializar a resposta. Outras 3 câmaras serviram como controle, tendo recebido, no mesmo período, injeções de albumina bovina sozinha ou em combinação com TGF ou EGF. Um grupo de animais foi sacrificado após 5 dias e outro após 9 dias, sendo que este último recebeu injeção de timidina H₃ junto com a última aplicação. A avaliação microscópica das amostras revelou que os grupos tratados com TGF resultaram em aumento significativo do conteúdo total de colágeno. O TGF oriundo de glândula salivar ainda apresentava atividade após 2 passos de purificação, padrão também observado no aumento do conteúdo de proteína e na síntese de DNA.

Ainda este ano, FROLIK et al.⁵⁵ demonstraram que o TGF- β era composto por duas subunidades unidas por ponte dissulfídica. Dentro da subclasse do TGF- β ainda existiriam duas subunidades – β 1 e β 2 – com 71% de homologia na sequência terminal, presentes na matriz e células ósseas em cultura.

Posteriormente, SEYEDIN et al.¹⁷⁵ em 1986 e SÖDEK & BERKMAN¹⁷⁷ em 1987 demonstraram que o TGF- β estava presente no tecido ósseo e apresentava estrutura molecular química, biológica e estruturalmente compatível com os chamados fatores indutores da cartilagem. Foram descritos dois fatores indutores da cartilagem (A e B) cuja sequência amino-ácida apresentou similaridade com o TGF- β .

Ainda em 1986, ASSOIAN & SPORN⁷ utilizaram testes radioimunes específicos para TGF- β para demonstrar que plaquetas humanas tratadas com trombina liberaram TGF- β como consequência da degranulação. As concentrações de trombina necessárias para induzir a liberação de TGF- β correspondeu às concentrações liberadas pelo marcador dos alfa-grânulos, a beta-tromboglobulina. Os resultados obtidos mostraram que culturas primárias de células de músculo liso de aorta bovina e culturas estabelecidas de células renais de ratos normais se comportaram de forma semelhante à ação do TGF- β . A proliferação de células musculares lisas não pareceu ser efeito estimulatório exclusivo do PDGF, mas uma interação de fatores plaquetários que possuíam a capacidade intrínseca de estimular ou limitar a mitose celular.

Os efeitos de fatores de crescimento diferentes do PDGF liberados de plaquetas foram também demonstrados neste ano por CENTRELLA, MASSAGUÉ & CANALIS³², quando afirmaram que o TGF- β estimulou o crescimento de calvária de ratos fetais. Demonstraram aumento da síntese de DNA a curto e longo prazo porém sem produzir efeitos estimulatórios significativos na síntese de colágeno ósseo ou de atividade de fosfatase alcalina quando presente continuamente na cultura. Entretanto, o tratamento transitório com TGF- β induziu a síntese de proteínas colágenas e não colágenas, sugerindo aumento do número de células indiferenciadas. Também aumentou a produção de prostaglandinas.

Ainda em 1986 ROBERTS et al.¹⁶¹ demonstraram que o TGF- β induziu rapidamente a fibrose e angiogênese *in vivo* e estimulou a síntese de colágeno *in vitro*, evidenciando mais uma vez sua participação nos processos de cura da ferida.

WRANA et al.²⁰⁶ em 1988 determinaram os efeitos do TGF- β sobre diferentes linhagens celulares obtidas de calvária de ratos fetais através de digestão por collagenase tempo-dependente. Os fenótipos das células variavam de predominantemente fibroblásticos a

osteoblásticos (5 tipos diferentes). As células foram estimuladas com TGF- β em concentrações baixas (0.1-1.0 ng/ml). Não houve indução de crescimento dependente ou independente da ancoragem, a despeito de aumento de 2.0 - 3.5 vezes na síntese de colágeno, dentre os quais o principal foi o tipo I. Também houve estímulo da síntese de fibronectina e inibidor do ativador do plasminogênio. Por outro lado, a síntese de SPARC (proteína ácida secretada rica em cistina ou osteonectina) foi estimulada em aproximadamente 2 vezes pela substância, porém apenas para células com fenótipo de fibroblastos. Os resultados demonstraram que o TGF- β estimulou a produção de matriz extracelular nas células ósseas e poderia influenciar na natureza dessa matriz dependendo da linhagem de células envolvidas. Na presença do TGF, as células com linhagem osteoblástica perderam suas características morfológicas, exibindo diminuição da atividade de fosfatase alcalina.

Consequentemente à existência de diversos tipos celulares no ligamento periodontal e considerando que a regeneração periodontal idealmente deve ser obtida pelo repovoamento selecionado de células oriundas do ligamento periodontal sobre a superfície radicular, em 1988 TERRANOVA & WIKESJÖ¹⁸⁸ realizaram testes de quimiotaxia e quimiocinese de culturas primárias de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal inicialmente cultivados sobre fibronectina e de células epiteliais inicialmente cultivadas sobre laminina. Posteriormente, as células foram posicionadas sobre blocos dentinários tratados com ECGF (fator de crescimento de células epiteliais), FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e TGF- β (fator de crescimento transformador-beta) e, em outro teste, em câmaras de Boyden modificadas. Os resultados obtidos demonstraram que especialmente o TGF- β induziu a migração específica de fibroblastos derivados do ligamento periodontal (200-300% mais potente que a fibronectina e 10% que o ECGF ou FGF). Não houve estímulo da migração de fibroblastos gengivais de forma semelhante aos fibroblastos de ligamento periodontal, mesmo utilizando as mesmas concentrações de fatores de crescimento. Tanto o ECGF quanto o TGF- β exerceram quimiotaxia positiva às células de ligamento periodontal. Sugeriram ainda que a combinação do TGF- β e ECGF poderia ser um importante mitógeno.

Em 1992 SPORN & ROBERTS¹⁸² realizaram uma pequena revista de literatura enaltecendo algumas características dos TGF- β . Afirmaram, com base em outros relatos científicos, a existência de dois tipos principais de TGFs- β : 1 e 2. Também ressaltaram que,

embora nove proteínas codifique receptores específicos para TGF- β , apenas duas moléculas principais estariam envolvidas nos mecanismos de sinalização (receptores I e II). Enalteceram a ação dessas substâncias sobre vários tipos celulares, indicando que o TGF- β exerceria ação homeostática nas lesões, diminuindo a extensão do dano ou aumentando o reparo, podendo ser utilizados terapeuticamente em casos de infarto do miocárdio, isquemia cerebral e fratura óssea.

MAILHOT et al.¹¹⁰ em 1995 avaliaram a resposta de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal em cultura à adição de TGF em concentrações de 10^{-9} a 10^{-21} M por até 60 horas com a finalidade de avaliar a síntese de RNA e proteína. As concentrações de proteína de culturas comparáveis também foram avaliadas colorimetricamente. Os resultados indicaram que as duas culturas mostraram aumento na síntese de RNA comparativamente ao controle, mas apenas as culturas de LP mostraram aumento da síntese protéica com o tempo. Sugeriram então, que os efeitos do TGF sobre as células eram dose e tempo-dependentes.

2.1.3- FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

Os primeiros autores a identificarem os fatores de crescimento derivado de plaquetas foram ROSS et al.¹⁶⁸ e KOHLER & LIPTON⁹¹ em 1974, como um potente mitógeno para células mesenquimais presentes no soro.

Segundo DEUEL et al.⁴⁸ em 1981 existiram dois subtipos de PDGF: PDGF-I e PDGF-II. O PDGF-I apresentou aproximadamente 31 Kd de peso molecular e continha cerca de 7% de carboidratos, enquanto que o PDGF-II possuía, aproximadamente, 28 Kd e apresenta 4% de carboidratos. O PDGF foi considerado, portanto, como uma glicoproteína dividida em duas frações protéicas ativas, que diferem entre si pelo conteúdo de carboidratos ligados covalentemente. As duas frações apresentaram atividade mitogênica, composição aminoácida e reatividade imunológica iguais.

BOWEN-POPE & ROSS²² em 1982 demonstraram que os diferentes isótipos de PDGF uniram-se a receptores de superfície de alta afinidade em várias células do tecido conjuntivo em testes usando PDGF radioionizado e purificado.

Neste ano ainda, SEPPÄ et al.¹⁷⁴ demonstraram que o PDGF exercia quimiotaxia para neutrófilos, monócitos e fibroblastos em níveis superiores até mesmo sobre derivados de plaquetas.

O fator de crescimento derivado de plaquetas estava constituído por uma glicoproteína de 27-31 kDa composta por duas cadeias peptídicas unidas por pontes dissulfídicas, segundo RAINES & ROSS¹⁵² em 1982 e BOWEN-POPE et al.²³ em 1984. Presente nos alfa-grânulos das plaquetas, somente eram liberados no processo de coagulação e no mecanismo de adesão plaquetária na lesão a vasos sanguíneos.

A união de PDGF humano a fibroblastos de ratos em cultura (células 3T3) foi demonstrada por HUANG et al.⁸³ em 1982 ocorrer de forma específica e reversível, existente para as duas formas do fator de crescimento (PDGF-I e -II). Essa união foi parcialmente inibida pela polilisina e histona e, de maneira competitiva, pelo sulfato de protamina, capaz de deslocar o fator de crescimento de seu receptor celular.

DEUEL et al.⁴⁷ em 1982 demonstraram que o PDGF exerceu quimiotaxia para monócitos e neutrófilos e que esta quimiotaxia foi semelhante àquela alcançada com o C5a para os monócitos e 65% em relação aos neutrófilos, porém em concentrações inferiores à necessária para estimular os monócitos. Sua atividade quimiotática foi bloqueada pela adição de anticorpos contra o PDGF e por sulfato de protamina, inibidor competitivo da união do PDGF às superfícies celulares.

GLENN, BOWEN-POPE & ROSS⁶⁴ no mesmo ano identificaram receptor de superfície celular específico para o PDGF utilizando o fator de crescimento marcado. O excesso de PDGF não marcado competiu com o PDGF ionizado enquanto que altas concentrações de FGF, insulina, EGF, lipoproteína de baixa densidade ou acetilada não apresentaram efeito algum. A pré-incubação com o PDGF marcado diminuiu os receptores de superfície disponíveis para o PDGF injetado. A união do PDGF se deu apenas a células que respondem ao mesmo na presença de um reagente.

Uma vez liberado, o PDGF apresentou rápido "clearance", conforme demonstrado por BOWEN-POPE et al.²³ em avaliação com rádio-receptor sensitivo no soro sanguíneo inteiro de humanos normais e macacos baboons em 1984. Os resultados obtidos demonstraram que o plasma reduziu substancialmente a capacidade do PDGF adicionado em se unir a superfícies celulares, sugerindo que o mesmo poderia conter uma proteína de ligação que servira para inativar o PDGF liberado no plasma.

Novamente em 1984 DEUEL & HUANG⁴⁵ apresentaram aspectos concernentes à estrutura, função e papel do PDGF em células normais e transformadas. Segundo os mesmos, o PDGF estaria presente nos alfa-grânulos plaquetários, sendo secretados após a exposição das plaquetas a um corpo estranho como a membrana basal subendotelial ou colágeno. Baseados em outras pesquisas, afirmaram que o PDGF é uma glicoproteína altamente básica separadas em duas frações protéicas ativas que diferem entre si no conteúdo de carboidratos covalentemente unidos. Os PDGFs I e II apresentariam atividade mitogênica, composição aminoácida e reatividade imunológica semelhantes. O PDGF estimularia células alvo específicas através de união a receptores de superfície celular que, por sua vez, mediarium uma cascata de eventos que levariam à síntese de DNA e proliferação celular. Outra propriedade do PDGF seria a quimiotaxia de células inflamatórias e fibroblastos.

HART et al.⁷⁶ e HELDIN et al.⁷⁷ em 1988 identificaram a existência de dois tipos principais de receptores de PDGF: os receptores alfa e beta. O PDGF-AB adere bem a ambos, porém o PDGF-AA se ligou com alta afinidade aos receptores alfa e o PDGF-BB aos receptores beta. Segundo HELDIN em 1988 a resposta de várias células ao PDGF pôde ser regulada pelo número e distribuição dos dois receptores nas superfícies celulares ou ainda pela viabilidade de um fator de crescimento específico ou uma isoforma específica.

Utilizando fibroblastos dérmicos cultivados ricos em bandas de actina- α , CLARK et al.³⁹ em 1989 demonstraram que as isoformas de -AB e -BB de PDGF puderam estimular a contração do gel colágeno na presença dos fibroblastos, mas não a isoforma -AA, semelhantemente ao que ocorre na cura das feridas. Após a adição de TGF- β , observaram resposta tardia de contração do gel colágeno, provavelmente correlacionada à capacidade desta substância em induzir a secreção de PDGF pelas células.

Em 1989, ROSS¹⁶⁷ publicou uma pequena revisão a cerca do PDGF e comentou que o fator de crescimento foi primeiramente isolado de plaquetas e constituído de duas cadeias (A e B) unidas por ponte dissulfídica. Existiriam 3 isótipos (AA, BB e AB) com 70% de homologia funcional entre si que se uniram a receptores específicos presentes na superfície celular.

ISHIKAWA et al.⁸⁵ em 1990 demonstraram que, em fibroblastos dérmicos humanos, o TGF- β foi um fraco mitógeno na ausência de soro ou outros fatores purificados e que este potencializou a síntese de DNA em fibroblastos estimulados por PDGF com cinética atrasada em relação ao estímulo com o PDGF isoladamente. O TGF- β 1 favoreceu o potencial mitogênico das três isoformas de PDGF e aumentou a adesão de PDGF-AA e PDGF-BB marcados aos receptores, de forma consistente com o aumento da expressão de receptores do tipo alfa. Estes achados seriam sugestivos de que o TGF- β poderia favorecer a proliferação de fibroblastos sob condições fisiológicas e patológicas.

HART et al.⁷⁵ em 1990 e DEUEL et al.⁴⁶ em 1991 demonstraram que o PDGF purificado de plaquetas humanas era predominantemente uma molécula predominantemente heterodimérica composta de duas cadeias denominadas de A e B, com homologia de

aproximadamente 60% na composição amino-ácida. Os homodímeros AA e BB foram isolados de fontes naturais. Várias células apresentam mensagens para as cadeias A ou B, incluindo macrófagos, células endoteliais e de músculo liso e fibroblastos.

BARTOLD, NARAYANAN & PAGE¹² demonstraram em 1992 que o PDGF foi capaz de reverter o efeito inibitório de LPS de *Salmonella* adicionado à cultura de fibroblastos gengivais humanos em até 60% acima do controle. O efeito inibitório máximo da ação dos LPS sobre os fibroblastos foi encontrado na dose de 50µl/ml e a ação proliferativa máxima do PDGF sobre as células foi observada na dose de 5 ng/ml.

A presença de receptores α e β de PDGF em fibroblastos de ligamento periodontal de ratos foi identificada em reação de imunoprecipitação com anticorpos específicos por CHO et al.³⁶ em 1994. Houve precipitação do antisoro ao receptor β na forma de dois componentes com pesos moleculares de 148 e 172 kDa, representando o precursor e a forma madura deste receptor. O mesmo procedimento para o receptor α também revelou a precipitação das formas precursora e madura, com pesos moleculares de 140 e 153 kDa, respectivamente.

Comparando os efeitos das diferentes isoformas de PDGF sobre a resposta mitogênica de fibroblastos de ligamento periodontal humano em cultura em 1994 BOYAN et al.²⁵ encontraram resposta mitogênica máxima para o PDGF-BB, seguido pelo PDGF-AB e, por último, pelo PDGF-AA. A resposta máxima foi obtida na concentração de 10 ng/ml.

Em 1994, WANG et al.¹⁹⁹ aplicaram 10 µl/ml de PDGF sozinho ou associado à membrana de politetrafluoretileno expandido para tratamento de defeitos periodontais cirurgicamente criados em cães, tendo como controle a adição de solução salina e o posicionamento de membrana apenas. Os resultados demonstraram aumento da resposta proliferativa dos grupos tratados com PDGF, independentemente da associação com a membrana.

Entretanto, no ano seguinte, PARK et al.¹³² observaram resposta regenerativa mais rápida de defeitos de furca classe III criados em pré-molares tratados com a aplicação de 5 µg/10µl de ácido acético 0.05 M após condicionamento com ácido cítrico por 3 minutos e seguida pelo posicionamento de membrana para regeneração tecidual guiada do que em dentes

tratados apenas pelo condicionamento ácido acompanhado pelo posicionamento da membrana após 4-8 semanas de observação.

Também no mesmo ano CHO, LIN & GENCO³⁵ propuseram uma terapia de regeneração tecidual guiada modulada pelo PDGF em modelo experimental constituído de três diferentes etapas. Na primeira etapa, a origem dos fibroblastos envolvidos no processo de reparo periodontal, sua atividade proliferativa e migração nos estágios iniciais da cura das feridas foi investigada utilizando-se o modelo de defeitos de furca criados em cães beagle, tratadas por condicionamento ácido e posicionamento de membrana. As células em divisão, localizadas principalmente no LP, tecido conjuntivo neoformado e próximas à superfície do osso, foram identificadas pela injeção de bromodeoxiuridina 1 hora previamente ao sacrifício, que ocorreu 1, 2 e 3 semanas após a criação dos defeitos. Numa segunda etapa, foram selecionados os fatores de crescimento mais efetivos para a regeneração periodontal através da análise de efeitos quimiotáticos, proliferativos, de síntese de colágeno e de diferenciação *in vitro* de trabalhos previamente publicados por MATSUDA et al.¹¹² e CHO et al.⁴⁸, tendo sido selecionado o PDGF-BB. Na terceira fase do experimento, propuseram que a desmineralização da superfície radicular com ácido cítrico previamente à adição do fator de crescimento poderia manter a liberação do fator de crescimento por maior período de tempo, conforme determinado por testes radioautográficos. Finalmente, foi proposta a terapia regenerativa conjugando condicionamento ácido da superfície radicular e aplicação do fator de crescimento. Os resultados mostraram estabelecimento precoce de inserção de tecido conjuntivo na ausência de barreira mecânica, diminuindo uma etapa cirúrgica e associando os efeitos benéficos de estímulo da quimiotaxia e proliferação de fibroblastos do LP pelo PDGF-BB.

Já PIERCE et al.¹³⁷ em 1995 detectaram pouca expressão de isoformas de PDGF na pele normal e em úlceras dérmicas não cicatrizantes. Por outro lado, em feridas agudas cirurgicamente criadas e em feridas crônicas tratadas com PDGF-BB foram encontrados níveis acentuados de PDGF-AA em capilares e fibroblastos, embora nas feridas crônicas este fato acontecesse mais tardiamente. Encontraram também receptores para PDGF-BB na pele normal e no tecido de granulação, fornecendo base molecular para o tratamento de feridas com PDGF-BB recombinante humano.

OATES et al.¹³⁰ em 1995 demonstraram que o número de receptores alfa – de alta afinidade para PDGF-AA diminuiu após o tratamento com TGF- β , enquanto que o número de receptores β permaneceu praticamente inalterado. Assim, o tratamento com TGF- β influenciou a união aos receptores de PDGF reduzindo as unidades alfa e aumentando o número das subunidades beta, que são mais específicas para a isoforma BB.

O tratamento de cilindros de polisulfona com várias concentrações de PDGF-BB mostrou aumento da incorporação de PDGF-BB radioativo sobre o controle para as doses de 10, 20 e 50 ng/ml da substância de 192%, 310% e 162% respectivamente após 4 dias. Assim MAILHOT et al. em 1996 demonstraram que o tratamento desses cilindros com PDGF-BB estimulou a proliferação de fibroblastos de LP em cultura dependente da dose e do tempo.

BARTOLD & RABEN¹¹ em 1996 criaram um modelo *in vitro* de ferida cirúrgica para estudar os efeitos de várias concentrações de PDGF na proliferação e migração celular e na síntese de matriz extracelular. A ferida foi criada como lesões discóides em pratos de 24 poços contendo camada confluyente de fibroblastos de LP. Os resultados indicaram que na presença de 10 ng/ml de PDGF e 0.2% de soro bovino fetal tanto a proliferação quanto à migração celular foram significativamente aumentadas. Nas culturas com a ferida, houve moderado estímulo da síntese de proteoglicanas comparativamente às culturas sem ferida.

Diante das evidências da participação do PDGF na regeneração periodontal, GREEN et al.⁶⁹ em 1997 avaliaram a localização de receptores alfa e beta de PDGF em feridas gengivais criadas pela confecção de incisões de 75 mm de profundidade na região de papila interproximais saudáveis, as quais foram excisionadas após 8 horas, 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Secções congeladas foram imunofixadas com anticorpos de afinidade purificados. Os resultados mostraram marcação positiva para as cadeias A e B no coágulo e no epitélio ferido e não ferido, sendo que no coágulo parecia mais intensa a marcação para a cadeia A. Os vasos sangüíneos no tecido conjuntivo também apresentaram marcação positiva enquanto outras áreas foram extensamente negativas. Também não houve marcação significativa em tecidos saudáveis para quaisquer das cadeias. Entretanto, as áreas feridas começaram a apresentar marcação positiva para a cadeia B depois de 3 dias, atingindo pico máximo após 7 dias e novamente diminuindo.

No presente ano, MUMFORD et al.¹²² demonstraram, em modelo *in vitro* que simula a criação de uma ferida cirúrgica, que fibroblastos do ligamento periodontal exibiram maior resposta proliferativa ao PDGF-BB do que fibroblastos gengivais na concentração mínima de 10 ng/ml.

2.1.4- ESTUDOS COMPARATIVOS DA AÇÃO DE DIVERSOS FATORES DE CRESCIMENTO UTILIZADOS ISOLADAMENTE OU EM COMBINAÇÃO

No ano de 1988, CANALIS; McCARTHY & CENTRELLA³¹ apresentaram revisão geral relacionadas aos diferentes fatores de crescimento e a regulação do remodelamento ósseo. Afirmaram que o TGF- β estimulou a síntese de DNA ósseo e a replicação celular, indicando ainda que os osteoblastos faziam parte do grupo de células mais sensíveis à ação deste fator. Outra propriedade comentada foi o estímulo da síntese de colágeno, em parte decorrente do número aumentado de fibroblastos. Quanto ao PDGF, afirmaram ser estimulatório da síntese de DNA e proteínas podendo atuar como regulador sistêmico ou local do crescimento do esqueleto. Um dos seus efeitos, por exemplo, seria a capacidade de tornar células ósseas competentes a responder a outros fatores de crescimento presentes no esqueleto, apresentando também efeitos na reabsorção óssea.

Os efeitos da aplicação tópica de 125-1500 ng de PDGF, EGF, IGF-I, FGF, TGF- α e TGF- β em 30 μ l de gel de metilcelulose (veículo inerte) até 45 minutos após a criação de feridas dérmicas no dorso de porcos Yorkshire foram avaliados por LYNCH, COLVIN & ANTONIADES¹⁰⁴ em 1989. Quando o PDGF-2, IGF-I, EGF e FGF foram utilizados isoladamente, pouco ou nenhum efeito foi conseguido. Por outro lado, a combinação do PDGF e do IGF produziu aumento considerável na regeneração de tecido conjuntivo (aumento de quatro vezes) e epitelização da ferida (aumento de duas vezes na espessura da derme e epiderme). O TGF- α foi capaz de substituir parcialmente o IGF-I na ação sinérgica com o PDGF mostrando, entretanto, aumento variável na espessura do epitélio e diferenciação

anormal, caracterizada pela presença de áreas com disqueratose. O FGF não apresentou bons resultados, mesmo quando combinado com outros fatores de crescimento, enquanto que o TGF- β foi aquele que apresentou os melhores resultados individualmente, aumentando a síntese de colágeno e o número de fibroblastos. Opostamente causou diferenciação anormal de ceratinócitos e inibiu o crescimento de células epiteliais. Outra característica produzida foi o acúmulo de fagócitos mononucleares, provavelmente decorrente do efeito quimioatratativo deste sobre monócitos, especialmente macrófagos, levando à angiogênese.

Após a obtenção destes resultados, LYNCH et al.¹⁰⁶ neste mesmo ano avaliaram os efeitos da aplicação de 1 μ g de PDGF humano purificado e IGF-I em 75 μ l de gel de metilcelulose em defeitos ósseos horizontais naturais de cães beagle. Os dentes foram removidos em bloco duas semanas após o tratamento. A análise histológica dos dentes controle, tratados apenas com o gel de metilcelulose, revelou formação de epitélio juncional longo, sem evidências da neoformação de osso ou cimento. Os espécimes tratados com a combinação de fatores de crescimento exibiram quantidades significativas de formação de novo osso e cimento. Uma camada praticamente contínua de osteoblastos revestia a camada de osso neoformado, com uma densa camada celular na extensão mais coronal deste tecido, indicando que a aplicação *in vivo* da combinação destes fatores favoreceria a regeneração das estruturas periodontais.

Aplicações únicas de PDGF-BB (2 μ g/80 pmol) e TGF- β 1 (20 μ g, 600 pmol) foram aplicadas por PIERCE et al.¹³⁸ em 1989 em incisões lineares realizadas no dorso de ratos. Cada um favoreceu a força necessária ao fechamento da ferida 5 dias após sua confecção em até 212% acima do controle. A análise histológica das feridas tratadas demonstrou resposta quimiotática de macrófagos e fibroblastos tanto para o PDGF quanto para o TGF. Entretanto, a resposta à segunda substância foi significativamente inferior à primeira. Além disso, esse efeito foi observado em períodos de tempo prolongados (7 semanas) apenas para o PDGF-BB. Após 21 dias, as feridas tratadas com este produto mostraram aumento persistente do número de fibroblastos e tecido de granulação. Macrófagos e fibroblastos isolados destas feridas apresentaram níveis intracelulares mais acentuados de TGF- β , sugerindo que esta substância atrairia transitoriamente os fibroblastos, podendo estimular diretamente a síntese de colágeno.

Diferentemente das demais combinações, a associação entre TGF- β , IGF-I e PDGF foi avaliada somente por PFEILSCHIFTER et al.¹³⁵ em 1990 quanto à atuação sobre a taxa de aposição óssea. Os resultados obtidos demonstraram que as três substâncias são capazes de dobrar a taxa de aposição óssea em 48 horas e ainda reverter o efeito inibitório exercido pelo paratormônio (PTH). Das três substâncias aplicadas isoladamente, a mais potente parecia ser o TGF- β , embora a aposição de matriz óssea se mostrasse mais favorecida quando da colocação simultânea dos três fatores. Esses resultados indicaram que os mesmos poderiam favorecer-se mutuamente na estimulação da formação óssea.

Novamente LYNCH et al.¹⁰⁵ em 1991 avaliaram os efeitos da aplicação de PDGF e IGF em defeitos ósseos naturais de cães beagle. Os achados histológicos foram semelhantes àqueles apresentados anteriormente. Também avaliaram a taxa de clearance das substâncias através da adição dos fatores de crescimento acrescidos de marcadores radioativos, encontrando meia-vida de 3 horas para o IGF-I e 4.2 horas para o PDGF. Mais de 96% das proteínas radioativas haviam sido eliminadas após 96 horas e estavam completamente ausentes após 2 semanas. Também observaram aumento de 2 vezes no consumo de Technetium 99-MDP após 2 e 4 semanas, indicando aumento da atividade metabólica óssea comparativamente ao controle.

A seguir, demonstraram que a aplicação de PDGF-BB e IGF-I e PDGF-AA e IGF-I em defeitos ósseos periodontais cirurgicamente induzidos em pré-molares de macacos resultou na formação de novo cimento, ligamento periodontal e osso recobrimo em média 50% da distância linear da junção cimento-esmalte à base do defeito criado, sem diferenças estatísticas entre os dois isótopos¹⁷⁰.

Após o estabelecimento de cultura primária de fibroblastos de ligamento periodontal obtidos do alvéolo de extração de ratos e caracterização da cultura em análise morfológica em micrografias de contraste de fase e marcação positiva para osteonectina, MATSUDA et al.¹¹² em 1992 avaliaram os efeitos mitogênicos, quimiotáticos, de síntese de proteína total e de colágenos de vários fatores de crescimento utilizados isoladamente e em combinação. Os resultados demonstraram que a associação entre o PDGF-AB e o IGF-I apresentou os melhores resultados mitogênicos, efeito também observado para os PDGFs e IGF-I isoladamente. Houve também aumento da resposta mitogênica com as combinações de PDGF-AB com EGF e TGF- β . Por outro lado, a associação entre o IGF-I e o TGF- β não

reverteu o efeito inibitório demonstrado pela segunda substância quando usada isoladamente. O PDGF-BB apresentou a mais significativa resposta quimiotática dentre os PDGFs, efeito também observado com o IGF-I em altas concentrações, sendo até mesmo mais potente que o PDGF-BB em concentrações superiores a 10 ng/ml. O EGF e o TGF- β não exerceram atividade quimiotática. Embora não houvesse diferenças na síntese de proteína total, houve aumento na síntese de colágeno de 8% acima do controle para o PDGF-AB e 3% com o TGF- β .

Metodologia semelhante foi empregada por OATES, ROUSE & COCHRAN¹²⁹ para avaliar os efeitos da aplicação de PDGF-AA e -BB, TGF- β e IL-1 sobre a resposta mitogênica, medida em termos de resposta proliferativa, de fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano em cultura. Houve aumento da atividade mitogênica de maneira dose-dependente sobre um gradiente de concentração variável de 1-50 ng/ml para as duas isoformas de PDGF, enquanto a IL-1 β em baixas doses não exercem efeito algum e, em doses elevadas, efeito inibitório na proliferação de fibroblastos. O TGF- β promoveu aumento estatisticamente significativo na proliferação de fibroblastos, porém inferior aos PDGFs de forma retardada, bimodal e dose-dependente sobre um gradiente de concentração de 0.01-20 ng/ml, com resposta máxima a 1 ng/ml. A incubação prévia das células com TGF- β favoreceu a resposta mitogênica após a adição de PDGF em baixas concentrações, ocorrendo o inverso quando altas concentrações de TGF foram adicionadas.

Novamente LYNCH¹⁰² em 1994 descreveu a ocorrência da síntese e liberação de diversos fatores de crescimento no processo de cura das feridas, ressaltando que os macrófagos são responsáveis pela síntese de grande quantidade de PDGF, levando à formação do tecido de granulação. Além disso, o estímulo para liberação de PDGF nos sítios lesados dispararia outros eventos biológicos semelhantemente ao mecanismo de coagulação em cascata, resultando na liberação de outros fatores de crescimento em cadeia. Afirmou ainda que a aplicação exógena de fatores de crescimento aceleraria o processo cicatricial de tecidos não mineralizados e, possivelmente, de tecidos mineralizados. Enalteceu os fatores que indicariam a associação entre o PDGF e o IGF-1 como a melhor combinação visando a regeneração periodontal:

- Tanto o PDGF como o IGF-I apresentou efeitos quimiotáticos e mitogênicos para fibroblastos do ligamento periodontal;

- O PDGF exerceu efeito quimiotático para osteoblastos;
- O IGF-I promoveu a síntese de proteínas colágenas e o PDGF de proteínas não colágenas em cultura de células ósseas;
- A combinação de PDGF e IGF-I promoveu a maior taxa de formação de matriz óssea de todos os fatores de crescimento até então avaliados;
- As duas substâncias interagiram sinergisticamente para promover significativa formação de colágeno e cicatrização de feridas de tecido mole.

Resultados similares aos achados de LYNCH et al.^{105,106} e RUTHERFORD et al.¹⁷⁰ foram apresentados por GIANNOBILE, FINKELMAN & LYNCH⁶² em 1994, quando utilizaram a combinação de PDGF e IGF-I para tratamento de defeitos periodontais naturais de cães, comparando-os ao tratamento de defeitos cirurgicamente criados em macacos. Os resultados apresentados demonstraram que os dois modelos apresentaram resultados consistentes, justificando sua utilização como modelo de teste de possíveis terapias periodontais.

DENNISON et al.⁴⁴ em 1994 avaliaram os efeitos da aplicação de 10 ng/ml de TGF- β 1 e/ou 20 ng/ml de PDGF em cultura de fibroblastos gengivais ou de ligamento periodontal humanos. Após 24 horas de observação, os fibroblastos de ligamento periodontal tratados com a combinação apresentaram a maior taxa proliferativa, mantendo-se por todo o período avaliado acompanhada por PDGF, TGF- β e controle. Após 48 e 72 horas, no entanto, a proliferação estimulada pelo TGF- β superou aquela estimulada pelo PDGF. Os fibroblastos gengivais foram significativamente estimulados pela combinação e pelo PDGF, porém a estimulação com TGF- β foi significativamente reduzida, assemelhando-se aos resultados obtidos com o controle após 48-72 horas. Esses dados sugeriram que o TGF- β poderia ser considerado como agente mitogênico específico para fibroblastos do ligamento periodontal sozinho ou combinado com PDGF. Associadamente ao efeito inibitório exercido sobre a proliferação de células epiteliais poderia ser então utilizado para promover a regeneração periodontal.

Vários estudos foram conduzidos por RUTHERFORD, CHARETTE & RUEGER¹⁶⁹ e descritos em 1994 comparando os efeitos da OP-1 (proteína morfogenética óssea, membro da superfamília do TGF- β) com o PDGF e o IGF-1, além da dexametasona

sintética. As amostras foram obtidas de biópsias gengivais e de ligamento periodontal obtido do terço médio de raízes de dentes extraídos por razões ortodônticas (não periodontais) e cultivadas em meio de cultura suplementada com ITS-Plus, contendo soro bovino fetal a 10% e antibiótico. As várias combinações de fatores de crescimento foram preparadas neste meio nas seguintes concentrações: (a) OP-1: 50, 100 e 200 ng/ml, (b) PDGF-BB: 100 ng/ml, (c) PDGF-BB + dexametasona: 100 ng/ml + 10^{-7} M, (d) PDGF/IGF-1: 100 ng/ml e (e) IGF-1: 100 ng/ml. O PDGF-BB e o IGF-1 apresentaram efeitos aditivos na mitogênese, podendo a dexametasona substituir o IGF-1 *in vitro*. Entretanto, quando utilizada isoladamente, a dexametasona não apresenta qualquer efeito. A OP-1 até a máxima concentração testada não é mitogênica para células do ligamento periodontal, mas promoveram aumento da atividade de fosfatase alcalina de maneira dose e tempo-dependentes, o que não foi observado para o PDGF sozinho ou em combinação com as demais substâncias. Dados similares foram obtidos para fibroblastos gengivais em cultura.

Na mesma série de trabalhos, CHO et al.³⁶ descreveram características gerais do PDGF, IGF-I e EGF que reforçaram o conceito geral de que a aplicação dos fatores de crescimento seria útil para a promoção da regeneração periodontal. Além disso, apresentaram aspectos relativos aos efeitos específicos dos fatores de crescimento sobre fibroblastos de ligamento periodontal que permitiriam a seleção de substâncias específicas para aplicação clínica dependendo da finalidade. Ressaltaram que, dentre os fatores de crescimento existentes, o PDGF-BB apresenta maior efetividade mitogênica, quimiotática e sintética para células do ligamento periodontal, com potencial de alcançar rápido repovoamento celular e, conseqüentemente, reparo mais acelerado, enquanto que o IGF-I seria efetivo na promoção de cementogênese e/ou osteogênese e o EGF no controle químico e na prevenção de anquilose.

Também LYNCH & GIANNOBILE¹⁰³ nesta série de relatos enfatizaram que os fatores de crescimento polipeptídicos possuiriam maior capacidade de controlar a mitogênese, migração e metabolismo celular do que qualquer outra classe de moléculas atualmente utilizadas na medicina ou odontologia. Estudos de cultura de células e órgãos *in vitro* e estudos de cicatrização da ferida *in vivo* em cães ou macacos indicaram que alguns fatores de crescimento poderiam ser potentes estimuladores da regeneração periodontal. Sua aplicação clínica seria dependente da produção em larga escala, purificação e formulação de sistemas de veiculação que controlasse e maximizasse seus efeitos.

Segundo GRAVES & COCHRAN¹⁶⁸, em 1994, fatores de crescimento polipeptídicos são modificadores biológicos naturais que regulam os eventos envolvidos no reparo tecidual, tais como síntese de DNA, quimiotaxia, diferenciação e síntese de matriz⁷³. Para que exerçam seu efeito biológico, devem ser sintetizados por um tipo celular, migrar ao receptor-alvo, interagir com o receptor ou proteína de ligação e ativar um mensageiro secundário ou efetores terminais. Seu modo de ação é a forma de interação dos mesmos com seus receptores. Usualmente, os fatores de crescimento agem localmente, ou seja, são sintetizados e atuam por células e tecidos existentes no mesmo microambiente. Neste caso, podem agir de maneira autócrina (ação sobre as próprias células que o sintetizaram), parácrina (produção por determinado tipo celular e ação sobre outro tipo celular existente no microambiente), intrácrina (ação sobre a própria célula produtora, sem que ocorra a liberação do fator de crescimento para o meio externo) ou justácrina (semelhante ao parácrino, com exceção de que, para exercer sua ação, deve haver contato entre a célula produtora e a célula alvo).

Considerando que os fatores que regulam a síntese de collagenase (MMP-1) e seu inibidor – TIMP-1 – são pobremente compreendidos, ALVARES et al.⁰³ em 1995 avaliaram os efeitos da adição de IL-1 β (10 e 100 ng/ml), PDGF-AA e -BB (4 e 20 ng/ml) e TGF- β 1 (1 e 10 ng/ml) na expressão de MMP-1 e TIMP-1 por fibroblastos de LP em cultura em passagens iniciais através de PCR. Os maiores efeitos sobre a síntese de RNA de MMP-1 foram observados após 24 horas pela IL-1 β que promoveu aumento de 5-9 vezes na sua expressão, acompanhado pelas isoformas de PDGF, que promoveram aumento de 2-3 vezes e do TGF- β que promoveu diminuição da síntese em 25-50%. Nenhum dos fatores avaliados estimulou a síntese de TIMP-1.

As respostas quimiotática e proliferativa de fatores de crescimento sobre fibroblastos gengivais e de LP em cultura voltaram a ser estudadas por NISHIMURA & TERRANOVA¹²⁴ em 1996 utilizando basicamente a metodologia descrita por TERRANOVA & WIKESJÖ¹⁸⁸ em 1988. Adicionalmente, fatores de crescimento secretados no meio de cultura foram isolados e utilizados no experimento. Os resultados demonstraram que os dois tipos respondem de maneira semelhante aos fatores de crescimento aplicados: PDGF, IGF-I, IGF-II, EGF e TGF- β . Entretanto, quando foi utilizada a proteína extraída do meio condicionado de células do LP houve apenas migração de células do LP, o mesmo ocorrendo

com fibroblastos gengivais quando foram empregadas substâncias obtidas do meio condicionado destas células. Opostamente, quando utilizaram meio condicionado de fibroblastos gengivais não houve migração direcionada de fibroblastos de LP e vice-versa, sugerindo que fatores de crescimento não identificados secretados pelos fibroblastos no meio de cultura seriam as únicas substâncias capazes de estimular especificamente a migração de fibroblastos, visto que a adição de anticorpos contra diferentes fatores de crescimento não alterou a resposta quimiotática dessas células.

Neste mesmo ano, a Academia Americana de Periodontia⁰⁴ (AAP) publicou uma revisão relativa à ação dos diferentes fatores de crescimento, visto a importância dos mesmos como uma iminente modalidade terapêutica para regeneração dos tecidos periodontais perdidos com o processo de doença.

Semelhantemente a outros trabalhos da equipe, em 1996 GIANNOBILE et al.⁶³ avaliaram os efeitos do PDGF-BB sozinho ou em combinação com o IGF-1 na regeneração periodontal em defeitos cirurgicamente criados em macacos. Após a criação das feridas, aplicaram 10 µg de cada fator de crescimento ou de sua combinação à superfície radicular. Os dados obtidos demonstraram que o IGF-1 sozinho na dose testada não alterou significativamente a regeneração periodontal, enquanto que o PDGF sozinho estimulou a nova inserção com tendência de ganho em outros parâmetros, como o preenchimento ósseo do defeito. A combinação de PDGF-BB e IGF-1 resultou em aumento significativo da nova inserção e no preenchimento ósseo do defeito.

O único trabalho em humanos existente até os dias atuais foi escrito por HOWELL et al.⁸² em 1997 com o objetivo de determinar a segurança da aplicação simples de PDGF-BB e IGF-1 para o tratamento de defeitos ósseos periodontais em 38 pacientes que apresentavam doença periodontal de moderada a severa (30-70% de perda óssea interproximal e defeitos de furca classe II em quadrante contralateral ao sítio tratado). Os grupos controle foram constituídos por tratamento cirúrgico ou tratamento cirúrgico associado ao posicionamento do gel carreador. Duas doses foram testadas: 50µg/ml e 150µg/ml de PDGF-BB e IGF-1. Realizaram então análises laboratoriais dentro de oito semanas após a aplicação (exames hematológico, sorológico, urinário e titulação de anticorpos contra os fatores de crescimento utilizados) e exames clínicos (inflamação gengival, altura óssea, profundidade de preenchimento do defeito, medidas de inserção à sondagem e de furca). Os resultados obtidos

demonstraram que o produto é seguro quando aplicado topicamente nas lesões e que uma dose única na concentração de 150 µl/ml de PDGF-BB e IGF-1 é efetiva, resultando em melhora significativa no crescimento ósseo e preenchimento do defeito.

GAMAL et al.⁵⁷, em 1998, avaliaram a proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal humano *in vitro* sobre fragmentos dentários periodontalmente comprometidos submetidos ao tratamento com tetraciclina previamente ou não à aplicação de PDGF-BB, IGF-1 ou combinação de ambos, posteriormente à raspagem e comparativamente ao grupo controle. Os resultados obtidos indicaram aumento na taxa de adesão de fibroblastos nos fragmentos tratados com PDGF-BB e com a combinação de PDGF-BB e IGF-1 foram maiores quando comparados ao controle e ao grupo com tetraciclina apenas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a combinação de fatores de crescimento e o PDGF-BB sozinho. Aparentemente, o tratamento com tetraciclina não melhorou significativamente a adesão de células. Entretanto, ocasionou alteração da morfologia celular de células achatadas para ovais ou arredondadas.

Sobre fibroblastos gengivais em cultura, o PDGF apresentou resposta proliferativa máxima na presença ou ausência de soro dependente da dose até 40 ng/ml, enquanto que, com soro inativado pelo calor, a resposta máxima observada foi na concentração de 20 ng/ml depois de 48 horas da adição dos fatores de crescimento ao meio de cultura. Sua resposta pareceu ser otimizada na presença do TGF segundo ANDERSON et al.⁰⁵, em 1998. A exposição simultânea aos dois fatores de crescimento favoreceu ainda mais a resposta comparativamente à exposição sequencial aos fatores.

Também em 1998, McCAULEY & SOMERMAN¹¹⁴ realizaram revista de literatura e resumiram os principais trabalhos *in vitro* e *in vivo* utilizando fatores de crescimento polipeptídicos para regeneração periodontal.

O estudo das interações entre diferentes fatores de crescimento no metabolismo ósseo seria importante, citando GIANNOBILE⁶¹ em 1999, por algumas razões dentre as quais destacaram:

- Vários fatores de crescimento foram encontrados na matriz óssea em altas concentrações, incluindo o IGF-1, TGF-β, FGFb e PDGF;
- As células ósseas liberaram vários tipos de fatores de crescimento;

- Durante o reparo ósseo, existiria a expressão temporária de vários genes de fatores de crescimento e seus produtos correspondentes.

GALETTI et al.⁵⁶ no ano passado propuseram um procedimento capaz de promover a diferenciação celular específica e proliferação com subsequente regeneração periodontal. Para tanto, testaram várias substâncias em fibroblastos de ligamento periodontal humano, incluindo colágeno tipo I, grânulos de coral e PDGF e TGF- β 1 sozinhos ou em combinação. A diferenciação das células foi avaliada morfolologicamente sob microscopia eletrônica de transmissão e por investigação da atividade de fosfatase alcalina. Dentre os fatores de crescimento utilizados, com base nos parâmetros avaliados.

2.2- BASES BIOLÓGICAS DA REGENERAÇÃO PERIODONTAL

MELCHER¹¹⁹ em 1976 primeiramente descreveu os fenômenos biológicos envolvidos no processo de regeneração periodontal, sugerindo que células que apresentassem a capacidade de neoformar não apenas tecido ósseo - conforme enfatizado anteriormente nos trabalhos que utilizavam técnicas de enxerto ósseo autógeno para tratamento dos defeitos ósseos periodontais - como também dos outros tecidos que compõem o periodonto de sustentação (ou seja, ligamento periodontal e cemento além do próprio tecido conjuntivo gengival) deveriam ser as primeiras a colonizar a superfície dentária, impedindo o reparo das lesões por um único tipo tecidual. Particularmente, ressaltou, células mesenquimais presentes no ligamento periodontal apresentariam esta capacidade.

Em 1980, KARRING; NYMAN; LINDHE⁸⁸, após a implantação de fragmentos radiculares obtidos de dentes expostos à bolsa periodontal em tecido ósseo de cães, demonstraram que não houve reinserção de fibras, mas a cicatrização se deu através de reparo, freqüentemente resultando em anquilose e reabsorção. Por outro lado, em locais onde o ligamento periodontal foi preservado houve reinserção de fibras. Esses resultados indicaram que, além da migração apical de células epiteliais e placa subgengival, outros fatores estariam envolvidos na regeneração periodontal.

Similarmente, NYMAN et al.¹²⁸ demonstraram que, quando fragmentos dentários obtidos de áreas expostas à bolsa periodontal induzida foram parcialmente implantados em tecido ósseo e parcialmente no tecido gengival de macacos e cães após a raspagem, observou-se cura da ferida por reparo. Quando remanescentes do ligamento periodontal foram preservados, observaram reinserção conjuntiva. Esses resultados indicaram que o tecido conjuntivo gengival não possuía a capacidade de fornecer condições que permitissem a formação de nova inserção conjuntiva.

Em 1982, BOWERS, SCHALLHORN & MELLONIG²⁴ apresentaram trabalho de revista de literatura descrevendo várias modalidades terapêuticas visando a regeneração periodontal e seus resultados clínicos e histológicos. Concluíram que era possível a obtenção de nova inserção em superfícies radiculares desnudas em decorrência da doença

periodontal, com formação de novo osso, cimento e ligamento periodontal com orientação funcional após o restabelecimento de contatos oclusais adequados.

No mesmo ano, NYMAN et al.¹²⁷ criaram defeito ósseo periodontal em macacos, removendo tecido ósseo alveolar em distância de 2 mm abaixo da crista óssea alveolar e interpondo um filtro de milipore sobre a região tratada antes da sutura do retalho. Os animais foram sacrificados 6 meses após a cirurgia e preparados para análise histológica. Os cortes histológicos demonstraram formação de novo cimento com inserção das fibras colágenas, embora este achado não fosse consistente em toda a região curetada da raiz. Na região mais coronal, observaram a formação de *adesão conjuntiva*, sem sinais de formação de cimento e de inserção conjuntiva.

ISIDOR et al.⁸⁶ ressaltaram a importância do crescimento coronal do ligamento periodontal na regeneração periodontal posicionando uma ligatura de elástico firmemente na base de defeitos periodontais cirurgicamente criados em macacos, enquanto que o grupo controle recebeu uma ligatura de elástico frouxamente posicionada sobre a superfície radicular em 1987. A análise histológica mostrou formação de nova inserção coronalmente à ligatura em 10/14 espécimes controle e em 1/18 espécime do grupo teste, indicando que o repovoamento de uma raiz desnuda por células do ligamento periodontal seria um pré-requisito para a regeneração.

Em 1987, TERRANOVA & WIKESJÖ¹⁸⁹ apresentaram ampla revista de literatura na qual afirmaram existir interação matriz extracelular-células específica, participando, conjuntamente com fatores de crescimento polipeptídico, na regeneração tecidual. Ressaltaram ainda os procedimentos clínicos utilizados para a regeneração periodontal, incluindo as propriedades benéficas do condicionamento radicular com ácido cítrico e da utilização de membranas para regeneração tecidual guiada.

Também EGELBERG⁴⁹ teceu considerações gerais à cerca dos procedimentos terapêuticos que visam a formação de novo osso, novo cimento e novo ligamento periodontal, baseado em trabalhos publicados em literatura, em 1987.

Novamente TERRANOVA, JENDRESEN & YOUNG¹⁹⁰ em 1989 apresentaram revista de literatura ressaltando aspectos comentados no trabalho de TERRANOVA & WIKESJÖ¹⁸⁸ (1987). Neste último, comentaram que o uso concorrente e

complementar de substitutos não biológicos, com integração biológica completa e aceitação do hospedeiro, estava se tornando uma alternativa iminente de tratamento dos tecidos perdidos com o processo de doença e examinaram as implicações das inovações biotecnológicas na ciência médica para a cicatrização, reparo e regeneração periodontal que, juntamente com a engenharia genética, poderia produzir mudanças significativas na qualidade de vida.

Embora o processo de cicatrização seja relativamente bem organizado, o tempo necessário para a realização das várias etapas seria dependente do tamanho e volume da lesão, viabilidade de elementos apropriados em áreas adjacentes à ferida e outros fatores. Basicamente, os estágios iniciais seguiriam as seguintes etapas em lesões incisionais e excisionais, comentadas por WIKESJÖ, NILVÉUS & SELVIG²⁰³ em 1992: inflamação, formação do tecido de granulação, formação de matriz e remodelação. Para o processamento destas etapas, descreveram eventos importantes correlacionados à adesão do coágulo, estabilização da ferida e condicionamento ácido da raiz, entre outros.

Seguindo o conceito de regeneração tecidual guiada, SCHÜPBACH et al.¹⁷² em 1993 avaliaram, em defeitos de furca em pré-molares de cães beagle o potencial regenerativo de membranas reabsorvíveis. Os espécimes foram avaliados através de microscopia de luz, eletrônica de transmissão e de varredura. Os resultados demonstraram que a regeneração ocorreu em porções radiculares onde restava cimento original após a raspagem. O reparo foi observado se a dentina periférica tivesse sido removida. Em regiões distantes da base do defeito, novas fibrilas colágenas, sintetizadas por fibroblastos e orientadas perpendicularmente à superfície radicular, se misturavam com várias terminações das bandas de fibras de Sharpey do cimento original. Se a dentina circumpulpar estivesse exposta, ocorria intermediação entre as novas fibrilas e as fibrilas da matriz de dentina. Em áreas próximas à base do defeito, o primeiro evento foi a formação de tecido cementóide pelos cementoblastos e subsequente formação de fibrilas intrínsecas orientadas paralelamente à superfície radicular. Posteriormente, a camada de cementoblastos se desintegrou e bandas de fibras extrínsecas ancoraram no novo cimento celular. Nestas áreas, houve união entre o novo cimento e os tecidos pré-existent na interface de contato entre as fibrilas, a despeito da ocorrência de nova inserção em dentina ou cimento.

A análise imunocitoquímica realizada por PRITLOVE-CARSON et al.¹⁵⁰ em 1994 em biópsia tecidual obtidas após a remoção de membrana ou de dentes em bloco de

pacientes submetidos a tratamento de lesões periodontais de moderada a severa através de regeneração tecidual guiada revelou a presença de epitélio em 7 dos 9 espécimes analisados (resposta positiva à adição de anticorpos mono e policlonais para pan-queratina 5, 18, 6, 10 e 14, ceratinas 19, 14, 13 e 4). Também obtiveram resposta positiva à marcação para vimentina e co-distribuição de colágeno I, III e IV em todas as amostras.

GOTTLOW⁶⁵ em 1994 apresentou diferentes abordagens de tratamento que visam a restituição do aparato de inserção, ou seja, cimento, ligamento e osso alveolar. Demonstrou, também com base em relatos de literatura, que o tecido ósseo que se desenvolvia em contato com a raiz resultava em anquilose e reabsorção, o tecido conjuntivo gengival causou reabsorção radicular quando se formou em contato direto com a raiz ou se alinhou paralelamente à superfície, sem inserção na mesma. Apenas o tecido de granulação originário do ligamento periodontal tinha a capacidade de formar nova inserção de tecido conjuntivo. A migração epitelial apical poderia ser evitada pela formação de novo tecido conjuntivo que promoveria o repovoamento da superfície radicular por células do ligamento periodontal.

A origem dos fibroblastos, sua atividade proliferativa e papel desempenhado nos estágios iniciais do reparo periodontal foram investigados por HERR et al.⁷⁸ em 1995 para compreender o processo de regeneração de lesões de furca em cães após a regeneração tecidual guiada. As novas células em divisão foram identificadas por imunolocalização de bromodeoxiuridina injetada 1 hora previamente ao sacrifício dos animais. Depois de 1-2 semanas da criação dos defeitos, as lesões foram ocupadas primeiramente pelo tecido de granulação. Sob estas condições, os fibroblastos do ligamento periodontal na porção coronal do epitélio juncional próximo à porção mais coronal do ligamento periodontal proliferaram ativamente, migraram ao longo da superfície radicular e formaram novo tecido conjuntivo. Fato semelhante ocorreu na vertente voltada para o tecido ósseo. A maioria das células marcadas se encontravam na área extravascular. Após 3 e 4 semanas, os defeitos estavam preenchidos com maior quantidade de novo tecido conjuntivo e osso. Os resultados obtidos indicaram que os fibroblastos envolvidos no reparo periodontal se originaram primariamente do osso alveolar e remanescentes do ligamento periodontal. A capacidade de proliferação, migração e formação de tecido conjuntivo pelas células do ligamento periodontal nos estágios iniciais do reparo pareceu exercer papel crucial na formação de ligamento periodontal e

cimento e, conseqüentemente, na regeneração periodontal sem desenvolvimento de reabsorção radicular e anquilose.

A participação das células de ligamento periodontal na regeneração de osso alveolar foi novamente evidenciada por ISAKA et al.⁸⁴ em 2001. Em estudo *in vitro*, avaliaram a expressão de atividade de fosfatase alcalina e acúmulo de adenosina monofosfato cíclica dependente do hormônio paratireoideano em células ósseas e de ligamento periodontal de cães. Em outro estudo, pré-molares extraídos de cães idosos foram transplantados para cavidades ósseas cirurgicamente criadas com defeitos ósseos vestibulares ou interproximais com (+PDL) ou sem (-PDL) ligamento periodontal. Os resultados demonstraram que tanto as células cultivadas de ligamento periodontal como as ósseas exibiram o fenótipo de osteoblastos. Nova inserção conjuntiva foi observada apenas no grupo com ligamento periodontal. No entanto, houve neoformação óssea em níveis bastante próximos da altura normal para ambos os grupos.

2.3- CONDICIONAMENTO ÁCIDO RADICULAR

Em 1973, REGISTER¹⁵³ avaliou se ocorria nova inserção, cementogênese e osteogênese induzida por raízes desmineralizadas *in vivo*. Nas raízes de 21 dentes de vários animais, a dentina foi cirurgicamente exposta. Utilizando o modelo de boca dividida, a dentina em metade dos dentes foi tratada com HCl durante 15 minutos enquanto que os dentes contralaterais receberam tratamento com solução de soro fisiológico. A análise histológica demonstrou que os dentes tratados com ácido mostraram reinserção de tecido conjuntivo à superfície radicular, com cementogênese e osteogênese aceleradas. Os espécimes controles não mostraram reinserção de tecido conjuntivo, cementogênese incompleta e pouca ou nenhuma osteogênese.

Estudos *in vitro* conduzidos por ALEO, DeRENZIS & FARBER⁰² em 1975 demonstraram que não houve adesão de fibroblastos a superfícies radiculares periodontalmente comprometidas, embora esta tivesse ocorrido em dentes não comprometidos. O tratamento com fenol das raízes afetadas e a remoção mecânica do cimento doente resultou em adesão celular. Estes achados sugeriram que a endotoxina aderida à superfície radicular periodontalmente comprometida afetou a adesão de fibroblastos.

Posteriormente, REGISTER & BURDICK¹⁵⁵ em 1975 avaliaram a capacidade de vários ácidos em promover a formação de nova inserção conjuntiva. Os ácidos testados foram: hidrocloreídrico, láctico, cítrico, fosfórico, tricloroacético e fórmico. Os melhores resultados foram obtidos com o uso de ácido cítrico, pH 1.0 por 2-3 minutos, produzindo reinserção do retalho com cementogênese.

Os mesmos autores em 1976 realizaram três experimentos cirúrgicos com avaliação histológica para estudar se ocorria reinserção gengival à dentina radicular desmineralizada *in situ* durante cirurgia a retalho em cães, usando ácido cítrico a pH 1.0 durante 2 minutos. Os resultados demonstraram a produção de pinos de cimento dentro dos túbulos dentinários alargados pela desmineralização, reinserção com cementogênese da gengiva inflamada às superfícies radiculares expostas a defeitos cirurgicamente induzidos por três meses, sucesso no reparo de defeitos de uma parede por reinserção e falha relativa no reparo

de bifurcações e defeitos ósseos periodontais por reinserção do retalho e reparo completo de osso alveolar da maior parte dos defeitos vestibulares após 1 ano¹⁵⁴.

STAHL¹⁸⁴, em 1977, foi um dos primeiros autores a relatar a possibilidade de tratamento de dentes periodontalmente comprometidos associando a remoção mecânica de placa dentobacteriana com o tratamento químico radicular, que apresentaria a capacidade de remover endotoxinas bacterianas aderidas à superfície radicular, citando como exemplo o fenol e o ácido clorídrico. Demonstraram, a seguir, em uma série de cortes histológicos de espécimes animais e humanos que, na maior parte das vezes, observava-se o reparo tecidual pela formação de epitélio juncional longo e formação de fibras colágenas com orientação paralela em relação à superfície dentária sem reformação de cimento acelular e reinserção de fibras, ao que denominou de *adesão conjuntiva*.

STAHL & FROUM¹⁸⁵ em 1977 utilizaram a aplicação tópica de solução de ácido cítrico no dente de dois pacientes com doença experimental severa. As raízes experimentais foram cirurgicamente expostas, raspadas e desmineralizadas. As áreas foram avaliadas 4 meses depois, quando mostraram formação de epitélio juncional longo.

CRIGGER et al.⁴³ em 1978 trataram defeitos cirurgicamente criados em cães com cirurgia a retalho, debridamento e, em metade dos dentes, tratamento com ácido cítrico. A cicatrização foi avaliada histologicamente 6 semanas pós-cirurgia. Todos os sítios controle mostraram adesão epitelial dentro dos defeitos de furca, enquanto que dos defeitos tratados com ácido cítrico, 55% demonstraram completa nova inserção e 35% formação incompleta, com orientação paralela ou perpendicular das células no novo cimento formado.

Em 1980, BOYKO, BRUNETTE & MELCHER²⁶ examinaram a adesão de fibroblastos de ligamento periodontal de porcos a superfícies radiculares obtidas do mesmo animal parcialmente desmineralizadas com EDTA 0.5M, HCl 0.6N e ácido cítrico pH 1.0 por 3 e 60 minutos. A adesão das células a várias superfícies desmineralizadas e não desmineralizadas foi determinada depois de 2 horas removendo as células com tripsina e contando-as em hemocítômetro. Os resultados mostraram mais células aderidas às superfícies desmineralizadas, sem diferenças entre os diferentes tipos de ácidos utilizados.

Numa tentativa de descrever o mecanismo pelo qual a desmineralização com ácido cítrico promove a nova inserção conjuntiva, RIRIE, CRIGGER & SELVIG¹⁶⁰ em 1980

descreveram a interface entre superfícies radiculares desnudas e o tecido conjuntivo utilizando microscopia eletrônica de transmissão. Foram criadas deiscências cirúrgicas e as superfícies radiculares expostas foram tratadas com ácido cítrico. Depois de 2 semanas, a adesão foi descrita como uma interdigitação das fibrilas expostas na dentina desmineralizada com as fibras do tecido conjuntivo gengival e formação de novo cimento após 42 dias.

BOGLE et al.²⁰ neste ano examinaram o potencial de adesão do tecido conjuntivo a defeitos de furca cirurgicamente induzidos e naturais de cães. Houve regeneração completa das furcas em 8% dos defeitos criados e 7% dos defeitos naturais, ocorrendo mais freqüentemente no interior da furca sem a formação de novo cimento. Houve formação de anquilose em defeitos naturais tratados com ácido cítrico.

Ainda neste ano, COLE et al.⁴² examinaram 10 sítios em 6 pacientes com profundidades de sondagem superior a 6 mm e evidência de cálculo subgengival. Realizaram demarcação com broca na extensão mais apical do cálculo para demarcar a área exposta à bolsa periodontal. As raízes foram vigorosamente raspadas e tratadas com ácido cítrico pH 1.0 por 5 minutos, os retalhos foram reposicionados e suturados. A análise histológica mostrou inibição da migração epitelial ao longo da superfície radicular, com formação de novo osso e nova inserção coronalmente à demarcação.

Trabalho semelhante foi descrito no mesmo ano por RENVERT & EGELBERG¹⁵⁶ que demonstraram maior ganho de inserção e redução da profundidade de sondagem em sítios tratados com condicionamento com ácido cítrico previamente à sutura do retalho.

SELVIG et al.¹⁷³ em 1981 também utilizaram análise em microscopia eletrônica de transmissão para estudar a cicatrização de raízes periodontalmente comprometidas após o tratamento com ácido cítrico e os resultados também demonstraram interdigitação das fibras colágenas da dentina com as fibras colágenas gengivais. Um aspecto relevante neste estudo e naquele descrito por RIRIE et al. foi que a adesão inicial se processou sem a formação de novo cimento.

Estudo conduzido por ALBAIR et al.⁰¹ em 1982 utilizando microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica de dentes humanos com doença periodontal avançada confirmaram o potencial da desmineralização ácida em favorecer a nova inserção

conjuntiva às superfícies radiculares. Foram utilizados 18 dentes periodontalmente afetados tratados cirurgicamente e vigorosamente raspados. As raízes de 9 destes foram tratadas com ácido. Os espécimes controle, 15 semanas após, não mostraram evidências de inserção conjuntiva. Por outro lado, em 6 dos 9 espécimes tratados com ácido cítrico, observou-se formação de nova inserção conjuntiva.

O papel do periodonto reduzido e de alterações da superfície radicular na cicatrização periodontal foram avaliadas por POLSON & CATON em 1982, através da indução de lesões periodontais em incisivo central superior de macacos, tendo como controle o incisivo contralateral. A capacidade regenerativa do periodonto reduzido foi avaliada transplantando o incisivo central saudável para o alvéolo periodontalmente comprometido e vice-versa em cortes histológicos realizados aos 40 dias de pós-operatório. A raiz saudável transplantada no periodonto comprometido revelou reinserção de tecido conjuntivo enquanto que, na raiz comprometida transplantada para periodonto saudável mostrou migração do epitélio ao longo da raiz apicalmente à crista óssea alveolar.

No mesmo ano, POLSON & PROYE¹⁴⁷ avaliaram a cura das feridas periodontais em raízes desnudas tratadas com ácido cítrico. Para tanto, 12 dentes foram extraídos e reimplantados após desnudação cirúrgica em macacos e condicionamento com ácido cítrico na superfície radicular mais coronal. Os espécimes foram analisados histologicamente após 1, 3, 7 e 21 dias. Os resultados sugeriram que o tratamento executado permitiu a formação de nova inserção conjuntiva dependente da formação de uma união de fibrina, sem migração apical de células epiteliais.

No mesmo ano, NALBANDIAN & COTE¹²³ realizaram comparações histológicas diretas da cicatrização em cães beagle com e sem condicionamento de ácido cítrico aplicado em defeitos de deiscência cirurgicamente criados. Os espécimes tratados mostraram superior cementogênese ao controle, aumento em espessura do cimento e tecido conjuntivo, com pouca separação artefactual entre o espécime e o tecido, sugerindo os efeitos benéficos do tratamento com ácido na superfície radicular.

Metodologia semelhante foi empregada por FERNYHOUGH & PAGE⁵¹ em 1983, que incubaram fibroblastos com superfícies parcialmente desmineralizadas ou não de dentes com e sem comprometimento periodontal durante 4 horas. Os resultados foram semelhantes aos anteriores para raízes afetadas ou não por doença periodontal.

Outras propriedades da tetraciclina diferentes da capacidade de desmineralização tornam-na atraente como um agente de condicionamento radicular. Investigações *in vitro* conduzidas em 1983 por BAKER et al.¹⁰ demonstraram a capacidade da tetraciclina de se ligar à dentina e ser subsequente liberada da superfície sob forma biologicamente ativa durante um período de tempo, propriedade referida como *substantividade*.

FRANK, FIORE-DONNO & CIMASONI⁵² neste ano ainda usaram microscopia eletrônica de transmissão para avaliar dentes com gengivite e bolsas falsas tratadas com ácido cítrico ou não conjuntamente com o procedimento cirúrgico. Houve ganho de inserção conjuntiva em 2 dos 3 dentes tratados com ácido, não se observando o mesmo para o grupo controle. Também não se observou migração apical do epitélio juncional nos grupos tratados e a inserção conjuntiva se processou com ou sem a neoformação de cimento. Quando não ocorreu cementogênese, a adesão à dentina se caracterizou por mineralização do colágeno dentário descalcificado que se misturou ao colágeno neoformado. Quando ocorreu, a adesão se caracterizou pela presença de bandas de fibras de Sharpey se inserindo no interior do cimento calcificado.

Para corrigir alguns defeitos de metodologia das técnicas acima descritas, LOWENBERG et al.¹⁰⁰ em 1984 utilizaram fibroblastos marcados com cromo radioativo e cultivados em pratos de 96 poços contendo, cada um, fragmento dentário de 200 µm de espessura. O número de células aderidas à superfície radicular de espécimes desmineralizados e não desmineralizados foi determinado após tripsinização e contagem em cintilador gama. Os resultados sugeriram que as células aderidas às superfícies desmineralizadas, além de existirem em maior número, são mais resistentes à digestão enzimática.

Em outro estudo avaliando o efeito de vários tratamentos da superfície radicular na adesão celular, COGEN et al.⁴¹ em 1984 demonstraram que a raspagem, a despeito do uso conjugado de desmineralização ácida, promoveu o crescimento de fibroblastos gengivais cultivados *in vivo*. Não houve aparentemente diferenças na taxa de crescimento e morfologia dos fibroblastos, levando à idéia de que a remoção da contaminação radicular pode ser tão importante quanto à exposição de matriz colágena na promoção de regeneração.

Utilizando cultura estabelecida de fibroblastos gengivais posicionadas sobre blocos de dentina e cimento desmineralizados com EDTA a 18% e blocos de dentina e cimento não desmineralizados, em 1984 PITARU et al.¹⁴¹ demonstraram que, após 24 e 72

horas, blocos de dentina desmineralizados foram mais eficientes na indução de migração e adesão celular e na manutenção de pontes celulares previamente estabelecidas que os demais grupos, o que poderia ser atribuído às propriedades químicas e morfológicas desta superfície. Por outro lado, o índice de inserção do cimento desmineralizado foi maior do que os demais, sugerindo que esta superfície foi mais eficiente, a longo-prazo, na manutenção das pontes celulares formadas e no estímulo de migração adicional de células. A exposição das células a endotoxinas bacterianas resultou na diminuição da formação e da manutenção das pontes celulares que haviam se formado inicialmente, sugerindo sua adsorção à superfície radicular e apresentando eficácia mesmo em pequenas quantidades.

Ainda neste ano, KARRING et al.⁹⁰ demonstraram a presença de novo tecido conjuntivo nas regiões previamente instrumentadas de raízes de macacos, enquanto a região localizada coronalmente à instrumentação sofreu processo de reabsorção. Entretanto, a aplicação de ácido cítrico a pH 1.0 por 3 minutos não resultou na formação de nova inserção.

GOTTLOW, NYMAN & KARRING⁶⁶, utilizando, em 1984, modelo de implantação do sistema em cães, examinaram o potencial regenerativo das superfícies radiculares comprometidas periodontalmente. Para tanto, as raízes foram raspadas, alisadas e desmineralizadas com ácido cítrico *in vivo*. As coroas foram separadas das raízes e implantadas em lojas ósseas criadas nas regiões desdentadas dos maxilares. Os dados histológicos demonstraram ausência de novo tecido conjuntivo nos dois espécimes, mas grande reabsorção radicular, provavelmente decorrente da ausência de células progenitoras do ligamento periodontal na região.

Ainda POLSON et al.¹⁴⁹, 1984. Avaliaram através de microscopia eletrônica de varredura os efeitos da raspagem apenas ou acompanhada por condicionamento com ácido cítrico em seis dentes extraídos de macacos cujas metades coronais foram raspadas para eliminar cimento e ligamento periodontal. As raízes apenas raspadas apresentaram superfície irregular correspondente à camada de “smear-layer”, enquanto que os dentes tratados com ácido exibiram túbulos dentinários abertos e zonas intertubulares com material fibrilar.

Em 1985, ISIDOR et al.⁸⁷ realizaram uma pesquisa para determinar se o tratamento com ácido cítrico promoveria a formação de nova inserção em raízes com o periodonto reduzido em macacos que tiveram defeitos periodontais induzidos em incisivos superiores e inferiores pelo posicionamento de ligadura, mantida até que 50% do suporte ósseo

estivesse perdido. Depois de 3 meses, foi realizada cirurgia e os dentes do grupo experimental receberam tratamento com ácido cítrico por 3 minutos. Os resultados histológicos mostraram a formação de novo cemento com fibras colágenas nele se inserindo apicalmente à região afetadas. Não foram encontradas diferenças entre os grupos tratados ou não com ácido.

Ainda neste ano, HANES, POLSON & LADENHEIM⁷⁴ avaliaram os efeitos do condicionamento com ácido cítrico em blocos dentinários obtidos de dentes humanos, revelando em análise histológica e histomorfométrica que, nos grupos tratados ocorreu adesão de fibras de tecido conjuntivo e inibição da migração apical do epitélio juncional.

Também BJORVATN; SKAUG & SELVIG¹⁶ examinaram a durabilidade da atividade antimicrobiana da tetraciclina. Para isso, impregnaram espécimes padronizados de esmalte e dentina em solução aquosa de tetraciclina HCl, oxitetraciclina HCl ou doxiciclina HCl, lavando em seguida com água e permanecendo estocada a seco por 200 dias. Outros fragmentos foram impregnados com solução de doxiciclina HCl e lavados com água por vários períodos até 35 dias, enquanto que outros ainda foram testados quanto à reproducibilidade, sem estocamento ou lavagens prolongadas. Após 24 horas de incubação em atmosfera contendo 10% CO₂, as amostras foram analisadas. Os resultados obtidos demonstraram manutenção da atividade anti-microbiana durante todo o experimento, que foi diminuída mas não inibida pela estocagem ou manutenção em líquido.

MILLER¹²⁰ ainda neste ano conseguiu índices altos de recobrimento radicular em defeitos amplos e largos empregando instrumentação mecânica e aplicação tópica de solução de ácido cítrico pH 1,0 durante 5 minutos, aplicado através de esfregaço com bolinha de algodão.

POLSON; LADENHEIM; HANES¹⁴⁷ em 1986 implantaram fragmentos radiculares preparados de áreas expostas à doença periodontal e tratados ou não com ácido cítrico verticalmente em dorso de ratos. Os espécimes foram avaliados 1, 3, 5 e 10 dias após a implantação. A análise dos grupos tratados e não tratados mostrou que dentes desmineralizados apresentaram maior número de células e fibras aderidas à superfície e inibição da migração apical de células epiteliais.

Em 1986, PETTERSON & AUKHILL¹³⁴ avaliaram os efeitos do tratamento de raízes com ácido cítrico na presença de células progenitoras do ligamento periodontal

repovoando a superfície radicular, utilizando o conceito de regeneração tecidual guiada para tratamento de defeitos de fenestração criados na vestibular de pré-molares mandibulares de cães beagle. A análise histológica, realizada 3 meses após a cirurgia, revelou que a extensão de novo tecido conjuntivo variou nos dois grupos, com maior porcentagem de anquiose e reabsorção e menor quantidade de fibras inseridas em novo cimento no grupo tratado com ácido.

A seguir, POLSON & FREDERICK¹⁴⁴ detalharam algumas observações preliminares com relação à morfologia e comportamento celular durante as fases iniciais de adesão *in vivo* às superfícies desmineralizadas. Para tanto, fragmentos retangulares de espécimes dentinários preparados de áreas recobertas com cálculo (dentina externa e dentina pulpar) foram tratadas com ácido cítrico pH 1,0 durante 3 minutos e implantadas verticalmente na pele de ratos de tal forma que uma das extremidades não ficasse submersa. Os fragmentos foram removidos após 1 dia de implantação e a interface dentina-tecido conjuntivo examinada através de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram que várias células se aderiram à superfície dentinária, exibindo processos celulares que se estendiam por longas distâncias na superfície radicular e nos túbulos dentinários. Dando continuidade ao estudo, ainda no mesmo ano a equipe publicou novo artigo mostrando os resultados obtidos com esta metodologia após 1, 3, 5 e 10 dias de implantação. Os resultados demonstraram que não houve diferenças entre os parâmetros observados para espécimes derivados de dentina externa e de dentina pulpar. Relativamente ao tratamento mostraram que nas superfícies desmineralizadas havia maior número de células, inserção de fibras e inibição da migração apical de células epiteliais.

No mesmo ano, TERRANOVA et al.¹⁹³ trataram superfícies dentinárias com tetraciclina ácida, o que aumentou a adesão de fibroblastos gengivais cultivados à fibronectina. A fibronectina adsorvida estimulou a adesão e o crescimento de fibroblastos e suprimiu o crescimento das células epiteliais.

Em estudo de acompanhamento utilizando metodologia semelhante ao seu trabalho anterior, LOWENBERG et al.⁹⁹ em 1986 mostraram que a digestão do colágeno exposto com collagenase resultou em melhora adicional da adesão e orientação de fibroblastos. O mesmo foi observado se fosse realizada a obtenção derivada das raízes doentes com hidróclorido de guanidina a 4M. Entretanto, quando raízes não desmineralizadas foram

igualmente extraídas a adesão foi comparável e a orientação superior às raízes desmineralizadas, o que indicou que a desmineralização pode não ser necessária à atração de fibroblastos à superfície radicular para a promoção de eventos regenerativos, mas sim para descontaminação da raiz afetada.

WIKESJÖ et al.²⁰⁵ em 1986 quantificaram a concentração e avaliaram a capacidade antimicrobiana da tetraciclina liberada de superfícies radiculares tratadas com a substância. Demonstraram com isso que era liberada em concentrações que possuíam atividade anti-microbiana por período de 48 horas, podendo servir como um reservatório de liberação lenta de tetraciclina.

Os efeitos da desmineralização parcial de cimento na morfologia da interface entre fibroblastos gengivais e o dente foram avaliados *in vitro* por PITARU & MELCHER¹³⁹ em 1987. Foram obtidos pares de fragmentos dentários cortados transversalmente com espessura de 150 µm de pré-molares de porcos que foram parcialmente desmineralizados em solução de EDTA a 12% durante 30 minutos ou embebidos em PBS (controle). Ambos foram examinados 20 e 30 dias após a cultura de células gengivais sob microscopia de contraste de fase e eletrônica. Observaram que as células se orientaram aproximadamente perpendiculares em relação aos fragmentos dentários tratados com ácido, exibindo processos celulares que estavam aderidos e embebidos pelo colágeno exposto. Material fibrilar, possivelmente colágeno, estava presente entre as células e a matriz orgânica adjacente ao dente, algumas vezes parecendo contínua com as fibrilas colágenas da matriz orgânica. Em relação ao cimento não desmineralizado, as células pareciam se orientar paralelamente à sua superfície, aderidas ao mesmo e formando um recobrimento encapsulado, bem como o material fibrilar recentemente sintetizado, estando este separado da superfície dentária por uma camada de células contínua, sugerindo que a natureza da superfície dentária influenciou o padrão de orientação e morfologia das células que a repovoam.

TERRANOVA et al.¹⁹² ainda neste ano afirmaram que um evento biológico essencial estaria envolvido nos processos de regeneração: a migração celular direta ou quimiotaxia. Propuseram então dois diferentes testes para avaliação das propriedades proliferativas e quimiotáticas de diversos modificadores biológicos aplicados sobre a superfície dentinária. O 1º mediu a atividade quimiotática de substâncias aderidas à dentina onde as células deveriam se mover através de um filtro (Nuclepore) em direção ao fator quimiotático.

O 2º avaliou a capacidade de modificadores de resposta biológica aderidos à dentina em estimular a movimentação direcionada e proliferação das células sobre a superfície dentinária. Os resultados obtidos demonstraram que as células de ligamento periodontal migraram em direção à fibronectina e fator de crescimento de células endoteliais (ECGF). Este movimento foi favorecido pelo pré-tratamento dos blocos de dentina com tetraciclina e a proliferação deste tipo celular foi maior quando a dentina foi tratada com fibronectina e ECGF. As células epiteliais gengivais apresentaram resposta proliferativa e migratória mais pronunciada com a adição de laminina.

A ação desmineralizante da tetraciclina foi avaliada em cães beagle por CLAFFEY et al.³⁸ também em 1987. Após a criação cirúrgica de defeitos periodontais, as superfícies radiculares foram expostas à cavidade bucal durante 3 meses sem controle de placa. Após este período nova cirurgia foi realizada e as raízes foram tratadas com solução de tetraciclina HCl a 1%. Depois de 6 meses de acompanhamento, a análise histológica dos espécimes mostrou adesão de tecido conjuntivo à raiz na maior parte deles, reabsorção em alguns e maior ganho de inserção do que o obtido com ácido cítrico em estudo conduzido por RIRIE, CRIGGER & SELVIG em 1980.

CAFFESSE et al.²⁸ em 1988 estudaram o uso do ácido cítrico como agente desmineralizador seguido da aplicação de fibronectina. Estudo em macacos usou exposição cirúrgica das superfícies radiculares que foram subseqüentemente tratadas com aplicação tópica de fibronectina. Para contagem das células em proliferação, administraram timidina tritiada 1 hora antes do sacrifício. Os espécimes foram avaliados depois de 3, 7, 15, 21 e 28 dias. Comparativamente aos sítios controle tratados apenas com cirurgia, o grupo tratado com fibronectina mostrou aumento significativo da proliferação durante as 2 primeiras semanas, com aparente formação de coágulo organizado aos 3 dias, indicando cicatrização mais rápida.

LARJAVA et al.⁹⁶ examinaram em 1988 os efeitos do tratamento com ácido cítrico sobre a migração epitelial sobre as raízes. Neste estudo, "explante" de mucosa gengival bovina foi posicionada sobre raízes com e sem tratamento ácido posteriormente à raspagem. As raízes tratadas com ácido raramente mostraram migração epitelial entre o "explante" e a raiz, enquanto que as amostras raspadas o fizeram. Concluíram com isso que o tratamento com ácido poderia atrasar a migração epitelial e favorecer a adesão de tecido conjuntivo.

Ainda neste ano, FRANTZ & POLSON⁵³ implantaram fragmentos dentinários tratados com tetraciclina em ratos. A análise histológica e histométrica após 1 e 10 dias demonstraram resultados comparáveis aos estudos *in vitro*. A dentina tratada com tetraciclina favoreceu a migração e adesão celular comparativamente com os controles não desmineralizados. No entanto, este favorecimento não levou à adesão de fibras, o que ocorreu com o uso de ácido cítrico.

HANES, POLSON & FREDERICK⁷³ implantaram neste mesmo ano fragmentos dentários condicionados com ácido cítrico e não condicionados verticalmente na pele de ratos. Os resultados avaliados sob microscopia eletrônica demonstraram que a dentina não desmineralizada permanecia com uma camada de smear-layer e as células presentes apresentavam formato ovóide com poucos processos ou extensões para a dentina ou para as outras células. Os espécimes desmineralizados apresentavam-se usualmente recobertos por uma camada de estruturas fibrilares e arredondadas aderidas às superfícies. As células presentes nestas superfícies exibiram bipolaridade acentuada com adesões distintas na dentina e processos celulares geralmente se estendendo dentro dos túbulos dentinários abertos nas primeiras 24 horas avaliadas, completando as observações iniciais de POLSON & FREDERICK¹⁴⁴.

Essa metodologia foi novamente empregada por HANES & POLSON⁷² e POLSON & HANES¹⁴⁶ no ano seguinte para avaliação dos espécimes após 1, 3, 5, 7 e 10 dias da implantação dos fragmentos, obtendo resultados similares aos anteriormente descritos. Esses achados sugeriram que o tratamento com ácido cítrico apresentou capacidade de desmineralização e que esta facilitou a adesão de células e fibras à superfície de cimento.

Em amostras de cimento e dentina obtidas de dentes extraídos por razões ortodônticas e desmineralizadas com ácido cítrico durante 3 minutos, NISHIMURA et al.¹²⁵ observaram em 1989, migração aumentada de fibroblastos gengivais através de filtro de milipore de 8.0 µm posicionados em câmara de Boyden, indicando o favorecimento da reinserção de fibras à superfície radicular após o condicionamento ácido da raiz. A maior quimiotaxia foi observada pela camada mais superficial de cimento e a menor pela dentina raspada sem condicionamento ácido. A desmineralização do cimento mais profundo aumentou o efeito quimiotático exercido pelo mesmo. Entretanto, não foi realizada a

desmineralização do grupo de cimento superficial para evidenciar se ocorreria ou não um favorecimento da resposta quimiotática após o condicionamento ácido radicular.

FARDAL & LOWENBERG⁵⁰ em 1990 avaliaram a migração, adesão e orientação de fibroblastos em relação a dentes humanos *in vitro*. Fibroblastos gengivais humanos foram cultivados com fragmentos dentários doentes ou não tratados através de: (a) raspagem, (b) raspagem e ácido cítrico ou (c) raspagem, ácido cítrico e collagenase. O grupo controle não recebeu tratamento de qualquer espécie. Em outro experimento, foi utilizado EDTA para desmineralizar raízes comprometidas com ou sem tratamento com collagenase. O grau de adesão dos fibroblastos às raízes foi determinado pela medida da extensão da periferia do fragmento coberto com fibroblastos. A orientação dos fibroblastos foi descrita como a extensão do desenvolvimento de camadas de fibroblastos partindo dos fragmentos. Após 21 dias de análise, determinaram que a fase mais ativa de inserção dos fibroblastos ocorreu aos 10 dias. A raspagem melhorou a inserção em todos os casos. Quando acompanhada de desmineralização, a adesão e a orientação dos fibroblastos foi comparável àquelas obtidas com dentes não comprometidos. Apenas a desmineralização com ácido cítrico mostrou adesão de fibroblastos similar a raízes comprometidas raspadas, sugerindo que a exposição de matriz colágena poderia não ser uma razão única para a melhora superficial das raízes para a adesão de fibroblastos e que a desmineralização poderia tornar a superfície radicular mais biocompatível.

WIKESJÖ et al.²⁰⁴ em 1991 acompanharam o início da cicatrização na interface dentina - tecido conjuntivo em pequenos blocos de dentina humana cirurgicamente implantados em cavidades ósseas do rebordo alveolar de cães beagle. Os fragmentos radiculares foram posicionados nos rebordos ósseos após tratamento manual com curetas ou tratamento manual seguido de aplicação de ácido cítrico por 3 minutos ou ainda embebição em solução de heparina por 5 minutos. Os blocos foram removidos conjuntamente com os tecidos ósseo e conjuntivo adjacentes em intervalos de 10 minutos, 1 e 6 horas e 1, 3 e 7 dias após o fechamento da ferida. A adesão inicial à dentina sem tratamento foi mediada por um precipitado granular. Nos períodos de 1 e 6 horas, a matriz intercelular estava mais organizada com a formação de fibrina ao redor de agregados de células sanguíneas vermelhas e a superfície de dentina. Foram observados leucócitos polimorfonucleares através da interface. No dia 1, as células vermelhas do sangue estavam se degradando e os polimorfonucleares prevalentes na superfície de dentina. Aos 3 dias, observou-se maior maturação da fibrina e

presença de macrófagos próximos à superfície de dentina e aos fibroblastos. Aos 7 dias, os espécimes exibiram áreas de formação de tecido conjuntivo e degradação do coágulo de fibrina. Esses eventos foram similares para os espécimes condicionados com ácido cítrico ou heparina. Entretanto, após 1 dia houve comprometimento da adesão do coágulo nos espécimes tratados com heparina. Os resultados sugeriram que, na ausência de trauma mecânico, proliferação epitelial e infecção a dentina não precisaria ser tratada por modificadores biológicos que pudessem influenciar a adesão do coágulo à superfície de dentina.

Também em 1991, CODELLI, FRY & DAVIS⁴⁰ aplicaram ácido cítrico pH 1 passivamente ou através de esfregaço vigoroso por 3 ou 5 minutos de raízes humanas doentes após a raspagem *in vitro*. As superfícies controle foram tratadas de forma semelhante com solução salina. Os dentes foram fixados em glutaraldeído, desidratados, congelados e recobertos com ouro para visualização em microscopia eletrônica de varredura. Os resultados obtidos sugeriram que a exposição ótima de colágeno e desmineralização ocorreram com aplicação de ácido cítrico esfregando-o sobre a superfície dentária durante 3 minutos, enquanto que o mesmo procedimento por 5 minutos resultou em desmineralização em excesso, levando à desnaturação protéica.

Em fragmentos dentinários sem tratamento ou tratados com raspagem apenas ou seguida de imersão em solução saturada de ácido cítrico durante 5 minutos ou solução de 0.5 mg/ml de tetraciclina por 5 minutos avaliados histologicamente, HANES, O'BRIEN & GARNICK⁷¹ demonstraram em 1991 que a raspagem resultou na formação de uma camada de smear layer e que o tratamento com ácido cítrico removeu-a e expôs e alargou os túbulos dentinários, o mesmo não ocorrendo com consistência nos espécimes tratados com tetraciclina.

LABAHN et al.⁹⁴ em 1992 compararam o potencial de desmineralização do ácido cítrico e tetraciclina na superfície dentinária utilizando microscopia eletrônica de varredura. As duas soluções efetivamente removeram a camada de smear layer e promoveram desmineralização, com o ácido cítrico promovendo alterações mais significativas na superfície radicular em termos de morfologia e penetração.

Neste ano ainda, WEN et al.²⁰² avaliaram os efeitos *in vitro* de diferentes técnicas de aplicação do ácido cítrico para condicionamento de superfícies radiculares em 40

fragmentos de dentina obtidos de 10 dentes extraídos de pacientes com envolvimento periodontal. O ácido cítrico foi aplicado em 32 fragmentos durante 5 minutos através de imersão, aplicação com algodão embebido na solução, aplicação com algodão embebido na solução com esfregaço do mesmo sobre a superfície a ser condicionada ou aplicação com pincel com pelos de camelo. A análise em microscopia eletrônica de varredura revelou que os espécimes não tratados continham uma camada de smear-layer enquanto que os espécimes tratados com ácido cítrico por imersão, aplicação com algodão embebido e pincel mostraram orifícios em forma de túnel dos túbulos dentinários e zonas intertubulares com exposição de colágeno, enquanto que os espécimes tratados com esfregaço de algodão embebido em solução mostraram resultados variáveis e, portanto, inconsistentes.

Um modelo *in vitro* foi desenvolvido por ROMPEN et al.¹⁶⁵ para medir a adesão inicial de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal humano marcados com timidina- H^3 a pó de dentina posicionado na cultura. Os resultados demonstraram que ambos os tipos celulares apresentaram alta afinidade pela dentina não tratada, enquanto que seu revestimento com BSA inibiu completamente a adesão celular. O condicionamento superficial dos grânulos de dentina com ácido cítrico pH 1.0 ou minociclina-HCl aumentaram a adesão inicial de células do ligamento periodontal, mais significativamente para a minociclina-HCl do que para o ácido cítrico. Além disso, a adesão de células gengivais à dentina foi significativamente aumentada pela pré-incubação das células com 50 µg/ml de minociclina, ocorrendo ainda indicação de aumento pela presença da substância no meio de adesão, com eficácia máxima de 110 µg/ml.

LOWENGUTH & BLIEDEN¹⁰¹ em 1993, em artigo de revisão, teceram algumas considerações quanto às alterações de superfície radicular que dificultariam a regeneração tecidual: perda de inserção de fibras colágenas, contaminação por bactérias ou endotoxinas, alterações na composição e densidade mineral e ausência de estímulo quimiotático necessário à regeneração. Descreveram a seguir revista de literatura identificando as bases biológicas que justificariam a desmineralização da superfície radicular como procedimento que visa a regeneração do periodonto.

Neste ano ainda PARASHIS & MITSIS¹³¹ avaliaram os efeitos clínicos do condicionamento radicular com tetraciclina associada à membrana ou apenas o posicionamento de membranas para tratamento de defeitos de furca de grau II. Não houve

diferenças estatisticamente nos parâmetros clínicos avaliados 6 meses após o procedimento entre os grupos.

Os efeitos *in vivo* da aplicação de ácido cítrico em dentes periodontalmente envolvidos foram investigados por CHAVES et al.³³ em 1993 utilizando microscopia eletrônica de varredura. Os dentes foram selecionados segundo critérios específicos e divididos em cinco grupos diferentes. No grupo controle, foram incluídos 10 dentes sem comprometimento periodontal, no grupo 2 foram incluídos 10 dentes periodontalmente comprometidos sem tratamento e nos grupos 3, 4 e 5 foram incluídos mais 10 dentes cada que receberam tratamentos com ácido cítrico apenas, raspagem apenas e raspagem e ácido cítrico, respectivamente. Os resultados demonstraram que a aplicação de ácido cítrico pH 1.0 durante 3 minutos após a raspagem promoveu desmineralização superficial, abertura dos túbulos dentinários e exposição de fibras colágenas, enquanto que a raspagem apenas deixou a superfície radicular com uma camada de "smear layer", ilhotas de cemento danificado, sem exposição de fibras dentinárias ou fibras colágenas.

Defeitos de fenestração cirurgicamente criados em cães foram usados para estudar a fonte de proliferação de fibroblastos e produção de matriz extra-celular durante a cicatrização, o arranjo e adesão de novas fibras colágenas sintetizadas e a cementogênese e osteogênese dos sítios em cicatrização. Para isso, WANG et al.²⁰⁰ em 1993 criaram defeitos de fenestração removendo osso alveolar, cemento, ligamento periodontal e dentina e, para tratamento dos mesmos, foi aplicado ácido cítrico, tetraciclina ou água esterilizada previamente à colocação de membranas reabsorvíveis em metade dos defeitos apenas. Os animais foram sacrificados após 1, 3, 7 e 21 dias e as análises histológicas em microscopia óptica revelaram que o ligamento periodontal e/ou o osso alveolar foram a principal fonte de proliferação e migração de fibroblastos e síntese de matriz extra-celular nos estágios iniciais de cicatrização enquanto que, após 21 dias, o ácido cítrico estimulou mais cementogênese do que o controle ou a tetraciclina. Além disso, enquanto que a tetraciclina influenciou a máxima deposição de osso alveolar, não foram encontradas diferenças no processo de cura entre os grupos com e sem o posicionamento das membranas.

LAFFERTY et al.⁹⁵, 1993 compararam através de microscopia eletrônica de varredura dentes extraídos por razões periodontais e tratados com tetraciclina HCl ou ácido cítrico durante 5 minutos. Os dentes tratados com os dois ácidos apresentaram diferenças

significantes com os dentes não tratados, exibindo túbulos dentinários expostos pela remoção da camada de “smear-layer”, livre de indutos orais e com denso arranjo de fibras, com características morfológicas comparáveis entre si.

Em 1994, TROMBELLI, SCABRIA & CALURA¹⁹⁴ avaliaram o tratamento de superfícies de cimento e dentina derivados de dentes humanos não afetados pela periodontite com tetraciclina ácida. Os resultados mostraram remoção da camada de “smear-layer” e exposição de substrato de colágeno fibrilar. Nos espécimes de cimento, a quantidade de exposição da matriz orgânica aparentemente estava mais relacionada à estrutura morfológica do cimento e à instrumentação mecânica da superfície radicular do que ao tempo ou concentração da aplicação da solução de tetraciclina. A exposição de matriz orgânica intertubular estava evidente apenas nos espécimes condicionados por 4 minutos.

A análise morfológica da interface entre fibroblastos derivados de ligamento periodontal e fragmentos dentinários ou de cimento obtidos de dentes humanos e tratados ou não com ácido cítrico realizada por HIGASHI et al.⁷⁹ em 1995 demonstrou que material elétron-denso cobria as superfícies não tratadas, com as células exibindo orientação paralela em relação ao substrato, enquanto que nos grupos tratados, sem diferenças estatisticamente significantes entre os mesmos, observaram orientação aproximadamente vestibular das células em relação aos espécimes e formação de fibras colágenas.

Em modelo de boca dividida para avaliar os efeitos cicatriciais após a aplicação de 100 mg/ml de tetraciclina durante quatro minutos e sistema de selamento fibrina-fibronectina em associação com cirurgia para recobrimento de raízes expostas através de regeneração tecidual guiada, TROMBELLI et al.¹⁹⁶ mostraram redução da recessão e ganho de inserção ligeiramente superior para os grupos tratados. Entretanto, quando utilizaram a tetraciclina houve redução significativa da profundidade de sondagem e aumento de mucosa ceratinizada.

Em experimento clínico controlado seguindo a mesma metodologia para avaliar os efeitos cicatriciais após a aplicação de tetraciclina e sistema de selamento fibrina-fibronectina em associação com cirurgia a retalho em 11 pacientes com doença periodontal moderada a severa, TROMBELLI et al.¹⁹⁵ em 1996 demonstraram que as duas abordagens (experimental e controle cirúrgico) resultaram em ganho de inserção clínica e redução significativa da profundidade de sondagem, indicando que não existiria nenhum benefício na

utilização de condicionamento com tetraciclina e aplicação do sistema fibrina-fibronectina nesta modalidade terapêutica.

SHAPIRA et al.¹⁷⁶ neste ano demonstraram que enquanto extratos de cimento saudável não apresentavam efeitos na secreção de monócitos, concentrações baixas de cimento de áreas doentes aumentavam os níveis de TNF- α e IL-1 β em 10 vezes de forma dose-dependente. O cimento doente continha 1.5 ng/mg de endotoxina, enquanto esta não foi detectada em cimento saudável. Entretanto, a neutralização desta por polimixina B reduziu parcialmente a resposta secretória de monócitos a 50-70%. Para simular os efeitos do condicionamento ácido, o cimento foi primeiramente agitado em solução de tetraciclina ou controle previamente a sua extração no meio e este tratamento com tetraciclina bloqueou a secreção de TNF- α pelos monócitos na concentração de 50 ng/ml.

BLOMLÖF¹⁹ comparou as superfícies de cimento após o condicionamento em pH neutro ou básico em dentes de macaco saudáveis e seres humanos comprometidos periodontalmente, no total de 16 dentes de macaco saudáveis e 16 dentes humanos comprometidos. Também foram feitos condicionamento superficial com ácido fosfórico, ácido cítrico e EDTA. Os resultados indicaram maior capacidade do EDTA em expor as fibras colágenas do que os demais. Os resultados relativos ao EDTA foram também descritos em 1996 por BLOMLÖF et al.¹⁸ em outro artigo quando afirmou que o tratamento com EDTA produziu superfície mais propícia à colonização de células da membrana periodontal após a remoção da camada de “smear-layer” sem comprometer a vitalidade do periodonto.

MADISON & HOCKETT¹⁰⁸ em 1997 compararam através de microscopia eletrônica de varredura, os efeitos superficiais da aplicação tópica de tetraciclina sobre a superfície radicular instrumentada de dentes humanos. Para tanto, foram preparadas 82 amostras dentinárias obtidas de dentes condenados à extração por razões periodontais. Foram preparadas e aplicadas sobre as amostras tetraciclina HCl (pH 1.6), doxiciclina (pH 2.2), minociclina (pH 3.8), sumicina (pH 4.4) e solução salina (pH 5.1) durante 0.5, 1, 3, 5 e 10 minutos, além de avaliação aos 1, 4, 7 e 10 dias de exposição das amostras à fibra periodontal contendo tetraciclina. A solução mais efetiva na remoção da camada de smear-layer e descontaminação da superfície radicular foi a tetraciclina HCl, inclusive para o menor tempo avaliado. A fibra periodontal não alterou a camada de smear layer significativamente.

ROMPEN; GOFFINET & NUSGENS¹⁶⁴ em 1999 avaliaram se o tratamento químico de amostras dentinárias condicionadas por 3 minutos com solução aquosa de ácido cítrico a 3% (pH 1.85) ou minociclina HCl 2-5% poderia alterar o comportamento de células de ligamento periodontal em cultura. Foram realizados testes de proliferação, de adesão e de síntese de proteína total e colágeno e avaliação em microscopia de varredura e de transmissão. Os resultados demonstraram que o condicionamento químico da dentina favoreceu significativamente a cinética de adesão dos fibroblastos à dentina em intervalos de 1-24 horas. Quanto à proliferação celular, observaram taxa significativamente maior em intervalos de 0-48 horas em células aderidas ao plástico do que à dentina não tratada e também para os 2 tipos de tratamento em comparação à dentina não tratada e ao plástico. Já quanto à atividade de síntese, os 2 tratamentos pareceram favorecer sua atividade comparativamente à dentina não tratada, com vantagem para o ácido cítrico (aumento de 6 vezes) sobre a minociclina (aumento de 3 ½ vezes). Nas primeiras 2 horas não houve alteração morfológica das células aderidas sobre a dentina tratada e não tratada. Os dados obtidos com a microscopia eletrônica de transmissão deram suporte às observações anteriores, mostrando penetração dos processos celulares nos túbulos dentinários. As células se aderiram à superfície radicular, permitindo um íntimo contato nos espécimes de dentina não tratada e tratada com minociclina, enquanto que nos espécimes tratados com ácido cítrico as células estavam conectadas a uma camada fibrosa, presumidamente composta de matriz orgânica de dentina exposta pela desmineralização. Os fibroblastos aderidos à dentina não tratada exibiram bom potencial proliferativo e atividade biossintética, com extensões lamelares e filopoidais penetrando dentro dos túbulos dentinários, o que talvez seja sugestivo de migração das células em direção a substâncias quimiotáticas. O condicionamento ácido parece aumentar e agilizar as propriedades acima mencionadas. As células aderidas à dentina condicionada exibiram taxa proliferação*ativa significativamente maior, bem como maior nível de síntese de colágeno e proteína total.

2.4- O LIGAMENTO PERIODONTAL

2.4.1- COMPOSIÇÃO E ASPECTO ESTRUTURAL^{13,15}

O ligamento periodontal está composto por fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, osteoclastos, células associadas com o sistema sensorial, endoteliais e epiteliais compreendidas pelos restos epiteliais de Malassez. Comparativamente com outros tecidos conjuntivos, é um tecido altamente celularizado, estimando-se que os fibroblastos ocupem cerca de 20% do incisivo de carneiros e de 43-55% do tecido conjuntivo de roedores.

Sua matriz extracelular está principalmente composta por fibras colágenas constituídas principalmente por colágeno tipo I e III, podendo também ser encontradas fibrilas colágenas compostas por colágeno tipo V, VI e XII.

Os fibroblastos do ligamento periodontal estão interconectados por numerosas junções de aderência e do tipo gap e orientados mais ou menos paralelamente às fibras colágenas em secções longitudinais, enquanto que em secções transversais podem apresentar aspecto estrelado. Contém núcleo evidente, com nucléolo único e poros nucleares bem definidos. Quando corados com prata coloidal, exibem uma ou duas regiões de proteínas ácidas associadas com regiões de organização nucleolar. Também se observa a presença de uma lâmina densa interna, característica de células do tecido conjuntivo. O núcleo tem o formato de disco achatado de aproximadamente 10 µm de diâmetro, podendo ocupar cerca de 30% do volume celular.

Os fibroblastos do ligamento periodontal apresentam quantidades significantes de organelas envolvidas com a síntese e degradação protéica, como retículo endoplasmático rugoso disperso pelo citoplasma, complexo de Golgi diferenciado e mitocôndrias bem distribuídas pelo citoplasma. Além disso, observa-se a presença de lisossomas na forma de grandes vesículas associadas à membrana, contendo matriz homogênea mais elétrôn-densa que circunda o citoplasma. Essas características são comuns a fibroblastos presentes em outros tecidos conjuntivos. Entretanto, os fibroblastos de ligamento periodontal apresentam algumas

características típicas, como, por exemplo, a presença de fibrilas colágenas dentro das vesículas associadas às membranas denominadas de “perfil de colágeno intracelular”.

Além dos fibroblastos, estão também presentes no ligamento periodontal os osteoblastos e os cementoblastos. Os cementoblastos, células responsáveis pela síntese de cimento, exceto pela localização próxima ao cimento, são indistinguíveis dos fibroblastos. Os osteoblastos, responsáveis pela produção de tecido ósseo, estão localizados próximos à superfície do osso alveolar e formam, quando ativos, uma camada de células cuboidais que apresentam citoplasma fortemente basofílico, com núcleo proeminente e polarizado, retículo endoplasmático rugoso proeminente e numerosas mitocôndrias e vesículas.

Citando McCULLOCH & BORDIN¹¹⁷ em 1991, os fibroblastos constituem-se no principal tipo celular do tecido conjuntivo mole do periodonto, realizando importantes funções no desenvolvimento, fisiologia e doença. Demonstraram a existência de células no ligamento normal e inflamado baseado em traços metabólicos. A distribuição tissular e as proporções relativas das subpopulações fibroblásticas teriam impacto significativo na regulação da função do tecido conjuntivo na saúde e na doença.

2.4.2- EVIDÊNCIAS DA EXISTÊNCIA DE DIFERENÇAS ENTRE FIBROBLASTOS GENGIVAIS E DERIVADOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL E SUBPOPULAÇÕES DIFERENTES DE FIBROBLASTOS NO LIGAMENTO PERIODONTAL

Vários trabalhos de literatura sugeriram a existência de múltiplas linhagens de fibroblastos e subpopulações destas células. A existência destas variações indicaram que os fibroblastos seriam capazes de se diferenciar, levando à necessidade de identificar marcadores específicos às diferentes populações de fibroblastos.

BORDIN et al.²¹ em 1984 isolaram cinco diferentes subpopulações de fibroblastos gengivais obtidos de biópsias da região interproximal de pacientes sem sinais de inflamação gengival utilizando meio de cultura essencial acrescido de diferentes substâncias, o que indicaria a possível existência de populações celulares heterogêneas no conjuntivo gengival. As células obtidas pelo crescimento em meio contendo soro humano fresco se caracterizaram por alta atividade sintética, produção de grandes quantidades de colágeno, especialmente tipo V e alta afinidade ao componente C1q do complemento. Segundo os autores, essas seriam propriedades características de células participantes dos processos de cura das feridas e regeneração tecidual.

A existência de células de diferentes naturezas no ligamento periodontal ficou novamente comprovada em 1985, quando RAGNARSSON, CARR & DANIEL conseguiram separar, através de tripsinização diferencial de células derivadas de ligamento periodontal em cultura, células do tipo fibroblastos de células epiteliais com marcação positiva para ceratina. A taxa de proliferação dos fibroblastos foi maior da que as células epiteliais após 48 horas.

Seriam características essenciais dos fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano, segundo McCULLOCH & BORDIN¹¹⁷, em 1991, a alta taxa de renovação ('turnover') de colágeno nos tecidos periodontais, mediado, ao menos parcialmente, pela degradação de colágeno. Existiriam algumas evidências indicativas da existência de subpopulações de fibroblastos capazes de realizar fagocitose de colágeno e outros componentes da matriz extracelular.

Utilizando-se do método de tripsinização seletiva, UITTO et al.¹⁹⁷ em 1992 identificaram o processo de adesão dos restos epiteliais de Malassez obtidos de ligamento periodontal de porcos em cultura a diferentes proteínas de matriz extracelular e a expressão de receptores para fibronectina e integrina através de técnicas de imunohistoquímica, hibridização *in situ* e cinemicrografia. Os resultados obtidos demonstraram que as células epiteliais se aderiram e distribuíram rapidamente sobre fibronectina, vitronectina e colágeno I e uma linhagem celular também se distribuiu sobre laminina, mas nenhuma das linhagens celulares se distribuiu sobre o Matrigel. Pela técnica de hibridização *in situ*, algumas células expressaram fortemente o gene para fibronectina e a análise imunocitoquímica localizou-a nas fibrilas extracelulares, grânulos intracelulares e nos traços deixados pelas células que migraram sobre o substrato. O peptídeo arg-gly-asp-ser inibiu a adesão das células a fibronectina, laminina, colágeno tipo I e vitronectina em 47%, 43%, 83% e 94% respectivamente, sugerindo que as interações célula-matriz eram mediadas pela família das integrinas.

Os fibroblastos seriam as células predominantes do ligamento periodontal e gengiva saudável, apresentando importante papel no desenvolvimento, função e regeneração do aparato de sustentação dos dentes, segundo McCULLOCH¹¹⁵ em 1995. Em tecidos periodontais normais, a taxa de renovação celular envolveria a geração de novas células por proliferação contrabalçada pela morte de células por apoptose. Consequentemente, os fibroblastos de ligamento periodontal compreenderiam um sistema de renovação celular em estado de quiescência. Células progenitoras de ligamento periodontal poderiam gerar múltiplas linhagens celulares mais diferenciadas e especializadas, incluindo grande número de fibroblastos e menor número de células osteogênicas ou cementogênicas. No entanto, o ligamento periodontal naturalmente bloqueia a osteogênese e mantém o espaço do ligamento periodontal. Populações de células progenitoras em proliferação estariam presentes em maior quantidade em regiões paravasculares e próximas aos espaços endosteais de onde migram para o corpo do ligamento periodontal. Ocorreu grande aumento na formação e diferenciação celular após a lesão, mas as células que repovoaram o ligamento periodontal na superfície radicular eram pós-mitóticas. As populações celulares variavam grandemente no ligamento periodontal e células com diferentes fenótipos poderiam repovoar a superfície radicular, dependendo dos fatores ambientais.

Em 1995, BERKOVITZ & SHORE¹⁵ comentaram que, além das células epiteliais, também estavam presentes no ligamento periodontal cementoblastos e osteoblastos. Os cementoblastos apresentaram-se como células secretoras indistinguíveis dos fibroblastos de ligamento periodontal, exceto pelo fato de sua localização próxima à superfície de cimento e, de certa forma, pela expressão de grande quantidade de grânulos de glicogênio, que diminuíram em células mais distantes da superfície de cimento, citando YAMASAKI et al. em 1986. De acordo com dados de literatura e estudos conduzidos pela própria equipe afirmaram que seu arranjo ultra-estrutural estaria diretamente correlacionado à atividade secretora. A membrana superficial dessas células apresentou receptores para hormônio do crescimento e, em menor extensão, para EGF. Os osteoblastos do ligamento periodontal seriam encontrados na superfície do osso alveolar, apresentando aspecto ultra-estrutural semelhante aos osteoblastos de diferentes regiões do organismo. Quando ativos, podiam apresentar aspecto cuboidal em multicamadas e citoplasma basofílico e também apresentaram retículo endoplasmático rugoso proeminente e grande número de mitocôndrias e vesículas. Entretanto, diferentemente dos fibroblastos, o complexo de Golgi era maior e mais localizado. As prováveis células precursoras ósseas se localizariam na proximidade dos capilares sanguíneos, apresentando citoplasma reduzido e poucas organelas e migrariam para o interior do ligamento periodontal para diferenciação e função.

Como forma de diferenciação entre os diferentes subtipos de fibroblastos, McCULLOCH¹¹⁷ em 1995 e BEERTSEN, McCULLOCH & SODEK¹³ em 1997 sugeriram a utilização de avaliação de aspectos morfológicos específicos, comportamento migratório, receptores de superfície (EGF, IL-1 e C1_q), expressão de proteínas de membrana (fosfatase alcalina), secreção de proteínas (colágeno XII), formação de nódulos minerais *in vitro* e proteínas de citoesqueleto (actina α de músculo liso). Nenhum desses marcadores isoladamente seria específico para células do ligamento periodontal, mas quando usados em conjunto seriam indicativos de importantes atributos funcionais importantes à regeneração periodontal. Como exemplo, citaram que a expressão de fosfatase alcalina seria necessária à cementogênese, conforme comentado por GARANT⁵⁸ em 1976 e GARANT & CHO⁵⁹ em 1979.

2.4.3- ORIGEM E FUNÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS PROGENITORAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL

A migração e divisão das populações celulares progenitoras do ligamento periodontal após a criação de defeitos periodontais foi avaliada em 5 experimentos envolvendo técnicas de autorradiografia, contagem dos grânulos de prata e irradiação de animais por GOULD, MELCHER & BRUNETTE⁶⁷ em 1980. A presença de células marcadas com timidina- H_3 foi observada predominantemente nas células paravasculares localizadas dentro de 200 μm da margem do ligamento periodontal de ratos cirurgicamente comprometido. Algumas células marcadas se moveram para longe dos vasos sanguíneos entre 30 e 72 horas depois da criação da ferida, podendo novamente entrar em divisão. Os fibroblastos marcados migraram dentro do ligamento periodontal necrótico entre 72 e 120 horas após a criação da ferida e novamente se dividiram. Finalmente, houve a existência de uma população de células progenitoras paravasculares localizadas dentro de 5 μm dos vasos sanguíneos cujos números permaneceram estáveis durante a cura da ferida periodontal. Essas células progenitoras provavelmente atuaram como fonte de novas células para a cicatrização do ligamento periodontal. Com isso, puderam determinar que a maior parte das células que ocupam a área da ferida cirúrgica tem origem paravascular.

A origem dos fibroblastos envolvidos no reparo periodontal, sua atividade proliferativa e migração nos estágios iniciais de cicatrização foram avaliadas usando técnicas regenerativas em defeitos periodontais cirurgicamente criados em pré-molares de macaco. Em 1988, AUKHIL & IGHAULT⁰⁹ demonstraram em autorradiografias após a injeção intravenosa de timidina tritiada 1 hora antes do sacrifício dos animais que a marcação ocorria em incrementos de 200 μm no ligamento periodontal para os grupos com e sem membrana, mais intensamente nos primeiros 200 μm e diminuindo gradativamente até praticamente desaparecer em distâncias de 600 μm , sugerindo que uma pequena porção do ligamento atuaria na regeneração periodontal.

Dentro do contexto das origens celulares, o epitélio odontogênico e o epitélio oral formariam as origens do epitélio juncional durante o desenvolvimento e durante o processo de cura das feridas respectivamente, citando PITARU, McCULLOCH & NARAYANAN¹⁴⁰ em 1994. Opostamente, o mesênquima odontogênico e não-odontogênico continha progenitores para fibroblastos gengivais nos tecidos em desenvolvimento enquanto

que, nos tecidos feridos, os fibroblastos gengivais seriam derivados do tecido conjuntivo e compreenderiam uma população heterogênea de células com diferentes propriedades e funções. Durante o desenvolvimento embrionário, as células do ligamento periodontal se originariam das células progenitoras do folículo dentário e, durante a cura, de células ancestrais no ligamento periodontal e tecido ósseo. A diferenciação celular no periodonto em desenvolvimento pareceu ser governada em parte por interações epitélio-mesenquimais que emitem sinais específicos os quais regulam populações celulares seletivas no tempo e espaço. Por outro lado, durante o processo de cura e regeneração, a diferenciação seria regulada por um vasto arranjo de moléculas de informação da matriz extra-celular e por citocinas que induzem respostas seletivas e não seletivas nas diferentes linhagens celulares e seus precursores. Ainda além, vários sistemas de sinalização seriam irreversivelmente perdidos quando o desenvolvimento estivesse completado. Assim, os tecidos embrionários e em cicatrização exibiriam diferenças fundamentais que, quando identificadas, poderiam levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas à regeneração periodontal.

Também em 1995 BERKOVITZ & SHORE¹³ afirmaram que os osteoblastos do ligamento periodontal seriam encontrados na superfície do osso alveolar, apresentando aspecto ultra-estrutural semelhante aos osteoblastos de diferentes regiões do organismo.

Ainda neste ano, para localizar as células em divisão, CHO; LIN; GENCO³⁵ injetaram bromodeoxiuridina 1 hora previamente ao sacrifício dos animais e 1, 2 e 3 semanas após a criação dos defeitos cirúrgicos. Nos estágios iniciais (1-2 semanas), os defeitos de furca foram preenchidos com tecido de granulação contendo células de infiltrado inflamatório e vasos sangüíneos, com a presença de uma fina camada de tecido conjuntivo denso nas superfícies voltadas para o cimento e para o osso. O tecido conjuntivo voltado para a superfície radicular parece ser uma extensão coronal do ligamento periodontal, no qual a celularidade e densidade de fibrilas colágenas gradualmente decresciam em direção coronal. As células marcadas encontravam-se principalmente no ligamento periodontal, no tecido conjuntivo neoformado e adjacente ao tecido ósseo. No ligamento, essas células concentravam-se mais coronalmente, a 400µm apicalmente à crista óssea alveolar. Após 2-3 semanas, houve diminuição da área inflamada e aumento da área de tecido conjuntivo neoformado. A marcação se concentrava especialmente na zona de transição, com numerosas fibrilas colágenas partindo da região neoformada em direção à área inflamada, indicando

atividade proliferativa do ligamento periodontal. Esses dados sugerem que as células progenitoras se originam do ligamento periodontal e tecido ósseo como resultado da proliferação, possivelmente em resposta a mitógenos existentes no coágulo, soro e/ou células inflamatórias presentes na região.

2.4.4- ASPECTO DAS CÉLULAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL NA CULTURA TECIDUAL

Os estudos de ligamento periodontal em cultura têm sido realizados, segundo BERKOVITZ & SHORE¹³ em 1995, para avaliar as propriedades celulares não identificadas adequadamente em estudos *in vivo*, quais substâncias biologicamente ativas podem ser secretadas pelas células em cultura e como as células reagem à adição de moléculas biologicamente ativas.

WASI et al.²⁰¹ em 1984 mostraram através de técnica de imunofluorescência que a osteonectina estava distribuída através da matriz extra-celular de ligamento periodontal de porcos em cultura em região perinuclear. A biossíntese de osteonectina pelos fibroblastos de ligamento periodontal foram estudadas através de marcação com metionina S35 e imunoprecipitação e a osteonectina marcada representou aproximadamente 0.5% do total de proteínas secretadas.

Ainda neste ano, RAGNARSSON, CARR & DANIEL¹⁵¹ propuseram uma metodologia para isolamento e crescimento de células de ligamento periodontal humano *in vitro*. Basicamente, a técnica consistiu em coletar pré-molares extraídos por razões ortodônticas, lavá-los em solução salina basal, remover o tecido gengival e submergir as coroas em hipoclorito de sódio durante 2 minutos. Cada dente foi posicionado em tubo para centrifuga contendo 5 ml de tripsina a 0.125% e colagenase a 0.1% e incubados durante 1 hora. A seguir, o dente foi removido e o tubo centrifugado por 2 minutos. A massa de células formada foi ressuspensa em meio essencial mínimo contendo soro bovino fetal a 10% e solução de antibiótico e incubada em ambiente contendo 95% ar e 5% de oxigênio a 37°C por 48 horas. Depois de atingida a confluência, as células epiteliais foram separadas dos fibroblastos através de tripsinização diferencial e caracterizadas usando técnica de imunofluorescência indireta.

Em 1986, BELLOWS et al.¹⁴ utilizaram técnica de separação celular enzimática para obter cinco subpopulações celulares diferentes a partir de cultura primária de células de calvária de ratos. Observou-se a presença de nódulos mineralizados sintetizados *in vitro* pelas populações celulares (propriedade característica de células osteoblásticas) nos grupos celulares que apresentavam este fenótipo.

Posteriormente, em 1987, MELCHER et al.¹¹⁸ utilizaram as populações II, III e IV deste estudo agrupadamente para avaliar se a presença de fragmentos dentários posicionados na cultura afetou o fenótipo exibido pelas células. Para o controle, foram utilizados fibroblastos de ligamento periodontal e gengival de ratos nas passagens 911. O preparo dos fragmentos foi feito de acordo com o proposto por PITARU et al.¹⁴² em 1984. As culturas foram examinadas sob microscopia de contraste de fase, os espécimes desmineralizados e não desmineralizados foram avaliados em microscopia de luz e, após fixação, em microscopia eletrônica. Os nódulos mineralizados - corados com alizarina vermelha sugerindo mineralização - descritos por BELLOWS¹⁴ em 1986 puderam ser observados em multicamadas 14 dias após o estabelecimento da cultura de células de calvária de ratos, mas não foram encontrados em células de ligamento periodontal ou de gengiva. A análise em microscopia de luz indicou que os fragmentos dentários estavam recobertos e cercados por células e estas depositaram matrizes extracelulares de natureza protéica após a adição dos fragmentos dentários. O teste de von Kossa certificou mineralização desta substância, cujo aspecto lembrava tecido ósseo ou cimento celular. Ao nível de microscopia eletrônica, ultra-estruturalmente este material pareceu apresentar aspectos de cimento celular ou acelular.

Contrariamente a outros relatos de literatura, CHOMETTE et al.³⁷ em 1987 afirmaram que as células derivadas de ligamento periodontal apresentam características comuns aos fibroblastos de forma geral (forma alongada, citoplasma abundante, sistema microfilamentar bem desenvolvido com forte marcação positiva para vimentina, entre outros) e ausência de atividade de fosfatase alcalina. Após a obtenção de cultura primária de fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano, as mesmas foram caracterizadas em microscopia de contraste de fase e óptica, quando apresentaram aspecto estrelado ou fusiforme, com 5-10% das células ovóides, em fase mitótica. Ao nível de microscopia de varredura, a maioria das células encontrava-se em fase mitótica, planas e anastomosadas umas

às outras. Algumas se apresentavam em prófase, ricas em microvilosidades e filópodos. O estudo histoenzimológico revelou positividade das enzimas oxidativas (succinodeidrogenase e lacticodeidrogenase), leucina aminopeptidase e atividade de fosfatase alcalina em raras células (5-6%) de uma única cultura. Já o estudo imunohistoquímico mostrou que 90% das células apresentaram marcação positiva para vimentina, ausência de ceratina, presença de colágeno I em 75-90% das células posicionadas em um halo perinuclear, colágeno III em 70-50% das células na passagem 3 e 45-40% na passagem 2. Sob microscopia eletrônica de transmissão, observaram a orientação perpendicular das células em relação a sua implantação.

A caracterização das células de ligamento periodontal após a 5ª passagem (linhagem contínua), conforme mostrado por ROSE et al.¹⁶⁶ em 1987 comparativamente a células em cultura primária, revelou a presença ocasional de células epiteliais após 4-5 semanas no mínimo. As células de linhagem contínua não se distinguiram morfológicamente das células em cultura primária em microscopia de contraste de fase. Ao nível de microscopia eletrônica, as culturas primárias mostraram quantidades variadas de microfilamentos com nódulos densos semiperiódicos e acúmulo de glicogênio nas células mais antigas, enquanto que as linhagens contínuas apresentaram várias quantidades de glicogênio nos diferentes tipos celulares e bandas de microfilamentos horizontais de 2.7 μ m e verticais de até 0.7 μ m de espessura.

Comparações *in vitro* da produção de colágeno, síntese de proteína total e nível de fosfatase alcalina secretadas por células de ligamento periodontal e de gengiva derivadas do mesmo paciente por SOMERMAN et al.¹⁸¹ em 1988, revelaram comportamentos metabólicos distintos entre as células, podendo indicar funções diferentes entre as mesmas para manutenção e regeneração do periodonto.

No ano seguinte, SOMERMAN et al.¹⁸⁰ avaliaram se a adição de diferentes substratos ao meio de cultura influenciaria ou não a adesão de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal 90 minutos após sua adição. Os resultados demonstraram que a fibronectina e a osteopontina favoreceram a adesão dos dois tipos celulares, embora esse aumento fosse mais pronunciado para fibroblastos gengivais, especialmente quando estimulados pela osteopontina. Extratos de cimento e osso também favoreceram a adesão de fibroblastos gengivais enquanto que extratos de dentina não apresentaram resultados favoráveis para nenhum dos dois espécimes.

Em 1989, PICHE, CARNES & GRAVES¹³⁶ realizaram cultura primária de células derivadas de ligamento periodontal humano obtido de 3º molares extraídos de pacientes saudáveis (duas linhagens obtidas de dois pacientes – PL4 e PL7), de tecido ósseo e de gengiva. Os diferentes tipos celulares em cultura foram avaliados quanto à resposta de AMP cíclico ao hormônio paratireoideano bovino, expressão de fosfatase alcalina e proliferação celular. Os resultados obtidos demonstraram que as duas linhagens de ligamento periodontal comportavam-se diferentemente, uma exercendo papéis característicos de fibroblastos (PL7) e outra de osteoblastos (PL4). As células derivadas de osso (BP0 e ligamento periodontal (PL4) dobraram a cada 1.6 dias, enquanto que as células gengivais (GF2) e de ligamento (PL7) dobram a cada três dias. Morfologicamente, não houve diferenças na subconfluência. Entretanto, na confluência, dois padrões foram observados. As células GF2 e PL7 formaram uma monocamada uniforme com orientação paralela de células fusiformes nos frascos de cultura, enquanto que as células BP1 e PL4 formaram rapidamente hiperconfluência, com colônias em multicamadas orientadas aleatoriamente. Houve aumento do AMP cíclico estimulado pelo hormônio paratireoideano em todas as células, porém significativamente apenas para as BP1 e PL4, assim como a secreção de fosfatase alcalina. A atividade desta substância após 48 horas de incubação com paratormônio diminuiu enquanto que, com vitamina D3 aumentou aproximadamente 70%. Houve ainda aumento da taxa de proliferação celular após incubação com quantidade moderada (6 ng/ml) de PDGF.

Para mais uma vez caracterizar as diferenças de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal em 1990 MARIOTTI & COCHRAN¹¹¹ realizaram cultura destes tipos celulares e observaram que os fibroblastos gengivais normalmente proliferam mais rapidamente do que os fibroblastos de ligamento periodontal, o mesmo ocorrendo em relação à síntese de proteína total, porém este dado não foi estatisticamente significativo. Também apresentaram maior conteúdo de proteínas não colágenas, ácido hialurônico e heparina e menor quantidade de condroitin sulfato A e C do que os fibroblastos de ligamento periodontal.

Em 1990, SOMERMAN et al.¹⁷⁹ demonstraram que células derivadas de ligamento periodontal humano em cultura secretaram uma proteína característica de células ósseas – a osteonectina, embora outras características únicas de células ósseas não pudessem ter sido observadas. As células de ligamento periodontal não apresentaram características de

resposta osteoblástica *in vitro*, respondendo resposta mediada pelo AMP cíclico ao isoproterenol, PGE₂ e vitamina D₃, mas não responderam semelhantemente à calcitonina ou ao PTH e não aumentaram a síntese de proteína. Por outro lado, foi encontrado aumento do nível de RNA para osteonectina e proteoglicana óssea I (biglicana).

No ano seguinte, estes autores demonstraram, através de análise imunohistoquímica de extratos de cimento bovino e humano, a presença de sialoproteína óssea-II neste tecido, além de outras frações com atividade de adesão diferentes desta e da fibronectina¹⁷⁸.

PENDER & McCULLOCH¹³³ em 1991 demonstraram que os fibroblastos de ligamento periodontal apresentavam mais actina *in vitro* do que fibroblastos gengivais.

ARCEO et al¹⁰⁶ no mesmo ano avaliaram a capacidade de fibroblastos de ligamento periodontal e de gengiva cultivados de produzir atividade de fosfatase alcalina e formar nódulos mineralizados *in vitro*, características essenciais de células osteoblásticas. As células de ligamento periodontal exibiram níveis mais elevados de fosfatase alcalina do que fibroblastos gengivais obtidos do mesmo paciente e na mesma passagem *in vitro*, conforme constatado em teste de cinética modificado. Além disso, exibiram a capacidade de sintetizar nódulos minerais conforme determinado pelo teste de von Kossa e em análise de microscopia eletrônica.

Segundo MATSUDA et al.¹¹² em 1992, as células derivadas de ligamento periodontal de ratos em cultura apresentaram, sob microscopia de contraste de fase, aspecto alongado ou fusiforme na subconfluência e alongados na confluência, com alto grau de polarização celular. O corpo celular grande continha complexo de Golgi bem desenvolvido, numerosas cisternas e vacúolos associados e alto número de ribossomas localizados na periferia das células. Observaram ainda forte marcação imunofluorescente ao redor do núcleo, possivelmente correlacionado à região do complexo de Golgi, enquanto as amostras controle não mostraram marcação, indicando a capacidade de síntese de osteonectina mantida pelos fibroblastos de ligamento periodontal em cultura. A organização estrutural dos fibroblastos de ligamento periodontal diferiu dos fibroblastos gengivais, especialmente em relação ao alto grau de polarização celular, indicando atividade de síntese de matriz extracelular acentuada, com alta taxa de produção de colágeno e polimerização de suas moléculas recém-formadas. Além disso,

os fibroblastos de ligamento periodontal mantiveram atividade osteoblástica e a capacidade de se envolverem na cementogênese.

Também houve expressão de fosfatase alcalina conforme demonstrado por GROENEVELD et al.⁷⁰ em 1993. Entretanto, nem todas as células em cultura apresentaram esta característica, parecendo ainda ocorrer uma diminuição de sua expressão conforme aumentou o número de passagens celulares. A presença da fosfatase alcalina indicaria a presença de células osteoblásticas e a formação de novo osso.

Ainda neste ano, HOU & YAEGER⁸¹ demonstraram que existem subpopulações celulares funcionalmente diferentes nos fibroblastos de ligamento periodontal e gengivais e que a síntese e expressão de moléculas da matriz extracelular podem ser essencialmente diferentes do ligamento periodontal, considerando que ambos os tipos celulares mostraram marcação positiva variando de fraca a forte intensidade para colágeno I e III enquanto que a fluorescência para colágeno I e III foi relativamente fraca nos espécimes de fibroblastos gengivais.

TAKANO-YAMAMOTO¹⁸⁶ demonstraram em 1994 a expressão de osteopontina por células derivadas de ligamento periodontal humano em cultura. Estes achados foram confirmados no ano seguinte por LEKIC et al. que identificaram a expressão transitória de osteopontina em cultura de células derivadas de ligamento periodontal de ratos.

MacNEIL et al.¹⁰⁷ em 1994 demonstraram que a sialoproteína óssea – proteína com propriedades de adesão – estava localizada no osso alveolar e no cimento em pontos correlacionados com a mineralização inicial destes tecidos. Além disso, análise do tipo “northern blot” do tecido folicular no 27º dia do desenvolvimento dentário indicou que o RNA mensageiro da sialoproteína foi expresso nas células do folículo dental em período de tempo coincidente com a inibição da cementogênese na superfície periférica da raiz.

NOHUTCU et al.¹²⁶ avaliaram a expressão de proteínas associadas a tecidos mineralizados em células cultivadas e recentemente extraídas de dentes anteriores inferiores de porcos através de testes de hibridização in situ dos seguintes componentes: colágeno tipo I, receptor e hormônio paratireoidiano, fosfatase alcalina, osteopontina, sialoproteína óssea e osteonectina. Demonstraram existir diferenças entre as células recém-extraídas e as células

cultivadas, que apresentaram redução significativa dos níveis de sialoproteína óssea e osteopontina.

Segundo BEERTSEN, McCULLOCH & SODEK¹³ neste ano as principais fibras do ligamento periodontal estariam compostas por colágeno. As fibras de Sharpey excederiam grandemente o comprimento do ligamento periodontal, penetrando dentro do tecido ósseo e cruzando linhas cementárias representativas da aposição óssea. Essas linhas demarcatórias seriam ricas em osteopontina e sialoproteína óssea, podendo ser considerados como marcadores aditivos representativos de células derivadas do ligamento periodontal.

LEKIC; SÖDEK; McCULLOCH⁹⁸ demonstraram que a osteopontina (OPN) e a sialoproteína óssea (BSP), expressas diferentemente ao longo do tempo na formação óssea e no remodelamento, poderiam servir como marcadores de ligamento periodontal em cultura.

De pacientes periodontalmente tratados através de regeneração tecidual guiada em 1998 e 1999 KURU et al.^{93,94} demonstraram expressão de fosfatase alcalina por células derivadas de ligamento periodontal e, ainda, que esse aumento era influenciado pela adição de dexametasona. Em 1999, retiraram células de ligamento periodontal existentes na membrana e no tecido regenerado circundando a membrana, além de células obtidas do ligamento periodontal e gengiva saudável dos pacientes. A atividade de fosfatase alcalina foi medida após 4-7 dias de cultura na ausência ou presença de dexametasona. Os resultados demonstraram que níveis basais de atividade de fosfatase alcalina foram expressos por todas as células e que a dexametasona aumentou o efeito da fosfatase alcalina nas células originárias da membrana, do tecido neoformado e do ligamento periodontal, mas não de células gengivais. Esse aumento foi significativamente superior nas células obtidas do tecido regenerado, sugerindo a existência de células osteoprogenitoras no tecido em processo de regeneração tecidual.

Para caracterizar se as células de ligamento periodontal em cultura mantinham as características fenotípicas das células *in vivo*, em 2001 LEKIC et al.⁹⁷ isolaram células de ligamento periodontal de ratos pelas técnicas do “explante”, de curetagem do alvéolo de dentes extraídos e por digestão enzimática de bloco tecidual composto pelo primeiro molar extraído conjuntamente com o ligamento periodontal e tecido ósseo e as compararam com as características fenotípicas exibidas pelas células *in vivo*. Para isso, realizaram testes imunohistoquímicos empregando anticorpos contra actina- α de músculo liso, osteopontina, fosfatase alcalina e sialoproteína óssea. Além disso, a diferenciação osteogênica das células de

ligamento periodontal cultivada foram avaliadas pela investigação da formação de nódulos mineralizados *in vitro* pelo teste de von Kossa, após a suplementação ou não (grupo controle) do meio de cultura com dexametasona por 21 dias. Os resultados demonstraram que as células *in vitro* preservaram as características fenotípicas das células *in vivo*, independente da técnica utilizada para estabelecimento da cultura primária.

PROPOSIÇÃO

3- PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho são responder a dois questionamentos principais:

- Os fatores de crescimento PDGF-BB, IGF-1 e TGF- β 1 isolados ou em combinação apresentam a capacidade de modificar a proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal humano (células FL₂) em cultura?
- Esses mesmos fatores de crescimento quando aplicados às superfícies radiculares previamente tratadas através de raspagem seguida ou não de condicionamento ácido são capazes de alterar a adesão das células FL₂?

MATERIAL E MÉTODOS

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- CULTIVO CELULAR

Para a realização deste trabalho, foi utilizada a linhagem celular FL₂ desenvolvida no laboratório de cultura de células da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (SANT'ANA et al.¹⁷¹, em preparação). Brevemente, a linhagem foi obtida através da técnica de cultivo primário utilizando “explantes” a partir de ligamento periodontal humano. Foram utilizados 3º molares impactados ou retidos extraídos de pacientes clinicamente saudáveis sem sinais clínicos de perda óssea ou de inserção periodontal. A técnica utilizada para o estabelecimento da cultura seguiu os princípios descritos por FRESHNEY⁵⁴ (2000) O projeto foi submetido à apreciação Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP sob número de protocolo 203/01, tendo sido aprovado.

Foram obtidos três 3º molares de três pacientes diferentes, clinicamente saudáveis, sem sinais clínicos ou radiográficos de perda óssea ou de inserção periodontal e extraídos com finalidade ortodôntica, encaminhados para tratamento junto à Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Uma vez extraídos, os dentes foram acondicionados em meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 200 U/ml de penicilina G potássica, 200 mg/ml de sulfato de estreptomicina e 20 µg/ml de anfotericina B em pH de 7.4 e transportados para laboratório de cultura de células da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Os dentes foram então colocados em placas de Petri contendo solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA), lavados e dissecados finamente com 2 lâminas de bisturi. Para obtenção de células do ligamento periodontal, seguindo o protocolo de SOMERMAN et al. (1987), raspou-se cuidadosamente o terço médio das raízes, evitando a contaminação da cultura com fibroblastos gengivais ou pulpares. Uma vez dissecados, os fragmentos teciduais foram posicionados em frascos de cultura de 25 cm² contendo DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e solução antibiótica-antimicótica* contendo 100 U/ml de penicilina G potássica, 100 mg/ml de sulfato de estreptomicina e 10 µg/ml de anfotericina B a 1% em pH 7.4 e incubados em estufa para cultura tecidual contendo atmosfera úmida composta de 95% de ar e 5% CO₂ à temperatura de 37°C. Os fragmentos menores foram

* Sigma Co., EUA

colocados em tubo de ensaio contendo 10 ml de PBSA e centrifugados durante 3 minutos. Após esta etapa, o PBSA foi aspirado, o precipitado de células resultante foi ressuscitado em 1 ml de DMEM suplementado com soro bovino fetal a 10% e antibiótico a 1% e transferido para frasco de cultura tecidual de 25 cm² mantido em estufa para cultura tecidual.

Após 1 semana de incubação, o meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias até que o crescimento atingisse uma monocamada subconfluente (70% da área cultivável recoberta por células), quando então foram separadas por métodos enzimáticos (solução de tripsina – Cro 25%, EDTA 1mM em PBSA) e cultivadas em frascos progressivamente maiores até que atingissem número de células suficiente para a realização dos experimentos. As células foram mantidas em estufa de CO₂ (95% ar e 5% CO₂) a 37°C.

A caracterização imunohistoquímica (anticorpos anti-vimentina, ceratina, osteonectina, sialoproteína óssea-2, fibronectina, actina de músculo liso, tenascina e colágeno III), histoquímica (método de von Kossa para detecção de nódulos mineralizados) e enzimática (teste de atividade de fosfatase alcalina) foi realizada confirmando a natureza dos fibroblastos de ligamento periodontal. Essa caracterização será apresentada em trabalho a ser publicado em literatura (SANT'ANA et al.¹⁷¹, 2001. Em preparação.)

ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS FL2 SOB MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A avaliação morfológica dos fibroblastos de ligamento periodontal foi realizada em microscopia eletrônica de transmissão utilizando-se cultura confluenta de células derivadas de ligamento periodontal humano (células FL2) na passagem 7, para comprovação do tipo celular isolado (Figura 1).

O meio de cultura foi removido do frasco e as células foram delicadamente lavadas com PBSA por 2 vezes. A seguir, os frascos foram preenchidos com 10 ml de fixador (solução em tampão de sódio 0.1 M pH 7.4a 2%) e mantidos em temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, com auxílio de um raspador de borracha, as células foram raspadas e desprendidas do fundo do frasco. O fixador com as células foi transferido para um tubo de centrífuga e centrifugados por 3 minutos a 300g. Removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado de células resultante em 5 ml de tampão fosfato de sódio acompanhado de centrifugação por 3 minutos mais duas vezes. Após a última centrifugação, o precipitado de

células foi ressuspensão em 1 ml de tampão fosfato, transferido para um tubo 'eppendorf' e centrifugado em minicentrífuga^{**}. Os frascos foram mantidos em geladeira até que se completasse o processamento técnico para avaliação em microscopia eletrônica de transmissão.

FIGURA 1- ELETROMICROGRAFIA DAS CÉLULAS FL2

EM (A) OBSERVAMOS AS CÉLULAS FL2 QUE FORAM FIXADAS NOS FRASCOS DE CULTIVO E POSTERIORMENTE REMOVIDAS ATRAVÉS DE RASPAGEM. OBSERVA-SE A MANUTENÇÃO DE MORFOLOGIA DAS CÉLULAS QUE SÃO FUSIFORMES, COM LONGOS PROLONGAMENTOS CITOPASMÁTICOS. OS NÚCLEOS SÃO OVÓIDES OU ALONGADOS COM NÚCLÉOLO EVIDENTE. EM (B) E (C) OBSERVA-SE EM DETALHES AS ORGANELAS CITOPASMÁTICAS QUE SÃO REPRESENTADAS PRINCIPALMENTE POR APARELHO DE GOLGI BEM DESENVOLVIDO (G, FIG.B), MITOCÔNDRIAS (M, FIG.B) E RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (RER, FIG.C).

^{**} Beckman MicrofugeTM

CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS FL2

FIGURA 2- CURVA DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS FL2 EM CULTURA (PASSAGEM 5)

OBS: As placas foram contadas três vezes, sendo este valor representativo da média das 3 contagens. Todas as placas cultivadas continham inicialmente 10^4 células.

4.2- CONTAGEM CELULAR

Para a obtenção do número de células presentes nos frascos ou placas de Petri utilizou-se a técnica de exclusão de células não vitais coradas por solução de azul de Tripan* seguindo as recomendações FRESHNEY⁵⁴ (2000), conforme descrito a seguir.

- (1) Após aspiração do meio de cultura antigo, lavagem com PBS e incubação com tripsina por 3 minutos, as células foram centrifugadas por 3 minutos. O extrato de células obtidos foi ressuspendido com 1 ml de PBS.
- (2) Para a contagem, foram utilizados 0.1 ml da suspensão celular que, por sua vez, foram adicionados a 0.1 ml de azul de Tripan e 0.8 ml de PBS.
- (3) Esta suspensão celular foi transferida para a câmara de Neubauer com auxílio de pipeta Pasteur.

* Sigma Co., EUA

- (4) As células presentes no quadrado central da câmara de Neubauer (dimensão de 1 mm², delimitado por 3 linhas paralelas entre si) foram contadas, excluindo-se aquelas que se apresentaram com os núcleos corados pelo azul de Tripán (células não viáveis).
- (5) A média das contagens foi calculada e a concentração da amostra foi então derivada como no exemplo: $c = n/v$, onde “c” representa a concentração celular, “n” o número de células contadas e “v” o volume. Para calcular-se o total de células, deve-se então considerar o número de células contadas, a diluição utilizada (por ser uma representação da amostra), o volume e o número total de quadrados contados. Assim, utiliza-se a seguinte fórmula como padrão de contagem celular:

$$c = \frac{nc \times \text{diluição} \times 10^4}{\text{número total de quadrados contados}}$$

As contagens foram repetidas para todos os grupos nos dias 3, 5 e 7. Os resultados obtidos foram utilizados para estabelecimento de uma curva de crescimento e comparados entre si, conforme exemplificado na figura 3.

FIGURA 3- CRONOGRAMA DA METODOLOGIA EMPREGADA PARA CONTAGEM CELULAR E ESTABELECIMENTO DE CURVA DE CRESCIMENTO PARA AS CÉLULAS FL₂.APÓS A ADIÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO

4.3- EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO PDGF-BB, IGF-1 E TGF- β 1 ISOLADOS OU COMBINADOS NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS FL2

4.3.1- PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

Os fatores de crescimento utilizados neste experimento foram adquiridos junto à Sigma (Saint Louis, Missouri, USA) e preparados segundo as recomendações do fabricante. Foram utilizados os seguintes fatores de crescimento:

- Fator de crescimento derivado de plaquetas – BB recombinante humano (“platelet derived growth factor” – BB ou PDGF-BB), na concentração de 50 ng/ml. Produto número **P3201**.
- Fator de crescimento do tipo insulina – 1 recombinante humano (“insulin-like growth factor” – 1 ou IGF-1) na concentração de 25 ng/ml. Produto número **I3769**
- Fator de crescimento transformador- β 1 recombinante humano (“transforming growth factor” - β ou TGF- β) na concentração de 10 ng/ml. Produto número **T7039**

4.3.1.1- PREPARO DO PDGF-BB

Cada frasco de PDGF-BB contém 10 μ g do produto em pó de coloração branca e 97% de pureza. O fabricante recomendou a reconstituição do frasco utilizando 1 ml de HCl 4 mM contendo albumina bovina ou humana a 0.1% imediatamente antes do uso de acordo com a aplicação planejada. O HCl foi preparado com BSA a 0.1% e esterilizado através de filtragem por filtro com poros de 0.22 μ m. Em seguida, o material foi diluído com 1 ml desta solução.

A seguir, foram feitas 10 alíquotas de 100 μ l cada uma na concentração de 1 μ g/ml, mantidas em nitrogênio líquido a -70°C , com exceção de 1 alíquota que foi mantida em geladeira ($2-8^{\circ}\text{C}$) para uso imediato, constituindo-se nas soluções de estoque do produto.

A solução de trabalho na concentração de 50 ng/ml foi conseguida diluindo-se a solução de estoque em 20 ml de DMEM suplementado com soro bovino fetal a 10% e solução de antibiótico a 1% dos quais foram removidos 100 μ l que foram substituídos pelos 100 μ l da solução de estoque.

4.3.1.2- PREPARO DO IGF-1

Para a reconstituição do IGF-1, também substância em pó de coloração branca com mais de 97% de pureza, o fabricante recomendou a utilização de ácido acético 0.1 M ou HCl 10 mM filtrados em filtro com poros de 0.2 μ m, atingindo concentração de 0.5-2.0 mg/ml. A solução de ácido clorídrico a 10 mM foi preparada e 100 μ l desta foram acrescentados ao frasco, obtendo-se a solução de estoque na concentração de 500 μ g/ml. Essa solução foi fracionada em alíquotas de 10 μ l cada uma e mantidas em nitrogênio líquido, com exceção de uma alíquota destinada à reconstituição para obtenção da solução de trabalho para uso imediato.

A solução de trabalho com concentração de 25 ng/ml foi obtida acrescentando-se à alíquota 990 μ l de DMEM suplementado com FBS a 10% e solução de antibiótico a 1%, atingindo-se a concentração de 5 μ g/ml. Para finalmente obter-se 20 ml do meio contendo IGF-1 a 25 ng/ml foi necessário acrescentar a esta solução 100 μ l da solução obtida após a remoção da mesma quantidade de meio de cultura do tubo de ensaio.

4.3.1.3 - PREPARO DO TGF- β 1

Para reconstituição do TGF- β 1, o fabricante recomendou a reconstituição do produto em pó liofilizado com pelo menos 97% de pureza com solução de HCl 4mM microfiltrado (poros de 0.22 μ m) contendo BSA (albumina do soro bovino) a 0.1% para uma concentração mínima de 1 μ g/ml. Como a quantidade do produto no frasco é de 2 μ g, para a obtenção da solução de estoque foram acrescentados 2 ml de ácido clorídrico (HCl) a 4 mM, atingindo-se a concentração de 1 μ g/ml. Posteriormente, a solução foi distribuída em 10 alíquotas de 200 μ l cada uma, também mantidas em nitrogênio líquido até o uso.

Para atingir a diluição de trabalho (10 ng/ml), acrescentou-se 900 μ l de meio à solução de estoque, conseguindo-se a concentração de 100 ng/ml de meio. Portanto, para atingir-se a concentração de trabalho, adicionou-se 200 μ l desta solução em 20 ml de meio de cultura diminuído de 200 μ l.

4.3.2- GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para avaliação da proliferação de células FL₂ induzidas pela aplicação dos fatores de crescimento, as amostras foram divididas nos seguintes grupos:

- *Grupo 1*- PDGF-BB – concentração de 50 ng/ml
- *Grupo C1*- Controle (sem adição de fatores de crescimento)
- *Grupo 2*- TGF-β1 – concentração de 10 ng/ml
- *Grupo 3*- IGF-1 – concentração de 25 ng/ml
- *Grupo 4*- PDGF-BB + IGF-1 + TGF-β - concentrações de 50, 25 e 10 ng/ml, respectivamente
- *Grupo C2* – Controle dos grupos 2, 3 e 4 (sem adição de fatores de crescimento)

4.3.3- EXPERIMENTO

Através de subculturas, obteve-se número de células suficientes para a realização dos experimentos, que foram divididos em duas etapas, cada uma com seu respectivo grupo controle. A análise da indução de proliferação celular do grupo 1 foi realizada concomitantemente com o grupo controle 1, enquanto que a análise proliferativa dos grupos 2-4 foram conduzidas ao mesmo tempo em que o grupo controle 2.

As células de ligamento periodontal humano em passagem 7 foram semeadas em 12 placas de Petri por grupo na concentração inicial de 1×10^3 células/placa contendo DMEM suplementado com FBS a 10% e solução antibiótica a 1% (grupos controle) acrescido dos respectivos fatores de crescimento (grupos 1-4). As amostras em triplicatas foram contadas de acordo com a técnica de exclusão das células não vitais coradas por solução de azul de Tripan (FRESHNEY⁵⁴, 2000) já descrita neste capítulo nos diferentes períodos de tempo estabelecidos, conforme exemplificado na figura 2. Cada placa foi contada 3 vezes para diminuir ao máximo o desvio-padrão da amostra.

4.3.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram avaliados através do teste ANOVA (Kruskal-Wallis) complementado pelos métodos de Tukey para comparação múltipla e pelo método de Dunnet para comparação contra um único grupo controle, além da análise descritiva dos dados obtidos em programa de análise de dados para computador (sistema PC) SigmaStat.

4.4- ANÁLISE DO EFEITO DOS FATORES DE CRESCIMENTO NA ADESÃO DE CÉLULAS FL2 SOBRE FRAGMENTOS RADICULARES TRATADOS POR RASPAGEM ACOMPANHADA OU NÃO DE CONDICIONAMENTO ÁCIDO

4.4.1- SELEÇÃO E OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Foram utilizados 30 fragmentos radiculares de dentes humanos extraídos de pacientes encaminhados para tratamento nas clínicas de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP que concordaram em participar do estudo após receberem informações a respeito do mesmo e terem assinado o "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" conforme determinado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP. Os critérios utilizados para inclusão na amostra foram:

- ✓ Profundidade de sondagem ≥ 6 mm nos sítios méso-vestibular (MV), centro da face vestibular (V), disto-vestibular (DV), méso-lingual (ML), centro da face lingual (L) e disto-lingual (DL), medida com auxílio de sonda periodontal milimetrada convencional por examinador único, como sendo a distância da margem gengival até o fundo da bolsa periodontal;
- ✓ Perda de inserção ≥ 6 mm nos sítios MV, V, DV, ML, L e DL, medida com auxílio de sonda periodontal milimetrada convencional por examinador único, estabelecida como sendo a distância da junção cimento esmalte até o fundo da bolsa periodontal;

- ✓ Presença ou ausência de sangramento à sondagem;
- ✓ Evidências radiográficas de perda óssea interproximal ≥ 5 mm, sendo determinada pela distância da porção mais apical da junção cimento-esmalte até a porção mais coronal da crista óssea alveolar.

Os critérios para exclusão da amostra foram:

- ✓ História de tratamento periodontal nos últimos 3 meses;
- ✓ Uso de antibióticos locais ou sistêmicos nos últimos 3 meses;
- ✓ Presença de alterações sistêmicas importantes;
- ✓ Gravidez;
- ✓ Presença de cárie radicular.

Previamente à extração, a medida da distância da margem gengival à junção cimento-esmalte foi feita com auxílio de sonda periodontal milimetrada, bem como a profundidade de sondagem e a presença de sangramento à sondagem, mobilidade e supuração. Os dados foram anotados em fichas apropriadas e armazenados (Anexo 1). Os dentes extraídos foram acondicionados em frascos individuais contendo soro fisiológico, raspados com curetas de Gracey esterilizadas, novamente acondicionados nos frascos e esterilizados em autoclave. Até o uso, os fragmentos dentários foram mantidos em refrigerador em frascos individuais contendo solução de soro fisiológico.

4.4.2- PREPARO DA AMOSTRA

As raízes foram raspadas com curetas de Gracey até a eliminação de placa, cálculo e restos teciduais e, posteriormente, separadas da coroa com ponta diamantada em alta rotação sob refrigeração constante na altura correspondente à posição da margem gengival com um corte horizontal (corte 1 – figura 4A). A seguir, as raízes foram seccionadas longitudinalmente através da câmara pulpar (corte 2 – figura 4B) e, sequencialmente, um novo corte horizontal separou a porção apical não exposta ao ambiente da bolsa da região contaminada a ser utilizada no experimento (corte 3 – figura 4C). Os blocos dentinários resultantes foram utilizados para avaliação dos efeitos dos diferentes fatores de crescimento na adesão das células FL₂ precedidos ou não de condicionamento com ácido cítrico associado à tetraciclina (figura 4D). Os espécimes

foram autoclavados previamente à colocação das células derivadas de ligamento periodontal humano.

FIGURA 4- PREPARO DOS ESPÉCIMES (FRAGMENTOS RADICULARES)

LEGENDA: O PRIMEIRO CORTE FOI FEITO SEPARANDO-SE A COROA DA RAIZ NA ALTURA DA MARGEM GENGIVAL (A). O SEGUNDO CORTE FOI FEITO ACOMPANHANDO O LONGO-EIXO DENTÁRIO (B) E O TERCEIRO CORTE SEPAROU A PORÇÃO APICAL DA RAIZ NÃO EXPOSTA AO AMBIENTE DA BOLSA PERIODONTAL (C), PERMITINDO A OBTENÇÃO DE FRAGMENTO RADICULAR DE FORMATO RETANGULAR (D).

4.5.2- GRUPOS EXPERIMENTAIS

As amostras foram divididas nos seguintes grupos experimentais:

- 1- Controle (raspagem)
- 2- Raspagem + PDGF-BB (concentração de 50 ng/ml, aplicado por 5 minutos)
- 3- Raspagem + IGF-1 (concentração de 25 ng/ml, aplicado por 5 minutos)
- 4- Raspagem + TGF- β (concentração de 10 ng/ml, aplicado por 5 minutos)
- 5- Raspagem + combinação de PDGF-BB + IGF-1 + TGF- β 1 (nas respectivas concentrações, aplicada por 5 minutos)
- 6- Raspagem + condicionamento ácido (3 minutos)
- 7- Raspagem + condicionamento ácido (3 minutos) + PDGF-BB (concentração de 50 ng/ml, aplicado por 5 minutos)
- 8- Raspagem + condicionamento ácido (3 minutos) + IGF-1 (concentração de 25 ng/ml, aplicado por 5 minutos)
- 9- Raspagem + condicionamento ácido (3 minutos) + TGF- β 1 (concentração de 10 ng/ml, aplicado por 5 minutos)
- 10- Raspagem + condicionamento ácido (3 minutos) + combinação (nas respectivas concentrações, aplicada por 5 minutos)

4.4.3- EXPERIMENTOS

Para cada grupo, foram obtidos 3 fragmentos dentários que, por sua vez, foram posicionados sobre placa de 12 poços para cultura de células e tecidos com a superfície tratada voltada externamente. Sobre estes, foram semeadas 1×10^3 células derivadas de ligamento periodontal humano em DMEM suplementado com FBS 10% e solução antibiótica a 1%, conforme mencionado anteriormente.

Após a obtenção e esterilização dos fragmentos radiculares, nos grupos 6 a 10 foi realizado condicionamento ácido dos fragmentos com solução em forma de gel de ácido cítrico

pH 1,0 associado à tetraciclina 50% desenvolvido pela disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. O gel foi aplicado sobre os fragmentos durante 3 minutos e posteriormente removido com lavagem abundante em PBS. A seguir, foi realizada a aplicação dos respectivos fatores de crescimento durante 5 minutos. O excesso de material não incorporado à superfície dentária foi descartado. Nos grupos 1 a 5, as mesmas etapas foram seguidas, excetuando-se o condicionamento ácido e posterior lavagem com PBS. No grupo 1, utilizado como controle, as células foram semeadas diretamente sobre os fragmentos radiculares raspados e esterilizados.

As amostras foram mantidas em estufa própria para cultura de tecidos em atmosfera úmida de 95% ar – 5% CO₂, a 37°C e pH 7.4 por 24 horas.

4.5.4- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após 24 horas, o meio foi removido e as amostras fixadas com 1.5 – 2.0 ml de glutaraldeído a 2% em solução tampão de fosfato durante 24 horas, no mínimo, em refrigerador. Depois desta etapa, o fixador foi removido e as amostras lavadas com solução de soro fisiológico e sacarose por 24 horas adicionais. Após a adição do ósmio por 30 minutos, as amostras foram desidratadas em série de álcool a 30, 50, 70, 90, 96 e 100% e álcool absoluto e preparadas para microscopia eletrônica de varredura. Foram obtidas 2 eletromicrografias de cada espécime, sendo uma da região central do fragmento e outra da periferia, aleatoriamente escolhida. As imagens geradas foram armazenadas em computador Macintosh e, sobre estas, o programa de microscopia eletrônica interpôs uma grade, permitindo a contagem das células em uma área representativa padronizada.

4.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram estatisticamente avaliados de acordo com os testes de ANOVA (Kruskal-Wallis) complementado pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação múltipla e por análise descritiva dos dados obtidos em programa de análise de dados para computador (sistema PC) SigmaStat.

RESULTADOS

5- RESULTADOS

5.1- EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO PDGF-BB, IGF-1 E TGF- β 1 ISOLADOS OU COMBINADOS NA PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO (CÉLULAS FL2)

Os efeitos dos fatores de crescimento utilizados (PDGF-BB, IGF-1, TGF- β e combinação dos mesmos) na proliferação dos fibroblastos de ligamento periodontal em cultura foram avaliados através de contagem das células viáveis em cada grupo experimental e analisados estatisticamente através de métodos descritivos e pelo teste de ANOVA (Kruskal-Wallis), complementado pelos métodos de Tukey e Dunnet. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 1, figura 5 e anexo III (tabela 6).

TABELA 1 – PROLIFERAÇÃO DOS GRUPOS TESTADOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE NOS DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO (EM %)

Grupo	Placa	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 7
Grupo 1/Controle	1	66,65%	233,00%	150,00%	92,37%
	2	166,50%	233,00%	220,21%	124,95%
	3	200,00%	250,37%	300,75%	133,25%
Média $\pm$ SEM	T	144,333 $\pm$ 40,100	238,790 $\pm$ 5,790	216,953 $\pm$ 44,287*	150,280 $\pm$ 9,647
Grupo 2/Controle	1	133,00%	233,00%	171,67%	120,00%
	2	200,00%	366,50%	183,25%	120,00%
	3	303,03%	433,00%	220,12%	123,56%
Média $\pm$ SEM	T	212,010 $\pm$ 49,449	344,167 $\pm$ 58,805*	191,680 $\pm$ 14,608	118,953 $\pm$ 3,008
Grupo 3/Controle	1	49,62%	200,00%	142,91%	73,30%
	2	100,00%	233,00%	150,00%	93,30%
	3	133,00%	266,50%	180,18%	94,08%
Média $\pm$ SEM	T	94,207 $\pm$ 24,243	233,167 $\pm$ 19,197	163,197 $\pm$ 10,885	86,893 $\pm$ 6,800
Grupo 4/Controle	1	150,37%	233,00%	160,06%	120,00%
	2	166,50%	266,50%	171,67%	176,52%
	3	201,51%	333,00%	183,25%	193,30%
Média $\pm$ SEM	T	172,793 $\pm$ 15,094	277,500 $\pm$ 29,387*	171,660 $\pm$ 6,694	163,273 $\pm$ 22,172

* $p \leq 0,05$

FIGURA 5- PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO INDUZIDA POR FATORES DE CRESCIMENTO

PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO INDUZIDA POR PDGF-BB (GRUPO 1), TGF- β 1 (GRUPO 2), IGF-1 (GRUPO 3) E PELA SUA COMBINAÇÃO (GRUPO 4) ADICIONADOS A DMEM + FBS 10% + SOLUÇÃO ANTIBIÓTICA A 1% RELATIVAMENTE AO CONTROLE (DMEM + FBS 10% E SOLUÇÃO ANTIBIÓTICA A 1% SEM ADIÇÃO DE OUTROS FATORES). A DENSIDADE INICIAL DE CÉLULAS FOI DE 1×10^3 CÉLULAS/PLACA E AS CONTAGENS FORAM REALIZADAS APÓS 1, 3, 5 E 7 DIAS DO CULTIVO INICIAL. CADA PONTO DAS CURVAS REPRESENTA A MÉDIA $\pm$ SEM DE TRÊS RÉPLICAS. A TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR ESTÁ REPRESENTADA COMO % DE ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS EM RELAÇÃO AO CONTROLE, CONSIDERADO COMO 100%.

De forma geral, na figura 5, observa-se aumento da taxa proliferativa após 24 horas superior para o grupo 2 (TGF- β 1), seguida dos grupos 4 (combinação) e 1 (PDGF-BB). O IGF-1 (grupo 3) apresentou taxa de proliferação celular inferior ao controle. Aos 3 dias, todos os fatores de crescimento apresentaram efeito proliferativo máximo sobre as células FL2, maior para os grupos 2 e 4 e mais ou menos semelhante para os grupos 1 e 3. Aos 5 dias, observa-se uma queda da taxa de proliferação celular. No entanto, nota-se que o PDGF-BB manteve seus efeitos estimulatórios em níveis bem próximos daqueles observados anteriormente e estatisticamente acima do controle (anexo III: tabela 6 e anexo IV: tabela 7). Aos 7 dias, a taxa de proliferação celular apresentou diminuição acentuada para todos os grupos avaliados, com exceção do grupo tratado pela combinação dos fatores de crescimento, que mostrou ligeiro aumento, sem, no entanto, apresentar diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos experimentais e ao controle (anexo III: tabela 6 e anexo IV: tabela 7).

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis para análise estatística dos dados obtidos e apresentados na tabela 1, não houveram diferenças estatisticamente significantes na taxa de proliferação das células FL2 medida em termos de porcentagem de proliferação relativamente ao controle, considerado como 100%, entre os grupos em todos os períodos avaliados, com exceção das contagens após 3 e 5 dias de cultura. Para isolar o grupo ou grupos que apresentaram diferenças foi utilizado procedimento de comparação múltipla segundo o método de Tukey, permitindo identificar que aos 3 dias os grupos 2 e 4 apresentaram taxa de proliferação de células em relação ao controle estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Aos 5 dias de análise, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1 e o controle conforme apresentado no anexo III (tabela 6).

Considerando-se os grupos controle como 100% e aplicando-se o teste de comparação múltipla pelo método de Dunnet, observou-se que a taxa de proliferação das células nos grupos experimentais (grupos 1-4) foram estatisticamente superiores às dos grupos controle ($p < 0,05$) aos 3 dias de observação e no grupo 1 aos 5 dias de observação (anexo IV: tabela 7). Não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos após 1 e 7 dias de observação.

Entretanto, quando se aplicou o teste ANOVA complementado pelo método de Dunnet para comparação de grupos múltiplos em relação ao controle, observou-se diferenças estatisticamente significantes no número de células ($p < 0,05$) aos 3 dias de observação para os

grupos 1 (PDGF-BB), 2 (TGF- β 1) e 4 (combinação de PDGF-BB + IGF-1 + TGF- β 1), aos 5 dias para os grupos 2, 3 (IGF-1) e 4 e aos 7 dias para o grupo 4, conforme descrito no anexo III (tabela 5) e anexo IV (tabela 8).

OUTRO DADO RELEVANTE FOI A CONSTATAÇÃO DE QUE NÃO HOVERAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS CONTROLE 1 E 2, SEGUNDO O TESTE ANOVA/TUKEY ($p=1,000$). ASSIM SENDO, A APLICAÇÃO DO TESTE DE VARIÂNCIA ANOVA PARA AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS/PLACA NÃO DEMONSTROU DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTES ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS (GRUPOS 1-4) 1, 3 E 5 DIAS APÓS O CULTIVO DAS CÉLULAS NAS PLACAS DE PETRI, MOSTRANDO AINDA DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTES ENTRE OS GRUPOS 4 (COMBINAÇÃO) E 3 (IGF-1) E ENTRE OS GRUPOS 4 E 1 (PDGF). OS RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA ESTÃO DESCRITOS NO ANEXO III (TABELA 5).

5.2- EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO APLICADOS SOBRE FRAGMENTOS RADICULARES PREVIAMENTE CONDICIONADOS OU NÃO COM ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO E TETRACICLINA NA ADESÃO DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO (CÉLULAS FL2)

A influência dos diferentes fatores de crescimento testados na adesão de células FL2 foi avaliada estatisticamente segundo os testes ANOVA/Student-Newman-Keuls e através de métodos descritivos, conforme apresentado na tabela 2, onde se observa a descrição estatística dos resultados encontrados para os diferentes grupos de tratamento.

TABELA 2 EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO APLICADOS SOBRE FRAGMENTOS RADICULARES PREVIAMENTE CONDICIONADOS OU NÃO COM ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO E TETRACICLINA NA ADESÃO DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO – ESTATÍSTICA DESCRITIVA

Grupos	Média	SEM
<i>Grupo 1 (Raspagem)</i>	6,000	1,780
<i>Grupo 2 (Raspagem + PDGF-BB)</i>	5,500	1,190
<i>Grupo 3 (Raspagem + IGF-1)</i>	5,750	1,931
<i>Grupo 4 (Raspagem + TGF-β1)</i>	3,250	1,493
<i>Grupo 5 (Raspagem + combinação)</i>	5,500	0,957
<i>Grupo 6 (Raspagem + ácido)</i>	9,250	1,702
<i>Grupo 7 (Raspagem + ácido + PDGF-BB)</i>	12,250	2,250
<i>Grupo 8 (Raspagem + ácido + IGF-1)</i>	10,000	0,816
<i>Grupo 9 (Raspagem + ácido + TGF-β1)</i>	10,250	2,056
<i>Grupo 10 (Raspagem + ácido + combinação)</i>	13,250	1,797

De uma maneira geral os espécimes tratados com raspagem seguida de condicionamento com ácido e tetraciclina mostraram número superior de células aderidas aos dentes se comparados com aqueles grupos tratados apenas com raspagem (como expressado na figura 6).

A aplicação do teste ANOVA identificou que as diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento foram maiores do que o ocasionalmente esperado ($p=0,002$). O método de Student-Newman-Keuls foi então empregado para isolar os grupos que apresentaram diferenças significantes entre si. Os resultados obtidos estão descritos no Anexo V (tabela 9).

Os espécimes pertencentes ao grupo controle (grupo 1), tratados apenas através de raspagem e alisamento radicular com curetas de Gracey, estavam apenas parcialmente cobertos por fibroblastos achatados, alongados ou estrelados, com presença de algumas células ovóides em 2 dos espécimes avaliados. Um dos fragmentos apresentou apenas 1 célula aderida à superfície radicular no campo avaliado. Além disso, todos os espécimes evidenciavam remanescentes de placa e cálculo sobre sua superfície (figura 7A). As células aderidas exibiam inúmeros prolongamentos citoplasmáticos em direção umas às outras e ao fragmento radicular. O número médio de células aderidas/unidade de área foi de 6,000, conforme pode ser observado na tabela 2.

Os espécimes pertencentes aos grupos pré-condicionados com solução em forma de gel de ácido cítrico e tetraciclina após raspagem e alisamento com cureta de Gracey mostraram superfície radicular com pouco ou nenhum remanescente de placa e cálculo, remoção da camada de *smear-layer* e desobliteração dos túbulos dentinários, favorecendo a adesão de células, conforme pode ser visualizado nas figuras 7C e 7D. O grupo 6 (raspagem +condicionamento ácido por 3 minutos) apresentou número médio de células aderidas (9,500) superior ao grupo tratado apenas através de raspagem, embora a diferença entre os grupos não fosse estatisticamente significativa segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p>0,05$).

Quando os fatores de crescimento foram adicionados às superfícies radiculares pré-condicionadas houve ainda maior aumento do número de células aderidas em relação aos grupos 1 e 6 e aos grupos tratados apenas pela aplicação dos fatores de crescimento após a raspagem (2-5). O grupo tratado pela adição de 50 ng/ml de PDGF-BB após a raspagem e o condicionamento ácido (grupo 7) apresentou 12,250 células aderidas/unidade de área, enquanto que os grupos tratados com 25 ng/ml de IGF-1 (grupo 8) e 10 ng/ml de TGF- β 1 (grupo 9) após a raspagem e condicionamento ácido apresentaram, respectivamente, 12,500 e 10,000 células aderidas/unidade de área. O tratamento com a combinação dos fatores de crescimento depois do tratamento mecânico e ácido (grupo 10) resultou na adesão, em média, de 13,250 células/unidade de área, sendo inexistente diferenças significantes entre estes grupos experimentais, segundo o teste ANOVA/Student-Newman-Keuls. Esses dados podem ser visualizados na Tabela 2, Figura 6 e Anexo V (tabela 9).

FIGURA 6- EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO APLICADOS SOBRE FRAGMENTOS RADICULARES PREVIAMENTE CONDICIONADOS OU NÃO COM ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO E TETRACICLINA NA ADESÃO DE CÉLULAS FL₂ SEGUNDO OS DIFERENTES TRATAMENTOS

LEGENDA: NO GRÁFICO REPRESENTADO PELO NÚMERO DE CÉLULAS ADERIDAS EM RELAÇÃO AOS GRUPOS (UM A UM) OBSERVA-SE DE MANEIRA GERAL QUE A ADESÃO DE CÉLULAS SOBRE SUPERFÍCIES TRATADAS SEM CONDICIONAMENTO ÁCIDO É INFERIOR DO QUE AQUELAS TRATADAS POR RASPAGEM SEGUIDA DE CONDICIONAMENTO COM ÁCIDO CÍTRICO E TETRACICLINA. OS ESPÉCIMES TRATADOS SEM CONDICIONAMENTO ÁCIDO ESTÃO REPRESENTADOS PELOS GRUPOS 1-5 E OS FRAGMENTOS TRATADOS POR RASPAGEM E CONDICIONAMENTO ÁCIDO ESTÃO REPRESENTADOS NOS GRUPOS 6-10.

Os espécimes pertencentes ao grupo 7 (raspagem + condicionamento ácido + PDGF-BB) mostraram presença de fibroblastos achatados e alongados, exibindo inúmeros prolongamentos citoplasmáticos misturados a células de menor tamanho e com menor número de prolongamentos citoplasmáticos, além de outras com formato ovóide ou arredondado, assim como os espécimes pertencentes aos grupos 8, 9 e 10. Algumas amostras, especialmente aquelas pertencentes ao grupo 9, mostraram células com inúmeros prolongamentos citoplasmáticos dificultando a visualização do fragmento dentário intercaladas com remanescentes de placa e cálculo em um espécime. Os espécimes tratados com a combinação de fatores de crescimento apresentaram o maior número de células aderidas dentre todos os grupos avaliados.

Já os fragmentos tratados com os diferentes fatores de crescimento (grupos 2, 3 e 4) ou sua combinação (grupo 5) após a raspagem mostraram adesão de células à superfície dos fragmentos indiferente estatisticamente entre si e em relação ao grupo controle ($p>0,05$). O grupo tratado pela adição de 10 ng/ml de TGF- β 1 após a raspagem (grupo 4) apresentou o menor número de células aderidas de todos os grupos avaliados, com média de 3,500 células aderidas/unidade de área (tabela 3). Similarmente ao observado no grupo controle, os espécimes apresentavam grande quantidade de placa e cálculo remanescente sobre a superfície radicular (Figura 7B), embora se observassem estrias superficiais decorrentes da instrumentação manual dos fragmentos. Em algumas amostras, os fibroblastos de ligamento periodontal cresceram sobre os depósitos de placa e cálculo, dificultando ou até impedindo a visualização da superfície dos fragmentos.

FIGURA 7 – IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DOS ESPÉCIMES TRATADOS ATRAVÉS DE RASPAGEM E APLICAÇÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO PRECEDIDA OU NÃO DE CONDICIONAMENTO ÁCIDO

LEGENDA: ELETROMICROGRAFIAS DE ESPÉCIMES TRATADOS POR RASPAGEM (A), RASPAGEM + APLICAÇÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO (B), RASPAGEM + CONDICIONAMENTO ÁCIDO (C) E RASPAGEM + CONDICIONAMENTO ÁCIDO + APLICAÇÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO (D). AS CÉLULAS FL2 APRESENTAM-SE ADERIDAS ÀS SUPERFÍCIES RADICULARES APRESENTANDO RESTOS TECIDUAIS CALCIFICADOS OU NÃO NOS GRUPOS TRATADOS APENAS POR RASPAGEM ENQUANTO QUE, NOS ESPÉCIMES TRATADOS POR RASPAGEM E CONDICIONAMENTO ÁCIDO, AS SUPERFÍCIES RADICULARES APRESENTAVAM-SE MAIS LIMPAS E REGULARES. AS FIGURAS B E D REPRESENTAM ESPÉCIMES TRATADOS PELA APLICAÇÃO DE PDGF-BB, ONDE SE OBSERVA NÚMERO DE CÉLULAS SUPERIOR AOS RESPECTIVOS CONTROLES (A E C). (x500 - LEO 430, CAMBRIDGE, EUA).

A comparação entre os grupos tratados pela adição de 50 ng/ml de PDGF-BB precedidos ou não por condicionamento ácido da superfície radicular (respectivamente, grupos 7 e 2) revelou maior número de células aderidas nas amostras pré-condicionadas (12,250 células/unidade de área) do que não condicionadas (5,500 células/unidade de área), sem, entretanto, existir diferença estatisticamente significativa entre os dois ($p > 0.05$), segundo o teste ANOVA/Student-Newman-Keuls (Anexo V, tabela 9).

Os grupos tratados com 25 ng/ml de IGF-1 após a raspagem seguida de condicionamento ácido (grupo 8) ou após a raspagem (grupo 3) também evidenciaram maior número médio de células aderidas no primeiro (10,000 células aderidas/unidade de área) do que no segundo (5,750 células aderidas/unidade de área), porém sem diferença estatisticamente significativa entre si, de acordo com o mesmo teste (Anexo V, tabela 9).

Este mesmo padrão foi observado com os grupos tratados pela adição de 10 ng/ml de TGF- β 1 após a raspagem (3,250 células aderidas/unidade de área) ou após a raspagem seguida de condicionamento ácido superficial (10,250 células aderidas/unidade de área) ou pela combinação dos fatores de crescimento precedidos ou não de condicionamento ácido após a raspagem (respectivamente, 13,250 e 5,500 células/unidade de área). A aplicação do ANOVA/Student-Newman-Keuls para análise estatística dos diferentes tratamentos revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos 4 (raspagem + TGF- β 1) e 10 (raspagem + ácido + combinação de fatores de crescimento) e entre os grupos 4 e 7 (raspagem + condicionamento ácido + PDGF-BB).

De todos os tratamentos testados, o grupo tratado através de raspagem e alisamento radicular acompanhado por condicionamento com ácido cítrico e tetraciclina e adição da combinação dos fatores de crescimento apresentou os melhores efeitos na adesão de fibroblastos de ligamento periodontal humano a superfícies radiculares periodontalmente comprometidas, conforme observado na Tabela 2, Figura 6 e Anexo V, onde se observa valor de $p < 0,05$ deste (grupo 10) em relação aos grupos 1-4.

DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

Estudamos os efeitos da aplicação de três fatores de crescimento (PDGF-BB, IGF-1 e TGF- β 1) sozinhos ou em combinação na proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal humano, considerando que estas células são as principais responsáveis pela formação de novo osso, novo cemento e novo ligamento periodontal. Adicionalmente, analisamos a adesão dessas células a fragmentos radiculares periodontalmente comprometidos tratados previamente ou não por associação de ácido cítrico e tetraciclina. Nossos resultados demonstraram que o TGF- β 1 apresentou os melhores efeitos na proliferação de células do ligamento periodontal em cultura, enquanto que na adesão das células aos fragmentos a combinação dos três fatores apresentou resultados mais favoráveis.

Estudos recentes têm sugerido que o uso de fatores de crescimento parácrinos regula os componentes do processo de cicatrização^{04,27,36,61,68,102,103,187,188,189,190}, evidenciando sua utilização como agentes terapêuticos para regeneração dos tecidos periodontais perdidos com o processo de doença.

Um aspecto peculiar à regeneração periodontal é o envolvimento de vários tipos celulares: células epiteliais derivadas do epitélio juncional e gengival, osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos originários do tecido gengival e do ligamento periodontal^{13,68,114,116}. Estudos conduzidos por MELCHER¹¹⁹ (1976), KARRING, NYMAN & LINDHE⁸⁸ (1980), NYMAN et al.¹²⁸ (1980), NYMAN et al.¹²⁷ (1982), GOTTLOW, NYMAN & KARRING⁶⁶ (1994) e McCULLOCH¹¹⁵ (1995) demonstraram que a regeneração ocorre quando as células presentes na área afetada após a cura da ferida forem do mesmo tipo e apresentarem as mesmas características funcionais daquelas originalmente existentes. Adicionalmente, demonstraram que quando as células que repovoaram a região da ferida periodontal eram oriundas do epitélio juncional havia migração apical dessas células, resultando na formação de epitélio juncional longo (adaptação). Quando as células eram originárias do tecido conjuntivo gengival resultaram em reparo, com formação de fibras colágenas orientadas paralelamente ao longo eixo do dente. Ainda, quando foram originárias do tecido ósseo, ocorria formação de anquilose e, possivelmente, reabsorção. Apenas quando células oriundas do ligamento periodontal ocuparam a região comprometida houve formação de novo osso, novo cemento e novo ligamento periodontal orientado perpendicularmente à superfície radicular.

Vários trabalhos têm sugerido, então, que a utilização de substâncias bioativas e manipulações técnicas favoreceriam o repovoamento dos defeitos periodontais por células progenitoras do ligamento periodontal e impediriam ou atrasariam a migração de “células não desejáveis”¹⁸⁷. Entretanto, ainda existem limitações de indicação destes procedimentos terapêuticos devido à pouca previsibilidade de sucesso dos mesmos.

Assim, fez-se necessária a realização de estudos que visem a obtenção de métodos capazes de promover a proliferação, migração e diferenciação de células capazes de formar novo aparelho de inserção periodontal. A capacidade de proliferação, migração e formação de tecido conjuntivo pelas células do ligamento periodontal nos estágios iniciais do reparo parece exercer papel crucial na formação de ligamento periodontal e cemento e, conseqüentemente, na regeneração periodontal sem desenvolvimento de reabsorção radicular e anquilose⁷⁸. O ligamento periodontal contém células mesenquimais indiferenciadas que, uma vez estimuladas, são capazes de proliferar, migrar e se diferenciar em fibroblastos, osteoblastos e cementoblastos^{13,24,49,65,115,116,119}. As células progenitoras localizam-se a cerca de 200 µm paravascularmente, com origem no ligamento periodontal ou no osso alveolar próprio voltado para o ligamento^{09,78,118}. As células localizadas cerca de 5 µm (GOULD, MELCHER & BRUNETTE⁶⁵, 1980) a 10 µm (McCULLOCH¹¹⁵, 1995) paravascularmente estariam mais correlacionadas à geração de fibroblastos responsáveis pela produção de fibras do ligamento periodontal.

Vários estudos para avaliar a efetividade de diferentes procedimentos regenerativos *in vitro* foram conduzidos empregando-se fibroblastos derivados de tecido conjuntivo gengival^{101,05,12,41,50,51,188,191}, o que não é desejável, considerando-se as diferenças existentes entre fibroblastos gengivais e periodontais.

Embora não existam testes específicos para identificação dos fibroblastos de ligamento periodontal, algumas características em conjunto são indicativas de sua origem¹⁵. Assim, a natureza dos fibroblastos cultivados foi confirmada pela realização de testes imunohistoquímicos, histoquímicos e enzimáticos descritos em trabalho em publicação. Brevemente, identificou-se marcação positiva destas células para osteonectina (WASI et al.²⁰¹, 1984; SOMERMAN et al.¹⁷⁹, 1990, MATSUDA et al.¹¹², 1992, TAKANO-YAMAMOTO et al.¹⁸⁶, 1994; NOHUTCU et al.¹²⁶, 1996), sialoproteína óssea-2 (LEKIC et al.⁹⁸, 1996, SOMERMAN et al.¹⁸¹, 1988; SOMERMAN et al.¹⁷⁸,

1991, MacNEIL et al.¹⁰⁷, 1994), vimentina (CHOMETTE et al.³⁷, 1987) e fibronectina (TERRANOVA & WIKESJÖ¹⁸⁸, 1988; UITTO et al.¹⁹⁷, 1992, HOU & YAEGER⁸¹, 1993; KURU et al.⁹³, 1998) e negativa para actina α de músculo liso (CHOMETTE et al.³⁷, 1987), citoqueratina AE1/AE3 (RAGNARSSON, CARR & DANIEL¹⁵¹, 1985) e colágeno III (CHOMETTE et al.³⁷, 1987). Detectou-se ainda a formação de nódulos mineralizados *in vitro* identificados pelo método de von Kossa (BELLOWS¹⁴, 1986; MELCHER et al.¹¹⁸, 1987, ARCEO et al.⁰⁶, 1991) e ausência de atividade de fosfatase alcalina (CHOMETTE et al.³⁷, 1987), embora alguns trabalhos tenham-na encontrado, estimulada ou não pela adição de dexametasona (KURU et al.⁹³, 1998, KURU et al.⁹², 1999; ISAKA⁸⁴, 2001).

Além disso, a heterogeneidade dos fibroblastos presentes no ligamento periodontal resulta em diferentes características de crescimento, meia vida e síntese protéica, com algumas células apresentando características osteoblásticas e outras fibroblásticas^{21,117,136,140}. Os fibroblastos de ligamento periodontal são diferenciados dos fibroblastos gengivais em uma série de estudos *in vitro*. PICHE, CARNES & GRAVES¹³⁶ apontaram diferenças entre fibroblastos gengivais, de ligamento periodontal e osteoblastos cultivados de pacientes saudáveis e encontraram dois tipos distintos de fibroblastos de ligamento periodontal, baseado no comportamento das células na cultura. Um dos tipos celulares reagiu similarmente a células osteoblásticas, exibindo aumento do AMP cíclico induzido pelo hormônio paratireoideano e a expressão de níveis basais acentuados de fosfatase alcalina. O segundo tipo celular apresentou boa resposta proliferativa à adição de PDGF, pequenos níveis basais de fosfatase alcalina e inalteração dos níveis de AMP cíclico estimulados pelo paratormônio. SOMERMAN et al.^{179,180} demonstraram que os fibroblastos de ligamento periodontal apresentam características distintas dos fibroblastos gengivais. A síntese de colágeno, proteína e atividade de fosfatase alcalina foram maiores nos primeiros do que nos segundos, mas também se tornam senescentes mais rapidamente do que os fibroblastos gengivais. Além disso, estas células perdem suas características originais com o aumento do número de passagens, conservando suas características básicas até a 10^a-15^a passagem. Portanto, neste estudo, utilizamos as células FL2 nas passagens 5-7, evitando-se a perda das características destas células.

Por estes motivos, estudamos os efeitos da aplicação de três fatores de crescimento (PDGF-BB, IGF-1 e TGF- β 1) sozinhos ou em combinação na proliferação de fibroblastos de

ligamento periodontal humano, considerando que estas células são as principais responsáveis pela formação de novo osso, novo cemento e novo ligamento periodontal.

Observou-se, neste estudo, que o TGF- β 1 aumentou a taxa de proliferação das células FL2 significativamente acima do controle e, embora não houvesse diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais até o 5º dia de análise, observa-se uma forte tendência deste fator de crescimento a induzir proliferação dos fibroblastos de ligamento periodontal mais rápida, o que seria benéfico aos eventos regenerativos. Esses resultados vêm de encontro às principais características funcionais deste fator de crescimento descritas em literatura, ressaltando a capacidade desta substância em estimular a síntese de proteínas colágenas^{32,110,138,161,206} em níveis superiores aos demais fatores de crescimento quando utilizados individualmente¹⁰⁴, talvez por promover forte efeito proliferativo sobre as células fibroblásticas, aumentando o número das mesmas nas áreas feridas⁴⁴.

O TGF- β é um fator de crescimento pertencente a uma grande família de hormônios biologicamente ativos que se relacionam entre si estruturalmente, mas desempenham diferentes funções. Foi descoberto em 1982 e isolado de plaquetas, placenta humana e fígado bovino¹⁸³. É sintetizado por inúmeros tipos celulares dentre os quais plaquetas e osteoblastos^{05,102,182}, existindo duas formas bem caracterizadas de TGF: o TGF- α e o TGF- β . Dentre os dois, o TGF- β apresenta maior interesse em Periodontia pelas suas características e propriedades. Trata-se de um polipeptídeo de 25 kDa de peso molecular, constituído por duas subunidades unidas por ponte dissulfídica⁵⁵. Dentro da subclasse do TGF- β ainda existem duas subunidades: TGF- β 1 e TGF- β 2, que apresentam 71% de homologia na sequência terminal. De forma geral, é secretado na forma inativa e ativado por proteólise e baixo pH, condições presentes durante o processo de cura da ferida¹⁸³. Atualmente, o TGF- β poderia ser considerado como uma citocina multifuncional, visto que poderia atuar tanto como inibidor quanto estimulador da proliferação celular, bem como controlar a síntese de vários componentes da matriz extracelular¹⁸².

O TGF- β 1 parece exercer quimiotaxia preferencial às células do ligamento periodontal relativamente aos fibroblastos gengivais, conforme descrito por TERRANOVA & WIKESJÖ¹⁸⁸ (1988) e DENNISON et al.⁴⁴ (1994) *in vitro*. TERRANOVA & WIKESJÖ¹⁸⁸ ainda sugeriram que este fator é mais potente que o TGF- α , justificando sua utilização em nosso trabalho

de pesquisa. Esses achados sugerem que sua utilização no tratamento de defeitos periodontais favoreceria o repovoamento dos sítios por fibroblastos de ligamento periodontal e, associado ao forte efeito proliferativo exercido pelo mesmo sobre estas células e observados no nosso trabalho, levaria à regeneração dos tecidos periodontais perdidos com o processo de doença. TERRANOVA, JENDRESEN & YOUNG¹⁹⁰ (1989) evidenciaram sua atuação na síntese de matriz extra-celular mediando a produção de colágeno e fibronectina de forma mais potente que o PDGF e o EGF, sendo ainda potencializado pelos mesmos. Ainda recentemente, GALETTI et al.⁵⁶ (2000) demonstraram que o TGF- β 1 foi o único dos fatores testados (TGF- β 1, PDGF-BB, colágeno tipo I e grânulos de coral) que influenciou a diferenciação de células de ligamento periodontal humano demonstrada por aumento da atividade de fosfatase alcalina e por análise das características celulares em microscopia eletrônica de varredura. Outra propriedade deste fator de crescimento à regeneração periodontal é a inibição da migração das células epiteliais demonstrada por LYNCH, COLVIN & ANTONIADES¹⁰⁴ (1989) e por DENNISON et al.⁴⁴ (1994). Vale ressaltar entretanto que os primeiros autores afirmaram que a aplicação de TGF- β 1 resultou em diferenciação anormal de ceratinócitos.

Além dessas características, de forma geral, esta substância parece exercer importante papel na homeostasia das lesões por estimular a síntese de outros fatores de crescimento intracelularmente e diminuir ou limitar a extensão do dano tecidual ou, ainda, aumentar o reparo, estimulando eventos necessários à angiogênese e síntese de colágeno^{110,183}. Dentro deste contexto, MAILHOT et al.¹¹⁰ demonstraram que o TGF- β inibiu a síntese de colagenase e aldolase e aumentou a síntese protéica significativa e constantemente após as primeiras 48 horas pelos fibroblastos de ligamento periodontal *in vitro*.

As culturas tratadas pela adição de PDGF-BB mostraram aumento da taxa de proliferação das células FL2 significativamente acima do controle aos 3 e 5 dias de observação sem, no entanto, apresentar diferenças significativas em relação aos demais grupos testados. As células tratadas com este fator de crescimento exibiram curva de crescimento mais uniforme, não se observando queda acentuada na taxa de proliferação celular aos 5 dias de observação conforme esperado. Esse achado sugere o forte efeito proliferativo exercido por esta substância sobre os fibroblastos de ligamento periodontal, conforme mencionado por MATSUDA et al.¹¹² (1992),

OATES et al.¹²⁹ (1993), CHO, LIN & GENCO³⁵ (1995), MAILHOT et al.¹⁰⁹ (1996), BARTOLD & RABEN¹¹ (1996) e MUMFORD et al.¹²² (2001), provavelmente aumentando o número de células existentes, mas retardando o início da fase de síntese protéica. Essa sugestão está baseada na observação das curvas de crescimento estabelecidas para os diferentes tratamentos executados e para caracterização das células do ligamento periodontal. Nessas curvas nota-se, após o 3º dia, uma queda na taxa de proliferação celular para todos os grupos avaliados. Segundo WIKESJÖ et al.²⁰⁴ (1991) e WANG et al.¹⁹⁹ (1994), os fibroblastos de ligamento periodontal entram na fase de síntese de matriz orgânica ao redor do 2º-4º dia, diminuindo a taxa proliferativa, confirmando os dados observados em nosso experimento. Como proliferação é uma atividade oposta à de síntese protéica, acreditamos que aos 3 dias, os demais fatores de crescimento já passaram a induzir produção protéica, enquanto a indução exercida pelo PDGF nas células FL2 ainda era preferencialmente proliferativa.

O PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) foi descoberto em 1974, sendo constituído por uma glicoproteína de 27-31 kDa composta por duas cadeias peptídicas unidas por pontes dissulfídicas^{23,152}. Presente nos alfa-grânulos das plaquetas^{34,91}, somente são liberados no processo de coagulação e no mecanismo de adesão plaquetária na lesão a vasos sangüíneos. Também se observou sua produção em várias células e tecidos, entre os quais destacam-se: monócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, matrizes ósseas, células musculares lisas¹⁰². Existem dois subtipos de PDGF: PDGF-I e PDGF-II que apresentam 18 resíduos de 1/2 cistina com ligação dissulfídica⁴⁸ que, se rompida, interrompe a atividade mitogênica das unidades protéicas e separa o PDGF em 2 cadeias: A (maior: PDGF-I ~ 17 Kd; PDGF-II ~ 15 Kd) e B (menor: PDGF-I e II ~ 14 Kd)^{05,45,48,83}. Assim, três isoformas diméricas foram identificadas⁷⁵: PDGF-AA, -BB e -AB, com diferentes efeitos e propriedades biológicas, cada uma se unindo especificamente a receptores de superfície celular³⁵. Foram descritas a existência de dois receptores diferentes para o PDGF^{64,76,77}: o receptor alfa que se une fortemente aos isótipos AA, BB e AB e o receptor beta, que se une fortemente ao isótipo BB e apenas fracamente ao isótipo AB^{22,23,46,76,77,167}. A presença de receptores α e β de PDGF em fibroblastos de ligamento periodontal de ratos foi identificada em reação de imunoprecipitação com anticorpos específicos por CHO et al.³⁶ em 1994. GREEN et al.⁶⁹ demonstraram a presença dos dois tipos de receptores na gengiva interproximal de pacientes saudáveis.

Dentre os diferentes isótopos de PDGF (AA, BB e AB) aquele que apresentou os melhores efeitos sobre células de ligamento periodontal em testes proliferativos, de síntese de DNA e quimiotáticos foi o PDGF-BB, seguido pelo PDGF-AB e -AA^{25,36,112}. CHO et al.³⁶ (1994) demonstraram que, dentre os fatores de crescimento existentes, o PDGF-BB apresenta a maior efetividade mitogênica, quimiotática e sintética, com potencial de alcançar rápido repovoamento celular e reparo acentuado, sendo ainda superior até mesmo sobre extratos plaquetários, conforme demonstrado por BOYAN et al.²⁵ (1994). Vale salientar que o PDGF obtido de plaquetas humanas e utilizado no estudo estava composto de 70% de PDGF-AB. Portanto, diante destas considerações e das propriedades deste fator, em nosso trabalho, utilizamos fator de crescimento derivado de plaquetas-BB recombinante humano altamente purificado (> 95%). A resposta à adição deste fator de crescimento parece ser dose e tempo-dependentes, segundo BOYAN et al.²⁵ (1994) e CHO et al.³⁶ (1994).

Adicionalmente aos efeitos no ligamento periodontal, o PDGF apresenta efeitos estimulatórios na proliferação e síntese de proteínas colágenas e não colágenas por fibroblastos gengivais (LYNCH¹⁰², 1994). Estudos *in vivo* demonstraram aumento de proliferação das células mesenquimais com formação de novo osso e novo cimento, especialmente quando associadas ao IGF-1 (LYNCH et al.^{105,106}, 1989, 1991). Além disso, aumentou significativamente a espessura de tecido conjuntivo (LYNCH et al.¹⁰⁵, 1989) e apresenta fortes evidências de sua participação – especialmente do PDGF-BB – no processo de cura das feridas¹¹.

Dos três fatores de crescimento utilizados individualmente, o IGF-1 apresentou o menor efeito proliferativo sobre as células FL2, estando inclusive abaixo do controle após 1 e 7 dias de avaliação. No entanto, estes resultados não são corroborados por achados de BLOM et al.¹⁷ (1992), que mostraram aumento da síntese de DNA em fibroblastos cultivados de ligamento periodontal de ratos relativamente ao controle ou ao hormônio do crescimento. Esses autores sugeriram que o IGF-1 poderia estimular a síntese de fibroblastos de ligamento periodontal através da união a receptores de superfície de alta afinidade. Entretanto, a maior parte dos trabalhos concorda em afirmar que seus efeitos proliferativos são inferiores aos exercidos pelo PDGF, sendo semelhante ao mesmo apenas quando utilizados em altas concentrações^{63,102,105,106,112,129,170}.

O IGF-1, assim como o IGF-2, é uma proteína do tipo insulina que foi encontrada no sistema circulatório e que possui atividade semelhante a esta substância. O IGF-I é uma proteína de 7.6 kDa em peso molecular e consiste de 70 resíduos em cadeia simples contendo três pontes dissulfídicas internas, com forte homologia com a insulina^{157,9}. Entre as propriedades que os destacam na regeneração periodontal, as principais são estimulação da síntese de matriz óssea (proteínas colágenas e não colágenas) *in vitro*^{29,30,31,80}, efeitos mitogênicos sobre osteoblastos e fibroblastos derivados do ligamento periodontal através da união a receptores celulares específicos¹⁷ e quimiotaxia para fibroblastos do ligamento periodontal, osteoblastos e células progenitoras de osteoclastos^{112,121}. CANALIS, McCARTHY & CENTRELLA³⁰ (1988) demonstraram que o IGF-1 pode ser ainda sintetizado por células osteoblásticas derivadas de calvária de ratos fetais cultivadas intracelularmente. Apresentou efeito mitogênico potente nos fibroblastos de ligamento periodontal em concentrações de 10-100 ng/ml, aumentando com a dose, conforme demonstrado por MATSUDA et al.¹¹² (1992).

Também a combinação dos três fatores de crescimento aumentou a taxa de proliferação das células FL2 significativamente acima do controle aos 3 dias de observação sem, entretanto, apresentar diferenças estatisticamente significante com relação aos demais grupos experimentais em todos os períodos de tempo avaliados, com exceção do 7º dia, quando foi significativamente superior ao grupo tratado pela adição de IGF-1.

Ao final do período de observação (7 dias), as células começaram a atingir confluência e diminuíram ainda mais sua taxa de crescimento, apresentando inibição por contato. No entanto, o grupo tratado pela combinação dos fatores de crescimento mostraram ligeiro aumento na taxa proliferativa embora não significante estatisticamente em relação ao controle ou aos demais grupos experimentais. Este pequeno e atrasado efeito estimulatório poderia ser, ao menos em parte, justificado pelo fato de que o TGF-β1 induz a síntese de PDGF e seus receptores intracelularmente, demonstrado por CLARK et al.³⁹ (1989), ISHIKAWA et al.⁸⁵ (1990) e ANDERSON et al.⁰⁵ (1998), embora este último tenha apontado que isto só ocorria se as células fossem pré-tratadas com TGF-β. Esta indução poderia ocorrer através de dois mecanismos distintos: primeiramente, o TGF-β1 aumentaria o número de receptores de PDGF em algumas células e, em segundo, induziria a formação de RNA mensageiro do PDGF. Assim, as células responderiam melhor ao PDGF

exógeno pelo aumento do número de receptores disponíveis ao mesmo tempo em que aumenta o número de PDGF intracelular.⁸⁵

Até os dias atuais, não existem relatos de literatura que tenham avaliado os efeitos da utilização da combinação de PDGF-BB, IGF-1 e TGF- β 1 sobre células de ligamento periodontal humano. Apenas PFEILSCHIFTER et al.¹³⁵ (1990) avaliaram o efeito destes fatores na taxa de aposição óssea e demonstraram que, das três substâncias utilizadas isoladamente, a mais potente foi o TGF- β 1 mas o maior efeito foi obtido com o uso concomitante das três. No entanto, a associação entre o TGF- β 1 e o PDGF-BB foi testada por alguns autores. Os resultados obtidos por DENNISON et al.⁴⁴ (1994), que demonstraram maior resposta proliferativa de células tratadas com a combinação dos dois fatores ou apenas com o TGF- β 1 após 24-48 horas e por OATES et al.¹³⁰ (1993), que avaliaram os efeitos do TGF- β 1 e dos PDGF-AA e -BB sobre fibroblastos de ligamento periodontal, demonstrando que o TGF- β 1 produziu aumento significativo na capacidade mitogênica destas células e produziu aumento dos níveis de PDGF, estão de acordo com os resultados aqui apresentados.

Por outro lado, MATSUDA et al.¹¹² (1992) mostraram resultados opostos aos deste trabalho, sugerindo que a combinação entre PDGF e TGF- β apresentou efeitos proliferativos similares aos obtidos com o uso dos PDGFs isoladamente, sugerindo ainda que o TGF- β 1 apresentou efeito inibitório da proliferação celular. No entanto, utilizaram em seu experimento, células de ligamento periodontal de ratos obtidas pela curetagem de alvéolo de extração recente e TGF- β 1 de origem porcina e ainda não mencionaram a concentração do TGF- β utilizada, enquanto em nosso trabalho utilizamos fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano e TGF- β 1 recombinante humano na concentração de 10 ng/ml.

Das diferentes combinações possíveis, a associação entre o PDGF e o IGF-1 têm sido mais intensamente estudada na regeneração periodontal. Vários estudos demonstram a ação sinérgica das duas substâncias *in vivo*^{62,63,82,102,105,106,170} e *in vitro*^{05,36,57,112,129}. LYNCH et al.¹⁰⁶ (1989) estudaram sua aplicação em defeitos periodontais naturais em cães beagle e mostraram resultados satisfatórios na formação de novo osso e novo cemento. Posteriormente, RUTHERFORD et al.¹⁷⁰ mostraram neoformação óssea, de cemento e ligamento periodontal significativamente superior ao controle quando aplicadas em defeitos periodontais induzidos de macacos. Resultados semelhantes

foram apresentados por GIANNOBILE, FINKELMAN & LYNCH⁶² (1994) em cães beagle apresentando doença periodontal natural. HOWELL et al.⁸² (1997) demonstraram ainda que a aplicação de dose única de 150 µg/ml de PDGF-BB e 75 µg/ml de IGF-1 foi efetiva e segura para o tratamento de defeitos ósseos periodontais severos em humanos, resultando em neoformação óssea e preenchimento do defeito sem o desenvolvimento de efeitos colaterais sistêmicos significativos.

Sabendo que a adesão de fibroblastos é fundamental para que se consiga proliferação (FRESHNEY⁵⁴, 2000), no nosso trabalho realizamos ainda a análise da adesão das células de ligamento periodontal humano (células FL2) influenciadas pela aplicação dos fatores de crescimento sobre raízes periodontalmente comprometidas previamente condicionadas ou não com associação de ácido cítrico e tetraciclina, não existindo em literatura relatos que avaliem o comportamento dessas células diante dos modificadores biológicos empregados.

Os resultados obtidos indicaram que o tratamento destas superfícies através de raspagem apenas ou acompanhada da aplicação dos fatores de crescimento não favoreceu a adesão das células FL2. Os espécimes deste grupo apresentaram-se irregulares, com partículas de cimento danificadas e remanescentes teciduais calcificados ou não sobre sua superfície. Neste trabalho, o tratamento mecânico das superfícies foi realizado manualmente com curetas de Gracey área-específica objetivando-se, após a extração dentária, a remoção de placa e cálculo visíveis bem como a eliminação da camada de cimento amolecido ou hipermineralizado. Não houve preocupação quanto à padronização dos procedimentos (número de movimentos, por exemplo), procurando aproximar-se ao máximo da situação *in vivo*. Nestes casos, a raspagem é feita até a redução da inflamação, medida clinicamente pelo aspecto de normalidade da gengiva marginal (presença do pontilhado casca-de-laranja, coloração rosa-pálido), ausência de sangramento à sondagem e redução da profundidade de sondagem.

A análise dos fragmentos em fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura evidenciou resíduos de placa e cálculo não percebidos durante a fase de tratamento da raiz indicando que estes depósitos dificultam ou impedem a adesão de fibroblastos, prejudicando a adesão de fibroblastos. Esses resultados se apóiam nos achados de ALEO, De RENZIS & FARBER⁰² (1975) que demonstraram a ausência de adesão de fibroblastos a superfícies radiculares periodontalmente comprometidas, apesar desta ter ocorrido em dentes não expostos à doença periodontal, indicando que produtos bacterianos (placa dentobacteriana, cálculo ou endotoxinas) dificultam ou até mesmo

impedem a adesão de fibroblastos às superfícies radiculares. As endotoxinas contaminantes da raiz poderiam ser facilmente removidas, empregando-se a técnica do fenol e água, indicando a possibilidade de que o tratamento químico radicular pode ser um adjunto no tratamento mecânico de raízes afetadas periodontalmente.

Com o emprego de fatores de crescimento pudemos avaliar em parte sua possível ação quimiotática para fibroblastos do ligamento periodontal. Relativamente aos efeitos quimiotáticos dos fatores de crescimento, NISHIMURA & TERRANOVA¹²⁴ (1996) afirmaram que nenhum dos fatores de crescimento testados (PDGF, IGF-1, IGF-2 e TGF) foi capaz de atrair seletivamente os fibroblastos de ligamento periodontal, efeito apresentado apenas pelo meio condicionado destas células, sugerindo que os fibroblastos secretam no meio de cultivo substâncias ainda desconhecidas que exerceriam efeito quimiotático seletivo para estas células. Entretanto, anteriormente, TERRANOVA & WIKESJÖ^{188,189} afirmaram que o TGF- β exerceu efeito quimiotático mais pronunciado para fibroblastos derivados de ligamento periodontal do que para fibroblastos gengivais, achados também descritos por DENNISON et al.⁴⁴ (1994). MATSUDA et al.¹¹² (1992), OATES et al.¹²⁹ (1993) e CHO, LIN & GENCO³⁵ (1995), que mostraram efeitos sinérgicos da associação entre PDGF e IGF tanto na proliferação quanto na quimiotaxia de fibroblastos de ligamento periodontal.

As concentrações dos fatores de crescimento utilizadas neste trabalho foram selecionadas com base nos relatos prévios de literatura. OATES et al.¹²⁹ (1993) demonstraram que o TGF- β 1 apresentou efeito mitogênico significativo nas concentrações de 1 e 10 ng/ml após 48 horas. Além disso, mostraram que a resposta mitogênica do PDGF aumentou de maneira dose-dependente até 50 ng/ml, quando apresentaram seu máximo efeito. Também DENNISON et al.⁴⁴ (1994) utilizaram o TGF- β 1 na concentração de 10 ng/ml associado ou não ao PDGF-BB na concentração de 20 ng/ml, mostrando efeito proliferativo diferencial de fibroblastos de ligamento periodontal comparativamente a fibroblastos gengivais. GAMAL et al.⁵⁷ utilizaram a combinação de 50 ng/ml de PDGF-BB e 25 ng/ml de IGF-1 para avaliar a adesão de fibroblastos de ligamento periodontal humano a fragmentos radiculares comprometidos periodontalmente. Assim, neste estudo, optamos por avaliar os efeitos na proliferação e adesão das células FL2 estimulados pela adição de PDGF-BB na concentração de 50 ng/ml, IGF-1 na concentração de 25 ng/ml e TGF- β 1

na concentração de 10 ng/ml, considerando ainda os achados de LYNCH et al.¹⁰⁶ (1989) que demonstraram que quando a dose de PDGF-BB foi mantida constante a 500 ng, a resposta proliferativa máxima foi alcançada com a utilização de 250 ng do IGF-1, indicando que a dosagem ótima da combinação por peso seria 2:1 (PDGF : IGF).

A adição dos fatores de crescimento às superfícies raspadas não favoreceu a adesão de células, diferentemente dos resultados apresentados por BARTOLD, NARAYANAN & PAGE¹² (1992) que determinaram que o PDGF foi capaz de reverter o efeito inibitório dos lipopolissacarídeos de *Salmonella* adicionado a cultura de fibroblastos gengivais humanos em até 60% acima do controle. O efeito inibitório máximo da ação dos lipopolissacarídeos sobre os fibroblastos foi encontrado na dose de 50 µl/ml e a ação proliferativa máxima do PDGF sobre as células foi observada a 5 ng/ml o que, por sua vez, não é consistente com a maior parte dos trabalhos publicados.

O pequeno número de células aderidas nos grupos tratados apenas por raspagem indica que houve inibição da adesão celular decorrente da contaminação superficial das amostras de cimento. Aliás, esta superfície foi selecionada considerando-se que as fibras de Sharpey do ligamento periodontal apresentam *in vivo* adesão em osso alveolar próprio e no cimento. Além disso, NISHIMURA et al.¹²⁵ (1989) evidenciaram que o cimento desmineralizado exerceu quimiotaxia para fibroblastos gengivais favorecendo a reinserção de fibras, o que não ocorre com a mesma intensidade com a dentina desmineralizada ou não e com o cimento não desmineralizado.

Quando se aplicou a associação de ácido cítrico e tetraciclina durante 3 minutos para complementação do tratamento mecânico dos espécimes, observou-se em nível de microscopia eletrônica de varredura aumento do número de células aderidas, desobliteração dos túbulos dentinários e remoção da camada de “smear-layer”, permitindo a obtenção de uma superfície de cimento mais regular e “limpa”, sem evidências de remanescentes teciduais calcificados ou não. Esses achados são reiterados por aqueles descritos por CHAVES et al.³³ (1993), que demonstraram a presença de camada de “smear-layer” e ilhotas de cimento danificado, sem exposição de fibras colágenas ou dentinárias. Este tratamento, portanto, favoreceu amplamente a adesão de células à superfície radicular e permitiu que os fatores de crescimento aplicados estimulassem a proliferação celular após 24 horas de incubação.

O condicionamento ácido das superfícies radiculares foi proposto pela primeira vez na literatura por REGISTER¹⁵³ (1973) e REGISTER & BÜRDICK^{154,155} (1975 e 1976). Em seu trabalho, mostraram que o condicionamento ácido das superfícies dentinárias acelerou o processo de osteogênese e cementogênese. No primeiro trabalho da série utilizaram ácido clorídrico durante 15 minutos. Posteriormente, testaram ácido cítrico, hidrocloreídrico e láctico, entre outros. Observaram então melhores resultados com uso do ácido cítrico pH 1,0 durante 2-3 minutos.

Esse ácido é capaz de induzir a formação de pinos de cimento dentro dos túbulos dentinários^{73,144,155}, exposição de colágeno^{33,164,194} e interdigitação com o colágeno intersticial^{74,160,173}, inibição da migração apical do epitélio juncional^{42,74,96}, descontaminação radicular^{33,72,146,205}, adesão de células e fibras à superfície de cimento^{72,146} e obtenção de superfície biologicamente compatível⁷³. Além disso, as células presentes nesta superfície apresentaram bipolaridade acentuada com adesões distintas na dentina e processos celulares geralmente se estendendo dentro dos túbulos dentinários⁷³. Assim, evidências indicaram que a desmineralização da superfície cementária permitiu a adesão de células gengivais orientadas perpendicularmente ao substrato, com processos celulares aderidos e embebidos pelo colágeno exposto, conforme relatos de PITARU & MELCHER¹³⁹ e FARDAL & LOWENBERG⁵⁰ (1990).

Também PITARU et al.^{141,142} em 1984 demonstraram que a migração, adesão e manutenção das pontes celulares previamente estabelecidas de fibroblastos gengivais a blocos de dentina e cimento obtidos de pacientes com doença periodontal foram mais eficientes após a desmineralização com EDTA a 18%. A exposição das células às endotoxinas bacterianas resultaram em diminuição da taxa de formação e manutenção das pontes celulares que haviam inicialmente se formado, sugerindo que a adsorção das endotoxinas bacterianas às superfícies radiculares são agressivas ao periodonto mesmo em pequenas quantidades. Ainda dentro deste contexto, SHAPIRA et al.¹⁷⁶ (1996) mostraram que extratos de cimento afetados pela doença periodontal, mesmo em baixas concentrações, aumentaram a síntese de TNF- α e IL-1B, conhecidos mediadores da inflamação cerca de 10 vezes de forma dose-dependente. O cimento contaminado apresentou 1,5 ng/ml de endotoxinas e o tratamento com polimixina B reduziu a atividade secretória de monócitos em 50-70%. A desmineralização ácida bloqueou a secreção de TNF- α pelos monócitos na concentração de 50 ng/ml.

Além de ácido cítrico, utilizamos concomitantemente no tratamento superficial do dente a tetraciclina que apresenta, além da capacidade de desmineralização, a propriedade de se unir à dentina e de ser subsequente liberada da superfície sob forma biologicamente ativa¹⁰ durante aproximadamente 48 horas²⁰⁵, independentemente do tipo de tetraciclina utilizado (tetraciclina HCl, oxitetraciclina ou doxiciclina)¹⁶. Demonstrou-se que a capacidade de desmineralização da tetraciclina HCl foi semelhante^{94,95} ou até mesmo superior³⁸ ao ácido cítrico. No entanto, alguns estudos afirmaram que o efeito da tetraciclina na adesão de fibras é inferior ao ácido cítrico⁵³, assim como seus efeitos na cementogênese²⁰⁰, desobliteração dos túbulos dentinários e remoção da camada de “smear-layer”^{71,94}. Pode ainda ser utilizada com a mesma eficácia que o ácido cítrico para recobrimento de raízes desnudas^{120,194-6}. ROMPEN et al.¹⁶⁴⁻⁵ e TERRANOVA et al.^{192,193} demonstraram que espécimes tratados com tetraciclina ou minociclina HCl aumentaram a adesão de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal à dentina, comparativamente ao tratamento com ácido cítrico. Dentre os tipos de tetraciclina existentes, MADISON & HOKETT¹⁰⁸ (1997) indicaram que a tetraciclina HCl é mais eficiente na remoção da camada de “smear-layer” e na descontaminação radicular.

Assim, a tetraciclina vêm sido amplamente empregada nos últimos anos como agente desmineralizador das superfícies radiculares. Entretanto, a tetraciclina HCl não está disponível comercialmente no país, impedindo o alcance de seus efeitos benéficos para desmineralização e descontaminação de raízes. Como o ácido cítrico pH 1,0 apresenta propriedades bem estabelecidas em literatura, a disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP desenvolveu um composto para desmineralização radicular constituído por ácido cítrico e tetraciclina, com o primeiro conferindo as propriedades ácidas propriamente ditas somando-se aos efeitos de substantividade e atividade antimicrobiana da tetraciclina.

Sabe-se que para que ocorra reinserção ou nova inserção conjuntiva, as fibras devem estar orientadas perpendicularmente ao longo eixo dentário¹⁴³. Os fibroblastos, responsáveis pela síntese de colágeno, apresentam seu longo-eixo disposto paralelamente às fibras sintetizadas. Assim, a orientação perpendicular dos fibroblastos gengivais em relação à superfície dos fragmentos dentários na cultura indicaria a possibilidade, *in vivo*, do favorecimento dos eventos necessários à regeneração. Por outro lado, nos fragmentos não tratados as células aderidas aparentemente se orientavam paralelamente à superfície, conforme descrito por HIGASHI et al.⁷⁹, 1995, formando um

material encapsulado separado da superfície dentária por uma camada de células. Adicionalmente, FARDAL & LOWENBERG⁵⁰ (1990) demonstraram que a raspagem acompanhada de desmineralização mostrou adesão e orientação de fibroblastos comparável aquelas obtidas com dentes não comprometidos.

BOYKO, BRUNETTE & MELCHER²⁶ (1980) examinaram a adesão de fibroblastos de ligamento periodontal a superfícies radiculares desmineralizadas com EDTA a 0,5M, ácido clorídrico 0,6 N ou ácido cítrico e mostraram maior número de células aderidas às superfícies tratadas com ácido.

Vale salientar ainda que a adesão de fibroblastos periodontais a superfícies radiculares comprometidas ou não periodontalmente foi maior que o controle nos espécimes tratados com ácido. LOWENBERG et al.¹⁰⁰ (1984) afirmaram ainda que essas células, além de existirem em maior número, são mais resistentes à digestão enzimática.

COGEN et al.⁴¹ (1984) e WIKESJÖ et al.²⁰⁴ (1991) demonstraram que a raspagem, a despeito do uso conjugado de desmineralização ácida, promoveu o crescimento de fibroblastos gengivais cultivados, indicando que a descontaminação pode ser tão importante quanto à exposição de matriz colágena na regeneração periodontal. De fato, em nosso trabalho, observamos que as células tiveram dificuldades em se aderir às superfícies contaminadas, ou seja, tratadas apenas por raspagem, a despeito da adição de fatores de crescimento.

Embora as evidências histológicas sejam bastante elucidativas, inclusive as apresentadas neste trabalho, alguns autores contestam os benefícios da aplicação de ácido para o condicionamento das superfícies radiculares STAHL¹⁸⁴ e STAHL & FROUM¹⁸⁵ (1977) demonstraram a formação de “adesão conjuntiva” em espécimes animais e humanos, observando reparo tecidual, formação de epitélio juncional longo e fibras colágenas com orientação paralela à superfície dentária, sem formação de cemento acelular e reinserção de fibras. Também CRIGGER et al.⁴³ (1978) trataram defeitos cirurgicamente criados em cães com condicionamento por ácido cítrico e demonstraram achados inconsistentes, ora com regeneração ora com reparo. PETTERSON & AUKHILL¹³⁴ (1986) mostraram maior porcentagem de anquilose nos grupos tratados com ácido. PARASHIS & MITSIS¹³¹ (1993) não encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com tetraciclina ou não 6 meses após a cirurgia. Também KARRING et al.⁹⁰ (1984) afirmaram não existir benefícios na utilização de tratamento ácido da raiz

com ácido cítrico durante 3 minutos. CAFFESSE et al.²⁸ encontraram pequeno aumento nas taxas de formação de novo osso, cemento e ligamento no tratamento periodontal regenerativo associado ou não ao tratamento com ácido cítrico e aplicação de fibronectina.

Baseados ainda em dados de literatura que demonstraram inibição da proliferação apical do epitélio juncional^{42,52}, formação de novo osso^{20,42} e novo cemento^{87,123}, redução da profundidade de sondagem¹⁵⁶, redução de recessões da margem gengival quando usadas conjuntamente com técnicas de recobrimento radicular^{195,196} e obtenção de reinserção^{01,18,19,42,52,87}, os efeitos benéficos do condicionamento ácido das raízes foram demonstrados neste trabalho, justificando seu emprego no tratamento regenerativo de dentes periodontalmente comprometidos.

Relativamente ao tempo usado para a desmineralização ácida, aplicou-se o tempo de 3 minutos considerando os relatos de literatura que mostraram que, neste período, ocorre desmineralização com exposição ótima de colágeno e mínimo risco à reabsorção radicular^{33,40,72,87,145,146,155}.

A aplicação dos fatores de crescimento às superfícies tratadas com ácido favoreceu ainda mais a adesão das células, com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados por raspagem, condicionamento ácido e combinação dos fatores de crescimento e aqueles tratados por raspagem seguida da aplicação de PDGF-BB, IGF-1 ou TGF- β . No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com a combinação com ou sem condicionamento ácido prévio. Ao analisar-se, porém, o número de células aderidas nos dois grupos, observa-se um número relativamente mais alto de células aderidas no primeiro ($13,250 \pm 1,797$) do que no segundo ($5,500 \pm 0,957$). Também não houveram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com os diferentes fatores de crescimento e pré-condicionados com ácido, o que pode ser, ao menos em parte, explicado pelo pequeno número de amostras e pelo curto período de observação utilizado.

Assim, a desmineralização de superfícies radiculares previamente à aplicação de fatores de crescimento não só torna as superfícies favoráveis à migração celular, como também facilita a união de novas fibrilas colágenas àquelas existentes no cemento ou dentina. Além disso, apresenta a capacidade de servir como um reservatório de liberação lenta dos fatores de crescimento, aumentando sua meia vida^{35,192}. LYNCH et al.¹⁰⁶ (1989) enfatizaram que, um dos grandes problemas no uso dos fatores de crescimento, é o emprego de carreadores que “segurem” as substâncias

empregadas por períodos mais prolongados de tempo na região tratada, permitindo usufruir suas propriedades. Demonstraram que a meia vida do PDGF e do IGF é de 4.2 e 3 horas, respectivamente, sendo que mais de 96% dos fatores não estavam mais presentes na área tratada depois de 4 dias.

Dos fatores de crescimento testados, o IGF-1 usado isoladamente foi, dos fatores de crescimento testados no grupo que sofreu desmineralização com ácido cítrico, o que menos influenciou a adesão de células FL2 a superfícies radiculares periodontalmente comprometidas, porém sem diferenças estatisticamente significativas com relação aos demais. No grupo não pré-condicionado, o TGF-B1 foi aquele que apresentou o menor número de células aderidas, inclusive inferior ao controle, mas também sem diferenças estatísticas com relação aos outros grupos não condicionados. Esse resultado parece ter sido mais influenciado pela pequena adesão de células à superfície dos fragmentos – que apresentavam grande quantidade de remanescentes teciduais calcificados ou não – do que ao efeito da substância propriamente dito.

Nossos achados não estão de acordo com os resultados apresentados por GAMAL et al.⁵⁷ (1998), visto que, em seu experimento, encontraram adesão de células superior nos grupos tratados pela combinação entre PDGF-BB e IGF-1 embora não diferente do tratamento com PDGF-BB, em amostras de dentina não condicionadas por tetraciclina.

A aparente divergência entre os resultados obtidos no teste proliferativo e de adesão das células FL2 diante da adição dos diferentes fatores de crescimento pode ser ainda parcialmente explicada pelos diferentes períodos de avaliação utilizados. No teste proliferativo, o número de células vitais aderidas ao plástico foi avaliado depois de 1, 3, 5 e 7 dias da adição das substâncias, enquanto que no teste de adesão as células foram permitidas a aderir sobre as superfícies tratadas por apenas 24 horas. Além disso, no primeiro experimento as células aderiram a um único substrato (plástico), enquanto que no segundo, as células aderiram sobre dois substratos distintos (dente e fator de crescimento). Esses dados são corroborados por ROMPEN, GOFFINET & NUSGENS¹⁶⁴ (1999) que mostraram, sob microscopia eletrônica de varredura e de transmissão em espécimes dentinários tratados por condicionamento em solução aquosa de ácido cítrico a 1% ou minociclina HCl a 2-5%, que o condicionamento ácido favoreceu significativamente a adesão dos fibroblastos à dentina após 24 horas. Quanto à taxa de proliferação celular, observaram resultados

significativamente maiores em intervalos de 048 horas nas células aderidas ao plástico do que à dentina não tratada.

Baseados nos resultados obtidos com os testes de proliferação e adesão celular, concluiu-se que a aplicação de fatores de crescimento, especialmente TGF- β 1 associado ou não ao PDGF-BB e IGF-1, sobre fragmentos radiculares previamente condicionados com solução em forma de gel de ácido cítrico associado à tetraciclina favorece a adesão e proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal. A regeneração periodontal é dependente dos eventos proliferativos, quimiotáticos e de diferenciação das células progenitoras capazes de se diferenciar em fibroblastos, cementoblastos e osteoblastos para produzir neoformação de osso, cimento e ligamento^{13,15,24,4960,86,89,116,190}. Portanto, sugerimos que o TGF- β 1 associado ou não ao PDGF-BB e IGF-1 possa contribuir para o rápido repovoamento por este tipo celular e a formação de novo ligamento periodontal.

O estudo *in vitro*, de acordo com FRESHNEY⁵⁴ (2000) apresenta como vantagens o controle do ambiente físico-químico como pH, temperatura, osmolaridade, tensão de CO₂, e das condições fisiológicas que podem ser mantidas relativamente constante, mas não podem ser definidas, além de fornecer bases para caracterização e obtenção de amostras mais homogêneas e de serem economicamente viáveis. Entretanto, as culturas devem ser conduzidas em condições totalmente assépticas, pois bactérias, fungos, vírus e protozoários crescem mais rapidamente do que as células, contaminando a cultura. Além disso, a quantidade de células disponíveis é limitada e as mesmas podem sofrer alterações das características iniciais com o aumento do número de passagens. Nos estudos *in vitro* interações celulares específicas da histologia tecidual são perdidas e, conforme as células crescem e se distribuem, perdem as interações heterotípicas e selecionam os tipos teciduais remanescentes, o que pode ser visto como vantajoso ou não.

Dos fatores de crescimento, o TGF- β 1 apresentou maior efeito proliferativo sobre as células de ligamento periodontal humano usadas neste experimento, seguida pela combinação dos três fatores avaliados até o 5º dia de avaliação. Já a combinação apresentou efeitos superiores na adesão de células a fragmentos dentários expostos ao ambiente da bolsa periodontal e, portanto, contaminados diferente estatisticamente dos demais grupos de tratamento. Embora os resultados dos estudos *in vitro* não possam ser diretamente extrapolados para as situações *in vivo*, acreditamos

que o uso do TGF- β 1 favoreceria a regeneração dos tecidos periodontais por promover uma rápida proliferação das células do ligamento periodontal, permitindo assim a síntese de proteínas necessárias à neoformação óssea, de cemento e ligamento periodontal mais precocemente e, ainda, por estimular a síntese de PDGF e seus receptores intracelularmente, além de ser economicamente mais viável do que o uso da combinação dos fatores de crescimento. A combinação dos fatores de crescimento também apresenta efeitos estimulatórios significantes sobre a proliferação e, principalmente, sobre a adesão das células às superfícies radiculares, possibilitando seu uso na terapêutica periodontal regenerativa. No entanto, ainda são necessários maiores estudos para determinar a toxicidade das substâncias sobre os componentes teciduais bem como identificar a melhor concentração, tempo e forma de aplicação dos mesmos *in vivo*.

7- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos dentro das condições deste estudo experimental sugeriram que:

- A adição dos fatores de crescimento ao meio de cultura DMEM associado a soro bovino fetal a 10% e solução antibiótica a 1% favorece a proliferação de células derivadas de ligamento periodontal humano;
- Dos fatores de crescimento avaliados, a adição de TGF- β seguido pela combinação dos mesmos apresenta tendência a resultados mais favoráveis na indução da proliferação dos fibroblastos de ligamento periodontal humano em cultura até o 5º dia de avaliação;
- A associação entre o tratamento com ácido cítrico e tetraciclina e a aplicação de fatores de crescimento para tratamento dos fragmentos radiculares obtidos de pacientes com evidências clínicas e radiográficas de doença periodontal severa favorece a adesão de células de ligamento periodontal humano;

Dentre os diversos fatores avaliados, a combinação dos fatores parece exercer melhor influência na adesão das células aos fragmentos radiculares.

ANEXO I

Tabela 3 Resultados da média de 3 contagens consecutivas em 3 diferentes placas/grupo nos períodos de tempo designados (em valores absolutos)

Grupo	Placa	<i>Dia 0</i>	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 3</i>	<i>Dia 5</i>	<i>Dia 7</i>
Grupo 1	1	10^3	$1,33 \times 10^3$	$3,33 \times 10^3$	$4,00 \times 10^3$	$5,33 \times 10^3$
	2	10^3	$3,33 \times 10^3$	$4,66 \times 10^3$	$6,00 \times 10^3$	$6,66 \times 10^3$
	3	10^3	$4,00 \times 10^3$	$4,66 \times 10^3$	$9,33 \times 10^3$	$8,00 \times 10^3$
Grupo 2	1	10^3	$2,00 \times 10^3$	$4,66 \times 10^3$	$7,33 \times 10^3$	$12,00 \times 10^3$
	2	10^3	$2,66 \times 10^3$	$7,33 \times 10^3$	$7,33 \times 10^3$	$12,00 \times 10^3$
	3	10^3	$2,66 \times 10^3$	$8,66 \times 10^3$	$8,00 \times 10^3$	$14,00 \times 10^3$
Grupo 3	1	10^3	$0,66 \times 10^3$	$4,00 \times 10^3$	$6,00 \times 10^3$	$7,33 \times 10^3$
	2	10^3	$0,66 \times 10^3$	$4,66 \times 10^3$	$6,00 \times 10^3$	$9,33 \times 10^3$
	3	10^3	$2,66 \times 10^3$	$5,33 \times 10^3$	$6,66 \times 10^3$	$10,66 \times 10^3$
Grupo 4	1	10^3	$1,33 \times 10^3$	$4,66 \times 10^3$	$5,33 \times 10^3$	$12,00 \times 10^3$
	2	10^3	$2,00 \times 10^3$	$5,33 \times 10^3$	$7,33 \times 10^3$	$19,33 \times 10^3$
	3	10^3	$3,33 \times 10^3$	$6,66 \times 10^3$	$8,00 \times 10^3$	$20,00 \times 10^3$
Grupo controle 1	1	10^3	$2,00 \times 10^3$	$1,33 \times 10^3$	$1,33 \times 10^3$	$4,00 \times 10^3$
	2	10^3	$2,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$4,00 \times 10^3$	$5,33 \times 10^3$
	3	10^3	$2,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$4,66 \times 10^3$	$8,66 \times 10^3$
Grupo controle 2	1	10^3	$0,66 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$3,33 \times 10^3$	$10,00 \times 10^3$
	2	10^3	$1,33 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$4,00 \times 10^3$	$10,00 \times 10^3$
	3	10^3	$2,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$4,66 \times 10^3$	$11,33 \times 10^3$

ANEXO II

TABELA 4- ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS FL2 (VALORES ABSOLUTOS)

Grupos/dias		Nº médio de células	Desvio-padrão	Erro padrão
Grupo 1	D1	2886,667	1389,112	802,004
	D3	4216,667	767,876	1907,509
	D5	6440,000	2687,155	6675,262
	D7	6663,333	1335,003	3316,332
Grupo 2	D1	2440,000	381,051	946,584
	D3	6883,333	2037,065	5060,350
	D5	7553,333	386,825	960,926
	D7	12886,667	1535,752	3815,019
Grupo 3	D1	1326,667	1154,701	2868,435
	D3	4663,333	665,006	1651,967
	D5	6220,000	381,051	946,584
	D7	9106,667	1676,196	4163,902
Grupo 4	D1	2220,000	1017,988	2528,823
	D3	5550,000	1017,988	2528,823
	D5	6886,667	1389,112	3450,747
	D7	17110,000	4438,051	11024,731
Grupo controle 1	D1	2000,000	0,000	0,000
	D3	1776,667	386,25	960,926
	D5	3330,000	1763,207	4380,050
	D7	5996,667	2400,465	5963,086
Grupo controle 2	D1	1330,000	670,000	1664,372
	D3	2000,000	0,000	0,000
	D5	3996,667	665,006	1651,967
	D7	10443,333	767,876	1907,509

ANEXO III

TABELA 5- TESTE DE TUKEY PARA AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO ESTIMULADA PELA ADIÇÃO DOS DIFERENTES FATORES DE CRESCIMENTO AO MEIO DE CULTURA*** (NÚMERO ABSOLUTO)

Grupos	Dia 3					Dia 7				
	G1	G2	G3	G4	GC	G1	G2	G3	G4	GC
Grupo 1	-	0,069	0,994	0,622	0,106	-	0,060	0,792	0,002*	0,999
Grupo 2	-	-	0,161	0,622	0,001*	-	-	0,408	0,303	0,792
Grupo 3	-	-	-	0,890	0,069	-	-	-	0,013*	0,979
Grupo 4	-	-	-	-	0,012*	-	-	-	-	0,041*

Onde: G1 – Grupo 1; G2 – Grupo 2; G3 - Grupo 3, G4 - Grupo 4; GC – Grupo controle

*** Só estão descritos os valores de p dos diferentes grupos nos períodos avaliados que apresentaram diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de ANOVA.

*estatisticamente significante se $p < 0,05$

** GC1 x GC2 – $p = 1,000$

TABELA 6- TESTE DE TUKEY PARA AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO ESTIMULADA PELA ADIÇÃO DOS DIFERENTES FATORES DE CRESCIMENTO AO MEIO DE CULTURA*** (TAXA DE PROLIFERAÇÃO EM %)

Grupos	Dia 3					Dia 5				
	G1	G2	G3	G4	GC	G1	G2	G3	G4	GC

<i>Grupo 1</i>	-	0,186	1,000	0,894	0,058	-	0,917	0,361	0,597	0,022*
<i>Grupo 2</i>	-	-	0,154	0,566	0,002*	-	-	0,799	0,962	0,080
<i>Grupo 3</i>	-	-	-	0,841	0,071	-	-	-	0,990	0,385
<i>Grupo 4</i>	-	-	-	-	0,015*	-	-	-	-	0,211

Onde: G1 – Grupo 1; G2 – Grupo 2; G3 - Grupo 3, G4 - Grupo 4; GC – Grupo controle

*** Só estão descritos os valores de p dos diferentes grupos nos períodos avaliados que apresentaram diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de ANOVA.

*estatisticamente significante se $p < 0,05$

ANEXO IV

Tabela 7- Identificação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos de tratamento e o grupo controle segundo o método de Dunnet - Taxa de proliferação de células FL2 em relação ao controle (em %)

Grupos	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 7
<i>G1 x controle</i>	-	Sim	Sim	-
<i>G2 x controle</i>	-	Sim	Sim	-
<i>G3 x controle</i>	-	Sim	-	-
<i>G4 x controle</i>	-	Sim	Não	-

G=grupo

Tabela 8 - Identificação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos de tratamento e o grupo controle segundo o método de Dunnet - Aumento do número de células FL2 em relação ao controle (em valores absolutos)*

Grupos	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 7
<i>G1 x controle</i>	-	Sim	Não	Não
<i>G2 x controle</i>	-	Não	Sim	Não
<i>G3 x controle</i>	-	Sim	Sim	Não
<i>G4 x controle</i>	-	Não	Sim	Sim

G=grupo

* Não houve diferença estatisticamente entre os grupos controle 1 e 2

ANEXO V

Tabela 9- Valores de p obtidos segundo o método de Student-Newman-Keuls para avaliação dos efeitos dos diferentes fatores de crescimento aplicados sobre fragmentos radiculares previamente condicionados ou não com associação de ácido cítrico e tetraciclina na adesão de células FL2 nos diferentes grupos (*significante se $p < 0,05$)

Grupos	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
G1	-	0,975	0,975	0,767	0,997	0,176	0,084	0,220	0,288	0,045*
G2	-	-	0,916	0,608	1,000	0,395	0,093	0,330	0,353	0,045*
G3	-	-	-	0,713	0,994	0,309	0,091	0,288	0,330	0,046*
G4	-	-	-	-	0,346	0,140	0,015•	0,093	0,091	0,006•
G5	-	-	-	-	-	0,510	0,114	0,412	0,422	0,054
G6	-	-	-	-	-	-	0,584	0,752	0,905	0,447
G7	-	-	-	-	-	-	-	0,608	0,401	0,673
G8	-	-	-	-	-	-	-	-	0,916	0,518
G9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,418

• Estatisticamente significativo segundo o teste aplicado

ANEXO VI

QUADRO I – MODELO DA FICHA PARA COLETA DE DADOS DOS PACIENTES

Nº controle						
Data						
Dados Pessoais						
Nome						
IDADE						
RAÇA						
Sexo						
DENTE/SÍTIOS	MV	V	DV	ML	L	DL
PROFUNDIDADE DE SONDAGEM						
NÍVEL DE INSERÇÃO À SONDAGEM						
SANGRAMENTO À SONDAGEM						
SUPURAÇÃO						
MOBILIDADE						
ALTERAÇÕES SISTÊMICAS						
OUTRAS OBSERVAÇÕES						

Legenda: Para cada dente obtido, foram anotados, além da identificação pessoal do paciente (Dados Pessoais), o número do dente extraído (Coluna direita – dentes/sítios) e a profundidade de sondagem (distância da margem gengival até o fundo da bolsa), nível de inserção à sondagem (distância da JCE ao fundo da bolsa), sangramento à sondagem (sim ou não), supuração (sim ou não) e mobilidade (Grau de mobilidade) nos sítios méso-vestibular (MV), centro da face vestibular (V), disto-vestibular (DV), méso-lingual (ML), centro da face lingual (L) e disto-lingual (DL). Também foram anotadas possíveis alterações sistêmicas não contra-indicassem o procedimento cirúrgico e o eventual uso de medicamentos, hábito de fumar, entre outros. Cada dente recebeu um número de identificação (1ª coluna/1ª linha) e foi acondicionado em frasco de biópsia individualizado e identificado com o número do protocolo correspondente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01- ALBAIR, W. B.; COBB, C. M.; COLLOY, W. J. Connective tissue attachment to periodontally diseased roots after citric acid demineralization. **J. Periodont. Res.**, v.53, n.8, p. 515-25, Aug.1982.
- 02- ALEO, J. J.; DE RENZIS, F. A.; FARBER, P. A. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. **J. Periodont.**, v.46, n.11, p. 639-45, Nov. 1975
- 03- ALVARES, O. et al. Growth factors effects on expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. **J. Periodont.**, v.66, n.7, p. 552-8, July 1995.
- 04- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. **J. Periodont.**, v.67, n.5, p.545-53, May 1996.
- 05- ANDERSON, T. J. et al. Effects of transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor on human gingival fibroblasts grown in serum-containing and serum-free medium. **J. clin. Periodont.**, v.25, n.1, p. 48-55, Jan. 1998.
- 06- ARCEO, N. et al. Human periodontal ligament cells initiate mineral-like nodules in vitro. **J. Periodont.**, v.62, n.8, p. 500-3, Aug. 1991.
- 07- ASSOIAN, R. K.; SPORN, M. B. Type β transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. **J. Cell Biol.**, v.102, p. 1217-23, Apr. 1986.
- 08- ASSOIAN, R. K. et al. Transforming growth factor-beta in human platelets: identification of a major storage site, purification and characterization. **J. Biol. Chem.**, v.258, n.11, p. 7155-60, June 1983.
- 09- AUKHIL,I.; IGLHAUT, J. Periodontal ligament cell kinetics following experimental regenerative procedures. **J. clin. Periodont.**, v.15, n.10, p.74-82, Nov./Dec. 1988.
- 10- BAKER, P. J. et al. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. **J. Periodont.**, v.54, n.10, p.580-5, Oct. 1983.
- 11- BARTOLD, P. M.; RABEN, A. Growth factor modulation of fibroblast in simulated wound healing. **J. Periodont. Res.**, v.31, n.3, p. 205-16, Apr. 1996.
- 12- BARTOLD, P. M.; NARAYANAN, A. S.; PAGE, R. C. Platelet-derived growth factor reduces the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation. **J. Periodont. Res.**, v.27, n.5, p. 499-505, 1992.
- 13- BEERTSEN, W.; MC CULLOCH, C. A. G.; SODEK, J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. **Periodontology 2000** v.13, p. 20-75, 1997.

- 14- BELLOWS, C. G. et al. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically-released rat calvaria cell populations. **Calcif. Tissue Int.**, v.38, n.3, p. 143-54, Mar. 1986.
- 15- BERKOVITZ, B. K. B.; SHORE, R. C. Cells of the periodontal ligament. In: BERKOVITZ, B.K.B.; MOXHAM, B. J.; NEWMAN, H. N. **The periodontal ligament in health and disease**. 2.ed. Barcelona, Mosby Wolfe, 1995. Cap. 1, p. 9-33.
- 16- BJORVATN, K.; SKAUG, N; SELVIG, K. A. Tetracycline-impregnated enamel and dentin: duration of antimicrobial capacity. **Scand. J. dent. Res.**, v.93, n.3, p. 192-7, June 1985.
- 17- BLOM, S.; HOLMSTRUP, P.; DABLESTTEN, E. The effect of insulin-like growth factor-I and human growth hormone on PDL fibroblast morphology, growth pattern, DNA synthesis and receptor binding. **J. Periodont.**, v.63, n.12, p. 960-8, Dec. 1992.
- 18- BLOMLÖF, J. Root cementum appearance in healthy monkeys and periodontitis-prone patients after different etching modalities. **J. Clin. Periodont.**, v.23, n.01, p. 12-8, Jan. 1996.
- 19- BLOMLÖF, J. et al. Root surface etching at neutral pH promotes periodontal healing. **J. clin. Periodont.**, v.23, n.1, p. 50-5, Jan. 1996.
- 20- BOGLE, G. et al. New attachment after surgical treatment and acid conditioning of roots in naturally occurring periodontal disease in dogs. **J. Periodont. Res.**, v.16, n.1, p. 130-3, Jan./Feb. 1981.
- 21- BORDIN, S. et al. Fibroblast subtypes in the periodontium. A possible role in connective tissue regeneration and periodontal reattachment. **J. Periodont. Res.**, v.19, n.6, p. 642-4, Nov. 1984.
- 22- BOWEN-POPE, D. F.; ROSS, R. Platelet-derived growth factor: specific binding to cultured cells. **J. Biol. Chem.**, v.257, n.9, p. 5161-71, May 1982.
- 23- BOWEN-POPE, D. F. et al. Platelet-derived growth-factor in vivo: levels, activity and rate of clearance. **Blood**, v.64, n.2, p. 458-69, Aug. 1984.
- 24- BOWERS, G. M. SCHALLHORN, R.; MELLONIG, J. T. Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. **J. Periodont.**, v.56, n.8, p. 509-14, Aug. 1982.
- 25- BOYAN, L. A. et al. Mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to the different isoforms of platelet-derived growth-factor. **J. dent. Res.**, v.73, n.10, p. 1593-600, Oct. 1994.
- 26- BOYKO, G. A.; BRUNETTE, D. M.; MELCHER, A. H. Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro. **J. Periodont. Res.**, v.15, n.3, p. 297-303, May/June 1980.

- 27- CAFFESSE, R.G.; QUIÑONES, C.R. Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. **Periodontology** 2000, v.1, p.69-79, 1993.
- 28- CAFFESSE, R. G. et al. Clinical evaluation of the use of citric acid and autologous fibronectin in periodontal surgery. **J. Periodont.**, v.59, n.9, p.565-9, May 1988.
- 29- CANALIS, E. Effect of insulin like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. **J. Clin. Invest.**, v.66, n.4, p.709-19, Oct. 1980.
- 30- CANALIS, E.; MCCARTHY, T.; CENTRELLA, M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. **J. Clin. Invest.**, v.81, n.02, p. 277-81, Feb. 1988.
- 31- CANALIS, E.; MCCARTHY, T.; CENTRELLA, M. Isolation and characterization of insulin-like growth factor-I (somatomedin-C) from cultures of fetal rat calvariae. **Endocrinology**, v.122, n.1, p.22-7, Jan. 1988.
- 32- CENTRELLA, M.; MASSAGUÉ, J.; CANALIS, E. Human platelet-derived growth factor- β stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. **Endocrinol.**, v.119, n.5, p. 2306-12, Nov. 1986.
- 33- CHAVES, E. et al. The effect of citric acid application on periodontally involved root surfaces. II. An in vitro scanning electron microscopic study. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.13, n.2, p. 189-96, Mar./Apr. 1993.
- 34- CHILDS, C. B. et al. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.79, n.17, p. 5312-6, Sept. 1982.
- 35- CHO, M.-I.; LIN, W.-L.; GENCO, R. J. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. **J. Periodont.**, v.66, n.6, p. 522-30, June 1995.
- 36- CHO, M.-I. et al. Differential regulation of periodontal ligament cell activities by platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor I and epidermal growth factor. In: GENCO, R. et al. **Molecular pathogenesis of periodontal disease**. Washington, ASM, 1994. Cap. 32, p.403-14.
- 37- CHOMETTE, G. et al. Les cellules du ligament parodontal humain normal. Étude ultrastructurale, histoenzymologique et immunocytochimique sur cultures in vitro. **J. Biol. Buccale**, v.15, n.4, p.217-24, Dec. 1987.
- 38- CLAFFEY, N. et al. Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles. **Acta Odontol. Scand.**, v.45, n.3, p. 141-6, June 1984.
- 39- CLARK, R. A. F. et al. Platelet isoforms of platelet-derived growth factors stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. **J. Clin. Invest.**, v.84, n.3, p. 1036-40, Sept. 1989.
- 40- CODELLI, G. R.; FRY, H. R.; DAVIS, J. W. Burnished versus nonburnished application of citric acid to human diseased root surfaces: the effect of time and method of application. **Quintessence Int.**, v.22, n.4, p. 277-83, Apr. 1991.

- 41- COGEN, R. et al. Effect of various root surface treatments on the attachment and growth of human gingival fibroblasts: histologic and scanning electron microscopic evaluation. **J. clin. Periodont.**, v.11, n.8, p. 531-9, Sept. 1984.
- 42- COLE, R. T. et al. Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. **J. Periodont. Res.**, v.15, n.1, p. 1-9, Jan./Feb. 1985.
- 43- CRIGGER, M. et al. The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. **J. Periodont. Res.**, v.13, n.6, p. 538-49, Nov./Dec. 1978.
- 44- DENNISON, D. K. et al. Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. **J. Periodont.**, v.65, n.7, p. 641-8, July, 1994.
- 45- DEUEL, T. F.; HUANG, H. S. Platelet-derived growth factor. Structure, function and roles in normal and transformed cells. **J. Clin. Invest.**, v.74, n.3, p. 669-76, Sept. 1984.
- 46- DEUEL, T. F. et al. Growth factors and wound healing: platelet-derived growth factor as a model cytokine. **Ann. Rev. Med.**, v.42, p. 567-84, 1991.
- 47- DEUEL, T. F. et al. Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet derived growth factor. **J. Clin. Invest.**, v.69, n.4, p. 1046-9, Apr. 1982.
- 48- DEUEL, T. F. et al. Human platelet-derived growth factor. Purification and resolution into two active protein fractions. **J. Biol. Chem.**, v.256, n.17, p. 8896-9, Sept. 1981.
- 49- EGELBERG, J. Regeneration and repair of periodontal tissues. **J. Periodont. Res.**, v.22, n.2, p. 232-42, Mar./Apr. 1987.
- 50- FARDAL, O.; LOWENGERG, B. F. A quantitative analysis of the migration, attachment and orientation of human gingival fibroblasts to human dental root surfaces *in vitro*. **J. Periodont.**, v.61, n.8, p. 529-35, Aug. 1990.
- 51- FERNYHOUGH, W.; PAGE, R. C. Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots. **J. Periodont.**, v.54, n.3, p.133-40, Mar. 1983.
- 52- FRANK, R. M.; FIORE-DONNO, G.; CIMASONI, G. Cementogenesis and soft tissue attachment after citric acid treatment in a human. An electron microscopic study. **J. Periodont.**, v.54, n.7, p. 389-401, July 1983.
- 53- FRANTZ, B.; POLSON, A. M. Tissue interactions with dentin specimens after demineralization with tetracycline. **J. Periodont.**, v.59, n.11, p.714-21, Nov. 1988.
- 54- FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells – A manual of basic technique**. 3.ed. Wiley-Liss, New York, 2001.

- 55- FROLIK, C. A et al. Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor-beta in normal rat kidney fibroblasts **J. Biol. Chem.**, v.259, n.17, p. 10995-11000, Sept. 1984 ASSOIAN, R. K.; SPORN, M. B.⁰⁷, 1986. p.1217-8.
- 56- GALETTI, R. et al. In vitro study of periodontal ligament cells. **Minerva Stomatol.**, v.49, n.4, p. 149-54, Apr. 2000.
- 57- GAMAL, A. Y. et al. Human periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCl conditioned root surfaces. **J. clin. Periodont.**, v.25, n.5, p. 404-12, May 1998.
- 58- GARANT, P. Collagen resorption by fibroblasts. A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament. **J. Periodont.**, v.47, n.12, p.380-90, Dec. 1976.
- 59- GARANT, P.; CHO, M. -I. Autorradiographic evidence of the coordination of the genesis of Sharpey's fibers with new bone formation in the periodontium of the mouse. **J. Periodont. Res.**, v.14, n.2, p. 107-14, Mar. 1979.
- 60- GARRET, S. Early wound healing stability and its importance in periodontal regeneration. In: POLSON, A. M. **Periodontal regeneration: current status and concepts.** Chicago, Quintessence, 1994. p. 41-52.
- 61- GIANNOBILE, W. V. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. In: LYNCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. **Tissue engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics.** Carol Stream, Quintessence, 1999. Cap. 14, p. 231-44.
- 62- GIANNOBILE, W. V.; FINKELMAN, R. D.; LYNCH, S. E. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. **J. Periodont.**, v.65, n.12, p. 1158-68, Dec. 1994
- 63- GIANNOBILE, W. V. et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on regeneration in *Macaca fascicularis*. **J. Periodont. Res.**, v.31, n.5, p.301-12, July 1996.
- 64- GLENN, K; BOWEN-POPE, D. F.; ROSS, R. Platelet-derived growth factor: identification of a platelet-derived growth factor receptor by affinity labeling. **J. Biol. Chem.**, v.257, n.9, p. 5172-6, May 1982.
- 65- GOTTLow, J. Principles of regenerative therapy. In; GENCO, R. J. et al. (eds). **Molecular pathogenesis of periodontal disease.** Washington, ASM Press, 1994. Cap.31, p. 393-402.
- 66- GOTTLow, J.; NYMAN, S.; KARRING, T. Healing following citric acid conditioning of roots implanted into bone and gingival connective tissue. **J. Periodont. Res.**, v.19, n.6, p. 214-20, 1984.

- 67- GOULD, T. R. L.; MELCHER, A. H.; BRUNETTE, D. M. Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. **J. Periodont. Res.**, v.15, p. 20-41, 1980.
- 68- GRAVES, D.T.; COCHRAN, D.L. Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. In: WILLIAMS, R.C.; YUKNA, R.A.; NEWMAN, M.G. **Current Opinion Periodontology**. 2 ed. Philadelphia, Current Science, 1994. Cap. 18, p.178-86.
- 69- GREEN, R. J. et al. Immunolocalization of platelet-derived growth factors A and B chains and PDGF- α and β receptors in gingival wounds. **J. Periodont. Res.**, v.32, n.2, p.209-14, Feb. 1997.
- 70- GROENEVELD, M C., EVERTS, V.; BEERTSEN, W. A quantitative enzyme histochemical analysis of the distribution of alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament of the rat incisor. **J. dent. Res.**, v.72, n.9, p.1344-50, Sept. 1993.
- 71- HANES, P. J.; O'BRIEN, N. J.; GARNICK, J. J. A morphological comparison of radicular dentin following root planing and treatment with citric acid or tetracycline HCl. **J. clin. Periodont.**, v.18, n.9, p. 660-8, Oct. 1991.
- 72- HANES, P. J.; POLSON, A. M. Cell and fiber attachment to demineralized cementum from normal root surfaces. **J. Periodont.**, v.60, n.4, p. 188-98, Apr. 1989.
- 73- HANES, P. J.; POLSON, A. M.; FREDRICK, G. Initial wound healing attachment to demineralized dentin. **J. Periodont.**, v.59, n.3, p. 176-88, Mar. 1988.
- 74- HANES, P. J.; POLSON, A. M.; LADENHEIN, S. Cell and fiber attachment to demineralized dentin from normal root surfaces. **J. Periodont.**, v.56, n.12, p. 752-65, Dec. 1985.
- 75- HART, C. E. et al. Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. **Biochemistry**, v. 29, n.01, p.166-72, Jan. 1990.
- 76- HART, C. E. et al. Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. **Science**, v.240, n.4858, p. 1529-31, June 1988.
- 77- HELDIN, C. H. et al. Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types. **EMBO J**, v.7, p. 1387-93, 1988 apud HART, C. E.⁷⁵, 1990. p.166.
- 78- HERR, Y. et al. The origin of fibroblasts and their role in the early stages of horizontal furcation defect healing in the beagle dog. **J. Periodont.**, v.66, n.10, p. 915-23, Oct. 1995.
- 79- HIGASHI, T. et al. Collagen formation at the tooth-cell interface: comparative ultrastructural study on the effect of partial demineralization of cementum with dentin. **J. Periodont.**, v.66, n.4, p. 267-73, Apr. 1995.

- 80- HOCK, J. M.; CENTRELLA, M.; CANALIS, E. Insulin-like growth factor-I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. **Endocrinology**, v.122, n.1, p. 254-60, Jan. 1988.
- 81- HOU, L. -T.; YAEGER, J. A. Cloning and characterization of human and periodontal ligament fibroblasts. **J. Periodont.**, v.64, n.12, p.1209-18, Dec. 1993.
- 82- HOWELL, T. H. et al. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. **J. Periodont.**, v.68, n.12, p. 1186-93, Dec. 1997.
- 83- HUANG, J. S. et al. Platelet-derived growth factor. Specific binding to target cells. **J. Biol. Chem.**, v.257, n.14, p. 8130-6, July 1982.
- 84- ISAKA, J. et al. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. **J. Periodont.**, v.72, n.03, p. 314-23, Mar. 2001.
- 85- ISHIKAWA, O.; LEROY, E. C.; TROJANOWSKA, M. Mitogenic effect of transforming growth factor β 1 on human fibroblasts involves the induction of platelet-derived growth factor- α receptors. **J. Cell Physiol**, v.145, n.1, p.181-6, Oct. 1990.
- 86- ISIDOR, F. et al. The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. **J. clin. Periodont.**, v.13, n.2, p. 145-50, Feb. 1986.
- 87- ISIDOR, F. et al. New attachment formation on citric acid treated roots. **J. Periodont. Res.**, v.20, n.04, p. 421-30, July 1985.
- 88- KARRING, T.; NYMAN, S.; LINDHE, J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissues. **J. clin. Periodont.**, v.7, n.2, p.96-105, Apr. 1980.
- 89- KARRING, T. et al. Development of the biological concept of guided tissue regeneration – animal and human studies. **Periodontology 2000**, v.1, p.26-35, Feb. 1993.
- 90- KARRING, T. et al. New attachment formation on citric acid and non-citric acid treated roots. **J. Periodont. Res.**, v.19, p. 666-9, 1984.
- 91- KOHLER, N.; LIPTON, A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. **Exp. Cell. Res.**, v.87, p. 297-301, 1974 apud BOYAN et al.²⁵, 1994. p.1593.
- 92- KURU, L. et al. Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells. **J. Periodont. Res.**, v.34, n.2, p. 123-7, Feb. 1999.
- 93- KURU, L. et al. Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. **J. dent. Res.**, v.77, n.4, p. 555-64, Apr. 1998.
- 94- LABAHN, R. et al. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. **J. Periodont.**, v.63, n.4, p. 303-9, Apr. 1992.

- 95- LAFFERTY, T. A. GHER, M. E.; GRAY, J. L. Comparative SEM study on the effect of acid etching with tetracycline HCl or citric acid on instrumented periodontally involved human surfaces. **J. Periodont.**, v.64, n.8, p. 689-93, Aug. 1993.
- 96- LARJAVA, H. et al. Effect of citric acid treatment on the migration of epithelium on root surfaces in vitro. **J. Periodont.**, v.59, n.2, p. 95-9, Feb. 1988.
- 97- LEKIC, P. et al. Phenotypic comparisons of periodontal cells in vivo e in vitro. **J. Periodont. Res.**, v.71, n.09, p. 71-9, Apr. 2001.
- 98- LEKIC, P.; SODEK, J.; McCULLOCH, C. A. G. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. **Anat. Rec.**, v.244, n.1, p.50-8, Jan. 1996.
- 99- LOWENBERG, B. F. et al. A new ⁵¹chromium assay for accurate measurement of cell attachment to demineralized and non-demineralized dentin in vitro. **J. dent. Res.**, v.65, p.1010-5, 1986.
- 100- LOWENBERG, B. F. et al. The influence of chemically-induced modifications of root surfaces on cell migration, attachment and orientation. **J. dent. Res.**, v.65, n.7, p. 1010-5, July 1986.
- 101- LOWENGUTH, R. A.; BLIEDEN, T. M. Periodontal regeneration: root surface demineralization. **Periodontology 2000** v.1, p.54-68, Feb. 1993.
- 102- LYNCH, S. E. The role of growth factors in periodontal repair and regeneration. In: POLSON, A. M. **Current status of periodontal regeneration**. Chicago, Quintessence, 1994. Cap. 11, p. 179-98.
- 103- LYNCH, S. E.; GIANNOBILE, W. V. Polypeptide growth factors: molecular mediators of tissue repair. In: GENCO, R. J. **Molecular pathogenesis of periodontal diseases**. Washington, ASM Pub., 1994. P. 415.
- 104- LYNCH, S. E.; COLVIN, R. B.; ANTONIADES, H. N. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. **J. Clin. Invest.**, v.84, n.2, p. 641-5, Aug. 1989.
- 105- LYNCH, S. E. et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. **J. Periodont.**, v.62, n.7, p. 458-67, July 1991.
- 106- LYNCH, S. E. et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **J. clin. Periodont.**, v.16, n.8, p.545-8, Sept. 1989.
- 107- MacNEIL, R. L. et al. Bone sialoprotein is localized to the root surface. **J. Bone Miner. Res.**, v.9, p. 1597-1606, 1994.

- 108- MADISON, J. G. III; HOKETT, S. D. The effects of different tetracyclines on the dentin root surface of instrumented, periodontally involved human teeth: a comparative scanning electron microscope study. **J. Periodont.**, v.68, n.8, p. 739-45, Aug. 1997.
- 109- MAILHOT, J. M. et al. Porous polysulfone coated with platelet-derived growth factor-BB stimulates proliferation of human periodontal ligament fibroblasts. **J. Periodont.**, v.67, n.10, p. 981-5, Oct. 1996.
- 110- MAILHOT, J. M. et al. Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF- β stimulation. **J. clin. Periodont.**, v.22, n.9, p. 679-85, Sept. 1995.
- 111- MARIOTTI, A.; COCHRAN, D. L. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. **J. Periodont.**, v.61, n.2, p. 103-11, Feb. 1990.
- 112- MATSUDA, N. et al. Mitogenic, chemotatic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. **J. Periodont.**, v.63, n.6, p. 515-25, June 1992.
- 113- McCARTHY, T. L.; CENTRELLA, M.; CANALIS, E. Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. **Endocrinology**, v.124, n.01, p.301-9, Jan. 1989.
- 114- McCAULEY, L. K.; SOMERMAN, M. J. Biologic modifiers in periodontal regeneration. **Dent. Clin. North Am.**, v.42, n.2, p. 361-88, Apr. 1998.
- 115- McCULLOCH, C. A. G. Origins and functions of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblasts in tissue homeostasis. **Oral Dis.**, v.1, n.4, p. 271-8, Dec. 1995.
- 116- McCULLOCH, C. A. G. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. **Periodontology 2000**, v.1, p. 16-25, Feb. 1993.
- 117- McCULLOCH, C. A. G.; BORDIN, S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. **J. Periodont. Res.**, v.26, n.3, p.144-54, May 1991.Pt.1.
- 118- MELCHER, A. H. et al. Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo. **J. Periodont. Res.**, v.22, n.3, p. 246-7, May 1987.
- 119- MELCHER, A. H. On the repair potential of periodontal tissues. **J. Periodont.**, v.47, n.5, p. 256-70, May 1976.
- 120- MILLER JR., P. D. Root coverage using the free soft tissue autograft following citric acid application. III. A successful and predictable procedure in areas of deep-wide recession. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.2, n.1, p. 15-37, Jan./Feb. 1985.
- 121- MOCHIZUKI, H. et al. Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. **Endocrinology**, v.131, n.3, p. 1075-80, Sept. 1992.
- 122- MUMFORD, J. H. et al. The effects of growth-derived growth factor-BB on periodontal cells in an in vitro wound model. **J. Periodont.**, v.72, n.03, p.331-40, Mar. 2001.

- 123- NALBANDIAN, J.; COTE, N. Direct histological comparison of periodontal wound healing in the beagle dog with and without citric acid conditioning. **J. Periodont. Res.**, v.17, n.6, p. 552-62, Nov./Dec. 1982.
- 124- NISHIMURA, F.; TERRANOVA, V. P. Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors. **J. dent. Res.**, v.75, n.4, p. 986-92, Apr. 1996.
- 125- NISHIMURA, K. et al. The chemoattractive potency of periodontal ligament, cementum and dentin for human gingival fibroblasts. **J. Periodont. Res.**, v.24, n.02, p. 146-8, Mar. 1989.
- 126- NOHUTCU, R. M. et al. Expression of mineral-associated proteins by periodontal ligament cells: in vitro vs. in vivo. **J. Periodont. Res.**, v.31, n.5, p. 369-72, July 1996.
- 127- NYMAN, S. et al. The regenerative potential of periodontal ligament: an experimental study in the monkey. **J. clin. Periodont.**, v.9, n.3, p.257-65, Jun. 1982.
- 128- NYMAN, S. et al. Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. **J. clin. Periodont.**, v.7, n.5, p. 394-401, Oct. 1980.
- 129- OATES, T. W.; ROUSE, C. A.; COCHRAN, D. L. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. **J. Periodont.**, v.64, n.2, p. 142-8, Feb. 1993.
- 130- OATES, T. W. et al. Receptor binding of PDGF-AA and PDGF-BB and the modulation of PDGF receptors by TGF- β in human periodontal ligament cells. **J. Cell Physiol.**, v.102, n.3, p.359-66, Mar. 1995.
- 131- PARASHIS, A. O.; MITSIS, F. J. Clinical evaluation of the effect of tetracycline root preparation on guided tissue regeneration in the treatment of class II furcation defects. **J. Periodont.**, v.64, n.2, p. 133-6, Feb. 1993.
- 132- PARK, J.-B. et al. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. **J. Periodont.**, v.66, n.6, p. 462-77, June 1995.
- 133- PENDER, N.; McCULLOCH, C. A. G. Quantitation of actin polymerization in two human fibroblast subtypes responding to mechanical stretching. **J. cell Sci.**, v.100, Pt.I, p. 187-93, Sept. 1991.
- 134- PETTERSON, E. C.; AUKHIL, I. Citric acid conditioning of roots affects guided tissue regeneration in experimental wounds. **J. Periodont. Res.**, v.21, n.05, p.543-52, Sept. 1986.
- 135- PFEILSCHIFTER, J. et al. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between insulin-like growth factor-I, platelet-derived growth factor and transforming growth factor-B. **Endocrinology**, v.127, n.1, p. 69-75, Jan. 1990.

- 136- PICHE, J. E.; CARNES, D. L.; GRAVES, D. T. Initial characterization of cells derived from human periodontia. **J. dent. Res.**, v.68, n.5, p. 761-7, May 1989.
- 137- PIERCE, G. F. et al. Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing wound treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. **J. Clin. Invest.**, v.96, n.3, p. 1336-50, Sept. 1995.
- 138- PIERCE, G. F. et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. **J. Cell Biol.**, v.109, n.1, p. 429-40, July 1989.
- 139- PITARU, S.; MELCHER, A. H. Organization of an oriented fiber system in vitro by human gingival fibroblasts attached to dental tissue: relationship between cells and mineralized and demineralized tissue. **J. Periodont. Res.**, v.22, n.1, p. 6-13, Jan. 1987.
- 140- PITARU, S.; McCULLOCH, C. A. G.; NARAYANAN, S. A. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. **J. Periodont. Res.**, v.29, n.2, p. 81-94, Mar. 1994.
- 141- PITARU, S. et al. Cell migration, attachment and orientation in vitro are enhanced by partial demineralization of dentine and cementum and inhibited by bacterial endotoxin. **J. Periodont. Res.**, v.19, n.6, p. 661-5, Nov./Dec. 1984.
- 142- PITARU, S. et al. The influence of the morphological and chemical nature of dental surfaces on the migration, attachment and orientation of human gingival fibroblasts in vitro. **J. Periodont. Res.**, v.19, n.4, p. 408-18, July/Aug. 1984.
- 143- POLSON, A. M.; CATON, J. Factors influencing periodontal repair and regeneration. **J. Periodont.**, v.53, n.10, p. 617-25, Oct. 1982.
- 144- POLSON, A. M.; FREDRICK, G. T. Cell process in dentin tubules during early phases of attachment to demineralized periodontitis-affected surfaces. **J. clin. Periodont.**, v.12, n.2, p. 162-9, Mar./Apr. 1985.
- 145- POLSON, A. M.; HANES, P. J. M. The root surface and periodontal regeneration. In: POLSON, A. M. **Periodontal regeneration: current status and concepts** Chicago, Quintessence, 1994. p. 41-52.
- 146- POLSON, A. M.; HANES, P. J. M. Cell and fiber responses to cementum from periodontitis-affected root surfaces after citric acid treatment. **J. clin. Periodont.**, v.16, n.8, p. 489-97, Sept. 1989.
- 147- POLSON, A. M.; PROYE, M. P. Effect of root surface alterations on periodontal healing. II. Citric acid treatment of the denuded root. **J. Clin. Periodont.**, v.9, n.6, p.441-54, Nov. 1982.

- 148- POLSON, A. M.; LADENHEIN, S.; HANES, P. J. Cell and fiber attachment to demineralized dentin from periodontitis-affected root surfaces. **J. Periodont.**, v.57, n.4, p. 235-46, Apr. 1986.
- 149- POLSON, A. M. et al. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. **J. Periodont.**, v.55, n.8, p.443-6, Aug. 1984.
- 150- PRITLOVE-CARSON, S. et al. Immunohistochemical analysis of tissues regenerated from within periodontal defects treated with expanded polytetrafluorethylene membranes. **J. Periodont.**, v.65, n.02, p. 134-8, Feb. 1994.
- 151- RAGNARSSON, B. CARR, G.; DANIEL, J. C. Isolation and growth of human periodontal ligament cells in vitro. **J. dent. Res.**, v.64, n.8, p. 1026-30, Aug. 1985.
- 152- RAINES, E. W.; ROSS, R. Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n.9, p. 5154-60, May 1982.
- 153- REGISTER, A. A. Bone and cementum induction by dentin demineralized in situ. **J. Periodont.**, v.44, n.1, p. 49-54, Jan. 1973.
- 154- REGISTER, A. A., BURDICK, F. A.. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. II. Defect repair. **J. Periodont.**, v.47, n.9, p. 497-505, Sept. 1976.
- 155- REGISTER, A. A.; BURDICK, F. A. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. I. Optimum range. **J. Periodont.**, v.46, n.11, p. 646-55, Nov. 1975.
- 156- RENVERT, S.; EGELBERG, J. Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. II. Effect of citric acid conditioning of the root surface. **J. clin. Periodont.**, v.8, n.6, p.459-73, Dec. 1981.
- 157- RINDERKNECHT, E.; HUMBLE, R. E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor-I and its structural homology with proinsulin. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n.08, p. 2769-76, Apr. 1978.
- 158- RINDERKNECHT, E.; HUMBLE, R. E. Amino-terminal sequences of two peptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell growth promoting activities: evidence for structural homology with insulin chain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.73, p. 4379-81, 1976 apud RINDERKNECHT, E.; HUMBLE, R. E.¹⁵⁷, 1978. p.2789.
- 159- RINDERKNECHT, E.; HUMBLE, R. E. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization and some biological properties of forms I and II. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.73, p. 2365-69, 1976.
- 160- RIRIE, C. M.; CRIGGER, M.; SELVIG, K. A. Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. **J. Periodont. Res.**, v.15, n.3, p. 314-27, May 1980.

- 161- ROBERTS, A. B. et al. Transforming growth factor- β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, p. 4167-71, 1986.
- 162- ROBERTS, A. B. et al. New class of transforming growth-factors: characterization of two classes of factors from neoplastic to non-neoplastic tumors. **Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation**, v.9, p. 310-23, 1982 apud ASSOIAN, R. K.; SPORN, M. B.⁰⁷, 1992. p.1217.
- 163- ROBERTS, A. B. et al. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 3494-8, 1980 apud ASSOIAN, R. K.; SPORN, M. B.⁰⁷, 1992. p.1217.
- 164- ROMPEN, E. H.; GOFFINET, G. H.; NUSGENS, B. Human periodontal ligament fibroblast behaviour on chemically conditioned dentine: an in vitro study. **J. Periodont.**, v.70, n.10, p. 1144-52, Oct. 1999.
- 165- ROMPEN, E. H. et al. Kinetic aspects of gingival and periodontal ligament fibroblast attachment to surface conditioned dentin. **J. dent. Res.**, v.72, n.3, p. 607-12, Mar. 1993.
- 166- ROSE, G. G. et al. Human periodontal ligament cells *in vitro*. **J. Periodont. Res.**, v.22, n.4, p. 20-8, Jul. 1987.
- 167- ROSS, R. Platelet-derived growth factor. **Lancet**, v.1, n.8653, p.1179-82, May 1989.
- 168- ROSS, R. et al. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial muscle cells in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.71, p.1207-10, 1974 apud BOYAN et al.²⁵, 1994. p.1593.
- 169- RUTHERFORD, B.; CHARETTE, M.; RUEGER, D. Role of osteogenic (bone morphogenetic) protein and platelet-derived growth factor in periodontal wound healing. In: GENCO, R. J. et al. (eds.) **Molecular pathogenesis of periodontal disease**. Washington, ASM Press, 1994. Cap. 34, p. 427-37.
- 170- RUTHERFORD, R. B. et al. Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. **J. Periodont. Res.**, v.27, n.4, p.285-90, July 1992.
- 171- SANT'ANA, A. C. P. et al. Cultura e caracterização de células derivadas de ligamento periodontal humano. Em preparação.
- 172- SCHÜPBACH, P. et al. Periodontal repair or regeneration: structures of different types of new attachment. **J. Periodont. Res.**, v.28, n.4, p.281-93, July 1993.
- 173- SELVIG, K. A. et al. Fine structure of new connective tissue attachment following citric acid treatment of experimental furcation pockets in dogs. **J. Periodont. Res.**, v.16, n.1, p. 123-9, Jan./Feb. 1981.

- 174- SEPPÄ, H. et al. Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. **J. Cell Biol.**, v.92, n.2, p. 584-8, Feb. 1982.
- 175- SEYEDIN, S. M. et al. Cartilage inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor- β . **J. Biol. Chem.**, v.261, n.13, p. 5693-5, May 1986.
- 176- SHAPIRA, L. et al. Human monocyte response to cementum extracts from periodontally diseased teeth: effect of conditioning with tetracycline. **J. Periodont.**, v.67, n.7, p. 682-7, July 1996.
- 177- SÖDEK, J.; BERKMAN, F. A. Bone cell cultures. **Methods Enzimol.**, v.145, p. 303-24, 1987 apud WRANA, J. L.²⁰⁶ et al., 1988. p.915.
- 178- SOMERMAN, M. J. et al. Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. **J. Periodont. Res.**, v.26, n.1, p.10-6, Jan. 1991.
- 179- SOMERMAN, M. J. et al. Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. **Arch. Oral Biol.**, v.35, n.3, p.241-7, 1990.
- 180- SOMERMAN, M. J. et al. Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors in vitro. **J. Periodont.**, v.60, n.2, p.73-7, Feb. 1989.
- 181- SOMERMAN, M. J. et al. Human bone sialoprotein I and II enhance fibroblastic attachment in vitro. **Calcif. Tissue Int.**, v.43, n.1, p.50-3, July 1988.
- 182- SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. Transforming growth factor- β : recent progress and new challenges **J. Cell Biol.**, v.119, n.5, p. 1017-21, Dec. 1992.
- 183- SPORN, M. B. et al. Polypeptide transforming growth factors: large scale isolation from bovine sources and use for wound healing in vivo. **Science**, v.219, p. 1329-31, Mar. 1983.
- 184- STAHL, S. Repair potential of the soft tissue-root interface. **J. Periodont.**, v.48, n.9, p. 545-52, Sept. 1977.
- 185- STAHL, S.; FROUM, S. J. Human clinical and histological repair responses following the use of citric acid in periodontal therapy. **J. Periodont.**, v.48, n.5, p. 261-6, May 1977.
- 186- TAKANO-YAMAMOTO, T.; TAKEMURA, T.; KITAMURA, Y. Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin and osteopontin revealed by in situ hibridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. **J. Histochem. Cytochem.**, v.42, n.7, p. 885-96, July 1994.
- 187- TAKATA, T. Oral wound healing concepts in periodontology. In: WILLIAMS, R. C.; YUKNA, R. A.; NEWMAN, M. G. (eds). **Current Opinicion in Periodontology**. Current Science, 1994. p. 119-27.

- 188- TERRANOVA, V. P.; WIKESJÖ, U. M. E. Chemotaxis of cells isolated from periodontal tissues to different biological response modifiers. **Adv. dent. Res.**, v.2, n.2, p. 215-22, Nov. 1988.
- 189- TERRANOVA, V. P.; WIKESJÖ, U. M. E. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. **J. Periodont.**, v.58, n.6, p. 371-80, June 1987.
- 190- TERRANOVA, V. P.; JENDRESEN, M.; YOUNG, F. Healing, regeneration and repair: prospectus for new dental treatment. **Adv. dent. Res.**, v.3, n.1, p. 69-79, May 1989.
- 191- TERRANOVA, V. P. et al. A biochemical approach to periodontal regeneration. AFSCM: assays for specific cell migration. **J. Periodont.**, v.58, n.04, p. 247-57, Apr. 1987.
- 192- TERRANOVA, V. P. et al. Biochemically mediated periodontal regeneration. **J. Periodont. Res.**, v.22, n.3, p. 248-51, May/June 1987.
- 193- TERRANOVA, V. P. et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. **J. Periodont. Res.**, v. 21, n.4, p. 330-7, July 1986.
- 194- TROMBELLI, L.; SCABIA, A.; CALURA, G. Nondiseased cementum and dentin root surface following tetracycline hydrochloride conditioning: SEM study of the effects of solution concentration and application time. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.14, n.5, p. 461-70, Oct. 1994.
- 195- TROMBELLI, L. et al. Effect of tetracycline HCl on periodontally-affected root surfaces. **J. Periodont.**, v.66, n.8, p. 685-91, Aug. 1995.
- 196- TROMBELLI, L. et al. Effects of tetracycline HCl conditioning and fibrin-fibronectin system application in the treatment of buccal gingival recession with guided tissue regeneration. **J. Periodont.**, v.66, n.5, p. 313-20, May 1995.
- 197- UITTO, J. et al. Expression of fibronectin and integrins in cultured periodontal ligament epithelial cells. **J. dent. Res.**, v.71, n.5, p. 1203-11, May 1992.
- 198- VAN WYK, J. J.; SVOBODA, M. E.; UNDERWOOD, L. E. Evidence from radioligand assays that somatomedin-C and insulin-like growth factor-I are similar to each other and different from other somatomedins. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.**, v.50, n.1, p. 206-8, Jan. 1980.
- 199- WANG, H.-L. et al. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. **J. Periodont.**, v.65, n.5, p. 429-36, May 1994.
- 200- WANG, H. -L. et al. Effect of root conditioning on periodontal wound healing with and without guided tissue regeneration: a pilot study. I. Histologic evaluation. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.13, n.06, p. 551-61, Dec. 1993.

- 201- WASI, S. et al. An osteonectin-like protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. **Can. J. Biochem. Cell Biol.**, v.62, n.6, p. 470-8, June 1984.
- 202- WEN, C. R. et al. In vitro effects of citric acid application techniques on dentin surfaces. **J. Periodont.**, v.63, n.11, p.883-9, Nov. 1992.
- 203- WIKESJÖ, U. M. E.; NILVÉUS, R. E.; SELVIG, K. A. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. **J. Periodont.**, v.63, n.03, p. 158-65, Mar. 1992.
- 204- WIKESJÖ, U. M. E. et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. **J. Periodont. Res.**, v.21, n.4, p. 322-9, July 1986.
- 205- WIKESJÖ, U. M. E. et al. Early healing events at the dentin-connective tissue interface. Light and transmission electron microscopic observations. **J. Periodont.**, v.62, n.1, p. 5-14, Jan. 1991.
- 206- WRANA, A. et al. Differential effects of transforming growth factor- β on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. **J. cell Biol.**, v.106, n.03, p. 915-24, Mar. 1988.

ABSTRACT

ABSTRACT:

The use of growth factors in regenerative periodontal treatment has been largely reviewed in the past years. However, its applicability in humans is not established yet. The purpose of this study was to determine the effects of the application of PDGF-BB, IGF-1, TGF- β 1 alone or in combination over the proliferation of cultured human periodontal ligament fibroblasts (FL2 cells). Besides, the adhesion of FL2 cells to periodontally compromised root fragments previously treated or not with citric acid and tetracycline was evaluated. Periodontal ligament fibroblasts were obtained from third molars extracted from healthy patients and treated as explants in order to develop a primary cell line culture. To analyze the growth factor effects on periodontal ligament cells, 72 Petri dishes were cultured with 10^3 cells each randomly distributed among 4 experimental and 2 control groups. The experimental groups received PDGF-BB (group 1), TGF- β 1 (group 2), IGF-1 (group 3) or its combination (group 4) added to the culture medium while the controls received the supplemented culture medium only. The Petri dishes were counted in triplicates 1, 3, 5 and 7 days after the culture allowing the establishment of a growth curve for each treatment group. In a parallel experiment, 30 teeth fragments were obtained from 14 patients presenting probing attachment level ≥ 6 mm and were randomly distributed among 10 treatment groups: scaling (group 1), scaling and growth factor application (groups 2-5), scaling and acid treatment (group 6) and scaling and acid treatment followed by growth factor application (groups 7-10). The data were statistically evaluated by ANOVA and descriptive methods. The results obtained have demonstrated that TGF- β 1 provided the more pronounced effects over cultured periodontal ligament fibroblasts proliferation while the combination of growth factors presented the most significant results over the its adhesion to periodontally compromised tooth fragments previously treated by scaling and citric acid associated to tetracycline conditioning for 3 minutes. These results were statistically different from the non-conditioned treatment groups ($p < 0,05$), except for the group treated with the combination of growth factors. These findings suggest that these substances, especially TGF- β 1 combined or not with PDGF-BB and IGF-1, could enhance regeneration of periodontal tissues lost with the disease.