



KARINA GONZALES SILVÉRIO RUIZ

Efeitos da combinação do fator de crescimento de fibroblastos básico e fator de transformação de crescimento beta na proliferação, expressão de genes para colágeno tipos I e III, metaloproteases-1 e -2 e TIMPs 1, 2 e 3, e na modulação da síntese destes próprios fatores de crescimento pelas células do ligamento periodontal de humanos

ARARAQUARA
2005



KARINA GONZALES SILVÉRIO RUIZ

Efeitos da combinação do fator de crescimento de fibroblastos básico e fator de transformação de crescimento beta na proliferação, expressão de genes para colágeno tipos I e III, metaloproteases-1 e -2 e TIMPs 1, 2 e 3, e na modulação da síntese destes próprios fatores de crescimento pelas células do ligamento periodontal de humanos

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, do Campus de Araraquara, para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia (Área de Concentração: Periodontia).

Orientador: *Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached*

ARARAQUARA
2005

Ruiz, Karina Gonzales Silvério

Efeito da combinação do fator de crescimento de fibroblasto básico e fator de transformação de crescimento beta na proliferação, expressão de genes para colágeno tipos I e III, metaloproteases -1 e -2 e TIMPs 1, 2 e 3, e na modulação da síntese destes próprios fatores de crescimento pelas células do ligamento periodontal / Karina Gonzales Silvério Ruiz. – Araraquara: [s.n.], 2005.

104 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached

1. Regeneração tecidual guiada 2. Ligamento periodontal 3. Fatores de crescimento de fibroblastos 4. Fator de crescimento transformador beta. 5. Colagenase intersticial 6. Gelatinase A 7. Inibidores de protease I. Título.

A *DEUS*, pela constante presença em minha vida. Seus ensinamentos de fé, amor e paciência, fizeram-me permanecer otimista nos momentos difíceis desta caminhada.

AGRADECIMIENTOS

Aos meus pais, *Devair e Mercedes* pela luta durante toda a vida com o objetivo de poder proporcionar a melhor formação profissional e principalmente, pessoal. Agradeço a constante demonstração de carinho, amor e responsabilidade.

Ao meu irmão *Adriano*, pelo constante incentivo, amor e preocupação que sempre teve comigo.

Ao meu querido *José Claudio* por acreditar que a distância e as dificuldades não impediriam de permanecermos juntos. Agradeço todos os dias por você acreditar no nosso amor e por isso, ter a paciência para compreender os meus objetivos e os meus momentos.

À amiga *Esmeralda*, uma grande companheira durante os anos de pós-graduação. Conquistamos uma amizade e confiança mútua que nem mesmo à distância e a nossa diferença de nacionalidade conseguem abalar. Agradeço a sua colaboração neste trabalho e em tudo que desenvolvemos juntas durante esses anos. Muito obrigado pelo apoio, amizade e confiança.

Ao *Prof. Dr. Carlos Rossa Junior*, que mesmo distante esteve presente na realização deste trabalho. Admiro muito a sua capacidade como mestre e pesquisador. Idealizamos este trabalho e juntos fomos atrás de apoio e de recursos para que este tornasse realidade. Obrigado pelo constante incentivo à pesquisa e por todos os ensinamentos que recebi.

Ao *Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached*, por ter aceitado a orientação deste trabalho em andamento. Obrigado por me incentivar a não desistir desta pesquisa e por acreditar que venceríamos os obstáculos que foram aparecendo. Agradeço pela paciência e gentileza com que sempre me recebeu.

À *Prof^{ta}. Dr^a Martha Somermam*, que em apenas uma visita a Araraquara mostrou interesse em ajudar-nos. Agradeço primeiramente pelas orientações na metodologia deste trabalho e principalmente, pelas linhagens celulares enviadas. Sua participação foi fundamental.

Ao *Prof. Dr. João Santana Silva*, por ter aceitado a função de co-orientador e ter aberto as portas do Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, para a realização desta e de outras pesquisas.

Ao *Prof. Dr. Sandro Valentini*, por ter dado a oportunidade de utilizarmos todas as dependências e os equipamentos do Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Campus de Araraquara.

À *Prof^a Dr^a Regina Maria Barretto Cicarelli*, pelo carinho com que sempre nos recebeu. Agradeço pelas sugestões dadas quando ainda estávamos elaborando o projeto e pelo constante auxílio durante a execução do mesmo. Obrigado por permitir a utilização das dependências e dos equipamentos do Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Campus de Araraquara.

Ao amigo *Gustavo Pompermaier Garlet*, doutorando em imunologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Obrigado por me ajudar na realização do RT-PCR

À *Carolina Barbosa Fregonesi* e ao *Gustavo Silmon*, pós-graduandos em imunologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Campus de Araraquara. Vocês são muito especiais. Obrigado pela disposição e colaboração na execução deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia, nas pessoas de sua Diretora, Prof^a Dr^a *Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio*, e Vice-Diretor, Prof. Dr. *José Cláudio Martins Segalla*.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação – Área de Periodontia, Prof. Dr. *Joni Augusto Cirelli*, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação, pela formação e exemplo.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia, Prof. Dr. *Benedicto Egbert Côrrea de Toledo*, Prof. Dr. *Ricardo Samih Georges Abi Rached*, Prof. Dr. *Élcio Marcantonio Júnior*, Prof. Dr. *José Eduardo Cezar Sampaio*, Prof^a Dr^a *Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio*, Prof^a Dr^a *Silvana Regina Perez Orrico*, Prof. Dr. *Joni Augusto Cirelli*, Prof. Dr. *Carlos Rossa Junior*.

A todos os colegas de Pós-graduação principalmente, os da turma de Periodontia, *Esmeralda, Rodrigo, Marinella, Cliciane, Cristiane, Ricardo, José Marcos, Luiz Henrique, Terezinha, Celso e Rogério*, pelo convívio e aprendizado.

Aos colegas *Rafael Faeda, Daniela Gonçalves, Andréa Rached e Fernanda Bello*, pela atenção e carinho que sempre recebi de vocês.

A amiga *Regina Lúcia*, pela força e pelos conselhos nos momentos de dúvida.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, *D. Maria do Rosário, D. Teresinha, Maria José e Cláudia*, pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A todos *funcionários, estagiários e alunos de pós-graduação* dos Laboratórios de Imunologia e Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Campus de Araraquara, pelo clima de amizade e de alegria que sempre encontrei. Obrigado por colaborarem comigo nos momentos que precisei.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial aos funcionários da seção de Pós-Graduação, *Mara, Rosângela e Sílvia*, pela paciência e interesse em nos ajudar; e aos funcionários da Biblioteca. *Maria Helena, Maria José, Vera, Sílvia, Inês, Adriano, Marlei e D. Odete*, pela atenção, orientação e disponibilidade em colaborar.

A FAPESP, pelo bolsa de doutorado e todo o auxílio financeiro que permitiram a realização deste projeto.

A todas as demais pessoas que sempre rezaram e torceram por mim.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO DA LITERATURA.....	19
PROPOSIÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODO.....	37
RESULTADO.....	50
DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÃO.....	74
ANEXOS.....	76
REFERÊNCIAS	86
RESUMO.....	101
ABSTRACT.....	103

1 Introdução

Visando promover a regeneração dos tecidos periodontais perdidos em decorrência da progressão da doença periodontal destrutiva, várias modalidades de tratamento como, a regeneração tecidual guiada (GOTTLOW¹⁵, 1984), a biomodificação radicular (GARRETT et al.¹⁴, 1978), retalhos reposicionados (ELLEGAARD et al.¹¹, 1974) e a implantação de materiais osteocondutores (BARNETT et al.³, 1983), osteoindutores e osteogênicos (QUINTERO et al.³⁹, 1982), vêm sendo aplicados na prática clínica, no entanto, com resultados pouco previsíveis do ponto de vista clínico provavelmente, devido aos poucos conhecimentos sobre os eventos bioquímicos e celulares associados à regeneração periodontal.

Atualmente, sabe-se que as células do ligamento periodontal exercem um papel crucial neste processo, sendo, então, fundamental a migração, inserção e proliferação deste tipo celular sobre a superfície radicular previamente exposta à doença, a fim de promover a síntese de componentes do tecido conjuntivo e a diferenciação em outros tipos celulares como os cementoblastos e osteoblastos (McCULLOCH e BORDIN²³, 1991; WIKESJO et al.⁵⁸, 1992; PITARU et al.³⁸, 1994).

Estudos relativamente recentes (TERRANOVA e WIKESJO,⁵⁵ 1987; TERRANOVA⁵⁴, 1993; CALLENS⁵, 1997) têm proposto a utilização dos fatores de crescimento polipeptídicos nos procedimentos de regeneração periodontal, devido ao

fato destas substâncias atuarem no controle das atividades de quimiotaxia, proliferação, diferenciação e funções secretoras de vários tipos celulares, incluindo as células do ligamento periodontal.

Existem diversos fatores de crescimento com atividades que lhes conferem potencial para aplicação na terapia regenerativa do periodonto, sendo os mais estudados atualmente, o fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), isoladamente (PARK et al.³⁷, 1995) ou associado ao fator de crescimento semelhante à insulina (LYNCH et al.²², 1991) (IGF); e as proteínas morfogenéticas do osso (SIGURDSSON et al.⁴⁸, 1995) (BMPs). No entanto, outros fatores parecem apresentar um bom potencial para esta aplicação, sendo objeto de reduzido número de estudos, como o fator de crescimento de fibroblastos básico (b-FGF) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β).

O b-FGF têm demonstrado estimular *in vitro* a quimiotaxia e mitose das células do ligamento periodontal e a proliferação de células endoteliais (TERRANOVA et al.^{56,57}, 1988,1989), além de promover *in vivo* a regeneração de tecidos mineralizados (osso alveolar e cimento radicular) e não mineralizado (ligamento periodontal) em diferentes tipos de defeitos ósseos tratados com este fator associado ou não a RTG (MURAKAMI et al.^{28,29}, 1999, 2003; ROSSA Jr et al.⁴¹, 2000; TAKAYAMA et al.⁵¹, 2001).

Já o TGF- β também apresenta *in vitro*, atividade proliferativa e quimiotática sobre as células do ligamento periodontal (TERRANOVA et

al.^{56,57},1988, 1989; MATSUDA et al.²⁵, 1992), além de inibir a mitose de células epiteliais, linfóides e endoteliais (LU et al.²¹, 1997). *In vivo*, estudos de Mohammed et al.²⁷ (1998) e Wiskejö et al.⁵⁹ (1998) demonstraram ocorrer regeneração óssea mais extensa quando associou-se a RTG ao TGF- β .

Além destas funções, estes fatores de crescimento (b-FGF e TGF- β) parecem estar relacionados com o controle da síntese e degradação de componentes da matriz extracelular do ligamento periodontal tanto durante o processo reparativo, como no “turnover” tecidual (ALVARES et al.¹, 1995; COLLETA et al.⁸, 1999; PALMON et al.^{35,36}, 2000, 2001).

Dentre estes componentes, os mais estudados são: o colágeno tipo I e III (formas de colágeno mais abundantes no ligamento periodontal) (ROMANOS et al.⁴⁰, 1992), a fibronectina (glicoproteína que promove a união dos fibroblastos à matriz extracelular) (AMAR e CHUNG²,1994) , as matrizes de metaloproteases (MMPs) e os inibidores teciduais das matrizes de metaloproteases (TIMPs) (BIRKEDAL-HASSEN⁴, 1993; RYAN et al.⁴², 1996) .

As MMPs constituem uma família de proteases as quais exercem um importante papel na degradação dos componentes da matriz extracelular, como o colágeno. Estas proteases são classificadas em 4 grupos de acordo com o substrato degradado por elas: 1) colagenases (MMP-1, -8 a -13); 2) gelatinases ou colagenase tipo IV (MMP-2 e -9); 3) estromelisininas (MMP-3, -10 e -12) e 4) Outros tipos

(Metaloprotease Tipo-Membrana, Meprina e Macrófago Metaloelastase) (BIRKEDAL-HANSEN⁴, 1993; RYAN et al.⁴², 1996).

Com exceção da MMP-8 (PMN-CL) e a MMP-9 (MR 92K GL/colagenase tipo IV), as quais são sintetizadas e armazenadas em grânulos específicos no citoplasma de leucócitos polimorfonucleares, as demais metaloproteases são liberadas pelas células na forma latente e precisam ser ativadas para atuarem na degradação do substrato (BIRKEDAL-HANSEN⁴, 1993; RYAN et al.⁴², 1996).

Em eventos fisiológicos, como por exemplo, a renovação tecidual, e em eventos patológicos, como a doença periodontal, o desequilíbrio entre as MMPs ativadas e os seus inibidores teciduais, leva a destruição de componentes da matriz extracelular. Os inibidores teciduais das MMPs, os TIMPs, atuam eliminando a proteases já ativadas, ou bloqueando a ativação destas (BIRKEDAL-HANSEN⁴, 1993; RYAN et al.⁴², 1996).

No estudo realizado por Takayama et al.⁵² (1997), os autores verificaram que o b-FGF reduz a expressão de genes para colágeno tipo I e não interfere na expressão de colágeno tipo III enquanto Palmon et al.^{35,36} (2000, 2001), encontraram que este fator de crescimento aumenta a expressão de genes para MMP-1 (colagenase-1).

Por outro lado, o TGF- β tem demonstrado exercer um efeito contrário, aumentando a expressão de colágeno tipo I (IGNOTZ e MASSAGUE¹⁷, 1986;

IGNOTZ et al.¹⁸, 1987) e diminuindo a de MMP-1 (OVERALL et al.³³, 1991; ALVARES et al.¹, 1995). No entanto, essa diminuição da expressão de MMP-1, não está relacionada ao aumento da expressão de mRNA para o TIMP-1, já que o TGF- β , não promoveu nenhuma sinalização celular que levasse a alteração na expressão desse gene (ÁLVARES et al.¹, 1995).

Desta maneira, embora estes dois fatores de crescimento promovam a migração e proliferação de células do ligamento periodontal, o TGF- β parece estimular a síntese de componentes da matriz de tecido conjuntivo tanto por fibroblastos como por osteoblastos, fundamental na regeneração dos tecidos periodontais enquanto que, o b-FGF estimula a atividade proteolítica através do aumento da síntese de proteases (OVERALL et al.³⁴, 1991).

Entretanto, Overall et al.³⁴. (1991) verificaram um aumento nos níveis de TIMP-1 e de MMP-2 quando fibroblastos gengivais humanos foram incubados com o TGF- β . Esta metaloprotease embora, encontra-se mais relacionada com o remodelamento do colágeno tipo IV (mais presente nas membranas basais do epitélio juncional e oral), atua também, na remoção de colágeno tipo I que apresentam estrutura anormal, os quais estariam retardando a formação de fibrilas colágenas durante a deposição e maturação de matrizes de tecido conjuntivo, como por exemplo, do tecido conjuntivo gengival, do ligamento periodontal e do osso alveolar.

Além disso, no estudo de Noda e Vogel³¹ (1989), os autores encontraram que o b-FGF quando aplicado em cultura de osteoblastos humanos

modula a expressão de genes para o TGF- β , o que poderia estar influenciando indiretamente na expressão de colágeno tipo I e de outros componentes da matriz extracelular e conseqüentemente, no processo de regeneração periodontal.

No entanto, os estudos voltados para a avaliação dos efeitos *in vitro* destes dois fatores de crescimento nas células do ligamento periodontal, o fazem separadamente. Porém, de acordo com os dados apresentados acima, parece interessante estudar os efeitos da associação do b-FGF com o TGF- β nas células do ligamento periodontal, já que: 1) estas células são consideradas fundamentais no processo de regeneração periodontal, 2) estes dois fatores de crescimento quando aplicados isoladamente parecem atuar de forma antagônica quanto à síntese de componentes do tecido conjuntivo, embora também, tenha que ser avaliado o efeito do TGF- β no aumento da expressão de MMP-2 pelas células do ligamento periodontal e 3) ambos podem estar modulando a síntese tanto do TGF- β como do b-FGF pelas células do ligamento periodontal, influenciando assim, na resposta destas células aos fatores de crescimento aplicados de forma exógena e conseqüentemente, na regeneração dos tecidos periodontais.

Partindo destes princípios, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da associação do bFGF e do TGF- β na proliferação, expressão de componentes da matriz extracelular e na modulação da síntese destes próprios fatores pelas células do ligamento periodontal.

2 Revisão da literatura

A regeneração do periodonto de inserção perdido em decorrência da doença periodontal é um processo muito complexo, particularmente devido às características anatômicas, com participação de uma superfície mineralizada avascular (a superfície radicular) e à posição transgengival do dente, sob influência do meio bucal (AMAR e CHUNG², 1994). Além disso, há necessidade da participação de um grande número de tipos celulares, incluindo células epiteliais, osteoblastos, cementoblastos, células do ligamento periodontal e fibroblastos do tecido gengival (CALLENS⁵, 1997).

A compreensão da complexa interação entre os diferentes tipos celulares envolvidos na reparação da ferida periodontal é fundamental para o desenvolvimento de terapias regenerativas eficazes e consistentes, uma vez que um dos principais problemas dos tratamentos regenerativos disponíveis atualmente é justamente sua grande variabilidade e inconsistência de resultados (JEPSEN et al.¹⁹, 2002; NEEDLEMAN et al.³⁰, 2002).

Segundo o paradigma atual da regeneração periodontal, considera-se que o processo de cicatrização de feridas periodontais requer o recrutamento (migração) de células do ligamento periodontal para o sítio, proliferação destas células e síntese de componentes do tecido conjuntivo para que haja a completa regeneração dos tecidos periodontais de suporte (MELCHER²⁶, 1976).

De fato, relatos recentes suportam a relevância fisiológica deste tipo celular, devido a sua participação ativa em processos como a remodelação do osso alveolar (KANZAKI et al.²⁰, 2001), resposta a citocinas inflamatórias como a IL-1 β (SHIMIZU et al.⁴⁷, 1992), além de características fenotípicas similares às de osteoblastos (SOMERMAN et al.^{49,50}, 1988; 1990).

O melhor entendimento dos processos biológicos associados à inflamação e reparação tecidual tem gerado grande interesse na manipulação terapêutica dos eventos celulares associados à reparação dos tecidos periodontais. É com base nestes estudos da intrincada rede de mediadores inflamatórios e outras citocinas envolvidas nos processos inflamatórios e nos eventos reparativos que, uma abordagem terapêutica ‘ativa’ para a regeneração dos tecidos periodontais vem sendo pesquisada.

Esta abordagem ‘ativa’, que possibilitaria estimular e modular ativamente eventos celulares importantes para a regeneração tecidual, controlando a velocidade e tipo de tecidos formados na área da lesão contrasta radicalmente com a estratégia da maior parte das modalidades terapêuticas disponíveis atualmente (como a regeneração tecidual guiada, por exemplo), nas quais o tratamento tem um papel passivo, sendo o organismo do paciente o único responsável pelo resultado final do processo reparativo.

Visando a coordenação dos eventos celulares fundamentais no processo de regeneração periodontal, alguns estudos têm proposto a utilização de

citocinas denominadas fatores de crescimento. Estes são modificadores da resposta biológica, de natureza polipeptídica, produzidos e secretados por diversos tipos de células tais como, fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais e células inflamatórias (particularmente os leucócitos polimorfonucleares), podendo exercer as suas funções de maneira autócrina, estimulando a mesma célula responsável pela sua síntese, ou parácrina, afetando outras células nas proximidades da célula responsável por sua síntese, podendo ainda ser produzidos em determinado órgão ou tecido e posteriormente secretados na corrente sanguínea, agindo sobre células à distância (ação endócrina) (CALLENS⁵, 1997).

Quanto as suas ações biológicas, a denominação “fatores de crescimento” é imprecisa, pois são na realidade multifuncionais, estimulando além do crescimento, uma grande variedade de atividades celulares como: quimiotaxia, proliferação, diferenciação e as funções secretoras das células, podendo inibir, e não apenas estimular todas estas funções celulares (CALLENS⁵, 1997).

De fato, alguns fatores de crescimento exercem seus efeitos de forma seletiva sobre os fibroblastos e células do ligamento periodontal, inibindo, por exemplo, a migração e proliferação de células epiteliais, o que é fundamental segundo os princípios da regeneração tecidual guiada (MELCHER²⁶, 1976). Isto justifica o grande interesse em testar o potencial dos fatores de crescimento na regeneração do periodonto, com a realização de vários estudos *in vitro* (DENNISON et al.⁹, 1994; ALVARES et al.¹, 1995; GAO et al.¹², 1996; CHIEN et al.⁷, 1999; CHANG et al.⁶, 2002; TERRANOVA et al.⁵⁷, 1989) e *in vivo* (SELVIG et al.⁴³, 1994; MOHAMMED

et al.²⁷, 1998; WIKESJO et al.⁵⁹, 1998; MURAKAMI et al.^{28,29}, 1999, 2003; ROSSA Jr et al.⁴¹, 2000).

Porém, devido à complexidade do processo regenerativo periodontal, parece lógico que uma terapia regenerativa “ativa”, a qual inclui a utilização de fatores de crescimento como modificadores e moduladores da resposta biológica não deve ter seu espectro de ação limitado, a apenas um fator de crescimento, concentrando seus efeitos em um tipo celular, mas sim incluir os diversos tipos celulares participantes do processo, como células mesenquimais, endoteliais e nervosas, o que leva à suposição que uma série de fatores de crescimento, empregados numa seqüência ideal e com efeitos sinérgicos será, provavelmente, necessária para atingir o objetivo final de completa e previsível regeneração do periodonto (TERRANOVA e WIKESJO⁵⁶, 1988; AMAR e CHUNG², 1994; GRAVES e CHOCHRAN¹⁶, 1994; CALLENS⁵, 1997) . Esta suposição é sustentada por estudos (PARK et al.³⁷, 1995; MOHAMMED et al.²⁷, 1998; ROSSA Jr et al.⁴¹, 2000) que observaram resultados desfavoráveis após a utilização de um único fator de crescimento, por exemplo, a ocorrência de anquilose após o emprego de BMP (WIKESJO⁶⁰, 2003).

Existem diversos fatores de crescimento com atividade que lhes conferem potencial para aplicação na terapia regenerativa do periodonto, sendo os mais estudados atualmente o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), isoladamente (PARK et al.³⁷, 1995) ou associado ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (LYNCH et al.²², 1991), e as proteínas morfogenéticas do osso

(BMPs) (SIGURDSSON⁴⁸, 1995). Acredita-se que outros fatores apresentam também bom potencial para esta aplicação, sendo no entanto, objeto de reduzido número de estudos, como o fator de crescimento de fibroblasto básico (b-FGF) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β).

O bFGF já foi imunolocalizado no núcleo e citoplasma das células do ligamento periodontal e células endoteliais de humanos bem como, na matriz extracelular, por Gao et al.¹², em 1996. Além disso, o estudo de Takayama et al.⁵³(1998) mostrou que as células do ligamento periodontal bem como, a matriz extracelular, expressam dois tipos de receptores para o bFGF, o FGFR1 e o FGFR2. Na matriz extracelular, os receptores são denominados de baixa afinidade e alta capacidade, tendo a finalidade de armazenar o bFGF sintetizado pelas células e protegê-lo contra a degradação proteolítica. Na membrana celular, são encontrados os receptores de alta afinidade e baixa capacidade, os quais são expressos em média 1×10^5 receptores/célula. São nestes receptores de membrana que o bFGF aplicado de maneira exógena atua, estimulando eventos celulares importantes nas fases iniciais da regeneração periodontal.

Já o TGF- β , apesar de ser sintetizado por células embrionárias e células teciduais adultas, incluindo os fibroblastos e osteoblastos (SHIMAZU et al.⁴⁶, 1999; SHI e MASSAGUE⁴⁴, 2003), ainda não há na literatura um estudo que descreva a presença e distribuição deste fator de crescimento e de seus receptores nas células do ligamento periodontal de humanos. Gao et al.¹³, em 1998, observaram que

o citoplasma e membrana das células do ligamento periodontal de ratos coravam-se positivamente para o TGF- β bem como, a sua matriz extracelular, e que estas células, principalmente, as localizadas na porção mais apical da raiz, expressavam genes para o TGF- β . Porém, os autores verificaram que nem todas as células do ligamento periodontal coravam-se para o TGF- β , ao contrário, dos osteoblastos e cementoblastos, mostrando a existência de subpopulações para esta linhagem celular.

Contudo, ambos os fatores de crescimento têm apresentado ações biológicas sobre as células do ligamento periodontal de humanos como estimular a quimiotaxia e a proliferação. Já em 1989, Terranova et al.⁵⁷ observaram a migração e proliferação de células do ligamento periodontal de humanos sobre blocos de dentina previamente condicionados com cloridrato de tetraciclina e posteriormente, tratados com o bFGF de origem humana. A proliferação celular ocorreu de maneira dose-dependente, atingindo o pico máximo com a concentração de 50ng de bFGF/bloco de dentina.

Do mesmo modo, mas utilizando o bFGF de origem humana e aplicando-o diretamente no meio de cultura, os resultados dos estudos realizados por Takayama et al.^{52,53} (1997, 1998) e Murakami et al.²⁸ (2003), mostraram que o bFGF também estimulava de maneira dose-dependente a proliferação celular. Entretanto, o efeito máximo do bFGF na proliferação foi alcançado com a dose de 10ng de bFGF/ml de meio de cultura para os dois primeiros estudos, e de 1ng/ml para o último. Provavelmente, as diferenças entre esses estudos e de Terranova et al.⁵⁷

(1989), quanto a concentração ideal de bFGF que promoveu o máximo de proliferação celular deve-se a diferenças nas próprias metodologias e na origem dos bFGFs empregados, o que torna difícil a comparação dos resultados.

Entretanto, nos estudos de Takayama et al.^{52,53} (1997, 1998) e Murakami et al.²⁹ (2003), a principal diferença na metodologia, foi à concentração inicial de células semeadas. Nos primeiros estudos, as células foram semeadas na concentração 10×10^4 céls/orifício e no segundo, 1×10^5 céls/orifício. Isso reflete na quantidade de receptores disponíveis para união ao bFGF. Possivelmente, nos estudos de Takayama et al.^{52,53} (1997, 1998), foram necessárias uma maior concentração de bFGF para ocupar o maior número de receptores expressos pela maior quantidade de células presentes. O contrário ocorreu no estudo de Murakami et al.²⁹ (2003), onde a dose de 1ng/ml de meio de cultura foi o suficiente para estimular ao máximo a proliferação.

Para o TGF- β , o estímulo à proliferação celular ocorreu de maneira tempo e dose-dependente. No estudo de Oates et al.³² (1993), após as células do ligamento periodontal serem incubadas com as doses de 1 ou 10ng TGF β /ml de meio de cultura por 24, 32 e 48 horas, estas apresentaram um aumento da proliferação após 32 horas na presença 1ng de TGF- β /ml de meio de cultura. Já Dennison et al.⁹ (1994), utilizando a única dose de 10ng, observaram que somente após 48 horas é que as células do ligamento periodontal começaram a ter maior proliferação comparadas ao grupo controle.

Estes dados mostram que os dois fatores de crescimento estimulam a proliferação das células do ligamento periodontal em momentos diferentes. O bFGF tem ação já nas primeiras 22 horas após a aplicação como observado por Takayama et al.^{52,53} (1997,1998), enquanto que o TGF- β somente vai aumentar a taxa proliferativa após 32 horas.

Talvez, essa diferença quanto ao momento de atuação do bFGF e do TGF- β também seja importante em outros eventos celulares fundamentais no processo de regeneração periodontal como: a citodiferenciação, a síntese e remodelação da matriz extracelular.

Em relação a citodiferenciação, existem alguns indicativos como presença de atividade de fosfatase alcalina, formação de nódulos mineralizados e a expressão de genes e síntese de sialoproteína óssea e osteoclastina, que evidenciam a diferenciação das células do ligamento periodontal em células com características de osteoblastos.

Na presença do bFGF, as células do ligamento periodontal não apresentam atividade de fosfatase alcalina e nem formação de nódulos mineralizados. Isso indica que este fator de crescimento não tem a capacidade de induzir a diferenciação celular ou pelo menos, na presença dele, as células do ligamento periodontal sofrem uma inibição para a diferenciação. Entretanto, esse efeito do bFGF parece estar relacionado ao tempo que as células permanecem em cultura e conseqüentemente, ao número de receptores expressos por elas. Como observado por

Takayama et al.^{52,53} (1997, 1998) e Shimazu et al.⁴⁶ (1999), após 20 dias de cultura, as células do ligamento periodontal de humanos da 3^a a 10^a passagem, diminuíram a expressão de receptores FGFR1 e FGFR2 de membrana, reduzindo assim, a ação do bFGF. Com a menor ação do fator de crescimento, as células começaram a apresentar características de células osteoblásticas, aumentando a atividade de fosfatase alcalina e a formação de nódulo mineralizados.

Quanto a TGF- β , nenhum estudo indica que este fator de crescimento tem a capacidade de induzir a diferenciação das células do ligamento periodontal. Porém, quando Chien et al.⁷ (1999) induziram a diferenciação das células do ligamento periodontal de ratos em células com características osteoblásticas por meio de dexametasona, os autores observaram que, conforme as células iam se diferenciando, havia um aumento na expressão de genes para TGF- β 1, 2 e 3, e para os receptores de TGF- β (TGF β -RI, TGF β -RIII, ALK-2, ALK-3, ALK-6).

Em um estudo realizado por Murakami et al.²⁹ (2003), foram detectadas duas subpopulações de células do ligamento periodontal de humanos. Uma população de células positivas para fosfatase alcalina, que expressavam genes para sialoproteína óssea e osteocalcina e, expressavam um maior número de receptores FGFR2 e TGF β -RII, e uma população de células negativas para fosfatase alcalina, sialoproteína óssea e osteocalcina, mas positivas, porém com menor número de FGFR2 e TGF β -RII. Nas células positivas, a ação do bFGF na proliferação foi mais intensa do que na negativa.

Esses dados são importantes pelo fato de indicarem a provável especificidade de atuação de cada fator de crescimento. Pelos estudos acima parece que, o bFGF é importante logo no início da regeneração periodontal, estimulando a quimiotaxia e a proliferação das células do ligamento periodontal. Na proliferação, este fator de crescimento vai estar estimulando tanto as células do ligamento com características de fibroblastos como, as com características de osteoblastos. Dando continuidade a esse efeito, o TGF- β mais tardiamente, passa a estimular a proliferação celular e segundo Chien et al.⁷ (1999), provavelmente irá exercer um efeito maior sobre a linhagem de células do ligamento com características osteoblásticas ou após, as células mesenquimais se diferenciarem em osteoblastos.

Durante esse processo de proliferação e diferenciação celular, estes fatores de crescimento atuam sobre a síntese e degradação e/ou remodelação de componentes da matriz extracelular como: colágeno tipos I e III (colágenos mais abundantes no ligamento periodontal segundo Romanos et al.⁴⁰, 1992), fibronectina (glicoproteína que promove a união dos fibroblastos à matriz extracelular segundo Amar e Chung², 1994), as matrizes de metaloproteases (MMPs) e os inibidores teciduais das metaloproteases (TIMPs).

As metaloproteases constituem uma família de 9 endopeptidases (Quadro1-Anexos) zinco-cálcio dependentes secretadas por neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos, células ósseas e fibroblastos. Estas enzimas (proteases) estão envolvidas tanto em eventos fisiológicos (remodelação tecidual,

erupção dos dentes), como em eventos patológicos (doença periodontal). Dentre as MMPs mais estudadas a MMP-1 (colagenase ou FIB-CL) e a MMP-2 (gelatinase/colagenase tipo IV ou Mr 72 GL), são sintetizadas quando a transcrição dos seus genes é ativada por fatores de crescimento e outros tipos de citocinas (exemplo, IL-1 β). Estas MMPs são liberadas e armazenadas na matriz extracelular na forma de proenzimas latentes, que irão atuar somente quando a plasmina, uma protease sérica converte-las para forma ativa (BIRKEDAL-HANSEN⁴, 1993; RYAN et al.⁴², 1996).

O efeito das MMPs pode ser inibido por duas vias: a) através das α -macroglobulinas, as quais capturam as MMPs ativas e clivam uma região específica destas enzimas, inativando-as e b) pelos inibidores teciduais das metaloproteases (TIMPs) (BIRKEDAL-HANSEN⁴, 1993; RYAN et al.⁴², 1996).

Os TIMPs por sua vez, podem atuar de duas maneiras: a) eliminando a protease e b) bloqueando a ativação da protease. Esses inibidores são amplamente distribuídos nos fluidos corporais e tecidos, e são sintetizados por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, monócitos e macrófagos. Duas formas de TIMPs já vêm sendo bem estudadas, o TIMP-1 mais efetivo contra as colagenases e o TIMP-2, o qual atua mais sobre as gelatinases. Mais recentemente, o TIMP-3 foi isolado, no entanto, pouco se sabe sobre a sua constituição e atuação (BIRKEDAL-HANSEN⁴, 1993; RYAN et al.⁴², 1996).

Poucos estudos têm sido realizados com o intuito de investigar o efeito do bFGF e do TGF- β na síntese e degradação/remodelação de componentes da matriz extracelular pelas células do ligamento periodontal de humanos. Apesar disso, os dados disponíveis na literatura mostram que o TGF- β promove aumento da expressão de mRNA para colágeno tipo I e fibronectina (IGNOTZ e MASSAGUE¹⁷, 1986; IGNOTZ et al.¹⁸, 1987), embora nestes estudos os autores tenham utilizado fibroblastos de embrião de aves e cultura primária de células do ligamento periodontal de ratos, respectivamente, as quais diferenciam principalmente, na expressão fenotípica em relação as células do ligamento periodontal de humanos.

Em cultura primária de células do ligamento periodontal de humanos, o TGF- β demonstrou modular a síntese de componentes da matriz extracelular, aumentando a síntese total de proteínas, logo após as 12 primeiras horas de incubação, atingindo picos com 48 e 60 horas (MAILHOT et al.²⁴, 1995), e inibindo a expressão de genes para MMP-1, com doses de 1 e 10ng/ml de meio de cultura (ALVARES et al.¹, 1995).

Outros efeitos do TGF- β porém, observados em cultura primária de fibroblastos gengivais humanos, comprovam a sua capacidade anabólica na regeneração dos tecidos periodontais. Nesta linhagem celular, o TGF- β além de aumentar a expressão de genes para colágeno tipo I e fibronectina, atuou na formação tecidual por meio do aumento da síntese de PAI-1 (um inibidor da redução de plasminogênio em plasmina e conseqüentemente, de procologenase em colagenase) e

de TIMP-1, e na redução da expressão de genes para MMP-1(OVERALL et al.³³, 1991).

Por outro lado, esse fator de crescimento estimulou os fibroblastos gengivais a expressarem MMP-2 (OVERALL et al.³⁴, 1991), embora não tenha alterado a expressão desta metaloprotease pelas células do ligamento periodontal de humanos (CHANG et al.⁶, 2002). No entanto, essa protease é considerada neutra e importante na remoção de fibrilas de colágeno tipo I de estrutura anormal, as quais retardam a formação de novas fibrilas colágenas durante a deposição e maturação de matrizes de tecido conjuntivo, como por exemplo, do tecido conjuntivo gengival, do ligamento periodontal e do osso alveolar (OVERALL et al.³⁴, 1991).

Contrário ao TGF- β , o bFGF diminui a expressão de genes para colágeno tipo I e não altera a expressão de genes para fibronectina e colágeno tipo III nas células do ligamento periodontal de humanos (TAKAYAMA et al.⁵², 1997, PALMON et al.³⁶, 2001). Entretanto, esse fator de crescimento promove um aumento na expressão de mRNA para laminina (glicoproteína importante para união das células endoteliais à matriz extracelular) (TAKAYAMA et al.⁵², 1997). A maior expressão desse gene significa que o bFGF está estimulando a angiogênese e portanto, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos.

Em um estudo realizado por Palmon et al.³⁶ (2001), os autores encontraram que as células do ligamento periodontal de humanos quando incubadas com o bFGF nas doses de 0.1 a 1ng/ml apresentavam ao mesmo tempo, um aumento

na expressão de genes para colágeno tipo I e MMP-1, e que após 21 dias, essa dosagem não alterava mais a expressão desses genes.

A partir do estudo de Murakami et al.²⁹ (2003), na qual os autores conseguiram obter proliferação celular com 1ng de bFGF, essa concentração pode ser a mais adequada para estimular as funções básicas das células do ligamento periodontal. Embora, com o bFGF nessa concentração tenha promovido aumento na expressão de mRNA para MMP-1. Apesar de que, esse aumento na expressão do gene não indica que as células tenham sintetizado a protease e que por sua vez, esta tenha promovido a degradação de fibrilas colágenas. Mesmo porque, caso a síntese tenha acontecido, essa colagenase é liberada na forma latente, necessitando ser ativada como descrito anteriormente.

Além disso, existe a possibilidade do bFGF modular a ação celular do TGF- β e vice-versa. No estudo de Noda e Vogel³¹ (1989), osteoblastos humanos cultivados na presença de 0.1 a 10 ng de bFGF/ml de meio de cultura, aumentaram a expressão de genes para TGF- β . Edwards et al.¹⁰ (1987), conseguiram reduzir a síntese de procologenase induzida pelo bFGF em fibroblastos do pulmão, quando as células foram incubadas na presença de TGF- β .

Esses dados descritos acima revelam a importância da presença dos dois fatores de crescimento na modulação das atividades celulares durante a neoformação de tecidos periodontais, e nos faz acreditar na possibilidade do emprego

do bFGF e do TGF- β no tratamento de defeitos periodontais associados ou não, a regeneração tecidual guiada.

Entretanto, vale ressaltar que os estudos *in vitro*, não podem ser considerados conclusivos, já que uma das limitações deste tipo de estudo, é que estes não são realizados na presença de outros fatores de crescimento, células e demais componentes da matriz extracelular, as quais estão presentes e/ou são liberados naturalmente na área da lesão periodontal, modulando ou modificando a ação das substâncias testadas, como demonstrado nos estudos de Noda e Vogel³¹ (1989) e de Edwards et al.¹⁰ (1987).

Devido a isso, são necessários mais estudos *in vitro* e também, em animais para se chegar a conclusões de qual é a real ação dos fatores de crescimento sobre as células dos tecidos periodontais e qual o melhor modo de aplicação e concentração ideal de cada fator a ser utilizada para estimular a regeneração periodontal.

3 Proposição

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos fatores de crescimento de fibroblastos básico (b-FGF) e de transformação de crescimento beta (TGF- β) aplicados isoladamente e também, combinados sobre: 1) proliferação celular; 2) expressão de genes para síntese de colágeno tipos I e III, metaloproteases-1 e -2, e inibidores teciduais das metaloproteases (TIMPs 1, 2 e 3); 3) síntese de TGF- β e b-FGF.

4 Material e método

4.1 Linhagem Celular

No presente estudo foi utilizada uma única linhagem de cultura primária de células do ligamento periodontal doadas pela Prof^a Dr^a Martha Somerman da Universidade de Washington. A utilização destas células foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (ver anexo).

Segundo o método proposto por Somerman et al.⁴⁹ (1988), as células do ligamento periodontal foram obtidas do terço médio de pré-molares indicados à extração por razão ortodôntica, sem sinais aparentes de patologia. Após a exodontia, e previamente à obtenção das amostras de ligamento, realizou-se a lavagem (dos dentes extraídos), por 5 vezes, com meio de Eagle modificado por Dulbecco* (DMEM) suplementado com 500 U/mL de penicilina* e 500 ug/mL de estreptomicina* (meio com 5X de antibióticos), e somente então foi feita a raspagem do terço médio da raiz (para obtenção das células do ligamento periodontal) e colocação das amostras (de ligamento) em placas para cultura** de 10x100 mm em incubadora*** a 37⁰C por 25 minutos para início da adesão ao substrato plástico do frasco. Então, acrescentou-se 4ml de DMEM suplementado com 500 U/mL de penicilina*, 500 ug/mL de estreptomicina* e 10% de soro fetal bovino* (FBS), e os explantes foram incubados a

* Gibco GRL, Life Technologies

** Corning Incorporation, NY - USA

*** Nuare US Autoflow, Model NU 4500, Plymouth, MN - USA

37°C (5% CO₂, 95% ar e 98% de umidade) por 12 horas. Em seguida, este meio foi substituído pelo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS)*, 100 U/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina (meio padrão). Quando as células começaram a proliferar ao redor dos explantes, e atingiram confluência, estas foram tripsinizadas com 0,08% tripsina/0,04% EDTA* e então, foi feita a “primeira passagem” para as garrafas de 25cm² de área de crescimento celular. Após estas células atingirem confluências nessas garrafas, elas foram novamente tripsinizadas, resuspendidas em DMEM padrão e transferidas para garrafas de 75cm² de área de crescimento celular. Após atingirem confluência, novamente foram tripsinizadas, resuspendidas em 10 ml de DMEM, transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e as células resuspendidas em 3 a 5 ml de DMSO* (meio de congelamento). Cada 0,5 ml desta suspensão celular foi transferido para um vial**. Todos os vials foram colocados em um isopor com gelo por 15 minutos e então, transferidos para tanques de nitrogênio líquido, onde as células permaneciam congeladas.

Todos os experimentos foram realizados com as células do ligamento periodontal entre a 7^a e 10^a passagens.

* Gibco GRL, Life Technologies

** Corning Incorporation, NY - USA

4.2 Grupos Experimentais

Para avaliar o efeito do b-FGF* e do TGF- β * nos diferentes parâmetros empregados no estudo, todos os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando-se os seguintes grupos:

Grupo Controle: células em meio de cultura padrão sem fator de crescimento

Grupo b-FGF: 1ng ou 10ng de b-FGF/ml de meio de cultura

Grupo TGF- β : 1ng ou 10ng de TGF- β /ml de meio de cultura

Grupo b-FGF +TGF- β : - 1ng b-FGF + 1ng de TGF- β /ml de meio de cultura

- 10ng b-FGF +10ng de TGF- β /ml de meio de cultura

- 1ng b-FGF + 10ng de TGF- β /ml de meio de cultura

- 10ng b-FGF/mL + 1ng de TGF- β /ml de meio de cultura

Estas concentrações de b-FGF e TGF- β foram empregadas devido a estudos anteriores terem mostrado efeitos significativos na proliferação celular (OATES et al.³², 1993; TAKAYAMA et al.⁵², 1997) e na expressão de genes para síntese de colágenos tipo I, III e MMP-1 (ALVARES et al.¹, 1995; TAKAYAMA et al.⁵², 1997; PALMON et al.³⁶, 2001).

* Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, CA - USA

4.3 Teste de Proliferação Celular

O efeito mitogênico dos fatores de crescimento foi avaliado pela mensuração de MTS tetrazolium* convertido em formazan pelas células do ligamento periodontal viáveis. Para tal experimento, as células foram cultivadas com DMEM padrão em frascos de 75 cm² de área para crescimento celular. Quando essas células atingiram uma confluência de 70 a 80%, o DMEM padrão foi substituído pelo DMEM suplementado com 2% de FBS, 100 U/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina, e as células incubadas por 24 horas. Após este período, o meio foi aspirado, as células tripisinizadas e resuspendidas em DMEM com 2% de FBS. Então, utilizando-se a câmara de Neubauer, foi verificada a concentração de células em cada mL desta suspensão celular. A partir deste dado, a concentração de células no meio de cultura foi ajustada para 2×10^5 células/ml. Em seguida, essas células foram semeadas em placas para cultivo celular contendo 24 orifícios, sendo três orifícios para cada grupo (triplicata). Em cada orifício foi colocado 1ml de meio de cultura contendo 2×10^5 céls/ml, e a placa incubada a 37°C (95% de ar, 5% de CO₂ e 98% de umidade) por um período de 8 horas para completa adesão e “espraiamento” celular. Após esse período, o meio de cultura foi aspirado e substituído por 1ml de DMEM com 2% FBS contendo ou não os fatores de crescimento de acordo com os grupos anteriormente descritos.

* Promega, Madison, WI - USA

Após os períodos de 24 e 48 horas de incubação, o meio de cultura foi aspirado, as células tripisinizadas e resuspendidas em 0,5ml DMEM com 2% FBS para cada orifício. Então, de acordo com as instruções do fabricante, uma placa para cultivo celular contendo 96 orifícios recebeu 100µl de DMEM com as células resuspendidas + 20µl de MTS tetrazolium (reagente único que compõe o kit) para cada orifício, sendo o experimento realizado em triplicata. Além disso, seguindo as próprias instruções do fabricante do kit, para a avaliação da real absorvância, foi necessário incluir um grupo controle negativo (triplicata), a qual era representado por meio de cultura sem células mais o MTS.

Essa placa foi incubada por 2 horas e após este período, a solução de MTS tetrazolium reduzida a formazan pelas células viáveis produziu uma reação de coloração, registrada por um leitor de ELISA a 490nm. Essa reação de coloração foi registrada como nível de absorvância, e para a obtenção dos resultados, o valor das leituras do grupo controle negativo foi subtraído do valor das leituras das amostras, e então, foram obtidas as médias e desvios-padrão da absorvância das triplicatas de cada grupo (Tabela 1a – Anexos).

4.4 Expressão de genes para colágeno tipos I e III, MMP-1 e -2, e TIMPs 1, 2 e 3 pelo RT-PCR

Para avaliar o efeito dos diferentes tipos de tratamento com o b-FGF e TGF β na expressão de colágeno tipos I e III, MMP-1 e -2 e TIMPs 1, 2 e 3, as células do ligamento periodontal foram cultivadas com meio padrão em frascos para cultivo celular de 75 cm² de área de crescimento celular. Quando essas células atingiram uma confluência de 70 a 80%, o meio de cultura padrão foi substituído por DMEM suplementado com 2% de FBS, 100 U/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina, e as células incubadas por 24 horas. Após as 24 horas, este meio foi aspirado, as células tripisinizadas e então, resuspendidas em DMEM com 2% de FBS e ajustadas para concentração de 2×10^5 céls/ml, conforme descrito anteriormente. Em seguida, essas células foram semeadas em placas para cultivo celular contendo seis orifícios, sendo três orifícios para cada grupo. Cada orifício recebeu 1ml de meio de cultura contendo 2×10^5 células mais os fatores de crescimento, de acordo com os grupos anteriormente descritos. Então, as células foram cultivadas por 72 horas, de acordo com a metodologia descrita por Takayama et al.⁵² (1997) e, após este período, o RNA total foi isolado pelo método da guanidina isotiocianato* (Trizol), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente. Brevemente, após o período de incubação na presença dos fatores de crescimento, o meio de cultura foi aspirado e as células foram resuspendidas no próprio Trizol (na proporção de 1ml de Trizol para

* Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbag, CA - USA

cada orifício da placa para cultivo celular). Então, cada 1ml do trizol contendo as células correspondentes a cada grupo experimental, foi transferido para um tubo tipo “eppendorf”, congelado a -70°C e transferido em gelo seco até o Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Para a extração do RNA total, as células em trizol foram descongeladas, os tubos de eppendorf agitados por 30 segundo e deixados a temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 ml da suspensão foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio, sendo as amostras centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C . A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, sofrendo agitação em “vortex” e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C . O precipitado foi lavado em etanol 100%, sendo então seco a temperatura ambiente, com o tubo invertido sobre um papel de filtro. As amostras de RNA foram suspensas em $50\mu\text{l}$ de água deionizada e livre de RNase, sendo então as amostras armazenadas a -70°C . Uma alíquota de $5\mu\text{l}$ foi utilizada para determinar a concentração de RNA/ μl nas amostras, usando o aparelho GeneQuant*. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa (Superscript II**) utilizando $5\mu\text{g}$ de RNA, e tendo como volume final de reação $200\mu\text{l}$.

* Pharmacia Amershan Biosciences, EUA

** Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, CA - USA

A expressão quantitativa dos genes para colágeno tipos I e III, metaloproteases (MMPs) 1 e 2 e inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs) 1, 2 e 3 foi analisada através de reações de RealTimePCR, utilizando-se o sistema SYBRGreen em um aparelho ABI5700*. Os Primers adequados para tais reações foram criados a partir de seqüências de mRNA para os genes alvos, do programa Primer Express*, e se encontram descritos, assim como as propriedades de cada reação (concentração de primer utilizada, temperatura de annealing, temperatura de melting, tamanho do fragmento de amplificação) na Tabela 9a - Anexos. Para as reações de RealTimePCR, foram utilizados 12,5µl do reagente SYBRGreen Master Mix*, que contém o fluoróforo SYBRGreen 1, a enzima polimerase AmpliTaq Gold, DNTPs com dUTP, o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência e os demais componentes de tampão, já devidamente otimizados), 5µl da solução de cDNA (sintetizado como previamente descrito), 4µl de água MiliQ tratada com DEPC e 1µl da solução contendo cada primer (a partir de uma solução stock, na qual cada primer se encontra na concentração de 1 µg/µl, eram preparadas alíquotas de modo a ajustar a concentração ideal de primer a ser utilizada em cada reação para o volume de 1µl). A reação de amplificação compreendeu basicamente 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C, empregada para a obtenção

* Applied Biosystems, Warrington – Reino Unido

de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Previamente, as reações de RealTimePCR foram otimizadas com relação as concentrações ideais de cada par de primers e temperatura de annealing, de modo a maximizar eficiência e a especificidade de amplificação. Durante a padronização, os produtos de amplificação também foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corados com nitrato de prata 0.2% diluído em água bidestilada, e analisados quanto a sua especificidade através da análise no gel (análise do tamanho do fragmento de amplificação em comparação a padrões de peso molecular, e análise da presença ou ausência de bandas inespecíficas). O sistema utilizado realizou as reações de amplificação e detecção, e quantificou as amostras (o termociclador ABI5700 associado ao Software ABI Prism, Applied Biosystems) através da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação nucleases fluorogênicas (SYBRGreen 1) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação das amostras, atingiu um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permitiu a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Para facilitar a visualização dos resultados, estes foram expressos em ‘fold induction’ ou alteração na expressão relativa ao controle não tratado (Tabela 2a – Anexos).

Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para a beta-actina, um gene de expressão constitutiva,

utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Além disso, os níveis de expressão de beta-actina foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos primers utilizados.

4.5 Análise da síntese de TGF- β e b-FGF

A análise do TGF- β e o b-FGF presente no sobrenadante das culturas de células do ligamento periodontal foi quantificado usando o teste ELISA “sandwich”. Brevemente, as células foram cultivadas com meio padrão em frascos de 75 cm² de área para crescimento celular. Quando essas células atingiram uma confluência de 70 a 80%, substituiu-se o DMEM padrão pelo DMEM suplementado com 2% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina, e as células incubadas por 24 horas. Após este período, o meio foi aspirado, as células tripisinizadas, resuspendidas em DMEM com 2% de soro fetal bovino e ajustadas para concentração de 5×10^4 céls/ml. Em seguida, essas células foram semeadas em placas para cultivo celular contendo 6 orifícios, sendo três orifícios para cada grupo. Para cada orifício colocou-se 1ml de DMEM contendo 5×10^4 céls/ml, e as células permanecerem incubadas a 37°C (95% de ar, 5% de CO₂ e 98% de umidade) por um período de 8 horas para completa adesão e “espraiamento” celular. Após esse período, o meio de cultura foi aspirado e substituído por 1ml de

DMEM com 2% FBS contendo ou não os fatores de crescimento de acordo com os grupos anteriormente descritos, e incubadas por 24 horas.

Após esse período, as células não aderidas foram removidas por lavagem com solução de tampão fosfato, realizada 3 vezes em seqüência, e o meio substituído por outro meio sem soro fetal bovino e sem os fatores de crescimento, sendo que as células permaneceram incubadas durante 24 horas (COLLETA et al.⁸,1999). Em seguida, os sobrenadantes contendo a forma latente do TGF- β foram convertidos para a forma ativa através do tratamento com 0.2 mL de 1 M HCL por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido pela neutralização com 0.2 mL de 1.2 M NAOH em 0.5 M HEPES. As amostras foram avaliadas usando Kit ELISA* de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 100 μ L dos sobrenadantes testados foram transferidos para placas de cultivo celular de 96 orifícios, recobertas com anticorpo monoclonal contra TGF- β , seguindo-se da incubação durante 1 hora a 37°C. Após esse período, o sobrenadante foi aspirado e os orifícios lavados 3 vezes com 200 μ L de solução tampão. Então, 100 μ L de Anti-TGF- β (anticorpo monoclonal conjugado a peroxidase) foi adicionado em cada orifício e incubado durante 1 hora a 37°C. Este conjugado foi removido, os orifícios lavados como descrito anteriormente, e 100 μ L de solução substrato (peróxido de hidrogênio estabilizado + tetrametilbenzidine estabilizado) adicionada a cada orifício e as placas incubadas por 30 minutos (temperatura ambiente e protegido da luz). A seguir, 100 μ L de “stop solution” (0.19 M

* R & D Systems, Minneapolis, MN - USA

ácido sulfúrico) foi adicionada e a leitura feita a 450 nm em leitor de ELISA. A concentração do TGF- β foi determinada com referência à curva padrão obtida com as diferentes diluições do TGF- β recombinante.

Para a análise do b-FGF também foi utilizado um Kit ELISA^{*}, seguindo basicamente o mesmo protocolo empregado para o TGF- β , não havendo a necessidade de se realizar o procedimento de conversão do fator de crescimento da forma latente para a ativa.

4.6 Análise estatística

Para os experimentos de proliferação celular e síntese de bFGF e TGF- β , às diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram avaliadas, usando o teste ANOVA, seguido da Comparação Múltipla de Bonferroni para comparações pareadas entre os grupos, com nível de significância de 5%.

No experimento que avaliou a expressão de genes, como não foi possível verificar a hipótese de distribuição próxima da normal para os dados, realizou-se a análise dos resultados com o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para amostras independentes, uma vez que este teste não compara apenas a localização das amostras em cada grupo por meio de postos médios ou médias, mas também é sensível à diferenças nas formas gerais da distribuição dos dados como, dispersão e *skewness*. O nível de significância adotado para este teste foi de 10%.

5 Resultado

5.1 Efeitos dos fatores de crescimento na proliferação celular

O teste ANOVA revelou haver diferenças ($p < 0.05$) entre os grupos experimentais para os períodos de 24 e 48 horas. Para avaliar quais tipos de tratamento haviam estimulado a proliferação celular, realizou-se a comparação pareada entre as médias dos grupos por meio da Comparação Múltipla de Bonferroni.

Na ausência de ambos os fatores de crescimento (grupo controle), as células do ligamento periodontal não proliferaram em meio de cultura com reduzida concentração de soro fetal bovino nas primeiras 24 horas (Gráficos 1, 2 e 3). Somente após 48 horas, essas células promoveram a redução do MTS em formazan (Gráficos 4, 5 e 6), indicando um aumento estatisticamente significativo da proliferação celular ($0,143 \pm 0,041$) em relação ao grupo controle do período de 24 horas ($p < 0.001$) (Tabela 4a – Anexos).

O tratamento com ambas as doses de bFGF (1 ou 10 ng) não aumentou a proliferação celular em relação ao controle para os períodos de 24 e 48 horas ($p > 0.05$) (Tabelas 5a e 6a - Anexos), embora após 24 horas foi observado um aumento na proliferação celular com a dose de 1ng (Gráfico 1), enquanto após 48 horas a mesma dose esteja associada a uma redução na absorvância (Gráfico 4) e, conseqüentemente, na proliferação celular. Provavelmente, isso ocorreu devido a desvio-padrão apresentado pelas amostras do grupo 1ng de bFGF no período de 24 horas e do grupo controle no período de 48 horas.

Outro aspecto quanto aos resultados observados no grupo bFGF foi o fato de não haver diferenças no estímulo mitogênico entre as duas doses para ambos os períodos (1ng x 10ng bFGF- 24 e 48 h, $p>0.05$) (Tabelas 5a e 6a - Anexos). Entretanto, pelo Gráfico 7, verifica-se que o bFGF induziu a proliferação celular de maneira tempo-dependente, somente para a dose de 10ng/ml, já que houve aumento significativo na proliferação celular após 48 h em comparação à mesma dose no período de 24h ($p<0.01$) Para a dose de 1ng não foram observadas diferenças entre os períodos ($p>0.05$).

O TGF- β mostrou ser tempo, mas não dose dependente. Isto porque, ambas as doses (1ng ou 10ng) aumentaram a redução do MTS em formazan em comparação ao grupo controle somente nas primeiras de 24 horas ($p<0.01$ e $p<0.001$, respectivamente) (Gráficos 2 e 5) (Tabelas 5a e 6a – Anexos). Entretanto, não foram observadas diferenças no estímulo a proliferação entre as duas doses para os dois períodos ($p>0.05$) (Gráficos 2, 5 e 7).

Todas as associações de bFGF com TGF- β estimularam a proliferação (Gráficos 3 e 6) de maneira significativa em relação ao grupo controle independente do período ($p<0.01$ – 1ng bFGF + 1ng TGF- β ; $p<0.001$ – demais associações; ver Tabelas 5a e 6a - Anexos). A menor absorbância e, portanto, o menor estímulo proliferativo ocorreu com a associação das menores doses dos fatores de crescimento para ambos períodos (Gráfico 3 e 6). No entanto, só houve diferenças estatisticamente significantes entre essa associação e a associação das maiores doses ($p<0.05$) e com

10ng de bFGF + 1ng de TGF- β ($p<0.001$) no período de 24 horas de tratamento. Após 48 horas de incubação, não houve diferenças significativas ($p>0.05$) na proliferação celular entre os grupos de associação dos fatores de crescimento.

Apesar disso, um efeito tempo-dependente foi observado com as associações de 1ng de cada fator e de 10ng de cada fator (Gráfico 7). Após 48 horas, ambas associações induziram a uma maior resposta proliferativa comparadas ao período de 24 horas ($p<0.001$) (Tabela 4a – Anexos).

Em comparação ao uso isolado do bFGF e do TGF- β , a adição de 10ng de bFGF + 1ng de TGF- β no meio de cultura promoveu um efeito mitogênico superior após os períodos de 24 e 48 horas ($p<0.001$) (Tabelas 5a e 6a – Anexos).

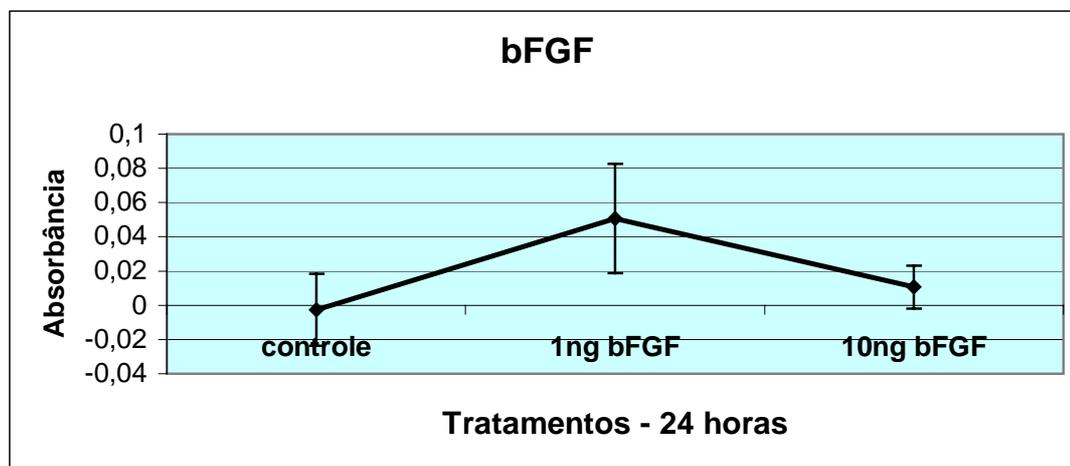


GRÁFICO 1 – Proliferação das células do ligamento periodontal cultivadas por 24h em DMEM suplementado com bFGF. Média \pm SD do nível de absorbância correspondente ao MTS reduzido a formazan após 2h de incubação.

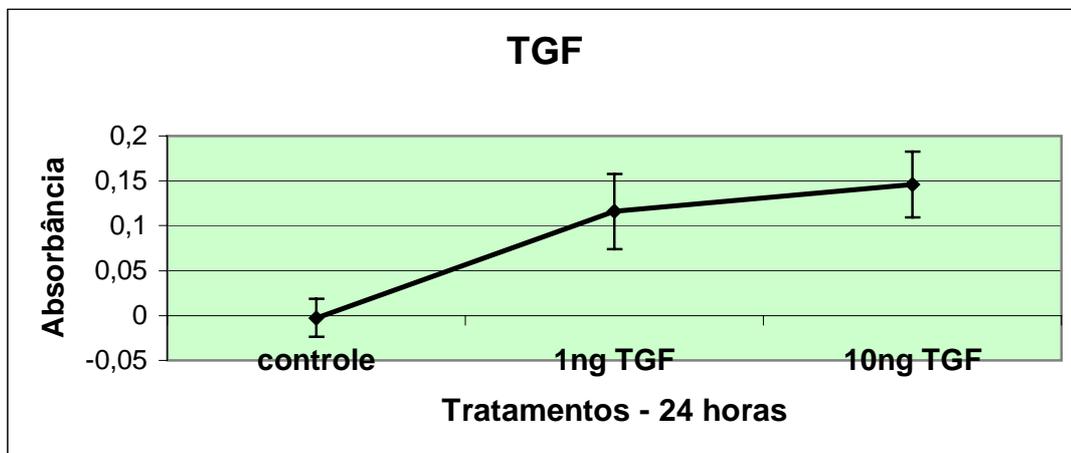


GRÁFICO 2 – Proliferação das células do ligamento periodontal cultivadas por 24h em DMEM suplementado com TGF- β . Média \pm SD do nível de absorbância correspondente ao MTS reduzido a formazan após 2h de incubação.

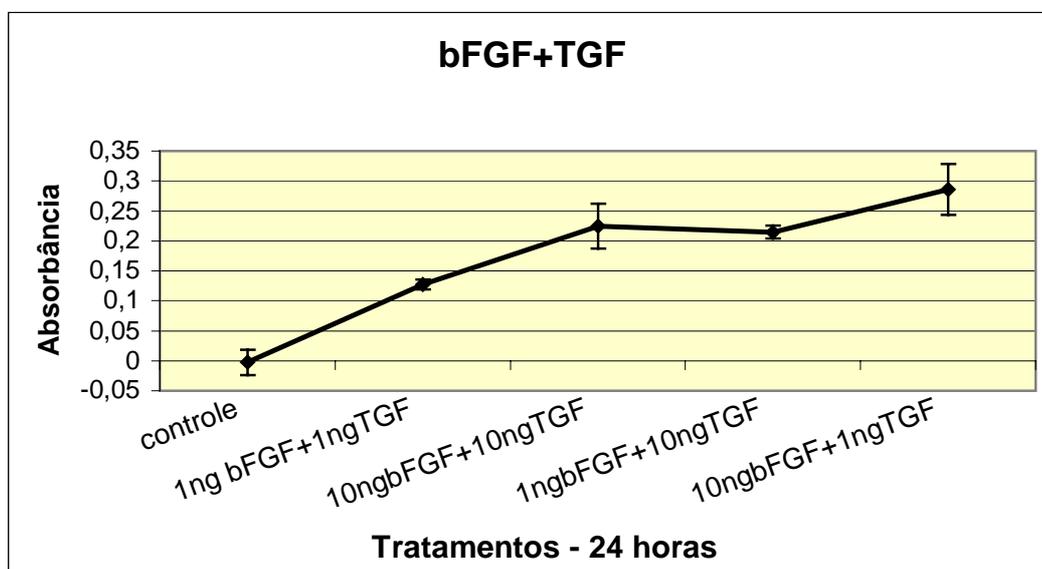


GRÁFICO 3 – Proliferação das células do ligamento periodontal cultivadas por 24h em DMEM suplementado com bFGF associado ao TGF- β . Média \pm SD do nível de absorbância correspondente ao MTS reduzido a formazan após 2h de incubação.

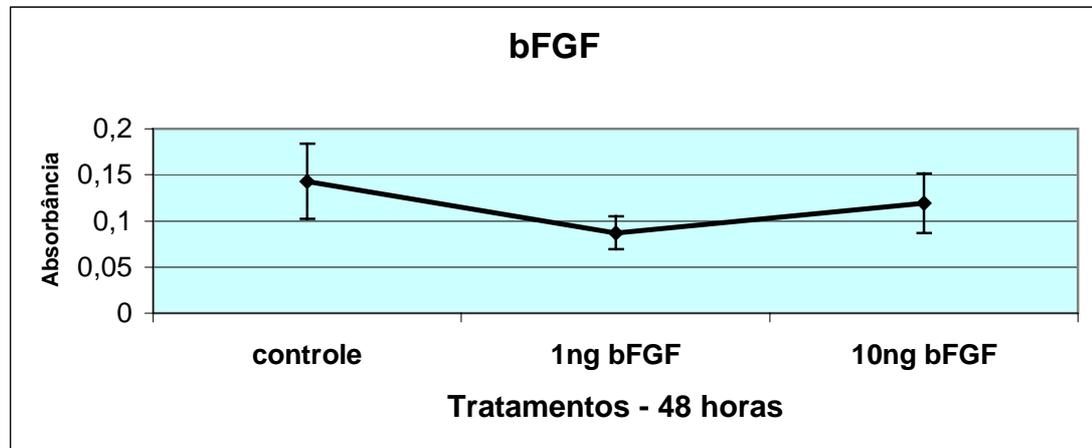


GRÁFICO 4 – Proliferação das células do ligamento periodontal cultivadas por 48h em DMEM suplementado com bFGF. Média \pm SD do nível de absorvância correspondente ao MTS reduzido a formazan após 2h de incubação.

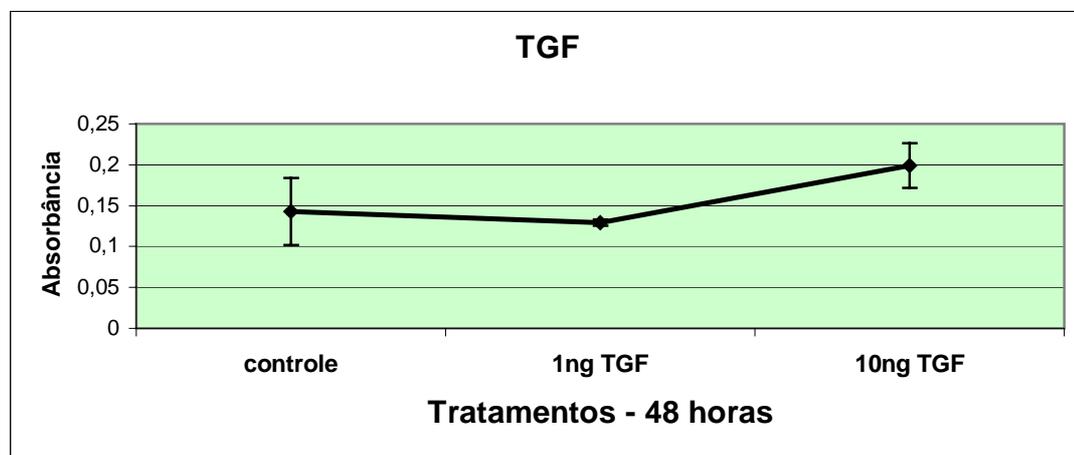


GRÁFICO 5 – Proliferação das células do ligamento periodontal cultivadas por 48h em DMEM suplementado com TGF- β . Média \pm SD do nível de absorvância correspondente ao MTS reduzido a formazan após 2h de incubação.

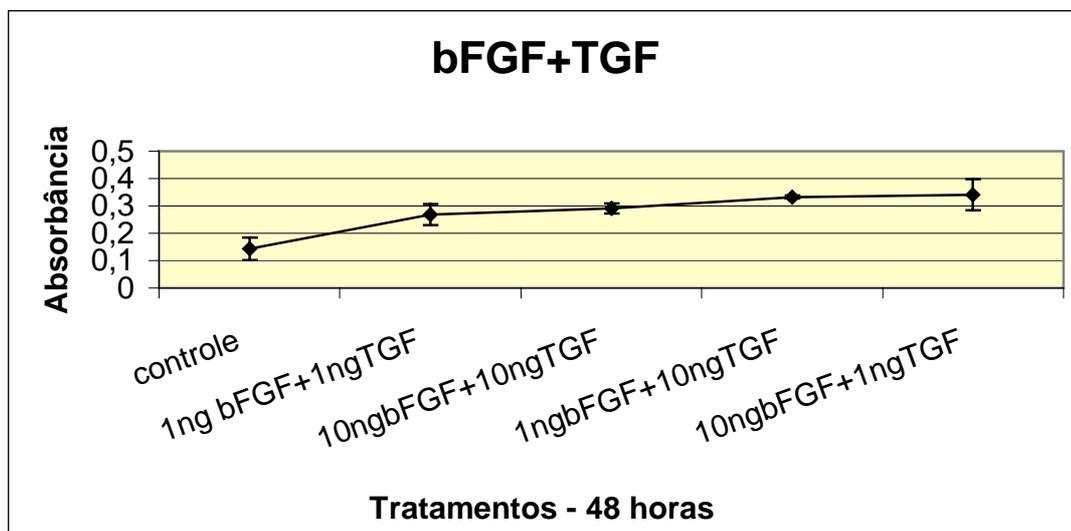


GRÁFICO 6 – Proliferação das células do ligamento periodontal cultivadas por 48h em DMEM suplementado com bFGF associado ao TGF- β . Média \pm SD do nível de absorbância correspondente ao MTS reduzido a formazan após 2h de incubação.

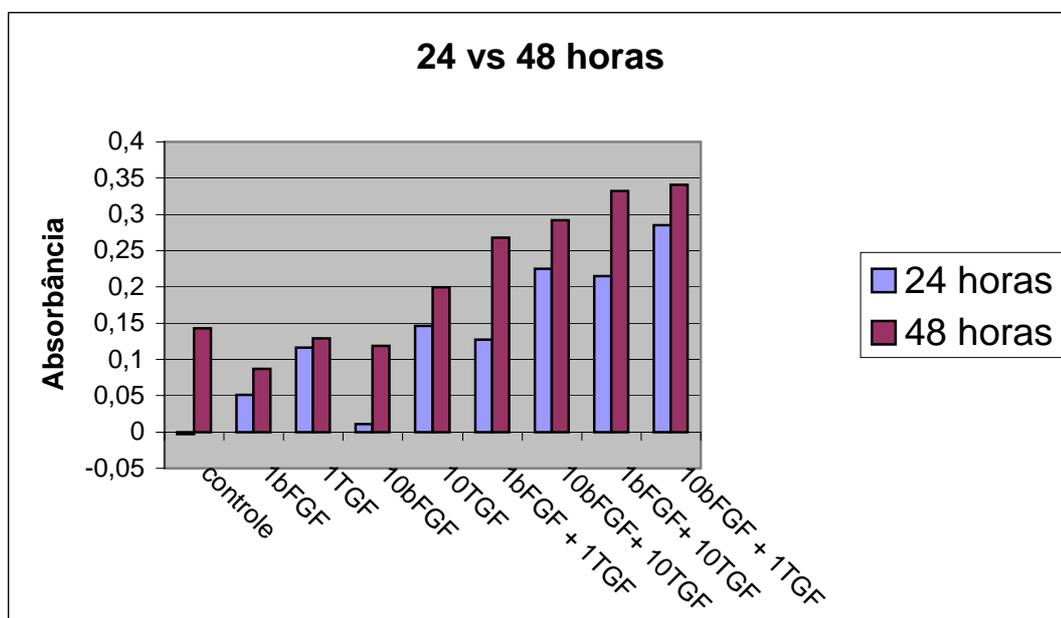


GRÁFICO 7 – Resposta proliferativa das células do ligamento periodontal tratadas com bFGF e TGF- β , associados ou não, por 24 e 48 horas.

5.2 Efeito dos fatores de crescimento na expressão de genes ao nível de RNA mensageiro

Os resultados indicaram que, de maneira geral o tratamento com TGF- β promoveu efeitos anabólicos nos fibroblastos, representados por estímulo à transcrição dos genes de colágeno tipos I e III (Gráfico 8) e também um estímulo mais discreto dos genes dos inibidores teciduais das metaloproteases 1, 2 e 3 (Gráfico 10), além da inibição das metaloproteases 1 e 2 (Gráfico 9). O oposto foi observado em relação ao tratamento com b-FGF, que promoveu mais estímulos do tipo catabólico, isto é, aumento da transcrição dos genes das MMP1 e 2 (Gráfico 9), e inibição de colágeno tipos I e III (Gráfico 8) e também dos TIMPs 1, 2 e 3 (Gráfico 10).

Já a associação dos fatores de crescimento promoveu essencialmente efeitos anabólicos entretanto, mais discretos do que a utilização do TGF- β isoladamente, exceto em relação à indução da transcrição dos TIMPs 1, 2 e 3 (Gráfico 10) que foi mais potente nas associações em que a concentração de b-FGF e TGF- β era a mesma, ou quando a concentração de TGF- β era maior do que a de b-FGF. Na associação de 1 ng de TGF- β e 10ng de b-FGF percebe-se que os efeitos catabólicos do b-FGF, já observados com a utilização isolada do b-FGF, se sobrepõe de forma perceptível, embora discreta (Gráficos 8, 9 e 10).

Devido à impossibilidade de verificar a hipótese de distribuição próxima da normal para os dados, realizamos a análise dos resultados com o teste não

paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para amostras independentes. Considerando o reduzido tamanho da amostra, o nível de significância aceito para rejeitar a hipótese de nulidade foi de 10%. A Tabela 7a (Anexos) apresenta as diferenças observadas entre os grupos, segundo as comparações realizadas, apenas com a finalidade de auxiliar na observação das diferenças entre os tratamentos nos gráficos.

É interessante notar que embora um efeito dose-dependente tenha sido observado para o TGF- β em relação à expressão de colágeno e MMPs, o aumento da dose de b-FGF não promoveu diferenças significativas nos resultados, exceto para a expressão de TIMP-1.

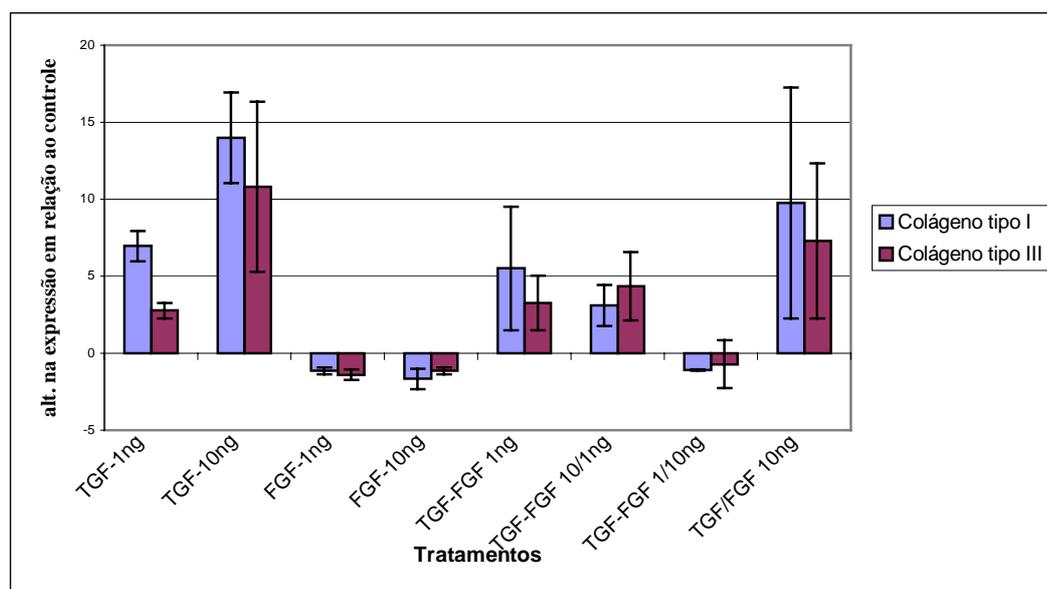


GRÁFICO 8 - Expressão relativa dos genes colágeno tipo I e colágeno tipo III segundo o tratamento realizado. Resultados normalizados para beta-actina. Colunas indicam média da alteração em relação ao controle não tratado, e as barras verticais o desvio padrão (experimentos realizados em triplicata).

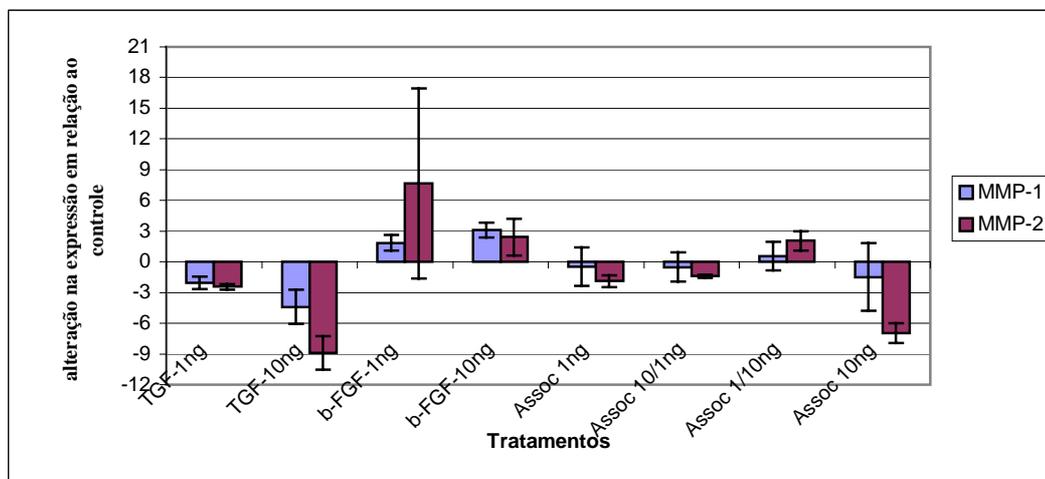


GRÁFICO 9 - Expressão relativa dos genes MMP-1 e MMP-2 segundo o tratamento realizado. Resultados normalizados para beta-actina. Colunas indicam média da alteração em relação ao controle não tratado, e as barras verticais o desvio padrão (experimentos realizados em triplicata).

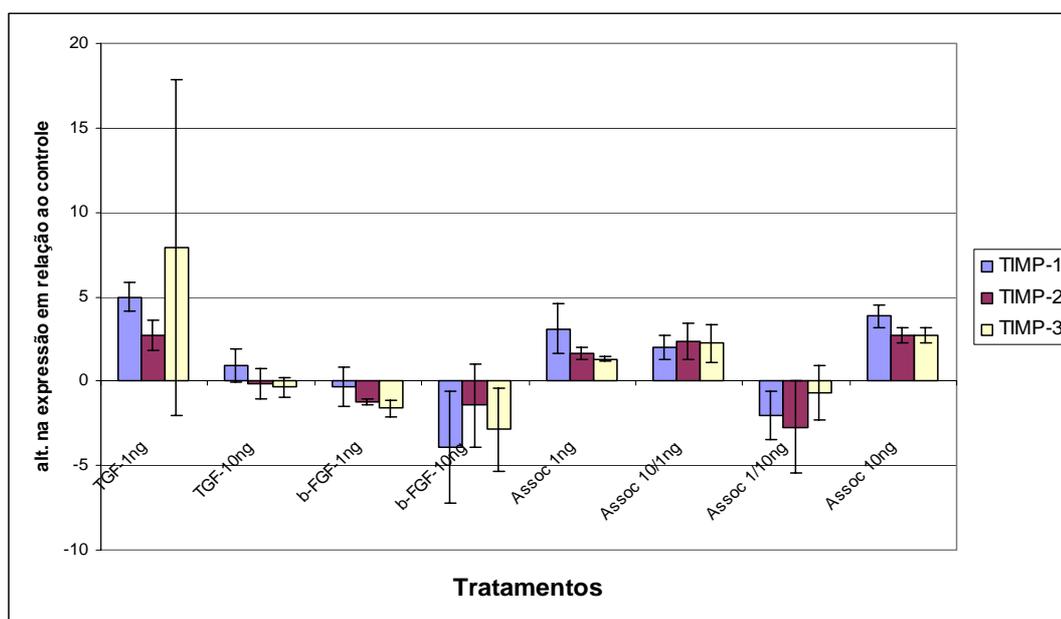


Gráfico 10 - Expressão relativa dos genes TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 segundo o tratamento realizado. Resultados normalizados para beta-actina. Colunas indicam média da alteração em relação ao controle não tratado, e as barras verticais o desvio padrão (experimentos realizados em triplicata).

5.5 Efeito dos fatores de crescimento na síntese de TGF- β e b-FGF

Os resultados do teste ELISA indicaram que, somente o tratamento com a associação de 1ng de cada fator de crescimento, estimulou a células a sintetizarem o TGF- β na concentração de $335,16 \pm 101,65$ pg/mL. Nos demais grupos, não foram detectada a presença deste fator de crescimento no sobrenadante.

Quanto a síntese de bFGF, este fator de crescimento foi encontrado no sobrenadante de todos os grupos (Tabela 3a – Anexos) (Gráfico 11), e o teste ANOVA mostrou haver diferenças entre os grupos ($p < 0.05$). Para verificar qual tratamento estimulou mais as células do ligamento periodontal a sintetizarem o bFGF, o teste de Comparação Múltipla de Bonferroni foi empregado.

Os resultados indicaram que as células incubadas na presença de 10ng de bFGF apresentaram uma maior síntese deste fator de crescimento comparadas ao grupo controle ($p < 0.001$), e a grupo TGF- β ($p < 0.001$) (Tabela 8a - Anexos). Além disso, o tratamento com o bFGF modulou a síntese dele mesmo de maneira dose-dependente, já que houve uma diferença estatisticamente significante entre as doses de 10ng e 1ng de bFGF ($p < 0.05$).

Quando os fatores de crescimento foram associados, a maiores concentrações de bFGF foram encontradas nos sobrenadantes das células tratadas com as associações que continham 10ng de bFGF (Gráfico 11). Porém, a maior dose de bFGF associada a menor dose de TGF- β promoveu uma maior síntese ($p < 0.001$) comparada a associação das maiores doses de cada fator (Tabela 8a - Anexos).

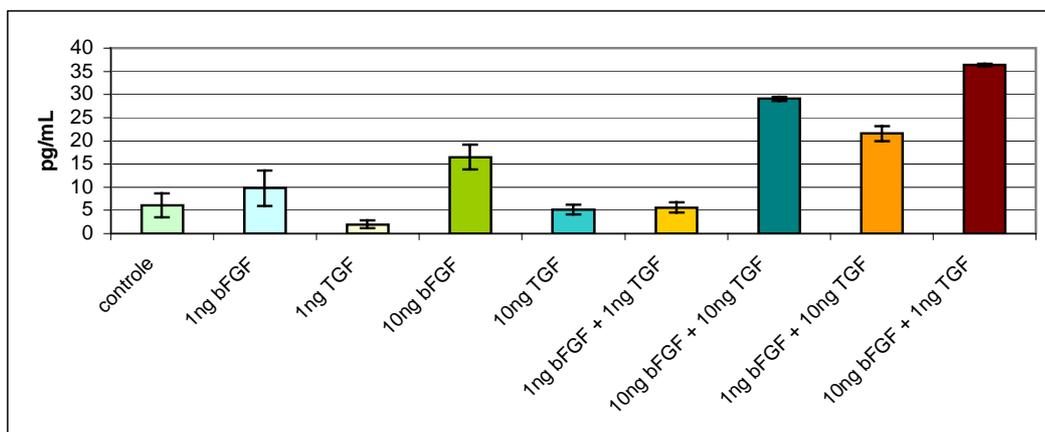


GRÁFICO 11 – bFGF presente no sobrenadante segundo o tratamento realizado. Colunas indicam a síntese média em pg/mL, e as barras verticais o desvio padrão (experimento realizado em triplicata).

6 Discussão

Atualmente, acredita-se que as células do ligamento periodontal são fundamentais para a regeneração dos tecidos periodontais perdidos em decorrência da progressão da doença periodontal destrutiva, sendo necessária a sua migração, inserção e proliferação sobre a superfície radicular, visando a síntese de componentes do tecido conjuntivo e a diferenciação em outros tipos celulares como os osteoblastos e cementoblastos.

Associado a esse conceito considera-se também que, existem certos mediadores químicos, como os fatores de crescimento, envolvidos com a coordenação de todos os eventos celulares, sendo o fator de crescimento de fibroblasto básico e o fator de transformação de crescimento beta, alguns dos mediadores que podem ter importante participação no processo de regeneração periodontal.

De fato, alguns estudos *in vitro* mostraram a capacidade de ambos os fatores de crescimento em estimular a proliferação (TERRANOVA et al.⁵⁷, 1989; OATES et al.³², 1993; DENNISON et al.⁹, 1994; TAKAYAMA et al.^{52,53}, 1997, 1998; MURAKAMI et al.^{28,29}, 1999, 2003; SHIMAZU et al.^{46,45}, 1999, 2003) e a síntese de componentes da matriz extracelular (IGNOTZ e MASSAGUE¹⁷, 1986; IGNOTZ et al.¹⁸, 1987; ALVARES et al.¹, 1995; CHANG et al.⁶, 2002; MAILHOT et al.²⁴, 1995; TAKAYAMA et al.⁵², 1997; MURAKAMI et al.²⁸, 1999, PALMON et al.^{35,36}, 2000,

2001; SHIMAZU et al.⁴⁵, 2003) enquanto que, alguns estudos realizados em cães, vêm confirmar o efeito clínico representado pela maior regeneração de osso alveolar com o TGF- β (MOHAMMED et al.²⁷, 1998; WIKESJO et al.⁵⁹, 1998), e de ligamento periodontal, osso alveolar e cimento radicular com o bFGF (MURAKAMI et al.^{28,29}, 1999, 2003; ROSSA Jr et al.⁴¹, 2000; TAKAYAMA et al.⁵¹, 2001).

Entretanto, até o momento, não se sabe como as células do ligamento periodontal responderiam à associação do bFGF ao TGF- β . Por esse motivo, o presente estudo empregou algumas metodologias com o objetivo de avaliar as reações das células do ligamento periodontal de humanos nas primeiras horas após a adição destes fatores de crescimento associados. Além disso, duas concentrações dos fatores de crescimento foram estudadas, visando a melhor compreensão do efeito dose *versus* atividades celulares.

Em relação à proliferação, quando os fatores de crescimento foram adicionados isoladamente ao meio de cultura, era esperado um aumento na resposta celular de maneira dose-dependente para o bFGF e TGF- β , e tempo-dependente somente para o TGF- β . No entanto, ambas as doses de bFGF não aumentaram a proliferação celular em nenhum dos períodos de incubação. Entretanto, apesar da grande variabilidade dos resultados encontrados na literatura, em geral, a dose de 10ng de bFGF tem exercido maior efeito mitogênico (TAKAYAMA et al.^{52,53}, 1997, 1998; MURAKAMI et al.²⁸, 1999; SHIMAZU et al.⁴⁵, 2003). Quanto ao efeito tempo de exposição ao bFGF, não é possível afirmar que esse fator não influencia na

resposta mitogênica tal como observado neste estudo, já que na literatura, todos os trabalhos estudaram o efeito do bFGF em um único período.

O fator de transformação de crescimento beta tanto na concentração de 1ng como de 10ng em ambos períodos estimulou a proliferação celular. Esse resultado concorda em parte com estudo de Oates et al.³² (1993), na qual as células do ligamento periodontal de humanos proliferaram mais quando incubadas com 1ng de TGF- β , sendo que essa proliferação somente ocorreu após 48 horas.

Alguns fatores podem ter contribuído para as diferenças entre os resultados do presente estudo e dos dados encontrados na literatura. O primeiro a ser considerado, é o método empregado para avaliar a proliferação celular. No presente estudo, foi utilizado um método na qual, a transformação de MTS em formazan pelas células viáveis, produzia uma reação de coloração registrada como absorbância. Então, quanto maior o nível de absorbância, pressupõe-se a presença de um maior número de células. Por outro lado, os demais estudos, utilizaram a incorporação de substância radiotiva no DNA celular. Esse segundo método garante uma maior precisão dos resultados, ao passo que, a variação na intensidade da coloração é mais sensível, podendo ocasionar uma maior discrepância dos resultados entre as amostras do mesmo grupo.

O segundo fator está relacionado às características inerentes às linhagens celulares empregadas em cada estudo. Embora o presente estudo tenha utilizado cultura primária de células do ligamento periodontal obtidas a partir de pré-

molares indicados para exodontia por razões ortodônticas, tal como, na metodologia dos estudos disponíveis na literatura (TAKAYAMA et al.^{52,53}, 1997, 1998; OATES et al.³², 1993; DENNISON et al.⁹, 1994; MURAKAMI et al.²⁸, 1999; SHIMAZU et al.⁴⁵, 2003), diferenças relacionadas aos próprios doadores como, variações genotípicas, envolvimento sistêmico e idade, e as relacionadas às próprias células como, o grau de diferenciação celular, ou seja, o número de passagens (cultivos) a partir da cultura inicial as quais as células foram submetidas até o seu uso, podem influenciar na capacidade e/ou na quantidade de receptores para o bFGF e TGF- β expressos pelas células, e conseqüentemente, na resposta celular as estas substâncias.

Embora não tenha sido pesquisada a expressão de receptores para bFGF e TGF- β , acredita-se que, a diferença entre as passagens celulares utilizadas no presente estudo (7^a - 10^a) e nos demais (3^a a 5^a) não tenha influenciado em relação ao número de receptores pelo menos, para o bFGF. Isto porque, o trabalho de Shimazu et al.⁴⁶ (1999), mostrou que as células do ligamento periodontal de humanos, não apresentam diferenças quanto ao número de receptores FGFR1 e FGFR2 entre a 3^a e 10^a passagens. Além disso, é possível acreditar também, que o grau de diferenciação celular não tenha reduzido o número de receptores para o TGF- β , pois Somerman et al.⁵⁰ (1990) mostraram que, dentro de uma mesma linhagem, as células do ligamento periodontal não sofrem alterações fenotípicas da 1^a até a 10^a passagem.

Mas as diferenças quanto aos tipos e quantidade de receptores expressos, pode estar relacionada à própria expressão fenotípica de cada linhagem

estabelecida, já que existem diferentes subpopulações de células do ligamento periodontal como identificado por Murakami et al.²⁹ (2003) em humanos, e por Gao et al.¹³ (1998), em ratos. No presente estudo, como o bFGF e o TGF- β utilizados isoladamente, mostraram-se capazes de influenciar na expressão de genes para colágeno, TIMPs e metaloproteases, acredita-se que estas células do ligamento periodontal apresentem receptores para ambos os fatores de crescimento.

Entretanto, diante da metodologia empregada, não é possível determinar quais e quantos receptores estas expressaram. Pode-se supor que as células expressavam um grande número de receptores para bFGF e menor, para o TGF- β de tal maneira, que a maior dose de bFGF (10ng) não tenha sido suficiente para estimular ao máximo a proliferação celular enquanto que, a dose de 1ng de TGF- β já foi o suficiente para estimular a mitose celular. Ou então, que o número de receptores para o bFGF sejam tão baixos, que esse fator de crescimento até na menor concentração não foi capaz de exercer o seu efeito mitogênico.

Porém, quando ambos fatores de crescimento foram adicionados ao meio de cultura principalmente, a maior dose de bFGF associada a menor TGF- β , a proliferação celular foi superior ao grupo controle e ao uso isolado de ambos fatores, para os períodos de 24 e 48 horas. Essa mesma associação estimulou as células a sintetizarem uma maior quantidade de bFGF comparada aos demais grupos. Então, esse concentração de bFGF recém sintetizado pode ter sido necessária para este fator de crescimento unir-se aos receptores livres e estimular a proliferação celular, caso a

suposição de que as células apresentem muitos receptores seja válida. Por outro lado, essa associação pode ter estimulado também, a expressão de receptores para o bFGF, aumentando o campo de atuação deste fator.

Diante desta observação, pode-se acreditar que o TGF- β por algum mecanismo desconhecido, atuou na modulação da síntese de bFGF pelas células do ligamento periodontal de humanos, e que essa modulação somente foi expressiva, quando os fatores de crescimento estavam associados (exceto para a associação das menores doses), já que o TGF- β isoladamente, não foi capaz de aumentar a síntese de bFGF comparado ao grupo controle.

No entanto, para verificar se o TGF- β realmente modula a síntese e até mesmo, a ação do bFGF, as células primeiramente deveriam que ter sido incubadas somente com o TGF- β , e posteriormente, o meio de cultura substituído por outro contendo somente o bFGF, semelhante ao estudo de Oates et al.³² (1993), na qual os autores avaliaram o efeito do TGF- β sobre o PDGF. Todavia, essa metodologia não simularia uma situação clínica, já que ao tratar uma lesão periodontal, os dois fatores de crescimento têm que ser aplicados ao mesmo tempo como realizado no estudo atual.

Por outro lado, ao mesmo tempo que, a dose de 1ng de TGF- β associada a 10ng de bFGF foi capaz de estimular a síntese de bFGF e potencializar a o estímulo a proliferação celular, esta concentração de TGF- β não conseguiu anular o efeito primariamente catabólico do bFGF na síntese de componentes da matriz

extracelular. Esse efeito catabólico foi representado pelo aumento na expressão de genes para as MMP-1 e MMP-2, e inibiu a expressão para os TIMPs e para os colágenos tipos I e III, resultado semelhante ao produzido pelo bFGF quando empregado isoladamente. Isso pode ter ocorrido pelo fato desta associação ter aumentando a síntese de bFGF, ou até mesmo, pelo aumento na expressão de receptores FGFR1 e/ou FGFR2, favorecendo a ação do bFGF sobre as células do ligamento periodontal.

Esse efeito proteolítico do bFGF pode ser necessário na fase inicial da cicatrização periodontal. Neste momento, há necessidade de aumento das colagenases para que estas possam promover a remoção dos fragmentos de colágeno e outros componentes da matriz extracelular degradados no processo patogênico, antes que os fibroblastos e demais células, iniciem a deposição de colágenos, fibronectina, proteoglicanos, e outros componentes da matriz extracelular (WIKESJO et al.⁵⁸, 1992). Como exemplo, o aumento na expressão da MMP-2, promovida por esse fator, pode ser de extrema importância, já que esta metaloprotease está relacionada à remoção de colágeno tipo I que apresentam estrutura anormal, os quais estariam retardando a formação de fibrilas colágenas durante a deposição e maturação das matrizes teciduais (OVERALL et al.³⁴, 1991).

Nas fases mais avançadas da cicatrização das lesões periodontais, onde há necessidade de formação tecidual, esse efeito catabólico do bFGF tem que ser “substituído” pelo efeito anabólico do TGF- β . Isso pode ocorrer naturalmente

através da própria redução de expressão de receptores FGFR1 e FGFR2 pelas células do ligamento periodontal (TAKAYAMA et al.⁵³, 1998), ou então, pela associação de uma concentração de TGF- β que seja capaz de anular ou modular o efeito proteolítico do bFGF.

De fato, essa segunda suposição é possível, já que todas as associações destes fatores de crescimento exceto, 10ng de bFGF com 1ng de TGF- β , atuaram na inibição da transcrição de genes para as MMP-1 e -2, aumentando a expressão colágeno tipos I e III, e TIMPs 1, 2 e 3, semelhante ao observado quando as células foram incubadas somente na presença do TGF- β .

A “anulação” ou “compensação” do efeito proteolítico do bFGF pelo TGF- β pode ter sido alcançado, por meio de vários mecanismos. A primeira possibilidade seria o fato de bFGF aumentar a síntese de TGF- β como observado por Noda e Vogel³¹ (1989), o que levaria a uma sobreposição dos efeitos deste fator de crescimento. No entanto, no sobrenadante celular, somente foi detectada a presença de TGF- β quando, associou-se as menores doses de cada fator. Então, de acordo com esses resultados é possível acreditar, que a síntese de TGF- β por esta linhagem utilizada, somente ocorra na presença de ambos, bFGF e TGF- β , e que essa associação tenha um efeito dose-dependente.

Por outro lado, os fatores de crescimento podem estar atuando de maneira independente nas atividades celulares, ou seja, o bFGF aumenta a expressão dos genes proteolíticos, mas isso é compensado pelo efeito formativo do TGF- β .

Realmente, Edwards et al.¹⁰ (1987) verificaram em fibroblastos humanos do trato respiratório inferior, que o TGF- β tem a capacidade de atenuar a expressão de mRNA para procologenase aumentada pelo bFGF.

Um outro mecanismo pelo qual o TGF- β estaria modulando a resposta celular ao bFGF, seria através da sinalização intracelular. Apesar do bFGF e do TGF- β terem receptores específicos na membrana celular, após a união deste fatores de crescimento aos seus receptores, as vias pelas quais ambas substâncias irão sinalizar a transcrição dos diferentes genes por via autócrina podem ser semelhantes.

Embora já tenha sido demonstrado que a sinalização do TGF- β ocorra por meio da fosforilação dos receptores tipos I e II serina/teonina kinase e participação de *Smads*, existe a possibilidade deste fator de crescimento promover a sinalização intra-celular através do padrão ERK/MAP kinase (SHI e MASSAGUE⁴⁴, 2003). Esta constitui a principal via de sinalização utilizada pelo bFGF nas células do ligamento periodontal de humanos (SHIMAZU et al.⁴⁵, 2003).

É importante considerar que no presente estudo a inibição da transcrição de mRNA para os TIMPs não resultou num aumento expressivo para as metaloproteases como observado por Overall et al.³³ (1991). Principalmente, em relação à concentração de 1ng de TGF- β , a qual inibição da expressão dos TIMPs- 2 e 3 foi acompanhada pela redução do genes para as MMPs-1 e -2.

Contudo, vale ressaltar que a expressão de genes para uma determinada proteína não significa que a célula irá sintetizá-la. Para ter a total certeza

de que as células ao serem estimuladas pelo bFGF iriam realmente aumentar a síntese de metaloproteases e inibir de colágeno e dos TIMPs, seria necessário realizar o teste ELISA para detecção de todas essas proteínas no sobrenadante celular. Além disso, as metaloproteases, quando sintetizadas, são liberadas para a matriz extracelular na forma latente, e somente irão atuar quando receberem algum estímulo que permita a sua ativação. Ademais, a inibição das MMPs pelos TIMPs é um fenômeno que ocorre após ambas as proteínas terem sido sintetizadas, então o TGF-beta pode ter o efeito de reduzir a expressão de ambos, MMPs e TIMPs, ainda a nível de RNAm, antes, portanto, da proteína estar presente e disponível para exercer seus efeitos biológicos. Desta forma, a inibição das MMPs pelo TGF-beta ocorreria a nível transcricional e não indiretamente, via aumento na expressão dos TIMPs.

Portanto, para considerar o bFGF como um mediador químico de ação proteolítica, seria necessário uma complementação na metodologia do estudo, o que ajudaria também, na melhor compreensão dos reais efeitos deste e de outros fatores de crescimento. Além disso, seria interessante e necessário avaliar uma das principais atividades do bFGF, a sua capacidade de estimular a angiogênese, a qual não foi verificada neste trabalho. Uma vez que, a angiogênese é fundamental no processo regenerativo e, atualmente, desconhece-se o papel dos fibroblastos do ligamento periodontal neste fenômeno.

Ademais, os resultados obtidos em relação à associação do bFGF com o TGF- β não podem ser considerados conclusivos, já que na literatura, não há estudos

que avaliaram *in vitro* essa associação na modulação das atividades das células do ligamento periodontal. Entretanto, dentro das limitações do estudo, podemos afirmar que há possibilidades na utilização do bFGF associado ao TGF- β na terapia regenerativa do periodonto, já que esses influenciaram positivamente a proliferação e a expressão de genes de componentes da matriz extracelular pelas células do ligamento periodontal de humanos. Além disso, pelos resultados parece que a aplicação seqüencial, ou seja, a liberação destes fatores de crescimento de forma sucessiva por dispositivos de liberação controlada, pode ser mais vantajosa do que a aplicação simultânea, uma vez que, neste último caso, os efeitos de um fator de crescimento podem antagonizar com os do outro.

Desta maneira, parece que mais estudos *in vitro* e *in vivo* aplicando o bFGF e o TGF- β associados a outros moduladores da resposta biológica, como o EGF, PDGF, IGF e as BMPs são fundamentais para estabelecermos o real papel de cada um no processo da regeneração periodontal.

7 Conclusão

De acordo com a metodologia e os resultados encontrados pode-se concluir que:

1) Somente o TGF- β aplicado isoladamente apresentou efeito mitogênico sobre as células do ligamento periodontal independente do período de avaliação. O bFGF somente estimulou a proliferação celular quando associado ao TGF- β ;

2) TGF- β e bFGF exerceram efeitos antagônicos na expressão dos genes avaliados. O TGF- β proporcionou um aumento na expressão de genes para colágeno tipo I e III, TIMPs 1, 2 e 3, e inibiram a expressão para MMP-1 e MMP-2 enquanto que, o bFGF apresentou efeito inverso.

3) O uso associado de 10ng de bFGF com 1ng de TGF- β apresentou efeito catabólico semelhante ao uso isolado do bFGF;

4) Em relação ao estímulo autócrino para síntese de bFGF e TGF- β , todas as associação de ambos os fatores de crescimento e o uso isolado do bFGF estimularam as células do ligamento periodontal a sintetizarem o bFGF. No entanto, somente a associação das menores doses de cada fator de crescimento foi capaz de estimular a síntese de TGF- β .

8 Anexos

Tabela 1a – Médias e desvio-padrão das absorvâncias segundo tratamento realizado (n=3).

GRUPOS	Média ± s.d. 24horas	Média ± s.d. 48horas
Controle	(-)0,0026 ± 0,02	0,143 ± 0,041
1ng bFGF	0,051 ± 0,032	0,087 ± 0,018
1ngTGF	0,116 ± 0,041	0,129 ± 0,004
10ng bFGF	0,107 ± 0,012	0,119 ± 0,032
10ng TGF	0,146 ± 0,037	0,199 ± 0,027
1bFGF + 1ng TGF	0,127 ± 0,008	0,268 ± 0,039
10bFGF + 10ng TGF	0,225 ± 0,037	0,291 ± 0,018
1bFGF + 10ng TGF	0,215 ± 0,010	0,332 ± 0,006
10bFGF + 1ng TGF	0,285 ± 0,042	0,341 ± 0,056

Tabela 2a – Expressão relativa dos genes ColI, Col III, MMP-1, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-3 em relação à expressão de beta-actina, segundo tratamento realizado (n=3).

TRATAMENTO	GENES						
	COL I	COL III	MMP-1	MMP-2	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3
TGF 1ng	6,96 ± 0,98	2,76 ± 0,49	(-)2,07 ± 0,60	(-)2,44 ± 0,28	4,97 ± 0,86	2,70 ± 0,88	7,91 ± 3,98
TGF 10ng	13,99 ± 2,94	10,80 ± 5,50	(-)4,40 ± 1,66	(-)8,89 ± 1,64	0,94 ± 1,00	(-)0,15 ± 0,90	(-)0,36 ± 0,60
b-FGF 1ng	(-)1,14 ± 0,22	(-)1,40 ± 0,35	1,84 ± 0,77	7,62 ± 9,28	(-)0,33 ± 1,16	(-)1,20 ± 0,19	(-)1,61 ± 0,51
b-FGF 10ng	(-)1,67 ± 0,65	(-)1,14 ± 0,22	3,12 ± 0,71	2,42 ± 1,80	(-)3,90 ± 3,32	(-)1,45 ± 2,43	(-)2,90 ± 2,45
1TGF + 1bFGF	5,51 ± 4,01	3,26 ± 1,78	(-)0,47 ± 1,87	(-)1,90 ± 0,57	3,10 ± 1,48	1,67 ± 0,36	1,33 ± 0,13
10 TGF+10bFGF	3,09 ± 1,32	4,35 ± 2,22	(-)1,50 ± 3,30	(-)6,70 ± 0,98	3,84 ± 0,63	2,70 ± 0,46	2,70 ± 0,45
1TGF + 10 bFGF	(-)1,09 ± 0,06	(-)0,72 ± 1,55	0,55 ± 1,40	2,04 ± 0,96	(-)2,01 ± 1,44	(-)2,74 ± 2,74	(-)0,68 ± 1,63
10 TGF + 1bFGF	9,77 ± 7,50	7,31 ± 5,04	(-)0,51 ± 1,41	(-)1,41 ± 0,14	2,00 ± 0,74	2,35 ± 1,05	2,23 ± 1,11

Tabela 3a – Médias e desvio-padrão da concentração de bFGF em pg/mL, segundo tratamento realizado (n=3).

GRUPOS	MÉDIA ± SD (pg/ml)
Controle	6,08 ± 2,64
1ng Bfgf	9,80 ± 3,80
1ng TGF	1,97 ± 0,82
10ng bFGF	16,5 ± 2,66
10ng TGF	5,17 ± 1,09
1ng bFGF + 1ng TGF	5,63 ± 1,09
10ng bFGF + 10ng TGF	29,11 ± 0,46
1ng bFGF + 10ng TGF	21,57 ± 1,64
10ng bFGF + 1ng TGF	36,39 ± 0,29

Tabela 4a – Comparação das médias de absorvância entre os períodos de 24 e 48 horas, usando o teste de Comparação Múltipla de Bonferroni.

<i>Grupos Experimentais – Comparações</i>	Diferença média	t	p	IC 95% da diferença
Controle vs Controle	0,1457	5,798	P < 0.001	0.07155 to 0.2198
1bFGF vs 1Bfgf	0,03633	1,446	P > 0.05	-0.03779 to 0.1105
1TGF vs 1TGF	0,013	0,5174	P > 0.05	-0.06112 to 0.08712
10bFGF vs 10bFGF	0,1083	4,312	P < 0.01	0.03421 to 0.1825
10 TGF vs 10TGF	0,053	2,109	P > 0.05	-0.02112 to 0.1271
1bFGF+ 1TGF vs 1bFGF+1TGF	0,141	5,612	P < 0.001	0.06688 to 0.2151
10bFGF+ 10TGF vs 10bFGF+10TGF	0,067	2,667	P > 0.05	-0.007121 to 0.1411
1bFGF + 10TGF vs 1bFGF+10TGF	0,1173	4,67	P < 0.001	0.04321 to 0.1915
10 bFGF+ 1TGF vs 10bFGF+1TGF	0,05567	2,216	P > 0.05	-0.01845 to 0.1298

Tabela 5a - Comparação das médias de absorvância entre os grupos celulares cultivados 24h com o bFGF e/ou TGF- β , usando o teste de Comparação Múltipla de Bonferroni.

<i>Grupos Experimentais - Comparações</i>	Diferença média	t	p	IC 95% da diferença
controle x 1bFGF	-0,05333	2,172	P > 0.05	-0.1460 to 0.03933
controle x 1TGF	-0,1187	4,833	P < 0.01	-0.2113 to -0.02600
controle x 10 bFGF	-0,01333	0,5431	P > 0.05	-0.1060 to 0.07933
controle x 10TGF	-0,1487	6,055	P < 0.001	-0.2413 to -0.05600
controle x 1bFGF+ 1TGF	-0,13	5,295	P < 0.01	-0.2227 to -0.03733
controle x 10bFGF+ 10TGF	-0,2273	9,259	P < 0.001	-0.3200 to -0.1347
controle x 1bFGF+ 10TGF	-0,2173	8,852	P < 0.001	-0.3100 to -0.1247
controle x 10bFGF+ 1TGF	-0,288	11,73	P < 0.001	-0.3807 to -0.1953
1bFGF x 1TGF	-0,06533	2,661	P > 0.05	-0.1580 to 0.02733
1bFGF x 10bFGF	0,04	1,629	P > 0.05	-0.05267 to 0.1327
1bFGF x 10TGF	-0,09533	3,883	P < 0.05	-0.1880 to -0.002667
1bFGF x 1bFGF+ 1TGF	-0,07667	3,123	P > 0.05	-0.1693 to 0.01600
1bFGF x 10bFGF+ 10TGF	-0,174	7,087	P < 0.001	-0.2667 to -0.08133
1bFGF x 1bFGF+ 10TGF	-0,164	6,68	P < 0.001	-0.2567 to -0.07133
1bFGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,2347	9,558	P < 0.001	-0.3273 to -0.1420
1TGF x 10bFGF	0,1053	4,29	P < 0.05	0.01267 to 0.1980
1TGF x 10TGF	-0,03	1,222	P > 0.05	-0.1227 to 0.06267
1TGF x 1bFGF+ 1TGF	-0,01133	0,4616	P > 0.05	-0.1040 to 0.08133
1TGF x 10bFGF+ 10TGF	-0,1087	4,426	P < 0.05	-0.2013 to -0.01600
1TGF x 1bFGF+ 10TGF	-0,09867	4,019	P < 0.05	-0.1913 to -0.006000
1TGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,1693	6,897	P < 0.001	-0.2620 to -0.07667
10bFGF x 10TGF	-0,1353	5,512	P < 0.01	-0.2280 to -0.04267
10bFGF x 1bFGF+ 1TGF	-0,1167	4,752	P < 0.01	-0.2093 to -0.02400
10bFGF x 10bFGF+ 10TGF	-0,214	8,716	P < 0.001	-0.3067 to -0.1213
10bFGF x 1bFGF + 10TGF	-0,204	8,309	P < 0.001	-0.2967 to -0.1113
10bFGF x 10bFGF + 1TGF	-0,2747	11,19	P < 0.001	-0.3673 to -0.1820
10TGF x 1bFGF+ 1TGF	0,01867	0,7603	P > 0.05	-0.07400 to 0.1113
10TGF x 10bFGF+ 10TGF	-0,07867	3,204	P > 0.05	-0.1713 to 0.01400
10TGF x 1bFGF+ 10TGF	-0,06867	2,797	P > 0.05	-0.1613 to 0.02400
10TGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,1393	5,675	P < 0.001	-0.2320 to -0.04667
1bFGF+ 1TGF x 10bFGF+ 10TGF	-0,09733	3,964	P < 0.05	-0.1900 to -0.004667
1bFGF+ 1 TGF x 1bFGF+ 10TGF	-0,08733	3,557	P > 0.05	-0.1800 to 0.005333
1bFGF+ 1TGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,158	6,435	P < 0.001	-0.2507 to -0.06533
10bFGF+ 10TGF x 1bFGF+ 10TGF	0,01	0,4073	P > 0.05	-0.08267 to 0.1027
10bFGF+ 10TGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,06067	2,471	P > 0.05	-0.1533 to 0.03200
1bFGF+ 10TGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,07067	2,878	P > 0.05	-0.1633 to 0.02200

Tabela 6a - Comparação das médias de absorbância entre os grupos celulares cultivados 48h com o bFGF e/ou TGF- β , usando o teste de Comparação Múltipla de Bonferroni

<i>Grupos Experimentais - Comparações</i>	Diferença média	t	p	IC 95% da diferença
controle x 1bFGF	0,056	2,18	P > 0.05	-0.04094 to 0.1529
controle x 1TGF	0,014	0,5451	P > 0.05	-0.08294 to 0.1109
controle x 10 bFGF	0,024	0,9344	P > 0.05	-0.07294 to 0.1209
controle x 10TGF	-0,056	2,18	P > 0.05	-0.1529 to 0.04094
controle x 1bFGF+ 1TGF	-0,1253	4,88	P < 0.01	-0.2223 to -0.02839
controle x 10bFGF+ 10TGF	-0,1487	5,788	P < 0.001	-0.2456 to -0.05172
controle x 1bFGF+ 10TGF	-0,189	7,358	P < 0.001	-0.2859 to -0.09206
controle x 10bFGF+ 1TGF	-0,198	7,709	P < 0.001	-0.2949 to -0.1011
1bFGF x 1TGF	-0,042	1,635	P > 0.05	-0.1389 to 0.05494
1bFGF x 10bFGF	-0,032	1,246	P > 0.05	-0.1289 to 0.06494
1bFGF x 10TGF	-0,112	4,36	P < 0.05	-0.2089 to -0.01506
1bFGF x 1bFGF+ 1TGF	-0,1813	7,06	P < 0.001	-0.2783 to -0.08439
1bFGF x 10bFGF+ 10TGF	-0,2047	7,968	P < 0.001	-0.3016 to -0.1077
1bFGF x 1bFGF+ 10TGF	-0,245	9,538	P < 0.001	-0.3419 to -0.1481
1bFGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,254	9,889	P < 0.001	-0.3509 to -0.1571
1TGF x 10bFGF	0,01	0,3893	P > 0.05	-0.08694 to 0.1069
1TGF x 10TGF	-0,07	2,725	P > 0.05	-0.1669 to 0.02694
1TGF x 1bFGF+ 1TGF	-0,1393	5,425	P < 0.01	-0.2363 to -0.04239
1TGF x 10bFGF+ 10TGF	-0,1627	6,333	P < 0.001	-0.2596 to -0.06572
1TGF x 1bFGF+ 10TGF	-0,203	7,903	P < 0.001	-0.2999 to -0.1061
1TGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,212	8,254	P < 0.001	-0.3089 to -0.1151
10bFGF x 10TGF	-0,08	3,115	P > 0.05	-0.1769 to 0.01694
10bFGF x 1bFGF+ 1TGF	-0,1493	5,814	P < 0.001	-0.2463 to -0.05239
10bFGF x 10bFGF+ 10TGF	-0,1727	6,722	P < 0.001	-0.2696 to -0.07572
10bFGF x 1bFGF + 10TGF	-0,213	8,293	P < 0.001	-0.3099 to -0.1161
10bFGF x 10bFGF + 1TGF	-0,222	8,643	P < 0.001	-0.3189 to -0.1251
10TGF x 1bFGF+ 1TGF	-0,06933	2,699	P > 0.05	-0.1663 to 0.02761
10TGF x 10bFGF+ 10TGF	-0,09267	3,608	P > 0.05	-0.1896 to 0.004278
10TGF x 1bFGF+ 10TGF	-0,133	5,178	P < 0.01	-0.2299 to -0.03606
10TGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,142	5,528	P < 0.01	-0.2389 to -0.04506
1bFGF+ 1TGF x 10bFGF+ 10TGF	-0,02333	0,9084	P > 0.05	-0.1203 to 0.07361
1bFGF+ 1 TGF x 1bFGF+ 10TGF	-0,06367	2,479	P > 0.05	-0.1606 to 0.03328
1bFGF+ 1TGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,07267	2,829	P > 0.05	-0.1696 to 0.02428
10bFGF+ 10TGF x 1bFGF+ 10TGF	-0,04033	1,57	P > 0.05	-0.1373 to 0.05661
10bFGF+ 10TGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,04933	1,921	P > 0.05	-0.1463 to 0.04761
1bFGF+ 10TGF x 10bFGF+ 1TGF	-0,009	0,3504	P > 0.05	-0.1059 to 0.08794

Tabela 7a – Resultados das comparações entre grupos realizadas com o teste de Kolmogorov-Smirnov para amostras independentes.

Gene	<i>TGF-β</i> <i>1x10ng/mL</i>	<i>bFGF</i> <i>1x10ng/mL</i>	<i>TGF-β/bFGF</i> <i>1-1x10-1ng/ml</i>	<i>TGF-β/bFGF</i> <i>1-1x1-10ng/ml</i>	<i>TGF-β/bFGF</i> <i>1-1x10-10ng/ml</i>
<i>COL I</i>	Sig.*	Não sig.	Não sig.	Sig.*	Não sig.
<i>COL III</i>	Sig.*	Não sig.	Não sig.	Sig.*	Não sig.
<i>MMP-1</i>	Sig.*	Não sig.	Não sig.	Não sig.	Não sig.
<i>MMP-2</i>	Sig.*	Não sig.	Não sig.	Sig.*	Sig.*
<i>TIMP-1</i>	Não sig.	Sig.*	Não sig.	Sig.*	Não sig.
<i>TIMP-2</i>	Não sig.	Não sig.	Não sig.	Sig.*	Sig.*
<i>TIMP-3</i>	Não sig.	Não sig.	Não sig.	Não sig.	Não sig.

Sig.* $p < 0.1$

Tabela 8a - Comparação das médias de síntese de bFGF em pg/mL entre os períodos de 24 e 48 horas, usando o teste de Comparação Múltipla de Bonferroni

<i>Grupos Experimentais - Comparações</i>	Diferença Médias	t	P	IC 95% da Diferença
controle vs 1ng bFGF	-3,72	2,326	P > 0.05	-9.755 to 2.315
controle vs 1ng TGF	4,11	2,57	P > 0.05	-1.925 to 10.15
controle vs 10ng bGF	-10,42	6,516	P < 0.001	-16.46 to -4.385
controle vs 10ng TGF	0,91	0,5691	P > 0.05	-5.125 to 6.945
controle vs 1+1ng assoc	0,45	0,2814	P > 0.05	-5.585 to 6.485
controle vs 10+10ng assoc	-23,03	14,4	P < 0.001	-29.07 to -16.99
controle vs 1+10ng assoc	-15,49	9,687	P < 0.001	-21.53 to -9.455
controle vs 10+1ng assoc	-30,31	18,95	P < 0.001	-36.35 to -24.27
1ng bFGF vs 1ng TGF	7,83	4,897	P < 0.01	1.795 to 13.87
1ng bFGF vs 10ng bGF	-6,7	4,19	P < 0.05	-12.74 to -0.6648
1ng bFGF vs 10ng TGF	4,63	2,895	P > 0.05	-1.405 to 10.67
1ng bFGF vs 1+1ng assoc	4,17	2,608	P > 0.05	-1.865 to 10.21
1ng bFGF vs 10+10ng assoc	-19,31	12,08	P < 0.001	-25.35 to -13.27
1ng bFGF vs 1+10ng assoc	-11,77	7,361	P < 0.001	-17.81 to -5.735
1ng bFGF vs 10+1ng assoc	-26,59	16,63	P < 0.001	-32.63 to -20.55
1ng TGF vs 10ng bGF	-14,53	9,087	P < 0.001	-20.57 to -8.495
1ng TGF vs 10ng TGF	-3,2	2,001	P > 0.05	-9.235 to 2.835
1ng TGF vs 1+1ng assoc	-3,66	2,289	P > 0.05	-9.695 to 2.375
1ng TGF vs 10+10ng assoc	-27,14	16,97	P < 0.001	-33.18 to -21.10
1ng TGF vs 1+10ng assoc	-19,6	12,26	P < 0.001	-25.64 to -13.56
1ng TGF vs 10+1ng assoc	-34,42	21,53	P < 0.001	-40.46 to -28.38
10ng bGF vs 10ng TGF	11,33	7,085	P < 0.001	5.295 to 17.37
10ng bGF vs 1+1ng assoc	10,87	6,798	P < 0.001	4.835 to 16.91
10ng bGF vs 10+10ng assoc	-12,61	7,886	P < 0.001	-18.65 to -6.575
10ng bGF vs 1+10ng assoc	-5,07	3,171	P > 0.05	-11.11 to 0.9652
10ng bGF vs 10+1ng assoc	-19,89	12,44	P < 0.001	-25.93 to -13.85
10ng TGF vs 1+1ng assoc	-0,46	0,2877	P > 0.05	-6.495 to 5.575
10ng TGF vs 10+10ng assoc	-23,94	14,97	P < 0.001	-29.98 to -17.90
10ng TGF vs 1+10ng assoc	-16,4	10,26	P < 0.001	-22.44 to -10.36
10ng TGF vs 10+1ng assoc	-31,22	19,52	P < 0.001	-37.26 to -25.18
1+1ng assoc vs 10+10ng assoc	-23,48	14,68	P < 0.001	-29.52 to -17.44
1+1ng assoc vs 1+10ng assoc	-15,94	9,968	P < 0.001	-21.98 to -9.905
1+1ng assoc vs 10+1ng assoc	-30,76	19,24	P < 0.001	-36.80 to -24.72
10+10ng assoc vs 1+10ng assoc	7,54	4,715	P < 0.01	1.505 to 13.58
10+10ng assoc vs 10+1ng assoc	-7,28	4,553	P < 0.01	-13.32 to -1.245
1+10ng assoc vs 10+1ng assoc	-14,82	9,268	P < 0.001	-20.86 to -8.785

Tabela 9a - Sequências dos primers, propriedades da reação e do produto de amplificação

Gene	Sense and anti-sense sequencias	CP	tA (°C)	tM (°C)	bp
MMP-1	TGGACCTGGAGGAAATCTTGC AGAGTCCAAGAGAATGGCCGA	0,15	58	79	155
MMP-2	CTGATGGCACCCATTTACACCT GATCTGAGCGATGCCATCAAA	0,15	60	82	186
MMP-9	AGAGATGCGTGGAGAGTCGAA AAGGTTTGGAAATCTGCCCAGG	0,1	65	85	162
TIMP-1	ACTGCAGGATGGACTCTTGCA TTTCAGAGCCTTGGAGGAGCT	0,15	30	82	206
TIMP-2	CAAGTTCTTCGCCTGCATCAA TCGAAACCCTTGGAGGCTT	0,2	61	84	155
TIMP-3	TTCTCAGCGAGGATGGCACTT AAACACGGTTCAGGATGCTGG	0,1	60	81	200
COL I	CTGGCAAAGAAGGCGGCAAA CTCACCACGATCACCCTCT	0,2	62	70	503
COL III	CAGTATTCTCCACTCTTGAGTTCAG GGTGACAAAGGTGAAACAGGTGAAC	0,15	65	73	560
β -actin	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	0,15	56	75	495

CP: concentração de primer em μg ;

tA: Temperatura de *annealing*;

tM: Temperatura de Melting;

bp: pares de base do produto de amplificação

Quadro 1 - Família das Matrizes de Metaloproteases

Enzima	MMP- nº	Substrato da Matriz Extracelular
COLAGENASES		
Colagenase tipo-fibroblasto	MMP-1	Colágeno tipos I, II, III, VII, VIII, X e Gelatina
Colagenase tipo-PMNL	MMP-8	Colágeno tipos I, II, III, VII, VIII, X e Gelatina
Colagenase-3	_____	Não determinada
ESTROMELISINAS		
Estromelisina-1	MMP-3	Proteoglicanos; Fibronectina; Laminina; Procollagenase;
Estromelisina-2	MMP-10	Colágeno Tipos IV, V, IX, X; Elastina
Estromelisina-3	MMP-11	Mesma da MMP-3
Matrielisina (PUMP-1)	MMP-7	Não determinada Laminina; Fibronectina; Colágeno Tipo IV; Gelatina; Procollagenase; Proteoglicano; Urokinase
GELATINASES		
72-kD Gelatinase (A)	MMP-2	Gelatina; Colágeno Tipo IV, V, VII, X; Elastina; Fibronectina
92-kD Gelatinase (B)	MMP-9	Gelatina; Colágeno Tipos IV, V, XI; Elastina
OUTRAS		
Macrófago Metaloeslastase	MMP-12	Elastina
MT-MMP	_____	Progelatinase-A
Meprina	_____	Gelatina; Laminina; Fibronectina; Colágeno Tipo IV

9 Referências*

1. ALVARES, O; KLEBE, R.; GRANT, G.; COCHARN, D.L. Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 66, n.7, p.552-558, jul. 1995.
2. AMAR, S.; CHUNG, K.M. Clinical implications of cellular biologic advances in periodontal regeneration. **Curr. Opin. Periodontol.**, p. 128-140, 1994.
3. BARNETT, J.D. Comparison of freeze-dried bone allograft and porous hydroxylapatite in human periodontal defects. **J. Periodontol.**, Chicago, v.60, n.5, p.231-237, mai.1989.
4. BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J. Periodontol.**, Chicago, v.64, n. (5 Suppl), p.474-484, mai. 1993.
5. CALLENS, A. Growth factors in periodontal regeneration – a review. In: LANG, N.P., KARRING, T.; LINDHE, J. (Eds.). **Proceedings of the 2nd European Workshop Periodontology**. Berlin: Quintessence, 1997, p.284-302.

* Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

6. CHANG, Y.C.; YANG, S.F.; LAI, C.C.; LIU, J.Y.; HSICH, Y.S. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 37, n. 3, p.196-203, jun. 2002.
7. CHIEN, H.H.; LIN, W.L.; CHO, M.I. Expression of TGF- β isoforms and their receptors during mineralized nodule formation by rat periodontal ligament cells in vitro. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 34, n. 6, p.301-309, ago. 1999.
8. COLLETA, R.D.; ALMEIDA, O.P.; REYNOLDS, M.A.; SAUK, J.J. Alteration in expression of MMP-1 and MMP-2 but not TIMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF- β_1 autocrine stimulation. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 34, n. 6, p.457-463, ago. 1999.
9. DENNISON, D.K.; DOMINIC, R.V.; GERALD, J.P.; RITTMAN, B.; CAFFESSE, R.G. Differential effect of TGF- β_1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 65, n. 7, p.641-648, jul. 1994.

10. EDWARDS, D.R.; MURPHY, G.; REYNOLDS, J.J.; WHITHAM, S.E.; DOCHERTY, A.J.P.; ANGEL, P.; HEATH, J.K. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, n. 7, p.1899-1904, jul. 1987.
11. ELLEGAARD, B.; KARRING, T.; LÖE, H. New periodontal attachment procedures based on retardation of epithelial migration. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 1, n. 2, p.75-88, 1974.
12. GAO, J.; JORDAN, T.W.; CUTRESS, T.W. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in human periodontal ligament (PDL) tissue. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 31, n. 4, p. 260-264, mai. 1996.
13. GAO, J.; SYMONS, A.L.; BARTOLD, P.M. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β_1) in the deveoping periodontium of rats. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 77, n. 9, p. 1708-1716, set. 1998.
14. GARRETT, J.S.; CRIGGER, M.; EGELBERG, J. Effects of citric acid on diseased root surfaces. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 13, n. 2, p.155-163, mar. 1978.

15. GOTTLow, J.; NYMAN, S.; KARRING, T.; LINDHE, S. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 11, n. 8, p. 494-503, set. 1984.
16. GRAVES, D.T.; COCHRAN, D. L. Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. **Curr. Opin. Periodol.**, Philadelphia, p. 178-186, 1994.
17. IGNOTZ, R.A.; MASSAGUÉ, J. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 261, n. 9, p. 4337-4345, mar. 1986.
18. IGNOTZ, R.A.; ENDO, T.; MASSAGUE, J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 262, n. 14, p. 6443-6446, mai. 1987.
19. JEPSEN, S.; EBERHARD, J.; HERRERA, D.; NEEDLEMAN, I. A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal furcation defects. What is the effect of guided tissue regeneration compared with surgical debridement in the treatment of furcation defects? **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 29, n. (Suppl 3) p.103-116, 2002.

20. KANZAKI, H.; CHIBA, M.; SHIMUZU, Y.; MITANI, H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 80, n. 3, p. 887-891, mar. 2001.
21. LU, H.; MACKENZIE, I.C.; LEVINE, A.E. Transforming growth factor- β response and expression in junctional and oral gingival epithelial cells. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 32, n. 8, p. 682-691, nov. 1997.
22. LYNCH, S.E.; de CASTILHA, G.E.; WILLIAMS, R.C.; KIRITSY, C.P.; REDDY, M.S.; ANTONIADES, H.N. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 62, n. 7, p. 458-467, jul. 1991.
23. McCULLOCH, C.A.; BORDIN, S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 26, n. 3, p. 114-154, mai. 1991.
24. MAILHOT, J.M.; SCHUSTER, G.S.; GARNICK, J.J.; HANES, P.J.; LAPP, C.A.; LEWIS, J.B. Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF- β_1 stimulation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 22, n. 9, p. 679-685, set. 1995.

25. MATSUDA, N.; LIN, W.L.; KUMAR, N.M.; CHO, M.I.; GENCO, R.J. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblast cells to polypeptide growth factor in vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, n. 6, p. 515-525, jun. 1992.

26. MELCHER, A. H. On the repair potential of periodontal tissues. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 47, n. 5, p. 256-260, mai. 1976.

27. MOHAMMED, S.; PACK, A.R.C.; KARDOS, T.B. The effect of transforming growth factor beta one (TGF- β_1) on wound healing, with or without barrier membranes, in class II furcation defect in sheep. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 33, n. 6, p. 335-344, ago. 1998.

28. MURAKAMI, S.; TAKAYAMA, S.; IKESAWA, K.; SHIMABUKURO, Y.; KITAMURA, M.; NOZAKI, T.; TERASHIMA, A.; ASANO, T.; OKADA, H. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 34, n. 7, p. 425-430, out. 1999.

29. MURAKAMI, S.; TAKAYAMA, S.; KITAMURA, M.; SHIMABUKURO, Y.; YANAGI, K.; IKEZAWA, K.; SAHO, T.; NOZAKI, T.; OKADA, H. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 38, n. 1, p. 97-103, fev. 2003.

30. NEEDLEMAN, I.; TUCKER, R.; GIEDRYS-LEEPER, E.; WORTHINGTON, H. A. systematic review of guided tissue regeneration for periodontal infrabony defects. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 37, n. 5, p. 380-388, out. 2002.

31. NODA, M.; VOGEL, R. Fibroblast growth factor enhances type beta 1 transforming growth factor gene expression in osteoblast-like cells. **J. Cell Biol.**, New York, v. 209, n. 5, p. 2529-2535, nov. 1989.

32. OATES, T.W.; ROUSE, C.A.; COCHRAN, D.L. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells In Vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 64, n. 2, p. 142-148, fev. 1993.

33. OVERALL, C.M.; WRANA, J.L.; SODEK, J. Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF- β_1 and concavalin A: regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 26, n. 3, p. 279-282, mai. 1991.
34. OVERALL, C.M.; WRANA, J.L.; SODEK, J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/Type iV collagenase by transforming growth factor- β_1 in human fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 266, n. 21, p. 14064-14071, jul. 1991.
35. PALMON, A.; ROOS, H.; EDEL, J.; ZAX, B.; SAVION, N.; GROSSKOP, A.; PITARU, S. Inverse dose and time dependent of basic fibroblast growth factor on the gene expression of collagen type 1 and matrix metalloproteinase-1 by periodontal ligament cells in culture. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, n. 6, p. 974-980, jun. 2000.
36. PALMON, A.; ROOS, H.; REICHENBERG, E.; GRSSKOP, A.; BAR KANA, I.; PITARU, S.; REDLICH, M. Basic fibroblast growth factor suppresses tropoelastin gene expression in cultured human periodontal fibroblasts. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 36, n. 2, p. 65-70, abr. 2001.

37. PARK, J.B.; MATSUURA, M.; HAN, K.Y.; NORDERYD, O.; LIN, W.L.; GENCO, K.S., CHOM, J. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guides tissue regeneration therapy with plateled-derived growth factor. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 66, n. 6, p. 462-477, jun. 1995.

38. PITARU, S.; McCULLOCH, C.A.; NARAYANAN, A.S. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 29, n. 2, p. 81-94, mar. 1994.

39. QUINTERO, G. A six-month evaluation of decalcified freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 53, n. 12, p. 726-730, dez. 1982.

40. ROMANOS, G.E.; SCHROTER-KERMANI, C.; HINZ, N.; WACHTEL, H.C.; BERNIMOULIN, J.P. Immunohistochemical localization of collagenous components in healthy periodontal tissues of the rat and marmoset. I. Distribution of collagen types I and III. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 27, n. 2, p. 101-110, mar. 1992.

41. ROSSA JR., C.; MARCANTONIO JR, E.; CIRELLI, J.A.; MARCANTONIO, R.A.C.; SPOLIDORIO, L.C.; FOGO, J.C. Regeneration of class III furcation defects with basic fibroblast growth factor (b-FGF) associated with GTR. A descriptive and histometric study in dogs. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, n. 5, p. 775-784, mai. 2000.
42. RYAN, M.E.; RAMAMAURTHY, N.S.; GOLUB, L.M. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. **Curr. Opin. Periodontol.**, Philadelphia, p. 85-96, 1996.
43. SELVIG, K.A.; WISKEJÖ, U.M.E.; BOGLE, G.C.; FINKELMMAN, R.D. Impaired early bone formation in periodontal fenestration defects in dogs following application of insulin-like growth factor (II). Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta 1. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 21, n. 6, p. 380-385, jul. 1994.
44. SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, Beijing, v. 113, n. 13, p. 685-700, jun. 2003.

45. SHIMAZU, A.; MORISHITA, M. Basic fibroblast growth factor induces the expression of matrix metalloproteinase-3 in human periodontal ligament cells through the MEK2 mitogen-activated protein kinase pathway. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 38, n. 2, p. 122-129, abr. 2003

46. SHIMAZU, A.; BACHCHU, M.A.H.; MORISHITA, M.; NOSHIRO, M.; KATO, Y.; IWAMOTO, Y. Expression of syndecan-2, -4, and fibroblast growth factor receptor type 1 in human periodontal ligament fibroblasts and down-regulation of these membrane proteins during maturation in culture. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 78, p.1 791-1799, dez. 1999.

47. SHIMIZU, N.; OGURA, N.; YAMAGUCHI, M.; GOSEKI, T.; SHIBATA, Y.; ABIKO, Y.; IWASAWA, T.; TAKIGUCHI, H. Stimulation by interleukin-1 of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, n. 9, p. 743-748, set. 1992.

48. SIGURDSSON, T.J.; LEE, M.B.; KUBOTA, K.; TUREK, T.J.; WOZNEY, J.M.; WIKESJO, U.M. Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 66, n. 2, p. 131-138, fev. 1995.

49. SOMERMAN, M.J.; ARCHER, S.Y.; IMM, G.R.; FOSTER, R.A. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 67, n. 1, p. 66-70, jan. 1988.

50. SOMERMAN, M.J.; YOUNG, M.F.; FOSTER, R.A.; MOEHRING, J.M.; IMM, G.; SAUK, J.J. Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 241-247, 1990.

51. TAKAYAMA, S.; MURAKAMI, S.; SHIMABUKURO, Y.; KITAMURA, M.; OKADA, H. Periodontal regeneration by FGF-2 (b-FGF) in primate models. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 80, n. 12, p. 2075-2079, dez. 2001.

52. TAKAYAMA, S.; MURAKAMI, S.; MIKI, Y.; IKEZAWA, K.; TASAKA, S.; TERASHIMA, A.; ASANO, T.; OKADA, H. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 32, n.8, p. 667-675, nov. 1997.

53. TAKAYAMA, S.; MURAKAMI, S.; NOZAKI, T.; IKEZAWA, K.; MIKI, Y.; ASANO, T.; TERASHIMA, A.; OKADA, H. Expression of receptors for basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 33, n. 6, p. 315-322, ago. 1998.

54. TERRANOVA, V.P. Biologically active factors in the treatment of periodontal disease. **Curr. Opin. Periodontol.**, Philadelphia, p.129-35, 1993.

55. TERRANOVA, V.P.; WIKESJÖ, U.M. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of cells of the periodontium. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 58, n. 6, p. 371-380, jun. 1987.

56. TERRANOVA, V.P.; WIKESJO, U.M. Chemotaxis of human periodontal ligament cells to various biological response modifiers. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 2, n. 2, p. 215-222, nov. 1988.

57. TERRANOVA, V.P.; ODZIEMIEC, C.; TWEDEN, K.S.; SPADONE, D.P. Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. Effect of basic fibroblast growth factor. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 60, n. 6, p. 293-301, jun. 1989.

58. WIKESJÖ, U.M.; NILVEUS, R.E.; SELVIG, K.A. Significance of early healing events on periodontal repair. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, n. 3, p. 158-165, mar. 1992.

59. WIKESJO, U.M.; RAZI, S.S.; SIGURDSSON, T.J.; TATAKIS, D.N.; LEE, M.B. Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human transforming growth factor- β_1 on guided tissue regeneration. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 25, n. 6, p. 475-481, jun. 1998.

60. WIKESJO, U.M.; LIM, W.H.; RAZI, S.S.; SIGURDSSON, T.J.; TATAKIS, D.N.; HARDWICK, W.R. Periodontal repair in dogs: evaluation of a bioabsorbable space-providing macroporous membrane with recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 74, n. 7, p. 635-647, jul. 2003.

RUIZ, K. G. S. *Efeitos da combinação do fator de crescimento de fibroblastos básico e fator de transformação de crescimento beta na proliferação, expressão de genes para colágeno tipo I e III, metaloproteases-1 e -2 e TIMPs 1, 2 e 3, e na modulação da síntese destes próprios fatores de crescimento pelas do ligamento periodontal de humanos*. Araraquara, 2005. 102p. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do presente estudo avaliar o efeito da combinação do fator de crescimento de fibroblastos básico (b-FGF) e fator de transformação de crescimento beta (TGF-beta) na proliferação, expressão de genes para colágeno tipos I e III, metaloproteases -1 e -2 e TIMPs 1, 2 e 3, e na síntese destes próprios fatores de crescimento pelas células do ligamento periodontal de humanos. Para a realização do estudo, as células em diferentes concentrações, de acordo com cada experimento, foram tratadas com os fatores de crescimento nas concentrações de 1.0ng e 10ng/ml de meio de cultura para o b-FGF e para o TGF- β , tanto isoladamente quanto associados. A avaliação da proliferação celular foi realizada após os períodos de 24 e 48h na presença dos fatores de crescimento, através da mensuração do nível de MTS reduzido a formazan pelas células viáveis, e a síntese de b-FGF e TGF- β pelo teste ELISA empregando a técnica "sandwich". A expressão de genes para colágeno tipos I e III, metaloproteases-1 e -2 foi avaliada pela técnica de RT-PCR. O teste ANOVA mostrou haver diferenças estatisticamente significantes para proliferação e síntese de bFGF ($p < 0.05$) entre os tratamentos. O teste de Comparação Múltipla de Bonferroni mostrou que todas as associações aumentaram a proliferação celular e a síntese de bFGF ($p < 0.001$). Isoladamente, só o TGF- β foi capaz de estimular a proliferação, independente do tempo e da dose ($p < 0.001$), enquanto que, somente o bFGF estimulou a síntese dele próprio de maneira dose-dependente ($p < 0.05$). Em relação à síntese de TGF- β , apenas

a associação das menores doses de cada fator, foi capaz de modular a síntese dele mesmo. O teste de Kolmogorov- Smirnov mostrou haver diferenças estatisticamente significantes quanto à expressão de genes entre o uso isolado dos fatores de crescimento ($p<0.1$), já que o bFGF aumentou a expressão de MMP-1 e MMP-2 e reduziu para Col I e III, e TIMPs1, 2 e 3, enquanto que, o TGF- β atuou de maneira inversa. Todas as associações apresentaram efeito semelhante ao uso isolado do TGF- β , com exceção da associação de 10ng de bFGF com 1ng de TGF- β , na qual prevaleceu o efeito do bFGF. Conclui-se que as associações do bFGF e do TGF- β atuaram de maneira dose-dependente no estímulo a proliferação celular, o aumento na expressão de genes para colágeno e TIMPs, e redução para as metalproteases e, modulação da síntese deles próprios.

Palavras-chave: Regeneração tecidual guiada, ligamento periodontal, fatores de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento transformador beta, collagenase, gelatinase, inibidores de protease e colágeno.

RUIZ, K. G. S. *The effects of association of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta on the proliferation, expression of collagen type I e III, matrix metalloproteinases-1 e -2 e TIMPs 1, 2 e 3, and on the modulation of the syntheses oh these growth factors by humans periodontal ligament cells.* Araraquara, 2005. 102p. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of association of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta on the proliferation, expression of collagen type I e III, matrix metalloproteinases-1 e -2 e TIMPs 1, 2 e 3, and on the modulation of the syntheses oh these growth factors by humans periodontal ligament cells. Different concentrations of cells, according to experiment, were incubated on the presence of 1.0 or 10 ng/ml of DMEM of growth factors, associated or no. The cellular proliferation was evaluated to 24 and 48 hours of incubation by the colorimetric method. The synthese of bFGF and TGF- β was verificated by ELISA method, using a “sandwich” techniqe, and mRNA expression by Real Time - PCR. ANOVA test results indicated significant differences on the proliferation and bFGF synthesis ($p < 0.05$) among the treatments. Bonferroni for pairwise comparition test results showed that all association stimulated the proliferation and bFGF synthesis ($p < 0.001$). Alone, only TGF- β can stimulate the proliferation to both concentrations and periods ($p < 0.001$), and only bFGF stimulated its own synthesis by dose-dependent manner ($p < 0.05$). Only the assocation of 1ng of each growth factor can stimulate the synthesis of TGF- β . Kolmogorov-Smirnov test results indicated significant differences on the expression of mRNA among treatment with the isolated growth factors ($p < 0.1$). Basic fibroblast growth factor increased the expression of

MMP-1 e MMP-2 and reduced to collagen I e III, e TIMPs1, 2 e 3, as long as TGF- β behaved the inverse manner. All the associations had similar effect to isolated TGF- β , except the association of 10ng of bFGF to 1ng of TGF- β . In conclusion, the associations of bFGF e TGF- β influenced of dose-dependent manner on the cellular proliferation, on the increasing of the expression to collagen and TIMPs, and on the reduction to metalloproteinases and, the modulation of these own synthesis.

Keywords: Periodontal tissue regeneration, periodontal ligament, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta, collagenase, gelatinase, inhibitors of inibidores of metalloproteinases and collagen.