



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

FERNANDA REGINA GODOY ROCHA

**CONDICIONAMENTO COM ÁCIDO CÍTRICO E OS EFEITOS
BIOLÓGICOS NA APLICAÇÃO TÓPICA DE bFGF E BMP-7
EM CÉLULAS RELEVANTES PARA A REGENERAÇÃO
PERIODONTAL**

ARARAQUARA

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

FERNANDA REGINA GODOY ROCHA

**CONDICIONAMENTO COM ÁCIDO CÍTRICO E OS EFEITOS
BIOLÓGICOS NA APLICAÇÃO TÓPICA DE bFGF E BMP-7
EM CÉLULAS RELEVANTES PARA A REGENERAÇÃO
PERIODONTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração - Periodontia, da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: *Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio*

Coorientador: *Prof. Dr. Carlos Rossa Junior*

ARARAQUARA

2012

Rocha, Fernanda Regina Godoy

Condicionamento com ácido cítrico e os efeitos biológicos na aplicação tópica de bFGF e BMP-7 em células relevantes para a regeneração periodontal / Fernanda Regina Godoy Rocha. - Araraquara: [s.n.], 2012.

130 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

1. Regeneração periodontal
 2. Peptídeos e proteínas de sinalização intracelular
 3. Ácido cítrico
 4. Fatores de crescimento
 5. Dentina
- I. Título

FERNANDA REGINA GODOY ROCHA

*CONDICIONAMENTO COM ÁCIDO CÍTRICO E OS EFEITOS
BIOLÓGICOS NA APLICAÇÃO TÓPICA DE BFGF E BMP-7 EM
CÉLULAS RELEVANTES PARA A REGENERAÇÃO PERIODONTAL*

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

2º Examinador: Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

3º Examinador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório

Araraquara, 27 de março de 2012.

DADOS CURRICULARES

Fernanda Regina Godoy Rocha

Nascimento 04 de outubro de 1985 – Taquaritinga, SP

Filiação José Rocha

Ana Maria Godoy

2004 – 2007 Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Universidade Estadual Paulista – UNESP

2010 – 2012 Pós-Graduação em Periodontia

Nível de Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Universidade Estadual Paulista - UNESP

DEDICATÓRIA

Antes de tudo, dedico **ao meu Deus** este trabalho. Sou grata pela oportunidade de estar aqui, aprender e conhecer mais profundamente, ainda que tão pequena parte, do que tão perfeitamente criou!

Com todo meu amor, agradeço ao Deus que me dá forças...
Pela vida, saúde, sustento, proteção e direção que tem me dado a cada dia,

Obrigada, meu Senhor!

À minha mãe, Ana,

A mulher mais forte que eu já conheci.

Se estou aqui realizando um sonho agora, certamente estou porque você acreditou nisto mais do que eu mesma, me incentivou em todo o tempo, e fez tudo o que podia para que isso acontecesse, ainda que em meio a tantas dificuldades. Obrigada por nunca me deixar desistir de nada do que sonhei. Seus valores dignos, honestidade, humildade e dedicação, são os exemplos que quero sempre ter comigo, e espero poder retribuir tudo o que sempre fez por mim com tanto amor. Você é responsável por esta conquista! Eu te amo tanto... Muito obrigada por tudo!

À minha avó, Donília,

Sempre perto, se preocupando com tudo, com muita atenção e dedicação.

Ter sua presença em minha vida, saber de seu apoio incondicional
em cada gesto de amor, sua alegria comigo a cada passo dado,
tudo isso é muito importante!

Obrigada por tudo, por fazer tanto por mim, e principalmente por entender
minha ausência nestes anos. Com muito amor, obrigada!

Ao meu pai, José Rocha (*in memoriam*),

Principalmente em momentos como este, de realização e dever cumprido, percebo como foi tão importante aprender com sua força de vontade e persistência. Momentos como este também são os que sinto mais a sua falta. Lembro-me sempre do quanto me amava e se preocupava comigo e tenho certeza de que estaria realizado em me ver e saber como estou hoje! Sei que de alguma forma está... Com amor e imutável saudade, obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio,

Meu orientador e amigo, com certeza ‘um pai’ nesta faculdade.

Obrigada por me orientar, por me ajudar, por ter confiado a mim este trabalho e, com ele, ter me proporcionado a oportunidade de aprendizado e crescimento profissional que pude ter neste período.

Agradeço pela convivência, que tanto me ensina, há tantos anos! Muito obrigada pela paciência, carinho e compreensão com os quais sempre me tratou. Admiro-o muito, tanto profissional como pessoalmente, por seu caráter e integridade exemplares; é um privilégio poder ouvir seus conselhos e ensinamentos, dos quais sempre vou me lembrar.

Ao Prof. Dr. Carlos Rossa Junior,

Por toda a orientação que me deu neste trabalho, pois sem sua colaboração ele não poderia ter sido feito.

Sou imensamente grata pela maneira como me recebeu, me ensinou e ajudou em todo este tempo, sempre com muita disponibilidade e paciência, em todos os momentos em que precisei.

Muito obrigada por todo o conhecimento transmitido, por todo o ‘pensamento científico’ despertado, e também pelo convívio pessoal que tanto me ensinou, pois pude aprender todos os dias com seu profissionalismo, objetividade, dedicação e competência admiráveis.

Aos amigos **Morgana, João, Marcell e Sabrina**, com os quais compartilhei de intenso e agradável convívio no laboratório. Muito obrigada por tudo o que me ensinaram e por sempre me ajudarem em tudo o que precisei. Vocês foram essenciais, tanto para a realização deste trabalho quanto para melhorar meu dia a dia!

A todos os amigos do Curso de Mestrado em Periodontia: **Livia, Giovana, Fabiana, Fausto, Felipe, Luizinho, Pablo, Rafael**, sempre presentes; obrigada pela amizade, companheirismo e ajuda em todos os momentos divididos nestes dois anos. Vocês são muito especiais!

Às minhas queridas **Renata, Tamara e Natália**, companheiras de república, que me acompanham e me aguentam de perto, com tanta compreensão em todas as fases, das mais difíceis às mais alegres, sendo minhas amigas e família ao mesmo tempo!
Maria Paula, Yuki, Milca, todas as que passaram por nossa casa, muito obrigada pelo carinho e pela grande torcida!

À minha grande amiga **Célia**, tão incentivadora, que venceu esta etapa junto comigo, sempre me ouvindo com muita paciência, e apoiando, com muito amor e fé. Muito obrigada!

À **família bendita que Deus me deu** em Taquaritinga e também em Araraquara. Obrigada por me ajudarem e estarem sempre comigo. Gostaria de citar tantos nomes aqui... mas prefiro chamá-los de minha família, pois é isso que são. Vocês fazem parte de tudo isto, fazem parte da minha vida.
Muito obrigada por tudo!

Aos meus primeiros orientadores, **Profa. Dra. Estela Sasso Cerri** e **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, da Disciplina de Histologia desta faculdade, e à amiga **Ana Paula Faloni**, pelos quais tenho muito carinho e gratidão. Obrigada por tudo que aprendi com vocês, e também pelo interesse despertado, ainda naquela fase, pela área acadêmica.

À empresa **Acecil, de Campinas**, pela esterilização dos espécimes de dentina utilizados neste trabalho. Agradeço em nome de **Marcos (in memorian)** e **Sônia**, sempre gentis, solícitos e muito eficientes.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro imprescindível, e à **FAPESP**, pelo auxílio financeiro concedido para realização deste trabalho.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP**, na pessoa de seu Diretor, **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla**, e **Vice-Diretora, Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon**, pelo crescimento profissional aqui proporcionado.

Ao **Programa de Pos-Graduação - Área de Periodontia**, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, em nome do coordenador, **Prof. Carlos Rossa Junior**, e a todos os demais docentes do Curso de Pos-Graduação, pela atenção dada e conhecimentos transmitidos.

A todos Docentes da Disciplina de Periodontia: **Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior**, **Prof^a Dra Rosemary Adriana Chierici Marcantonio**, **Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio**, **Prof^a Dra Silvana Regina Perez Orrico**, **Prof. Dr. Carlos Rossa Junior**, **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**, pela dedicação, amizade, formação e exemplo profissional que recebo de vocês desde a graduação.

A todos os amigos do Curso de Pós-Graduação com quem convivi: **Alliny, Shelon, Michele, Rodrigo, Lucas, Sâmia, Suzane, Rafael, Leila, João Paulo, Bruno, Mário, Jônatas, Livia, Chaine, Guilherme, Luana, Andressa, Letícia, Érica, Nicole, Tetê, Sabrina, Naná, Marina, Roberta, Rubão, Rubinho, Túlio, Nicolau, Yeon, Andrés, Wagner, Humberto**; também aos da graduação ou de outros cursos de Pós-Graduação; obrigada a todos, desde as experiências transmitidas até os momentos de descontração, o convívio com vocês tornou os dias melhores!

A todos os funcionários e amigos da Disciplina de Periodontia: **D. Maria, Regina Lucia, Maria José (Zezé), Priscila, Cláudia e Leandro**, pelo agradável convívio, atenção e dedicação sempre presentes.

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, em especial à amiga **Isabela**, pelo convívio, carinho e disposição em ajudar; e ao **Toninho**, pela disponibilidade e eficiência constantes.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara, José Alexandre e Sérgio**, por toda a atenção, gentileza, e extrema paciência para ajudar;

A todos os funcionários da Biblioteca, pela dedicação e colaboração em todos esses anos.

Enfim, a todos os que de alguma forma fizeram parte deste período, contribuindo e torcendo por mim,

MUITO OBRIGADA!!!

“Todos os vossos atos sejam feitos com amor.”

(I Coríntios, 16:14)

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 PROPOSIÇÃO.....	35
3 MATERIAL E MÉTODO.....	37
4 RESULTADOS.....	49
5 DISCUSSÃO.....	66
6 CONCLUSÃO.....	77
7 REFERÊNCIAS	79

Rocha FRG. Condicionamento radicular com ácido cítrico e os efeitos biológicos da aplicação tópica de bFGF e BMP-7 em células relevantes para a regeneração periodontal [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

RESUMO

A regeneração periodontal ainda representa um importante desafio, devido a limitações na efetividade e imprevisibilidade das abordagens clínicas. O condicionamento radicular e a utilização de mediadores biológicos, como os fatores de crescimento, são duas das técnicas que tem sido estudadas para esta finalidade; também tem sido proposta a combinação de ambas. Foi avaliado in vitro o efeito do condicionamento ácido da dentina na liberação de bFGF e BMP-7 aplicados topicamente de forma isolada ou associados, além da influência de tais tratamentos na expressão de genes-alvo relacionados ao metabolismo de tecido conjuntivo mineralizado e não mineralizado em três tipos celulares relevantes para o processo regenerativo no microambiente periodontal. Espécimes de dentina bovina foram subdivididos em dois grupos: não condicionados e condicionados com ácido cítrico 25% durante 3 minutos. bFGF recombinante humano (10 e 50 ng), BMP-7 (100 e 300 ng) e associação bFGF/BMP-7 (50 ng e 100 ng, respectivamente) foram suspensos em 50 µL de meio de cultura e aplicados topicamente sobre a dentina. A liberação de fatores de crescimento aplicados topicamente sobre a dentina condicionada e não

condicionada foi determinada por meio de ELISA. Linhagens celulares de camundongos – fibroblastos do ligamento periodontal, cementoblastos e células do estroma ósseo – foram plaqueadas sobre os espécimes de dentina com e sem condicionamento ácido prévio, tratados ou não com os fatores de crescimento. Após 24 horas, as células aderidas sobre as amostras de dentina foram coletadas, o RNA total extraído e a expressão gênica de colágeno 1-alfa1, fibronectina e Runx2 foi avaliada por RT-qPCR. Os resultados encontrados neste estudo indicam que os fatores de crescimento são retidos pela dentina após aplicação tópica com o pico de liberação em 2 horas; o condicionamento ácido da dentina favoreceu a retenção dos fatores de crescimento aplicados topicamente sobre a dentina; e os três tipos celulares avaliados respondem diferentemente a uma mesma condição experimental; e que a aplicação tópica dos fatores de crescimento sobre a dentina atenuou os efeitos dos mesmos fatores utilizados diretamente no meio de cultura, sendo esta atenuação menos marcante em amostras previamente condicionadas com ácido cítrico.

Palavras-chave: Periodontia; Regeneração; Ácido cítrico; Fatores de crescimento.

Rocha FRG. Conditioning with citric acid and biological effects of topical bFGF and BMP-7 in relevant cells to periodontal regeneration [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

ABSTRACT

Periodontal regeneration still poses a challenge both in terms of predictability and magnitude of effect. Chemical root conditioning and the use of biological mediators are two strategies studied to improve the results of regenerative therapies. The objective of this study was to determine the effect of acid conditioning of dentin on the release of topically applied bFGF and BMP-7, isolated or associated. We also evaluated the impact of such treatment in the expression of target genes related to the metabolism of mineralized connective tissue and non-mineralized in three cell types relevant for the regenerative process in the periodontal microenvironment. Dentin specimens, which were obtained from bovine teeth, were divided into two groups: non-conditioned and conditioned with 25% citric acid for 3 minutes. Human growth factors produced by recombinant DNA technology were diluted in 50 mL of culture medium and topically applied on the dentin in the following amounts: recombinant human bFGF (10 and 50 ng), BMP-7 (100 and 300 ng) and associated bFGF/BMP-7 (50 ng and 100 ng, respectively). The released of growth factor topically applied on the conditioned and non-conditioning dentin samples was determined by ELISA. Murine cell lines - periodontal ligament fibroblasts, cementoblasts

and bone marrow stromal cells - were grown on dentin specimens with and without prior acid conditioning and application of growth factors. After 24 hours, the cells adhered on the samples of dentin were collected, total RNA extracted and gene expression of collagen 1-alpha 1, fibronectin and Runx2 was determined by RT-qPCR. The results of this study indicate that: growth factors are retained by dentin after topical application and that the peak release occurs in two hours; the conditioning of dentin with citric acid favored the retention of topically applied growth factors to dentin; all three cell types respond differently to the same experimental condition evaluated; the topical application of growth factors on dentin attenuated the effects of these factors used directly in the culture medium, and this attenuation was less marked in the samples previously conditioned with citric acid.

Keywords: Periodontics; Regeneration; Citric acid; Growth factors

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Neste trabalho, propomos investigar a viabilidade da utilização da aplicação tópica de fatores de crescimento sobre a dentina para influenciar o comportamento biológico de células em contato direto com este substrato. Como objetivo secundário, avaliamos se o condicionamento químico prévio da superfície dentinária proporciona algum tipo de benefício na retenção dos fatores de crescimento aplicados topicamente e/ou em seus efeitos biológicos. Para facilitar o entendimento das bases racionais deste trabalho, dividimos esta introdução e justificativa em tópicos, nos quais exploramos os seguintes aspectos: condicionamento radicular, mediadores biológicos para regeneração periodontal e seus veículos e formas de aplicação.

1. 1 O Condicionamento químico radicular como estratégia terapêutica para regeneração periodontal

Embora o tratamento periodontal seja efetivo na paralisação do processo de doença periodontal e redução de inflamação local, diminuindo a incidência de perda dental²⁶, não é possível ainda obter por meio dele de forma consistente e clinicamente relevante a restauração da anatomia normal dos tecidos periodontais perdidos em consequência da doença. O resultado mais comum e previsível do tratamento periodontal é o reparo,

condição em que nem a arquitetura e nem a função originais do periodonto são reproduzidas pelos tecidos cicatrizados⁸. Há muito tempo, com objetivo de obter a regeneração dos tecidos periodontais, outras modalidades terapêuticas vem sendo intensamente estudadas. Estas incluem o condicionamento químico da superfície radicular, a regeneração tecidual guiada, os enxertos ósseos e sintéticos, a utilização de fatores de crescimento e a combinação dos mesmos.

O condicionamento químico da superfície radicular foi uma das primeiras estratégias terapêuticas propostas com a finalidade de promover a regeneração periodontal. Entre os possíveis efeitos biológicos aventados para o condicionamento radicular está a descontaminação radicular, a qual promove a remoção de bactérias, toxinas e também de smear layer, que é a camada residual formada na superfície radicular após a instrumentação, podendo atuar como uma barreira à nova inserção conjuntiva^{6, 12, 16, 42}3. Além disso, a desmineralização da superfície radicular tem também como objetivo a exposição das fibras colágenas da matriz orgânica do cimento ou dentina, favorecendo a formação e adesão do coágulo de fibrina^{3, 33}, o que encurta a sequência dos eventos biológicos necessários para a regeneração do periodonto.

Sabe-se que a matriz extracelular do tecido ósseo é um dos principais locais de armazenamento de fatores de crescimento e outras proteínas, como osteopontina (OPN), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), colágeno (principalmente tipos I e III), osteocalcina (OCN)^{19, 66}, que

são capazes de influenciar o processo de reparo e *turnover* ósseo. Baseando-se nisso e também no fato de que as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) foram inicialmente detectadas pela descalcificação do tecido ósseo, existe a possibilidade de que o condicionamento radicular e a desmineralização superficial resultante levem à liberação de mediadores biológicos, como fatores de crescimento e outras proteínas, que estão armazenados na matriz orgânica do cimento ou dentina, estimulando assim a divisão e proliferação das células do ligamento periodontal⁵.

O cimento é um tecido que pode exercer importante papel no processo de regeneração periodontal, possivelmente devido a propriedades bioquímicas e mediadores biológicos armazenados em sua matriz extracelular pois, embora esta tenha similaridades com a matriz de outros tecidos mineralizados, possui características fisiológicas únicas²², contendo moléculas que não são detectáveis em outros tecidos, as quais influenciam na atividade de diversos tipos celulares. A matriz orgânica do cimento é constituída principalmente de colágeno, sendo 90% colágeno tipo I e 5% colágeno tipo III, além de duas proteínas colagenosas constituintes da matriz – osteopontina e sialoproteína óssea – as quais parecem ter um importante papel na diferenciação de células progenitoras em cementoblastos⁵¹.

Também estão presentes na matriz do cimento outros fatores de crescimento capazes de promover proliferação e diferenciação de células cementoprogenitoras, tais como BMP-2, BMP-3 e BMP-4, fator de

transformação de crescimento-beta ($TGF-\beta$), fator de crescimento derivado de plaquetas-beta ($PDGF-\beta$) e fator de crescimento insulínico-I ($IGF-I$). Estes são também componentes do tecido ósseo, no entanto, algumas moléculas parecem ser exclusivas do cimento, como o fator de crescimento do cimento (CGF), a proteína de adesão do cimento (*cementumadhesionprotein*, CAP) e a proteína do cimento 23 (*cementumprotein 23*, CP-23)²⁴, considerados marcadores específicos do cimento. Tais moléculas, devido ao fato de serem específicas do cimento, podem ser úteis ao entendimento da cementogênese, bem como da regeneração do cimento dental. Este fato sugere duas possibilidades: 1) A manutenção do cimento sobre a superfície radicular, pois o condicionamento químico poderia favorecer a exposição dos mediadores biológicos contidos em sua matriz extracelular; e 2) Na inviabilidade de manter o cimento radicular, acrescentar exogenamente, de forma tópica, sobre a superfície radicular, o mediador biológico presente no cimento, e que favorece a regeneração periodontal, visto que o condicionamento radicular poderia favorecer a adsorção do mediador biológico à superfície radicular. De fato, a segunda possibilidade é suportada pelos estudos que demonstraram que o condicionamento químico prévio proporcionou vantagem na adsorção de proteínas derivadas da matriz do esmalte (Emdogain) à raiz dental^{45, 65}.

No entanto, ainda que as evidências sobre o papel do condicionamento químico radicular na regeneração periodontal sejam

promissoras em modelos animais (Tabela 1)^{14, 40, 43, 46, 52, 67, 68}, a maior parte dos estudos em humanos não apresenta ainda bons resultados. Esta discrepância entre os resultados em modelos animais e estudos clínicos pode ser devida às diferenças espécie-específicas na etiopatogênese da doença periodontal, ou na própria capacidade reparativa dos tecidos.

Outra possibilidade é que existam diferenças na quantidade de mediadores biológicos armazenada na matriz extracelular da dentina e do cemento. A adição de fatores de crescimento de forma exógena poderia compensar esta deficiência, porém um dos problemas associados ao uso dos fatores de crescimento é sua reduzida meia-vida. O condicionamento radicular prévio à aplicação tópica do fator de crescimento pode favorecer a adsorção à superfície radicular, provavelmente devido à exposição da matriz colagenosa da superfície radicular. Esta exposição de colágeno também favorece a migração e adesão de fibroblastos do ligamento periodontal^{18, 55, 62, 64}, um tipo celular de grande relevância para a regeneração do periodonto.

Assim, o condicionamento químico radicular pode ter um papel relevante na regeneração periodontal, devido à exposição de mediadores biológicos endógenos presentes na matriz dentinária e do cemento, bem como por favorecer a adsorção de mediadores biológicos aplicados topicamente.

Tabela 1. Estudos utilizando condicionamento químico radicular em modelos animais.

Autor	Modelo	Agente	Resultado
Register et al., 1976	Cirurgia a retalho, cães	Ácido cítrico	Ganho de inserção foi acelerado pelo condicionamento
Polson et al., 1982	Exposição de raiz, reimplante dental, macacos	Ácido cítrico	Nova inserção tecidual, boa adesão da rede de fibrina à raiz
Claffey et al., 1987	Exposição de raiz, reposição de retalho, cães	Tetraciclina 1%	Ganho de inserção com tetraciclina foi semelhante ao obtido com ácido cítrico anteriormente
Wikesjö et al., 1988	Furca classe II, cães	Cloridrato de tetraciclina, ácido cítrico, fibronectina	Favorecimento da regeneração com todos os agentes químicos
Wikesjö et al., 1992	Recobrimento radicular, cães	Ácido cítrico Tetraciclina	Melhor reparo com ácido cítrico
Sculean et al., 2000	RTG, EMD, Defeitos tipo fenestração, macacos	Emdogain, EDTA	EDTA favoreceu a regeneração
Nagata et al., 2005	Defeitos de deiscência, macacos	Tetraciclina 10%	Não houve diferenças significantes entre os grupos

1. 2 Agentes químicos mais utilizados para condicionamento radicular

Em uma revisão sistemática³⁷, foi verificado que quatro de oito trabalhos histológicos avaliados em humanos demonstravam regeneração após o condicionamento com ácido cítrico e em apenas um trabalho clínico, de um total de dezoito avaliados, houve ganho clínico de inserção. Nenhuma regeneração foi verificada nos trabalhos em que o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi utilizado para o condicionamento químico e, de cinco trabalhos em que a tetraciclina foi utilizada, um estudo histológico e um estudo clínico demonstraram ganho de inserção. Nesta mesma revisão, uma meta-análise foi realizada com vinte e oito trabalhos clínicos e nenhum efeito significativo do condicionamento químico da superfície radicular foi observado para os parâmetros de redução da profundidade de sondagem e de ganho clínico de inserção. O emprego do condicionamento radicular associado à regeneração tecidual guiada para o tratamento de recessões gengivais não proporcionou melhoria nos níveis de inserção, embora estivesse associado a um maior percentual de recobrimento radicular completo (51.7% das recessões X 32.1% das recessões tratadas sem o condicionamento radicular)².

De maneira geral, a literatura mostra que os resultados obtidos após o condicionamento químico da superfície radicular são bastante controversos e conflitantes, variando de uma marcante regeneração até uma ausência de regeneração ou efeito clínico benéfico. Essa grande

variabilidade nos resultados pode estar associada a diversos fatores que podem interferir negativamente no resultado final dos experimentos, como: local e modo de preparo dos agentes químicos; tempo de condicionamento da superfície radicular; modo de aplicação destas substâncias, concentração e pH utilizados; grau de hipermineralização do dente. Assim, a regeneração periodontal não deve ser considerada como um resultado previsível após o condicionamento radicular utilizado isoladamente.

Considerando a grande variabilidade na metodologia de aplicação dos agentes condicionantes e nos resultados encontrados na literatura, nosso grupo de pesquisa tem avaliado sistematicamente diversos agentes, como o ácido cítrico, EDTA e tetraciclina. Estes vem sendo aplicados segundo diferentes protocolos, visando principalmente atingir concentração, tempo, pH e modo de aplicação ideais de cada substância, como objetivo de conseguir a remoção de smear layer e, principalmente, a exposição de fibras colágenas dentinárias e ou cementárias. Nossos resultados indicam os seguintes parâmetros considerados ideais para cada substância: ácido cítrico 25%, aplicado com auxílio de pincel (aplicação ativa suave), por 3 minutos; cloridrato de tetraciclina 50mg/mL, aplicado por fricção com auxílio de uma bolinha de algodão (aplicação ativa vigorosa), durante 3 minutos; EDTA 24% na forma de gel, aplicado com auxílio de pincel, por 3 minutos^{1, 10, 11, 17, 27, 33, 50, 58}. Recentemente, verificamos que o ácido cítrico proporciona a melhor adesão de fibrina e de elementos sanguíneos à superfície dentinária do que tetraciclina ou EDTA³³ (Figura 1).

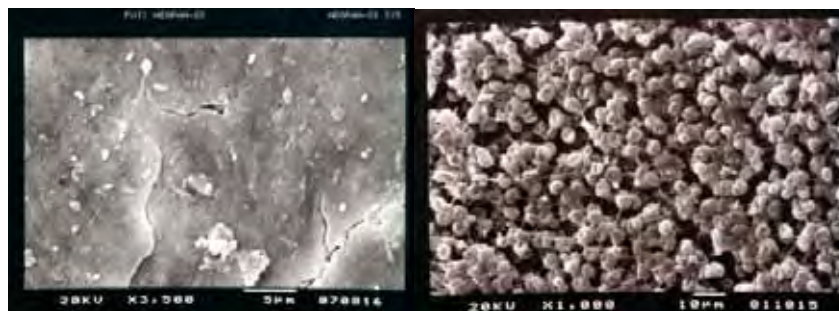


FIGURA 1 – Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura de amostras de dentina condicionadas com solução salina (esquerda) e ácido cítrico (direita) sobre as quais foi depositado o mesmo volume (1,0 ml) de sangue total humano. Após a coagulação do sangue e lavagem por irrigação com solução salina, observa-se a virtual ausência de células aderidas à superfície dentinária controle (não condicionada) em comparação à superfície condicionada com ácido cítrico.

Considerando a relevância da estabilidade do coágulo sanguíneo para a regeneração periodontal, tanto como fonte de células precursoras (derivadas do sangue periférico e do estroma ósseo adjacente) quanto de fatores de crescimento (derivados das plaquetas e outras células sanguíneas), optamos neste estudo pela utilização do ácido cítrico a 25% para condicionamento da superfície radicular.

1. 3 Modulação ativa do processo de reparo periodontal com a utilização de mediadores biológicos - fatores de crescimento

A inconsistência dos resultados das terapias regenerativas periodontais se deve, em parte, à parcial ou total dependência da capacidade regenerativa de cada indivíduo, uma vez que a maior parte das

técnicas é de natureza passiva, isto é, procura proporcionar condições que favoreçam a capacidade regenerativa do hospedeiro. Na técnica de regeneração tecidual guiada, por exemplo, o objetivo é proteger o coágulo e impedir o acesso de determinado tipo celular à área da ferida; já o uso de enxertos visa proporcionar uma matriz tridimensional que favoreça a deposição de novo tecido ósseo pelo hospedeiro. A modulação ativa do processo de reparo com a utilização de diversos mediadores biológicos tem despertado grande interesse por possibilitar a potencialização do processo regenerativo, além de um maior controle sobre este processo. Entre os mediadores biológicos mais estudados estão os fatores de crescimento, que são polipeptídeos produzidos naturalmente, com múltiplas e complexas atividades biológicas, incluindo modulação de proliferação, migração, quimiotaxia, diferenciação e expressão gênica pelas células²⁸.

O fator de crescimento de fibroblastos-2, ou fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), é um dos mitógenos mais potentes, estimulando a proliferação e quimiotaxia de fibroblastos do ligamento periodontal e osteoblastos. No entanto, seus efeitos sobre a diferenciação celular, avaliados pela modulação da expressão gênica e síntese de colágeno, são controversos e dependentes do tipo celular. A síntese de colágeno, por exemplo, é inibida pelo bFGF em fibroblastos, mas é estimulada em osteoblastos. Em geral, o bFGF tem ações primariamente mitogênicas e angiogênicas, as quais são especialmente relevantes nas fases iniciais de reparação. Sua importância na regeneração periodontal é

demonstrada por estudos em animais^{39, 49, 60}, e um estudo clínico com bFGF em humanos³⁰ relatando maior extensão de regeneração periodontal com a aplicação tópica do bFGF sugere que realmente pode haver maior eficácia no estímulo da regeneração em presença de bFGF.

Outros fatores de crescimento bastante estudados na regeneração periodontal são as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), em particular BMP-2 e BMP-7. Diversos estudos relatam maior extensão de regeneração periodontal, principalmente do tecido ósseo com a utilização de BMP-2, porém com resultados variados em relação à regeneração de cimento e ligamento periodontal^{7, 13, 57, 69, 70}. Por outro lado, há uma relativa escassez de estudos com BMP-7, com a qual estudos pré-clínicos em modelos animais sugerem uma maior uniformidade no favorecimento da regeneração não apenas de tecido ósseo, mas também de cimento e ligamento periodontal^{20, 47, 48}. Em geral, os resultados dos estudos com BMP-2 sugerem que a regeneração de cimento e tecido não mineralizado (ligamento periodontal) é inferior à obtida com BMP-7. Anquilose e formação de tecido fibrovascular no espaço do ligamento periodontal sem fibras de Sharpey inseridas no cimento e sem a organização de fibras colágenas inseridas no tecido ósseo foram relatadas com o uso de BMP-2³². Recentemente, estudos que utilizaram BMP-7 em cementoblastos in vitro mostraram efeitos positivos para a mineralização destas células^{9, 23}. Em uma análise de perfil proteômico e expressão gênica de cementoblastos após tratamento in vitro destes com BMP-7, foi encontrada

ainda uma associação da promoção de diferenciação e mineralização dos cementoblastos por BMP-7 por meio de indução de genes que participam do processo de formação do colágeno tipo I⁹.

Como o periodonto inclui tecidos mineralizados e não mineralizados, bem como múltiplos tipos celulares (fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais, células epiteliais, macrófagos e outras células da resposta imune), a regeneração é um processo complexo, que requer a participação de mais de um mediador biológico. A proposta de uma combinação de fatores de crescimento, embora seja biologicamente sensata, tem muitos parâmetros que devem ser para isso conhecidos e otimizados, como: a natureza dos fatores de crescimento utilizados, a concentração a ser utilizada, a compatibilidade bioquímica dos fatores combinados em termos de manutenção de sua atividade biológica ou de efeitos antagônicos ou sinérgicos, a sequência de liberação no processo reparativo e a caracterização de seus efeitos nos tipos celulares relevantes para o processo de regeneração periodontal. De fato, a combinação de fatores de crescimento não apenas é viável como pode favorecer a regeneração periodontal, como demonstrado em estudos pré-clínicos em cães e macacos^{21, 35} e ensaios clínicos em humanos²⁵ da associação de fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento semelhante à insulina (PDGF/IGF). Por outro lado, em relação especificamente às BMPs, quando utilizada uma associação de BMP-2 e BMP-7 não houve ação sinérgica na regeneração periodontal em modelos animais em comparação

aos efeitos destes fatores aplicados isoladamente⁴⁸. Nosso grupo de pesquisa verificou que o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e bFGF exercem efeitos opostos em fibroblastos do ligamento periodontal no metabolismo de colágeno (TGF- β foi anabólico e bFGF catabólico) e que na associação destes fatores os efeitos anabólicos do TGF- β foram parcialmente atenuados pelo bFGF⁵⁶.

1. 4 Forma de administração dos fatores de crescimento e os tipos celulares envolvidos

Outra consideração importante é com relação ao veículo utilizado como carreador dos fatores de crescimento. O veículo deve preservar as atividades biológicas dos fatores de crescimento, ser inerte aos tecidos do hospedeiro e possibilitar a liberação sustentada e, idealmente, na sequência adequada no caso do uso associado de diferentes fatores de crescimento. A avaliação do veículo carreador é uma área de intensa pesquisa em estudos pré-clínicos, incluindo esponja e géis de colágeno, osso autógeno liofilizado e compostos sintéticos de cálcio (beta-tricálcio fosfato, cimento de fosfato de cálcio)³².

No entanto, existem importantes hiatos no conhecimento das ações dos fatores de crescimento sobre diferentes tipos celulares que devem ainda ser melhor compreendidos para que haja um embasamento biológico da seleção do(s) fator(es) utilizado(s) na regeneração do periodonto, tanto

em estudos posteriores pré-clínicos em modelos animais quanto em estudos clínicos em humanos.

Os efeitos da BMP-7 sobre os cementoblastos, por exemplo, ainda tem sido estudados, havendo em estudos mais recentes a sugestão de que BMP-7 é um promissor indutor de cementogênese, embora ainda sejam necessários mais estudos para compreender seu mecanismo de atuação em níveis moleculares²³. Ainda necessitam ser mais estudados também os efeitos de bFGF e BMP-7 na modulação diferencial da expressão gênica de fibroblastos do ligamento periodontal, além de cementoblastos.

Uma estrutura necessariamente presente na regeneração periodontal é a raiz dentária, e a aplicação tópica de fatores de crescimento sobre a raiz é o meio mais direto de avaliação dos efeitos dos fatores de crescimento, sem a possível influência de veículos carreadores. Existem evidências de que a aplicação tópica de fatores de crescimento sobre a superfície radicular pode favorecer a regeneração periodontal, sendo necessárias mais avaliações dos efeitos da aplicação tópica de bFGF e BMP-7 na superfície radicular, bem como de seu papel no condicionamento químico prévio na raiz e os efeitos biológicos destes fatores de crescimento.

Os estudos clássicos de Melcher et al.³⁸ propuseram a base biológica, aceita ainda hoje, segundo a qual o endósteo é uma das fontes principais dos tipos celulares fundamentais envolvidos na regeneração periodontal (cementoblastos, fibroblastos do ligamento periodontal, células

endoteliais, osteoblastos). O ligamento periodontal também pode conter células precursoras dos vários tipos celulares necessários para a regeneração periodontal^{34, 53}.

Assim, propomos a avaliação dos efeitos de bFGF e BMP-7 na modulação da biologia celular de tipos celulares que podem estar presentes no microambiente periodontal e relevantes para a regeneração do periodonto de sustentação: fibroblastos do ligamento periodontal, cementoblastos e a população mista celular derivada do endósteo (*bone marrow stromal cells*). Os resultados deste estudo podem contribuir significativamente para o embasamento biológico de terapias regenerativas do periodonto ao demonstrar: 1) os efeitos de bFGF e BMP-7 em tipos celulares relevantes para a regeneração periodontal; 2) a viabilidade da aplicação tópica de bFGF e BMP-7 na manutenção de seus efeitos biológicos; 3) os efeitos da aplicação combinada de bFGF e BMP-7; e 4) a influência do condicionamento químico radicular prévio na adsorção e efeitos biológicos de bFGF e BMP- 7.

Este estudo, portanto, teve como foco verificar se a aplicação tópica dos fatores de crescimento influencia os diversos parâmetros da biologia celular avaliados (proliferação, diferenciação e expressão gênica) e caracterizar os efeitos de bFGF e BMP-7 nos distintos tipos celulares avaliados. Além disso, avaliamos o condicionamento químico radicular como potencializador dos efeitos biológicos dos fatores de crescimento, determinando se esta potencialização se deve ao aumento da adsorção

dos fatores de crescimento na raiz ou à exposição de fatores de crescimento de origem endógena armazenados na matriz extracelular de dentina e cimento.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a aplicação tópica de bFGF e BMP-7, aplicados isoladamente e combinados, sobre:

- 1) A modulação dos parâmetros biológicos de diferenciação celular e expressão gênica segundo o tipo celular considerado;
- 2) Seus efeitos biológicos quando aplicados após o condicionamento químico da superfície radicular.

Material e Método

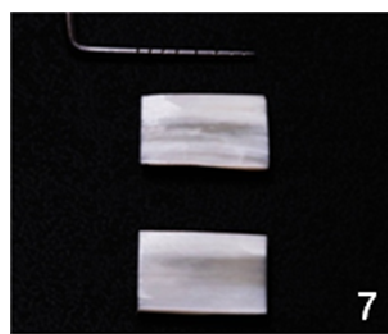
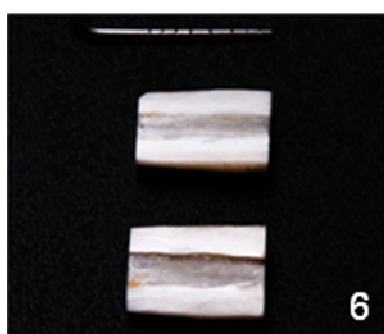
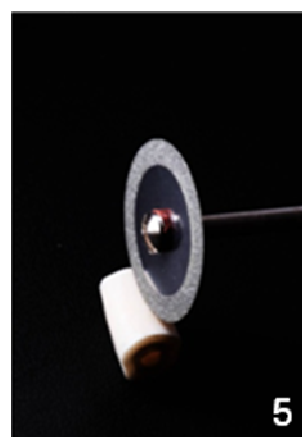
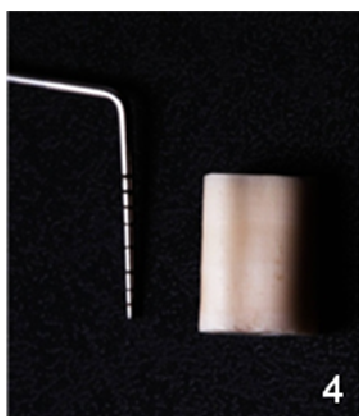
3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Preparo dos espécimes de dentina

Os espécimes de 1,0 cm de comprimento foram obtidos manualmente, a partir de dentes de bovinos, raça Nelore, com cerca de 5 anos de idade e 250 kg. Os dentes foram adquiridos junto ao Frigorífico Vangélio Mondelli LTDA (Bauru, SP, Brasil). Foram utilizadas somente as raízes de incisivos permanentes inferiores (Figuras 2 e 3). Primeiramente foram separadas as coroas e os ápices radiculares utilizando disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) montado em peça reta (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), de forma a serem obtidos espécimes da porção mais cervical das raízes, os quais foram medidos com 1,0 cm de comprimento (Figuras 4 e 5). Em seguida foram feitos cortes longitudinais, também com disco diamantado, obtendo-se dois espécimes a partir de cada raiz (Figura 6). Ainda com disco diamantado em baixa velocidade, as superfícies dentinárias foram regularizadas e aplainadas (Figura 7). Foram utilizadas somente as superfícies voltadas para a polpa dental, pois visualmente é possível diferenciar cimento e dentina no espécime.

A utilização de dentes bovinos possibilitou a detecção dos fatores de crescimento de origem humana liberados no meio de cultura, sem nenhuma interferência dos fatores de crescimento endógenos armazenados na matriz dentinária, o que poderia ter ocorrido com a utilização de dentes humanos. Outra vantagem da utilização de dentes

bovinos é que seu maior tamanho possibilitou o preparo de amostras com dimensões adequadas utilizando um menor número de dentes.



FIGURAS 2 a 7 - Preparo dos espécimes de dentina a partir de dentes bovinos.

3. 2 Procedimento de esterilização dos espécimes

Após o preparo, todas as amostras foram devidamente embaladas e enviadas para esterilização por meio de gás de óxido de etileno³¹, serviço que nos foi gentilmente fornecido pela empresa Acecil (Campinas, São Paulo, Brasil).

3. 3 Condicionamento ácido

O agente condicionante utilizado foi o ácido cítrico 25%, manipulado em farmácia (Farmácia Santa Paula, Araraquara, SP, Brasil), aplicado com auxílio de pincel, durante 3 minutos, segundo procedimento já descrito¹¹. Após o tempo de condicionamento, cada espécime condicionado foi lavado com 10 ml de solução tampão fosfato salina (PBS) estéril, por meio de irrigação com seringa descartável. Os espécimes não condicionados foram somente lavados com a mesma quantidade de PBS estéril.

3. 4 Células e reagentes

Foram utilizadas linhagens celulares de fibroblastos do ligamento periodontal (mPDL) e de cementoblastos (OCCM) de camundongos, obtidas por doação da Dra. Martha J. Somerman (University of Washington, Seattle, WA, USA), bem como linhagem doação do Dr. Charles O'Brien (University of Arkansas, Kansas City, AK). Estas linhagens já estão caracterizadas na literatura^{15, 36}. de células do estroma ósseo de camundongos (UAMS32), obtidas por

Os fatores de crescimento utilizados foram de origem humana recombinante (R&D Systems), para possibilitar a distinção entre os fatores de crescimento produzidos pelas células (de camundongo) ou liberados da matriz dentinária (de origem bovina) dos fatores de crescimento exógenos aplicados topicamente. Foram utilizados em cada aplicação tópica sobre as amostras de dentina 50µl de meio de cultura celular sem suplementação o qual continha as seguintes quantidades dos fatores de crescimento: 10 e 50ng de bFGF (correspondendo, respectivamente, a 0.2 e 1 µg/mL) e 100 e 300 ng de BMP-7 (equivalente a 2 e 6 µg/mL, respectivamente). Estas quantidades totais dos fatores de crescimento são baseadas em estudos anteriores^{41, 54, 55, 61}, e correspondem à concentração utilizada nos experimentos-controle realizados na ausência das amostras de dentina e com adição dos fatores de crescimento diretamente ao meio de cultura. As amostras de dentina foram condicionadas com estas quantidades de fatores de crescimento por 2 minutos.

3. 5 Quantificação dos fatores de crescimento liberados no meio de cultura

Para cada experimento foram utilizados 8 espécimes de dentina, aleatoriamente selecionados, dos quais 4 foram somente lavados com 10 mL de PBS e outros 4 foram condicionados com ácido cítrico durante 3 minutos e depois lavados com 10 mL de PBS (Figuras 8 e 9).

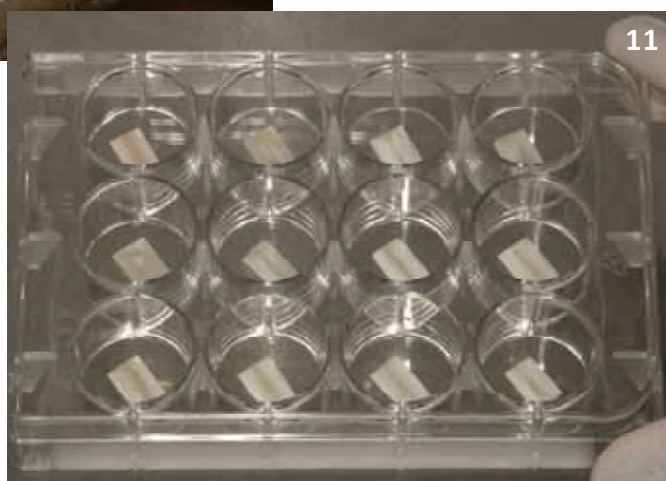
Após este procedimento, os espécimes foram colocados em placas para cultura celular contendo 12 poços (Figuras 10 e 11) e receberam a aplicação tópica durante 2 minutos dos fatores de crescimento diluídos em meio de cultura não suplementado (Figuras 12 e 13), o qual foi aspirado ao final deste tempo^{49, 55, 56}.

As condições experimentais utilizadas neste experimento foram:

1. Controle;
2. bFGF 50 ng;
3. BMP-7 100 ng;
4. bFGF 50 ng + BMP-7 100 ng;
5. Condicionamento ácido;
6. Condicionamento ácido + bFGF 50 ng;
7. Condicionamento ácido + BMP-7 100 ng;
8. Condicionamento ácido + bFGF 50 ng + BMP-7 100 ng.

Foi então acrescentado a cada poço da placa de cultura 1,95 mL de meio de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco GRL, Life Technologies) não suplementado, de modo a cobrir os espécimes, obtendo-se volume final de 2 mL em cada poço (Figuras 14 e 15).

Nos períodos de coleta estabelecidos: 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 8 horas, foram coletados 200 µL de cada poço da placa de cultura, os quais foram aliquotados em 2 tubos eppendorf e



**FIGURAS 8 a 11 –
Condicionalmento ácido
dos espécimes de denina
e posicionamento dos
mesmos nas placas de
cultura**



FIGURAS 12 a 15 –
Condicionamento com os
fatores de crescimento e
posterior cobertura dos
espécimes de dentina com
meio de cultura para
incubação.

armazenados imediatamente armazenadas em freezer a -80°C até o momento da análise.

A quantificação de bFGF e BMP-7 foi realizada utilizando kits ELISA do tipo sanduíche, segundo as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Cada amostra foi avaliada em duplicata e os experimentos foram repetidos de forma independente duas vezes.

3. 6 Avaliação da regulação da expressão gênica em nível de RNAm

Para realização deste experimento, primeiramente as células a serem utilizadas (fibroblastos do ligamento periodontal, cementoblastos, e células do estroma ósseo) foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS (soro fetal bovino) e 1% de penicilina e glutamina, em placas de cultura de 10x100 mm em incubadora a 37°C , até que atingissem confluência. No momento do experimento o meio de cultura foi aspirado e as células foram destacadas enzimaticamente do substrato plástico, ressuspensas em DMEM suplementado com 2% de FBS, e ajustadas para uma concentração de 1×10^6 células/mL, de forma que uma alíquota de 50 μL contivesse 5×10^5 células.

Em cada experimento foram utilizados 12 espécimes, selecionados aleatoriamente, dos quais 6 foram condicionados com ácido cítrico durante 3 minutos e depois lavados com 10 mL de PBS. Os outros 6 espécimes não condicionados foram lavados com 10 mL de PBS (Figuras 8 e 9). Em

seguida, os espécimes foram distribuídos em placas para cultura de 12 poços (Figuras 10 e 11) e receberam então os seguintes tratamentos:

1. Controle;
2. bFGF 10 ng;
3. bFGF 50 ng
4. BMP-7 100 ng;
5. BMP-7 300 ng;
6. bFGF 50 ng/ μ L + BMP-7 100 ng;
7. Condicionamento ácido;
8. Condicionamento ácido + bFGF 10 ng;
9. Condicionamento ácido + bFGF 50 ng;
10. Condicionamento ácido + BMP-7 100 ng;
11. Condicionamento ácido + BMP-7 300 ng;
12. Condicionamento ácido + bFGF 50 ng + BMP-7 100 ng.

Os fatores de crescimento nas quantidades indicadas acima foram diluídos em 50 μ L de meio de cultura DMEM não suplementado, somente no momento da realização dos experimentos, e então colocados sobre a dentina, sendo aspirados após 2 minutos (Figuras 12 e 13).

Em seguida, alíquotas de 50 μ L de uma suspensão contendo 1×10^6 células (fibroblastos do ligamento periodontal, cementoblastos, e células do estroma ósseo) em meio de cultura suplementado com 2% de soro fetal bovino foram plaqueadas precisamente sobre os espécimes de dentina. As placas foram então levadas à incubadora a 37°C durante 4 horas para

adesão celular inicial e, após este período, foi acrescentado em cada poço 1,5mL de DMEM suplementado com 2% de FBS, permanecendo as células na incubadora durante mais 20 horas (Figuras 14 e 15). As células foram coletadas por raspagem com raspador de células plástico estéril após completadas as 24 horas de seu plaqueamento.

Foram feitos também controles positivos, representados por células plaqueadas diretamente em placas de cultura de 12 poços (sem espécimes de dentina) e estimuladas com as mesmas concentrações (em ng/ μ L) dos fatores de crescimento.

Este experimento foi repetido de forma independente duas vezes. O RNA utilizado neste experimento foi isolado utilizando um sistema de colunas de afinidade para o isolamento e purificação do RNA total, incluindo tratamento com DNase (kit RNAqueous-4-PCR, Ambion, Inc).

Após quantificação do RNA total em espectrofotômetro UV de microvolumes (Nanovue, GE Health Sciences), 100ng de RNA total foram utilizados na síntese de cDNA, utilizando random hexamers primers e moloneyleukemia vírus reverse transcriptase, segundo as instruções do fornecedor do kit (High Capacity cDNA synthesis kit, Applied Biosystems).

A reação de PCR em tempo real foi feita utilizando conjuntos de primers e sondas pré desenhados (Gene expression assays, Applied Biosystems) para detecção dos genes-alvo Colágeno 1 alfa 1 (Col1 α 1), Fibronectina (Fn) e Runt-related transcription factor 2 (Runx2) e do gene constitutivo (GAPDH), utilizando o sistema TaqMan (TaqMan Universal

PCR Master Mix, Applied Biosystems) e a termocicladora Step One Plus (Applied Biosystems) com as condições de ciclagem otimizadas pelo fabricante (10 minutos a 95°C para desnaturação inicial seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores *cyclethreshold* (Ct) de cada poço foram calculados pelo software da termocicladora, normalizados para os valores de Ct da expressão do gene constitutivo e analisados pelo método $\Delta(\Delta Ct)$.

Os resultados foram expressos como *foldchange* em relação aos controles negativos (células cultivadas em placas de 12 poços e não estimuladas com os fatores de crescimento).

3. 7 Análise Estatística

Os dados obtidos a partir de cada experimento foram analisados separadamente, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) e com base em medidas de tendência central calculadas a partir dos diferentes experimentos e considerando cada condição experimental como um evento independente. Para as comparações dentro de um mesmo grupo (dentina condicionada ou não condicionada) ou entre grupos em uma mesma condição experimental (por ex., 50 ng bFGF em dentina condicionada comparada à não condicionada) foi utilizado o teste t de Student, não pareado. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0.05$) para todas as análises.

Resultado

4 RESULTADO

4. 1 Perfil de liberação dos fatores de crescimento aplicados topicamente

Nestes experimentos, procuramos avaliar o perfil de liberação dos fatores de crescimento bFGF e BMP-7 após aplicação tópica sobre amostras de dentina bovina com e sem condicionamento químico prévio. Como controles, acrescentamos os fatores de crescimento ao meio de cultura celular diretamente (sem a presença de amostras de dentina). A utilização de fatores de crescimento recombinantes humanos e kits ELISA específicos para detecção de proteínas de origem humana evita o possível confundimento com proteínas que poderiam ser liberadas das amostras de dentina bovina utilizadas.

a) bFGF

Quando bFGF foi acrescentado diretamente ao meio de cultura, a concentração detectada não sofreu alterações nas primeiras duas coletas (30 minutos iniciais). A partir do período de uma hora a concentração de bFGF sofreu redução gradativa e significativa em todos os períodos seguintes, com a meia-vida do bFGF sendo inferior a 1 hora (Figura 16).

Já com a aplicação tópica sobre amostras de dentina não condicionadas, a liberação de bFGF foi inicialmente muito baixa (observar escalas dos gráficos), aumentando progressivamente e de forma estatisticamente significativa após 1, 2 e 4 horas, período em que foi observado o pico máximo de concentração de bFGF. No período de 8

horas, houve marcante redução da concentração de bFGF em comparação ao período anterior, voltando aos mesmos níveis observados no período de 10 minutos (Figura 17).

Nas amostras de dentina previamente condicionadas com ácido cítrico, a liberação de bFGF foi também progressiva, no entanto atingiu concentrações superiores em comparação às observadas com a aplicação tópica de bFGF sobre dentina não condicionada (ver escalas dos gráficos). O pico máximo de liberação também ocorreu no período de 4 horas. A liberação em todos os períodos foi estatisticamente diferente quando comparada ao período de 10 minutos, e os períodos de 2, 4 e 8 horas também apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si (Figura 17). Após 8 horas, de forma similar ao observado nas amostras de dentina não condicionadas houve marcante redução na concentração de bFGF em comparação ao período anterior, porém esta concentração ainda se manteve superior à obtida aos 10 minutos.

b) BMP-7

Diferente do verificado para bFGF, a concentração de BMP-7 máxima foi mensurada apenas 30 minutos após a diluição deste no meio de cultura, com reduções progressivas e significativas em todos os períodos subsequentes. A meia-vida de BMP-7 nestas condições esteve entre 1 e 2 horas (Figura 8).

Quando aplicado topicamente sobre espécimes de dentina não condicionados previamente, nos períodos iniciais houve maior liberação de BMP-7 para o meio de cultura, havendo diminuição progressiva e estatisticamente significativa em comparação à concentração no período inicial de 10 minutos, porém esta redução foi de caráter gradual (Figura 18). A aplicação tópica de BMP-7 em espécimes de dentina condicionados previamente resultou em maiores concentrações de BMP-7 liberado no meio de cultura, que aumentaram gradualmente a partir do período de 1 hora e atingiu o pico máximo no período de 2 horas. A partir deste período a concentração de BMP-7 voltou a se reduzir retornando aos níveis iniciais após 8 horas, porém esta concentração ainda foi superior à observada no mesmo período de 8 horas em amostras de dentina não condicionadas (Figura 22).

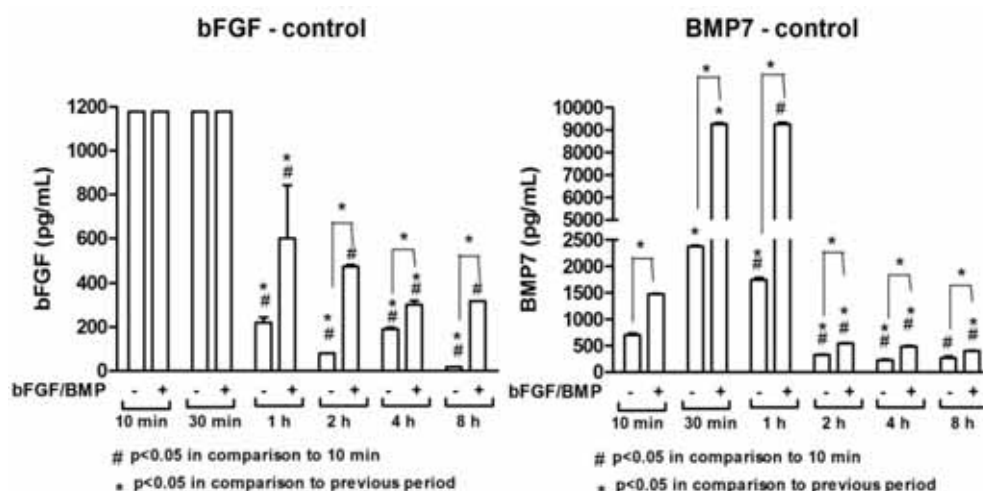


FIGURA 16 - Concentrações de bFGF e BMP-7, respectivamente, no meio de cultura ao longo do tempo de incubação nos experimentos controle positivos, ou seja, sem amostras de dentina. Dados indicativos de dois experimentos independentes avaliados em duplicata

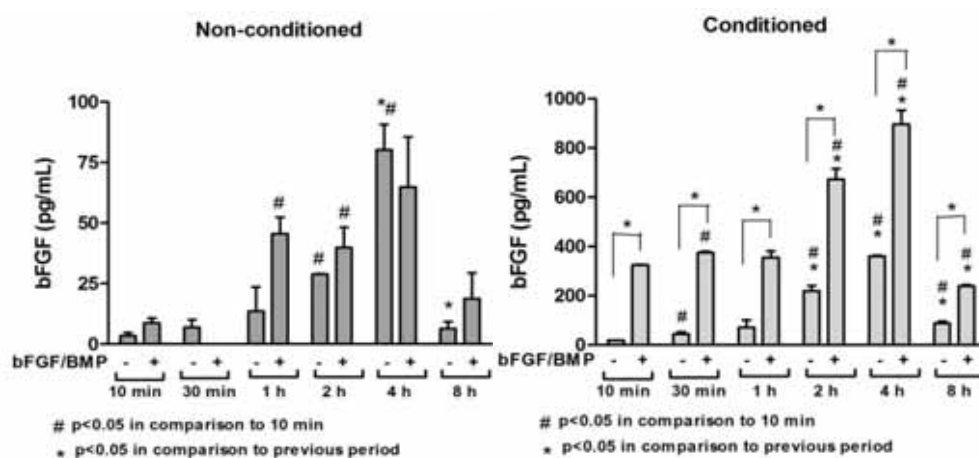


FIGURA 17 - Concentração de bFGF no meio de cultura segundo o tempo de incubação com amostras de dentina sem condicionamento prévio (Non-conditioned) ou previamente condicionadas (Conditioned) à aplicação tópica de bFGF isoladamente ou associado à BMP-7. Dados indicativos de dois experimentos independentes avaliados em duplicata.

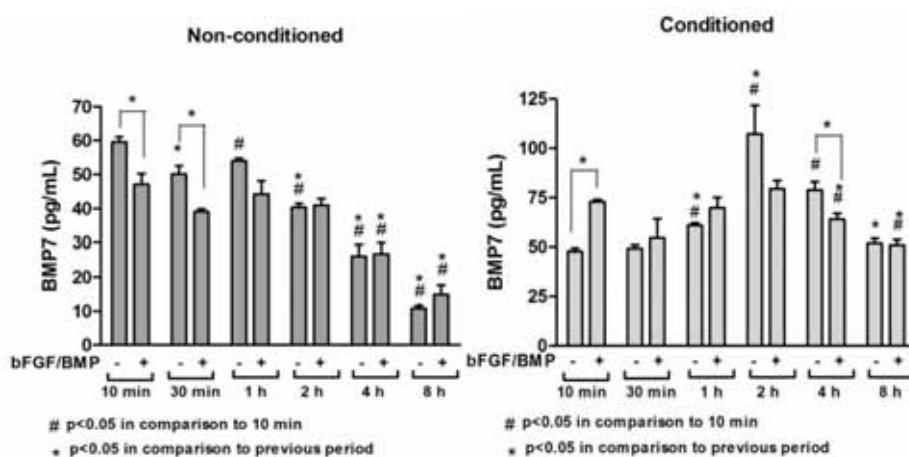


FIGURA 18 - Concentração de BMP-7 no meio de cultura segundo o tempo de incubação com amostras de dentina sem condicionamento prévio (Non-conditioned) ou previamente condicionadas (Conditioned) à aplicação

tópica de bFGF isoladamente ou associado à BMP-7. Dados indicativos de dois experimentos independentes avaliados em duplicata.

4. 2 Modulação da expressão de genes relacionados à diferenciação e atividade osteoblástica: Col1 α 1, Fn1, Runx2

Utilizamos linhagens celulares de camundongo representativas de três tipos celulares relevantes para o reparo e/ou regeneração no microambiente periodontal: fibroblastos do ligamento periodontal (mPDL), células do estroma ósseo (UAMS32) e cementoblastos (OCCM). Os dados da expressão gênica serão apresentados segundo o tipo celular.

Estes experimentos avaliaram o efeito da aplicação tópica dos fatores de crescimento testados (bFGF e BMP-7), isoladamente e combinados, em diferentes quantidades, na modulação da expressão gênica por estes tipos celulares, verificando ainda se o condicionamento químico prévio da dentina exerceria algum tipo de influência nestes efeitos. A avaliação da expressão foi feita em nível de RNAm, por meio de RT-qPCR e utilizando pares de primers e sonda espécie-específicos de camundongo.

4.2.1 Efeito do substrato em que foram cultivadas as células (plástico tratado para cultura ou dentina com e sem condicionamento ácido prévio)

Inicialmente avaliamos se a natureza do substrato em que foram cultivadas as células teria alguma influência na expressão constitutiva (não estimulada) dos genes-alvo de interesse.

- *Fibroblastos do ligamento periodontal (mPDL)*

Para este tipo celular a expressão de colágeno foi a mais baixa, seguida pela expressão de Runx2. Fibronectina mostrou-se bastante expressa por estas células. Não houve, no entanto, em nenhum dos genes-alvo avaliados, influência significativa do substrato de cultura das células.

- *Cementoblastos (OCCM)*

A expressão constitutiva de colágeno por esta linhagem celular foi reduzida, seguida da expressão de fibronectina e maior expressão de Runx2. Não observamos diferenças significativas na expressão constitutiva de nenhum dos genes-alvo com qualquer dos substratos em que foram cultivadas as células.

- *Células do estroma ósseo (UAMS32)*

O perfil de expressão gênica destas células foi similar ao observado em cementoblastos, com reduzida expressão constitutiva de colágeno, seguida pela expressão de fibronectina e maior expressão encontrada de Runx2. Novamente, o substrato de cultura não influenciou de forma significativa a expressão constitutiva dos genes-alvo avaliados, com

exceção da expressão de Fn que foi significativamente maior quando as células foram cultivadas sobre amostras de dentina não condicionadas.

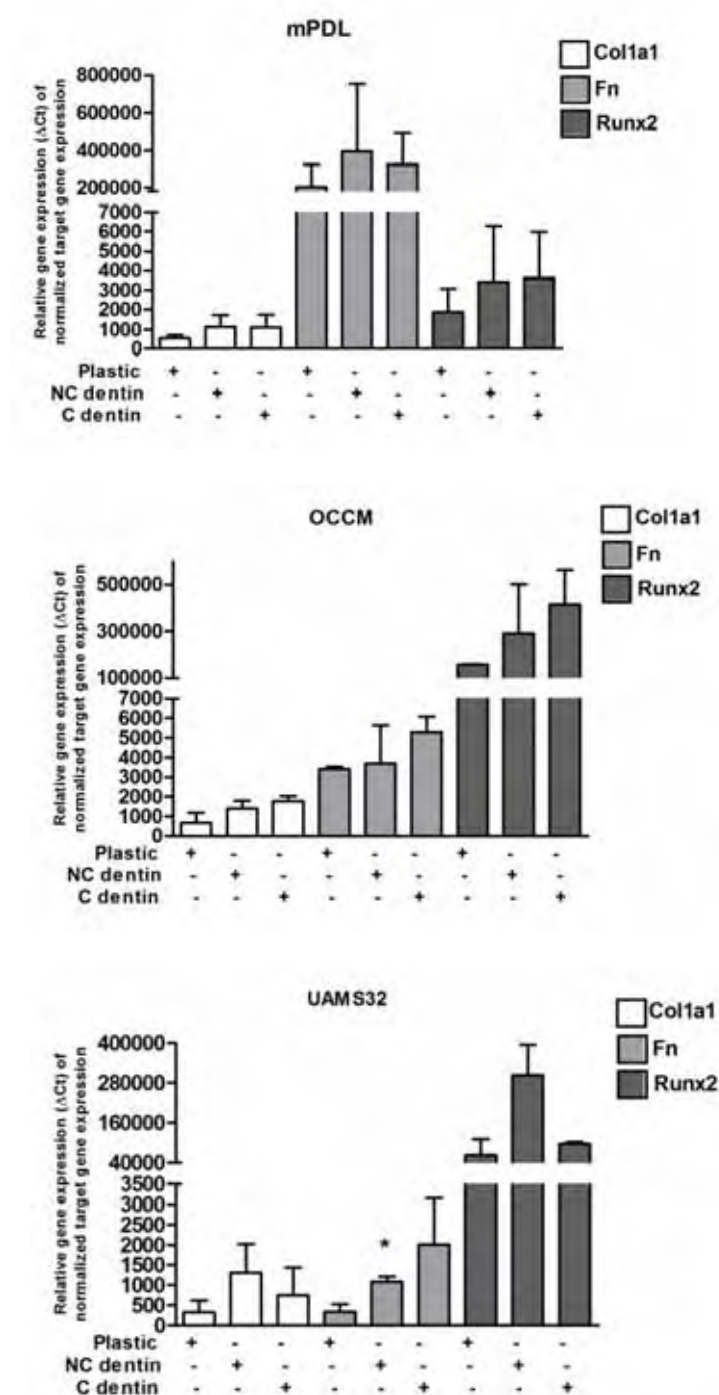


FIGURA 19 - Modulação da expressão gênica (RNA_m) de Col1α1, Fn e Runx2, por células do ligamento periodontal de camundongo (mPDL),

cementoblastos de camundongo (OCCM) e células do estroma ósseo de camundongo (UAMS32) diretamente sobre a placa de cultura e sobre os espécimes de dentina, não condicionados e condicionados com ácido cítrico. 24 horas após o plaqueamento das células, o RNA total foi coletado e utilizado na síntese de cDNA, o qual foi utilizado em reação de qPCR utilizando conjuntos de primers e sondas para os genes-alvo pré-otimizados (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Os resultados foram avaliados pelo método $\Delta(\Delta Ct)$, e as barras indicam os resultados da expressão gênica relativa utilizando a expressão do gene constitutivo GAPDH para normalização dos resultados. Resultados representativos de um pool de RNA de dois experimentos independentes.

Efeito da aplicação tópica dos fatores de crescimento sobre amostras de dentina com e sem condicionamento prévio

Nestes experimentos avaliamos o efeito da aplicação tópica dos fatores de crescimento bFGF e BMP-7, isoladamente e associados, sobre amostras de dentina com e sem condicionamento prévio na modulação da expressão dos genes-alvo.

Fibroblastos do ligamento periodontal (mPDL)

Embora estas células sejam capazes de formar nódulos mineralizados in vitro sob condições de cultura favoráveis, não apresentam um fenótipo osteoblástico constitutivo (não induzido).

O gene colágeno 1 alfa-1 (Col1 α 1) é o responsável por codificar a produção da cadeia pro-alfa 1, a qual vai constituir duas das três alfa-hélices do colágeno tipo 1. Este tipo de colágeno é comumente encontrado em tecidos conjuntivos, nos quais constitui as fibrilas, incluindo osso,

córnea, tendão e derme. É altamente expresso por fibroblastos e osteoblastos, sendo considerado um dos marcadores de formação óssea, no qual tem função estrutural. Foi observada sua expressão por fibroblastos do ligamento periodontal em todas as amostras neste experimento, sendo menos acentuada nas amostras que receberam condicionamento ácido prévio. Quando o fator de crescimento foi adicionado diretamente ao meio de cultura na ausência de amostras de dentina, houve uma tendência de inibição da expressão de Col1 α 1 com estímulo de BMP-7 e de aumento de expressão na presença de bFGF, isoladamente ou associado.

As amostras de dentina previamente submetidas ao condicionamento ácido a expressão de Col1 α 1 não foi significativamente influenciada pela aplicação tópica de fatores de crescimento, porém em amostras de dentina não condicionadas previamente nota-se uma tendência (não significativa estatisticamente) de aumento da expressão deste gene na presença de bFGF associado ou não a BMP-7. Estes resultados são sugestivos de que o condicionamento ácido pode favorecer a adsorção e/ou a atividade dos fatores de crescimento. Esta interpretação é suportada pelos achados dos ensaios ELISA, que demonstraram que o condicionamento ácido favorece a liberação dos fatores de crescimento, especialmente de bFGF.

A expressão dos genes fibronectina, a qual é responsável pela aderência de células à matriz extracelular, e Runx2, relacionado com a

diferenciação osteoblástica, não foram marcadamente influenciadas em nenhuma das condições experimentais avaliadas.

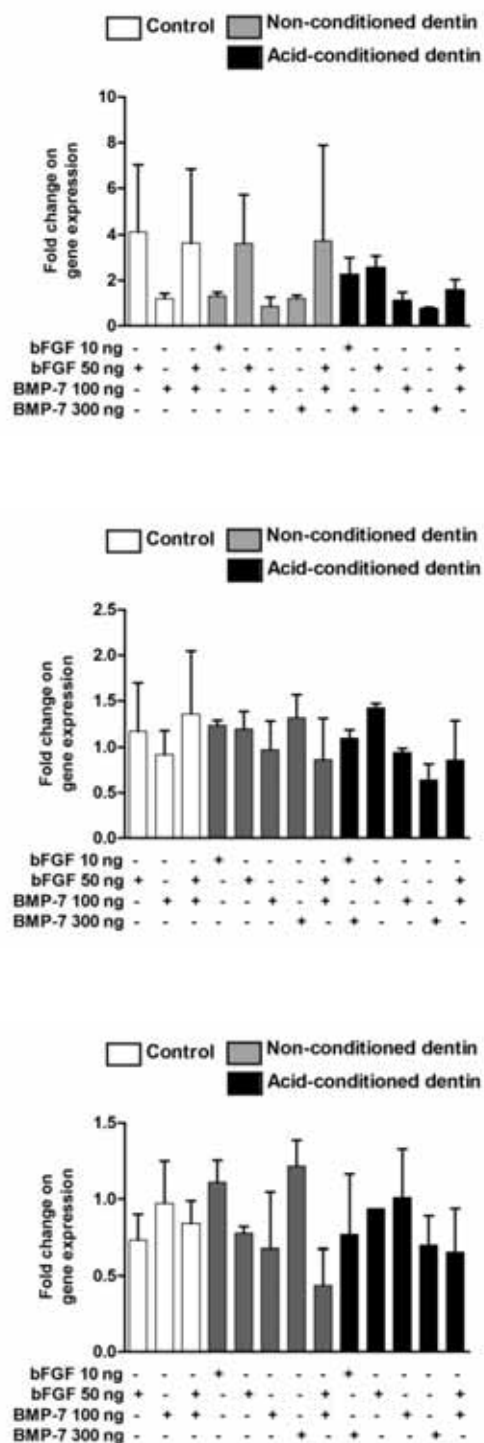


FIGURA 20 - Modulação da expressão gênica (RNAm) de Col1a1, Fn e

Runx2, em células do ligamento periodontal de camundongo (mPDL) após estímulo com bFGF e BMP-7, isoladamente e combinados, nas doses indicadas. 24 horas após o estímulo, o RNA total foi coletado e utilizado na síntese de cDNA, o qual foi utilizado em reação de qPCR utilizando conjuntos de primers e sondas para os genes-alvo pré-otimizados (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Os resultados foram avaliados pelo método $\Delta(\Delta C_t)$, e as barras indicam os resultados da expressão gênica relativa utilizando a expressão do gene constitutivo GAPDH para normalização dos resultados. Resultados representativos de um pool de RNA de dois experimentos independentes.

Cementoblastos (OCCM)

Os cementoblastos apresentam um perfil fenotípico mais próximo de osteoblastos do que as células do ligamento periodontal. É bastante sutil a distinção entre cementoblastos e osteoblastos, no entanto, a modulação dos genes-alvo nas condições experimentais deste estudo foi bastante distinta da observada para as células do estroma ósseo.

De forma bastante similar ao observado para os fibroblastos, o estímulo direto das células com os fatores de crescimento resultou em indução da expressão de Col1 α 1 por bFGF (associado ou não a BMP-7) e inibição da expressão com BMP-7. O cultivo destas células sobre amostras de dentina com ou sem condicionamento prévio resultou, em geral, em marcante inibição expressão de Col1 α 1, porém foi mantido o perfil de resposta aos fatores de crescimento: maior inibição da expressão gênica com BMP-7 e manutenção ou discreto aumento da expressão com bFGF, associado ou não a BMP-7.

A expressão de fibronectina foi discretamente aumentada com o estímulo de bFGF ou BMP-7 diretamente acrescentados ao meio de cultura, na ausência de amostras de dentina. O cultivo das células sobre amostras de dentina com ou sem condicionamento ácido prévio resultou em discreta redução da expressão gênica, a qual não foi influenciada pelos fatores de crescimento aplicados topicamente. A expressão de Runx2 não foi influenciada pelos fatores de crescimento adicionados diretamente ao meio de cultura ou quando aplicados diretamente sobre amostras de dentina, exceto por uma discreta tendência de redução da expressão com a aplicação de bFGF ou BMP-7 isoladamente em amostras de dentina não condicionada.

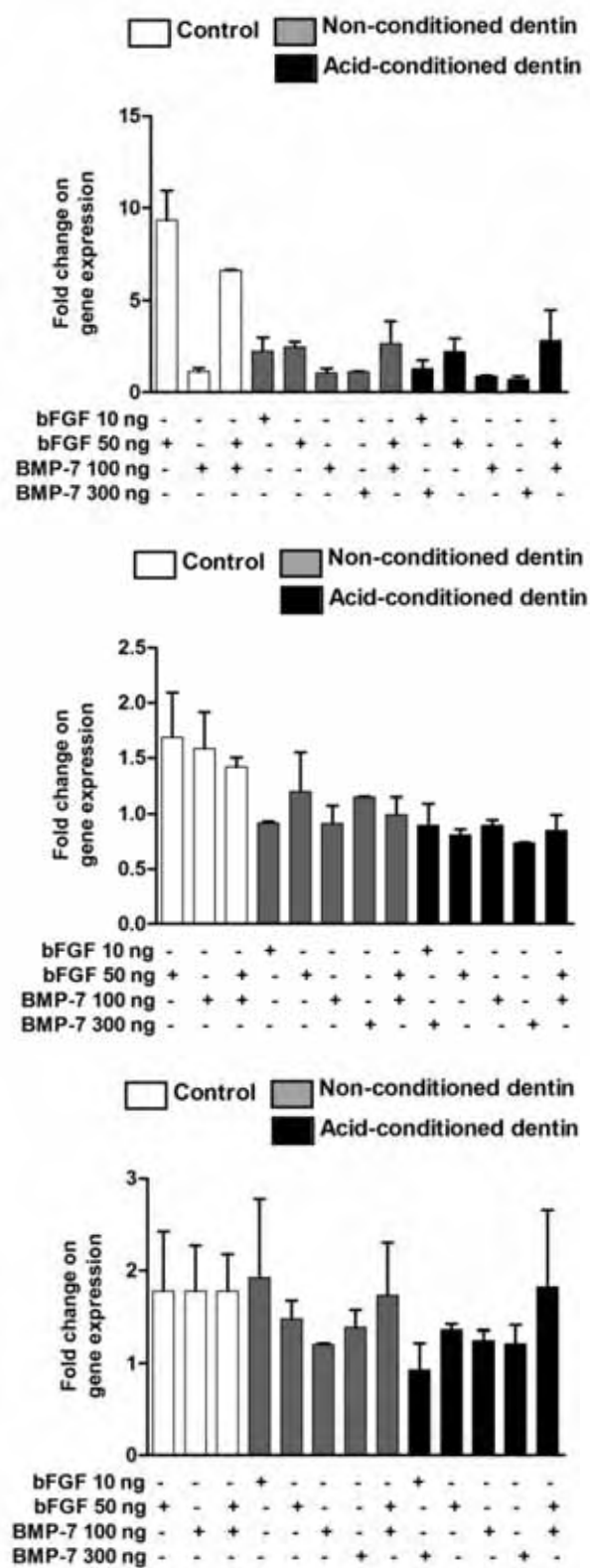


FIGURA 21 - Modulação da expressão gênica (RNAm) de Col1 α 1, Fn e

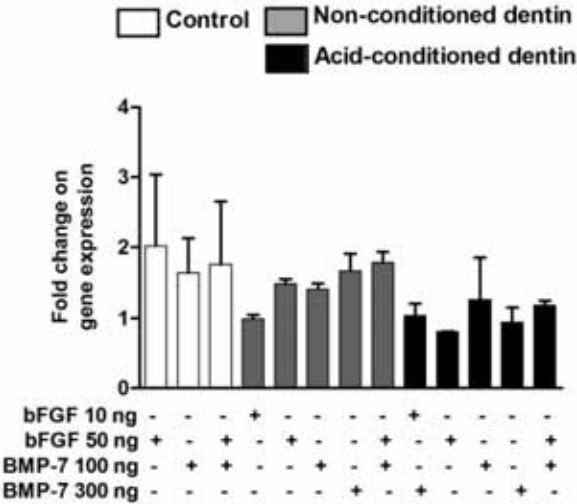
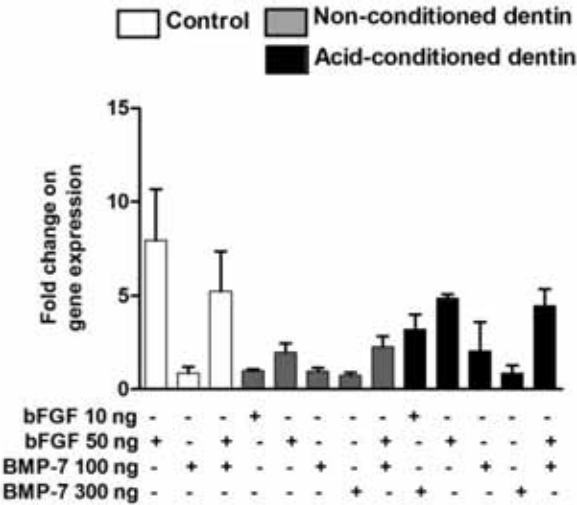
Runx2 em cementoblastos de camundongo (OCCM) após estímulo com bFGF e BMP-7, isoladamente e combinados, nas doses indicadas. 24 horas após o estímulo, o RNA total foi coletado e utilizado na síntese de cDNA, o qual foi utilizado em reação de qPCR utilizando conjuntos de primers e sondas para os genes-alvo pré-otimizados (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Os resultados foram avaliados pelo método $\Delta(\Delta Ct)$. As barras indicam os resultados da expressão gênica relativa utilizando a expressão do gene constitutivo GAPDH para normalização dos resultados. Resultados representativos de um pool de RNA de dois experimentos independentes.

Células do estroma ósseo (UAMS32)

Esta linhagem celular representa uma mistura de osteoblastos e alguns poucos fibroblastos em diversos estágios de diferenciação. Na ausência de amostras de dentina, o estímulo com bFGF, associado ou não a BMP-7, aumentou a expressão de Col1 α 1 e Runx2, enquanto o estímulo com BMP-7 isoladamente não modulou de forma importante a expressão destes genes em comparação ao controle não estimulado. Nestas mesmas condições (cultivo sobre o plástico tratado para cultura), todos os estímulos aumentaram discretamente a expressão de Fn.

Quando cultivadas sobre amostras de dentina, observamos uma redução geral na expressão gênica de Col1 α 1 e Runx2, a qual foi menos marcante em amostras de dentina pré-condicionadas com ácido cítrico. Colágeno tipo I é um dos principais produtos de secreção de osteoblastos, e os resultados desta linhagem celular são relativamente difíceis de ser interpretados isoladamente, uma vez que estas células podem estar em

estágios variados de diferenciação. Assim, o estímulo com fatores de crescimento pode favorecer ou inibir a diferenciação celular, estimulando primariamente a proliferação celular ou a expressão de genes da matriz extracelular, respectivamente.



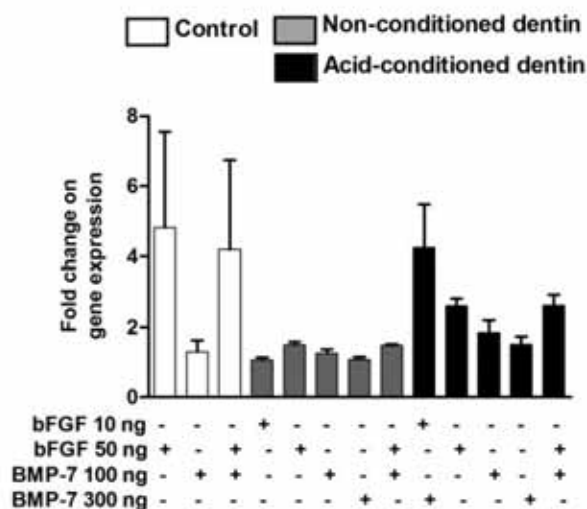


FIGURA 22 - Modulação da expressão gênica (RNA_m) de Col1α1, Fn e Runx2 em células do estroma ósseo de camundongo (UAMS32) após estímulo com bFGF e BMP-7, isoladamente e combinados, nas doses indicadas. 24 horas após o estímulo, o RNA total foi coletado e utilizado na síntese de cDNA, o qual foi utilizado em reação de qPCR utilizando conjuntos de primers e sondas para os genes-alvo pré-otimizados (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Os resultados foram avaliados pelo método $\Delta(\Delta C_t)$, e as barras indicam os resultados da expressão gênica relativa utilizando a expressão do gene constitutivo GAPDH para normalização dos resultados. Resultados representativos de um pool de RNA de dois experimentos independentes.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Tanto o condicionamento ácido radicular quanto a utilização de fatores de crescimento estão entre as modalidades terapêuticas que tem sido estudadas com objetivo de se obter a regeneração dos tecidos do periodonto, os quais são perdidos em consequência da doença periodontal. Também tem sido proposta a combinação dessas duas terapias com o intuito de potencializar o efeito de ambas^{4, 18, 55}, e este estudo teve como objetivo avaliar in vitro o efeito do condicionamento ácido da dentina na liberação de bFGF e BMP-7 aplicados topicamente de forma isolada ou associados. Também foi avaliada a influência de tais tratamentos sobre a expressão de genes-alvo relacionados ao metabolismo de tecido conjuntivo mineralizado e não mineralizado em três tipos celulares relevantes para o processo regenerativo no microambiente periodontal.

Diversos estudos já avaliaram os efeitos dos fatores de crescimento sobre as características e o metabolismo de células que participam do processo regenerativo^{56, 59, 61, 63}. Isso se deve ao próprio efeito que os fatores de crescimento exercem sobre a fisiologia celular, considerando as diversas funções celulares que são ativadas e/ou reguladas em presença destes⁴⁴. De acordo com os resultados obtidos por este estudo, podemos também observar que o acréscimo de fatores de crescimento, por si só, já é capaz de induzir diferenças no perfil de expressão de alguns genes por

estas células, sendo estas diferenças variáveis conforme o tipo celular e o gene-alvo avaliado.

A expressão de RNAm dos genes-alvo pelas células avaliadas neste estudo foi, em geral, modulada pelos fatores de crescimento utilizados, como pode ser visto observando-se as expressões gênicas encontradas nas amostras do controle positivo, ou seja, coletadas dos poços sem os espécimes de dentina, que foram estimuladas com os fatores de crescimento acrescentados diretamente ao meio de cultura, demonstrando a bioatividade dos fatores de crescimento de origem recombinante humana em células de camundongo. Os resultados mostram indução marcante da expressão de quase todos os genes-alvo, exceto em algumas situações em que os fatores de crescimento foram utilizados de forma isolada, em particular com BMP-7.

Em geral, os resultados indicam que bFGF teve efeito anabólico, induzindo a expressão gênica e, conseqüentemente, modulando a diferenciação celular; enquanto BMP-7 não teve efeito anabólico mas também não impediu o efeito do bFGF. Ou seja, embora não tenha sido observado efeito sinérgico entre bFGF e BMP-7, não parece, de acordo com nossos resultados, haver um efeito antagônico entre estes dois fatores de crescimento.

Muitos tipos celulares participam do processo de regeneração periodontal e assim, muitos mediadores biológicos, incluindo vários fatores de crescimento, podem ter papel relevante neste processo havendo, no

entanto, diversos aspectos que podem interferir na função biológica destes quando se pensa em usá-los terapeuticamente, em especial no seu uso associado. Assim como a concentração dos fatores de crescimento a serem combinados, também a própria compatibilidade química entre eles pode fazê-los atuar tanto de forma simultânea e cooperativa entre si quanto de forma divergente ou antagônica. Apesar de alguns estudos mostrarem eficácia da associação de alguns fatores de crescimento^{21, 25, 35}, outros verificaram que não houve ação sinérgica no processo regenerativo quando associados BMP-2 a BMP-7⁴⁸, por exemplo, ou mesmo que houve um efeito antagônico em fibroblastos do ligamento periodontal em consequência do uso combinado de bFGF e TGF- β ⁵⁶.

Um estudo recente relata os efeitos, *in vitro*, do estímulo com BMP-7 em cementoblastos. Após 72 horas, foi avaliada a expressão de genes relevantes no processo de mineralização. Foram encontrados aumentos significativos nas expressões de Runx2, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea²³. Em nosso estudo, não encontramos diferenças na expressão de Runx2 pelos cementoblastos após estímulo com BMP-7 (100 e 300 ng/ml) isoladamente ou associado a bFGF. No entanto, o tempo decorrido após a aplicação de BMP-7 em neste estudo foi de 24 horas, o que impossibilita uma comparação direta com os achados de Hakki et al.²³, e levanta ainda a possibilidade de que poderia ter sido observado efeito significativo com um maior tempo de incubação. Outros fatores, como a

concentração diferente utilizada de BMP-7, podem ter levado a tais diferenças encontradas.

Além da ação direta dos fatores de crescimento sobre as células, a qual pode ser variável conforme o tipo de célula estimulado, a própria condição celular e o ambiente em que estas se encontram poderiam interferir na resposta celular aos diferentes tratamentos. Algumas diferenças nas expressões gênicas encontradas em nossos resultados poderiam ser atribuídas a diferenças nos substratos sobre os quais as células foram cultivadas.

A presença de um substrato ou superfície pode alterar o comportamento da célula e sua atividade, como constatado por Kim et al., que tentaram induzir a mineralização de cementoblastos por meio da utilização de um substrato de dentina, considerando a hipótese de que a dentina teria um papel importante na formação de novo cimento. Os autores relatam um aspecto morfológico de mineralização mais evidente, indicando que esta foi mais acelerada, além de elevados níveis de expressão de alguns genes que indicam o processo de mineralização (sialoproteína óssea, fosfatase alcalina e osteocalcina) por parte das células que foram tratadas com um meio de condicionamento de odontoblastos e com extrato de proteínas de dentina, atuando este como estímulo à mineralização da dentina²⁹.

Podem ser vistas também em nossos resultados algumas diferenças de expressão de RNAm pelos tipos celulares avaliados para quase todos

os genes quando as células encontravam-se sobre o substrato de dentina com aplicação tópica dos fatores de crescimento bFGF e BMP-7, isolados ou associados. Não houve, porém, influência marcante do substrato (plástico tratado para cultura, dentina com ou sem condicionamento ácido) na expressão constitutiva (não estimulada) de nenhum dos genes-alvo, exceto por discreto aumento na expressão de Fn por células do estroma ósseo cultivadas sobre dentina não condicionada.

A condição da superfície do substrato de dentina é outro fator que pode exercer interferência direta no processo regenerativo pois, uma vez que esta superfície deverá ser repovoada adequadamente pelos tipos celulares responsáveis pela regeneração, é necessário que haja condições favoráveis à aderência celular e que também tal condição influencie de forma positiva a expressão gênica relacionada à neoformação dos tecidos de interesse. Muitos estudos sugerem que a modificação desta superfície por meio de condicionamento ácido radicular com diversas substâncias causa alterações que favorecem a exposição de fibras colágenas, adesão de células sanguíneas, entre outras, tornando então o meio mais propício à regeneração do periodonto^{6, 33}. Uma das possíveis vantagens do condicionamento ácido da superfície radicular é o fato de a desmineralização da dentina e a consequente exposição de fibras colágenas facilitar a adsorção dos fatores de crescimento à superfície dentinária^{18, 64, 69}.

Este favorecimento à retenção dos fatores de crescimento foi também demonstrado em nosso estudo. Os resultados do experimento para quantificar a liberação de fatores de crescimento para o meio de cultura mostram que quando não havia espécimes de dentina, foram detectadas concentrações mais altas de bFGF no meio de cultura nos períodos iniciais, com rápida redução da concentração após o período de 30 minutos. Já quando havia espécimes de dentina que não foram condicionados com ácido cítrico, o perfil de liberação mostrou-se inverso, sendo as concentrações mais altas detectadas nos períodos subseqüentes, e indicando que houve retenção dos fatores de crescimento por parte da dentina. Esta retenção foi visivelmente maior pela dentina previamente condicionada com o ácido cítrico, pois se observa maior quantidade de bFGF liberado para o meio nestas amostras, a qual foi maior desde o período inicial, sendo ainda mais alta nos períodos seguintes. As maiores concentrações de bFGF foram detectadas quando passadas 4 horas de sua aplicação, tanto em amostras de dentina condicionadas como nas não condicionadas, o que sugere que este, uma vez retido, foi sendo liberado progressivamente para o meio de cultura durante as horas seguintes à aplicação.

A liberação de BMP-7 também mostrou diferenças após o condicionamento radicular. Sem os espécimes de dentina, as maiores quantidades detectadas deste fator de crescimento, foram aos 30 e 60 minutos, diminuindo após este período, enquanto em presença de dentina

não condicionada a liberação diminuiu progressivamente. Já quando os espécimes de dentina tiveram condicionamento ácido prévio, a concentração detectada no meio aumentou a cada período avaliado, atingindo o pico de liberação 2 horas após a aplicação tópica de BMP-7. Não encontramos estudos semelhantes na literatura, impossibilitando a comparação direta destes resultados; no entanto, podemos sugerir que estes achados indicam uma maior retenção de bFGF e BMP-7 pela dentina previamente modificada pelo ácido cítrico.

É possível ainda que o condicionamento ácido prévio da dentina tenha interferido de alguma forma na modulação da expressão gênica dos tipos celulares avaliados. Notamos alguns padrões ou tendências na modulação da expressão dos genes-alvo que apresentamos em tópicos a seguir para facilitar a interpretação e discussão dos dados:

a) Sem alteração da expressão gênica após o condicionamento ácido em relação à expressão constitutiva:

- Não houve modulação importante na expressão de nenhum dos genes-alvo avaliados em fibroblastos do ligamento periodontal (mPDL);
- A expressão de fibronectina e Runx2 pelos cementoblastos (OCCM) também não foi alterada;
- A expressão de fibronectina por células do estroma ósseo (UAMS32) não foi influenciada.

b) Expressão gênica aumentada na presença de bFGF, porém não alterada com aplicação de BMP-7. Em presença do substrato de dentina a

expressão do gene-alvo foi diminuída independentemente do condicionamento ácido:

- Apenas a expressão de colágeno 1-alfa1 pelos cementoblastos seguiu este padrão.

c) Expressão gênica aumentada na presença de bFGF, e não alterada com aplicação de BMP-7, no entanto o condicionamento ácido prévio da dentina parece ter elevado os níveis de expressão do gene-alvo:

- A expressão dos genes colágeno 1-alfa1 e Runx2 pelas células do estroma ósseo seguiram este padrão.

Há relatos na literatura de diferentes alterações celulares após condicionamento radicular, como alterações morfológicas e alterações na densidade celular. Silvério et al.⁵⁵ encontraram maior densidade e adesão de fibroblastos do ligamento periodontal quando em contato com amostras de dentina que haviam sido condicionadas com EDTA 24% durante 3 minutos, após aplicação de bFGF em diferentes concentrações⁵⁵. Os mesmos autores observaram ainda alterações morfológicas nas células avaliadas por microscopia eletrônica de varredura devido à aplicação de bFGF, independentemente do condicionamento químico prévio. Alterações quimiotáticas também já foram observadas por Terranova, Wikesjö⁶⁰; após condicionamento dos espécimes de dentina com cloridrato de tetraciclina, foi observado um aumento da quimiotaxia, também em fibroblastos do ligamento periodontal⁶⁴.

Por outro lado, foi verificado por Belal et. al⁴ em 2012, o efeito da aplicação de EDTA e/ou PDGF na proliferação e adesão de mPDL a raízes de dentes humanos, sendo observado nesse estudo que o condicionamento ácido com EDTA associado à aplicação de PDGF proporcionou adesão celular mais elevada em comparação com o condicionamento químico apenas. No entanto, não houve efeito sinérgico entre o condicionamento ácido radicular e o tratamento com o fator de crescimento, pois PDGF aplicado topicamente mostrou ter efeito tanto isoladamente quanto associado ao condicionamento prévio com EDTA⁴.

Os resultados deste estudo precisam ser considerados à luz de suas limitações. No estudo da liberação dos fatores de crescimento, a detecção pelo ensaio ELISA não implica, necessariamente, que o polipeptídeo do fator de crescimento detectado encontra-se íntegro e/ou com sua atividade biológica preservada. Utilizamos linhagens celulares contínuas originárias de camundongo, as quais podem não representar exatamente o comportamento biológico de células humanas primárias. A modulação da proliferação celular pelos diferentes substratos e mediadores biológicos utilizados ainda não foi avaliada, e o fato de se tratar de linhagens celulares contínuas também exige cautela na interpretação dos resultados devido a possíveis diferenças no ciclo celular em comparação à células primárias. A avaliação da modulação da expressão dos genes-alvo apenas em nível de RNAm é outra limitação, uma vez que os níveis de RNAm detectados

podem não ser diretamente correspondentes à produção das respectivas proteínas.

A seleção dos genes-alvo avaliados neste estudo procurou incluir genes de interesse para a neoformação de tecido conjuntivo mineralizado e não mineralizado, mas não podemos especular sobre possíveis efeitos em outros genes também relevantes para os processos de reparo e regeneração. Finalmente, a modulação da expressão gênica foi avaliada em um único período de 24 h, representativo da situação de equilíbrio entre a síntese e degradação de RNAm (*“steady-state”*), porém não podemos excluir a possibilidade de efeitos marcantes na expressão dos genes-alvo terem ocorrido antes de 24 horas ou os que poderiam ter ocorrido em períodos posteriores.

Com estas limitações da abordagem experimental utilizada em perspectiva, podemos resumir os achados principais deste trabalho: fatores de crescimento aplicados topicamente sobre a dentina apresentam retenção e pico de liberação 2 horas após a aplicação; o condicionamento da dentina com ácido cítrico favoreceu a retenção dos fatores de crescimento aplicados topicamente; os três tipos celulares avaliados respondem diferentemente a uma mesma condição experimental (substrato/fator de crescimento); e a aplicação tópica dos fatores de crescimento sobre a dentina atenuou os efeitos dos mesmos fatores utilizados diretamente no meio de cultura, sendo esta atenuação menos marcante em amostras previamente condicionadas com ácido cítrico.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Considerando a metodologia utilizada e os resultados encontrados, pode-se concluir que:

- 1) bFGF foi um indutor mais potente da expressão dos genes-alvo e, portanto, teve ação anabólica mais potente do que BMP-7, nos três tipos celulares avaliados;
- 2) O condicionamento da dentina com ácido cítrico 25% durante 3 minutos aumentou de forma marcante a retenção dos fatores de crescimento aplicados topicamente;
- 3) A modulação dos genes-alvo em resposta à aplicação tópica de bFGF e BMP-7, isolados ou em associação, foi variável segundo o tipo celular considerado;
- 4) Sobre os diferentes substratos sobre os quais foram cultivadas as células, com ou sem o condicionamento ácido prévio, não houve influência marcante na expressão dos genes-alvo considerados.

Referências

8 REFERÊNCIAS*

1. Abi Rached AD. Remoção de smear layer de superfícies radiculares utilizando diferentes concentrações, modos e tempo de aplicação de cloridrato de tetraciclina. Análise por meio de microscopia eletrônica de varredura [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2003.
2. Al-Hamdan K, Eber R, Sarment D, Kowalski C, Wang HL. Guided tissue regeneration-based root coverage: meta-analysis. J Periodontol. 2003; 74: 1520-33.
3. Baker DL, Stanley Pavlow SA, Wikesjo UM. Fibrin clot adhesion to dentin conditioned with protein constructs: an in vitro proof-of-principle study. J Clin Periodontol. 2005; 32: 561-6.
4. Belal MH, Watanabe H, Ichinose S, Ishikawa I. Effect of PDGF-BB combined with EDTA gel on adhesion and proliferation to the root surface. Odontology. 2012 Jan 17. [Epub of print]
5. Blomlof J, Lindskog S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. J Clin Periodontol. 1995; 22: 464-8.
6. Blomlof L, Jonsson B, Blomlof J, Lindskog S. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. II. Surgical periodontal treatment. Int J Periodontics Restorative Dent. 2000; 20: 566-73.
7. Blumenthal NM, Koh-Kunst G, Alves ME, Miranda D, Sorensen RG, Wozney JM, et al. Effect of surgical implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a bioabsorbable collagen sponge or calcium phosphate putty carrier in intrabony periodontal defects in the baboon. J Periodontol. 2002; 73: 1494-506.
8. Bosshardt DD, Sculean A. Does periodontal tissue regeneration really work? Periodontol 2000. 2009; 51: 208-19.

*De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível em http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

9. Bozic D, Grgurevic L, Erjavec I, Brkljacic J, Orlic I, Razdorov G, et al. The proteome and gene expression profile of cementoblastic cells treated by bone morphogenetic protein-7 in vitro. *J Clin Periodontol*. 2012; 39: 80-90.
10. Carvalho Batista LH, Cezar Sampaio JE, Pilatti GL, Shibli JA. Efficacy of EDTA-T gel for smear layer removal at root surfaces. *Quintessence Int*. 2005; 36: 551-8.
11. Cavassim R. Avaliação in vitro de diferentes concentrações, tempos e modos de aplicação de ácido cítrico na biomodificação radicular. Análise por meio de microscopia eletrônica de varredura [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.
12. Chaves E, Cox CF, Morrison E, Caffesse R. The effect of citric acid application on periodontally involved root surfaces. II. An in vitro scanning electron microscopic study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1993; 13: 188-96.
13. Choi SH, Kim CK, Cho KS, Huh JS, Sorensen RG, Wozney JM, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs. *J Periodontol*. 2002; 73: 63-72.
14. Claffey N, Bogle G, Bjorvatn K, Selvig KA, Egelberg J. Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles. *Acta Odontol Scand*. 1987; 45: 141-6.
15. D'Errico JA, Ouyang H, Berry JE, MacNeil RL, Strayhorn C, Imperiale MJ, et al. Immortalized cementoblasts and periodontal ligament cells in culture. *Bone*. 1999; 25: 39-47.
16. Daly CG. Anti-bacterial effect of citric acid treatment of periodontally diseased root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol*. 1982; 9: 386-92.
17. Dantas AAR. Efeito do condicionamento radicular com diferentes agentes para a adesão de plasma rico em plaquetas e células sangüíneas. Estudo in vitro [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

18. Gamal AY, Mailhot JM, Garnick JJ, Newhouse R, Sharawy MM. Human periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCl conditioned root surfaces. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 404-12.
19. Gamradt SC, Lieberman JR. Genetic modification of stem cells to enhance bone repair. *Ann Biomed Eng*. 2004; 32: 136-47.
20. Giannobile WV, Ryan S, Shih MS, Su DL, Kaplan PL, Chan TC. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *J Periodontol*. 1998; 69: 129-37.
21. Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontal Res*. 1996; 31: 301-12.
22. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13: 474-84.
23. Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki EE. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *J Trace Elem Med Biol*. 2010; 24: 243-50.
24. Hara R, Wato M, Tanaka A. Marker of cemento-periodontal ligament junction associated with periodontal regeneration. *J Periodontal Res*. 2005; 40: 231-8.
25. Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol*. 1997; 68: 1186-93.
26. Hujoel PP, Leroux BG, Selipsky H, White BA. Non-surgical periodontal therapy and tooth loss. A cohort study. *J Periodontol*. 2000; 71: 736-42.

27. Ishi EP, Dantas AA, Batista LH, Onofre MA, Sampaio JE. Smear layer removal and collagen fiber exposure using tetracycline hydrochloride conditioning. *J Contemp Dent Pract.* 2008; 9: 25-33.
28. Kao RT, Murakami S, Beirne OR. The use of biologic mediators and tissue engineering in dentistry. *Periodontol 2000.* 2009; 50: 127-53.
29. Kim HS, Lee DS, Lee JH, Kang MS, Lee NR, Kim HJ, et al. The effect of odontoblast conditioned media and dentin non-collagenous proteins on the differentiation and mineralization of cementoblasts in vitro. *Arch Oral Biol.* 2009; 54: 71-9.
30. Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, Fujii T, Shimauchi H, Sasano T, et al. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS One.* 2008; 3: e 2611.
31. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alecio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25: 533-43.
32. Lee J, Stavropoulos A, Susin C, Wikesjö UM. Periodontal regeneration: focus on growth and differentiation factors. *Dent Clin North Am.* 2010; 54: 93-111.
33. Leite FR, Moreira CS, Theodoro LH, Sampaio JE. Blood cell attachment to root surfaces treated with EDTA gel. *Braz Oral Res.* 2005; 19: 88-92.
34. Lin NH, Menicanin D, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM. Putative stem cells in regenerating human periodontium. *J Periodontal Res.* 2008; 43: 514-23.
35. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol.* 1989; 16: 545-8.
36. MacNeil RL, D'Errico JA, Ouyang H, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ. Isolation of murine cementoblasts: unique cells or uniquely-positioned osteoblasts? *Eur J Oral Sci.* 1998; 106 (Suppl 1): 350-6.

37. Mariotti A. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003; 8: 205-26.
38. Melcher AH, McCulloch CA, Cheong T, Nemeth E, Shiga A. Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo. *J Periodontal Res.* 1987; 22: 246-7.
39. Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res.* 2003; 38: 97-103.
40. Nagata MJ, Bosco AF, Leite CM, Melo LG, Sundfeld ML. Healing of dehiscence defects following root surface demineralization with tetracycline: a histologic study in monkeys. *J Periodontol.* 2005; 76: 908-14.
41. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol.* 1993; 64: 142-8.
42. Polson AM, Proye MP. Effect of root surface alterations on periodontal healing. II. Citric acid treatment of the denuded root. *J Clin Periodontol.* 1982; 9: 441-54.
43. Polson AM, Frederick GT, Ladenheim S, Hanes PJ. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol.* 1984; 55: 443-6.
44. Raja S, Byakod G, Pudakalkatti P. Growth factors in periodontal regeneration. *Int J Dent Hyg.* 2009; 7: 82-9.
45. Rathe F, Junker R, Chesnutt BM, Jansen JA. The effect of enamel matrix derivative (Emdogain) on bone formation: a systematic review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009; 15: 215-24.
46. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. II. Defect repair. *J Periodontol.* 1976; 47: 497-505.

47. Ripamonti U, Heliotis M, Rueger DC, Sampath TK. Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hop-1/bmp-7) in the baboon (*Papio ursinus*). *Arch Oral Biol.* 1996; 41: 121-6.
48. Ripamonti U, Crooks J, Petit JC, Rueger DC. Periodontal tissue regeneration by combined applications of recombinant human osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-2. A pilot study in Chacma baboons (*Papio ursinus*). *Eur J Oral Sci.* 2001; 109: 241-8.
49. Rossa C, Jr., Marcantonio E, Jr., Cirelli JA, Marcantonio RA, Spolidorio LC, Fogo JC. 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.* 2000; 71: 775-84.
50. Sampaio LM. Eficiência do cloridrato de tetraciclina na remoção da "smear layer" após instrumentação radicular; em diferentes concentrações, tempos e modos de aplicação. Análise através de microscopia eletrônica de varredura [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1998.
51. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol 2000.* 2000; 24: 73-98.
52. Sculean A, Donos N, Brex M, Karring T, Reich E. Healing of fenestration-type defects following treatment with guided tissue regeneration or enamel matrix proteins. An experimental study in monkeys. *Clin Oral Investig.* 2000; 4: 50-6.
53. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364:149-55.
54. Shen B, Wei A, Whittaker S, Williams LA, Tao H, Ma DD, et al. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *J Cell Biochem.* 2010; 109: 406-16.

55. Silverio KG, Martinez AE, Rossa C, Jr. Effects of basic fibroblast growth factor on density and morphology of fibroblasts grown on root surfaces with or without conditioning with tetracycline or EDTA. *J Oral Sci.* 2007; 49: 213-20.
56. Silverio-Ruiz KG, Martinez AE, Garlet GP, Barbosa CF, Silva JS, Cicarelli RM, et al. Opposite effects of bFGF and TGF-beta on collagen metabolism by human periodontal ligament fibroblasts. *Cytokine.* 2007; 39: 130-7.
57. Sorensen RG, Wikesjo UM, Kinoshita A, Wozney JM. Periodontal repair in dogs: evaluation of a bioresorbable calcium phosphate cement (Ceredex) as a carrier for rhBMP-2. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 796-804.
58. Sousa CP. Estudo in vitro da eficácia do gel de EDTA 24% na remoção de "smear layer" e exposição de fibras colágenas da superfície radicular [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2004.
59. Takayama S, Murakami S, Nozaki T, Ikezawa K, Miki Y, Asano T, et al. Expression of receptors for basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 1998; 33: 315-22.
60. Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H. Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res.* 2001; 80: 2075-9.
61. Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 1997; 32: 667-75.
62. Terranova VP, Wikesjo UM. Chemotaxis of cells isolated from periodontal tissues to different biological response modifiers. *Adv Dent Res.* 1988; 2: 215-22.

63. Terranova VP, Odziemiec C, Tweden KS, Spadone DP. Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. Effect of basic fibroblast growth factor. *J Periodontol.* 1989; 60: 293-301.
64. Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, DiFlorio RM, Lyall RM, Wikesjo UM, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodontal Res.* 1986; 21: 330-7.
65. Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Adriaens P, Dubravec D, et al. Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 317-25.
66. Wang JJ, Ye F, Cheng LJ, Shi YJ, Bao J, Sun HQ, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells promoted by overexpression of connective tissue growth factor. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009; 10: 355-67.
67. Wikesjo UM, Bogle GC, Nilveus RE. Periodontal repair in dogs: effect of a composite graft protocol on healing in supraalveolar periodontal defects. *J Periodontol.* 1992; 63: 107-13.
68. Wikesjo UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, Cho KS, Trombelli L, Selvig KA, et al. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 392-400.
69. Wikesjo UM, Xiropaidis AV, Thomson RC, Cook AD, Selvig KA, Hardwick WR. Periodontal repair in dogs: space-providing ePTFE devices increase rhBMP-2/ACS-induced bone formation. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 715-25.
70. Wikesjo UM, Claffey N, Christersson LA, Franzetti LC, Genco RJ, Terranova VP, et al. Repair of periodontal furcation defects in beagle dogs following reconstructive surgery including root surface demineralization with tetracycline hydrochloride and topical fibronectin application. *J Clin Periodontol.* 1988; 15: 73-80.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 27 de março de 2012.

FERNANDA REGINA GODOY ROCHA