



KARINA GONZALES SILVÉRIO

**O efeito do fator de crescimento de fibroblastos
básico aplicado em superfícies radiculares
condicionadas com cloridrato de tetraciclina ou
EDTA na morfologia e densidade de fibroblastos.
Estudo *in vitro***

ARARAQUARA
2002



KARINA GONZALES SILVÉRIO

O efeito do fator de crescimento de fibroblastos básico aplicado em superfícies radiculares condicionadas com cloridrato de tetraciclina ou EDTA na morfologia e densidade de fibroblastos. Estudo *in vitro*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, do Campus de Araraquara, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Periodontia).

Orientador: Prof. Dr. *Carlos Rossa Junior*

ARARAQUARA
2002

Silvério, Karina Gonzales

O efeito do fator de crescimento de fibroblastos básico aplicado em superfícies radiculares com cloridrato de tetraciclina ou EDTA na morfologia e densidade de fibroblastos. Estudo *in vitro*. / Karina Gonzales Silvério. – Araraquara: [s.n.], 2002.

83 f. ; 30 cm

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

1. Regeneração tecidual guiada 2. Fator de crescimento de fibroblastos 3. Fibroblastos I.Título.

À *DEUS*, pela oportunidade de estar alcançando mais um objetivo de vida, aprendendo através da minha existência, os seus ensinamentos de fé, amor e misericórdia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, *Devair e Mercedes* pela constante demonstração de carinho, amor, compreensão e apoio durante toda a minha vida. Vocês juntamente com o meu irmão *Adriano* constituem a família que sempre me incentivaram a conquistar os meus ideais.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimentos Especiais

Ao *Prof. Dr. Carlos Rossa Junior*, pela dedicação como orientador deste trabalho, estando sempre disponível a me ajudar de maneira compreensiva e paciente. Agradeço ao constante incentivo à pesquisa e espero ser merecedora de todos os ensinamentos transmitidos por você.

Ao *Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio*, responsável pelo meu interesse em Periodontia e pela oportunidade de realizar o meu primeiro trabalho de pesquisa nesta disciplina, abrindo as portas para que eu chegasse até aqui.

À *Prof^a Dr^a Eleny Balducci Roslindo*, minha amiga, incentivadora e responsável pelo meu interesse em pesquisa. Um exemplo de conduta profissional, científica e humana. Muito obrigado por tudo que você tem feito por mim.

À amiga *Esmeralda*, pela ajuda neste e em outros trabalhos. Obrigado pela convivência, confiança e amizade.

Ao amigo *Rodrigo*, por estar sempre disposto a me ajudar nos momentos em que precisei.

Ao *Prof. Dr. Benedicto Egbert Corrêa de Toledo*, pela confiança e estímulo antes e durante o mestrado.

Agradecimentos

Ao meu namorado *José Cláudio*, por compreender os meus objetivos profissionais, aceitando os meus momentos de ausência.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas de seu Diretor, *Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi –Rached*, e Vice-Diretor, *Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard*.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação – Área de Periodontia, *Profª Drª Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio*, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação, pela formação e exemplo.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia, *Prof. Dr. Benedicto Egbert Corrêa de Toledo*, *Prof. Dr. Ricardo Samih georges Abi-Rached*, *Prof. Dr. Élcio Marcantonio Junior*, *Profª Drª Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio*, *Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio*, *Profª Drª Silvana Regina Perez Orrico*, *Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli* e *Prof. Dr. Carlos Rossa Junior*, pelos ensinamentos durante toda a minha formação nesta Faculdade.

À todos os colegas de Pós-graduação, principalmente, os da turma de Periodontia, *Rodrigo*, *Esmeralda*, *Celso*, *Marinella*, *Rogério*, *Ciliciane*, *Cristiane*, *José Marcos*, *Ana Carolina* e *Luiz Henrique*, pelo convívio e aprendizado.

Aos colegas *Roberto, Robertson e Valéria*, pelo convívio quando ainda faziam mestrado, sempre apoiando e colaborando para que esse momento fosse possível.

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

À amiga *Regina Lúcia*, por todos os favores e em especial, pela força e pelos conselhos nos momentos de dúvida.

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

Ao *Sr. Sebastião Anésio Dametto*, pela competente ajuda na tramitação laboratorial da microscopia eletrônica de varredura e cordialidade em que sempre me recebeu.

Ao *Luis Rocatelli*, o meu agradecimento pela cuidadosa e eficiente revelação das fotos da tese.

Ao *Prof. José Carlos Fogo*, Departamento de Estatística (Des) da UFSCar, pela criteriosa análise estatística.

À *CAPEL*, pelo auxílio financeiro.

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

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
REVISÃO DA LITERATURA.....	17
PROPOSIÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODO.....	27
RESULTADO.....	37
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÃO.....	62
ANEXOS.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
RESUMO.....	80
ABSTRACT.....	82

1.INTRODUÇÃO

A regeneração do periodonto de inserção perdido em decorrência da doença periodontal é um processo muito complexo, particularmente devido às características anatômicas, com participação de uma superfície mineralizada avascular (a superfície radicular) e à posição transgengival do dente, sob influência do meio bucal (Amar & Chung, 1994). Além disso, há necessidade da participação de um grande número de tipos celulares, incluindo células epiteliais, osteoblastos, cementoblastos, células do ligamento periodontal e fibroblastos do tecido gengival (Callens, 1996).

Esta complexidade se reflete nos resultados pouco significativos e imprevisíveis obtidos com as diferentes técnicas ou terapias regenerativas (Blom et al., 1992). Dentre estas, encontramos os retalhos reposicionados (Ellegaard et al., 1974), agentes para condicionamento da superfície radicular (Garrett et al., 1978), materiais osteocondutores (Barnett et al., 1989), materiais osteoindutores ou osteogênicos (Quintero et al., 1982) e a regeneração tecidual guiada (Nyman et al., 1982; Gottlow, 1984).

Atualmente, a tentativa de compreensão dos eventos biológicos relacionados à regeneração periodontal tem sido o ponto chave para alcançar o sucesso com estas terapias. Até o momento, sabe-se que o processo de cicatrização de feridas periodontais requer o recrutamento (migração) de células do tecido conjuntivo

do ligamento periodontal para o sítio, proliferação destas células e síntese de componentes do tecido conjuntivo (Melcher, 1976; Nyman et al., 1980; Bartold et al., 1996).

Este processo descrito anteriormente é coordenado por mediadores originados das próprias células envolvidas na coagulação ou inflamação tais como, plaquetas, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e fibroblastos. Devido ao envolvimento de uma grande variedade de células neste processo, uma complexa interação entre estas é mediada pela liberação local de citocinas (Bartold et al., 1996).

Um dos tipos de citocina que vem sendo pesquisado com bastante intensidade nos últimos anos são os fatores de crescimento. Estes são modificadores da resposta biológica, de natureza polipeptídica, produzidos por diversos tipos de células e com capacidade para influenciar a quimiotaxia, proliferação e função secretora tanto de maneira autócrina, estimulando a mesma célula responsável pela sua síntese, quanto de maneira parácrina, afetando outras células nas proximidades da célula responsável por sua síntese (Terranova et al., 1989; Graves & Cochran, 1994), podendo ainda serem produzidos em determinado órgão ou tecido e posteriormente secretados na corrente sanguínea, agindo como hormônios endócrinos (Blom et al., 1992).

Os fatores de crescimento de fibroblastos básico (b-FGF) e ácido (a-FGF) estão entre as substâncias com potencial para estimular a regeneração periodontal, tendo sido avaliados tanto por estudos *in vivo* (Miki et al., 1994,1996; Murakami et

al., 1999; Rossa Jr et al., 2000), quanto *in vitro* (Terranova & Wiskejö, 1988; Terranova et al., 1989, 1993; Takayama et al., 1997,1998). Estes foram identificados por volta de 1940, quando substâncias extraídas do tecido encefálico humano estimularam a proliferação de fibroblastos em cultura (Thomaz & Gimenez-Gallego, 1987).

Atualmente, sabe-se que as duas formas do FGF são encontrados em diversos tecidos (por exemplo, conjuntivo e ósseo), unindo-se aos mesmos receptores, atuando como quimiotáticos e coordenando a mitose de células endoteliais e de uma variedade de células mesenquimais incluindo, fibroblastos, osteoblastos, condrócitos e células musculares lisas (Callens, 1996). Entretanto, o b-FGF tem demonstrado ser 30 a 100 vezes mais quimiotático comparado ao a-FGF (Thomaz & Gimenez-Gallego, 1987).

O fato de alguns estudos (Takayama et al., 1997, 1998; Shimazu et al., 1999; Murakami et al., 1999) terem identificado a expressão de receptores (FGFR-1 e FGFR-2) específicos para o b-FGF nas células do ligamento periodontal, parece justificar a utilização desta substância na terapia regenerativa periodontal.

Além disso, Gao et al. (1996) encontraram através de técnicas imunohistoquímicas a presença de b-FGF em fibroblastos e células endoteliais do ligamento periodontal, tanto no citoplasma como no núcleo e também na matriz extracelular. Estes autores supõe que o b-FGF armazenado é liberado quando o tecido sofre algum tipo de agressão, estimulando a angiogênese, a migração e

proliferação de fibroblastos, além da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos nos estágios iniciais da cicatrização.

Realmente, Terranova & Wiskejö (1988) verificaram o efeito quimiotático do b-FGF sobre células do ligamento periodontal, utilizando como substrato blocos de dentina tratados com o b-FGF. Enquanto que, Murakami et al. (1999), Miki et al. (1994, 1996) e Rossa Jr et al. (2000) aplicando modelos de estudo em animais, observaram a regeneração de tecidos mineralizado (osso alveolar e cemento radicular) e não mineralizado (ligamento periodontal) em diferentes tipos de defeitos ósseos que receberam este fator de crescimento.

Entretanto, estudos (Terranova et al, 1989; Blomlof & Lindskog, 1995; Gamal et al., 1998) têm demonstrado que a “smear layer” formada após os procedimentos de raspagem e aplainamento, diminuem a adesão destes fatores de crescimento quando aplicados nas superfícies radiculares, e que o condicionamento destas superfícies com algum agente químico desmineralizante aumentaria esta adesão.

Isto porque sugere-se que, o condicionamento químico promove uma remoção da “smear layer”, obtendo-se a abertura dos túbulos dentinários, exposição de fibras colágenas e da matriz orgânica do cemento ou dentina, tornando a superfície radicular mais adequada para a retenção dos fatores de crescimento (Blomlof, 1996), a adesão celular e a inserção de fibras colágenas (Aukil & Pettersson, 1987; Blomlof & Lindskog, 1995).

Um dos agentes químicos mais utilizados em estudos regenerativos (Baker et al., 1983; Terranova et al., 1986; Lafferty et al., 1993), inclusive com relatos de aumento da adesão dos fatores de crescimento à superfície radicular é a tetraciclina (Terranova et al., 1989; Gamal et al., 1998; Terranova et al., 1987). Este agente químico ao remover a smear layer da superfície dentinária, desmineraliza-a parcialmente, expondo fibras colágenas, favorecendo então, a união da fibronectina, uma glicoproteína da matriz extracelular que tem atividade quimiotática para fibroblastos, e estimulando, desta maneira, a adesão e a proliferação destes sobre a superfície radicular (Terranova et al., 1987). Por outro lado, o condicionamento com tetraciclina inibe a adesão de laminina e a subsequente quimiotaxia e inserção de células epiteliais (Terranova et al., 1987). Além disso, a tetraciclina tem demonstrado inibir *in vitro* a atividade da collagenase e a reabsorção óssea, e quando aderida à superfície dentinária mantém-se ativa nesta condição, sendo liberada como um composto antimicrobiano (Terranova et al., 1987; Baker et al., 1983; Wikesjo et al., 1986).

Com essa mesma finalidade, vários outros agentes químicos desmineralizantes podem ser empregados. Um deles é o EDTA, um agente quelante de pH neutro, capaz de remover a smear layer e expor as fibras colágenas, mantendo a integridade destas (Blomlof & Lindskog, 1995). Este embora ainda não tenha sido estudado, associado a algum modificador da resposta biológica, tem a capacidade de favorecer a migração, inserção e expressão fenotípica de fibroblastos responsáveis

pelo desenvolvimento de um sistema de fibras orientadas na superfície tratada (Pitaru et al., 1984; Pitaru & Melcher, 1987; Zaman et al., 2000; Babay, 2001).

Portanto, pode-se supor que o pré-condicionamento da superfície radicular com algum agente químico desmineralizante, e subsequente aplicação de modificadores da resposta biológica como os fatores de crescimento polipeptídicos tenham efeito sinérgico na regeneração do ligamento periodontal localizado na interface superfície radicular-tecido ósseo pelo acentuamento da seleção, migração e proliferação das células de inserção.

Sendo assim, a proposta do presente estudo foi avaliar o efeito do fator de crescimento de fibroblastos básico (b-FGF) aplicado em superfícies radiculares de dentes humanos envolvidos periodontalmente, condicionadas ou não com cloridrato de tetraciclina ou EDTA.

2.REVISÃO DA LITERATURA

Há cerca de 30 anos, um dos principais objetivos da terapia periodontal é promover a regeneração dos tecidos periodontais perdidos em decorrência da progressão da doença periodontal destrutiva. Visando, então, alcançar a completa neoformação de osso alveolar, cemento radicular e ligamento periodontal, várias modalidades de tratamento, incluindo a regeneração tecidual guiada (Nyman et al., 1982; Gottlow, 1984), o condicionamento químico da superfície radicular (Garrett et al., 1978) e a implantação de materiais osteoindutivos ou osteogênicos (Quintero et al., 1982), vêm sendo aplicados na prática clínica, no entanto, com resultados pouco previsíveis do ponto de vista clínico. Provavelmente, isto ocorra devido ao fato de que, enquanto os eventos histológicos relacionados com este processo têm sido extensamente estudados, pouco ainda se sabe sobre os eventos bioquímicos e celulares associados à regeneração periodontal.

Assim, alguns estudos (McCulloch & Bordin, 1991; Pitaru et al., 1994; Wiskejö et al., 1992) têm sido direcionados para uma melhor compreensão dos complexos processos ligados à regeneração periodontal e, atualmente, sabe-se que as células do ligamento periodontal exercem um papel crucial neste processo, sendo, então, fundamental a migração, inserção e proliferação deste tipo celular sobre a superfície radicular previamente exposta à doença, a fim de promover a síntese de componentes do tecido conjuntivo e a diferenciação em outros tipos celulares como

os cementoblastos e osteoblastos. Além disso, também há necessidade de migração e proliferação de células endoteliais vasculares, já que um dos eventos biológicos essenciais em qualquer processo regenerativo é a neovascularização.

Estudos relativamente recentes (Terranova & Wiskejö 1987; Terranova et al., 1991; Terranova, 1993; Callens, 1996; Giannobile et al., 1996) têm proposto a utilização de certas substâncias proteicas com estrutura e função semelhantes aos hormônios, denominadas fatores de crescimento polipeptídicos. Estes apresentam potentes ações biológicas, podendo assim, estimularem eventos celulares importantes no processo regenerativo periodontal (Terranova et al., 1991).

Alguns autores (Graves & Cochran, 1994; Terranova & Wiskejö, 1987) tem, desde então, estudado os vários fatores de crescimento *in vitro* verificando que estes são produzidos por diversos tipos celulares, podendo exercer suas funções de forma autócrina, atuando sobre a mesma célula responsável pela sua síntese, ou parácrina, quando atuam à distância sobre células próximas aos seus sítios de produção. Quanto às suas ações biológicas, a denominação de “fatores de crescimento” é imprecisa, pois são na realidade multifuncionais, estimulando além do crescimento, uma grande variedade de atividades celulares como: quimiotaxia, proliferação, diferenciação e as funções secretoras das células, podendo inibir, e não apenas estimular todas estas funções celulares (Callens, 1996).

Na verdade, estes fatores de crescimento estão relacionados tanto com o processo reparativo, sendo liberados pelas células do tecido injuriado e por células inflamatórias (Terranova et al., 1991), como com o processo de renovação celular,

exercendo um importante papel no estabelecimento e manutenção da arquitetura tecidual normal (Terranova, 1993).

Em relação especificamente ao processo regenerativo periodontal, alguns fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas - PDGF, fator de transformação de crescimento beta - TGF- β , fator de crescimento de células endoteliais - ECGF, fator de crescimento de fibroblastos básico - b-FGF e fator de crescimento derivado do ligamento periodontal - PDL-CTX) parecem ser mais relevantes influenciando este processo de maneira positiva, estimulando a quimiotaxia, funções secretoras ou ainda a proliferação das células do ligamento periodontal (Terranova e Wiskejö, 1988; Terranova et al., 1991; Terranova, 1993; Giannobile et al., 1996). Dentre estes, o b-FGF tem demonstrado bom potencial para esta finalidade, estimulando a quimiotaxia (Terranova & Wiskejö, 1988) e proliferação de células do ligamento periodontal (Terranova et al., 1989; Takayama et al., 1997, 1998) e vem sendo objeto dos estudos *in vitro* (Terranova & Wiskejö, 1988; Terranova et al., 1989; Takayama et al., 1997, 1998, Murakami et al., 1999; Palmon et al., 2000).

Segundo Thomas & Gimenez-Gallego (1987), o fator de crescimento de fibroblasto básico foi identificado em 1940, quando substâncias extraídas de tecido encefálico estimularam a proliferação de fibroblastos em cultura. Quase 60 anos depois, um estudo realizado por Gao et al. (1996) empregando métodos

imunohistoquímicos, detectou a presença deste fator de crescimento em fibroblastos, células endoteliais e matriz extracelular do ligamento periodontal.

Entretanto, apesar do b-FGF já estar presente naturalmente no ligamento periodontal, este mesmo estudo (Gao et al., 1996) mostrou que os fibroblastos de tecidos periodontais afetados pela periodontite e/ou gengivite crônica apresentam uma quantidade inferior deste fator de crescimento e possivelmente, uma reduzida capacidade reparadora. Embora ainda não se saiba a seqüência temporal dessa associação, ou seja, se a doença periodontal leva a uma diminuição da quantidade do b-FGF, ou se este já encontra-se em baixas quantidades, tornando os indivíduos mais suscetíveis às formas mais agressivas de doença periodontal destrutiva.

No entanto, justifica-se a relevância dos vários estudos *in vitro* que avaliam o efeito e também, a concentração, veículo e forma de aplicação do b-FGF em cultura primária de células do ligamento periodontal, ou até mesmo, em fibroblastos gengivais e células epiteliais gengivais, simulando uma terapia periodontal regenerativa com aplicação exógena desta substância.

Já em 1988, Terranova & Wiskejö avaliaram o efeito quimiotático de várias concentrações do b-FGF associado a outros fatores de crescimento (PDGF, TGF- β e ECGF) ou a proteínas da matriz extracelular (fibronectina e laminina) sobre as células do ligamento periodontal, fibroblastos gengivais e células epiteliais “semeadas” sobre blocos de dentina previamente condicionados ou não com

cloridrato de tetraciclina na concentração de 100mg/mL durante 5 minutos. Os autores puderam verificar que o b-FGF associado à fibronectina, ECGF, PDGF e TGF- β exerceu um efeito quimiotático mais intenso sobre as células do ligamento periodontal do que sobre os fibroblastos gengivais, e nenhum efeito quimiotático, sobre as células epiteliais. E esse efeito quimiotático era potencializado quando as amostras recebiam previamente o condicionamento químico.

Resultados semelhantes foram observados por Terranova et al. (1987, 1989), empregando a mesma metodologia, utilizando o fator de crescimento de células endoteliais (ECGF) em associação com a fibronectina, e também, empregando o b-FGF isoladamente. Entretanto, neste último estudo (Terranova et al., 1989) observaram que ao incubar os blocos de dentina com 2×10^5 células/mL de meio de cultura mais o b-FGF marcado radioativamente durante 24 horas, ocorria um estímulo da proliferação celular de maneira dose-dependente até certo ponto (50 ng b-FGF / bloco de dentina), passando a ser inversamente proporcional a doses maiores, e que o condicionamento dos blocos dentinários com cloridrato de tetraciclina na concentração de 50 mg/mL durante 5 minutos aumentava em 2,5 vezes a adsorção de b-FGF à dentina, justificando o resultado do estudo anterior (Terranova & Wiskejö, 1988).

Do mesmo modo, Takayama et al. (1997, 1998) verificaram que o b-FGF estimulava a proliferação das células do ligamento periodontal de maneira dose-dependente, sendo alcançado efeito máximo na concentração de 10 ng de b-FGF/mL.

de meio de cultura, enquanto que Terranova et al. (1989) mostraram que o máximo de proliferação celular ocorreu a 50 ng de b-FGF/ bloco de dentina. Provavelmente, vários fatores contribuíram para essa diferença de resultados dentre eles: a diferença da fonte de obtenção do b-FGF, o modo de aplicação deste, o tipo e a concentração celular utilizados e o tempo de incubação com o fator de crescimento.

No estudo de Terranova et al. (1989), o bFGF foi purificado a partir da glândula pituitária bovina e aplicado sobre blocos de dentina previamente condicionados ou não com cloridrato de tetraciclina. Com este modo de aplicação nem toda a dose de b-FGF utilizada pode ter sido adsorvida à dentina ou então, nem todo o b-FGF adsorvido pode ter sido liberado para atuar sobre as células. Já nos trabalhos de Takayama et al. (1997, 1998), o b-FGF utilizado era recombinante obtido de humano e foi colocado diretamente no meio de cultura, dentro de cada orifício das placas para cultivo celular, permitindo desta maneira, que toda a dose empregada estivesse livre para atuar sobre as células. Além disso, estes autores (Takayama et al., 1997, 1998) incubaram o b-FGF com uma maior quantidade de células (10×10^5) durante um período menor de tempo (22 horas) comparado a Terranova et al. (1989).

Por outro lado, a quantidade de receptores para o b-FGF expresso pelas células do ligamento periodontal podem também ter influenciado as diferenças encontradas entre os trabalhos acima. Como Takayama et al. (1998) e Shimazu et al. (1999) mostraram, as células do ligamento periodontal expressam dois tipos de receptores para o b-FGF, o FGFR-1 e FGFR-2, sendo que a proporção desta

expressão está diretamente ligada à capacidade/taxa proliferativa e grau de diferenciação celular. Embora tanto o trabalho de Terranova et al. (1989) quanto os estudos de Takayama et al. (1997,1998) tenham utilizado como doadores pré-molares periodontalmente saudáveis, indicados para extração por razões ortodônticas, fatores relacionados ao hospedeiro como, variações genotípicas, envolvimento sistêmico, idade e o uso de tabaco bem como, o número de “passagens” (cultivos) a partir da cultura inicial às quais as células foram submetidas até o seu uso, podem também ter influenciado a quantidade de expressão de receptores para o b-FGF e conseqüentemente, a resposta celular a esta substância.

No entanto, um aspecto importante a ser considerado quanto a relação dose de b-FGF/proliferação celular é o fato desta se comportar de maneira dose-dependente até uma certa concentração do fator de crescimento, a qual sofre variações entre os trabalhos (Terranova et al., 1989; Takayama et al., 1997,1998) como mencionado anteriormente, passando ser inversamente proporcional a doses maiores. Segundo alguns autores (Takayama et al., 1997, 1998; Murakami et al., 1999), essa observação pode estar diretamente associada ao grau de ocupação do receptores FGFR-1 e FGFR-2 já que, após todos os receptores terem sido ocupados pelo b-FGF, o fator de crescimento residual que permanece adsorvido à dentina ou no meio de cultura, pode inibir tanto a migração quanto a proliferação celular, justificando o porquê, doses maiores promovem um efeito contrário ao esperado.

Outros aspectos como, a expressão gênica para componentes da matriz extracelular foram também estudados, quando da aplicação do b-FGF em cultura

primária de células do ligamento periodontal. Em geral, os estudos (Giannobile et al., 1996; Takayama et al., 1997, 1998; Palmon et al., 2000; Murakami et al., 1999; Shimazu et al., 1999) têm relatado que o b-FGF promove uma diminuição na expressão de genes para colágeno tipo I, aumenta a expressão para a colagenase-1 e não altera para o colágeno tipo III e fibronectina. Além disso, induz também, a uma diminuição da atividade da fosfatase alcalina e conseqüentemente, a formação de nódulos mineralizados pelas células do ligamento periodontal.

Entretanto, a diminuição da atividade da fosfatase alcalina induzida pelo b-FGF parece ser reversível, já que Murakami et al. (1999) observaram a formação de nódulos mineralizados pelas células do ligamento periodontal ao substituírem um meio de cultura contendo 10 ng b-FGF/mL por outro, sem o fator.

Porém, Shimazu et al. (1999) verificaram em seu trabalho que a atividade da fosfatase alcalina nas células do ligamento periodontal não está simplesmente relacionada à presença ou não de b-FGF no meio de cultura mas sim, ao grau de diferenciação celular e conseqüentemente, à quantidade de receptores para o b-FGF expressos por estas células. Quando as células do ligamento periodontal da 5ª passagem foram incubadas com 0,03 a 3ng b-FGF/mL de meio de cultura, uma maior quantidade de receptores, FGFR-1 e FGFR-2 foram detectados pela análise de RT-PCR e conseqüentemente, uma menor atividade da fosfatase alcalina observada. O contrário ocorreu quando os autores utilizaram as mesmas concentração de b-FGF e as mesmas células, mas na 20ª passagem.

Estes dados sugerem, que este fator de crescimento pode ser fundamental na fase inicial da regeneração periodontal por constituir um importante regulador da atividade de remodelamento do colágeno tipo I no ligamento periodontal, além de ser um potente quimiotático e mitógeno para as células encontradas neste tecido.

No entanto, estes achados não podem ser considerados conclusivos, já que uma das limitações dos estudos *in vitro*, é que estes não são realizados na presença de outros fatores de crescimento, células e demais substâncias (componentes da matriz extracelular), as quais estão presentes e/ou são liberadas naturalmente na área da lesão periodontal, e que podem modular ou modificar a ação da substância testada, no caso o b-FGF (Terranova & Wiskejö, 1987; Giannobile et al., 1996).

Porém, podemos afirmar que existem motivos para grandes esperanças na utilização do b-FGF na terapia regenerativa do periodonto, embora ainda seja necessário a realização de estudos *in vitro* para avaliar o efeito deste fator de crescimento sobre cultura primária de osteoblastos originários do osso alveolar de suporte, já que a regeneração periodontal compreende também a neoformação óssea. Além disso, é importante esclarecer também, o real papel de cada um dos fatores de crescimento na regeneração periodontal, e como a função de cada um deles é orquestrada durante este processo.

3.PROPOSIÇÃO

O propósito do estudo foi avaliar através da microscopia eletrônica de varredura o efeito do fator de crescimento de fibroblastos básico (b-FGF) aplicado em superfícies radiculares previamente condicionadas com cloridrato de tetraciclina ou EDTA na morfologia e densidade de fibroblastos.

4.MATERIAL E MÉTODO

4.1 - SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Foi utilizado um total de 50 dentes anteriores extraídos de pacientes tratados na Clínica de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, segundo protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição. Para ser doador os pacientes não poderiam apresentar qualquer problema sistêmico que pudesse interferir no periodonto como, diabetes e alterações hormonais, serem fumantes, e no caso de mulheres, estas não poderiam estar grávidas ou amamentando.

Foram incluídos na amostra, somente dentes de pacientes com diagnóstico clínico compatível com periodontite crônica (Fleming et al., 1999), que apresentavam 2/3 ou mais de perda de inserção periodontal, sem função mastigatória, com ou sem presença de cálculo e que não tinham sido submetidos à raspagem e aplainamento radicular por no mínimo 3 meses prévios.

Logo após a extração, os dentes foram armazenados em solução salina estéril[◇] sob refrigeração (< 10°C) para posterior manipulação. Para o preparo inicial dos dentes, uma ranhura horizontal foi confeccionada com uma fresa tronco-cônica[◊] em alta rotação sob refrigeração contínua na altura do periodonto remanescente (Fig. 1), com o intuito de delimitar como área de trabalho apenas a região da superfície

[◇] Cloreto de sódio 0,9% - Fresenius Kabi, Campinas, SP - Brasil

[◊] KG Sorensen - FG 1342, Brasil

radicular exposta aos agentes etiológicos locais. Então, com o auxílio de uma cureta de Gracey 5-6* previamente afiada, um único operador realizou 30 movimentos de raspagem e aplainamento radicular nas porções dentárias mesiais e distais que encontravam-se em contato com a placa bacteriana/cálculo dentário com o objetivo de obter uma superfície visualmente limpa e lisa.

4.2 - PREPARO, ESTERILIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Após a raspagem e aplainamento radicular, utilizando-se um disco diamantado, as coroas dos dentes foram seccionadas 2mm apicalmente à junção cemento-esmalte (Figura1), sendo sempre irrigadas com água proveniente da seringa tríplice do equipo♦ da Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, para evitar superaquecimento das amostras. A seguir, estes foram seccionados longitudinalmente, na região média da superfície vestibular da raiz nas mesmas condições descritas anteriormente, a partir do corte da coroa até o ápice, obtendo-se duas porções: mesial e distal (Figura 1).

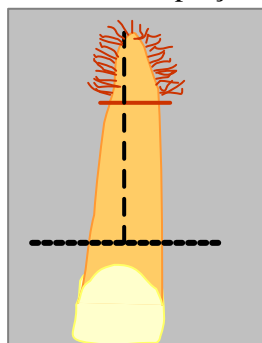


Figura 1 – Preparo das amostras

- Ranhura horizontal
- Corte 1 – Secção da coroa
- Corte 2 – Secção da raiz

* Neumar, São Paulo, SP - Brasil

♦ Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP - Brasil

Então, utilizando-se o disco diamantado, blocos de dentina localizados nas porções mesiais e distais submetidas à raspagem e aplainamento radicular foram obtidos, constituindo uma amostra de 2mm de espessura e com aproximadamente 4 mm² de superfície de área. As 90 amostras obtidas foram esterilizadas em autoclave e divididas em 3 grupos de acordo com o tratamento recebido pela superfície dentinária, sendo 30 amostras para cada grupo e 10 amostras para cada subgrupo:

Grupo A - Sem condicionamento químico (controle):

- A.1) Raspagem e aplainamento radicular (RAR)
- A.2) RAR + aplicação de 50 µg/mL de b-FGF
- A.3) RAR + aplicação de 125 µg/mL de b-FGF

Grupo B - Condicionamento com cloridrato de tetraciclina:

- B.1) RAR + condicionamento
- B.2) RAR + condicionamento + aplicação de 50 µg/mL de b-FGF
- B.3) RAR + condicionamento + aplicação de 125 µg/mL de b-FGF

Grupo C - Condicionamento com EDTA:

- C.1) RAR + condicionamento
- C.2) RAR + condicionamento + aplicação de 50 µg/mL de b-FGF
- C.3) RAR + condicionamento + aplicação de 125 µg/mL de b-FGF

4.3 - PREPARO DO CLORIDRATO DE TETRACICLINA E B-FGF

O cloridrato de tetraciclina^φ foi dissolvido em água destilada para a obtenção de uma concentração final de 50mg/mL e o b-FGF^ψ foi diluído em meio Eagle^ζ para obtenção das concentrações de 125 µg/mL e 50 µg/mL.

4.4 - TRATAMENTO DOS BLOCOS DE DENTINA

As amostras do grupo 1 receberam apenas a raspagem e aplainamento radicular realizada antes da obtenção dos blocos de dentina, como descrito anteriormente.

Para o grupo 2, o qual recebeu previamente o condicionamento com o cloridrato de tetraciclina^φ, esta foi aplicada na concentração de 50 mg/mL durante 3 minutos (Sterrett, 1997), utilizando-se bolinhas de algodão esterilizadas, sendo estas renovadas a cada 30 segundos.

No grupo 3, o EDTA^φ gel 24% pH 7 foi aplicado utilizando-se uma espátula n° 7 esterilizada, permanecendo durante 3 minutos (Zaman et al., 2000). Ao término do tempo de aplicação de cada agente químico desmineralizante, os blocos de dentina foram lavados com 10 mL de solução salina estéril.

Nas amostras tratadas com o b-FGF, este foi aplicado nas suas devidas concentrações permanecendo em contato com estas durante 5 minutos.

^φ Farmácia Santa Paula, Araraquara - SP

^ψ Sigma, St Louis, MO - USA

^ζ Cultilab, Campinas. SP - Brasil

4.5 - LINHAGEM CELULAR

A linhagem celular utilizada neste experimento era constituída por células McCoy[☆], mantidas em frascos para cultura[•] (25 cm² de área de crescimento celular) contendo meio Eagle[☉] suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 40 µg/mL de gentamicina[⊗]. O cultivo era realizado em uma incubadora[✧] com umidade controlada de aproximadamente 98% e temperatura de 37°C.

4.6 - DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO E DA VIABILIDADE CELULAR

Após o tratamento dos blocos de dentina como descrito anteriormente, estes foram colocados nos orifícios de placa para cultivo celular[•] (24 orifícios – 3,8 cm² de área de crescimento celular), sendo que cada orifício recebeu 1mL de meio Eagle[☉] sem células e 1 mL de solução do meio Eagle[☉] contendo 1×10^5 células/mL.

Estas placas foram incubadas durante 24 horas, com umidade controlada de aproximadamente 98% e temperatura de 37°C.

[☆] Instituto Adolf Lutz, São Paulo, SP - Brasil

[•] Corning Incorporation, NY - USA

[⊗] Garamicina (60 mg) – Laboratório Schering Plough, Rio de Janeiro, RJ - Brasil

[✧] Nuare US Autoflow – Model NU 4500, Plymouth, MN - USA

4.7 - PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A MEV

Após as 24 horas, as amostras foram removidas da incubadora, o meio de cultura pipetado e estas lavadas com solução salina de Hanks[⊕] para remoção de células não aderidas à superfície dentinária. Então, as amostras foram fixadas em glutaraldeído[⋄] a 2,5% por 15 minutos, e desidratadas em etanol nas concentrações de 10, 30, 50, 70, 90 e 100%, sendo 15 minutos para cada concentração, permanecendo após esta etapa, em temperatura ambiente por 24 horas.

Em seguida, as amostras foram coladas em “stubs” metálicos utilizando-se uma mistura de esmalte incolor com grafite em pó, sendo identificadas de acordo com cada grupo, e levadas ao dessecador à vácuo[⊖], onde permaneceram por 3 dias para desidratação.

As amostras foram então, metalizadas com ouro(20nm) e levadas ao microscópio eletrônico de varredura[⊕] do Instituto de Química de Araraquara – UNESP para exame e fotomicrografias[■]. As fotomicrografias[■] foram realizadas em um aumento de 500x em 3 áreas centrais de cada amostra, sendo estas equidistantes, para posterior avaliação da densidade de fibroblastos e em um aumento de 1000x, para descrição da morfologia celular.

[⊖] Pirex Labware– Corning, San Nicolas - México

[⊕] Jeol JSM – T330A

[■] Filme Fujifilme Neopan SS 120, Grão Fino, Tokyo - Japão

4.8 - ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Após calibração, os examinadores realizaram as leituras de todas as fotomicrografias. Nas fotomicrografias com aumento de 1000x, para a descrição da morfologia celular, aplicou-se o escore proposto por Gamal et al., 1998, modificado:

0 = sem células (Figura 2)

1 = células com formato arredondado (Figura 3)

2 = células com formato achatado (Figura 4)

3 = combinação de células achatadas e arredondadas (Figura 5)

Nas fotografias com aumento de 500x, para análise da densidade celular, foi utilizado o escore proposto por Jenkins et al., 1988, modificado:

0 = nenhuma célula ou células ocasionalmente presentes (Figura 6)

1 = células sem formação de nenhuma confluência (Figura 7)

2 = formação de confluência celular sem cobertura total (Figura 8)

3 = formação de uma densa camada celular ocupando toda a área avaliada (Figura 9)

4.9 - CALIBRAÇÃO DOS EXAMINADORES

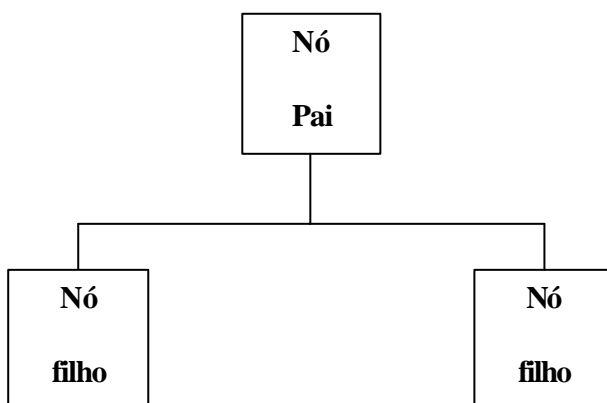
Os 3 examinadores realizaram 2 leituras, cada uma em 40 fotomicrografias selecionadas aleatoriamente, de forma cega. Os dados foram avaliados para concordância intra e inter-examinador, pelo teste Kappa, realizado para cada dupla de examinadores (ver anexos).

4.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram avaliadas usando a regressão por árvores através das técnicas de CHAID (Chi-Square Automatic Interactive Detection) e CART (Classification and Regression Trees). Estas técnicas são aplicadas em estudos constituídos por dados multivariados e com diferentes tipos de variáveis categóricas.

Ambas as técnicas são denominadas de hierárquicas pelo fato de fazerem uma partição inicial do conjunto de dados em subgrupos, segundo uma variável considerada mais significativa e, dentro de cada um dos subgrupos, realiza uma nova partição, em função de uma segunda variável mais significativa e assim por diante. A classificação escolhe os objetos ou indivíduos em etapas, produzindo uma seqüência de partições, segundo a ordem de influência das medidas usadas como discriminantes ou classificadoras, resultando em uma árvore de classificação.

O diagrama de Árvores é composto basicamente por:



A técnica CHAID proposta por Kass, 1980, é uma extensão da técnica de AID (Automatic Interactive Detection) para o caso em que a variável dependente for categórica. Nesta situação, utiliza-se a estatística χ^2 de Pearson como critério ótimo de seleção do agrupamento de categorias. Para cada variável independente, estudam-se todas as partições e agrupamentos das categorias em sub-grupos, procurando a partição ou agrupamento que tem o maior valor da estatística χ^2 num cruzamento com a variável dependente.

A técnica de CART proposta por Breiman et al., 1984, funciona da mesma forma que a CHAID, utilizando aqui, uma medida de homogeneidade dentro do nó ao invés do Qui-quadrado.

5.RESULTADO

5.1 - ANÁLISE DESCRITIVA

Neste estudo, para a avaliação da *densidade celular* foram consideradas 30 fotomicrografias para cada subgrupo formado e, para a avaliação da *morfologia celular*, 10 fotomicrografias para cada subgrupo. Como ocorreu uma perda de um bloco de dentina e portanto, de três fotomicrografias para avaliação da *densidade* e uma para avaliação da *morfologia*, o total de amostras (fotomicrografias) foi de 267 e 89, respectivamente.

No Quadro 1, encontra-se representada a classificação da *densidade celular* para os três grupos de tratamento (grupo sem condicionamento, condicionamento com tetraciclina e condicionamento com EDTA), segundo a dose de b-FGF. Em relação as amostras do grupo condicionado por tetraciclina, pode-se notar que no grupo controle, com dose de b-FGF igual a 0 µg, a maior parte das amostras (66,7%) apresentou presença de células sem formação de confluência (categoria 1) (Figura 10), enquanto que nos grupos que receberam 50 ou 125 µg de b-FGF, houve uma maior concentração das amostras (56,7%) na categoria 2, ou seja, com formação de confluência celular sem cobertura total da área avaliada (Figura 11).

Para o grupo condicionado com EDTA, as amostras que receberam as doses de 0 ou 125 µg de b-FGF apresentaram em sua maioria, 66,7% e 53,3%, respectivamente, formação de uma densa camada celular, ocupando toda a área avaliada (categoria 3) (Figura 12), enquanto que as amostras tratadas com 50 µg de b-FGF, concentraram-se mais na categoria 2 (66,7%), mostrando desta maneira, formação de confluência celular sem cobertura total da área avaliada (Figura 13).

Esta mesma observação foi válida para as amostras que não receberam nenhum tipo de condicionamento químico, na qual verifica-se também, que uma maior frequência dos blocos de dentina tratados com 0 ou 125 µg de b-FGF, 50,0% e 46,7%, respectivamente, apresentaram formação de uma densa camada celular, ocupando toda a área avaliada (categoria 3) (Figura 14), enquanto que aqueles tratados com 50 µg do fator de crescimento, foram mais representados pela categoria 2 (Figura 15).

Quadro 1: Contagens da classificação de Densidade.

Condicionamento	b-FGF	Valor				Total	Porcentagens			
		0	1	2	3		0	1	2	3
NENHUM	0	0	5	10	15	30	0.0	16.7	33.3	50.0
	50	3	3	13	11	30	10.0	10.0	43.3	36.7
	125	1	7	8	14	30	3.3	23.3	26.7	46.7
Subtotal		4	15	31	40	90	4.4	16.7	34.4	44.4
TETRACICLINA	0	2	20	8	0	30	6.7	66.7	26.7	0.0
	50	0	7	17	6	30	0.0	23.3	56.7	20.0
	125	0	6	17	7	30	0.0	20.0	56.7	23.3
Subtotal		2	33	42	13	90	2.2	36.7	46.7	14.4
EDTA	0	0	0	10	20	30	0.0	0.0	33.3	66.7
	50	0	0	18	9	27	0.0	0.0	66.7	33.3
	125	0	9	5	16	30	0.0	30.0	16.7	53.3
Subtotal		0	9	33	45	87	0.0	10.3	37.9	51.7
GLOBAL	0	2	25	28	35	90	2.2	27.8	31.1	38.9
	50	3	10	48	26	87	3.4	11.5	55.2	29.9
	125	1	22	30	37	90	1.1	24.4	33.3	41.1
Total Global		6	57	106	98	267	2.2	21.3	39.7	36.7

No Quadro 2, encontra-se representada a classificação da *morfologia celular* para os três grupos de tratamento. Como pode-se observar no grupo condicionado com tetraciclina, as amostras do grupo controle (0 µg de b-FGF) apresentaram quase que na sua totalidade (90%) células achatadas (categoria 2) como mostra a Figura 16. Por outro lado, nos blocos de dentina que receberam as doses de 50 ou 125 µg de fator de crescimento, a frequência entre as categorias 2 e 3 foi distribuída de maneira uniforme, com praticamente metade dos casos apresentando superfícies cobertas com células achatadas (Figura 17) e a outra metade, com combinação de células arredondadas e achatadas (Figura 18).

Quadro 2: Contagens da classificação de Morfologia.

Condicionamento	b-FGF	Valor			Total	Porcentagens		
		1	2	3		1	2	3
NENHUM	0	0	7	3	10	0.0	70.0	30.0
	50	0	6	4	10	0.0	60.0	40.0
	125	0	2	8	10	0.0	20.0	80.0
Subtotal		0	15	15	30	0.0	50.0	50.0
TETRACICLINA	0	0	9	1	10	0.0	90.0	10.0
	50	0	4	6	10	0.0	40.0	60.0
	125	0	5	5	10	0.0	50.0	50.0
Subtotal		0	18	12	30	0.0	60.0	40.0
EDTA	0	0	3	7	10	0.0	30.0	70.0
	50	0	4	5	9	0.0	44.4	55.6
	125	1	3	6	10	10.0	30.0	60.0
Subtotal		1	10	18	29	3.4	34.5	62.1
GLOBAL	0	0	19	11	30	0.0	63.3	36.7
	50	0	14	15	29	0.0	48.3	51.7
	125	1	10	19	30	3.3	33.3	63.3
Total Global		1	43	45	89	1.1	48.3	50.6

Para as amostras condicionadas por EDTA, verifica-se uma predominância da categoria 3, ou seja, combinação de células arredondadas e achatadas (Figura 19) nos três grupos (0, 50 e 125 µg de b-FGF), destacando-se o grupo controle (0 µg) onde o valor percentual desta categoria foi o maior de todos, com 70% dos casos.

Os blocos de dentina tratados apenas com 0 ou 50 µg de b-FGF, sem nenhum tipo de condicionamento químico, apresentaram em sua maioria células achatadas (Figura 20), cujos valores percentuais foram de 70 e 60%, respectivamente. Por outro lado, nos blocos de dentina que receberam a dose de 125 µg de b-FGF, houve uma brusca inversão, predominando a combinação de células arredondadas e achatadas (Figura 21), com 80% dos casos.

5.2 - REGRESSÃO POR ÁRVORE PELA TÉCNICA CHAID, PARA VARIÁVEL *DENSIDADE*

Com o objetivo de dicotomizar-se a avaliação das amostras em menor densidade celular (presença de células sem formação de confluência) ou maior densidade (formação de confluência celular) e assim, discriminar melhor os resultados, na classificação por árvore para a variável *densidade celular*, a categoria 0 e 1 foram agrupadas numa nova categoria, representada pelo número 1 e as categorias 2 e 3, numa nova categoria, representada pelo número 2.

Com esta nova categorização, verifica-se através da Árvore representada pela Figura 22 que, embora a grande maioria das amostras (76,40%) tenham apresentado a categoria 2 para *densidade celular*, houve uma diferença estatisticamente significante entre as amostras que receberam os três diferentes tipos de condicionamento químico, dividindo o grupo total de amostras em ramo 1 (condicionamento com EDTA), ramo 2 (nenhum condicionamento) e ramo 3 (condicionamento com tetraciclina).

No grupo formado pelas amostras condicionadas com EDTA, observa-se ainda, que a dose do fator de crescimento influenciou na *densidade celular*, já que os subgrupos tratados com as concentrações de 0 ou 50 µg apresentaram 100% das suas amostras na categoria 2 (ramo 4) enquanto que, o subgrupo representado pela dose de 125 µg de b-FGF, teve 70% das suas amostras com categoria 2 e 30% com categoria 1 (ramo 5).

A dose de b-FGF também promoveu diferenças estatisticamente significantes entre as amostras condicionadas com tetraciclina. Neste grupo, a não aplicação do b-FGF levou os blocos de dentina a apresentarem uma menor densidade celular, sendo a maioria das amostras (66,7%) representadas pela categoria 1 (ramo 6) enquanto que, 78,33% das amostras condicionadas com 50 ou 125 µg do fator de crescimento foram representadas pela categoria 2 (ramo 7).

Estas diferenças estatísticas quanto a dose do fator de crescimento em relação à *densidade celular* não ocorreram no grupo representado pelas amostras sem condicionamento químico prévio, já que os três subgrupos (0, 50 e 125 µg de b-FGF) apresentaram 78,89% das suas amostras na categoria 2, não gerando desta maneira, ramificações como observado na Figura 22. Entretanto, se esta categoria for subdividida novamente em 2 e 3, verifica-se que 27 a 43% das amostras concentram-se na categoria 2 e 37 a 50% na categoria 3 (Figura 1a - anexos).

Pode-se notar ainda, que o ramo 6 da Árvore é o que mais fortemente prevê a categoria 1 (Tabela 1a - anexos) enquanto que, o ramo 4, o que mais prevê a categoria 2, sendo um nó puro (100% das observações são da categoria 2) (Tabela 2a - anexos).

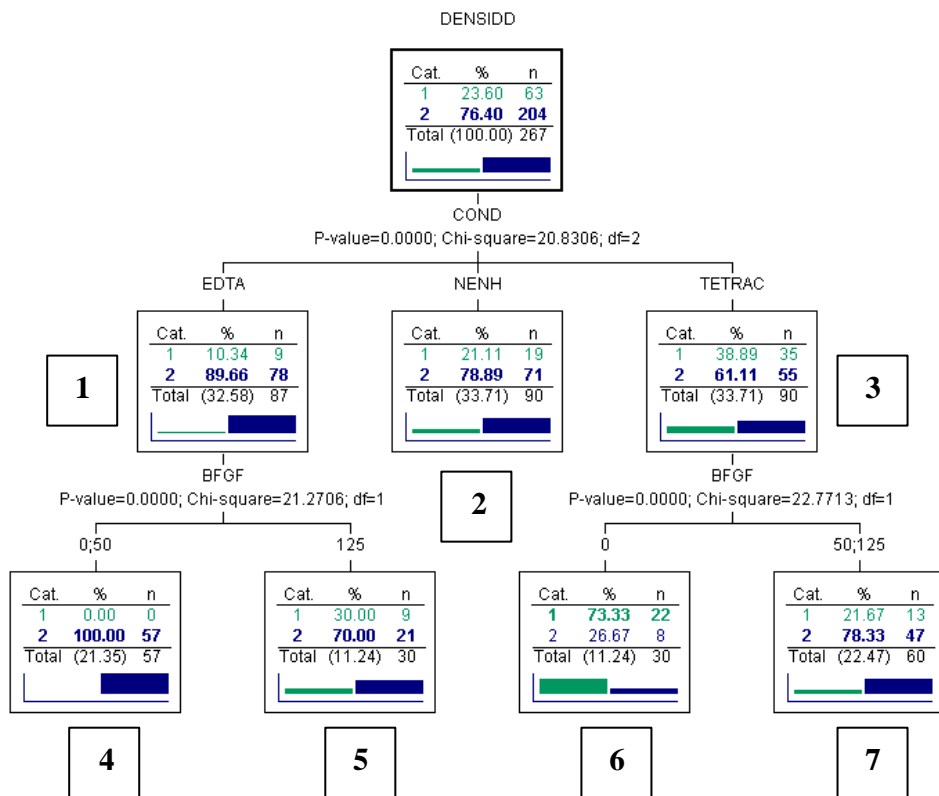


Figura 22 – Diagrama de Árvore para variável *Densidade*

5.3 - REGRESSÃO POR ÁRVORE PELA TÉCNICA CART, PARA VARIÁVEL *MORFOLOGIA*

Para a classificação por árvore para a variável *morfologia celular*, pelo fato de não ter apresentado nenhum resultado 0 e apenas um resultado classificado como 1, as categorias 1 e 2 foram agrupadas numa nova categoria, representada pelo número 2 enquanto que, a categoria 3 foi mantida.

Pela Árvore abaixo (Figura 23), pode-se notar que houve uma diferença estatisticamente significativa quanto a *morfologia celular* entre as amostras que receberam a dose de 0 µg de bFGF e aquelas tratadas com 50 ou 125 µg do fator de crescimento. Desta maneira, o grupo total de amostras se divide em ramo 1, representado pelas amostras controle, ou seja, sem aplicação do fator de crescimento, na qual a maioria das amostras (63,33%) apresentaram categoria 2, e ramo 2, constituído pelas amostras que receberam aplicação do fator de crescimento, sendo que, 57,63% destas foram representadas pela categoria 3.

Dentro do grupo das amostras tratadas com 0 µg de bFGF, verifica-se ainda, que houve diferença entre os blocos de dentina condicionados com EDTA e aqueles condicionados com tetraciclina ou sem nenhum condicionamento prévio. Os blocos de dentina pré-condicionados com EDTA (ramo 3) tiveram 70,00% das suas amostras com categoria 3 enquanto que, os blocos que não receberam nenhum condicionamento ou foram condicionados com tetraciclina, apresentaram 80,0% das amostras com categoria 2, constituindo assim o ramo 4, sendo este ramo, o que mais fortemente prevê esta categoria (Tabela 3a - anexos).

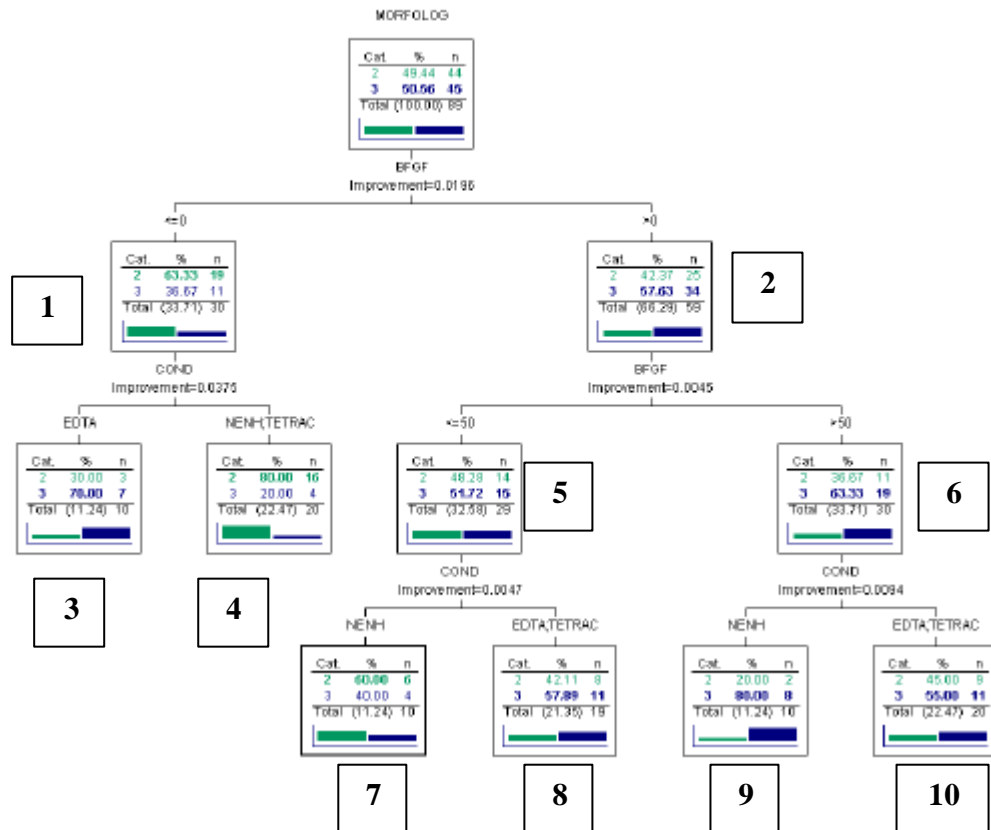


Figura 23 – Diagrama de Árvore para variável *Morfologia*

Em relação as amostras tratadas com o b-FGF, a dose do fator de crescimento também promoveu diferenças quanto a *morfologia celular* entre os blocos de dentina que receberam o b-FGF na concentração de 50 µg/mL (ramo 5), e aqueles tratados com 125 µg/mL (ramo 6). No ramo 5, verifica-se que houve um equilíbrio entre a porcentagem de amostras com categoria 2 (48,28%) e com categoria 3 (51,72%).

3 (51,72%) enquanto que, no ramo 6, a grande maioria das amostras (63,33%) foram classificadas na categoria 3.

Além disso, o tipo de condicionamento químico aplicado nos blocos de dentina, também promoveu diferenças na morfologia celular dentro dos grupos tratados com o fator de crescimento de fibroblastos básico. Para as amostras tratadas com 50 µg de b-FGF (ramo 5), a ausência de condicionamento químico prévio fez com que a maioria das suas amostras (60,0%) apresentasse categoria 2 (ramo 7) enquanto que, os grupos pré-condicionados com EDTA ou tetraciclina (ramo 8) apresentaram 57,89% das suas amostras com combinação de células arredondadas e achatadas (categoria 3).

Essa mesma divisão ocorreu entre as amostras do ramo 6, as quais foram tratadas com 125 µg de b-FGF. Entretanto, a maioria (80,0%) dos blocos de dentina que não receberam nenhum condicionamento químico (ramo 9) apresentaram categoria 3, sendo este ramo o que mais prevê esta categoria (Tabela 4a - anexos). Enquanto que, 55,0% dos blocos condicionados com EDTA ou tetraciclina tiveram categoria 3 (ramo 10).

6.DISSCUSSÃO

Os estudos associados à regeneração periodontal têm sido direcionados cada vez mais a promover um maior entendimento dos complexos processos associados a este evento (McCulloch & Bordin, 1991; Wiskejö et al., 1992, Pitaru et al., 1994). Atualmente, acredita-se que as células do ligamento periodontal são fundamentais para a regeneração dos tecidos periodontais perdidos em decorrência da progressão da doença periodontal destrutiva, sendo necessária a sua migração, inserção e proliferação sobre a superfície radicular, visando a síntese de componentes do tecido conjuntivo e a diferenciação em outros tipos celulares como os osteoblastos e cementoblastos.

Associado a esse conceito, considera-se também, que existem certos mediadores químicos, como os fatores de crescimento, envolvidos com a coordenação de todos esses eventos celulares, sendo o fator de crescimento de fibroblastos básico um destes mediadores que podem ter importante participação no processo de regeneração periodontal (Terranova & Wiskejö, 1988; Terranova et al., 1989; Bartold et al., 1996; Takayama et al., 1997, 1998) . Estudos têm detectado a presença deste fator de crescimento no citoplasma e núcleo de fibroblastos do ligamento periodontal (Gao et al., 1996) bem como, a expressão de receptores de membrana específicos para este fator nestas mesmas células (Takayama et al., 1997, 1998; Shimazu et al., 1999; Murakami et al., 1999). Além disso, alguns autores têm

mostrado através de estudos *in vitro*, o efeito do b-FGF na proliferação (Terranova et al., 1989; Takayama et al., 1997, 1998), na migração de células do ligamento periodontal (Terranova & Wiskejö, 1988) e na síntese de componentes da matriz extracelular (Giannobile et al., 1996; Takayama et al., 1997, 1998; Murakami et al., 1999; Shimazu et al., 1999; Palmon et al., 2000).

Entretanto, grande parte dos estudos citados acima (Takayama et al., 1997, 1998; Murakami et al., 1999; Shimazu et al., 1999; Palmon et al., 2000) são realizados aplicando-se metodologias as quais não simulam uma situação clínica, já que o b-FGF é colocado diretamente em contato com as células ao ser diluído no meio de cultura, permanecendo incubado com estas durante longos períodos de tempo (30 minutos - 22 horas). Diferentemente do presente estudo, no qual diluiu-se o b-FGF no meio de cultura, aplicando-o posteriormente sobre blocos de dentina provenientes de dentes com comprometimento periodontal, os quais permaneceram em contato com o fator de crescimento durante 5 minutos em temperatura ambiente.

Além disso, os blocos de dentina receberam condicionamento químico prévio com cloridrato de tetraciclina ou EDTA, pois estudos anteriores demonstraram que através da desmineralização da superfície radicular há exposição de uma matriz colágena rica em fibronectina (um componente da matriz extracelular) a qual estimula a migração, inserção e orientação de fibroblastos (Terranova et al., 1986; Terranova & Wiskejö, 1988), e que esta própria matriz atua como um arcabouço, promovendo uma maior retenção dos fatores de crescimento (Terranova et al., 1989).

Os resultados revelaram que a aplicação do b-FGF nas doses de 50 ou 125 $\mu\text{g/mL}$ promoveu um aumento da densidade celular apenas para as amostras condicionadas com cloridrato de tetraciclina, já que a maioria destes blocos de dentina tratados com o fator de crescimento apresentou formação de confluência celular parcial ou total (Figura 22 – ramo 7) enquanto as amostras condicionadas e não tratadas com o fator de crescimento apresentaram células em sua superfície porém, sem formação de nenhuma confluência (Figura 22 – ramo 6).

Esses dados estão de acordo com as observações prévias de Terranova & Wiskejö (1988) os quais verificaram haver uma maior quimiotaxia das células do ligamento periodontal quando o b-FGF ou outros fatores de crescimento (Fator de Crescimento de Células Endoteliais – ECGF, Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas - PDGF e o Fator de Transformação de Crescimento β - TGF- β) eram aplicados em superfícies dentinárias previamente condicionadas com cloridrato de tetraciclina, e de Terranova et al. (1987;1989), que relataram haver um aumento da proliferação celular, devido à maior adsorção do b-FGF à dentina desmineralizada pela tetraciclina.

Esse mesmo resultado, ou seja, aumento da densidade celular após aplicação do b-FGF era esperado no grupo das amostras condicionadas com EDTA, já que esta substância atua tal como a tetraciclina, promovendo uma desmineralização da superfície dentinária com exposição de fibras colágenas do tipo I, supostamente favorecendo a adesão do b-FGF e, conseqüentemente, a proliferação celular.

Entretanto, embora o grupo condicionado com EDTA tenha apresentado um maior número de amostras com confluência celular parcial ou total quando comparado às amostras condicionadas com tetraciclina e às não condicionadas (Figura 22), a aplicação ou não do b-FGF não influenciou nesses resultados (Figura 22).

Como na literatura ainda não há estudos associando o condicionamento com EDTA e a aplicação de algum tipo de fator de crescimento, não existem subsídios para explicar o porquê do diferente comportamento destas amostras quando comparadas àquelas desmineralizadas com tetraciclina quanto a densidade celular. Provavelmente, as diferenças nas características químicas das duas substâncias podem estar influenciando os resultados.

De um lado, o cloridrato de tetraciclina que, por apresentar pH baixo, dissolve a superfície mineralizada, além de permanecer adsorvido à dentina, diminuindo a capacidade de adesão celular e desta maneira, a densidade de fibroblastos (Frantz & Polson, 1988; Blomlöf & Lindskog, 1995; Sterrett et al., 1997; Zaman et al., 2000). Condição essa compensada quando o b-FGF foi utilizado, em ambas as dosagens (Figura 2a – anexos). Por outro lado, o EDTA que, por atuar como um agente quelante de pH neutro, preserva a integridade das fibras colágenas expostas (Blomlof, 1996; Blomlof et al., 1997), favorecendo a adesão celular, não havendo provavelmente, grandes mudanças com a aplicação do b-FGF. No entanto, possíveis efeitos sinérgicos entre EDTA/b-FGF podem não ocorrer devido a incompatibilidade química destas substâncias ou talvez, o EDTA tenha a capacidade

de desnaturar o b-FGF, ou de ocupar receptores específicos para este fator de crescimento nas células.

Quanto às amostras não condicionadas quimicamente, os resultados indicaram haver proliferação de fibroblastos em suas superfícies, com formação de confluência celular independente da dose de fator de crescimento aplicada (Figura 22). Esses achados contrariam os dados apresentados no estudo de Gamal et al. (1998), os quais utilizaram uma metodologia similar ao presente estudo, porém com aplicação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento parecido com insulina (IGF). Os autores encontraram uma maior densidade celular nas amostras não condicionadas e tratadas com os fatores de crescimento quando comparadas àquelas que não receberam o PDGF e/ou IGF.

Entretanto, embora existam diferenças em relação às propriedades e características dos fatores de crescimento utilizados nos dois estudos, era esperada uma maior concentração de células nas amostras não condicionadas e tratadas com o b-FGF, tal como ocorreu no estudo de Gamal et al. (1998). Porém, deve-se considerar que estes autores utilizaram cultura primária de células do ligamento periodontal, as quais apresentam uma maior dificuldade de proliferação *in vitro* comparadas aos fibroblastos de linhagem contínua.

Provavelmente, este fator ou seja, diferenças quanto ao tipo celular utilizado, tenha proporcionado aos blocos de dentina apenas raspados e aplainados manualmente apresentarem uma maior densidade celular quando comparados aos resultados obtidos por Zaman et al. (2000), Rompen et al. (1999) e Babay (2001),

embora nos dois últimos trabalhos não há indicação da forma de seleção das áreas escolhidas nas amostras para a obtenção das fotomicrografias.

Em relação à morfologia celular, os resultados indicaram que as amostras tratadas com o b-FGF apresentaram combinação de células arredondadas e achatadas (Figura 23) enquanto que, a maioria dos blocos de dentina do grupo controle (sem aplicação de b-FGF) apresentaram apenas células achatadas em suas superfícies (Figura 23). De acordo com Gamal et al. (1998), os fibroblastos achatados são indicativos de células firmemente aderidas à superfície dentinária, pois apresentam projeções citoplasmáticas, e os fibroblastos arredondados são células pobremente aderidas devido ao processo de morte celular causado, por exemplo, por substâncias citotóxicas, ou são células em processo de mitose.

Pela análise das fotomicrografias do estudo (Figuras 13, 15, 18 e 19), a grande maioria ou senão, quase a totalidade das células arredondadas encontram-se com processos citoplasmáticos, num aspecto sugestivo de modificação para um formato achatado, enquanto outras estão em evidente processo de mitose (Figura 5a – anexos), sugerindo, então, vitalidade celular. Desta maneira, pode-se considerar uma condição mais favorável, a associação dos dois tipos de morfologia celular do que a presença somente de células achatadas, pois na possibilidade de divisão celular, está havendo simultaneamente, um aumento da densidade.

Embora subjetivo, este raciocínio sugere que, o tratamento com o b-FGF recebido pelas amostras pareceu ser mais favorável, principalmente quando a dose de 125 µg foi aplicada nos blocos de dentina. Porém, pode-se considerar o

condicionamento químico prévio recebido pelas amostras, como um fator que também influenciou na morfologia celular. Considerando as amostras que receberam aplicação de b-FGF (50 ou 125 μg), as diferenças quanto à morfologia celular foram encontradas entre as amostras condicionadas e as não condicionadas previamente à aplicação do b-FGF, já que os dois tipos de agentes químicos utilizados, tetraciclina e EDTA, promoveram resultados similares, com a maioria das suas amostras apresentando combinação de morfologia celular (Figura 23 – ramos 8 e 10).

Para o grupo de amostras não condicionadas, a dose de 125 μg de b-FGF favoreceu a presença de combinação de células arredondadas e achatadas enquanto que as amostras tratadas com a dose de 50 μg apresentaram uma maior frequência de células achatadas (Figura 23 – ramos 9 e 7). No entanto, esta possível “influência benéfica” da dose de 125 μg de b-FGF não se refletiu em maior densidade celular em relação à dose de 50 μg (Figura 22 – ramo 2). Esta aparente incoerência dos resultados pode ser devida ao reduzido tempo de observação deste experimento (24 horas) ou ao reduzido tempo de condicionamento com b-FGF recebido pelas amostras (5 minutos).

No entanto, estes resultados diferem nas amostras que receberam o condicionamento químico prévio, mas não foram tratadas com o b-FGF. Nestas amostras, o condicionamento com o EDTA mostrou-se mais favorável à combinação de fibroblastos arredondados e achatados em comparação ao condicionamento com tetraciclina ou à ausência de condicionamento (Figura 23 – ramos 3 e 4). Uma

possível explicação para essas diferenças seria o fato de que, as superfícies dentinárias não condicionadas ou condicionadas com tetraciclina, embora tenham proporcionado a adesão celular, podem não ser favoráveis para a sua proliferação.

Neste sentido, ainda que o condicionamento com tetraciclina proporcione exposição de colágeno tipo I, e conseqüentemente de fibronectina, supostamente estimulando a adesão de fibroblastos, devido ao reduzido pH deste agente químico, podem ocorrer efeitos prejudiciais sobre a proliferação celular. Além disso, a tetraciclina permanece adsorvida à raiz, sendo liberada lentamente por pelo menos 48 horas no meio de cultura (Frantz & Polson, 1988), o que pode ter alterado as características deste meio e, desta maneira, a proliferação dos fibroblastos.

Assim, as características químicas dos agentes desmineralizantes utilizados para condicionamento radicular parecem influenciar também a morfologia celular tal como ocorreu na densidade. Este fato pode explicar porque nas amostras tratadas com cloridrato de tetraciclina o tratamento com o b-FGF não só levou a um aumento da densidade celular, como também promoveu uma mudança na morfologia celular, favorecendo a combinação de fibroblastos achatados e arredondados (Figura 23 – ramos 8 e 10). Neste caso, a suposição é que o uso do b-FGF tenha “compensado” os efeitos deletérios do cloridrato de tetraciclina observados no grupo condicionado, mas sem aplicação do b-FGF (Figuras 2a e 3a – anexos)

Já nos grupos condicionados com EDTA, a aplicação do b-FGF parece não exercer efeito sobre a morfologia dos fibroblastos, pois em ambas situações

(EDTA associado ou não ao b-FGF) observa-se uma maior frequência de amostras com combinação de células arredondadas e achatadas (Figura 4a – anexos).

Entretanto, embora não tenha sido observado diferenças em relação à morfologia e densidade celular entre os grupos de amostras condicionadas com o EDTA e tratadas ou não com o b-FGF, a literatura sugere que a utilização deste fator de crescimento *in vitro* pode ter efeitos sobre diversas funções dos fibroblastos como a expressão de genes relacionados à síntese de certos componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo I, tipo III, fibronectina e colagenase (Giannobile et al., 1996; Takayama et al., 1997, 1998; Murakami et al., 1999; Shimazu et al., 1999; Palmon et al., 2000), e mesmo sobre outras células, como as células endoteliais, influenciando na sua migração, proliferação e morfologia (Gao et al., 1996), os quais não foram avaliados.

Além disso, alguns fatores relacionados à metodologia do presente estudo tais como, tipo celular utilizado, modo e tempo de aplicação do b-FGF, e processamento das amostras devem ser considerados quando os resultados obtidos são analisados. Em relação ao tipo celular, enquanto a maioria dos estudos utilizou cultura primária de células do ligamento periodontal, no presente estudo, empregou-se fibroblastos de linhagem contínua. Estas células por terem um grau de diferenciação muito reduzido, podem expressar em menor quantidade os receptores específicos para o b-FGF (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 e FGFR-4), diminuindo a capacidade de atuação do fator de crescimento, o que levaria segundo Takayama et al. (1997, 1998) e Shimazu et al. (1999), a uma menor proliferação celular.

Quanto ao modo e tempo de aplicação deve-se considerar que: 1) ao diluir o b-FGF no meio de cultura, este pode ter mudado as propriedades físicas e/ou químicas do fator de crescimento, além do que, nem toda a dose do bFGF empregada pode ter sido adsorvida à dentina e posteriormente liberada para atuar sobre as células e 2) diferentemente dos estudos que incubaram as amostras com o b-FGF durante um tempo variável de 30 minutos (Terranova et al., 1987; Terranova & Wiskejö, 1988; Terranova et al., 1989) a 22 horas (Takayama et al., 1997,1998), a aplicação neste estudo foi de 5 minutos em temperatura ambiente, visando simular o emprego clínico diminuindo então, o tempo de contato do fator de crescimento com os blocos de dentina.

Com relação ao processamento, ao colocar os blocos de dentina no dessecador a vácuo é provável que uma alteração da morfologia celular tenha ocorrido, já que não é possível controlar a quantidade de pressão gerada no interior deste e nem mesmo, o tempo necessário para promover a desidratação das amostras, condição que poderia ser controlada caso tivesse sido utilizado o dessecador de ponto crítico. Entretanto, durante o desenvolvimento do estudo este equipamento não estava disponível na região.

Mesmo considerando todas estas limitações, principalmente quanto ao tipo celular utilizado, pode-se acreditar que existem motivos para grandes esperanças na utilização do b-FGF na terapia regenerativa do periodonto, já que este influenciou positivamente a densidade e morfologia dos fibroblastos. É preciso salientar que apenas por meio da realização de mais estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, será

possível compreender melhor o modo de ação dos fatores de crescimento, bem como as influências da dose ou concentração e forma de aplicação sobre os diferentes tipos celulares que compõe o periodonto. A partir deste conhecimento, poderá ser possível avaliar o potencial de uma eventual combinação de fatores de crescimento para utilização clínica.

7.CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados conclui-se que:

1) O condicionamento de superfícies dentinárias com fator de crescimento de fibroblastos básico influenciou tanto a densidade como a morfologia dos fibroblastos utilizados no estudo;

2) Para as amostras que previamente foram condicionadas com cloridrato de tetraciclina, ambas as doses de b-FGF promoveram um aumento na densidade celular e uma modificação na morfologia dos fibroblastos consistente com uma maior atividade de divisão celular;

3) A aplicação do b-FGF em superfícies dentinárias condicionadas previamente com EDTA não proporcionou benefícios significativos à densidade e morfologia celular em relação àqueles já obtidos com o uso do próprio EDTA;

8. ANEXOS

8.1 - CALIBRAÇÃO DOS EXAMINADORES

8.1.1 - DADOS DA CALIBRAÇÃO INTRA-EXAMINADOR

Morfologia

Examinador 1

<i>1º exame</i>	<i>2º exame</i>		<i>Total</i>
	2	3	
2	9	2	11
3	1	8	9
Total	10	10	20

Kappa = 0.700

Z = 3.146; p = 0.002

Examinador 2

<i>1º exame</i>	<i>2º exame</i>		<i>Total</i>
	2	3	
2	8	2	10
3	1	9	10
Total	9	11	20

Kappa = 0.700

Z = 3.146; p = 0.002

Examinador 3

<i>1º exame</i>	<i>2º exame</i>			<i>Total</i>
	1	2	3	
1	1	1		2
2		8	1	9
3		1	8	9
Total	1	10	9	20

Kappa = 0.736

Z = 3.956; p < 0.0001

Densidade

Examinador 1

<i>I^o exame</i>	<i>2^o exame</i>				<i>Total</i>
	0	1	2	3	
0	1				1
1		7			7
2			7	2	9
3				3	3
Total	1	7	7	5	20

Kappa = 0.853

Z = 5.868; p < 0.0001

Examinador 2

<i>I^o exame</i>	<i>2^o exame</i>				<i>Total</i>
	0	1	2	3	
0	1				1
1		6	1		7
2			8	2	10
3				2	2
Total	1	7	7	5	20

Kappa = 0.768

Z = 5.124; p < 0.001

Examinador 3

<i>I^o exame</i>	<i>2^o exame</i>				<i>Total</i>
	0	1	2	3	
0	1	1			2
1		3	1		4
2			7	1	8
3			2	4	6
Total	1	4	10	5	20

Kappa = 0.632

Z = 4.478; p < 0.0001

8.1.2 - DADOS DA CALIBRAÇÃO INTER-EXAMINADORES

Morfologia

Examinador 1 (E1) x Examinador 2 (E2)

<i>E1</i>	<i>E2</i>		<i>Total</i>
	2	3	
2	9	2	11
3	1	8	9
Total	10	10	20

Kappa = 0.700

Z = 3.146; p < 0.001

Examinador 1 (E1) x Examinador 3 (E3)

<i>E1</i>	<i>E3</i>			<i>Total</i>
	1	2	3	
2		8	3	11
3	2	1	6	9
Total	2	9	9	20

Kappa = 0.454

Z = 2.368; p = 0.008

Examinador 2 (E2) x Examinador 3 (E3)

<i>E2</i>	<i>E3</i>			<i>Total</i>
	1	2	3	
2		8	2	10
3	2	1	7	10
Total	2	9	9	20

Kappa = 0.545

Z = 2.828 ; p = 0.002

Densidade

Examinador 1 (E1) x Examinador 2 (E2)

<i>E1</i>	<i>E2</i>				<i>Total</i>
	0	1	2	3	
0	1				1
1		7			7
2			9		9
3			1	2	3
Total	1	7	10	2	20

Kappa = 0.921

Z = 5.928; p < 0.0001

Examinador 1 (E1) x Examinador 3 (E3)

<i>E1</i>	<i>E3</i>				<i>Total</i>
	0	1	2	3	
0	1				1
1	1	4	2		7
2			6	3	9
3				3	3
Total	2	4	8	6	20

Kappa = 0.571

Z = 4.246; p < 0.0001

Examinador 2 (E2) x Examinador 3 (E3)

<i>E2</i>	<i>E3</i>				<i>Total</i>
	0	1	2	3	
0	1				1
1	1	4	2		7
2			6	4	10
3				2	2
Total	2	4	8	6	20

Kappa = 0.496

Z = 3.778; p < 0.0001

8.2 – TABELAS DE GANHOS PARA A VARIÁVEL *DENSIDADE*

8.2.1 – GANHOS PARA A CATEGORIA 1:

Na tabela 1a, encontra-se a avaliação do ganho para a categoria 1. Pode-se notar que, o ramo 6 é o que mais fortemente prevê a categoria 1, enquanto que o ramo 4, é o que menos explica esta categoria.

Tabela 1a: Ganhos para a categoria 1.

Node	Node: n	Node: %	Resp: n	Resp: %	Gain (%)	Index (%)
6	30	11.24	22	34.92	73.33	310.79
5	30	11.24	9	14.29	30.00	127.14
7	60	22.47	13	20.63	21.67	91.83
2	90	33.71	19	30.16	21.11	89.47
4	57	21.35	0	0.00	0.00	0.00

8.2.2 – GANHOS PARA A CATEGORIA 2:

Na tabela 2a, encontra-se a avaliação do ganho para a categoria 2. Pode-se notar que, o ramo 4 é o que mais fortemente prevê a categoria 2, sendo um nó puro (100% das observações são da categoria 2), enquanto que o ramo 6, é o que menos explica esta categoria.

Tabela 2a: Ganhos para a categoria 2.

Node	Node: n	Node: %	Resp: n	Resp: %	Gain (%)	Index (%)
4	57	21.35	57	27.94	100.00	130.88
2	90	33.71	71	34.80	78.89	103.25
7	60	22.47	47	23.04	78.33	102.52
5	30	11.24	21	10.29	70.00	91.62
6	30	11.24	8	3.92	26.67	34.90

8.3 – TABELA DE GANHOS PARA VARIÁVEL *MORFOLOGIA*

8.3.1 – GANHOS PARA A CATEGORIA 2:

Na tabela 3a, tem-se a avaliação do ganho para a categoria 2. Pode-se observar que o ramo 4 é o que mais fortemente prevê a categoria 2, enquanto que o ramo 9, é o que menos explica esta categoria.

Tabela 3a: Ganhos para a categoria 2.

Node	Node: n	Node: %	Resp: n	Resp: %	Gain (%)	Index (%)
4	20	22.47	16	36.36	80.00	161.82
7	10	11.24	6	13.64	60.00	121.36
10	20	22.47	9	20.45	45.00	91.02
8	19	21.35	8	18.18	42.11	85.17
3	10	11.24	3	6.82	30.00	60.68
9	10	11.24	2	4.55	20.00	40.45

8.3.2 – GANHOS PARA CATEGORIA 3:

Na tabela 4a, encontra-se a avaliação do ganho para a categoria 3. Pode-se observar que o ramo 9 é o que mais fortemente prevê a categoria 3, enquanto que o ramo 4 é o que menos explica.

Tabela 4a: Ganhos para a categoria 3.

Node	Node: n	Node: %	Resp: n	Resp: %	Gain (%)	Index (%)
9	10	11.24	8	17.78	80.00	158.22
3	10	11.24	7	15.56	70.00	138.44
8	19	21.35	11	24.44	57.89	114.50
10	20	22.47	11	24.44	55.00	108.78
7	10	11.24	4	8.89	40.00	79.11
4	20	22.47	4	8.89	20.00	39.56

8.4 – ANÁLISE DO AJUSTE DO MODELO / TAXA DE MÁ-CLASSIFICAÇÃO

Uma forma de analisar a falta de ajuste do modelo consiste em separar uma amostra especificamente para isso, e fazer a contagem do número de indivíduos que foram classificados erroneamente, calculando-se assim, a *Taxa de Má-classificação*. Para calcular a *Taxa de Má-classificação*, divide-se a amostra em duas partes, sendo que a primeira parte é a amostra propriamente dita, com a qual se constrói a árvore, e a segunda, é a amostra em teste, cujos elementos serão classificados segundo a árvore criada pela primeira parte. A probabilidade de classificar erroneamente um elemento da segunda amostra é denominada *Taxa de Má-classificação*.

8.4.1 – TAXA DE MÁ-CLASSIFICAÇÃO PARA A ÁRVORE DA VARIÁVEL DENSIDADE

Tabela 5a: Matriz de Má Classificação.

Categoria predita	Categoria observada		Total
	1	2	
1	22	8	30
2	41	196	237
Total	63	204	267

8.4.2 - TAXA DE MÁ-CLASSIFICAÇÃO PARA A ÁRVORE DA VARIÁVEL MORFOLOGIA

Tabela 6a: Matriz de Má Classificação.

Categoria predita	Categoria observada		
	1	2	Total
1	22	8	30
2	22	37	59
Total	44	45	89

8.5 – Figuras

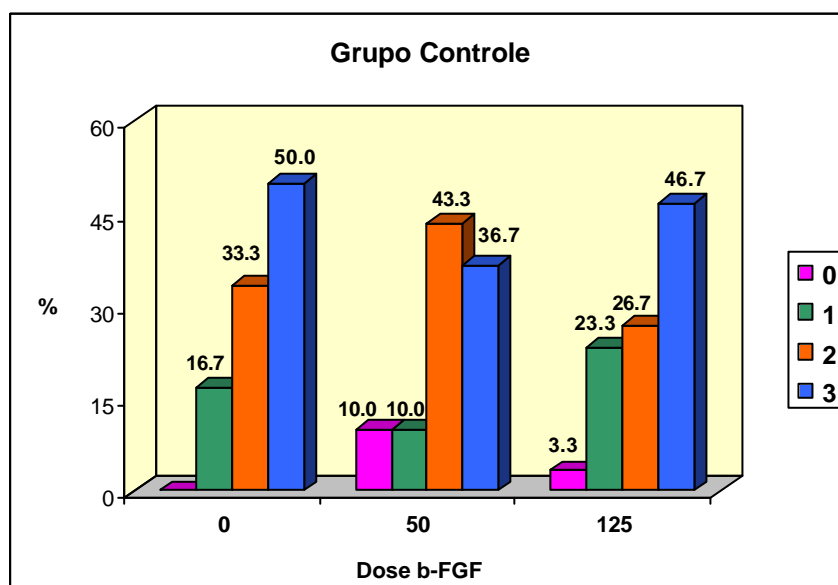


Figura 1a: Classificação de Densidade – Grupo sem nenhum condicionamento

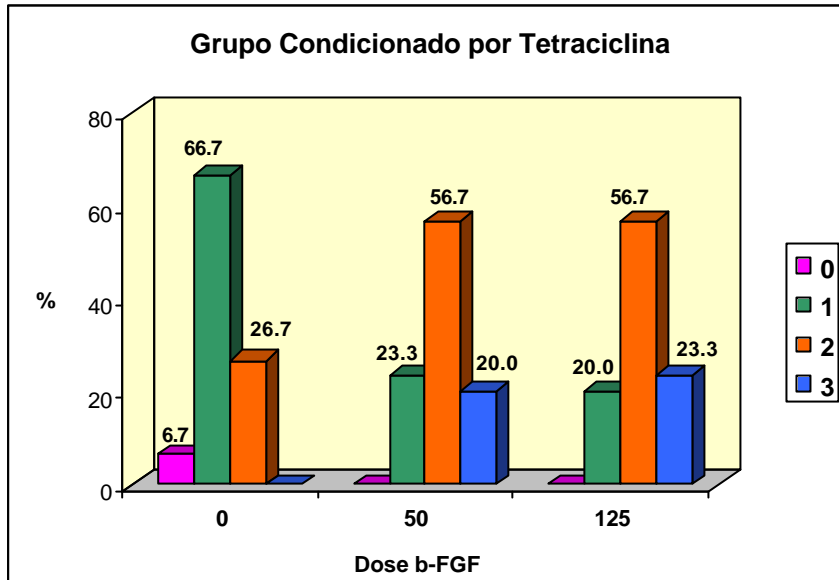


Figura 2a: Classificação de Densidade – Grupo condicionado por tetraciclina

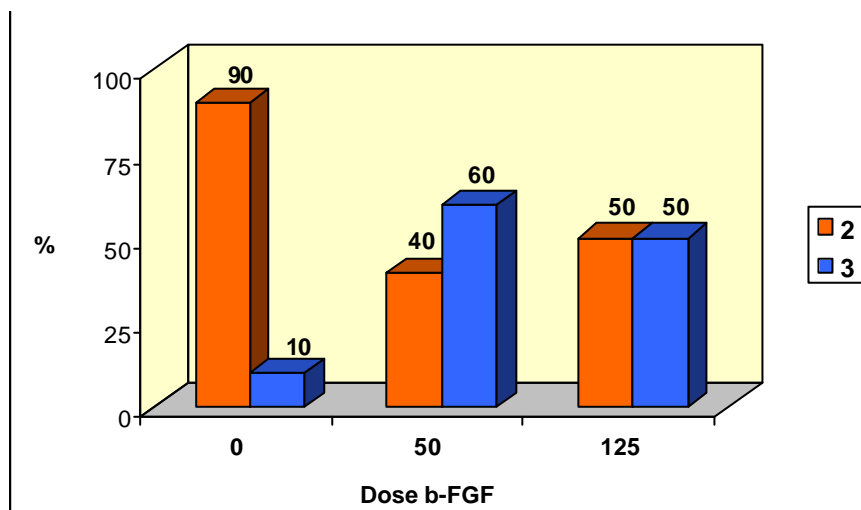


Figura 3a: Classificação de Morfologia – Grupo condicionado por tetraciclina

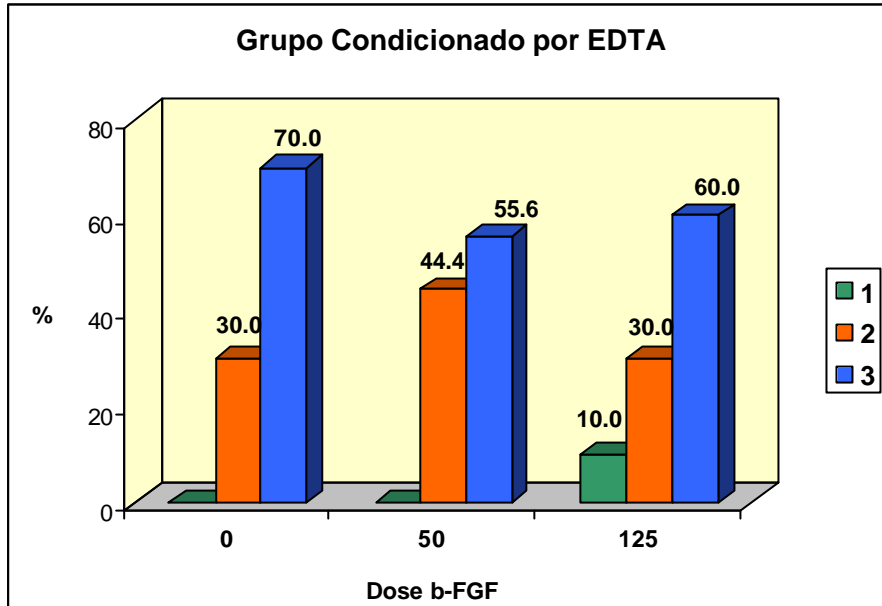


Figura 4a: Classificação de Morfologia – Grupo condicionado por EDTA

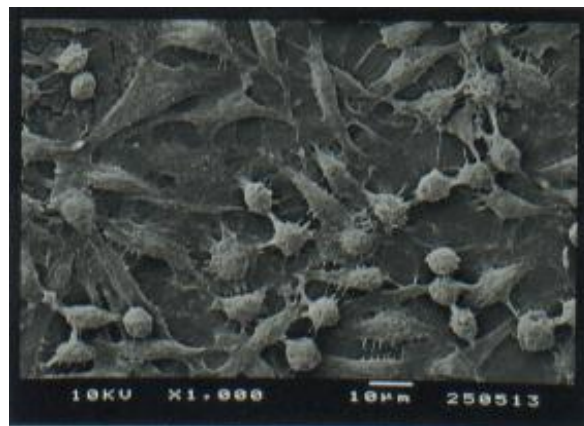


Figura 5a: Células arredondadas em processo de mitose. 1000X

9.Referências bibliográficas*

AMAR, S., CHUNG, A. Clinical implications of cellular biologic advances in periodontal regeneration. *Curr. Opin. Period.*, v.2, p.128-140, 1994.

AUKIL, I., PETTERSSON, E. Effect of citric acid conditioning on fibroblast cell density in periodontal wounds. *J. Clin. Periodontol.*, v.14, p.80-4, 1987.

BABAY, N. Attachment of human gingival fibroblasts to periodontally involved root surface following scaling and/or etching procedures: a scanning electron microscopy study. *Braz. Dent. J.*, v.12, p.17-21, 2001.

BAKER, P.J. et al. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. *J. Periodontol.*, v.54, p.580-5, 1983

BARNETT, J.D. et al. Comparison of freeze-dried bone allograft and porous hydroxylapatite in human periodontal defects. *J. Periodontol.*, v.60, p.231-7, 1989.

BARTOLD, P.M., RABEN, A. Growth factor modulation of fibroblasts in simulated wound healing. *J. Periodontal. Res.*, v.31, p.205-16, 1996.

BLOM, S. et al. The effect of insulin-like growth factor-I and human growth hormone on periodontal ligament fibroblast morphology, growth pattern, DNA synthesis and receptor binding. *J. Periodontol.*, v.63, p.960-8, 1992.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria geral de Bibliotecas, Editora UNESP. *Normas para publicação da UNESP*. São Paulo: Editora UNESP, 1994. 4v., v.2 Referências bibliográficas.

- BLOMLÖF, J. Root cementum appearance in healthy monkeys and periodontitis-prone patients after different etching modalities. *J. Clin. Periodontol.*, v.23, p.12-8, 1996.
- BLOMLÖF, J., LINDSKOG, S. Root surface textures and early cell and tissue colonization after different etching modalities. *J. Clin. Periodontol.*, v.22, p.464-8, 1995.
- BLOMLÖF, J.P., BLOMLÖF, L.B., LINDSKOG, S.F. Smear layer formed by different root planing modalities and its removal by an ethylenediaminetetraacetic acid gel preparation. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, v.17, p.243-9, 1997.
- BREIMAN, L. et al. *Classification and regression trees*. Belmont: Wadsworth, 1984.
- CALLENS, A. *Growth factors in periodontal regeneration*. Berlin: Quintessence books, 1997, p.284-302.
- ELLEGAARD, B. et al. New periodontal attachment procedures based on retardation of epithelial migration. *J. Clin. Periodontol.*, v.1, p.75-88, 1974.
- FLEMING, T.F. Periodontitis. *Ann. Periodontol.*, v.4, p.32-7, 1999.
- FRANTZ, B.; POLSON, A. Tissue interactions with dentin specimens after demineralization using tetracycline. *J. Periodontol.*, v.59, p.714-21, 1988.
- GAMAL, A.Y. et al. Human periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-I application on tetracycline HCL conditioned root surfaces. *J. Clin. Periodontol.*, v.25, p.404-12, 1998.

- GAO, J. et al. Immunolocalization of b-FGF in human periodontal ligament tissue. *J. Periodontal Res.*, v.31, p.260-4, 1996.
- GARRETT, J.S. et al. Effects of citric acid on diseased root surfaces. *J. Periodontal Res.*, v.13, p.155-63, 1978.
- GIANNOBILE, W.V. et al. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *J. Periodontol.*, v.67, p.545-53, 1996.
- GOTTLOW, J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, v.11, p. 494-503, 1984.
- GRAVES, D.T.; COCHRAN, D. L. Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. *Curr. Opin. Period.*, v.2, p.178-86, 1994.
- JENKINS, S.; ADDY, M.; WADE, W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *J. Clin. Periodontol.*, v.15, p.415-24, 1988.
- KASS, G. An exploratory technique for investigating large quantities of categorical data. *Appl. Stat.*, v.29, p.119-27, 1980.
- LAFFERTY, J.A. et al. Comparative SEM study on the effect of etching with tetracycline HCl or citric acid on instrumented periodontally involved human root surfaces. *J. Periodontol.*, v.64, p.689-93, 1993.
- McCULLOCH, G.A.G., BORDIN, S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J. Periodontal Res.*, v.26, p.114-54, 1991.

- MELCHER, A.H. On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol.*, v.47, p.256-60, 1976.
- MIKI, Y. et al. The effect of application of bFGF on regeneration of the periodontal tissues. *J. Dent. Res.*, v.73, sp.iss., p.354, 1994. (Abstract 2018).
- MIKI, Y. et al. Periodontal regeneration by bFGF in beagle dogs with naturally occurring periodontitis. *J. Dent. Res.*, v.74, sp.iss., p.325, 1996. (Abstract 2464).
- MURAKAMI , S. et al. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J. Periodontal Res.*, v.34, p.425-30, 1999.
- NYMAN, S. et al. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J. Clin. Periodontol.*, v.7, p.394-401, 1980.
- NYMAN, S. et al. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J. Clin. Periodontol.*, v.9, p.257-65, 1982.
- PALMON, A. et al. Inverse dose and time dependent of basic fibroblast growth factor on the gene expression of collagen type 1 and matrix metalloproteinase-1 by periodontal ligament cells in culture. *J. Periodontol.*, v.71, p.974-80, 2000.
- PITARU, S., McCULLOCH, G.A.G., NARAYANAN, A.S. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J. Periodontal Res.*, v.29, p.81-94, 1994.

PITARU, S., MELCHER, A. Organization and oriented fiber system in vitro by human gingival fibroblasts attached to dental tissue: relationship between cells and mineralized and desmineralized tissue. *J. Periodontal Res.*, v.22, p.6-13, 1987.

PITARU, S. et al. The influence of the morphological and chemical natures of dental surfaces on the migration, attachment and orientation of human gingival fibroblasts in vitro. *J. Periodontal Res.*, v.19, p.408-18, 1984.

QUINTERO, G. et al. A six-month evaluation of decalcified freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. *J. Periodontol.*, v.53, p.726-30, 1982.

ROMPEN, E.H.; GOFFINET, G.H.; NUSGENS, B. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: na in vitro study. *J. Periodontol.*, v.70, p.1144-52, 1999.

ROSSA JR., C. et al. 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.*, v.71, p.775-84, 2000.

SHIMAZU, A. et al. Expression of syndecan-2, -4, and fibroblast growth factor receptor type 1 in human periodontal ligament fibroblasts and down-regulation of these membrane proteins during maturation in culture. *J. Dent. Res.*, v.78, p.1791-99, 1999.

STERRETT, J.D. tetracycline demineralization of dentin the effects of concentration and application time. *J. Clin. Periodontol.*, v.24, p.457-63, 1997.

TAKAYAMA, S. et al. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J. Periodontal Res.*, v.32, p.667-75, 1997.

TAKAYAMA, S. et al. Expression of receptors for basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J. Periodontal Res.*, v.33, p.315-22, 1998.

TERRANOVA, V.P. Biologically active factors in the treatment of periodontal disease. *Curr. Opin. Periodontol.*, v.1, p.129-35, 1993.

TERRANOVA, V.P., WISKESJÖ, U.M.E. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of cells of the periodontium. *J. Periodontol.*, v.58, p.371-80, 1987.

TERRANOVA, V.P., WISKESJÖ, U. M. E. Chemotaxis of human periodontal ligament cells to various biological response modifiers. *Adv. Dent. Res.*, v.2, p.215-22, 1988.

TERRANOVA, V.P. et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J. Period. Res.*, v.21, p.330-7, 1986.

TERRANOVA, V.P. et al. A biochemical approach to periodontal regeneration. *J. Periodontol.*, v.58, p.247-57, 1987.

TERRANOVA, V.P. et al. Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. Effect of basic fibroblast growth factor. *J. Periodontol.*, v.60, p.293-301, 1989.

TERRANOVA, V.P. et al. Polypeptide stimulation of periodontal regeneration. *Period. Case Rep.*, v.13, p.6-12, 1991.

THOMAS, K.A.; GIMENEZ-GALLECO, G. *Fibroblast growth factors: broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity*. *Oncogen. Growth Factors*; ed. Bradshae, R. A.; Prentis, S., 1987.

WISKEJÖ, U.M.E., NILVEUS, R.E., SELVIG, K.A. Significance of early healing events on periodontal repair. *J. Periodontol.*, v.63, p.158-65, 1992.

WISKEJÖ, U.M.E. et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J. Periodontal Res.*, v.66, p.685-91, 1986.

ZAMAN, K.U. et al. A study of attached and oriented human periodontal ligament cells to periodontally diseased cementum and dentin after demineralization with neutral and low pH etching solution. *J. Periodontol.*, v.71, p.1094-99, 2000.

SILVÉRIO, K. G. *O efeito do fator de crescimento de fibroblastos básico aplicado em superfícies radiculares condicionadas com cloridrato de tetraciclina ou EDTA na morfologia e densidade de fibroblastos. Estudo in vitro*. Araraquara, 2002. 83p. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o efeito do condicionamento radicular com fator de crescimento de fibroblastos básico (b-FGF) sobre a morfologia e densidade de fibroblastos. Para tal, blocos de dentina com 4 mm² de área de superfície foram obtidos de raízes de dentes humanos extraídos devido severo envolvimento periodontal, sendo instrumentados manualmente e autoclavados. Noventa amostras foram selecionadas aleatoriamente e distribuídas em 3 grupos segundo o tratamento de superfície prévio ao condicionamento com o b-FGF: sem tratamento – controle; 50 mg/mL de cloridrato de tetraciclina e EDTA a 24%. As 30 amostras de cada um destes 3 grupos foram distribuídas em 3 subgrupos quanto à dose de bFGF: 0 µg/mL – controle; 50 µg/mL e 125 µg/mL. Após os tratamentos, as amostras foram incubadas a 37° C e 98% de umidade com 2mL de meio Eagle, sendo 1mL com fibroblastos de linhagem contínua (células McCoy) na concentração de 1 x 10⁵ células/mL e 1mL meio sem células, por 24 h. Após as 24 h, as amostras foram submetidas a preparo de rotina para MEV e então, fotomicrografadas nos aumentos de 500X (densidade celular) e 1000X (morfologia celular). Em seguida, as

fotomicrografias foram avaliadas por 3 examinadores treinados, calibrados, independentes e cegos, os quais verificaram morfologia e densidade celular segundo os escores propostos por Gamal et al. (1998) e Jenkins et al. (1988), respectivamente. A aplicação da Análise de Regressão pela Técnica da Árvore demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes para a densidade celular ($p < 0,0001$) entre os grupos EDTA, tetraciclina e controle, sendo que também houve diferenças entre as doses de 0/50 μg e 125 μg de b-FGF nas amostras condicionadas com EDTA ($p < 0,0001$) e entre as doses de 0 e 50/125 μg de bFGF nas amostras condicionadas com tetraciclina ($p < 0,0001$). Esta mesma técnica mostrou haver diferenças significativas quanto à morfologia celular entre as amostras tratadas ou não com b-FGF, sendo que a dose de 125 μg , demonstrou ainda, ser mais favorável do que a de 50 μg . Conclui-se que o tratamento das superfícies dentinárias com o b-FGF influenciou tanto a densidade como a morfologia, embora nas amostras condicionadas com o EDTA este fator de crescimento não tenha proporcionado benefícios significativos em relação aos já obtidos com o uso desta substância.

Palavras-chave: Regeneração tecidual guiada; fator de crescimento de fibroblastos; fibroblastos.

SILVÉRIO, K. G. *The effect of fibroblast growth factor on the root surfaces conditioning with tetracycline HCl or EDTA at the morphology and density of fibroblast . Study in vitro.* Araraquara, 2002. 83p. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in vitro* the effect of the root surface conditioning with basic fibroblast growth factor (b-FGF) about morphology and density of fibroblasts. Dentin slices of with 4 mm² of surface area were obtained from roots of teeth extracted due to severe periodontal involvement. These were scaled and sterilized. Ninety samples were randomly distributed into 3 groups according to treatment before application of b-FGF: non-treated – control; 50mg/mL of tetracycline HCl and EDTA 24%. The thirty samples of each group were distributed into 3 subgroups according to the concentration of b-FGF: 0 µg/mL – control; 50 µg/mL and 125 µg/mL. After treatments, the samples were incubated at 37°C and 98% humidity with 1mL of Eagle Medium with 1 x 10⁵ cells/mL of fibroblast from continuous lineage (McCoy Cells) plus 1mL this solution without cells during 24 hours. The samples were submitted to routine preparation for SEM and photographed at 500x (density celular) and 1000x (morphology celular). Three independent and blind examiners evaluated the fibroblast's morphology and density, according to Gamam et al. (1998) and Jenkins et al. (1998), respectively. Classification and Regression Trees test results indicated significant differences on the density

($p < 0,0001$) among EDTA, tetracycline and control groups with also differences between concentrations of 0/50 μ g and 125 μ g of b-FGF at the samples conditioning with EDTA ($p < 0,0001$) and between concentrations of 0 and 50/125 μ g of b-FGF at the samples conditioning with tetracycline($p < 0,0001$). The results of this test to morphology indicated significant differences between treatment or non-treatment with b-FGF, and that concentration of 125 μ g demonstrated to be more favorable than the concentration of 50 μ g. In conclusion, the treatment of root surfaces with b-FGF influenced the density and morphology, however at the samples conditioned with EDTA previously to the application of b-FGF, there was no improvement on the results over those obtained solely with EDTA.

Keywords: Guided tissue regeneration regeneration; fibroblast growth factor; fibroblasts.