

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Daniela Bazan Palioto

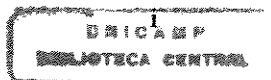
CIRURGIÃ DENTISTA

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**Influência da matriz protéica do esmalte associada ao
fator de crescimento insulina-símile sobre fibroblastos do
ligamento periodontal humano**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica na
Área de Periodontia.

PIRACICABA
- 2001-



2001/3246

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Daniela Bazan Palioto

CIRURGIÃ DENTISTA

**Influência da matriz protéica do esmalte associada ao
fator de crescimento insulina-símile sobre fibroblastos do
ligamento periodontal humano**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica na
Área de Periodontia.

Orientador: Prof Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima

Banca: Prof. Dr. Eduardo Jorge Feres Filho
Prof. Dr. Mario Taba Jr.
Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Suplentes: Prof. Dr. Marcio Ajudarte Lopes
Prof. Dr. Lauro Henrique de Souza Lins

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CUPG-038/83

02/07/2001

Assinatura do Orientador

PIRACICABA
- 2001-

Ficha Catalográfica

P176i Palioto, Daniela Bazan.
Influência da matriz protéica do esmalte associada ao fator de crescimento insulina-símile sobre fibroblastos do ligamento periodontal humano. / Daniela Bazan Palioto. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
xi, 79f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima.

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

I. Célula. 2. Matrix extracelular. 3. Cultura celular. I. Lima, Antonio Fernando Martorelli de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 20 de Junho de 2001, considerou a candidata DANIELA BAZAN PALIOTO aprovada.

1. Prof. Dr. ANTONIO FERNANDO MARTORELLI DE LIMA

2. Prof. Dr. EDUARDO JORGE FERES FILHO

3. Prof. Dr. MARIO TABA JUNIOR

4. Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

5. Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

José Maria e Roselena.

Pela dedicação incansável e irrestrita, sempre atentos a todos os detalhes, nunca medindo esforços para que eu possa realizar todos os meus sonhos.

A eles, o meu amor eterno.

Às minha irmãs,

Anna Julia e Maria Carolina,

Pela convivência mais próxima durante o tempo deste trabalho. Com alegria e carinho.

Ao Tônico,

que nunca colocou barreiras para meu crescimento profissional e que, mesmo distante, sempre se faz presente.

AGRADECIMENTOS

A Deus,
a ciência perfeita.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima,
por ter orientado toda minha formação acadêmica. É baseado em tudo que aprendi
nesses tantos anos que hoje sinto-me apta a buscar novos objetivos. Seus exemplos de
dignidade, ética e busca constante da excelência em tudo que faz, sempre nortearão
minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, pela orientação zelosa e diária. Pela habilidade em transmitir as bases fundamentais para realização desse projeto e principalmente, pela convivência enriquecedora durante todo esse período.

Ao Prof. Dr. Edgard Graner, por ter dado crédito à idéia deste trabalho. Pelo suporte valioso e sugestões sempre pertinentes.

A Área de Patologia Bucal dessa faculdade na pessoa do Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, pela total disponibilidade de utilização do laboratório.

Ao amigo Julio Cesar Joly e à amiga Cristina Cunha Villar, que mesmo não trabalhando diretamente neste trabalho, nunca mediram esforços para que tudo pudesse ser concluído.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro e científico na forma de Bolsa de Doutorado e de Auxílio à Pesquisa.

Ao Prof. Dr. Hermano de Medeiros Ferreira Tavares, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Prof^a. Dr^a. Altair Antoninha Del Bel Cury, Coordenadora de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Prof^a. Dr^a. Brenda Paula F. A. Gomes, Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica.

Aos Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Prof. Dr. Sérgio de Toledo, Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum e Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior, da Área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela participação na minha formação acadêmica.

Aos pacientes, que gentilmente cederam seus dentes para este estudo.

Ao pesquisador José Eduardo Corrente, pelo suporte estatístico.

À nossa grande Eliete Aparecida Ferreira Lima, secretária da Periodontia pela ajuda sempre pronta e incansável.

Aos funcionários Ana Maria do Amaral Godoy, Maria Helena de Vasconcelos Peron, Adriano Luís Martins, Aparecida Conceição Capion, Eliene Aparecida Orsini Narvaes Romani e Paulo Roberto Rizzo do Amaral, pela colaboração.

Aos amigos do curso de estomatopatologia, em especial à Paola e o Hercilio Jr. pela grande ajuda prestada.

Aos amigos Lauro Henrique Souza Lins e Patricia Cury, pelos momentos de apoio prático e moral.

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica - Área de Periodontia.

SUMÁRIO

Capítulos	Página
Resumo	2
Abstract	4
Introdução Geral	5
Processo Embriológico do Periodonto de Sustentação	6
Processo Regenerativo	8
Fibroblastos do Ligamento Periodontal	9
Matriz Protéica do Esmalte e Fatores de Crescimento	11
Trabalhos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	13
Capítulo 1. Comparações histológica, proliferativa e de síntese protéica de fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal	14
Resumo	15
Introdução	16
Proposição	17
Material e Métodos	18
Resultados	23
Discussão	32
Referências	35
Capítulo 2. Influência da matriz protéica do esmalte associada ao fator de crescimento insulina-símile sobre fibroblastos do ligamento periodontal humano	37
Resumo	38
Introdução	39
Proposição	43
Material e Métodos	44
Resultados	49
Discussão	55
Referências	58
Conclusão Geral	63
Referências Bibliográficas	65
Apêndice	73

Resumo

Resumo

O conhecimento das diferenças morfológicas e proliferativas de fibroblastos do ligamento periodontal (FLP) e fibroblastos gengivais (FG) são fundamentais para o melhor entendimento do papel destas células nos eventos de homeostasia, doença e regeneração periodontal. O primeiro objetivo desse estudo foi comparar as características morfológicas, o potencial proliferativo e a síntese protéica de FLP e de FG. Os fibroblastos foram cultivados pela técnica do explante a partir de fragmentos gengival e do ligamento periodontal de um mesmo paciente. As células foram isoladas e plaqueadas para análise em microscopia de contraste de fase e microscopia óptica. O índice de proliferação celular foi determinado por contagem automática de células nos dias 1, 4, 7, 15 e 21 e pelo ensaio de incorporação de bromodioxiuridina (BrdU). A síntese de proteína total foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida e zimografia. Os resultados mostraram que FLP são maiores e mais alongados que os FG em condições de subconfluência e confluência celular. Os FLP proliferam mais rapidamente que os FG nos períodos de 1, 4 e 7 dias ($P < 0,05$). Nos períodos subsequentes de 15 e 21 dias, não houve diferença estatística significativa entre o número de células dos dois tipos celulares. O índice de incorporação de BrdU demonstrou potencial proliferativo de $65,1 \pm 11,0$ % para FLP e $41,2 \pm 17,1$ % para FG ($P < 0,05$). A síntese de proteína total verificada em nosso experimento no período de 24 horas mostrou resultados similares para FLP e FG. Nossos resultados demonstraram que FLP e FG são diferentes na morfologia e na capacidade proliferativa, porém são semelhantes na síntese protéica. O segundo objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da matriz protéica do esmalte (EMD), do fator de crescimento insulina-símile (IGF-I) e da associação dos dois fatores sobre o potencial proliferativo e a capacidade de adesão e migração celular de fibroblastos do ligamento periodontal humano. Esse estudo foi conduzido utilizando a análise de proliferação por contagem automática de células (Coulter Counter®), a análise de adesão celular por avaliação colorimétrica com leitor ELISA. E os experimentos de migração foram realizados em Câmara de Boyden (Transwell®) num período de 4h e o índice de migração foi avaliado por ensaio colorimétrico em leitor de ELISA. O EMD aumentou significativamente a proliferação celular a partir da dosagem mínima de 50 $\mu\text{g/ml}$ até 200 $\mu\text{g/ml}$ no período de 24h e continuou estimulando a proliferação celular nos períodos de 3, 7 e 10 dias ($P < 0,05$). O IGF-I não alterou o índice de proliferação de FLP ($P > 0,05$). A associação de EMD + IGF-I aumentou o índice de proliferação celular independente das concentrações utilizadas. Entretanto, a associação não produziu um efeito adicional em relação a utilização de EMD sozinho. A adesão celular não foi modificada significativamente pela utilização de EMD, IGF-I ou a associação dos dois fatores ($P > 0,05$). Os fatores também não promoveram resultados diferentes do controle negativo para a migração celular ($P > 0,05$). Nossos resultados demonstraram que EMD tem um efeito estimulador da proliferação celular mas não atua de forma efetiva na adesão e migração celular. O IGF-I tem atuação desprezível nas células do ligamento periodontal e sua associação ao EMD não parece promover resultados favoráveis adicionais tanto para proliferação como adesão e migração celular.

Abstract

Abstract

The knowledge of morphological and proliferative differences between Gingival Fibroblasts (GF) and Periodontal Ligament Fibroblast (PDL) is essential to understand the role of each cell on the homeostasis, disease process and regeneration of the periodontium. The first objective of this study was to compare the PDL and GF morphology, proliferation rate and protein synthesis. PDL and GF were explanted from tissues of the same patients. To characterize and compare the cells morphology, PDL and GF were plated for optical and phase contrast microscopy. The proliferation rates were determined by automated count at days 1, 4, 7, 15 and 21, and by Bromodeoxyuridine Labelling Index (BrdU). The total protein content was analyzed by means of electrophoresis in 10% polyacrylamide gel and zymography containing gelatin as substrate. PDL were greater and more elongated than GF in subconfluence and confluence conditions. The proliferative rate of PDL was higher than GF at 1, 4, and 7 days ($P < 0.05$). At 15 and 21 days there was no statistically significant difference between cells number. The BrdU Index demonstrated a proliferative potential of 65.1 ± 11.0 % for PDL and 41.2 ± 17.1 % for GF ($P < 0.05$). The synthesis of protein in a period of 24 hours was similar for both PDL and GF. Our results demonstrated that PDL and GF are different in morphology and in proliferative capacity, however, they do not differ in protein synthesis. The second objective of the present study was to evaluate the effects of the enamel matrix protein (EMD) the effects of Insulin growth factor-I (IGF-I) and the association of the these two factors on periodontal ligament fibroblasts. The study was based on the proliferation rate, and cellular attachment and migration. The proliferation rate was determined by counting the cells after 1, 3, 7 and 10 days with the help of a automated counter (Coulter Counter). The cellular attachment was analyzed by means of colorimetric assays. Migration assays was performed in Boyden chambers for a period of 4h and analyzed by means of colorimetric assays. EMD has significantly raised the proliferation rate from a minimum concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ up to maximum concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$ in a 24h period. The proliferation rate continuing to be raised in a period of 3, 7 and 10 days ($P < 0.05$). IGF-I has not altered the proliferation rate at any concentration. The association of EMD + IGF-I raised the proliferation rate independently of the concentration. However, the association has not resulted on further significant effect when compared to the use of EMD alone. The cellular attachment and migration was not altered by EMD, IGF-I or EMD + IGF-I. Our results showed that EMD increased the proliferation rate of PDL but did not improve cellular attachment and migration. IGF-I did not raise neither the proliferation rate nor the cellular attachment and migration and did not have any additional effect on the EMD alone.

Introdução Geral

Introdução

Processo Embriológico do Periodonto de Sustentação

O periodonto tem origem embriológica a partir dos folhetos ectodérmicos e mesodérmicos. O folículo dental é uma estrutura bem definida que formada se formar a partir de células mesenquimais que circundam o órgão do esmalte (TEN CATE, 1994). Células do epitélio interno e externo do órgão do esmalte migram apicalmente dando origem a bainha epitelial de Hertwig que durante a formação da raiz dental terá a membrana basal fragmentada. As células da bainha epitelial de Hertwig fragmentada irão desenvolver retículo endoplasmático rugoso para secretar ativamente uma classe distinta de proteínas do esmalte da família das amelogeninas, que constituirá uma matriz hipermineralizada e não-colagênica. Essa matriz, que tem sido chamada ou reconhecida como enameloíde, já foi também descrita como camada hialina de Hopewell-Smith ou ainda cemento intermediário (HARRISON & RODA, 1995).

Em 1982, LINDSKOG & HAMMARSTROM foram os primeiros a investigar a possível presença desta camada altamente mineralizada em animais superiores. Os autores mostraram que essa camada tem origem similar ao esmalte aprismático sendo portanto produto de células epiteliais. A bainha epitelial de Hertwig participa da formação da camada mineralizada mas não participa da formação do cemento acelular. Sendo assim, a matriz mineralizada além de ser uma barreira externa da dentina, teria a função precursora na cementogênese durante o desenvolvimento da raiz e no processo de regeneração periodontal (HARRISON & RODA, 1995). Secretada a matriz, as células mesenquimais do folículo dental passarão através da rede deixada pela bainha epitelial de Hertwig fragmentada, e em contato com a matriz mineralizada (interação matriz-célula) serão induzidas a se diferenciarem em cementoblastos, desenvolvendo todas as características de células produtoras e secretoras de proteínas. Depois de sua

diferenciação, elas começam a depositar uma substância orgânica sobre a superfície radicular e ao redor de fibras em formação do ligamento, chamadas fibras extrínsecas. Esse seria o cimento acelular de fibras extrínsecas ou cimento primário (TEN CATE, 1994). Tem sido proposto que a matriz protéica mineralizada liga a dentina radicular à primeira camada de cimento acelular para possibilitar a inserção das fibras do ligamento periodontal.

TEN CATE sugere em 1997 que a formação do cimento acelular primário seria a condição para formação conseqüente do ligamento periodontal e do osso alveolar. Depois que o dente entra em oclusão, um cimento menos mineralizado é formado ao redor dos dois terços apicais da raiz. Nessa situação, os cementoblastos que podem ter fenótipo diferente dos cementoblastos do cimento primário, ficam envolvidos pela matriz caracterizando o cimento celularizado. Esse cimento contém fibras colágenas que são claramente derivadas de duas fontes – fibras extrínsecas do ligamento periodontal e fibras intrínsecas resultado da atividade cementoblástica.

O ligamento periodontal se forma a partir do folículo dental logo após o começo do desenvolvimento da raiz. A intensa taxa de divisão celular resulta um número aumentado de células que crescem e rapidamente assumem a função de fibrogênese, formando as fibras colágenas do periodonto. Enquanto o ligamento periodontal está sendo formado, o osso está sendo depositado ao redor das bandas de fibras colágenas em desenvolvimento (TEN CATE 1994).

Há portanto, evidências de que os tecidos de suporte do dente tem origem embriológica específica a partir do folículo dental. As células progenitoras permanecem no espaço perivascular para a reposição das populações de cementoblastos, fibroblastos e osteoblastos.

Processo Regenerativo

A Periodontia hoje, como ciência, tenta explicar os fundamentos biológicos das respostas celulares e teciduais seletivas que ocorrem como resultado dos procedimentos terapêuticos regenerativos. Os experimentos em biologia molecular e celular podem ser utilizados para identificar possíveis moléculas que induzam essas células à recapitular os processos embriológicos de formação periodontal e conseguir restaurar em sua forma e função, a estrutura periodontal perdida.

No final da década de 70 começaram a ser elaborados os conceitos sobre regeneração periodontal e, desde então, diversas técnicas e materiais biológicos e sintéticos vem sendo pesquisados. Um grande avanço foi a introdução da técnica denominada regeneração tecidual guiada, que utiliza uma barreira física para excluir os tecidos epitelial e conjuntivo gengival e proteger o coágulo sangüíneo, possibilitando que as células do ligamento periodontal remanescente e do endósteo adjacente possam repovoar a superfície radicular tratada desprovida do ligamento periodontal e de cemento (GOTTLOW et al., 1986).

Os resultados do procedimento de regeneração tecidual guiada podem ser limitados pela modificação da qualidade da superfície radicular, pelo tipo de defeito e pela quantidade de ligamento periodontal remanescente, pois, fundamentalmente, o resultado de um procedimento regenerativo depende do fenótipo das células que repovoarem o sítio a ser regenerado (MELCHER, 1976). Entretanto, a expressão fenotípica é dependente de fatores relacionados ao ambiente, como por exemplo, a matriz que regula não só a atividade celular intrínseca mas também modula a recepção de sinais (NATHAN & SPORN, 1990). A regeneração periodontal requer especificamente células do ligamento periodontal, como demonstrado por BOYKO et al.

(1981) que colocaram fibroblastos do ligamento periodontal e gengival em contato com a superfície radicular que foi posteriormente inserida em alvéolos artificiais preparados em áreas desdentadas de cães. Apesar de algumas áreas de anquilose, os autores puderam observar áreas com ligamento periodontal neoformado inserido em novo cemento. Esses resultados só foram observados quando fibroblastos do ligamento periodontal foram utilizados (BOYKO et al. 1981; LANG et al., 1995).

No processo de cura periodontal o ligamento executa funções cruciais, tais como, promove a formação de novas fibras, previne a migração apical do epitélio e gera células para restaurar novo osso e novo cemento, além de agir como um sensor biológico regulando sua própria largura. É claro, portanto, que existe uma demanda constante por novos cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal na medida em que o aparato de suporte dos dentes se remodela (BEERTSEN et al., 1997).

Por ser o periodonto formado por três tipos diferentes de tecido conjuntivo, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar propriamente dito, torna-se bastante difícil sua regeneração. Para que possa haver regeneração são necessários vários fenômenos sincronizados como por exemplo a diferenciação, proliferação, migração e adesão celular, produção e mineralização da matriz do cemento e do osso (MCCULLOCH, 1993).

Fibroblastos do Ligamento Periodontal

Os principais tipos celulares relacionados com os tecidos de suporte dos dentes são fibroblastos, cementoblastos e osteoblastos. Essas células diferenciam-se a partir de um mesmo precursor mas possuem funções distintas e por isso tornam complexo o processo de regeneração periodontal. Além dessas, o ligamento periodontal contém os restos epiteliais de Malassez que são células derivadas da bainha epitelial de Hertwig

(WESSELINK & BEERTSEN, 1993). O papel dos restos epiteliais de Malassez continua não bem esclarecido na literatura.

Os fibroblastos são as células mais comuns e funcionalmente mais importantes do tecido conjuntivo, exibem contratilidade e mobilidade, funções que contribuem para a organização estrutural do tecido, especialmente durante o desenvolvimento do ligamento. Estas células são capazes de sintetizar e fagocitar colágeno e componentes da matriz extracelular (TEN CATE, 1976), produzir citocinas que tem a capacidade de mediar a destruição tecidual e estimular a reabsorção óssea (GENCO, 1992), secretar inibidores de metaloproteinases como os inibidores colagenolíticos que tem papel regulador na destruição conjuntiva (OVERALL & SODEK, 1990).

As células progenitoras do ligamento periodontal são encontradas adjacente aos vasos sanguíneos contíguos ao endósteo e exibem características de células indiferenciadas como tamanho pequeno, capacidade de resposta a fatores estimulantes e ciclo metabólico lento (GOULD et al., 1980). No periodonto com função normal, há uma renovação celular relativamente modesta, essencial para manter a homeostasia, com equilíbrio entre a apoptose e a proliferação (MCCULLOCH & MELCHER 1983). Um grande aumento na formação e diferenciação celular pode ser percebido quando da aplicação de forças ortodônticas e no processo de reparo alveolar (LEKIK & MCCULLOCH, 1996).

Os fibroblastos do ligamento sob condições fisiológicas ou durante o processo de cura, têm a capacidade de migrar através do tecido em direção apico-coronal, o que parece acontecer diretamente ao redor das fibras colágenas (PERERA & TONGE, 1981). A migração dos fibroblastos periodontais é dependente de um substrato propício e estímulo quimiotático apropriado - medidas de adesão e migração no coágulo sanguíneo mostraram que a fibronectina é necessária para a migração dessas células

(KNOX et al., 1986). Alguns produtos derivados do cimento e do osso bovino mostraram potente atividade quimiotática para células do ligamento (OGATA et al., 1994).

Os fibroblastos gengivais tem semelhança morfológica com os do ligamento periodontal, entretanto, são células funcionalmente diferentes (HASSEL, 1993). Por exemplo, os fibroblastos do ligamento periodontal são ricos na síntese de fosfatase alcalina (GROENEVELD et al., 1994). Esta enzima atua no metabolismo do fosfato, provavelmente iniciando o processo de mineralização óssea (ARCEO et al., 1991) e talvez na formação de cimento acelular (GROENEVELD et al., 1995). Os fibroblastos gengivais proliferam mais rapidamente que os fibroblastos do ligamento periodontal (MARIOTTI & COCHRAN, 1990). Quando analisadas separadamente essas características não são específicas para células do ligamento periodontal, mas em conjunto, indicam atributos funcionais importantes nos processos regenerativos.

Matriz Protéica do Esmalte e Fatores de Crescimento

A indicação do uso de matriz protéica do esmalte para favorecer a regeneração periodontal esta sustentada pelos resultados de pesquisas científicas que indicam a atividade dessas proteínas durante a embriogênese do cimento, do ligamento e do osso alveolar propriamente dito e, em 1997 foi relatada a utilização de uma matriz protéica do esmalte purificada a partir do folículo dental de embriões de porcos (Emdogain® - EMD) que encontra-se comercialmente disponível (HAMMASTRÖM et al., 1997, GESTRELIUS et al., 1997a, HEIJL et al., 1997).

A maior parte das proteínas da matriz do esmalte é conhecida como amelogeninas. Estas proteínas constituem cerca de 90% da matriz, os outros 10% incluem ameloblastina, amelina, proteínas não-amelogênicas, proteínas ricas em prolina, tuftelina, proteínas plasmáticas e proteínas salivares (BROOKES et al., 1995).

As amelogeninas, existem em diferentes tamanhos, e juntas formam agregados supra moleculares. Esses agregados estabilizam os cristais de esmalte formados e influenciam o crescimento desses cristais em tamanho. Nos dentes humanos, essas proteínas foram encontradas até no final da formação apical da raiz (LINDSKOG & HAMMARSTROM, 1982; HAMMARSTROM, 1997).

GESTRELIUS et al., (1997)b pesquisaram o efeito do Emdogain® (EMD) no comportamento migratório, adesão, proliferação, biosíntese e formação de nódulos de mineralização de fibroblastos do ligamento periodontal. Esses autores determinaram também se havia algum fator de crescimento na matriz derivada do esmalte, uma vez que as matrizes extracelulares podem ligar e reter polipeptídeos. Os autores concluíram que a utilização de EMD aumenta a proliferação, a biosíntese de colágeno e de proteína total dos fibroblastos do ligamento periodontal, e promove nódulos de mineralização, entretanto, essa matriz não tem efeito na migração ou adesão dessas células. Os autores não encontraram fatores de crescimento na matriz protéica de esmalte isolada de embriões de porcos.

Fatores de crescimento são polipeptídeos ativos naturais, semelhantes aos hormônios em estrutura e função, com ação local e difundidos ao redor das células que os secretam (WIRTHLIN, 1989). Os fatores de crescimento regulam os processos biológicos de migração, adesão, proliferação, diferenciação celular e síntese protéica (CAFESSE & QUIÑONES, 1993; COCHRAN & WOZNEY 1999). Dentre os fatores de crescimento de interesse na Periodontia podem ser citados a proteína óssea morfogenética (BMP), fator de crescimento do cemento (CGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento insulina-símile (IGF).

NARAYANAN & YONEMURA (1993) identificaram um fator de crescimento caracterizado apenas no cemento dental, capaz de promover migração e crescimento

de células progenitoras de cementoblastos, denominado fator de crescimento do cimento (CGF). IKEZAWA et al. (1997) encontraram evidências que indicam que o fator de crescimento do cimento (CGF) é da mesma família que o fator de crescimento insulina-símile IGF-1.

Trabalhos *in vitro* e *in vivo*

A utilização de matriz protéica do esmalte tem demonstrado resultados interessantes em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Como coadjuvante ao tratamento periodontal regenerativo foi demonstrada a formação de cimento acelular em defeitos periodontais induzidos em macacos (HAMMARSTRÖM et al., 1997). HEIJL (1997) encontrou em biópsia humana, 63% da superfície radicular tratada ocupada por tecido periodontal regenerado. O ganho clínico de inserção conseguido com a utilização de matriz protéica de esmalte é similar ao ganho proporcionado pela técnica de regeneração tecidual guiada (SCULEAN et al., 1999a; HEDEN ET AL., 1999). SCULEAN et al., (1999b) e PONTORIERO et al., (1999) compararam o uso do EMD e a técnica de regeneração tecidual guiada no tratamento de defeitos intraósseos. Embora esses estudos pareçam promissores, ainda não foi possível confirmar a regeneração total do periodonto.

Capítulo 1

Comparações histológica, proliferativa e de síntese protéica de fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal

Resumo

O conhecimento das diferenças morfológicas e proliferativas de fibroblastos do ligamento periodontal (FLP) e fibroblastos gengivais (FG) são fundamentais para o melhor entendimento do papel destas células nos eventos de homeostasia, doença e regeneração periodontal. O objetivo desse estudo foi comparar as características morfológicas, o potencial proliferativo e a síntese protéica de FLP e de FG. Os fibroblastos foram cultivados pela técnica do explante a partir de fragmentos gengival e do ligamento periodontal de um mesmo paciente. As células foram isoladas e plaqueadas para análise em microscopia de contraste de fase e microscopia óptica. O índice de proliferação celular foi determinado por contagem automática de células nos dias 1, 4, 7, 15 e 21 e pelo ensaio de incorporação de bromodioxiuridina (BrdU). A síntese de proteína total foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida e zimografia. Os FLP são maiores e mais alongados que os FG em condições de subconfluência e confluência celular. Os FLP proliferam mais rapidamente que os FG nos períodos de 1, 4 e 7 dias ($P < 0,05$), entretanto, nos períodos subsequentes de 15 e 21 dias, não houve diferença estatística significativa entre o número de células dos dois tipos celulares. O índice de incorporação de BrdU demonstrou potencial proliferativo de $65,1 \pm 11,0$ % para FLP e $41,2 \pm 17,1$ % para FG ($P < 0,05$). A síntese de proteína total verificada em nosso experimento no período de 24 horas mostrou resultados similares para FLP e FG, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Nossos resultados demonstraram que FLP e FG são diferentes na morfologia e na capacidade proliferativa, porém são semelhantes na síntese protéica.

Introdução

A doença periodontal é um processo inflamatório caracterizado pela perda dos tecidos de suporte - ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (Gestrelius et al., 1997⁶). A partir da publicação de Melcher¹⁴ (1976) que demonstrou que o periodonto contém células com potencial regenerativo, o principal objetivo do tratamento tem sido a regeneração previsível dos tecidos periodontais perdidos. A resposta seletiva a partir de fibroblastos derivados do ligamento periodontal favorece o processo regenerativo com a formação de novo cemento, ligamento periodontal e osso alveolar em área anteriormente envolvida pela doença (McCulloch, 1993¹³). Sendo assim, a caracterização e comparação das células do ligamento periodontal com células de outros tecidos tem sido essencial para que se possa entender a participação celular no processo de regeneração.

Fibroblastos do ligamento periodontal são morfologicamente semelhantes mas funcionalmente diferentes dos fibroblastos gengivais (Hassel, 1993⁹). Por exemplo, os fibroblastos do ligamento periodontal são ricos na síntese de fosfatase alcalina (Groeneveld et al., 1994⁸), enzima que atua no metabolismo do fosfato, provavelmente iniciando o processo de mineralização óssea (Arceo et al., 1991¹), e talvez atue na formação de cemento acelular (Groeneveld et al., 1995⁷). Entretanto, Carnes et al.⁴, (1997) demonstraram que tanto células do tecido conjuntivo gengival como do ligamento periodontal podem exibir fenótipos de células osteoblásticas. Os fibroblastos do ligamento periodontal proliferam mais rapidamente (Mariotti & Cochran, 1990¹¹) e sintetizam mais matriz extracelular do que os fibroblastos gengivais (Somerman et al., 1988¹⁶). Essas características não são específicas para células do ligamento periodontal, mas em conjunto, indicam atributos funcionais importantes nos processos regenerativos.

Nyman et al.¹⁵ (1982) demonstraram que o contato do tecido conjuntivo gengival com a superfície radicular tratada podia ocasionar reabsorção radicular. Boyko et al.³ (1981) colocaram fibroblastos do ligamento periodontal e gengival em contato com a superfície radicular que foi posteriormente inserida em alvéolos artificiais preparados em áreas desdentadas de cães, e demonstraram que a regeneração periodontal requer especificamente células do ligamento periodontal. Apesar de algumas áreas de anquilose, os autores puderam observar áreas com ligamento periodontal neoformado inserido em novo cimento. Esses resultados só foram observados quando fibroblastos periodontais foram utilizados não acontecendo o mesmo com fibroblastos gengivais (Lang et al., 1995¹⁰).

O objetivo desse estudo foi comparar as características morfológicas, o potencial proliferativo e a síntese protéica de fibroblastos isolados do ligamento periodontal (FLP) e do tecido gengival (FG) provenientes de um mesmo paciente.

Materiais e Métodos

Culturas primárias de FLP e FG

As culturas primárias de fibroblastos do ligamento periodontal (FLP) e Fibroblastos Gengivais (FG) foram obtidas pela técnica do explante (Somerman et al., 1988¹⁸) com algumas modificações. Os fragmentos do ligamento periodontal foram obtidos de pré molares extraídos por razão ortodôntica de uma paciente de 12 anos de idade e os fragmentos de gengiva foram obtidos aproveitando o retalho levantado para realização da extração, após a anuência do seu responsável que assinou o consentimento formal e esclarecido, de acordo com os preceitos emanados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Os pré molares extraídos foram lavados gentilmente com soro fisiológico e com auxílio de uma cureta foi removido o ligamento periodontal do terço médio da raiz. O material foi plaqueado em wells de 35 mm de diâmetro (Corning Cortar® - USA) contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) acrescidos de 150 mg/ml de ampicilina G, 10% de SFB (soro fetal bovino) e estabilizados com lâminas de vidro de 1,0 cm². As culturas foram incubadas à temperatura de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O fragmento gengival foi cortado em fragmentos de aproximadamente 1mm³, incubados em meio de cultura e transferidos para frascos de cultura de 25cm². O crescimento celular foi monitorado e o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. A concentração de ampicilina G foi reduzida para 50mg/ml após 15 dias de cultivo.

Ao atingirem a confluência, as células foram subcultivadas. Na subcultura as células foram lavadas em tampão fosfato salino acrescido de 0,1% EDTA e tratadas com solução de tripsina a 0,1% e transferidas para frascos de cultura de 75 cm² caracterizando a primeira passagem (P1). Foram utilizadas somente as células entre a 1º e 10º passagens para realização dos experimentos.

Ensaio para determinação da presença de fosfatase alcalina

FLP e FG (3 x 10⁴) foram cultivados em lâminas de vidro para cultura (Lab-Tek-Nunc) à 37°C em atmosfera umedecida e 5% de CO₂ por 48 h. Em seguida a incubação, as células foram lavadas em PBS e fixadas em etanol 70% por 1 h. Após nova lavagem em PBS, as células foram incubadas por 5 min com 500 µl de tampão de revelação (1M Tris-HCl, pH 9,4; 4M CaCl₂; 4M MgCl₂) contendo 7,5 mg/ml do nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma) e 5 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP, Sigma). A positividade foi verificada por marcação citoplasmática microvesicular.

Morforlogia celular

Microscopia de fase

FLP e FG em 3ml de DMEM acrescido de 10% soro fetal bovino foram plaqueados em frascos de cultura de área 75 cm² a uma concentração de 10⁵ células e mantidas à 37°C, atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24h. Em seguida, as células foram incubadas com meio de cultura fresco por períodos que variaram de 1 a 5 dias. Diariamente as células foram analisadas e fotografadas em condições de subconfluência e confluência em microscópio de fase invertido equipado com máquina fotográfica (Leica) .

Microscopia óptica

FLP e FG foram plaqueados nas densidades de 3 x 10⁴ e 6 x 10⁴ células/well em lâminas de vidro para cultura de 8 wells (LabTek, Nalge Nunc Int, Naperville IL, USA) e mantidas à 37°C, atmosfera úmida contendo 5% CO₂ por 24h. As células aderidas as lâminas foram fixadas em 70% etanol, coradas pela técnica convencional de hematoxilina & eosina (H&E) e examinadas a microscopia de luz.

Análise da Proliferação celular

Índice de Crescimento Celular

FLP e FG (3 x 10⁴ células/well) em 2ml de DMEM acrescidos de 10% SFB foram plaqueados e cultivados em placas de cultura de 24-well à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Transcorrido 16h os well foram lavados com PBS e o meio de cultura substituído por DMEM sem SFB. Após 16h as células foram novamente incubadas com DMEM acrescido de 10% SFB. O índice de crescimento celular foi determinado por contagem da população celular nos dias 1, 4, 7, 15 e 21 usando

contador automático de células (Coulter Counter – Beckman). Esses experimentos foram realizados em triplicata.

Índice de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU)

FLP e FG (3×10^4) em 0,5 ml de DMEM acrescido de 10% SFB foram plaqueados em lâminas de vidro tratadas para cultura celular (LabTek, Nalge Nunc Int, Naperville IL, USA) e cultivados à 37° C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ por 24 h. Em seguida, as células foram lavadas em PBS e incubadas em mesmo meio acrescido de BrdU (Amersham Life Sci Inc., Arlington IL USA) na diluição 1:1000. Após 1 h de incorporação de BrdU as células em proliferação foram reveladas por análise imunohistoquímica utilizando protocolos descritos pelo fabricante (Kit de proliferação celular – Amersham Inc.). Resumidamente, após fixação, as células foram lavadas em PBS e 500 μ l de uma solução aquosa de 4M HCl foi adicionada e mantida por 30 min para se obter a separação da dupla fita do DNA. Após a ação desnaturante da solução as células foram lavadas 3 vezes com PBS acrescida de 0,1% Tween 20 (Sigma) incubadas por 30 min com solução de 3% albumina sérica bovina (BSA) para inibir ligação inespecífica. O anticorpo monoclonal anti-BrdU conjugado à biotina foi incubado na concentração 1/200 durante 2h, seguido por incubação com estreptavidina-peroxidase por 1h. A reação foi revelada com 3'3-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB, Sigma) em PBS acrescido de 0,05% H₂O₂. O índice de incorporação foi expresso como porcentagem de células marcadas com BrdU e representada a contagem de 500 células de cada linhagem celular, utilizando sistema de imagem Zeiss (KONTROM 400). A omissão de BrdU ou do anticorpo primário foi utilizado como controle negativo da reação.

Síntese de Proteína Total

FLP e FG foram plaqueados em duplicata em placas de 24-wells na concentração de 6×10^4 células/well e cultivados à 37°C em atmosfera umedecida e 5% de CO₂ por 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com DMEM acrescido ou não de 10% SFB e cultivadas por um período adicional de 24 h. Os sobrenadantes celulares foram coletados e as células incubadas em tampão de lise contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5mM EDTA; 1% Tween 20; 2mM PMSF; 2mM NEM sob agitação à 4°C por 30 min.

Dosagem Protéica

A concentração protéica foi determinada como descrito por Bradford² (1976) utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Resumidamente, 100 μ l de sobrenadante e 10 μ l do extrato celular foram adicionados a 200 μ l do reagente de Bradford (BIO-RAD Protein Assay) e o volume total foi ajustado para 1000 μ l completando a amostra com água deionizada. Para a calibração do espectrofotômetro (Spectronic® – Genesis™) foi utilizada a solução de branco (200 μ l da solução de Bradford + 800 μ l de água deionizada), em luz visível de comprimento de onda de 595 nm. Os valores da absorbância das amostras foram transferidos para o gráfico da curva de Bradford, feito a partir de solução padrão de BSA, nas concentrações 1 μ l a 10 μ l. (Gráfico 1). Foram evitados valores de absorbância próximos as extremidades da curva do gráfico de Bradford, utilizando a região central do gráfico, caracterizada por uma reta.

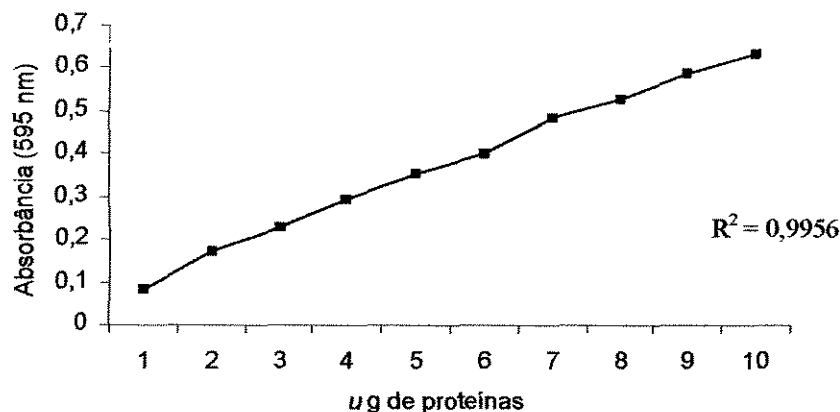


Gráfico 1. Curva Padrão de Bradford, realizada com concentrações crescentes de BSA.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Concentração protéica similar do sobrenadante e do extrato celular das culturas de FLP e FG foi misturada com tampão de amostra redutor (2% SDS; 125 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10% glicerol; 0,001% azul de bromofenol; 2% mercaptoetanol), fervida por 5 min, submetida a separação protéica por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) e corado em Coomassie blue R 250 (Bio Rad).

Análise Zimográfica

A análise zimográfica foi realizada como descrita por Coletta et al⁵. (1999). Resumidamente, concentração protéica equivalente do sobrenadante e do extrato celular das culturas FLP e FG foram incubados com tampão de amostra não redutor e submetidas a eletroforese em 10% SDS-PAGE contendo 1,6 mg/ml de gelatina (Bio Rad) como substrato. Após eletroforese, o gel foi lavado duas vezes por 30 min em solução aquosa de 2% Triton X-100 e incubado por 16 h à 37° C em tampão de ativação composto por 10mM Tris-HCl pH 8,0 e 5mM CaCl₂. A seguir, o gel foi corado com Coomassie blue R 250 (Bio Rad). As proteínas com atividade gelatinolíticas foram observadas com bandas negativas. Para confirmação das enzimas com atividade

gelatinolítica como pertencentes ao grupo das metaloproteinases de matriz (MMP), foi adicionado ao tampão de ativação 2 mM de 1,10-fenantrolina (Sigma), um inibidor específico da ação enzimática de MMPs.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão dos grupos de fibroblastos. Para análise das diferenças entre os grupos foi utilizado o teste T de Student com critério bi-caudal, utilizando 5% como nível de significância.

Resultados

Após 2 semanas de cultura primária, as FG preenchiem mais de 70% do frasco, sendo então realizada a primeira subcultura. Por outro lado, a primeira subcultura de FLP só foi possível após 70 dias de cultivo primário. As células da gengiva e do ligamento periodontal, apesar da diferença na velocidade de crescimento, proliferaram em orientação paralela respeitando o espaço entre as membranas celulares. Em condições de confluência celular não foram observados empilhamento, desorganização ou morte celular. Ocorreu inibição por contato, como é característico para células normais. Após a décima primeira passagem foi observado redução na velocidade de crescimento e, próximo da décima quinta passagem, os dois tipos de fibroblastos não progrediram como inicialmente, sendo então descartados.

Ensaio para determinação da presença de fosfatase alcalina

A presença de fosfatase alcalina foi determinada pela coloração com NBT/BCIP. Neste método, a enzima fosfatase alcalina na presença de BCIP oxida o substrato NBT,

formando o subproduto diformazan, que precipita como grânulos azulados. Células positivas são observadas com marcação citoplasmática microvesicular correspondendo às regiões lisossomais. Neste estudo pudemos verificar que os FLP são positivos para a enzima fosfatase alcalina enquanto que os FG são negativos (Figura 1).

Morfologia celular

Em condições de subconfluência celular, os FLP e FG exibiram formato fusiforme com núcleo central e típicos prolongamentos citoplasmáticos. Os FLP foram maiores e mais alongados que os FG tanto em condições de subconfluência como de confluência celular (Figura 2). A coloração das células pela técnica convencional de H&E e análise em microscopia de luz confirmou essa observação (Figura 3). Em condições de saturação celular, o número de FG variou entre $16,2$ e $26,2 \times 10^4$ células/cm² com a média de $21,1 \pm 4,3 \times 10^4$ célula/cm², enquanto que o número de FLP variou entre $11,4$ e $19,8 \times 10^4$ célula/cm² com uma média de $15,9 \pm 3,5 \times 10^4$ célula/cm². O número de FG/cm² foi significativamente maior que o número de FLP ($P < 0,05$ - Tabela 1).

Proliferação celular

FLP e FG foram plaqueados a uma concentração de 3×10^4 células/well em placas de cultura de 24-wells e incubados por 16h em DMEM acrescido de 10% SFB seguido por incubação adicional de 16h em DMEM sem SFB. Um período de incubação em meio de cultura na ausência de SFB ou em níveis reduzidos é requerido previamente a estimulação celular com o objetivo de cessar as vias de ativação da proliferação celular por fatores de crescimento presentes no soro. É determinado que períodos superiores a 4h de ausência da influência de SFB são suficientes para reduzir o metabolismo celular aos níveis basais com conseqüente inibição da proliferação, sem prejuízo na viabilidade

celular (McAllister et al., 1995). A análise proliferativa dos FLP e FG é mostrada no Gráfico 2. Diferenças na relação de proliferação foram maiores para os FLP em todos os períodos analisados. Do dia 1 ao 7 as diferenças no número de células entre os grupos foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Nos dias 15 e 21 foi observado saturação no número de células, sendo a proliferação menos intensa. O índice de incorporação de BrdU também demonstrou que FLP apresentam maior potencial proliferativo que FG. A imunoreatividade para BrdU foi identificada em ambas as culturas celulares. Núcleos com coloração marrom, independente da intensidade de marcação, identificaram as células em proliferação. A tabela 1 mostra que FLP apresentaram índice de incorporação de BrdU significativamente maior que FG ($P < 0,05$). A porcentagem média de células do ligamento periodontal positivas para BrdU foi $65,1 \pm 11,0\%$, com mediana de 63,6% enquanto que FG apresentaram média de $41,2 \pm 17,1\%$, com uma mediana de 43,6%.

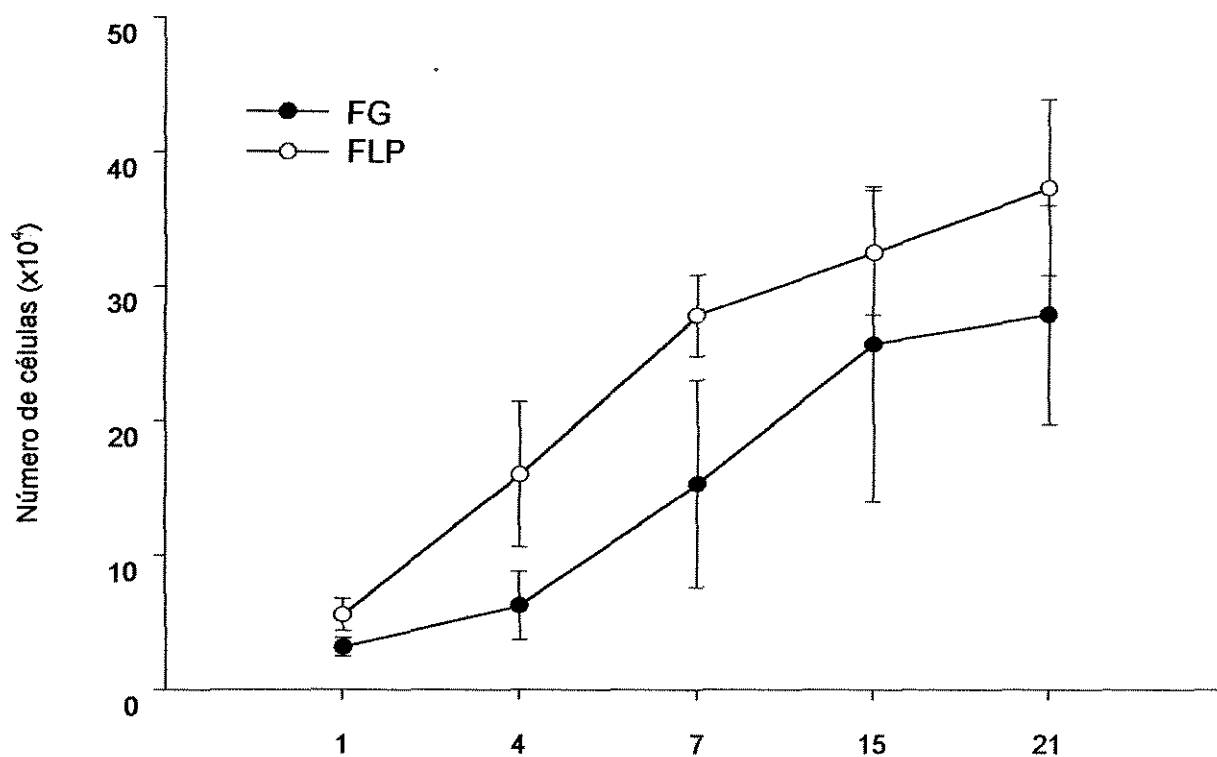


Gráfico 2. Relação de crescimento celular (índice de proliferação) para FLP e FG.

Tabela 1. Análise proliferativa pela incorporação de BrdU e contagem celular em confluência máxima por cm² para FLP e FG.

	BrdU	Células/cm ²
FLP	65,1 ± 11,0 % *	15,9 ± 3,5 x 10 ⁴
FG	41,2 ± 17,1%	21,1 ± 4,3 x 10 ^{4*}

* P < 0,05. Teste t.

Síntese de Proteína

A síntese de proteína total foi similar para FLP e FG cultivados na presença ou ausência de SFB, no período de 24 h (Figura 4). Quando o sobrenadante e o lisato celular de fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gelatina como substrato, foram identificadas enzimas com atividade gelatinolítica de massa molecular aproximadamente de 68 e 72 kDa (Figura 5), igualmente relacionada para as duas amostras. Estas enzimas correspondem a forma ativa e inativa de MMP-2. A inativação da atuação enzimática pela fenantrolina confirmou a origem das bandas como sendo pertencentes ao grupo das MMPs.

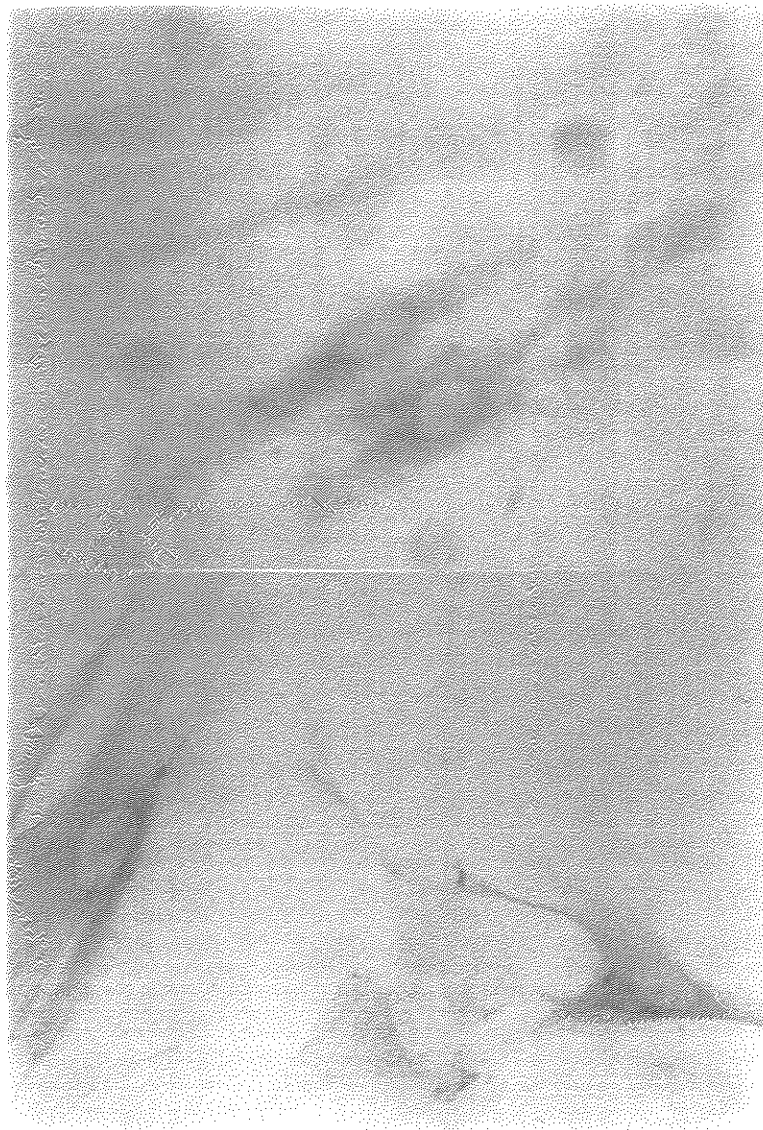


Figura 1. Ilustração da positividade para fosfatase alcalina expressa em FLP

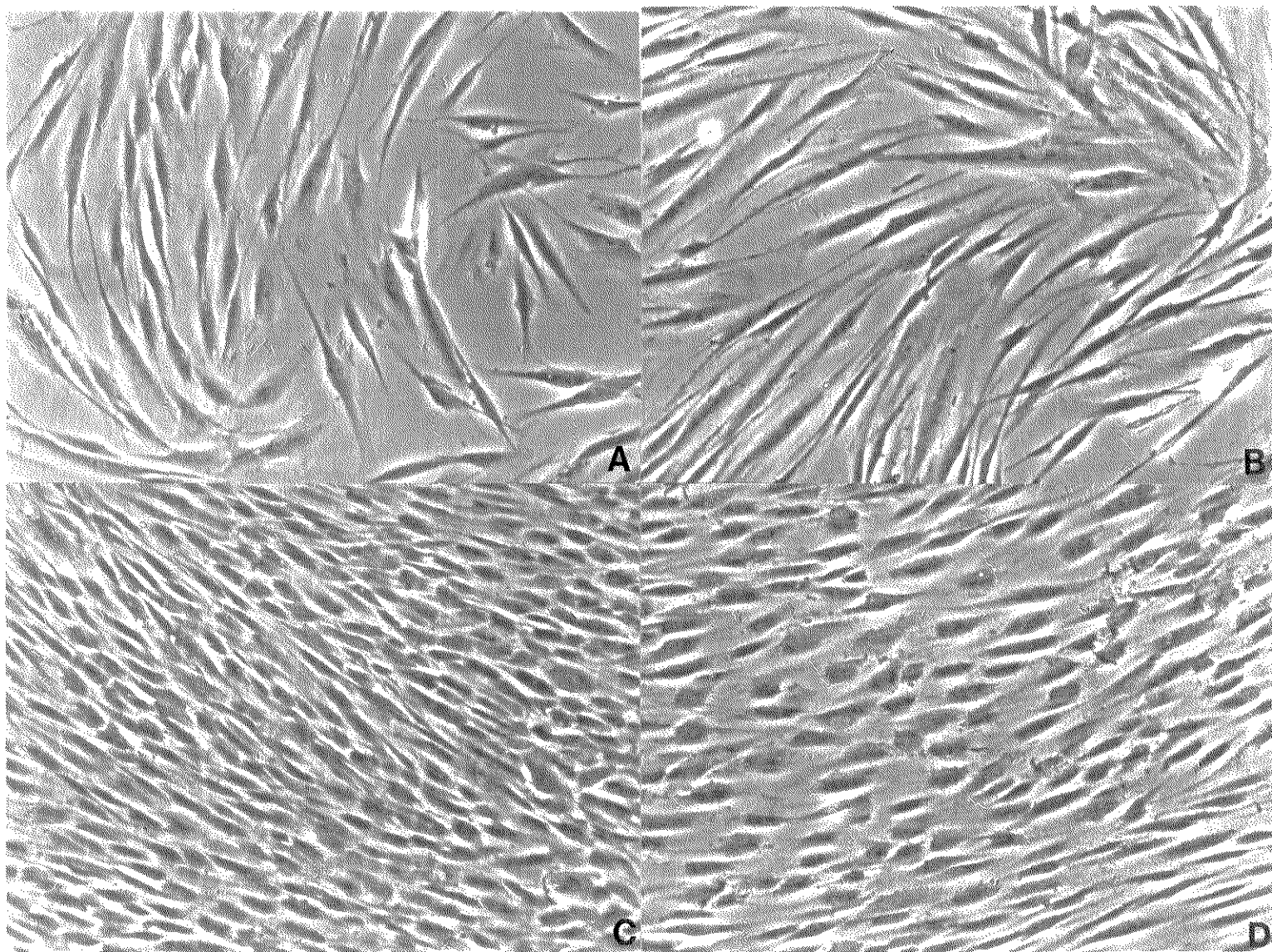


Figura 2. Características morfológicas em microscopia de contraste de fase de FG em subconfluência (A) e confluência celular (C) e FLP em subconfluência (B) e confluência celular (D). (x160)

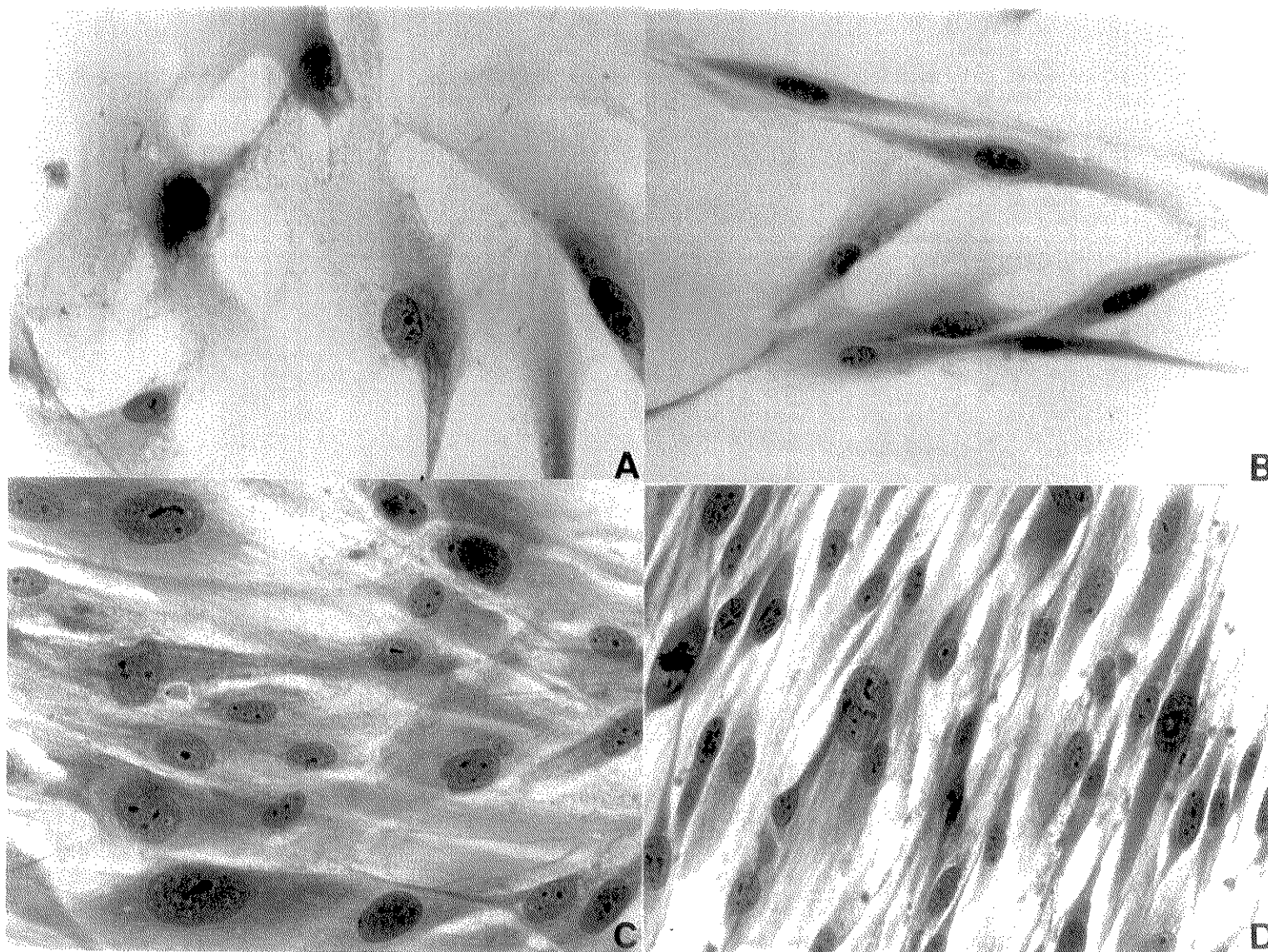


Figura 3. Características morfológicas em microscopia óptica, coloração H&E de FG em subconfluência (A) e confluência celular (C) e FLP em subconfluência (B) e confluência celular (D). (x400)

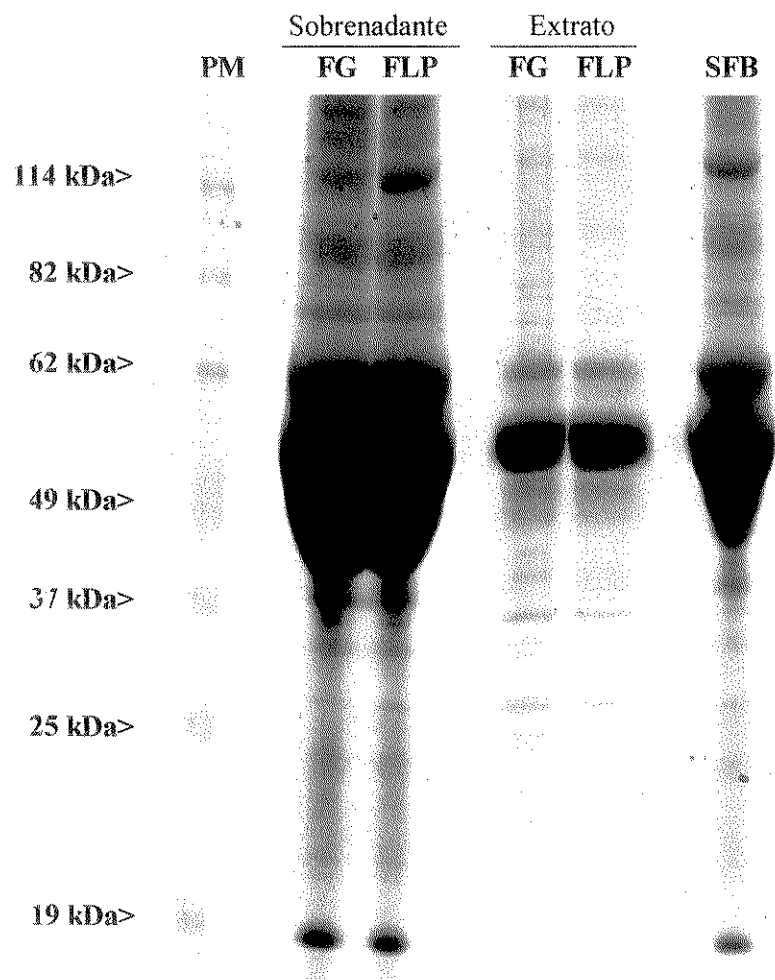


Figura 4. Síntese de proteína total.

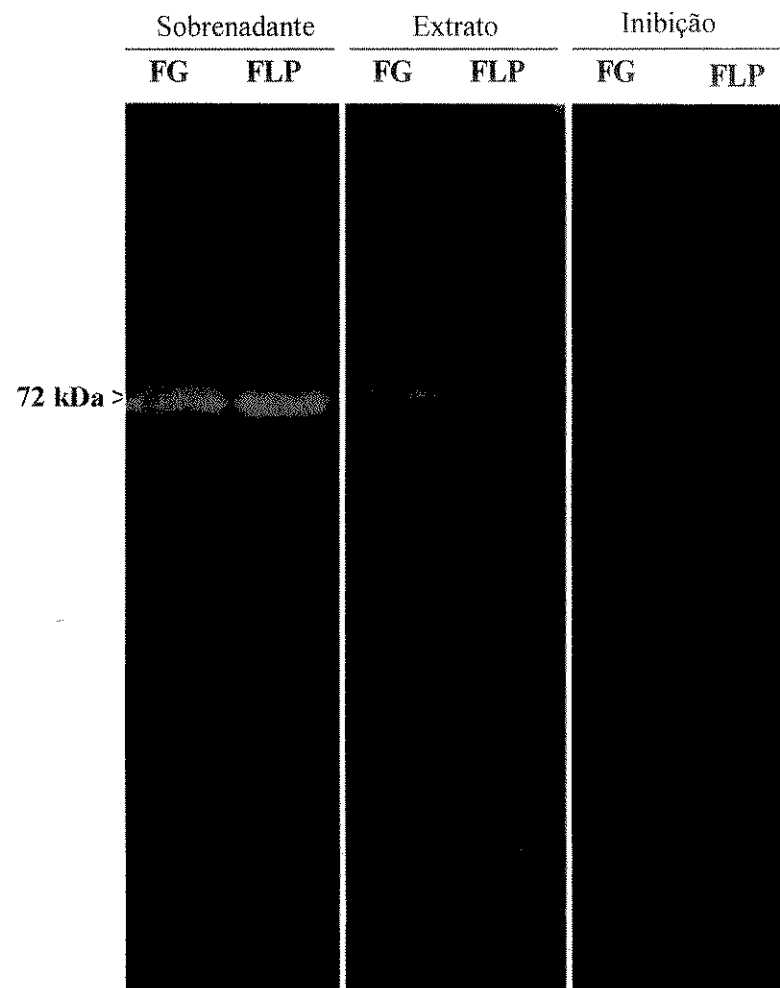


Figura 5. Análise zimográfica.

Discussão

A caracterização das células do ligamento periodontal e sua comparação com os fibroblastos gengivais é essencial para melhor compreender os sucessos e insucessos da manutenção e regeneração periodontal. Apesar de Hassel⁹ (1993) tenha afirmado que os fibroblastos do ligamento periodontal são semelhantes aos gengivais, nossos resultados mostraram que eles são morfologicamente diferentes, embora os dois tipos celulares tenham apresentado formato fusiforme com núcleo central e típicos prolongamentos citoplasmáticos. Utilizando as microscopias de contraste de fase e de luz pudemos observar que na cultura de FLP existe uma predominância de células maiores e mais alongadas, e na cultura de FG a predominância é de células mais largas e menos compridas. Pudemos observar que o aumento do volume celular está relacionado ao maior citoplasma nos FLP uma vez que o volume nuclear permanece o mesmo entre as duas linhagens. A análise destas duas linhagens celulares por microscopia eletrônica de varredura confirmou estas características observadas (dados não apresentados). Outro ponto que demonstra as diferenças morfológicas foi determinado através da verificação da densidade celular máxima. O número de células por cm² foi maior para os FG do que para os FLP, sugerindo que os fibroblastos do ligamento periodontal são células maiores que os fibroblastos gengivais e desta forma estariam ocupando mais espaço na placa de cultura (Figuras 2 e 3).

Neste estudo pudemos verificar que os FLP são positivos para a enzima fosfatase alcalina enquanto que os FG são negativos (Figura 1). Células positivas são observadas com marcação citoplasmática microvesicular correspondendo às regiões lisossomais. Esses achados são suportados pelos achados da literatura (Piche et al.¹⁶, 1989; Carnes et al.⁴, 1997; Somerman et al.¹⁸, 1988; Mariotti e Cochran¹¹, 1990; San Miguel et al.¹⁷, 1998). Apesar das diferenças nas metodologias, esses trabalhos foram

unânicos em afirmar que há maior produção da enzima fosfatase alcalina nos FLP do que nos FG. Arceo et al.¹ (1991) demonstraram que a fosfatase alcalina promove núcleos de mineralização atuando no metabolismo do fosfato e possivelmente iniciando a mineralização cementária.

O índice de proliferação determinado pela contagem celular foi estatisticamente mais alto nos dias 1, 4 e 7 para os FLP que para os FG (Gráfico 2). Nos dia 15 e 21 os fibroblastos do ligamento periodontal ainda proliferaram mais que os gengivais, sem diferença estatística significativa, possivelmente pelo fato de ambas as linhagens estarem em confluência. Isso pode ser confirmado pela análise proliferativa pelo índice de incorporação de BrdU nessas células. O índice BrdU para FLP foi de 61% enquanto que para os FG foi de 43% ($P < 0,05$) (Tabela 1). Esses resultados indicam crescimento exponencial mais rápido para os FLP, que segundo Mariotti e Cochran (1990) atingem um platô de confluência em 6 dias.

A síntese de proteína total verificada em nosso experimento no período de 24 h mostrou resultados similares para FLP e FG, tanto qualitativa quanto quantitativamente. As enzimas identificadas com atividade gelatinolítica de massa molecular aproximadamente de 68 e 72 kDa (Figura 4), correspondem a forma ativa e inativa da MMP-2. Mais uma vez nossos resultados estão de acordo com os verificados por Mariotti e Cochran (1990), que usaram culturas isoladas de pacientes diferentes e encontraram síntese de proteína total e de colágeno similar para os dois grupos celulares no período de 24 h e nos primeiros 7 dias de análise. Por outro lado, estes resultados são contrários aos achados de Sommerman et al. (1988), que também usaram linhagens do mesmo paciente e encontraram uma produção maior de proteína total e colágeno para os FLP em comparação aos FG.

Os resultados dessa análise comparativa indicam que FLP são positivos para fosfatase alcalina, maiores e mais alongados e mostraram índice de proliferação mais acelerado que os FG . Entretanto, a síntese de proteína total foi semelhante para os dois grupos celulares.

Referências Bibliográficas

- 01 ARCEO, N.; SAUK, J.J.; MOEHRING, J. et al. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. **J Periodontol**, v. 62, n. 8, p. 499-503, Aug. 1991.
- 02 BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** v. 72, n.7, p. 248-54, May 1976.
- 03 BOYKO, G.A.; MELCHER, A.H.; BRUNETTE, D.M. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. **J Periodontal Res**, v. 16, n. 1, p. 73-88, Jan. 1981
- 04 CARNES, D.L.; MAEDER, C.L.; GRAVES, D.T. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. **J Periodontol**, v. 68, n. 7, p. 701-7, Jul. 1997.
- 05 COLETTA, R.D.; ALMEIDA, O.P.; REYNOLDS, M.A.; SAUK, J.J. Alteration in expression of MMP-1 and MMP-2 but not TIMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF-beta 1 autocrine stimulation. **J Periodontal Res** v. 34, n. 8, p.457-63, Nov. 1999.
- 06 GESTRELIUS, S.; ANDERSSON, C.; LIDSTROM, D. et al. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. **J Clin Periodontol**, v. 24, n. 9, p. 685-692, Sep. 1997.
- 07 GROENEVELD, M.C.; EVERTS, V.; BEERTSEN, W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: its relation to cementum formation. **J Dent Res**, v. 74, n. 7, p. 1374-81, Jul. 1995.
- 08 GROENEVELD, M.C.; EVERTS, V.; BEERTSEN, W. Formation of afibrillar acellular cementum-like layers induced by alkaline phosphatase activity from periodontal ligament explants maintained in vitro. **J Dent Res**, v. 73, n. 10, p. 1588-92, Oct. 1994.
- 09 HASSEL TM. Tissues Cells of the periodontium. **Periodontology** 2000, v. 3, p. 9-38, 1993.

- 10 LANG, H.; SCHÜLER, N.; ARNHOLD, S. et al. Formation of differentiated tissues *in vivo* by periodontal cell populations cultured *in vitro*. **J Dent Res**, v. 74, n. 5, p. 1219-1225, May 1995.
- 11 MARIOTTI, A.; COCHRAN, D.L. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. **J Periodontol**, v. 61, n. 2, p. 103-111, Feb. 1990.
- 12 MCALLISTER, B.S.; LEEB-LUNDBERG, F.; MELLONIG J.T.; OLSON, M. The functional interaction of EGF and PDGF with bradykinin in the proliferation of human gingival fibroblast. **J Periodontol**, v. 66, p. 429-437, 1995.
- 13 MCCULLOCH, C.A. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. **Periodontol 2000**, n. 1, p. 16-25, 1993.
- 14 MELCHER, A.H. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol**, v. 47, n. 5, p. 256-260, May 1976.
- 15 NYMAN, S.; GOTTLOW, J.; KARRING, T. et al. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **J Clin Periodontol**, v. 9, n. 3, p. 257-65, May. 1982.
- 16 PICHE, J.E.; CARNES, D.L.; GRAVES, D.T. Initial characterization of cells derived from human periodontia. **J Dent Res**, v. 68, n. 5, p. 761-767, May. 1989.
- 17 SAN MIGUEL, S.M.; GOSEKI-SONE, M.; SUGIYAMA, E. et al. The effects of retinoic acid on alkaline phosphatase activity and tissue-non-specific alkaline phosphatase gene expression in human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. **J Periodontal Res**, v. 33, n. 7, p. 428-33, Oct. 1998.
- 18 SOMERMAN, M.J.; ARCHER, S.Y.; IMM, G.M. et al. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. **J Dent Res**, v. 67, n. 1, p. 66-70, Jan. 1988.

Capítulo 2

Influência da matriz protéica do esmalte associada ao fator de crescimento insulina-símile sobre fibroblastos do ligamento periodontal humano

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da matriz protéica do esmalte (EMD), do fator de crescimento insulina-símile (IGF-I) e da associação dos dois fatores sobre o potencial proliferativo e a capacidade de adesão e migração celular de fibroblastos do ligamento periodontal humano. Esse estudo foi conduzido utilizando a análise de proliferação por contagem automática de células (Coulter Counter®) e a análise de adesão celular por avaliação colorimétrica com leitor ELISA. Os experimentos de migração foram realizados em câmara de Boyden (Transwell®) num período de 4h e o índice de migração foi avaliado por ensaio colorimétrico em leitor de ELISA. O EMD aumentou significativamente a proliferação celular a partir da dosagem mínima de 50 $\mu\text{g/ml}$ até 200 $\mu\text{g/ml}$ no período de 24h e continuou estimulando a proliferação celular nos períodos de 3, 7 e 10 dias ($P < 0,05$). O IGF-I não alterou o índice de proliferação de FLP ($P > 0,05$). A associação de EMD + IGF-I aumentou o índice de proliferação celular independente das concentrações utilizadas. Entretanto, a associação não produziu um efeito adicional em relação a utilização do EMD sozinho. A adesão celular não foi modificada significativamente pela utilização do EMD, do IGF-I ou da associação dos dois fatores ($P > 0,05$). Os fatores também não promoveram resultados diferentes do controle negativo para a migração celular ($P > 0,05$). Nossos resultados demonstraram que, EMD tem um efeito estimulador da proliferação celular mas não atua de forma efetiva na adesão e migração celular. O IGF-I tem atuação desprezível nas células do ligamento periodontal e sua associação a EMD não parece promover resultados favoráveis adicionais tanto para proliferação como para adesão e migração celular.

Introdução

A doença periodontal é um processo inflamatório caracterizado pela alteração e ou perda dos tecidos de suporte: cemento, ligamento periodontal e osso alveolar (Gestrelius et al., 1997)b. O objetivo final do tratamento é a regeneração dos tecidos periodontais de forma previsível.

Melcher (1976) afirmou que o periodonto contém células capazes de promover sua regeneração. A resposta seletiva a partir de células derivadas do ligamento periodontal favorece o processo regenerativo com a formação de novo cemento, ligamento periodontal e osso alveolar em área anteriormente envolvida pela doença (McCulloch, 1993). A interposição de uma barreira física para separar o coágulo sanguíneo do retalho, excluindo os tecidos epitelial e conjuntivo gengival, recebeu o nome de Regeneração Tecidual Guiada (Gottlow, 1986) e desde que foi descrita, tem mostrado resultados favoráveis para o tratamento de defeitos intra-ósseos (Laurell et al., 1998) e defeitos de bifurcação grau II (Caffesse et al., 1990).

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo especializado, cuja função principal é a inserção do dente no alvéolo (Mariotti e Cochran, 1990) - os fibroblastos são os elementos celulares predominantes (Ten Cate, 1994) e responsáveis pelo desenvolvimento, estrutura, função e manutenção da sua estrutura.

A maior parte da população celular progenitora do ligamento periodontal encontra-se adjacente aos vasos sanguíneos e ao endósteo (McCulloch, 1995). Os tecidos periodontais mostram renovação discreta, determinada por proliferação e morte celular programada (apoptose). No processo de cura ocorre aumento significativo na proliferação e diferenciação celular comprovados por experimentos de cinética celular. Nessa etapa os fibroblastos do ligamento periodontal responsáveis pela renovação celular são provenientes de células progenitoras que geraram populações com

fenótipos diferenciados ou especializados. Portanto, as características dos tecidos neoformados serão determinadas pelas células que ocuparem o coágulo (Lekic e McCulloch, 1996).

A regeneração periodontal inclui eventos de migração, adesão celular e subsequente síntese de matriz extracelular. A expressão fenotípica das células depende de sua interação com fatores extracelulares - macromoléculas da matriz extracelular - que regulam a atividade intra-celular e modulam a recepção de sinais (Nathan e Sporn, 1991) além de outros fatores solúveis secretados pelos fibroblastos e outros tipos celulares. As proteínas da matriz extracelular são provavelmente os principais fatores que influenciam a capacidade regenerativa celular (Wirthlin, 1989), entretanto, até o presente momento, não se conhece qual ou quais fatores determinam a capacidade regenerativa máxima de um determinado tipo celular.

As interações de fatores de crescimento e seus receptores com células do ligamento periodontal são importantes para o processo de cura e regeneração do periodonto (Lekic e McCulloch, 1996). Takayama et al. (1998) propuseram a hipótese de atuação do fator FGF-2 no crescimento de células pouco diferenciadas do ligamento periodontal aumentando a densidade celular nos estágios iniciais do processo de cura periodontal acelerando o processo regenerativo.

Lynch et al. (1989) mostraram que o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento insulina-símile (IGF-1) agem sinergicamente favorecendo a regeneração periodontal em cães beagle. Em duas semanas, a análise histológica dos espécimes controle mostrou a formação de epitélio juncional longo e a ausência de neoformação óssea e cementária, enquanto que os sítios tratados com a combinação desses fatores de crescimento exibiram quantidades significativas de novo osso e de novo cimento. Os autores sugeriram que esses fatores de crescimento são

mitogênicos e quimiotáticos para fibroblastos e osteoblastos *in vivo*, estimulando assim, os mecanismos de migração e proliferação celular.

O objetivo da administração de fatores de crescimento no tratamento da periodontite crônica é aumentar o processo de cura normal que como tal, é insuficiente para promover a regeneração completa das estruturas de suporte. A associação de diferentes fatores de crescimento parece proporcionar maior regeneração do que sua aplicação isolada (Lynch et al. 1991; 1989; Dennison et al., 1994; Rutherford et al., 1993; Giannobile et al., 1994).

Os fibroblastos periodontais são células derivadas do folículo dental e se tornam populações de células distintas logo após o começo do desenvolvimento radicular (Ten Cate et al., 1994). Depois da deposição e mineralização da matriz de dentina, algumas células da bainha epitelial de Hertwig começam a se fragmentar enquanto outras parecem migrar para os tecidos do folículo dentário adjacente. Quando encontrados no ligamento periodontal adulto, são chamados de restos epiteliais de Malassez. Quando a matriz de dentina recém formada é exposta as células do folículo dentário ocorre interação matriz-célula fazendo com que os fibroblastos do tecido adjacente se diferenciem em cementoblastos, células responsáveis pela deposição de matriz do cimento.

Tem sido demonstrado que a formação de cimento acelular de fibras extrínsecas difere da formação do cimento celular de fibras extrínsecas e intrínsecas (Bosshardt e Schroeder, 1996; Ten Cate 1996; Bosshardt e Selvig 1997). Slavkin (1976) sugeriu que as proteínas do esmalte poderiam ser depositadas pela bainha epitelial de Hertwig na superfície radicular em desenvolvimento e agiriam como indutoras da produção de cimento. Hammarstrom et al. (1997) demonstraram em defeitos experimentais em

macacos que a regeneração de cemento acelular de fibras extrínsecas pode ser induzida pela matriz do esmalte purificada de embriões de porcos (Emdogain® - EMD).

Gertrelius et al., (1997) demonstraram que o EMD estimula a proliferação mas não atua na migração e adesão das células do ligamento, não interfere na proliferação de células epiteliais mas promove a formação de nódulos de mineralização. Segundo esses autores, no Emdogain® não foram encontrados fator estimulador de macrófagos (GM-CSF), calbindina D, fator de crescimento epitelial (EGF), fibronectina, fator de crescimento para fibroblasto (FGF- β), γ -interferon, interleucinas (IL-1 β , 2, 3, 6); fator de crescimento insulina-símile (IGF-1, 2); fator de crescimento neural (NGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento transformador (TGF- β).

Araujo et al. (1996), demonstraram que os tecidos neoformados após regeneração tecidual guiada diferem dos tecidos existentes antes da doença periodontal, principalmente em qualidade e espessura do cemento. Araujo e Lindhe (1998) testaram o efeito do Emdogain® em defeitos de bifurcação de cães beagle e mostraram que o verdadeiro novo cemento - acelular de fibras extrínsecas e intrínsecas - era depositado na parte apical do defeito. Isto sugere que a matriz protéica do esmalte pode criar um ambiente favorável para a neoformação cementária.

O cemento contém fatores de crescimento e moléculas de adesão (MacNeil e Somerman, 1993; Ogata et al., 1994) que são quimiotáticos para células periodontais (Lekic e McCulloch, 1996). Esses fatores seriam somente relativos ao cemento e não detectáveis nos tecidos vizinhos e células provenientes dos diferentes componentes do periodonto responderiam de forma distinta ao extrato de cemento (Somerman et al., 1989; Pitaru et al., 1995).

O fator de crescimento derivado do cemento (CGF) é uma molécula recentemente caracterizada que parece ser encontrada somente no cemento (Narayanan e Yonemura, 1993). Esse fator de crescimento mostrou ser mitogênico tanto para os fibroblastos do ligamento periodontal quanto para os fibroblastos gengivais. Tem sido sugerido que CGF pode promover a migração e crescimento das células progenitoras presentes em estruturas adjacentes à matriz de dentina e participar da diferenciação em cementoblastos (Yonemura et al., 1993). Ikezawa et al. (1997), mostraram evidências indicando que o CGF tem propriedades semelhantes o fator de crescimento insulina-símile (IGF-I) e afirmaram ser o CGF um fator de crescimento da família do IGF.

Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da matriz protéica do esmalte (EMD), os efeitos do fator de crescimento insulina-símile (IGF-1) e os efeitos da associação dos dois fatores na proliferação, adesão e migração de fibroblastos provenientes do ligamento periodontal humano.

Material e Métodos

Obtenção de culturas primárias

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas. As culturas primárias de fibroblastos do ligamento periodontal foram obtidas pela técnica do explante (Somerman et al., 1988) com algumas modificações, a partir de fragmentos do ligamento periodontal de pré molares extraídos por razões ortodônticas de um indivíduo. Resumidamente, os pré molares foram extraídos e lavados duas vezes com soro fisiológico, o ligamento periodontal do terço médio da raiz foi removido com curetas e os fragmentos obtidos lavados novamente em meio de cultura celular (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo 150 $\mu\text{g/ml}$ de garamicina, 1 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B). Os fragmentos foram plaqueados em wells para cultura celular de 35 mm (Corning Cortar® - USA) contendo DMEM acrescidos de 150 $\mu\text{g/ml}$ de garamicina e 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e incubados à 37°C em atmosfera úmida com 5% de dióxido de carbono. O meio foi trocado depois de 1 semana de cultivo.

Ao atingirem a confluência, as células foram subcultivadas. Na subcultura as células foram lavadas em tampão fosfato salino acrescido de 0,1% EDTA e tratadas com solução de tripsina a 0,1% e transferidas para frascos de cultura de 75 cm² caracterizando a primeira passagem (P1). Amostras representativas da cultura foram congeladas e mantidas em recipientes contendo nitrogênio líquido e crioprotegidas com 10% de di-metil sulfóxido (DMSO - Sigma). Foram utilizadas para os experimentos as células entre a 1º e a 10º passagem.

Proliferação celular

O efeito do EMD (Emdogain® – Biora, Malmo, SE) e do IGF-I (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) na proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal foi avaliado utilizando contador automático de células (Coulter Counter - Beckman). Para elaborar as curvas de concentrações da solução de EMD, IGF-I e EMD + IGF-I, foram plaqueadas e deixadas aderir por 24 horas 3×10^4 células em cada well das placas (Corning Cortar® - USA) contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) acrescido de 50 $\mu\text{g/ml}$ de gamicina e 50 ng/ml de anfotericina B. Após a adesão celular, o meio foi removido e trocado por DMEM suplementado com 2% de SFB por 24 horas para quiescência das células. DMEM suplementado com 10% de SFB (controle positivo), DMEM suplementado com 2% de SFB filtrado em carvão ativado (controle negativo) e DMEM suplementado com 2% de SFB filtrado em carvão ativado contendo EMD nas concentrações 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g/ml}$, ou IGF-1 nas concentrações 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 ng/ml ou EMD + IGF-1 nas concentrações 100 $\mu\text{g/ml}$ + 50 ng/ml , 50 $\mu\text{g/ml}$ + 25 ng/ml , 50 $\mu\text{g/ml}$ + 50 ng/ml e 100 $\mu\text{g/ml}$ + 25 ng/ml foram mantidos por 24 horas. As células foram removidas por ação de tripsina e contadas em contador automático.

O índice de proliferação foi determinado nos períodos correspondentes a 1, 3, 7 e 10 dias. Aproximadamente 3×10^4 células foram plaqueadas em cada well (Corning Cortar® - USA) em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) acrescido de 50 $\mu\text{g/ml}$ de gamicina e 50 ng/ml de anfotericina B, e deixadas aderir por 24 horas. Após a adesão celular, o meio foi removido e trocado por DMEM suplementado 2% de FCS por 24 horas para quiescência das células. O meio foi trocado novamente por DMEM suplementado com 10% de SFB (controle positivo); DMEM suplementado com 2% de SFB filtrado em carvão ativado (controle negativo) e DMEM suplementado

com 2% de SFB filtrado em carvão ativado contendo as diferentes concentrações de EMD (50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$), de IGF-1 (25, 50 e 100 ng/ml) e de EDM + IGF-1 (100 $\mu\text{g/ml}$ + 50 ng/ml , 50 $\mu\text{g/ml}$ + 25 ng/ml , 50 $\mu\text{g/ml}$ + 50 ng/ml e 100 $\mu\text{g/ml}$ + 25 ng/ml). O meio de cultura não foi trocado ao longo do período experimental para controlar a quantidade de agregados de EMD nos wells. A seguir as células foram removidas de cada well pela ação de tripsina e contadas automaticamente. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada período estudado.

Adesão celular

Para os experimentos de adesão celular foi utilizado método de Klebe (1974) modificado por Somerman et al. em 1989. Resumidamente, placas de cultura de 96-wells foram sensibilizadas com EMD nas concentrações 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g/ml}$, ou com IGF nas concentrações 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 ng/ml ou a mistura das duas soluções EMD + IGF nas concentrações 100 $\mu\text{g/ml}$ + 50 ng/ml , 50 $\mu\text{g/ml}$ + 25 ng/ml , 50 $\mu\text{g/ml}$ + 50 ng/ml e 100 $\mu\text{g/ml}$ + 25 ng/ml por 16 horas à 4°C, lavados com PBS e incubados com solução a 3% de albumina sérica bovina (BSA) em PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS as células (3×10^4 células/well) em DMEM foram incubadas por 1 hora à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . As células não aderidas foram aspiradas do poço e as aderidas fixadas com etanol a 70%, coradas com solução aquosa de 1% borax contendo 1% azul de toluidina por 5 minutos, lavadas intensamente com H_2O destilada e lisadas com solução de SDS a 1% por 30 minutos à 37°C. A densidade óptica do sobrenadante foi determinada em leitor ELISA usando filtro de 630 nm. Paralelamente, para determinação do número de células aderidas foi construído uma curva padrão correlacionando concentrações celulares crescentes (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35×10^4

cel/ well) com absorbância a 630 nm (Gráfico 1). O ensaio foi realizado em triplicata usando como controle negativo wells não sensibilizados e como controle positivo, wells sensibilizados com 0,5 μ g de colágeno tipo I purificado. Os resultados foram expressos como porcentagem de células que aderiram em relação ao controle negativo.

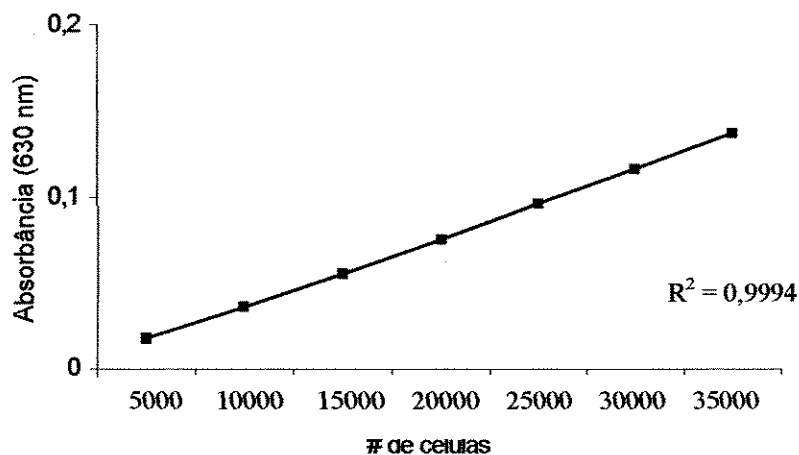


Gráfico 1. Curva padrão utilizada para correlacionar o número de células e o grau de absorbância.

Migração celular

Para o experimento de migração celular foi utilizado o método proposto por Somerman et al., (1989), realizado com a câmara de Boyden, denominada Transwell® (6,5 mm de diâmetro). A parte inferior da câmara e a superfície externa do filtro Millipore foram sensibilizados com DMEM 2% SFB acrescido de EMD (12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 μ g/ml), IGF-I (12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 ng/ml) e EMD + IGF-1 (100 μ g/ml + 50 ng/ml, 50 μ g/ml + 25 ng/ml, 50 μ g/ml + 50 ng/ml e 100 μ g/ml + 25 ng/ml) e mantidos por 16h à 4° C. Após esse período a parte externa da membrana foi bloqueada por BSA a 2% por 2h quando então 1×10^5 células foram plaqueadas na parte superior da câmara e

incubadas à 37° por 4h. Após esse período o filtro foi removido, as células fixadas em etanol 70% por 15 minutos e coradas com azul toluidina 1% em borax 1% por 5 minutos. Em seguida, os filtros foram lavados intensamente com H₂O destilada. Com o auxílio de um cotonete foram removidas as células aderidas na superfície superior onde foram aplicadas. As células que permaneceram na membrana, e que portanto estavam migrando, foram lisadas com solução de SDS a 1% por 30 minutos à 37°C. A densidade óptica do sobrenadante foi determinada em leitor ELISA usando-se filtro de 630 nm. Semelhante ao experimento de adesão, para determinação do número de células que migraram foi construída uma curva padrão correlacionando concentrações celulares crescentes (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 x 10⁴ cel/ well) com absorbância a 630 nm.

Análise Estatística

Para análise dos dados referentes as curvas de concentrações, ao experimento de adesão e migração celular foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com as respectivas comparações múltiplas e para análise dos dados do índice de proliferação nos diversos dias e para os diversos tratamentos foi utilizado análise da variância com a realização do teste F e o Teste de Tukey para as comparações múltiplas.

Resultados

Proliferação celular

Diversas concentrações de EMD (12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g/ml}$) foram verificadas quanto ao índice de proliferação celular num período de 24h e podem ser visualizadas na Figura 1. As concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ estimularam a proliferação celular significativamente no período inicial de 24h e passaram a ser analisadas nos ensaios de proliferação para os demais períodos experimentais. A curva para o IGF-I nas diversas concentrações 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 ng/ml podem ser visualizadas na Figura 2. As concentrações de 25, 50 e 100 ng/ml foram escolhidas para os ensaios de proliferação por serem concentrações intermediárias, uma vez que nenhuma concentração de IGF-I estimulou significativamente a proliferação celular num período de 24h. A curva de concentrações para a mistura de EMD + IGF-I nas misturas 1 (100 $\mu\text{g/ml}$ + 50 ng/ml), 2 (50 $\mu\text{g/ml}$ + 25 ng/ml), 3 (50 $\mu\text{g/ml}$ + 50 ng/ml) e 4 (100 $\mu\text{g/ml}$ + 25 ng/ml) podem ser visualizadas na Figura 3. As misturas 1, 2, 3 e 4 foram estatisticamente significantes no aumento da proliferação celular no período de 24h em comparação ao controle negativo porém, não foram diferentes estatisticamente entre si e não foram diferentes dos resultados conseguidos com EMD nas concentrações 100 e 50 $\mu\text{g/ml}$.

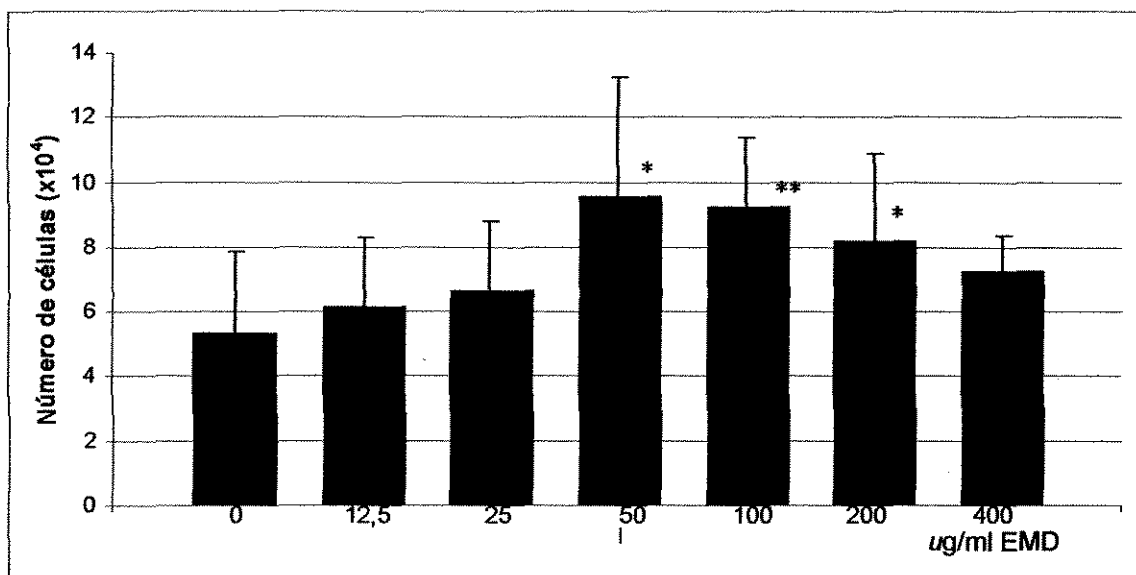


Figura 1. Curva de concentrações do EMD. Análise de Kruskal-Wallis * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$

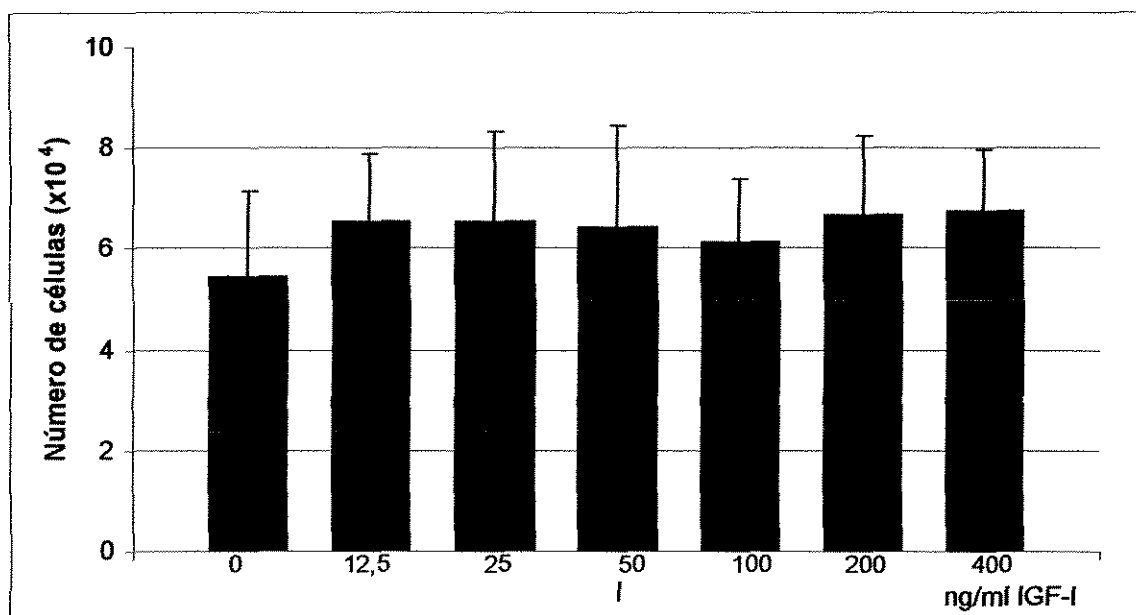


Figura 2. Curva de concentrações do IGF-I. Análise de Kruskal-Wallis * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$

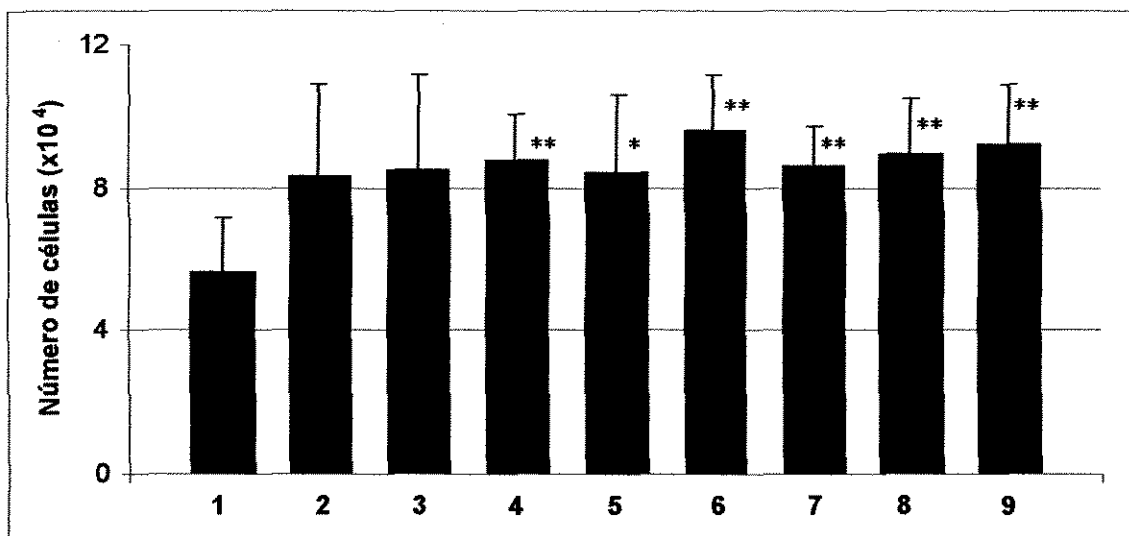


Figura 3. Curva de concentrações do EMD + IGF-I. Análise de Kruskal-Wallis * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$

1 = controle negativo

2 = 50 ng/ml IGF-I

3 = 25 ng/ml IGF-I

4 = 100 µg/ml EMD

5 = 50 µg/ml EMD

6 = 100 µg/ml EMD + 50 ng/ml IGF-I

7 = 50 µg/ml EMD + 25 ng/ml IGF-I

8 = 50 µg/ml EMD + 50 ng/ml IGF-I

9 = 100 µg/ml EMD + 25 ng/ml IGF-I

As concentrações escolhidas na etapa anterior desse experimento foram avaliadas nos períodos subsequentes de 1, 3, 7 e 10 dias. Os resultados da análise de variância mostraram que houve diferença estatística significativa nos índices de proliferação determinados nos períodos 1, 3, 7 e 10 dias. A análise proliferativa dos FLP sob influência das diversas concentrações de EMD (50, 100, 200 µg/ml) no primeiro período mostra que houve um aumento na proliferação celular em relação ao grupo controle negativo, independente da concentração utilizada. No dia 3, 7 e 10 a proliferação celular continua sendo estimulada significativamente pelo EMD em relação ao controle negativo, com exceção da concentração 200 µg/ml apenas no dia 3 (Tabela 1). Houve comportamento semelhante entre todas as concentrações de IGF-I (25, 50 e 100 ng/ml) e o grupo controle negativo em todos os períodos (Tabela 2). Quando IGF-I foi adicionado ao EMD notou-se aumento significativo na proliferação celular após a utilização das quatro misturas quando comparadas ao grupo controle negativo mas

tiveram um comportamento semelhante produzindo o mesmo índice de proliferação que o EMD sozinho. Entretanto, no dia 7 houve diferença entre as misturas e as concentrações utilizadas de EMD.

Tabela 1. Análise proliferativa nos períodos 1, 3, 7 e 10 dias para as diversas concentrações de EMD, (número de células x 10⁴)

	EMD			
	dia 1	dia 3	dia 7	dia 10
Controle negativo	5,31 a	8,12 b	8,02 c	6,92 c
Controle positivo	5,88 a	11,32 a	16,06 a	18,10 a
50 µg/ml	9,54 b	11,32 a	11,10 b	10,30 b
100 µg/ml	9,21 b	10,70 a	11,24 b	12,60 b
200 µg/ml	8,18 b	7,80 b	10,56 b	10,76 b

Teste de Tukey - Letras diferentes denotam significância estatística ao nível de 5%

Tabela 2. Análise proliferativa nos períodos 1, 3, 7 e 10 dias para as diversas concentrações de IGF-I, (número de células x 10⁴)

	IGF-I			
	dia 1	dia 3	dia 7	dia 10
Controle negativo	5,46 a	8,43 b	10,20 c	9,33 b
Controle positivo	7,18 a	13,46 a b	16,51 a	17,35 c
25 ng/ml	6,41 a	11,56 a b	11,68 b c	11,80 b
50 ng/ml	6,15 a	12,78 a b	12,68 b c	11,53 b
100 ng/ml	6,65 a	9,35 b	13,23 b	11,78 b

Teste de Tukey - Letras diferentes denotam significância estatística ao nível de 5%

Tabela 3. Análise proliferativa nos períodos 1, 3, 7 e 10 dias para as diversas concentrações de EMD + IGF-I, (número de células x 10⁴)

	EMD + IGF-I			
	dia 1	dia 3	dia 7	dia 10
Controle negativo	5,65 a	7,16 c	7,10 e	5,80 e
Controle positivo	7,50 a	12,30 a	16,98 b	19,58 a
50 ng/ml IGF-I	8,31 a	8,86 b	9,78 c d	11,36 d
25 ng/ml IGF-I	8,56 a	7,90 c	10,33 c	10,80 d
100 µg/ml EMD	8,78 a	9,76 b	13,57 c	14,17 b
50 µg/ml EMD	8,40 a	12,06 a	12,13 c	12,43 d
Mistura 1	9,57 a	12,06 a	19,21 a	15,81 b
Mistura 2	8,60 a	10,98 a b	15,23 b	15,15 b
Mistura 3	8,91 a	11,22 a b	14,85 b	13,23 c
Mistura 4	9,20 a	10,32 a b	15,12 b	13,85 b c

Teste de Tukey - Letras diferentes denotam significância estatística ao nível de 5%

Adesão Celular

Os resultados dos experimentos de adesão podem ser visualizados na Tabela 4. Houve aumento do número de células aderidas sem diferença estatística significativa após a utilização do EMD nas diversas concentrações em relação ao controle negativo, com exceção da concentração de 400 $\mu\text{g/ml}$ que proporcionou inibição da adesão. Quando utilizado o fator de crescimento IGF-I houve inibição da adesão celular, sem diferença estatística significativa. Quando foi utilizado a associação EMD + IGF-I houve aumento no número de células aderidas, sem diferença estatística significativa. O controle positivo desse ensaio foi realizado pela quantificação da adesão de FLP ao colágeno - substrato reconhecidamente favorável a adesão celular que demonstrou adesão de 70% em relação ao controle negativo.

Tabela 4. Porcentagem média de células aderidas em relação ao controle negativo (100%)

	Concentração	% média	Desvio padrão
	Controle negativo	100 abc	0
EMD	12,5 $\mu\text{g/ml}$	106,9 abc	10,45746
	25 $\mu\text{g/ml}$	108,4 abc	7,756329
	50 $\mu\text{g/ml}$	111,3 abc	5,247854
	100 $\mu\text{g/ml}$	110,1 abc	14,93081
	200 $\mu\text{g/ml}$	103,9 abc	27,85735
	400 $\mu\text{g/ml}$	95,1 bc	7,044174
IGF-I	12,5 ng/ml	92,8 bc	7,661126
	25 ng/ml	99,1 abc	5,554582
	50 ng/ml	93,5 b	5,91192
	100 ng/ml	98,7 bc	5,850222
	200 ng/ml	93,9 bc	12,88756
	400 ng/ml	92,2 b	9,989149
EMD + IGF-I	100 $\mu\text{g/ml}$ / 50 ng/ml	94,3 bc	18,79622
	50 $\mu\text{g/ml}$ / 25 ng/ml	112,3 ab	24,22652
	50 $\mu\text{g/ml}$ / 50 ng/ml	103,6 abc	28,37556
	100 $\mu\text{g/ml}$ / 25 ng/ml	121,4 a	4,815524

Análise de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas não paramétricas - Letras diferentes denotam significância estatística ao nível de 5%

Migração Celular

Os resultados dos experimentos de migração celular podem ser visualizados na tabela 5. O EMD inibiu a migração celular em todas as concentrações, demonstrando resultados comparáveis estatisticamente ao controle negativo. Houve aumento da migração celular para as diversas concentrações de IGF-I, com exceção da concentração 400 ng/ml que demonstrou pequena inibição. Entretanto, esses resultados não foram estatisticamente significativos. A associação de EMD + IGF-I demonstrou não aumentar a migração celular com exceção da concentração 100 μ g/ml / 25 ng/ml. Porém, esse resultados não diferiram significativamente do controle negativo.

Tabela 5. Porcentagem média de células que migraram em relação ao controle negativo (100%)

	Concentração	% média	desvio padrão
	Controle negativo	100 Abcdef	0
EMD	12,5 μ g/ml	65,9 ef	35,64785
	25 μ g/ml	66,8 ef	33,05642
	50 μ g/ml	77,3 def	47,65763
	100 μ g/ml	73,1 def	41,96868
	200 μ g/ml	74,1 def	39,81542
	400 μ g/ml	83,5 cdef	47,00244
IGF-I	12,5 ng/ml	141,1 ab	37,32034
	25 ng/ml	140,0 abc	42,3415
	50 ng/ml	135,1 abcd	70,0924
	100 ng/ml	156,6 a	44,99262
	200 ng/ml	130,3 abcde	92,10635
	400 ng/ml	97,1 abcdef	58,72929
EMD + IGF-I	100 μ g/ml / 50 ng/ml	86,4 bcdef	27,45568
	50 μ g/ml / 25 ng/ml	63,9 f	12,27221
	50 μ g/ml / 50 ng/ml	97,5 abcdef	29,66713
	100 μ g/ml / 25 ng/ml	109,1 abcdef	27,69952

Análise de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas não paramétricas - Letras diferentes denotam significância estatística ao nível de 5%

Discussão

Tem sido demonstrado *in vitro* que a matriz protéica do esmalte tem potencial para promover aumento na proliferação de células do ligamento periodontal, na produção de proteína total e de colágeno, na promoção de núcleos de mineralização, mas não tem efeito significativo na migração celular. Da mesma forma, estudos tem sugerido que a associação de fatores de crescimento pode induzir efeito sinérgico aumentando a ação dos fatores de crescimento aplicados isoladamente.

Nossos resultados mostraram que EMD aumenta a proliferação de FLP a partir da concentração mínima de 50 $\mu\text{g/ml}$ até a concentração máxima de 200 $\mu\text{g/ml}$, sem que haja, entretanto, diferença estatística significativa entre as concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$. No decorrer dos períodos de 1, 3, 7 e 10 dias houve um efeito significativo entre os dias, entre os tratamentos e entre os dias e tratamentos. Não houve diferença estatística significativa entre as três concentrações escolhidas para análise proliferativa - todas elas foram estimuladoras da proliferação celular em comparação ao controle negativo. Esses resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Gestrelus et al. (1997)^b que obtiveram aumento na proliferação celular de fibroblastos do ligamento periodontal. Esses autores mostraram que esse aumento no índice de proliferação é maior nas concentrações mais altas de EMD a medida que o período de 7 dias se aproxima, e especulam se esse resultado não foi em função do modelo experimental utilizado. EMD é insolúvel a temperatura e ao pH fisiológicos e em decorrência disso, durante o decorrer do período experimental de dez dias no experimento de proliferação celular o meio não foi trocado para que não fossem removidos os nódulos formados. Deve se discutir portanto, se a presença de fatores de crescimento e matriz extracelular produzidos pelas células neste período não estariam estimulando a ação do EMD no aumento da proliferação celular.

A utilização de fatores estimuladores de diferenciação e proliferação celular em pesquisas “in vitro” podem trazer respostas de como as células do ligamento periodontal poderiam trabalhar em sua capacidade máxima de regeneração. A avaliação dos resultados deste estudo para a proliferação de FLP após a incubação com o fator de crescimento IGF-I não mostrou resultados favoráveis na proliferação celular. Nos dez dias avaliados, houve diferença estatística significativa entre os dias mas não entre as diversas concentrações do fator de crescimento e o grupo controle negativo. Esses resultados demonstram claramente a não efetividade do IGF-I como atuante na proliferação celular de FLP.

A utilização de EMD associada ao IGF-I teve efeito proliferativo significativo sobre os FLP quando comparado ao controle negativo. Entretanto, nos dois primeiros e no último período, o índice proliferativo não diferiu dos resultados obtidos com a utilização do EMD nas concentrações de 50 ou 100 $\mu\text{g/ml}$. No sétimo dia, a associação de EMD e IGF-I, em qualquer concentração, potencializou a proliferação celular significativamente em relação a utilização de EMD sozinho, tendo seu pico máximo na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ de EMD + 50 ng/ml de IGF-I. Essa concentração de mistura foi também estatisticamente superior aos resultados obtidos pelo controle positivo. Podemos especular se ao 7º dia o meio já não estava composto de fatores de crescimento produzidos pelas próprias células e que pudesse desencadear a atividade de IGF-I estimulando EMD ou vice-versa.

Os FLP mostraram percentual de adesão de 70% ao controle positivo (colágeno). Os índices de adesão ao EMD ou à mistura dos dois fatores mostraram-se muito inferior ao controle positivo. IGF-I mostrou dificultar a adesão de FLP. Entretanto, esses resultados não foram estatisticamente significantes. Lyngstadaas et al. em 2001 mostram um aumento de aproximadamente 5 vezes maior na adesão celular quando

EMD foi utilizado. Essas diferenças, no entanto, podem ser explicadas pela diferença na metodologia. Aqueles autores usaram contagem celular após adesão dessas células em poços diferentes destes utilizados em nosso estudo. Além disso, nossa metodologia para verificação da adesão celular foi um ensaio colorimétrico por leitor de ELISA.

Tem sido sugerido que o Fator de crescimento do cemento (CGF) pode promover a migração e crescimento das células do ligamento periodontal e participar da diferenciação em cementoblastos (Yonemura et al., 1993). Ikezawa et al. (1997), mostraram evidências indicando que o CGF tem propriedades semelhantes o fator de crescimento insulina-símile (IGF-I) e afirmaram ser o CGF um fator de crescimento da família do IGF. Nossos resultados mostraram que IGF-I aumentou a migração de fibroblastos do ligamento periodontal enquanto que EMD e a associação dos dois fatores com exceção da concentração 100 $\mu\text{g/ml}$ + 25 ng/ml inibiram a migração celular. Entretanto, não foi atribuído significância estatística a esses resultados. Quando analisamos os números de cada repetição (apêndice), podemos perceber que esse aumento na migração celular acontece de forma repetida, apesar da grande variabilidade dos dados. Se faz necessário uma repetição desses experimentos para poder se traçar conclusões mais definitivas para a migração de FLP em relação aos fatores avaliados.

Podemos concluir que EMD tem um efeito estimulador da proliferação celular a partir de uma concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ mas não atua de forma efetiva na adesão e migração celular. IGF-I tem uma atuação desprezível nas células do ligamento periodontal e sua associação a EMD não parece promover resultados favoráveis adicionais tanto para proliferação como adesão e migração celular.

Referências

- ARAUJO, M.G., BERGLUNDH, T. & LINDHE, J. (1996) The periodontal tissues in healed degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* **6**, 532-541.
- ARAUJO, M.G. & LINDHE, J. (1998) GTR treatment of degree III furcation defects following application of enamel matrix proteins. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* **6**, 524-530.
- BOSSHARDT, D.D. & SCHROEDER, H.E. (1996) Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec* **2**, 267-292.
- BOSSHARDT, D.D. & SELVIG, K.A. (1997) Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000* **13**, 41-75.
- CAFFESSE, R.G., SMITH, B.A., DUFF, B., MORRISON, E.C., MERRILL, D. & BECKER, W. (1990) Class II furcation treated by guided tissue regeneration in humans: case reports. *J Periodontol* **8**, 510-514.
- COLETTA, R.D., ALMEIDA, O.P., GRANER, E., PAGE, R.C. & BOZZO, L. (1998) Differential proliferation of fibroblast cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. *J Periodontal Res* **33**, 469-475.
- DENNISON, D.K., VALLONE, D.R., PINERO, G.J., RITTMAN, B. & CAFFESSE, R.G. (1994) Differential effect of TGF-beta 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodontol* **7**, 641-648.
- GESTRELIUS, S., ANDERSSON, C., JOHANSSON, A.C., PERSSON, E., BRODIN, A., RYDHAG, L. & HAMMARSTROM, L. (1997) Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization *J Clin Periodontol* **9**, 678-684.
- GESTRELIUS, S., ANDERSSON, C., LIDSTROM, D., HAMMARSTROM, L. & SOMERMAN, M. (1997) In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* **9**, 685-692.
- GIANNOBILE, W.V., FINKELMAN, R.D. & LYNCH, S.E. (1994) Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol* **12**, 1158-1168.
- GOTTLOW, J., NYMAN, S., LINDHE, J., KARRING, T. & WENNSTRON, J. (1986) New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol* **6**, 604-616.

- HAMMARSTROM, L., HEIJL, L. & GESTRELIUS, S. (1997) Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* **24**, 669-677.
- HAMMARSTROM, L. (1997) Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* **9**, 658-668.
- IKEZAWA, K., HART, C.E., WILLIAMS, D.C. & NARAYANAN, A.S. (1997) Characterization of cementum derived growth factor as an insulin-like growth factor-I like molecule. *Connect Tissue Res* **4**, 309-319.
- KNOX, P., CROOKS, S. & RIMMER, C.S. (1986) Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots. *J Cell Biol* **6**, 2318-2323.
- LAURELL, L., GOTTLow, J., ZYBUTZ, M. & PERSSON, R. (1998) Treatment of intrabony defects by different surgical procedures. A literature review. *J Periodontol* **3**, 303-313.
- LEKIC, P. & MCCULLOCH, C.A. (1996) Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* **2**, 327-341.
- LYNCH, S.E., DE CASTILLA, G.R., WILLIAMS, R.C., KIRITSY, C.P., HOWELL, T.H., REDDY, M.S. & ANTONIADES, H.N. (1991) The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* **7**, 458-467.
- LYNCH, S.E., WILLIAMS, R.C., POLSON, A.M., HOWELL, T.H., REDDY, M.S., ZAPPA, U.E. & ANTONIADES, H.N. (1989) A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration *J Clin Periodontol* **8**, 545-548.
- LYNGSTADAAS, S.P., LUNDBERG, E., EKDAHL, H., ANDERSON, C. & GESTRELIUS, S. (2001) Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* **2**, 181-188
- MACNEIL, R.L. & SOMERMAN, M.J. (1993) Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodontol* **6**, 550-559.
- MARIOTTI, A. & COCHRAN, D.L. (1990) Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *J Periodontol* **2**, 103-111.

- MCCULLOCH, C.A. (1993) Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol 2000* **1**, 16-25.
- MCCULLOCH, C.A. (1995) Origins and functions of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral Dis* **4**, 271-278.
- MELCHER, A.H. (1976) On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* **5**, 256-260.
- NARAYANAN, S.A. & YONEMURA, K. (1993) Purification and characterization of a novel growth factor from cementum. *J Periodontal Res* **6**, 563-565.
- NATHAN, C. & SPORN, M. (1991) Cytokines in context. *J Cell Biol* **113**, 981-986.
- OGATA, Y., YOKOTA, Y., NIISATO, N., FURUYAMA, S. & SUGIYA, H. (1994) Presence of endogenous chemotactic factors for periodontal ligament cells in bovine cementum and bone. *Arch Oral Biol* **6**, 529-533.
- PITARU, S., NARAYANAN, S.A., OLSON, S., SAVION, N., HEKMATI, H., ALT, I. & METZGER, Z. (1995) Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodontal Res* **5**, 360-368.
- RUTHERFORD, R.B., RYAN, M.E., KENNEDY, J.E., TUCKER, M.M. & CHARETTE, M.F. (1993) Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol* **7**, 537-544.
- SLAVKIN, H.C. (1976) Towards a cellular and molecular understanding of periodontics. Cementogenesis revisited. *J Periodontol* **5**, 249-255.
- SOMERMAN, M.J., FOSTER, R.A., IMM, G.M., SAUK, J.J. & ARCHER, S.Y. (1989) Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors in vitro. *J Periodontol* **2**, 73-77.
- SOMERMAN, M.J., FOSTER, R.A., VORSTEG, G.M., PROGEBIN, K. & WYNN, R.L. (1988) Effects of minocycline on fibroblast attachment and spreading. *J Periodontal Res* **2**, 154-159.
- TAKAYAMA, S., MURAKAMI, S., NOZAKI, T., IKEZAWA, K., MIKI, Y., ASANO, T., TERASHIMA, A. & OKADA, H. (1998) Expression of receptors for basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* **6**, 315-322.

- TEN CATE, A.R. (1994) Oral histology: development, structure, and function. 4th edition, p. . St. Louis: Mosby.
- WIRTHLIN, M.R. (1989) Growth substances: potential use in periodontics. *J West Soc Periodontal Abstr* **3**, 101-125.
- YONEMURA, K., RAINES, E.W., AHN, N.G. & NARAYANAN, A.S. (1993) Mitogenic signaling mechanisms of human cementum-derived growth factors. *Journal Biol Chem* **35**, 26120-26126.

Conclusões Gerais

Conclusão Geral

Os resultados dos estudos apresentados indicaram que os fibroblastos do ligamento periodontal são positivos para fosfatase alcalina, maiores e mais alongados e apresentam índice de proliferação mais acelerado que os fibroblastos gengivais, entretanto, essas células são semelhantes quanto a capacidade de síntese de proteína total. A utilização da matriz do esmalte purificada estimula a proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal a partir de uma concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ mas não atua de forma efetiva na adesão celular e migração celular. A utilização do fator de crescimento insulina-símile mostrou efeito não significativo sobre as células do ligamento periodontal. Não houve efeito sinérgico quando da associação da matriz do esmalte purificada com o fator de crescimento insulina-símile, pois, não foram encontrados resultados favoráveis adicionais nos ensaios de proliferação, adesão e migração celular.

Referências Gerais

Referências Bibliográficas*

ARAUJO, M.G.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. The periodontal tissues in healed degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.23, n.6, p.532-541, 1996.

ARAUJO, M.G.; LINDHE, J. GTR treatment of degree III furcation defects following application of enamel matrix proteins. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.25, n.6, p.524-530, 1998.

ARCEO, N. *et al.* Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol*, Chicago, v.62, n.8, p.499-503, Aug. 1991.

BEERTSEN, W.; MCCULLOCH, C.A.G.; SODEK, J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000*, Copenhagen, v.13, p.20-40, Feb. 1997.

BOLZANI, G. *et al.* Cyclosporin a inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. *J Dent Res*, Washington, v.78, Special Issue, p.194, 1999. Abstract, 710.

BOSSHARDT, D.D.; SCHROEDER, H.E. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec*, New York, v.245, n.2, p.267-292, 1996.

BOSSHARDT, D.D.; SELVIG, K.A. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000*, Copenhagen, v.13, p.41-75, 1997.

BOYKO, G.A.; MELCHER, A.H.; BRUNETTE, D.M. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.16, n.1, p.73-88, Jan. 1981.

* Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).
Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

BROOKES, S.J. *et al.* Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Arch Oral Biol*, Oxford, v.40, n.1, p.1-14, Jan. 1995.

CAFESSE, R.G.; QUIÑONES, C.R. Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol 2000*, Copenhagen, v.1, p.69-79, 1993.

CAFESSE, R.G. *et al.* Class II furcation treated by guided tissue regeneration in humans: case reports. *J Periodontol*, Chicago, v.61, n.8, p.510-514, 1990.

COCHRAN, D.L.; WOZNEY, J.M. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol 2000*, Copenhagen, v.19, p.40-58, 1999.

COLETTA, R.D. *et al.* Differential proliferation of fibroblast cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.33, n.8, p.469-475, Nov. 1998.

DEBONI, M.C.; JAEGER, M.M.M.; ARAUJO, N.S. Obtenção e caracterização de linhagem de células osteoblásticas. *RPG Rev Pos Grad*, São Paulo, v.3, n.3, p.220-230, 1996.

DENNISON, D.K. *et al.* Differential effect of TGF-beta 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodontol*, Chicago, v.65, n.7, p.641-648, 1994.

GENCO, R.J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol*, Chicago, v.64, Supplement 4, p.338-355, Apr. 1992.

GESTRELIUS, S. *et al.* Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.24, n.9, p.678-684, 1997a.

GESTRELIUS, S. *et al.* In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.24, n.9, p.685-692, 1997b.

GIANNOBILE, W.V.; FINKELMAN, R.D.; LYNCH, S.E. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol*, Chicago, v.65, n.12, p.1158-1168, 1994.

GOTTLOW, J. *et al.* New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.13, n.6, p.604-616, 1986.

GOULD, T.R.; MELCHER, A.H.; BRUNETTE, D.M. Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wound. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.15, n.1, p.20-24, Jan. 1980.

GROENEVELD, M.C.; EVERTS, V.; BEERTSEN, W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: its relation to cementum formation. *J Dent Res*, Washington, v.74, n.7, p.1374-1381, July 1995.

GROENEVELD, M.C.; EVERTS, V.; BEERTSEN, W. Formation of afibrillar acellular cementum-like layers induced by alkaline phosphatase activity from periodontal ligament explants maintained in vitro. *J Dent Res*, Washington, v.73, n.10, p.1588-1592, Oct. 1994.

HAMMARSTROM, L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.24, n.9, p.658-668, 1997.

HAMMARSTROM, L.; HEIJL, L.; GESTRELIUS, S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.24, n.9, p.669-677, 1997.

HARRISON, J.W.; RODA, R.S. Intermediate cementum. Development, structure, composition, and potential functions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, Saint Louis, v.79, n.5, p.624-633, May 1995.

HASSEL, T.M. Tissues cells of the periodontium. *Periodontol 2000*, Copenhagen, v.3, p.9-38, 1993.

HEDEN, G.; WENNSTROM, J.; LINDHE, J. Periodontal tissue alterations following endogain treatment of periodontal sites with angular bone defects. A series of case reports. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.26, p.855-860, 1999.

HEIJL, L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.24, p.693-696, 1997.

IKEZAWA, K. *et al.* Characterization of cementum derived growth factor as an insulin-like growth factor-I like molecule. *Connect Tissue Res*, London, v.36, n.4, p.309-319, 1997.

KLEBE, R.J. Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. *Nature*, London, v.250, n.463, p.248-251, 1974.

LANG, H. *et al.* Formation of differentiated tissues *in vivo* by periodontal cell populations cultured *in vitro*. *J Dent Res*, Washington, v.74, p.1219-1225, 1995.

LAURELL, L. *et al.* Treatment of intrabony defects by different surgical procedures. A literature review. *J Periodontol*, Chicago, v.69, n.3, p.303-313, 1998.

LEKIC, P.; MCCULLOCH, C.A. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec*, New York, v.245, n.2, p.327-341, 1996.

LINDSKOG, S.; HAMMARSTROM, L. Formation of intermediate cementum. III: 3H-tryptophan and 3H-proline uptake into the epithelial root sheath of Hertwig *in vitro*. *J Craniofac Genet Dev Biol*, New York, v.2, n.2, p.171-177, 1982.

LYNCH, S.E. *et al.* A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.16, n.8, p.545-548, 1989.

LYNCH, S.E. *et al.* The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol*, Chicago, v.62, n.7, p.458-467, 1991.

MACNEIL, R.L.; SOMERMAN, M.J. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.28, n.6, p.550-559, 1993.

MARIOTTI, A., COCHRAN, D.L. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *J Periodontol*, Chicago, v.61, n.2, p.103-111, 1990.

MCCULLOCH, C.A. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol 2000*, Copenhagen, v.1, p.16-25, 1993.

MCCULLOCH, C.A. Origins and functions of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral Dis*, Hants, v.1, n.4, p.271-278, 1995.

MCCULLOCH, C.A.; MELCHER, A.H. Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *Am J Anat*, New York, v.167, n.1, p.43-58, 1983.

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

NARAYANAN, S.A.; YONEMURA, K. Purification and characterization of a novel growth factor from cementum. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.28, n.6, p.563-565, 1993.

NATHAN, C.; SPORN, M. Cytokines in context. *J Cell Biol*, New York, v.113, p.981-986, 1991.

NOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immun Meth*, Amsterdam, v.65, p.55-63, 1983.

OGATA, Y. *et al.* Presence of endogenous chemotactic factors for periodontal ligament cells in bovine cementum and bone. *Arch Oral Biol*, Oxford, v.39, n.6, p.529-533, 1994.

OVERALL, C.M.; SODEK, J. Concanavalin A produces a matrix-degradative phenotype in human fibroblasts. Induction and endogenous activation of collagenase, 72-kDa gelatinase, and Pump-1 is accompanied by the suppression of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, Bethesda, v.265, n.34, p.21141-21151, Dec. 1990.

PERERA, K.A.; TONGE, C.H. Fibroblast cell population kinetics in the mouse molar periodontal ligament and tooth eruption. *J Anat*, Cambridge, v.133, pt.2, p.281-300, Sept. 1981.

PITARU, S. *et al.* Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.30, n.5, p.360-368, 1995.

PONTORIERO, R.; WENNSTROM, J.; LINDHE, J. The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. A prospective controlled clinical study. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.26, p.833-840, 1999.

RUTHERFORD, R.B. *et al.* Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.20, n.7, p.537-544, 1993.

SCULEAN, A. *et al.* Healing of human intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins or guided tissue regeneration. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.34, p.310-322, 1999a.

SCULEAN, A. *et al.* Treatment of intrabony periodontal defects with an enamel matrix protein derivative (Emdogain): a report of 32 cases. *Int J Periodontics Restorative Dent*, Carol Stream, v.19, p.157-163, 1999b.

SLAVKIN, H.C. Towards a cellular and molecular understanding of periodontics. Cementogenesis revisited. *J Periodontol*, Chicago, v.47, n.5, p.249-255, 1976.

SOMERMAN, M.J. *et al.* Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors in vitro. *J Periodontol*, Chicago, v.60, n.2, p.73-77, 1989.

SOMERMAN, M.J. *et al.* Cell attachment activity of the 44 kilodalton bone phosphoprotein is not restricted to bone cells. *Matrix*, Stuttgart, v.9, n.1, p.49-54, 1989.

SOMERMAN, M.J. *et al.* Effects of minocycline on fibroblast attachment and spreading. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.23, n.2, p.154-159, 1988.

TAKAYAMA, S. *et al.* Expression of receptors for basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.33, n.6, p.315-322, 1998.

TEN CATE, A.R. *Oral histology: development, structure, and function*. 4th ed. Saint Louis: Mosby, 1994.

TEN CATE, A.R. The development of the periodontium - a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol 2000*, Copenhagen, v.13, p.9-19, 1997.

TEN CATE, A.R. The role of epithelium in the development, structure and function of the tissues of tooth support. *Oral Dis*, Hants, v.2, n.1, p.55-62, 1996.

TEN CATE, A.R.; DEPORTER, D.A.; FREEMAN, E. The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. *Am J Orthod*, Saint Louis, v.69, n.2, p.155-168, Feb. 1976.

TERRANOVA, V.P. *et al.* A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.21, n.4, p.330-337, July 1986.

WESSELINK, P.R.; BEERTSEN, W. The prevalence and distribution of rests of Malassez in the mouse molar and their possible role in repair and maintenance of the periodontal ligament. *Arch Oral Biol*, Oxford, v.38, n.5, p.399-403, May 1993.

WIRTHLIN, M.R. Growth substances: potential use in periodontics. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr*, Northridge, v.37, n.3, p.101-125, 1989.

YONEMURA, K. *et al.* Mitogenic signaling mechanisms of human cementum-derived growth factors. *J Biol Chem*, Bethesda, v.268, n.35, p.26120-26126, 1993.

Apêndice

Apêndice

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações dispostas neste termo foram fornecidas por Daniela Bazan Palioto (Doutorado em Clínica Odontológica na Área de Periodontia e executor do projeto) e Prof. Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima (Orientador), para estabelecer acordo formal por escrito, mediante o qual o indivíduo objeto da pesquisa, ou seu responsável, autoriza sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

I - Título do projeto de pesquisa:

"Influência da matriz protéica do esmalte associada ao fator de crescimento insulina-símile (IGF) sobre linhagens de fibroblastos do ligamento periodontal humano"

II - Objetivo:

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da associação de matriz protéica do esmalte (EMD) ao fator de crescimento insulina-símile (IGF), em linhagem de fibroblastos do ligamento periodontal humano, que serão obtidos a partir do ligamento periodontal de dentes extraídos por razões ortodônticas.

III - Procedimentos clínicos:

Os pré molares serão extraídos por razões ortodônticas. A anti-sepsia bucal será realizada com bochecho com digluconato de clorexidina a 0,2% por 1 minuto. A anestesia será obtida por infiltração local. Retalhos mucoperiosteais serão elevados nas faces vestibular e lingual, a partir de incisão intra-sulcular desenhada para a preservação das papilas interdentais. O tecido gengival remanescente será removido da superfície cervical radicular. Os pré molares serão extraídos e lavados duas vezes com soro fisiológico.

IV - Desconforto ou risco esperados

O procedimento proposto pode ocasionar desconforto pós-operatório inerente as extrações dentais simples, sendo facilmente suportado com terapia analgésica. No paciente não será testado nenhum tipo de material. Somente o dente extraído servirá como objeto de estudo.

V – Benefícios esperados:

Os dentes serão indicados para extração para ganho de espaço ortodôntico. Por esta razão, o diagnóstico e indicação são totalmente pertinentes ao tratamento ortodôntico.

VI – Métodos alternativos existentes:

Em função da necessidade de extração do elemento dental em questão, não há a possibilidade de métodos alternativos.

VII – Forma de acompanhamento e assistência:

Os pacientes receberão acompanhamento na semana pós operatória, sob a responsabilidade do executor deste projeto (Daniela Bazan Palioto).

VIII – Direitos dos voluntários:

Todos os voluntários têm garantido o seu direito de receber esclarecimentos sobre a metodologia a ser empregada, antes e durante o curso do projeto. Além disso, todos os voluntários têm plena liberdade de recusa de participação ou de retirada do consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. Os dados coletados e as informações pessoais são confidenciais para assegurar a privacidade dos participantes.

IX – Ressarcimento de despesas e formas de indenização:

Não haverá ônus material ou financeiro para os pacientes, não sendo necessário nenhum ressarcimento de despesa. No caso de eventuais danos decorrentes da pesquisa, as formas de indenização serão definidas judicialmente no foro local, de acordo com a legislação vigente. Eventuais despesas feitas pelos pacientes com transporte e alimentação serão devidamente ressarcidas pelo executor da pesquisa.

X – Consentimento formal para participação em pesquisa clínica:

Por este instrumento particular declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu, _____
_____(nome), _____(nacionalidade),
_____(profissão), portador do RG _____, CIC
_____, residente e domiciliado à _____, na
cidade de _____, concordo com absoluta consciência dos procedimentos a
que vou me submeter para extração dental dos pré-molares por razões ortodôntica, nos termos
relacionados nas disposições anteriores. Esclareço ainda que este consentimento não exime a
responsabilidade do profissional que executará os procedimentos experimentais.

Por estar de acordo com o teor do presente termo, assino abaixo o mesmo.

Piracicaba, de _____ de 1999.

Assinatura do voluntário ou responsável _____

Assinatura do pesquisador _____

Valores Tabelados

Valores originais da análise de proliferação e curva de proliferação (número de células $\times 10^4$) celular obtidos pela contagem automática de células. d = duplicata

EMD	1o repetição		2o repetição		3o repetição	
dia 1	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d
2% neg	9,87	4,32	3,3	3,4	4,7	6,5
10% pos	7,2	5,5	2,8	3,6	7,8	8,4
12,5	7,4	4,5	2,9	6,3	9	6,8
25	9,6	4,3	4,6	5,1	8,2	7,8
50	13,3	15	5,5	8,2	7,5	7,6
100	9	11,3	5,7	11,8	9,3	8,2
200	9	10,1	3,3	7,2	8,6	10,9
400	8,1	7,8	5,3	7,9	8	6,4
dia 3	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d
2% neg	9,4	10,7	5,9	9,7	4,9	
10% pos	17,5	10,1	10,2	8,7	10,1	
50	13,1	11,9	9,1	8,8	13,7	
100	10,1	10,7	12,9	10,3	9,5	
200	7,6	9,1	8,3	6,7	7,3	
dia 7	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d
2% neg	6,5	6,5	8,3	9,1	9,7	
10% pos	18,7	16,8	18,7	8,1	18	
50	7,2	7,2	10,4	17	13,7	
100	10,3	8,1	12,9	12,1	12,8	
200	7	10,5	9	9,8	16,5	
dia 10	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d
2% neg	7,9	6,7	6	9,3	4,7	
10% pos	15,8	20,6	16,1	19,4	18,6	
50	7,7	10,6	8,8	8,7	15,7	
100	10,5	9,7	13,8	13,1	15,9	
200	10,9	10,5	11,1	8,3	13	

IGF-I	1o repetição		2o repetição		3o repetição	
dia 1	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d
2% neg	2,6	6,6	7,5	5,2	6,1	4,8
10% pos	6,4	6,6	8,3	7,7	7	7,1
12,5	6,1	7,8	7,6	4,2	6,5	7,1
25	7,8	4,2	5,1	6,1	9,1	7
50	4,5	5,8	10,3	6,2	5,1	6,6
100	4,2	6,1	7,3	7,1	5,2	7
200	3,6	7,1	7,5	7,3	6,3	8,1
400	5,6	4,9	7,5	8,1	7,1	7,2
dia 3	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d
2% neg	9,1	10,7	5	10,3	6,6	8,9
10% pos	17,5	10,1	16,8	12,1	10,1	14,2
25	13,1	11,9	10,4	11,7	11	11,3
50	10,1	10,7	12,9	11,9	12,5	18,6
100	7,6	9,1	9,6	9,1	7,7	13
dia 7	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d
2% neg	9,1	9,8	8,2	8,5	12,9	12,7
10% pos	14,1	13,3	14,2	15,6	19,9	22
25	11,6	10,8	10,7	11,2	13,5	12,3
50	10,1	9,7	11,1	12,6	15,9	17,7
100	14,8	10,3	11,4	13,5	14,3	15,1
dia 10	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d
2% neg	7,7	8,8	9,1	7	12,3	11,1
10% pos	14,7	14,2	17,2	20,5	16,3	21,2
25	8	8,8	14,7	10,6	12,9	15,8
50	9,1	12	10	12,2	14,8	11,1
100	9,5	11,7	9,9	15,1	9,2	15,3

EMD + IGF-I	1o repetição		2o repetição		3o repetição		4o repetição	
dia1	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d		
2% neg					4,6	6,7		
10% pos					4,7	10,3		
50 IGF	6,5	7,7	7,4	7,4	7,4	13,5		
25 IGF	7,2	7,2	6,9	6,9	8,8	13,8		
100 EMD	8,3	8,1	8,3	8,5	11,4	8,1		
50 EMD	7,7	7,4	9,2	12,5	6,6	7		
100/50	10,4	10,5	9,9	11,25	8,4	7		
50/25	10,4	9	8,6	8,2	8,5	6,9		
50/50	11,2	10	8,7	9,2	6,9	7,5		
100/25	9,4	7	11,8	10	7,7	9,3		
dia 3	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d
2% neg				8,8	7,1	6,9	7,8	5,2
10% pos				17,1	9,3	11,6	12,1	11,4
50 IGF	6,9	10,9	7,8	13,8	6,6	6,2	8	10,7
25 IGF	8,7	10,9	10,8	7,6	6,3	4,4	7,3	7,2
100 EMD	14,7	9	12,2	11,5	6	8,2	9,2	7,3
50 EMD	13,4	13,9	18,8	14,8	7,8	9,6	10,6	7,6
100/50	14,1	12,8	18,7	13,8	6,5	10,3	12,3	8
50/25	13,4	11,1	17,8	12,1	7,5	7,8	10,9	7,3
50/50	10,7	15,9	17,8	13,9	5,4	7,4	9,7	9
100/25	13,3	10,7	14,8	10,2	8,3	5,8	12,4	7,1
dia 7	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d
2% neg				8,7	5,7	4,9	8,5	7,7
10% pos				16,8	21,7	16,9	19	10,5
50 IGF	9,4	10,8	7,3	11	9,2	10,5	8,2	11,9
25 IGF	9,4	10,1	10,1	12,5	10	12,1	8	10,5
100 EMD	16,9	14,4	14,2	15,7	13,5	11,8	10,6	11,5
50 EMD	13,9	11,9	10,7	11,5	10,4	10,5	15,1	13,1
100/50	16,8	19,5	14,9	21	19,1	26,5	13,9	22
50/25	22,3	14	15,2	12,2	15,2	15,4	12,9	14,7
50/50	13,5	19,8	10,8	18,1	13,8	14,4	15,2	13,2
100/25	16,7	16,8	13,8	13,1	13	22,6	14,9	10,1
dia 10	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d	1° d	2° d
2% neg				6,1	4,8	4,6	8	5,5
10% pos				18,3	20,4	22,5	15,3	21,4
50 IGF	11	12,8	13,4	10,7	11	12,6	6,2	13,2
25 IGF	11,1	7,5	8,2	10	12,6	12,7	8,1	16,2
100 EMD	12,8	13,1	10,4	16,1	20	15,2	12,6	13,2
50 EMD	6,9	9,9	9,1	14,5	13,7	15	17	13,4
100/50	14,3	18,4	13,1	16,2	16,1	14,7	14	19,7
50/25	15	17,7	11,9	9	14,5	16,6	15,7	20,8
50/50	9,9	13	10,2	13,7	12,1	13,1	15,7	18,2
100/25	10,2	14,8	22,5	11,9	13,2	11,8	14,6	11,8

Valores originais para a análise de adesão celular nas três repetições (Dados expressos em porcentagem de adesão considerando o controle negativo como sendo 100%).

	Concentração	1° repetição	2° repetição	3° repetição	% média	desvio padrão
	Controle negativo	100	100	100	100	0
EMD	12,5 ug/ml	113,0435	94,89051	112,963	106,9657	10,45746
	25 ug/ml	115,217	110,219	100	108,4787	7,756329
	50 ug/ml	117,3913	108,5158	108,1018	111,3363	5,247854
	100 ug/ml	125	110,219	95,13888	110,1193	14,93081
	200 ug/ml	134,7826	96,59367	80,55554	103,9773	27,85735
	400 ug/ml	100	98,29684	87,03704	95,11129	7,044174
IGF-I	12,5 ng/ml	88,57142	88,3576	101,7327	92,88723	7,661126
	25 ng/ml	102,8571	92,7235	101,7327	99,10444	5,554582
	50 ng/ml	92,39183	88,3576	100	93,58314	5,91192
	100 ng/ml	104,7619	98,54471	93,06929	98,79197	5,850222
	200 ng/ml	84,7619	88,3576	108,6634	93,92763	12,88756
	400 ng/ml	103,8095	86,90229	86,13861	92,28348	9,989149
EMD + IGF-I	100 ug/ml / 50 ng/ml	110,8699	73,91305	98,35294	94,37862	18,79622
	50 ug/ml / 25 ng/ml	140,2174	100	96,70588	112,3078	24,22652
	50 ug/ml / 50 ng/ml	130,4348	73,91305	106,5882	103,6454	28,37556
	100 ug/ml / 25 ng/ml	126,087	121,7391	116,4706	121,4322	4,815524

Valores originais para a análise de migração celular nas três repetições (Dados expressos em porcentagem de migração considerando o controle negativo como sendo 100%).

	Concentração	1° repetição	2° repetição	3° repetição	4° repetição	5° repetição	% média	Desvio padrão
	Controle negativo	100	100	100	100	100	100	0
EMD	12,5 ug/ml	47,5	81,33333	45,42373	34,25415	121,4485	65,99193	35,64785
	25 ug/ml	58	55,2	64,40678	34,25415	122,4234	66,85687	33,05642
	50 ug/ml	58	107,4667	2,711859	119,337	99,02507	77,30812	47,65763
	100 ug/ml	44	114,9333	92,88136	14,91713	99,02507	73,15138	41,96868
	200 ug/ml	75,5	98,13333	5,084739	100	92,20055	74,18372	39,81542
	400 ug/ml	121	141,0667	26,44067	72,92817	56,12814	83,51273	47,00244
IGF-I	12,5 ng/ml	129,75	154,1333	152,2034	185,0829	84,40111	141,1141	37,32034
	25 ng/ml	108,75	178,4	156,9492	173,4807	82,45125	140,0062	42,3415
	50 ng/ml	128	133,6	251,8644	72,92817	89,27577	135,1337	70,0924
	100 ng/ml	124,5	161,6	232,8814	134,8066	129,2479	156,6072	44,99262
	200 ng/ml	119,25	163,4667	12,20338	262,4309	94,15042	130,3003	92,10635
	400 ng/ml	103,5	159,7333	4,406785	130,9392	87,32591	97,18105	58,72929
EMD + IGF-I	100 ug/ml / 50 ng/ml	108,75	114,9333	47,45763	72,92818	88,30083	86,47399	27,45568
	50 ug/ml / 25 ng/ml	76,375	70,13333	59,32204	69,06077	44,91644	63,96151	12,27221
	50 ug/ml / 50 ng/ml	80,75	120,5333	62,0339	134,8066	89,76323	97,57742	29,66713
	100 ug/ml / 25 ng/ml	67,625	126,1333	137,9661	117,4033	96,58775	109,1431	27,69952



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
CEP-FOP-UNICAMP



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Influência da matriz protéica do esmalte associada ao fator de crescimento insulina-símile (IGF) sobre linhagens de fibroblastos do ligamento periodontal humano", sob o protocolo nº **51/99**, do Pesquisador(a) **Daniela Bazan Palioto**, sob a responsabilidade do Prof(a). Dr(a). **Antonio Fernando Martorelli de Lima**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 17 de setembro de 1999

We certify that the research project with title "Influence of Enamel Matrix Protein associate with Insuline like growth factor in human periodontal fibroblasts lineages", protocol nº **51/99**, by Researcher **Daniela Bazan Palioto**, responsibility by Prof. Dr. **Antonio Fernando Martorelli de Lima**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, 17 september 99

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Secretário - CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
Coordenador - CEP/FOP/UNICAMP