

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PROPEPE – PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA AÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO
DERIVADO DE PLAQUETAS EXÓGENO CARREADO POR LIPOSSOMAS NO
REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS**

UBERABA-MG
2014

PAULA VIRGÍNIA NASCIMENTO GOMES

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA AÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO
DERIVADO DE PLAQUETAS EXÓGENO CARREADO POR LIPOSSOMAS NO
REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba - UNIUBE, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração Biopatologia.

Orientador: Profa. Dra. Elisângela Ribeiro da Silva

**UBERABA-MG
2014**

Ata da Sessão Pública de defesa de dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Biopatologia, a que se submeteu a aluna Paula Virginia Nascimento Gomes – matrícula 5104907, orientada pela Profa. Dra. Elisângela Ribeiro da Silva.

Aos vinte e oito dias do mês de abril do ano de dois mil e quatorze, às 14h, na sala 2C02 na Universidade de Uberaba, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo Colegiado do Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba, composta pelos Professores Doutores: Elisângela Ribeiro da Silva - **Presidente**, Álvaro Ribeiro Barale e Melissa Nunes Miziara para julgar o trabalho da candidata Paula Virginia Nascimento Gomes, apresentado sob o título: "AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA AÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS EXÓGENO CARREADO POR LIPOSSOMAS NO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS". A Presidente declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros da Comissão Julgadora. A seguir a candidata dissertou sobre o seu trabalho e foi arguida pela Comissão Julgadora, tendo a todos respondido às respectivas arguições. Terminada a exposição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

APROVADO

REPROVADO (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora)

Para fazer jus ao título de MESTRE EM ODONTOLOGIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOPATOLOGIA, a versão final da dissertação, corrigida na totalidade das sugestões oferecidas documentalmente pelos membros da banca, considerada aprovada, devidamente conferida pela Secretaria do Mestrado em Odontologia, deverá ser entregue à Secretaria dentro do prazo de 30 dias, a partir da data da defesa. O aluno aprovado que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Universidade de Uberaba, conferindo título de validade nacional aos aprovados. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente declara a sessão encerrada, cujos trabalhos são objeto desta ata, lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pelo Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE, com ciência do aluno. Uberaba, vinte e oito dias do mês de abril de dois mil e quatorze.

Prof. Dr. Elisângela Ribeiro da Silva _____

Prof. Dr. Álvaro Ribeiro Barale _____

Prof. Dr. Melissa Nunes Miziara _____

Prof. Dr. Cesar Penazzo Lepri _____

Coordenador do Programa de Mestrado Acadêmico em Odontologia da UNIUBE

Flávia Michele da Silva _____

Secretária do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Ciência do Aluno: _____

Paula V. N. Gomes

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Gomes, Paula Virgínia Nascimento.

G585a Avaliação imunohistoquímica da ação do fator de crescimento derivado de plaquetas exógeno carregado por lipossomas no reparo ósseo alveolar em ratos / Paula Virgínia Nascimento Gomes. – Uberaba, 2014.

52 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia, 2014.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisângela Ribeiro da Silva

1. Odontologia. 2. Processo alveolar. 3. Imunohistoquímica. 4. Maxilares. 5. Arcada dentária. 6. Periodonto. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia. II. Título.

CDD 617.6

Dedico este trabalho a minha avó Glória, que não está mais aqui fisicamente para ver a minha conquista, mas sinto sua presença todos os dias em meu coração. Tenho certeza que onde estiver está orgulhosa e feliz. Você me faz falta todos os dias e momentos. Estará sempre em meus pensamentos e orações. Esse trabalho é para você e por você. Amor além da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me abençoar e reforçar a minha fé nos momentos de dúvida e desespero, me guiando pro melhor caminho sempre.

Aos meus pais Virginia Beatriz Martins Nascimento e Mauricio Gomes pelo apoio e amor incondicional, sem vocês eu não sou nada, e não teria nada. Vocês são tudo pra mim.

Ao meu namorado Felipe Mendes Cardoso Carvalho por toda a ajuda, paciência, amor e dedicação, sem o seu apoio, calma, carinho, ajuda e sabedoria eu não conseguiria chegar onde cheguei.

Aos meus avós Sebastião Gomes e Maria José, pelo carinho e admiração.

Ao meu irmão Léo pela amizade e carinho de sempre.

A orientadora Dra. Elisângela Ribeiro da Silva que com toda sua determinação e solidariedade soube conduzir brilhantemente o trabalho para o sucesso. Sem a sua dedicação e esforço nada sairia do lugar. Obrigada por sacrificar o seu tempo por mim e ter mantido a calma sempre que foi necessário.

A professora Dra. Melissa Nunes Miziara pela amizade, conselhos e dicas.

Ao professor Dr. José Bento Alves pela oportunidade.

Ao amigo Rafael Santos pela ajuda, dicas e conselhos.

A Universidade de Uberaba por todo apoio e estrutura oferecidos para realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento, em específico a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

As técnicas de laboratório Rayanne Bernardes e Aline Oliveira, pela amizade e ajuda nas práticas laboratoriais.

Aos professores do mestrado pelo conhecimento passado.

Aos colegas de mestrado.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do CEFORES da UFTM pelo apoio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

RESUMO

A odontologia tem buscado aprimorar técnicas que visam devolver de forma harmônica, a funcionalidade e estética ao sistema estomatognático. Nesse sentido, estudos acerca da reparação óssea, visando reparar o tecido lesado tem despertado significativo interesse em investigações exaustivas com vista para a natureza da osteogênese e métodos de controlá-la. A reconstrução de tecidos, danificados em função de traumas, processos infecciosos, neoplasias, bem como anomalias de desenvolvimento, é considerada um desafio. No entanto, pouco se sabe sobre o papel de fatores de crescimento exógenos no processo de reparo ósseo. A partir desse entendimento, há evidências que a atuação de moléculas como o Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) no processo de reparo ósseo, visando proporcionar diretrizes mais seguras no desenvolvimento de biomateriais para enxertos ósseos, assim como contribuir para a elucidação da cascata molecular que rege esse reparo. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da administração local do PDGF veiculado a vesículas de lipossomas, no processo de reparo ósseo em alvéolos dentários de ratos, após exodontia dos segundos molares superiores. Para tanto, foram utilizados 32 ratos *Wistar* machos, pesando em média 250 g. Após a exodontia dos segundos molares superiores, no lado direito das arcadas, os alvéolos foram utilizados como controle sendo naturalmente preenchido com coágulo. No lado esquerdo, os alvéolos tratados foram preenchidos com solução de 20 ng/ μ l de PDGF em lipossoma. Ao término do período experimental, os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésico e posterior deslocamento cervical, conforme protocolo padrão do comitê de ética, aos 3,7,14 e 21 dias. Foram confeccionadas lâminas histológicas e realizado técnica de imunohistoquímica com anticorpos anti- molécula de adesão celular endotelial de plaquetas (PECAM) e anti-alfa actina de músculo liso (α -AML). Os dados obtidos passaram por análise estatística, utilizando a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey com significância ($p < 0.05$). A partir da metodologia pode-se concluir, que o PDGF veiculado por lipossoma aumenta a expressão de PECAM e de α -AML, importantes moléculas do reparo ósseo, ambas moléculas tendo um pico de células marcadas aos 7 dias ($p < 0.05$).

Palavra-chaves: Reparo ósseo, PDGF, α -AML, PECAM .

ABSTRACT

Dentistry has been striving to enhance techniques that harmonically develop both functionality and aesthetic to the stomatognathic system. In this sense, studies of bone repair aiming to heal harmed tissues has been arousing significant interest, which implies into exhaustive investigations with sight to the nature of ossification and to ways of controlling it. Tissue reconstruction, caused due to traumas, inflammatory process, neoplasias, as well as developing anomalies, is considered a challenge. However, little is known about the exogenous growth factor's role in the healing process of the bone. After this acknowledgement, it is believed that the action of molecules such as PDGF will lead to safer guidelines to the development of biomaterials used for bone grafting, as well as to contribute to the elucidation of molecular cascade that rules this repair. This work aimed to evaluate the effect of the local use of PDGF served to liposome vesicles in the process of bone repair in dental alveoli of rats after the extraction of superior second molars. To do so, 32 *Wistar* male rats weighing approximately 250 g were used. After extraction of mentioned teeth, on the right side of the dental arch, the alveoli were used as control, being naturally filled with clot. On the left side, the treated alveoli were filled with a 20ng solution of PDGF in liposome. At the end of the experimental period, animals suffered euthanasia by anesthetic overdose and subsequent cervical displacement on the 3rd, 7th, 14th and 21st days, in accordance to the Ethical Committee protocol. Histological slides were made and immunohistochemical technique resorted using anti-PECAM and anti-Alfa Actin antibodies of smooth muscle tissues (α -AML). To achieve the results, data was statistically processed via analysis of variance (ANOVA) followed by *post-hoc* test of Tukey with significance $p < 0.05$. It is possible to conclude through the analysis that PDGF served by liposome increases the expression of PECAM and α -AML, important molecules of the bone repair process, both presenting marked cell peaks on the 7th day.

Keywords: Bone Repair, PDGF, α -AML and PECAM.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Diagrama mostrando o mecanismo através do qual os fatores de crescimento influenciam a atividade das células.....	18
FIGURA 2 – Mesa cirúrgica e acesso ao campo operatório	22
FIGURA 3- Seringa de precisão para microinjeção HAMILTON COMPANY®	24
FIGURA 4 – Alvéolos dos grupos A, B, C e D do lado controle imunomarcados com PECAM	32
FIGURA 5 – Alvéolos dos grupos A, B, C e D do lado experimental imunomarcados com PECAM.....	32
FIGURA 6 – Alvéolos dos grupos A, B, C e D do lado experimental imunomarcados com α -AML.....	33
FIGURA 7 – Alvéolos dos grupos A, B, C e D do lado controle imunomarcados com α -AML.....	33

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Delineamento experimental	23
QUADRO 2 – Amostras alfa actina de músculo liso	27
QUADRO 3 – Amostras PECAM	28

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Resultado da análise imunohistoquímica de lâminas de tecido aos 3,7,14 e 21 dias marcadas com alfa actina de músculo liso. Teste Tukey $p < 0,05$ 34
- Gráfico 2 –** Resultado da análise imunohistoquímica de lâminas de tecido aos 3,7,14 e 21 dias marcadas com PECAM. Teste Tukey $p < 0,05$35

LISTA DE ABREVIATURAS

α -AML	- Alfa Actina de Músculo Liso
aFGF	- Fibroblast Growth Fator acid (Fator de Crescimento Fibroblástico ácido)
bFGF	- Fibroblast Growth Fator basic (Fator de Crescimento Fibroblástico básico)
BMP	- Bone morphogenetic proteins (Proteínas Morfogenéticas do Osso)
CAMs	- Cell Adhesion Molecules (Moléculas de Adesão Celular)
EGF	- Epidermal Growth Factor (Fatores de Crescimento Epidérmico)
FGF	- Fibroblast Growth Factor (Fator de crescimento do fibroblasto)
IGF- I	- Fator de crescimento insulínico I
IGF-II	- Fator de crescimento insulínico II
MEC	- Matriz extracelular
MMPs	- Metaloproteinases de Matriz
NO	- Óxido Nítrico
PDGF	- Platelet Derived Growth Factor (Fator de crescimento derivado de plaquetas)
PECAM	- Endothelial Platellet Cell Adhesion Molecule (Molécula de adesão celular endotelial de plaquetas)
PRP	-Plasma rico em plaquetas
ROG	- Reparo ósseo guiado
RTK	- Receptor tirosina quinases
TGF- β -I	- Fator de crescimento transformador beta I
TGF- β -II	- Fator de crescimento transformador beta II
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
VEGF	- Vascular Endothelial Growth Fator(Fator de crescimento vascular endotelial)
FC	- Fator de Crescimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Procedimento cirúrgico.....	22
3.3 Solução de PDGF em lipossoma	23
3.4 Delineamento experimental.....	23
3.5 Processamento Histológico dos Espécimes.....	24
3.6 Imunohistoquímica	25
3.7 Estatística.....	26
4 RESULTADOS.....	30
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

O osso alveolar implica a porção da maxila ou da mandíbula responsável por sustentar e proteger os elementos dentais. Não obstante, assim como os demais tecidos ósseos, o osso alveolar caracteriza-se como um tecido mineralizado de suporte, oferecendo inserção aos músculos e servindo como uma estrutura para a medula óssea. O osso também apresenta grande resistência como propriedade biológica, em função da sua plasticidade, que permite o remodelamento conforme demandas funcionais. Entretanto, requer estímulos funcionais para manter a massa óssea, dependendo da presença de dentes para seu desenvolvimento e manutenção (CHERY YANG et al., 2013).

Embora o tecido ósseo apresente um alto poder de reparo, algumas injúrias não alcançam uma reconstrução satisfatória, o que implica em investigações exaustivas com vista para elucidar a natureza da osteogênese e desenvolvimento de métodos para controlá-la. Nesse contexto, o entendimento apropriado dos eventos básicos que envolvem o processo de reparo ósseo representa um aporte significativo para o desenvolvimento de novas técnicas que promovam uma regeneração a contento, de modo a satisfazer a reabilitação do sistema estomatognático, sobretudo na correção de perdas traumáticas ou mudanças atróficas do processo alveolar da maxila ou mandíbula (WILTFANG et al., 2004).

O desenvolvimento de biomateriais empregados em cirurgia ortopédica, traumatológica e maxilofacial, particularmente dos substitutos ósseos, tem se tornado uma constante em clínicas de reabilitação orofacial. Esses biomateriais podem ser definidos como “todo material de origem humana, animal, vegetal, destinado à implantação no homem, com a perspectiva de uma reconstituição do tecido ósseo, para o reforço de uma estrutura óssea ou para o preenchimento de uma perda de substância óssea de origem traumática ou ortopédica” (BOABAID, 2006; GONCALVES, GUIMARÃES; GARCIA, 1998).

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas para acelerar o reparo ósseo em ferimentos, compreendendo fatores de crescimento exógenos, enxertos ósseos, bem como a evolução e desenvolvimento de novas vias de administração de agentes indutores e drogas osteogênicas. Dentre os objetivos das terapias teciduais esqueléticas estão o de acelerar o processo de cicatrização, reduzindo assim o

período de maturação óssea, objetivando uma ou mais fases do processo de reparo: inflamação, revascularização, osteoindução, osteocondução e remodelação (BAGI et al., 1994; LINKHART et al., 1996; COLNOT et al., 2005; GIAVARESI et al., 2005; MAGRO FILHO et al., 1996).

Os biomateriais disponíveis no mercado possuem diferentes características físico-químicas, dentre as quais pode-se destacar tamanho de partículas, porosidade, cristalinidade e composição química, que podem alterar o comportamento *in vivo* dos biomateriais. Neste ponto de vista, é importante que os clínicos possuam o conhecimento das características físico-químicas dos biomateriais para escolha do material adequado para determinada aplicação. Dentre as características que os biomateriais devem apresentar destacamos a biocompatibilidade, osteocondutividade, área superficial suficiente, visando permitir apropriada revascularização para o sítio ósseo hospedeiro, elevada porosidade, para ser devidamente incorporado ao novo osso e moderada reabsorção, possibilitando a remodelação óssea ao longo do tempo (SCARANO et al., 2006).

O desenvolvimento e reparo do tecido ósseo são diretamente dependentes da remodelação da matriz extracelular (MEC), assim como da angiogênese local. A aposição e reabsorção óssea são episódios dinâmicos igualmente dependentes da ação de fatores de crescimento, dentre eles o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e as Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs), Metaloproteinases de Matriz (MMPs), fosfatase alcalina, Fosfatase ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) e Óxido Nítrico (NO). Além desses, outros fatores de crescimento são também conhecidos por afetar células osteogênicas na regeneração óssea, em especial o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), apontados como reguladores da proliferação celular em tecidos diferenciados (ANITUA et al., 2007).

Em relação aos estudos abrangendo técnicas do reparo ósseo, tem se objetivado entender a regulação da aposição e reabsorção óssea por meio da identificação de proteínas sinalizadoras responsáveis por estes processos. Investigações nesta área poderão ajudar no desenvolvimento ou melhoria do tratamento de perdas ósseas, reduzindo o tempo de reparo (DUCY, SCHINKE KARSENTY, 2000; TEITELBAUM 2000; ALVES et al., 2009).

Inúmeras moléculas sinalizadoras tem sido pesquisadas e correlacionadas à meios terapêuticos destinados à reparo ósseo, dentre os quais destacam-se os Fatores de Crescimento Fibroblásticos (FGF), Fatores de Crescimento Epidérmico

(EGF), Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- β), Proteína Morfogenética óssea (BMP), Fator de Crescimento semelhante a Insulina (IGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF) e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). Tais agentes sinalizadores são expressos e ativos durante o desenvolvimento e reparo ósseo, cada qual obedecendo sua função correspondente. (STREET et al., 2002; ZELZER, 2005; AROSARENA; COLLINS, 2005).

Os fatores de crescimento (FC) são responsáveis por ativar ou regular uma gama de funções celulares, em particular estimulando a diferenciação, proliferação, migração, adesão celular e expressão de genes. Quando essa ativação ocorre sobre as células de mesma classe, a sinalização é denominada autócrina, e quando em células de outra classe é denominado parácrina. Esses fatores estão presentes na circulação, o que permite agir localmente ou como reguladores sistêmicos do metabolismo esquelético apresentando ação direta importante tanto no crescimento celular, como na aposição e reabsorção óssea, e possivelmente na patofisiologia das disfunções ósseas (HILL, 1998; LUGINBUEHL et al., 2004; KRISHNAN, 2006).

Os FC são uma classe de proteínas sinalizadoras, com ação direta e relevante tanto no crescimento como na diferenciação para determinadas linhagens celulares. Posto que, uma indução celular efetiva é dependente de vários fatores, os quais incluem a concentração dos FC no meio extracelular, o período e duração da exposição, o tipo de célula alvo e seu estágio de diferenciação, a expressão de receptores específicos e a presença de outros FC sinergistas ou antagonistas são relevantes para o processo (GIANNOBILE, WHITSON, LYNCH, 1997; HUANG et al., 2008).

Os FC são mediados por receptores de superfície das células alvo, ocasionando a ativação intracelular de enzimas fosforiladas que são responsáveis por induzir uma via de sinalização intracelular específica. Juntos com os fatores de transcrição eles ativam um sítio de genes, os quais então exercem trocas específicas na atividade celular ou fenótipo (SCHLIEPHAKE, 2002).

Em razão do efeito individual dos FC nas atividades de diferentes tipos de células, cada proteína e/ou peptídeo tem sido usada em pesquisas, em uma série de métodos para conseguir a cicatrização tecidual, normalmente em conjunto com sistemas de entrega, isto é, veículos para disponibilização de drogas para mediar a velocidade, tempo e quantidade de liberação (LIEBERMAN et al., 2002;

LUGINBUEHL et al., 2004; ROSE et al., 2004; ANITUA et al., 2007; LEE; SHIN, 2007).

As terapias com os FCs em tecido ósseo têm sido aplicadas na promoção e, em alguns casos, na indução da formação de novo osso em situações de defeitos ósseos, nos sítios de reparo de fraturas e, também, em áreas adjacentes de implantes metálicos (BESSHO et al., 1999; RAMOSHEBI, 2002; SCHLIEPHAKE, 2002; KLOEN et al., 2003).

As plaquetas são essenciais à formação do tampão hemostático, tratando-se de partículas anucleadas derivadas de fragmentos de megacariócitos, oriundos da medula óssea. Quando ativadas sofrem um processo de granulação, induzida pela trombina, secretando, por sua vez, vários mediadores na área lesada, inclusive o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (FOSTER, 2009).

O PDGF é considerado como um dos principais agentes de cicatrização, apresentando significativa capacidade mitogênica na regeneração periodontal, razão pela qual tem sido estudado extensivamente (RAJA; BYAKOD; PUDAKALKATTI, 2009).

Além das plaquetas presentes na área lesada, macrófagos, células da musculatura lisa e células endoteliais vasculares são secretores deste fator. *In vitro*, o PDGF estimula a síntese de fibronectina, ácido hialurônico, colagenase e outras substâncias que são atuantes no processo de reparação (SWAK; HOSGOOD, 1996; ABREU et al. 2013).

O PDGF aumenta a vascularização tissular, promove a proliferação de fibroblastos, eleva a quantidade de colágeno, estimula a produção de tecido de granulação e otimiza a osteogênese. Tal fator de crescimento atua a partir de propriedades denominadas quimiotáticas, sobre células osteoprogenitoras, neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, que em conjunto são responsáveis pelo processo de reparação óssea (VENDRAMIN et al., 2006).

A linhagem do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) abrange quatro proteínas (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C e PDGF-D), codificadas respectivamente por 9 genes específicos. Por sua vez, a síntese de PDGF é ativada em resposta a estímulos externos, como por exemplo, hipóxia, trombina, estímulo de outros fatores de crescimento e citocinas, gerando a indução de crescimento, sobrevivência, transformação, migração celular e permeabilidade vascular. Este fator de crescimento exerce seus efeitos no alvo celular, por meio da ativação de dois

receptores tirosina-quinase (PDGFR- α e PDGFR- β), a partir da dimerização e autofosforilação de resíduos de tirosina no meio intracelular, e conseqüentemente transdução de sinal intracelular de forma semelhante ao EGF (CAIO et al, 2012).

O PDGF consiste em um importante mediador relacionado ao processo de cicatrização de injúrias e desempenha papel importante em quase todas as etapas abrangendo os eventos de reparo ósseo. Este, que foi descoberto na década de 1970, e atualmente compreende uma família de PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD e PDGF-AB. Sendo o PDGF um catiônico homodímeros ou heterodímeros de polipeptídeo ligado por dissulfureto correntes, responsável por estimular o crescimento, diferenciação, a proliferação, a quimiotaxia e a sobrevivência de células. PDGF que é caracterizado por ser armazenado principalmente na α - grânulos plaquetas, podendo ser sintetizado por um número de células de diferentes tipos (KALTALIOGLU et al., 2013).

Cicatrização óssea decorre de uma complexa interação estabelecida entre células e citocinas que trabalham em conjunto com fatores de crescimento (FC), que são polipeptídeos que atuam localmente como moduladores das ações celulares. Todavia, tais ações podem ser autócrino, parácrino, ou endócrino. Por sua vez, um único FC pode ter efeitos sobre múltiplos tipos de células e induzindo diferentes funções. Os receptores dessas células induzem a transmissão de sinal intracelular que atinge o núcleo e determina uma resposta biológica específica (DEVESCOVI; LEONARDI; CIAPETTI; CENNI, 2008).

Os efeitos biológicos de PDGFs ocorrem pela ativação dos PDGF- α e PDGF- β que são dois receptores estruturalmente relacionados da tirosina-quinase. Nos complexos receptores, a fosforilação permite a ligação e ativação de SH2-contendo domínio de moléculas de sinalização. Em inúmeras pesquisas, foi descrito que o PDGF promove uma cura acelerada, regulando a inflamação, otimizando proliferação das células e a angiogênese, além de ter contribuído para remodelação do tecido (KALTALIOGLU; COSKUN-CEVHER; TUGCU-DEMIROZ; CELEBI, 2013).

O efeito dos fatores de crescimento é mediado por receptores de superfície das células alvo pela ativação intracelular de enzimas fosforiladas, as quais induzem uma via de sinalização intracelular pela agregação de co-fatores e outras proteínas, os quais migram para o núcleo, como ilustra a Figura 1 (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN; THOMAS, 2002).

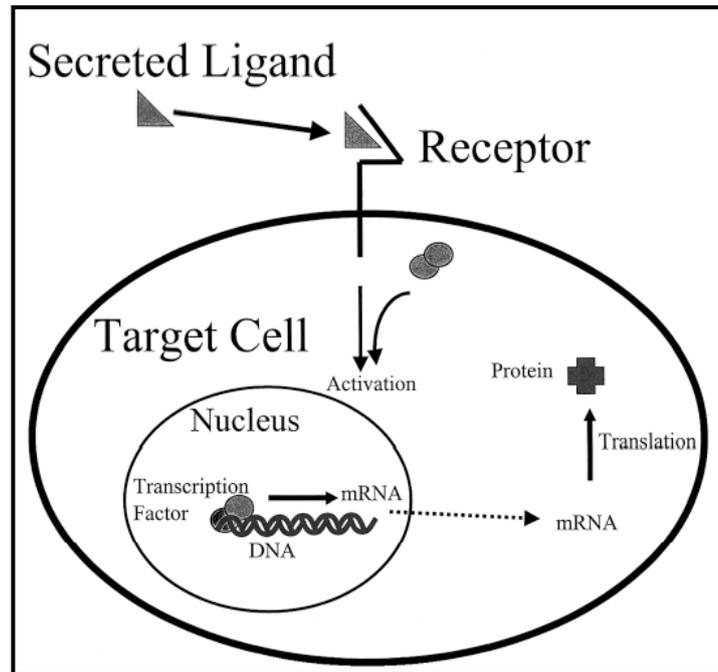


FIGURA 1-Diagrama mostrando o mecanismo através do qual os fatores de crescimento influenciam a atividade das células.

FONTE: LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN; THOMAS, 2002

Ao mesmo tempo, a partir do aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos genéticos e celulares de doenças humanas, uma aplicação terapêutica vem adquirindo lugar de destaque baseado na terapia gênica. Aplicação local de fatores de crescimento, invariavelmente requer uma grande quantidade de proteína, visando estimular os efeitos *in vivo*, conseqüentemente aumentando o risco de efeitos colaterais indesejados. Neste aspecto, um recurso alternativo utilizando veículo de distribuição para células biologicamente ativas pode ter a vantagem de se transferir para as células específicas com promotores específicos, usando vetores adequados (DARNELL et al., 2006).

Nesta perspectiva, as moléculas de adesão celular (CAMs), tem adquirido expressiva atenção, em razão da possibilidade de aplicação clínica, seja por meio da aplicação como marcadores biológicos, seja como alvo de fármacos ou demais agentes terapêuticos imunodirecionados. As CAMs correspondem a moléculas expressas na superfície celular, que atuam como mediadores da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, de acordo com a respectiva similaridade estrutural, bem como funcional. São classificadas nos seguintes grupos: caderinas, selectinas, integrinas, dentre outras. A participação dessas moléculas no processo

de reparação óssea, tem sido muito investigada por meio de modelos animais (GARCIA, 2005).

A molécula de adesão celular plaqueta- endotelial-1 (PECAM-1), é expressa constitutivamente nos leucócitos, nas células endoteliais e nas plaquetas. No caso das células endoteliais, a PECAM-1 é encontrada, sobretudo nas regiões próximas às junções celulares, onde atua mediando a passagem dos leucócitos por entre as células endoteliais (fase de diapedese), durante o processo de migração transendotelial (PUSZTASZERI; SEELENTAG; BOSMAN, 2006).

Ao mesmo tempo, células especializadas como miofibroblastos têm sido associadas ao processo de formação de tecido de granulação e encurtamento do tecido conjuntivo. Tais constituintes têm características morfológicas e funcionais intermediárias entre fibroblastos e células pertencentes aos músculo liso, onde se encontram proteínas específicas que participam da cicatrização tecidual, como a alfa actina de músculo liso (α -AML) que é uma proteína microfilamentar encontrada no citoplasma das células musculares lisas (HINZ et. al. 2001).

Ao passo que , consiste em uma proteína do citoesqueleto que é o principal constituinte do chamado sistema contrátil das células pertencentes ao músculo liso, a α -AML vem, sendo considerada um importante marcador miofibroblástico, participando decisivamente do processo de reparo tecidual (MARTINS et al., 2011).

Os miofibroblastos são caracterizados por desenvolver uma função específica no fechamento da ferida, por meio da capacidade em gerar uma expressiva força contrátil, supostamente oriunda das fibras de estresses, similares as culturas de fibroblastos. Essa contração pode estar relacionada ao papel da α -AML no fenômeno de contração do tecido de granulação, o que permite uma aceleração do reparo tecidual, uma vez que facilita a difusão dos fatores de crescimento do tecido lesado. Essa proteína foi utilizada por Martinez et al.(2007) com o objetivo de localizar estas células, sendo também empregada na imunomarcagem de células musculares lisas e células mioepiteliais.

A disponibilização local de fatores de crescimento no alvéolo do dente extraído pode favorecer os procedimentos clínicos no reparo ósseo. Para tanto, seria necessário um sistema capaz de liberar o composto terapêutico de forma gradual e constante durante o processo de cicatrização alveolar. Os lipossomas têm sido os carreadores de escolha como veículo de distribuição para compostos biologicamente ativos. São partículas esféricas microscópicas, cujas membranas, desenvolvidas

com uma ou mais bicamadas lipídicas, encapsulam uma fração de solvente que fica suspenso em seu interior. Em comparação com outros carreadores, os lipossomas têm algumas vantagens, como degradabilidade biológica e relativa segurança toxicológica e imunológica (LASIC, 1993).

Refinamentos nas técnicas de engenharia tecidual ao longo da década passada possibilitaram a regeneração óssea *in vivo* em muitos modelos animais e a transmissão destas técnicas para aplicações ortopédicas. Enquanto esses avanços são promissores para uma eventual regeneração óssea guiada nos maxilares, muito ainda precisa ser compreendido sobre a interação de biomoléculas envolvidas na cicatrização óssea e sobre o melhor método de administração destes fatores (AROSARENA, COLLINS, 2005).

O método mais empregado na avaliação do reparo ósseo é o histológico, seguido da análise das imagens por algum sistema computacional que possa quantificar, por exemplo, o tecido ósseo neoformado (SASAKI, T.; WATANABE 1995). Sendo assim a associação desses métodos apresenta alto grau de precisão, podendo determinar pequenas alterações ósseas que possam ocorrer durante um determinado período de tempo (FREDERIKSEN, 1995).

Considerando o potencial do uso dos Fatores de Crescimento (FCs) carreado por lipossomas, este estudo teve como objetivo a avaliação imunohistoquímica da administração local do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), carreado por lipossomas durante reparo ósseo alveolar em ratos.

Para tal avaliação foram analisados os perfis de expressão das proteínas PECAM e α -AML, que foram utilizadas como marcadores (indicadores) de reparo ósseo nos alvéolos submetidos à administração do PDGF e assim avaliar seu potencial regenerativo durante o reparo ósseo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial do uso de PDGF como acelerador do processo de regeneração óssea.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar imunohistoquimicamente a expressão de PCAM durante o processo de reparo ósseo mediado por PDGF exógena carregado por lipossomas;
- Avaliar imunohistoquimicamente a expressão de α -actina de músculo liso durante o processo de reparo ósseo mediado por PDGF exógena carregado por lipossomas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 32 ratos *Wistar* adultos machos, pesando em médias 250 g, provenientes do Biotério da Universidade de Uberaba (UNIUBE), Campus Aeroporto.

Durante o período experimental, os animais foram mantidos em biotério apropriado, acondicionados em gaiolas plásticas contendo um número máximo de 04 (quatro) animais, sob temperatura ambiente e controle automático de luz (07h-19h). Os animais receberam ração para animais de laboratório (Labina®, Purina®) e água *ad libitum*, sendo a alimentação pastosa nos 3 primeiros dias após o procedimento cirúrgico para não prejudicar a formação do coágulo. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UNIUBE e aprovado, com protocolo número 082/2009.

3.2 Procedimento cirúrgico

Para a realização das cirurgias, os animais foram anestesiados através de injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (Rompun®, Bayer) (0.1 ml/100g), utilizado como sedativo e relaxante muscular, e cloridrato de Ketamina 10% (Ketalar®, Parke-Davis) (0,1ml/100g), como anestésico geral. Utilizando-se um instrumento de Hollemback para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação e foram extraídos os dentes segundos molares superiores direitos e esquerdos, demonstrado na Figura 2. No lado direito das arcadas, os alvéolos foram utilizados como controle do processo de reparo ósseo, sendo naturalmente preenchido com coágulo. No lado esquerdo, denominado experimental, os alvéolos foram preenchidos com solução de 20 ng / μ l de PDGF em lipossoma.



FIGURA 2 – Mesa cirúrgica e acesso ao campo operatório
3.3 Delineamento Experimental

A amostra foi dividida em 4 grupos, e podem ser observadas na Quadro 1:

Grupo A – animais eutanasiados 3 dias após a cirurgia (n = 8)

Grupo B– animais eutanasiados 7 dias após a cirurgia (n = 8)

Grupo C – animais eutanasiados 14 dias após a cirurgia (n = 8)

Grupo D – animais eutanasiados 21 dias após a cirurgia (n = 8)

QUADRO 1 - Distribuição das amostras

Tratamentos		Período de tratamento			
Lado Direito	Lado Esquerdo	3 Dias	7 Dias	14 Dias	21 Dias
Coágulo	20ng/ μ L PDGF em Lipossomas	Grupo A n=8	Grupo B n=8	Grupo C n=8	Grupo D n=8

3.4 Solução de PDGF em lipossoma

As soluções foram preparadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Uberaba, sob a orientação do professor Dr. Tony Paiva Paulino, como se segue.

PDGF foi dissolvido em 1 ml de ácido acético de 10 MM contendo 0,1% (m/v) de Albumina de Soro Bovino (BSA) em um preparo de concentração final armazenado em lipossoma de 0,2 μ g/ml e -20 °C. A solução armazenada de PDGF foi então diluída para 2 ng/ μ l em tampão fosfato salino (PBS) previamente esterilizado em um filtro de 0,2 μ m. O lipossoma foi obtido por extrusão utilizando-se 3,0 mg/ml de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), 3,0 mg/ml de lisofosfatidilcolina (LPC) e 10 μ l de solução de PDGF, produzindo vesículas unilamelares homogêneas contendo 0,5 ng/ μ l de PDGF com aproximadamente 100 nm de diâmetro.

A administração foi realizada dentro dos alvéolos esquerdos logo após a extração dos segundos molares superiores, utilizando para este procedimento uma seringa de precisão, graduada em microlitros da marca HAMILTON COMPANY® (Figura 3). As microinjeções foram aplicadas dentro do coágulo, com volume de 1µl, com seringa posicionada verticalmente, paralela ao primeiro e terceiros molares.



FIGURA 3 - Seringa HAMILTON COMPANY®

Ao término do período experimental, os animais sofreram eutanásia por superdosagem de anestésico e posterior deslocamento cervical, conforme protocolo padrão do Comitê de Ética. Em seguida, foram decapitados, tiveram as maxilas dissecadas, e as amostras fixadas por 48 horas à temperatura ambiente em solução de formalina neutra tamponada a 10%. Após fixação, as maxilas foram rapidamente lavadas em água corrente, e transferidas para solução desmineralizadora.

3.5 Processamento Histológico dos espécimes

Após a fixação as maxilas foram desmineralizadas em solução tamponada de EDTA (Ácido diaminotetracético) a 10%, (pH entre 7,2 e 7,4) em temperatura ambiente, com trocas a cada 2 dias, durante um período de 40 dias. Após a desmineralização, as maxilas foram lavadas em água corrente por uma noite e separadas em metades direita e esquerda. Os fragmentos foram então processados para análise histológica, conforme protocolo a seguir:

1. Desidratação: os tecidos foram mergulhados em uma série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II, absoluto III), com um tempo de 30 minutos em cada banho;
2. Diafanização: os tecidos foram mergulhados em três banhos de xilol, durante 30 minutos em cada banho;
3. Infiltração: foram realizados três banhos em parafina a 58°C, durante 90 minutos em cada. Após o último banho, as peças foram incluídas em blocos de parafina.

Ademais, os blocos de parafina de todos os animais foram cortados no sentido longitudinal ântero-posterior, em micrótomo, obtendo-se cortes seriados de seis micrometros de espessura. As lâminas de vidro passaram por um pré-tratamento com 3-aminopropiltriethoxisilano (Sigma). Os cortes foram coletados em lâminas de vidro e deixados secar durante um dia. Algumas lâminas foram coradas em Hematoxilina Eosina e através dessa coloração foram escolhidas os melhores cortes adjacentes para realização da imunohistoquímica.

3.6 Imunohistoquímica

As lâminas de vidro com os cortes passaram inicialmente pelo processo de Desparafinização, em cinco banhos de Xilol durante 10 minutos cada. Posteriormente passaram por seis banhos de álcool (Absoluto I, II, III, 95%, 80%, 70%) e água destilada durante 5 minutos cada banho para hidratar os cortes. As lâminas foram lavadas com PBS (tampão fosfato salino pH 7,2) e imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio 3% e metanol por 10 minutos em câmara úmida e escura para o bloqueio da peroxidase endógena. O próximo passo da técnica consiste no bloqueio das ligações inespecíficas, submetendo as lâminas em uma solução de PBS + BSA (albumina sérica bovina) 2% durante 30 minutos em câmara úmida. As lâminas então foram lavadas mais uma vez com PBS e submersas em uma solução de ácido cítrico 0,01M durante 30 minutos a uma temperatura de 90°C, para a recuperação do antígeno. As lâminas passaram então pelo processo de incubação do anticorpo primário, neste caso anticorpos policlonais anti-PCAM e anti- α actina de músculo liso em uma diluição de 1:100 (Santa Cruz Biotechnology) por 3 horas a uma temperatura de 37°C em câmara úmida e escura, posteriormente foram lavadas 3 vezes com solução de PBS - Tween 20 com a duração de 5 minutos cada lavagem. Os cortes foram incubados com o anticorpo secundário apropriado biotilado do Sistema Link (DAKO – EUA), durante 30 minutos. Depois de serem lavados os cortes foram incubados com streptavidina conjugada com peroxidase (DAKO), por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram tratadas com uma solução contendo H_2O_2 (0,05%) e 1 mg / ml DAB (1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol-diaminobenzidina; Sigma) por 10 minutos fora do alcance da luz. As lâminas foram então lavadas em água corrente durante 1 minuto e contra coradas com Hematoxilina, desidratadas e montadas com Entellan®. As imagens das lâminas foram obtidas através de um microscópio (Zeiss Axiostar Plus) acoplado a uma

câmera e um computador; para captura das imagens foi utilizado o software AxioVision versão 4.8 (Carl Zeiss).

A contagem das células marcadas foi feita nas fotos das lâminas com aumento de 400X (ocular de 10X e objetiva de 40X), utilizando um retículo de 1cm², onde cada célula marcada na intercessão foi contada, utilizando o software ImageJ®.

3.7 Estatística

A abordagem estatística usada foi a análise de variância (ANOVA) para comparação das médias obtidas dos dois grupos (Controle e Experimental) comparados com o objetivo de se identificar diferenças significativas entre eles.

A ANOVA é uma técnica universalmente utilizada em comparações entre duas ou mais médias, para se obter uma comparação de grupos no que diz respeito a diferenças significativas estabelecidas através da hipótese nula e hipótese alternativa. *A priori*, esta análise retorna o mesmo resultado do teste t de student para duas médias, mas ao contrário da última, permite a utilização de testes *post-hoc* para uma maior confiabilidade da resposta estatística.

Os pré-requisitos para a aplicação deste método são que as amostras sejam aleatórias e independentes, que os grupos tenham distribuição normal e que tenham variâncias constantes, ou seja, homocedásticos.

O teste *post-hoc* utilizado foi Tukey com nível de significância de 5% para determinar o intervalo de confiança para o qual rejeita-se ou aceita-se a hipótese nula e diminuir as chances de se ter obtido um falso resultado na análise anterior. Tukey dá corpo ao resultado de modo a sustentar, de forma mais absoluta, uma hipótese pré estabelecida no modelo de pesquisa.

Como dito anteriormente, as amostras foram separadas em dois grupos, um sendo o experimental, e o outro, o controle. Primeiramente a análise foi feita entre Alfa Actina BC (controle) e Alfa Actina PDGF + LIPO (experimental) em 4 períodos de tempo distintos, 3, 7, 14 e 21 dias. A segunda etapa contemplou a comparação dos grupos PECAM BC (controle) e PECAM PDGF+LIPO (experimental). Cada grupo em cada período, teve 4 contagens de células marcadas através do método de contagem utilizando o software ImageJ.

Atendendo aos pressupostos já citados, as amostras (apresentadas nas Quadros 2 e 3 a seguir) são independentes, os grupos tem distribuição normal e as variâncias são constantes, todas iguais a 1,667.

QUADRO 2 – Amostras submetidas a análise de expressão da molécula alfa actina de músculo liso, demonstrando número da contagem de células marcadas, média e variância (*).

ALFA ACTINA BC		ALFA ACTINA PGDF+LIPO	
3 DIAS		3 DIAS	
Contagem de células	Média/variância	Contagem de células	Média/variância
14	14,5	19	18,5
16	1,6666667*	20	1,6667*
13		18	
15		17	
7 DIAS		7 DIAS	
Contagem de células	Média/variância	Contagem de células	Média/variância
37	36,5	45	44,5
35	1,6666667*	43	1,6667*
36		46	
38		44	
14 DIAS		14 DIAS	
Contagem de células	Média/variância	Contagem de células	Média/variância
28	26,5	31	29,5
26	1,6666667*	30	1,6667*
27		28	
25		29	
21 DIAS		21 DIAS	
Contagem de células	Média/variância	Contagem de células	Média/variância
24	22,5	26	25,5
23	1,6666667*	27	1,6667*
21		25	
22		24	

QUADRO 3 – Amostras submetidas a análise de expressão da molécula PECAM, demonstrando número da contagem de células marcadas, média e variância (*).

PECAM BC		PECAM PDGF+LIPO	
3 DIAS		3 DIAS	
Contagem de células	Média/variância	Contagem de células	Média/variância
31	30,5	38	38,5
29	1,666667*	37	1,666667*
32		40	
30		39	
7 DIAS		7 DIAS	
Contagem de células	Média/variância	Contagem de células	Média/variância
48	46,5	53	51,5
45	1,666667*	52	1,666667*
47		50	
46		51	
14 DIAS		14 DIAS	
Contagem de células	Média/variância	Contagem de células	Média/variância
21	19,5	23	22,5
19	1,666667*	22	1,666667*
20		24	
18		21	
21 DIAS		21 DIAS	
Contagem de células	Média/variância	Contagem de células	Média/variância
17	15,5	18	16,5
14	1,666667*	17	1,666667*
16		16	
15		15	

A partir de satisfeitas as condições para a aplicação da análise escolhida, definem-se as hipóteses nula e alternativa, que são:

Hipótese nula (H₀): não há diferença significativa entre as médias analisadas;

Hipótese alternativa (H₁): há diferença significativa entre as médias analisadas;

Dos procedimentos da ANOVA, encontra-se o valor F para cada análise e o compara com um valor F crítico obtido através da tabela F. Este valor crítico delimita a região do gráfico de distribuição estatística monocaudal para o valor de significância estabelecido em projeto, na qual rejeita-se ou aceita-se a hipótese nula. Se o valor encontrado na análise for maior que o F crítico, aceita-se a hipótese nula, caso contrário, rejeita-se. O valor F no caso deste experimento, pela tabela, é de 5,99.

Em outras palavras, deseja-se identificar, através das hipóteses, se há diferença significativa nas contagens (ou ainda, nas médias das contagens) de células marcadas entre o grupo controle, aquele em que foi usada a Alfa Actina BC e PECAM BC, e o grupo experimental, Alfa Actina PDGF+LIPO e PECAM PDGF+LIPO, melhor, se o fator de crescimento carregado por lipossomo realmente catalisou o reparo ósseo.

4 RESULTADOS

A técnica cirúrgica foi bem sucedida, tendo em vista que não houve perda de nenhum animal e nenhuma intercorrência que pudesse comprometer o experimento, tendo o reparo ocorrido a contento.

Vale ressaltar que tanto o lado direito, correspondente ao grupo controle, quanto o lado esquerdo, referente ao grupo experimental, em todos os intervalos, apresentaram a dinâmica histológica clássica de reparação óssea, isto é, compreendendo o processo de inflamação, formação do tecido de granulação, formação de tecido ósseo primário e substituição deste por osso lamelar.

A análise imunohistoquímica teve como finalidade determinar o número de células imunomarcadas pelos anticorpos anti- α AML e anti-PECAM, nos defeitos ósseos dos grupos A, B, C e D, bem como fornecer os dados necessários à análise estatística. Os valores foram expressos em média e desvio padrão.

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

PECAM

Aos três dias a área do defeito ósseo cirúrgico marcado com anti-PECAM, lado esquerdo (experimental), apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) de células marcadas quando comparado ao lado direito (controle) como demonstrado nas Figuras 4 A e 5 A .

Aos sete dias a imunomarcção para PECAM apresentou maior expressividade para o lado experimental quando comparado ao lado controle ($p < 0,05$), registrando um pico de células imunomarcadas nesse período demonstrado nas Figuras 4 B e 5 B.

Aos quatorze dias, a imunomarcção para PECAM no lado experimental apresentou discreta diferença quando comparado ao lado controle, demonstrado nas Figuras 4 C e 5 C.

No último período analisado, aos vinte e um dias, constatou-se que para a molécula PECAM havia uma pequena diferença entre o lado experimental comparado ao lado controle, mas sem importância estatística demonstrado nas Figuras 4 D e 5 D.

Alfa Actina de Múculo Liso

As lâminas marcadas com anti- α -AML aos 3 dias apresentaram uma discreta diferença entre os lados controle e experimental, porém sem importância estatística demonstrado nas Figuras 6 A e 7 A.

A imunomarcção com anti- α -AML apresentou uma maior expressividade para o lado experimental ($p < 0,05$) quando comparado ao lado controle aos 7 dias, demonstrado nas Figuras 6 B e 7 B.

Aos quatorze dias, nas lâminas marcadas com anti- α -AML foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para o lado experimental quando comparado ao lado controle, demonstrado nas Figuras 6 C e 7 C.

E, aos vinte e um dias, nas lâminas marcadas com anti- α -AML houve diferença significativa no lado experimental quando comparado ao lado controle, demonstrado nas Figuras 6 D e 7 D.

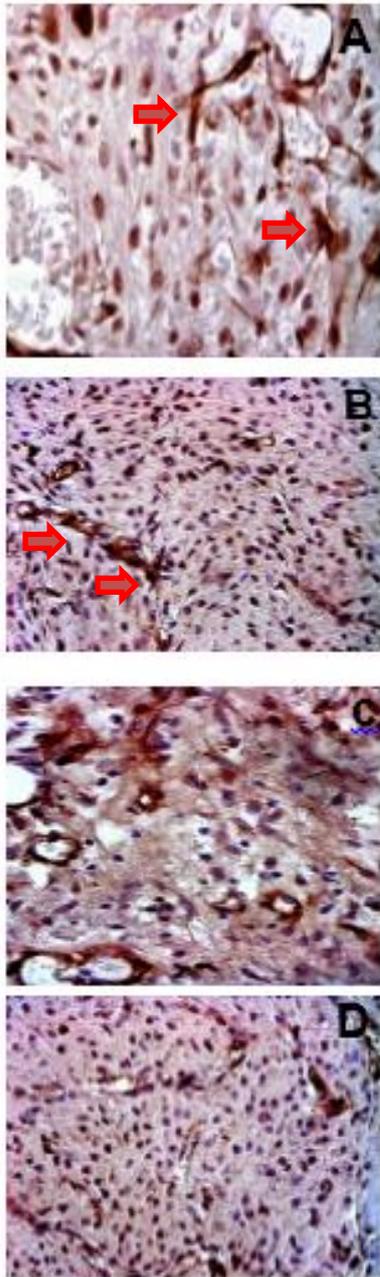


FIGURA 4 – Alvéolos dos grupos A, B, C e D do lado controle imunomarcados com PECAM, as setas indicam as células marcadas.

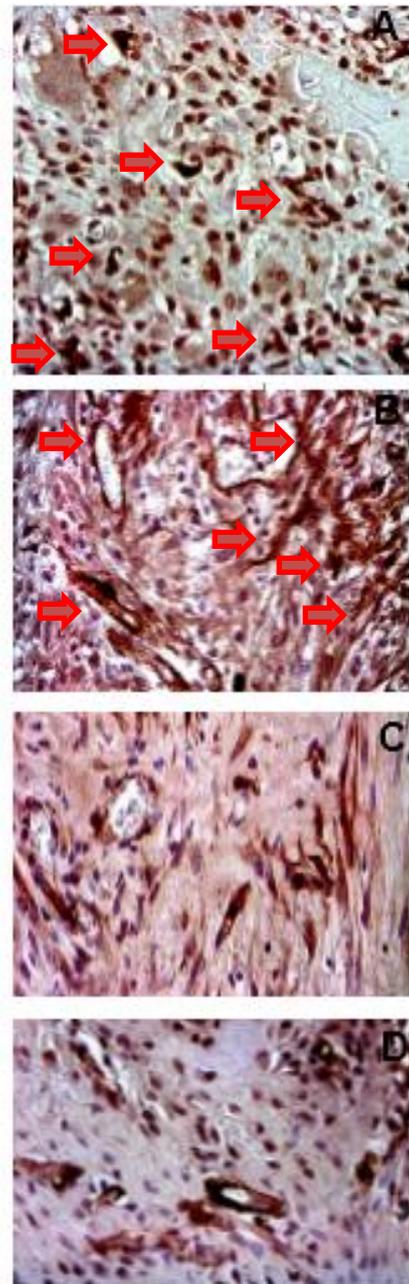


FIGURA 5 – Alvéolos dos grupos A, B, C e D do lado experimental imunomarcados com PECAM, as setas indicam as células marcadas.

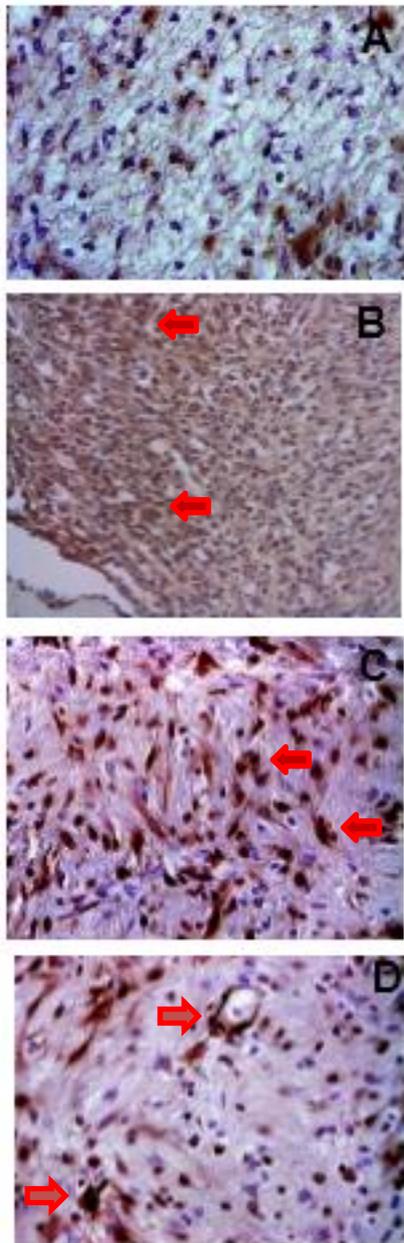


FIGURA 6 – Alvéolos dos grupos A, B, C e D do lado controle imunomarcados com α -AML, as setas indicam as células marcadas.

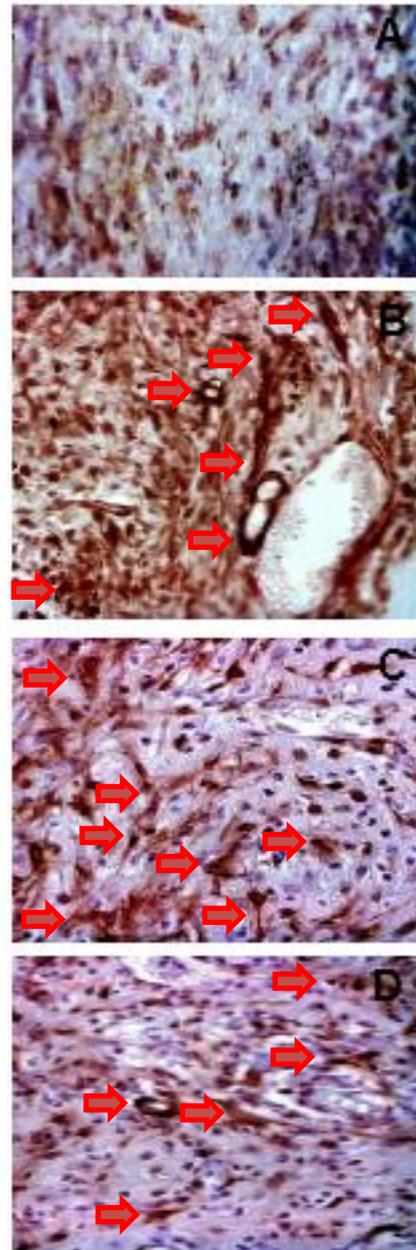


FIGURA 7 – Alvéolos dos grupos A, B, C e D do lado experimental imunomarcados com α -AML, as setas indicam as células marcadas.

Com base nos dados avaliados, é possível avaliar que a presença de PDGF exógeno carregado por lipossomas afetou significativamente a expressão de PECAM e α -AML no tecido ósseo neoformado da ferida.

De acordo com os dados, referentes à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, apresentados no Gráfico 1, houve diferença estatisticamente significativa na expressão de α -AML para os grupos B, C e D em comparação ao grupo controle, determinada pelas probabilidades (p) encontradas para cada período, inferior a 5% de referência de significância.

Também de acordo com os dados, referentes à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, apresentados no Gráfico 2, houve diferença estatisticamente significativa na expressão de PECAM para os grupos A e B em relação ao grupo controle, determinada pelas probabilidades (p) encontradas para cada período, inferior a 5% de referência de significância.

Após a realização da análise de variância (ANOVA), aplicou-se o Teste de Tukey, com o objetivo de calcular a diferença mínima significativa entre duas médias ao nível de 5%, cujos resultados constam nos Gráficos 1 e 2, abaixo:

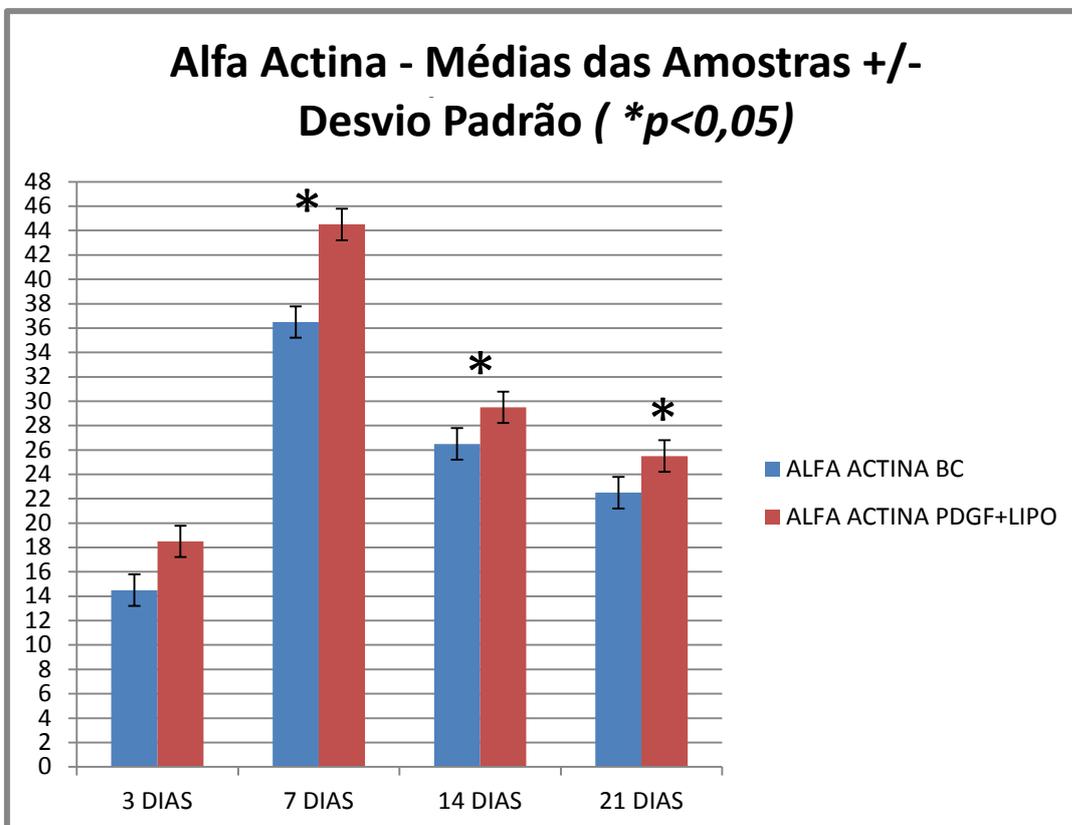


Gráfico 1- Resultado da imunohistoquímica realizada em lâminas marcadas com alfa actina de músculo liso. Teste Tukey $p < 0,05$

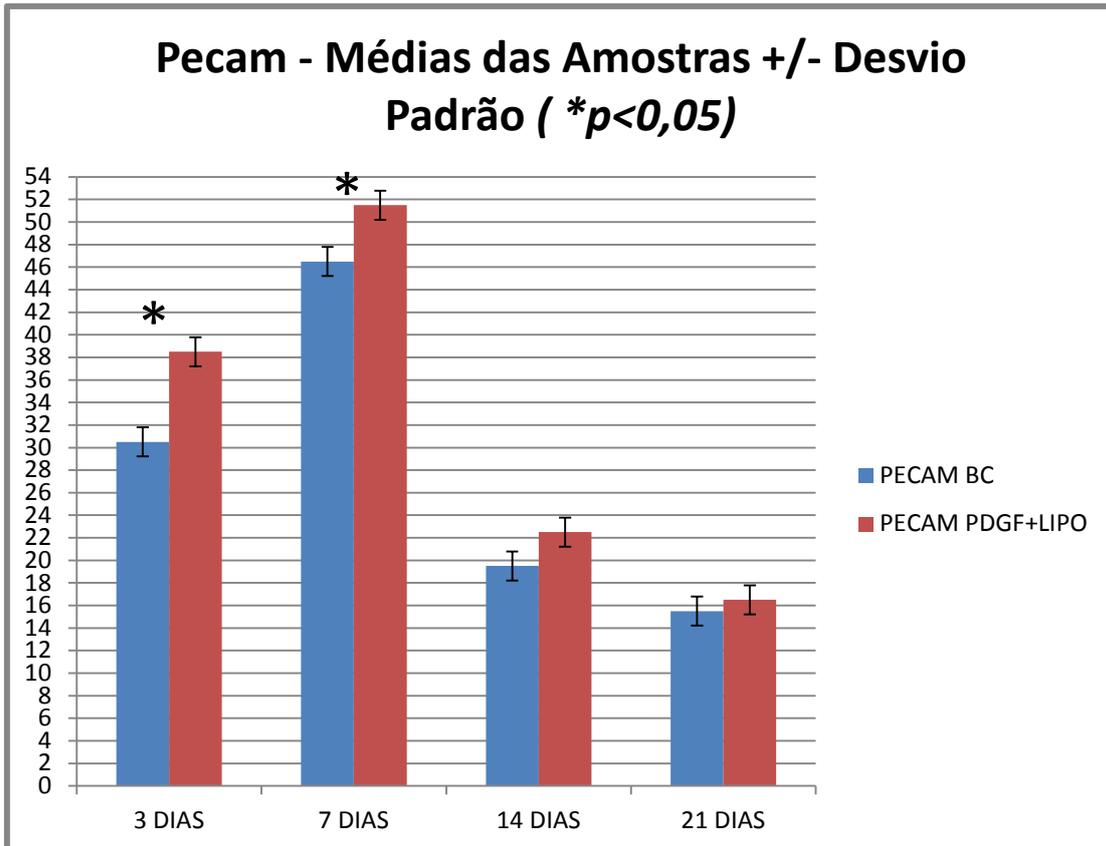


Gráfico 2 - Resultado da imunohistoquímica realizada em lâminas marcadas com PECAM. Teste Tukey $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

O processo de reparo ósseo dos maxilares é mediado por uma cascata de eventos moleculares, na qual participam fatores de crescimento e seus receptores. O conhecimento dessas moléculas sinalizadoras durante a dinâmica da cicatrização alveolar, poderá tornar o tratamento mais rápido e permitir, por meio da modulação biológica, o alcance dos objetivos clínicos, estéticos e funcionais, com maior eficiência e menor comprometimento dos tecidos envolvidos.

Pesquisas acerca do potencial dos biomateriais têm motivado diversos trabalhos que buscam o desenvolvimento de terapias ósseas, favorecendo a regeneração parcial e/ou total do aparato de inserção, potencializando expressivas implicações, em particular, sobre o uso de FC na regeneração do osso alveolar.

O reparo ósseo guiado (ROG) surgiu na década de 1950, e desde então tem idealizado várias técnicas e biomaterias, na intenção de alcançar o material ideal. Substitutos como osso alógeno, xenógeno, autógeno e aloplástico tem sido pesquisados e utilizados na prática clínica, porém essas técnicas tem apresentado limitações importantes que podem inviabilizar seu uso (OLIVEIRA et al 2007). O emprego de FC para a estimulação da osteogênese, em última análise, superam as limitações atualmente encontradas em relação ao reparo ósseo, como por exemplo, a necessidade de sítio doador e a imunogenicidade pertinentes a outros materiais (CHEN et al., 2002).

Apesar de o PDGF ser uma molécula chave durante o reparo ósseo, pouco se sabe sobre o papel desse Fator de crescimento quando exógeno ao reparo ósseo. Nesse sentido acredita-se que o entendimento da atuação de moléculas como o PDGF no processo de reparo ósseo, auxiliará no desenvolvimento de biomateriais para enxertos ósseos, bem como contribuirá para a elucidação da cascata molecular que rege esse reparo. Assim o objetivo geral deste trabalho foi compreender alguns dos fenômenos biológicos que acontecem no reparo ósseo normal (expressão de PECAM e α AML) e correlacioná-los com o reparo ósseo e com envolvimento de biomateriais, especificamente PDGF carregado por lipossomas (DARNELL et al., 2006; BESSHO et al., 1999; CHERY YANG et al., 2013).

Em linhas gerais, o modelo ideal seria aquele capaz de simular a situação clínica para o qual a técnica cirúrgica ou o material de enxerto ósseo foi desenvolvido. Nesse sentido, diversos testes tem sido empregados, em especial, o reparo de fraturas, a perda segmental em osso longo, o defeito de tamanho crítico em crânio, defeitos pós-exodontia e várias outras formas de não união. Haja vista disso, o modelo experimental utilizado nesse estudo foi eleito em razão da oferta adequada de dados e informações para estudos referente à reparação óssea, além de prestar, desta forma, um instrumento útil no entendimento dos processos moleculares que regulam a reparação de maneira didática e oportuna (LI; REINISCH; VAN DE MERVE, 1992).

A utilização de modelos animais para embasamento científico deve ser etapa fundamental no processo de pesquisa. Dentre os diversos modelos animais utilizados, os ratos são o de primeira escolha, por serem animais de baixo custo, fácil manutenção e enquadrarem-se nos conceitos de bioética. Por serem animais de pequeno porte, permitem que o experimento seja realizado com um número maior de animais e num intervalo de tempo menor entre o experimento e a análise dos resultados, tendo em vista seu metabolismo mais acelerado em relação a outros animais de grande porte (AOKI et al., 1996).

Todavia, o potencial osteoindutor varia em relação a posição ocupada pelo hospedeiro na escala filogenética, sendo que os seres vivos mais inferiores (p. ex. roedores) possuem uma maior capacidade tanto de induzir quanto de responder a um estímulo osteoindutor, o que torna a administração de PDGF carregado por lipossomas em ratos um modelo experimental para estudos do processo de reparo ósseo. A análise do peso dos animais encontra justificativa pelo fato de que o osso, sendo um tecido metabolicamente dinâmico é influenciado pelo fator nutricional e deficiências protéico-nutricionais (BAGI et al., 1994; LINKHART et al., 1996; COLNOT et al., 2005; GIAVARESI et al., 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; AROSARENA, COLLINS, 2005; CHESMEL et al. (1998).

A seleção dos períodos experimentais de 03, 07, 14 e 21 dias demonstraram viáveis, posto que, o evento de reparo em feridas a partir da extração dental em ratos leva cerca de 21 dias, período em que o alvéolo é preenchido integralmente por trabeculado ósseo neoformado (CARVALHO et al., 1983).

Com base nesse achado bio-fisiológico, o metabolismo acelerado dos animais utilizados nesse experimento sugere ser responsável pela efetiva recuperação dos mesmos após serem submetidos a exodontia dos segundos molares superiores. Embora os procedimentos de anti-sepsia intrabucal não foram empregados conforme o protocolo pré-operatório não houve manifestações de origem infecciosa nos dias seguintes a inserção do material. Logo, a eliminação desse procedimento provavelmente não inviabilizou o processo de reparo. Tal observação, possui fundamentação em estudos realizados por Magro-Filho et al. (1996) que concluíram que o uso prévio de clorexedina (0,2%) para a exodontia do incisivo superior direito em 45 ratos de raça Wistar não comprometeu o período de reparação das feridas de extração dental dos ratos. Por conseguinte, a realização de suturas foi dispensada, o que novamente não interferiu na correspondente formação de coágulo para posterior constituição do reparo ósseo. Tal situação supostamente possui estreita relação com o tempo de aplicação de agentes anestésicos, assim como administração medicamentosa de relaxantes musculares.

Nas últimas décadas, sabe-se que o hematoma gerado próximo aos limites das fraturas não significa um coágulo imóvel, mas sim um emaranhado de mediadores químicos que promovem sinais capazes de otimizar a formação do calo ósseo, promovendo a união da fratura provendo uma estabilidade provisória. O processo de coagulação ativa ainda o sistema complemento e tem o poder quimiotático para células inflamatórias, sobretudo macrófagos, que liberam interleucinas visando estimular a produção e liberação de prostaglandinas. Já as plaquetas são ricas em FC como o PDGF e EGF. Tendo em vista todas essas características positivas do coágulo, nosso estudo não obteve como objetivo o descarte do mesmo, mas sim utilizá-lo como indicador do processo natural de reparo ósseo, para ter um controle do experimento, e avaliar o efeito da aplicação do PDGF carregado por lipossomas no reparo ósseo alveolar.

A reconstrução de tecidos é considerado um desafio em cirurgias ósseas maxilofaciais entretanto, o resultado de tratamentos já utilizados mostra-se invariavelmente imprevisível, o que justifica as pesquisas continuadas que investigam a natureza da osteogênese, além de métodos de controlá-la e estimulá-la (BOABAID, 2006; GONCALVES, GUIMARÃES; GARCIA, 1998).

A viabilidade da técnica utilizada é explicada pelo fato de que o exemplo ideal de reparo ósseo é dependente basicamente da atividade das células osteoprogenitoras. Contudo, tais células possuem números limitados e sua atividade depende de estímulos, como os fornecidos por FC. Por tudo isso, é necessário desenvolver técnicas e materiais que venham a favorecer a proliferação, assim como diferenciação das células do tecido ósseo, para beneficiar no reparo de defeitos ósseos severos (OREFFO; TRIFFIT, 1999).

Alguns trabalhos *in vitro* têm demonstrado que em defeitos não reparáveis espontaneamente, os fatores de crescimento (FC) não alcançariam o centro do defeito ou não estariam presentes em quantidades suficientes. Muitas células mesenquimais, embora presentes, não seriam alvos dos FCs e conseqüentemente não seriam ativadas para proliferação e diferenciação em células produtoras de tecido ósseo, o que determinaria o preenchimento do defeito por tecido fibroso ou invasão por tecido muscular (ANITUA et al., 2007).

O emprego de moléculas que promovam a estimulação do reparo ósseo tem por finalidade possibilitar a ação a que ela se destina. Embora, geralmente uma significativa porção do medicamento é descartada sem exercer nenhuma atividade. Diante desse inconveniente, atualmente tem se desenvolvido inúmeros recursos para tornar o medicamento mais acessível para determinados alvos e com índices de liberação mais eficientes aumentando a probabilidade de alcançar o efeito desejado. Tais alternativas buscam em síntese, elevar a eficácia, em contrapartida, diminuir os efeitos colaterais, direcionar os fármacos a locais específicos do organismo, reduzir sua toxicidade, liberar o fármaco de maneira controlada, melhorar sua biodisponibilidade, alterar sua farmacocinética e potencializar a solubilidade do fármaco em sistemas aquosos (HARPER; JULIANO, 1981; RANSON et al., 1996; SILER-MARINKOVIC et al., 1997).

Nos reparos ósseos que ocorrem com sucesso *in vivo*, os fatores de crescimento são expressos em dosagens tempo-dependente, proporcionando a distribuição adequada dessas moléculas e o conseqüente reparo tecidual. Nesse sentido, selecionou-se para esse trabalho o lipossoma como carreador do FC, mimetizando assim a dinâmica ocorrida durante o reparo espontâneo, proporcionando a entrega da proteína em tempo, dose e contexto celular adequado, evitando assim quaisquer tipo de limitação relacionadas à difusão ou alcance do FC

às células alvo, preservando o potencial e a atividade da proteína (ECKARDT et al., 2003; PENG et al., 2002). Diante disso, pesquisas a partir do uso de lipossomas encontram-se em evidência. Trabalhos pré-clínicos e clínicos mostram que a encapsulação de fármacos em lipossomas fornecem vantagens efetivas, atuando, então como um sistema de liberação controlada (RANSON et al., 1996; SILER-MARINKOVIC et al., 1997).

Assim sendo, os lipossomas, quando utilizados como carreadores de FC no reparo ósseo, possuem a finalidade de alterar a natureza cinética de liberação da proteína, favorecendo a liberação lenta e gradual no sítio cirúrgico específico, mimetizando a liberação dos FC endógenos. Vale ressaltar que não somente a liberação prolongada do FC quando encapsulado é importante, como também a proteção da proteína de possíveis degradações no tecido. Logo, sua eliminação pode ser retardada, ou seja, preservada, permanecendo em níveis pequenos durante um período prolongado no tecido (FRÉZARD; MELO, 1997).

Estudos realizados com PECAM demonstraram que esta proteína está relacionada com funções vasculares que incluem o início do contato entre as células endoteliais, permeabilidade vascular, angiogênese, migração celular e trans-endotelial (SPRINGER, 1994; PIEDBOEUF et al., 1998)

Estudos realizados com α -AML demonstraram que esta proteína apresenta uma grande capacidade de aceleração do reparo tecidual, uma vez que, facilita a difusão dos fatores de crescimento do tecido lesado. Essa proteína, foi utilizada tendo em vista que a mesma é empregada na imunomarcagem de células musculares lisas, células mioepiteliais (MARTINEZ et al., 2007; MARTINS et al., 2011).

Nossos resultados sugerem um aumento da expressão de PECAM e α - AML regulado pela disponibilização de PDGF exógena carregada por lipossomas, principalmente aos sete dias do reparo ósseo. Nossos achados sugerem, portanto, a regulação direta de PCAM e alfa- AML pelo PDGF.

O PDGF é uma proteína encontrada em vários tecidos, e possui o poder de estimular a síntese celular de DNA e a rápida regeneração dos tecidos após as agressões (KALTALIOGLU et al., 2013; Olsen et al, 1984). Este fator tem uma ampla ação biológica e está envolvido com a indução do crescimento epitelial e da angiogênese. Entre suas ações biológicas, podem-se destacar ainda os efeitos

mitogênicos e quimiotáticos nos fibroblastos e a diferenciação e proliferação de células mesenquimais e epiteliais, além de estimular a formação de tecido de granulação (LIEBERMAN et al., 2002; ROSE, et al., 2004). Fibroblastos e pré-osteoblastos do ligamento periodontal expressam alta quantidade de receptores para o PDGF em suas membranas, em particular as de origem endotelial (ABREU et al., 2013; SCHLIEPHAKE, 2002).

Diversos experimentos com PDGF têm demonstrado que este fator de crescimento pró-angiogênese parece ser seguro em terapias ósseas, com resultados bastante promissores (STREET et al., 2002; KASTRUP, 2003; GALEANO et al., 2003). Os recentes avanços tecnológicos na biologia celular e molecular têm trazido esperança no que diz respeito ao completo conhecimento da cascata molecular envolvida no reparo ósseo, o que promete possibilidades para desenvolvimento de novas abordagens como terapias com fatores de crescimento e soluções de problemas clínicos hoje insolúveis.

A angiogênese é um evento importante, expressivamente mediado para a constituição de novos vasos sanguíneos a partir de capilares antecedentes, e o reparo tecidual exclusivamente ocorre com a formação adequada desses vasos (CHAIN; JONES; TARNAWISK, 2004). No sítio do reparo ósseo, osteoblastos e células osteoprogenitoras são encontradas de maneira adjacente as células endoteliais nos vasos sanguíneos, insinuando que a angiogênese e a osteogênese são concomitantemente interdependentes (DECKER; BARTELS; DECKER, 1995). Há uma íntima relação entre a formação óssea e a angiogênese, o alvo germinativo do tecido esta situado em volta dos vasos sanguíneos durante a osteogênese embrionária. Neste contexto, durante o processo de desenvolvimento, assim como alongamento ósseo, os fatores correspondentes a angiogênese presentes na placa de crescimento da epífise estimulam o surgimento de vasos sanguíneo em direção a região da metáfise e da cartilagem, gerando assim a neoformação óssea. Ademais, o processo de angiogênese é imprescindível para a ossificação endocondral durante reparo da fratura, neste quadro o tecido cartilaginoso é desprovido de vasos e paulatinamente é substituído por tecido óssea.

Para a angiogênese, a proliferação de células musculares lisas e sua disponibilização para incorporação na parede dos vasos em formação é de grande importância (SEZER et al., 2001; AKBULUT et al., 2002). A α -AML, presente em

miofibroblasto consiste em uma proteína do citoesqueleto e possui intrínseca relação no fechamento da lesão, uma vez que, tem a capacidade de prover uma intensa força contrátil, decorrente das fibras de estresses, estimulando a formação de coágulo e conseqüentemente favorecendo o reparo tecidual correspondente, sobretudo quando estimulado por FC.

Acredita-se que a atuação de moléculas como o PDGF no processo de reparo ósseo, poderá proporcionar diretrizes mais seguras no desenvolvimento de biomateriais para enxertos ósseos, bem como contribuir para a elucidação da cascata molecular que rege esse reparo (LEE; SHIN, 2007).

Células endoteliais possuem muitas funções e desempenham um papel central no controle da coagulação, trombose, tônus vascular, permeabilidade, inflamação, reparo tecidual e angiogênese. A angiogênese é um processo dinâmico, regulado por sinais presentes, tanto no soro, quanto na matriz extracelular local e ocorre na matriz do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica das células endoteliais. Este constitui, portanto, um complexo processo, que envolve mediadores solúveis, interações célula-célula e célula-matriz extracelular, bem como forças biomecânicas. A invasão de vasos sanguíneos tem um papel decisivo no reparo tecidual e sugere-se que o PDGF seja um mecanismo pelo qual a angiogênese e osteogênese estão interligados ou dependentes durante o reparo ósseo (PUSZTASZERI; SEELENTAG; BOSMAN, 2006; ANITUA et al., 2007).

Em situações envolvendo a cicatrização de feridas abertas fibroblastos oriundos da derme direcionam-se da região marginal da ferida, migrando para uma matriz provisória constituindo de coágulo de fibrina. Ao passo que, com cerca de 7 dias após o ferimento, tal matriz passa a ser substituída por um tecido conjuntivo neoformado chamado de tecido de granulação, composto em sua maioria por pequenos vasos, matriz extracelular e células fibroblástica que quando ativadas convertem-se em miofibroblastos. (MARTINS et al., 2011; MARTINEZ et al., 2007; HINZ et. al. 2001).

O Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) é naturalmente secretado por macrófagos, células da musculatura lisa e células endoteliais vasculares, além de plaquetas presentes na área lesada, e pode estar envolvido na cicatrização, pois *in vitro* estimula a síntese de fibronectina, ácido hialurônico,

colagenase e outras substâncias que são atuantes no processo de reparação (FOSTER, T. et al. 2009; WILTFANG et al., 2004).

Dessa forma, a terapia envolvendo alvéolos com PDGF em lipossomas, poderia potencializar o reparo e a osteointegração, promovendo vantagens significativas à reabilitação protética, corroborando a colocação de implantes e próteses dentárias, restabelecendo a função mastigatória aos pacientes.

A análise histomorfométrica utilizada possibilitou constatar uma elevação na expressão de moléculas presentes no reparo ósseo. A importância da análise histomorfométrica é validada nos estudos de Marzouk et al. (2007) e Eski et al. (2007), que relatam ser a análise quantitativa essencial para estudos que objetivam avaliar a efetividade de novas modalidades terapêuticas na neoformação óssea.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram, ao final do experimento, aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão de PCAM e α -AML, com pico nos alvéolos tratados com PDGF em lipossomas do grupo B, apresentando relevância estatística para esses dados.

Aumentos estatisticamente significantes na expressão de PCAM foram observados nos grupos A e B, respectivamente 3 e 7 dias, lado experimental. Esses resultados estão de acordo com achados anteriores relativos ao PDGF, que evidenciam a ação dessa proteína na otimização da aceleração no reparo ósseo, o que demonstra a viabilidade do uso dessas substâncias, quando devidamente aplicadas sobre o tecido ósseo lesado.

Para os períodos de 14 e 21 dias, não se evidencia diferença estatística para a expressão de PCAM, pois quase a totalidade do alvéolo se encontrar preenchida com tecido ósseo neoformado e o tecido inflamatório já foi substituído (DEVLIN, 2000).

Em consonância com o fato do PDGF endógeno ser muito importante para o reparo ósseo, o PDGF exógeno pode promover a angiogênese e a aceleração da formação óssea (STREET et al., 2002).

As evidências experimentais deste trabalho sugerem que a utilização de PDGF exógena carregado por lipossoma parece causar alterações nas características intrínsecas do reparo alveolar pós-exodontia, porém, estudos complementares se

fazem necessários, devido à complexidade dos efeitos dos fatores de crescimento sobre a dinâmica de reparo do tecido ósseo.

Considerando as características acima mencionadas, verificamos propriedades relevantes do emprego de PDGF carregado por lipossomas neste estudo, uma vez que se evidenciou significativo potencial osteoindutor desse material. Essas características favoráveis contribuem para a indicação de PDGF carregado por lipossoma como material de enxerto em feridas ósseas, com resultados positivos e grandes perspectivas de sucesso em sua aplicação nas mais variadas áreas das ciências biomédicas, sobretudo na Odontologia. Futuras pesquisas com metodologia específica para a identificação de outras substâncias ativadas pelo processo de osteoindução de PDGF poderão complementar os resultados obtidos neste experimento, elucidando melhor a cascata molecular do reparo ósseo e indicando qual ou quais fatores de crescimento apresentam maior potencial para terapias regenerativas.

6 CONCLUSÃO

Assim sendo, em conformidade com os objetivos propostos os resultados obtidos demonstraram que a utilização do PDGF carregado por lipossomas favoreceu o reparo. Ao mesmo tempo, o PDGF veiculado por lipossomas aumentou a expressão de PECAM e de α -AML, importantes moléculas no reparo ósseo.

REFERÊNCIAS

ABREU, F. A. M. de. et al. Effect of PDGF-BB, IGF-I Growth Factors and their Combination Carried by Liposomes in Tooth Socket Healing. **Brazilian Dental Journal**. 24(4): 299-307. 2013.

ALVES, J. B. et al. Local delivery of EGF-liposome mediated bone modeling in orthodontic tooth movement by increasing RANKL expression. **Life Sci**, v. 4;85, n. 19-20, p. 693-699, nov. 2009.

AKBULUT, H. et al. Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. **Cytokine**, v. 20, n. 4, p. 184-190, nov. 2002.

ANITUA, E. et al. The potencial impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. **Biomaterials**, v. 28, p. 4551-4560, 2007.

AROSARENA, O. A.; PUELO, D. In vitro effects of combined and sequential bone morphogenetic protein administration. **Arch Facial Plast Surg**, v. 9, p. 242-247, 2007.

AOKI, K.; NISHIMURA, G.; HAGA, N.; IKEUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; YAMATO, M. Review. Fragile bone syndrome associated with craniognathic fibro-osseous lesions and abnormal modeling of the tubular bones: report of two cases and review of the literature. **Skeletal Radiol**. Nov;25(8):717-22. 1996.

AROSARENA, O. A.; COLLINS W. L. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. **Otolaryngology: Head and Neck Surgery**, 132: 592-597, 2005.

BAGI, C. M. et al. Benefit of systemically administered rhIGF-I and rhIGF-I/IG-FBP-3 on cancellous bone in ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**, v. 9, p. 1301, 1994.

BESSHO, K. et al. BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. **Clin Oral Implants Res**, v. 10, p. 212-218, 1999.

BOABAID, Fernanda. **Uso das Proteínas Derivadas da Matriz do Esmalte (Emdogain® Straumann) Associado a Implantodontia**. Trabalho de conclusão apresentada ao curso de Especialização de Periodontia da universidade Federal de Santa Catarina. 2006. Disponível em: <http://tcc.bu.ufsc.br/Espodonto235876.PDF>. Acesso em: 08 fev. de 2014.

CAIO, Abner V. G. Leite. et al. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, Vol. 8, n. 29, julho / agosto / setembro, 2012.

CARVALHO, A. A. et al. Healing of tooth extraction wounds in rats with renal hypertension: a histological study. *J Nihon Univ Sch Dent*, v. 25, n. 3, p. 214-220, sep. 1983.

CHAIN, J.; JONES; M. K.; TARNAWSKI, A. S. Serum response factor is a critical requirement for VEGF signaling in endothelial cells and VEGF-induced angiogenesis. **FASEB J**, v. 18, n. 11, p. 1264-1266, aug. 2004.

CHEN, D. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB e IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. **J Cell Biol**, v. 142, n. 1, p. 295-305, jul. 2002.

CHERY YANG et al. Periodontal regeneration with nano-hydroxyapatite-coated silk scaffolds in dogs. **J Periodontal Implant Sci**. December; 43(6): 315–322. 2013.

CHESMEL, K. D. et al. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 56, n. 7, p. 857, 863, jul. 1998.

COLNOT, C. et al. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 435, p. 69-78, 2005.

DARNELL, Kaigler. et al. Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering. **Expert Opin Drug Deliv**. September ; 3(5): 647–662. 2006.

DECKER, B.; BARTELS, H.; DECKER, S. Relationships between endothelial cells, pericytes, and osteoblasts during bone formation in the sheep femur following implantation of tricalciumphosphate-ceramic. **Anat Rec**, v. 242, n. 3, p. 310-320, jul. 1995.

DEVLIN, H. Early bone healing events following rat molar tooth extraction. **Cells Tissues Organs**, v. 167, n. 1, p. 33-37, 2000.

DEVESCOVI, Valentin; LEONARDI, Elisa; CIAPETTI, Gabriela; CENNI, Elisabetta. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov.* 92:161–168. 2008.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The Osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, p. 1501-1504, 2000.

ECKARDT, H. et al. Effects of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis. **J Orthop Res**, v. 21, n. 2, p. 335-340, 2003.

ESKI, M. et al. Assessment of distraction regenerate using quantitative bone scintigraphy. **Ann Plast Surg**, v. 58, n. 3, p. 328-334, mar. 2007.

FOSTER, T. et al. Platelet rich plasma: from basic Science to clinical applications. **American Journal os Sports Medicine**, v. 37, n.11, 2009.

FREDERIKSEN, N.L; BENSON, B. W; SOKOLOWSKI, T. W .Effective dose and risk assessment from computed tomography of the maxillofacial complex. **Dentomaxillofac Radiol.** 24:55-58. 1995.

FRÉZARD, F.; MELO, A. L. Evaluation of the schistosomicidal efficacy of liposome: entrapped oxamniquine. **Rev Inst Med Trop**, v. 39, n. 2, p. 97-100, mar./abr. 1997.

GALEANO, M. et al. Effect of recombinant adeno-associated virus vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer on wound healing after burn injury. *Crit Care Med*, v. 31, n. 4, p. 1017-1025, apr. 2003.

GARCIA, M. P. Estudo in vivo dos efeitos sub-crônicos de não partículas magnéticas à base de magnetita recobertas com DMSA. 2005. 88F Tese (Doutorado em Ciências de Saúde)- Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. Brasília.

GIANNOBILE, W. V.; WHITSON, S.W.; LYNCH, S. E. Non-coordinate control of bone formation displayed by growth factor combinations with IGF-I. **J Dent Res**, v. 76, p. 1569-1578, 1997.

GIAVARESÌ, G. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. **Biomaterials**, v. 26, p. 3001-3008, 2005.

GONCALVES, Evelyn Almeida Lucas; GUIMARAES, Sérgio Augusto Catanzaro; GARCIA, Roberto Brandão. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. **Rev Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v. 12, n. 3, jul. 1998.

HARPER, P. A.; JULIANO, R. L. Two distinct mechanisms of fibroblast adhesion. **Nature**, v. 12, n. 290, p. 136-138, mar. 1981.

HILL, P. A. Bone remodelling. **Br J Orthod**, v. 25, p. 101-107, 1998.

HINZ, Boris et. al. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. **Molecular Biology of the Cell**. 12, 2730-2741, set. 2001.

HUANG, Y. H. Bone morphogenetic proteins and osseointegration: current knowledge – future possibilities. **Periodontology 2000**, v.47, p. 206-223, 2008.

KALTALIOGLU; K; COSKUN-CEVHER, S; TUGCU-DEMIROZ, F; CELEBI, N. PDGF supplementation alters oxidative events in wound healing process: a time course study. **Arch Dermatol Res**. Jul;305(5):415-22. 2013.

KASTRUP, J. Therapeutic angiogenesis in ischemic heart disease: gene or recombinant vascular growth factor protein therapy? **Curr Gene Ther**, v. 3, n. 3, p. 197-206, jun. 2003.

KLOEN, P. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. **Bone**, v. 33, p. 362-371, 2003.

KRISHNAN, V. D. Z. Cellular, molecular and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 129, n. 469, p. 460-460, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LASIC D. **Liposomes: From Physics to Applications**. Elsevier. 1993.

LEE, S. H.; SHIN, H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, p. 339-359, 2007.

LI, Z. Z; REINISCH, L.; VAN DE MERWE, W. P. Boné ablation with Er: YAG and CO2 laser: study of thermal and acoustic effects. **Lasers Surg Med**, v. 12, n. 1, p. 79-85, 1992.

LIEBERMAN, J. R. et al. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84, p. 1032-1044, 2002.

LINKHART, T. A. et al. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta e BMP. **Bone**, v. 19, (Supl. 1), p. 1-12, 1996.

LUGINBUEHL, V. et al. Localized delivery of growth factors for bone repair. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 58, p. 197-208, 2004.

MAGRO-FILHO, O. et al. Influência da anti-sepsia intra-bucal com clorexidina 0,2% na reparação do alvéolo dental. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 50, p. 243-246, 1996.

MARTINS, Gabriela Botelh; RIBEIRO, Marlos Barbosa; REIS, Silvia Regina de Almeida. Análise de miofibroblastos no estroma de carcinoma epidermoide da boca. **RPG Rev Pós Grad.**18(4):244-252. 2011.

MARTINEZ, et. al. TGF β 1 Enhances the expression of α -Smooth Muscle Actin in Cultures Human Pulpal Fibroblasts: Immunochemical and Ultrastructural Analyses – **JOE**. 11, novembro, 2007.

MARZOUK K. M. et al. Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 8, p. 1508-1516, aug. 2007.

OLIVEIRA, S; FERREIRA de OLIVEIRA, S. H; ROMEIRO, R. L. Enxerto de crista de ilíaco emperdas ósseas verticais localizadas em maxila. Relato de caso. **Implant News**. 2007;4(6):713-716.

OREFFO, R. O.; TRIFFITT, J. T. In vitro and in vivo methods to determine the interactions of osteogenic cells with biomaterials. **J Mater Sci Mater Med**. 10,10-11, p. 607-611, oct./nov. 1999.

PIEDBOEUF, B., GAMACHE, M., FRENETTE, J., HOROWITZ, S. BALDWIN, H. Increased endothelial cell expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 during hyperoxic lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 19: 543-553. 1998.

- PUSZTASZERI, M. P.; SEELENTAG, W.; BOSMAN, F.T. 2006. Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. **J Histochem Cytochem** 54: 385 2006.
- RAJA, S; BYAKOD G; PUDAKALKATTI, P. **Growth factors in periodontal regeneration**. Int J Dent Hyg. May;7(2):82-9. 2009.
- RAMOSHEBI, L. N. Tissue engineering: TGF- β superfamily members and delivery systems in bone regeneration. **Expert Rev Mol Med**, v. 4, p. 1-11, 2002.
- RANSON, M. et al. Liposomal drug delivery. **Cancer Treat Rev.**, v. 22, n. 5, p. 365-379, 1996.
- ROSE, F. R. et al. Delivery systems for bone growth factors: the new players in skeletal regeneration. **J Pharm Pharmacol**, v. 56, p. 415-427, 2004.
- SASAKI, T.; WATANABE, C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. **Bone**, v. 16, p. 9-15, 1995.
- SCARANO A, DEGIDI M, IEZZI G, PECORA G, PIATTELLI M, ORSINI G et al. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. **Implant Dentistry** ;15(2):197-207. 2006.
- SEZER, O. et al. Relationship between bone marrow angiogenesis and plasma cell infiltration and serum beta2-microglobulin levels in patients with multiple myeloma. **Ann Hematol**, v. 80, n. 10, p. 598-601, 2001.
- SCHLIEPHAKE, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 31, p. 469-484, 2002.
- SILER-MARINKOVIC, S. et al. Liposomes as carriers of antimicrobial drugs. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 23, n. 5, p. 483-488, 1997.
- SPRINGER, T. A. **Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration**: the multistep paradigm. Cell 76: 301-314. 1994.
- STREET, J. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 9656-9661, 2002.

SWANK, A.; HOSGOOD, G. Corneal wound healing and the role of growth factors. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 18, n. 9, p. 1007-1017, 1996.

TEITELBAUM, S.L. Bone Resorption by Osteoclasts. **Science**, v. 289, p. 1504-1508, 2000.

WILTFANG, J. et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects – an animal experiment. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, p. 187-193, 2004.

VENDRAMIN, Fabiel Spani et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro , v. 33, n. 1, Feb. 2006.

ZELZER, E.; OLSEN, B. R. Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. **Curr Topics Dev Biol**, v. 65, p. 169-187, 2005.

ANEXOS