

UNIVERSIDADE DE UBERABA
CLÁUDIO ROBERTO REIS FILHO

EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE ENDOTÉLIO VASCULAR APÓS
UTILIZAÇÃO DE MATRIZ DENTINÁRIA HUMANA DESMINERALIZADA EM
ALVÉOLOS DE RATOS: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E
HISTOQUANTITATIVA

UBERABA – MG
2009

CLÁUDIO ROBERTO REIS FILHO

EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE ENDOTÉLIO VASCULAR APÓS
UTILIZAÇÃO DE MATRIZ DENTINÁRIA HUMANA DESMINERALIZADA EM
ALVÉOLOS DE RATOS: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E
HISTOQUANTITATIVA

Trabalho apresentado como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Mestrado Acadêmico em Odontologia, da Universidade de Uberaba, área de concentração em Biopatologia.

Orientador: Prof. Dr. José Bento Alves

Co-orientadora: Profa. Dra. Elisângela Ribeiro da Silva

UBERABA – MG

2009

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central da UNIUBE

- R277e Reis Filho, Cláudio Roberto
Expressão do VEGF após utilização de matriz dentinária humana desmineralizada em alvéolos de ratos: análise imunohistoquímica e histoquantitativa / Cláudio Roberto Reis Filho. 2009
67 f. : il. ; 30 cm
- Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia, área de concentração em Biopatologia, 2009
Orientador: Prof. Dr. José Bento Alves
Co-orientadora: Prof^a Dra. Elisângela Ribeiro da Silva
1. Osso malar – Regeneração. 2. Endotélio vascular. 3. Permeabilidade vascular. 4. Dentina. 5. Polpa dentária. 6. Ossos – Enxerto. I. Universidade de Uberaba.. Programa de Mestrado em Odontologia. II. Alves, José Bento. III. Silva, Elisângela Ribeiro da. IV. Título.
- CDD: 617. 471

CLÁUDIO ROBERTO REIS FILHO

EXPRESSÃO DO VEGF APÓS UTILIZAÇÃO DE MATRIZ DENTINÁRIA
HUMANA DESMINERALIZADA EM ALVÉOLOS DE RATOS: ANÁLISE
IMUNOHISTOQUÍMICA E HISTOQUANTITATIVA

Trabalho apresentado como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Mestrado Acadêmico em Odontologia, da Universidade de Uberaba, área de concentração em Biopatologia.

Orientador: Prof. Dr. José Bento Alves

Co-orientadora: Profa. Dra. Elisângela Ribeiro da Silva

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. André Jerônimo

Prof. Dr. José Bento Alves

Profa. Dra. Sanívia Aparecida Lima Pereira

A Deus, pois se ELE é por mim quem será contra mim.

A SANDRA esposa, amiga, companheira eterna, meu equilíbrio.

Ao CLAUDINHO E A ISABELA por me darem amor incondicional e eterno.

Ao Dr. CLÁUDIO e a Dona AMÉLIA, meus pais, rochas para se edificar uma vida.

Ao FLAVIO e ao GIAN irmãos, amigos, carne de minha carne.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Jose Bento Alves pelo conhecimento compartilhado sempre.

A amiga e co-orientadora Elisangela Ribeiro, por acreditar em mim.

A enorme “Cláudinhezinha” Alem Domingues e família pela amizade sincera e ombro amigo.

Ao prof. Ms. Silas Queiroz de Souza pela sinceridade e amizade.

A Polyana pela presteza e conhecimento compartilhado.

Ao Peterson pelos ratos e pelas conversas e alegria.

Aos professores do mestrado pelo conhecimento abundante.

Aos colegas de mestrado locais e importados de Gurupi, pela energia positiva.

Ao Prof. Ms quase Dr. Gustavo Silva Abrahao pelos artigos e pelas lições de vida e amizade.

Ao Prof. Dr. João Paulo Chieragato, pela intervenção e sugestões e pelo exemplo de pessoa.

Aos companheiros de laboratório pelas dicas valiosas.

Ao Leônidas e sua equipe pela inteligência e habilidade em adaptar ferramentas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

AS TRÊS PENEIRAS

Augustus procurou Sócrates e disse-lhe:

- Sócrates, preciso contar-lhe algo sobre alguém! Você não imagina o que me contaram a respeito de...

Nem chegou a terminar a frase, quando Sócrates ergueu os olhos do livro que lia e perguntou:

- Espere um pouco Augustus. O que vai me contar já passou pelo crivo das três peneiras?

- Peneiras? Que peneiras?

- Sim. A primeira, Augustus, é a da verdade. Você tem certeza de que o que vai me contar é absolutamente verdadeiro?

- Não. Como posso saber? O que sei foi o que me contaram!

- Então suas palavras já vazaram a primeira peneira. Vamos então para a segunda peneira: a bondade. O que vai me contar gostaria que os outros também dissessem a seu respeito?

- Não, Sócrates! Absolutamente, não! - Então suas palavras vazaram, também, a segunda peneira.

-Vamos agora para a terceira peneira: a necessidade. Você acha mesmo necessário contar-me esse fato, ou mesmo passá-lo adiante? Resolve alguma coisa? Ajuda alguém? Melhora alguma coisa?

- Não, Sócrates... Passando pelo crivo das três peneiras, compreendi que nada me resta do que iria contar. E Sócrates sorrindo concluiu:

- Se passar pelas três peneiras, conte! Tanto eu, quanto você e os outros iremos nos beneficiar. Caso contrário esqueça e enterre tudo. Será uma fofoca a menos para envenenar o ambiente e fomentar a discórdia entre irmãos. Devemos ser sempre a estação terminal de qualquer comentário infeliz! Da próxima vez que ouvir algo, antes de ceder ao impulso de passá-lo adiante, submeta-o ao crivo das três peneiras porque:

Pessoas sábias falam sobre idéias;

Pessoas comuns falam sobre coisas;

Pessoas medíocres falam sobre pessoas.

RESUMO

As profissões da área da saúde estão inseridas em um contexto de progresso tecnológico permitindo com que os biomateriais sejam cada vez mais utilizados para acelerar o processo de regeneração óssea. Proteínas, como a fibronectina e colágeno, e Fator de crescimento de endotélio vascular, têm um papel importante na formação óssea, pois tem a capacidade de induzir a ativação de osteoclastos funcionais, neovascularização e influenciar a diferenciação de células mesenquimais em células osteogênicas ou osteoprogenitoras. Vários destes fatores detectados no tecido ósseo também foram isolados da dentina e podem atuar como determinantes da formação óssea. A dentina humana desmineralizada pode representar uma alternativa à matriz óssea, para a indução do reparo ósseo, devido à sua facilidade de processamento, biocompatibilidade e capacidade de estimular a angiogênese e a formação óssea. Além disso, a sua utilização não acarretaria os problemas que estão associados ao auto-enxerto, dentre eles morbidade do sítio doador e fornecimento limitado de tecido. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da Matriz dentinária humana desmineralizada na regeneração de defeitos cirúrgicos. Neste trabalho, foram utilizados trinta e dois ratos da raça *Rattus norvegicus albinus*, variedade *Wistar*, divididos em quatro grupos experimentais: grupo I, composto por 8 animais sacrificados após três dias da exodontia; grupos II, III e IV compostos por 8 animais cada, submetidos à eutanásia respectivamente, aos sete, quatorze e vinte e um dias após procedimentos cirúrgicos. Neste procedimento, os segundos molares maxilares esquerdo e direito foram extraídos e os alvéolos do lado esquerdo preenchidos com matriz dentinária humana desmineralizada e os direitos, utilizados como controles. As regiões onde foram realizados os experimentos foram removidas e examinadas e em seguida as peças foram desmineralizadas em ácido etilendiamino tetra-acético a 10 % , processadas para análise em microscopia de luz. A média de densidade de volume de matriz óssea neoformada foi significativamente maior no grupo tratado em relação ao controle, principalmente nos três primeiros dias. As lâminas foram processadas para técnica imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos Anti-Fator de crescimento de endotélio vascular o que sugere também que a matriz dentinária humana desmineralizada estimula a expressão de crescimento de endotélio vascular.

Palavras-chave: VEGF. Matriz dentinária humana desmineralizada. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

The health área professions are inserted in a context of technological advancement. Biomaterials have been used with the purpose of accelerating the bone regeneration process. Neovascularization as well as the proteins secretion, such as fibronectine and collagen, and growing factors as the vascular endothelium growing factor have a significant role in bone formation, since they are capable of inducing the activation of functional osteoblasts, neovascularization and of influencing the differentiation of mesenchymal cells in either osteogenic or osteoprogenitor cells. Several of these factors, detected in bone tissue were also isolated from dentin and can actuate as determinants of bone formation. Demineralized human dentin can represent an alternative to the bone matrix, for the induction of bone repair, due to its processing easiness, biocompatibility and capacity of stimulating the angiogenesis and bone formation. Besides, its utilization would not bring on the troubles which are associated with the autograft, such as morbidity of donor site and limited supply of tissue. The aim of this study was to analyze the effects of demineralized human dentin matrix on surgical defects regeneration. Thirty-two Wistar rats divided into four groups of eight animals each one were used. The second right and left maxillary molars were extracted and the left side alveoli filled with demineralized human dentin matrix, and the right alveoli were the controls. The animals were divided into four groups: group I, composed by 8 animals sacrificed after three days of exodontics; groups II, III and IV composed by 8 animals each sacrificed, respectively, at seven, fourteen and twenty-one days after surgical procedures. The regions where the experiments were performed were removed and macroscopically examined, demineralized in ethylene-diamine-tetra-acetic acid, and paraffin embedded for obtaining histological cuts of 5 μ m of thickness, stained with Hemtoxylin and Eosin, and bone tissue cytology was described. The average of volume density of neoformed bone matrix was significantly larger in the treated group mainly in the first three days. It was concluded that demineralized human dentin matrix is biocompatible, acting as an osteopromoter material in bone regeneration, thus promoting the neoforamin of bone tissue in a more rapid way and in a larger volume. Laminae were processed for immunohistochemical technique using specific antibodies anti-growing factor of vascular endothelium, which allowed us also to conclude that demineralized human dentin matrix stimulates the growing expression of vascular endothelium.

Key-words: Vascular endothelium growing factor-VEGF. Demineralized human dentin matrix. Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Figura histológica mostrando a colocação de reticulo milimetrado com o propósito de quantificar a o numero de células himunomarcadas dentro dos períodos considerados.(Objetiva de 40x) -----	40
Figuras 2 e 3	Figura histológica mostrando a presença da matriz dentro do alvéolo esquerdo (setas). Controle - Figura histológica mostrando a presença de processo inflamatório (setas). Coradas com HE, (objetiva de 20x)-----.	41
Figuras 4 e 5	Corte longitudinal de alvéolo. Experimental (fig4) Corte longitudinal do alvéolo Controle (fig5) . Tempo: 7 dias. HE-----	42
Figuras 6 e 7	Experimental - Corte longitudinal do alvéolo esquerdo mostrando área com diminuição dos espaços medulares (setas). Controle - Corte longitudinal do alvéolo direito mostrando áreas dos espaços medulares (setas). Ambas Coradas com HE, (objetiva de 40x)-----	43
Figuras 8 e 9	Corte longitudinal do alvéolo esquerdo (fig 8) , lado controle.Corte longitudinal do alvéolo direito , lado controle(fig 9) . HE-----	43
Figuras 10 e 11	Controle - Expressão do VEGF em fibroblastos do tecido cicatricial em alvéolo 7 dias. Experimental - Expressão do VEGF em fibroblastos do tecido cicatricial em alvéolo (marcação intensa no tecido cicatricial) 7 dias-----	44
Gráficos 1 e 2	Mostra a neo-formação óssea no lado esquerdo (preenchido com Matriz dentinária) do que no lado direito (lado controle), sendo estatisticamente maior ($P < 0.05$) aos sete, quatorze e vinte e um dias--	44

LISTA DE ABREVIATURAS

aFGF	-	Fator de crescimento Fibroblástico ácido
bFGF	-	Fator Fibroblástico básico
BIO OSS	-	Osso desproteínizado liofilizado bovino
BMP	-	Proteína Morfogênica do Osso
CDPM	-	Proteínas morfogenéticas derivadas de cartilagem 1
FGF	-	Fator de crescimento do fibroblasto e
GDF	-	Fator de crescimento e diferenciação
HE	-	Hematoxilina e eosina
HNa	-	Hialuronato de sódio
IGF- II	-	Fator de crescimento insulínico II
IGF-I	-	Fator de crescimento insulínico I
kDA	-	Kilo daltons
KDR	-	Kinase domain region
MDDA	-	Matriz dentinária desmineralizada autógena
MDHD	-	Matriz dentinária humana desmineralizada
MEC	-	Matriz extracelular
PTFE	-	Politetrafluoretileno
NCP	-	Proteínas não colagenosas
PDG-F	-	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PRP	-	Plasma rico em plaquetas
ROG	-	Regeneração óssea guiados
RTK	-	Receptor tirosina quinases
TGF- β -I	-	Fator de crescimento transformador beta I

- TGF- β -II - Fator de crescimento transformador beta II
- VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial
- Vgr - Gene do grupo transformador de fator de crescimento
- VPF - Fator de permeabilidade vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Tecido ósseo e mecanismos de reparo.....	16
1.2 Reparo ósseo.....	20
1.3 Materiais biológicos de enxertos ósseos.....	26
1.4 Dentina.....	28
1.5 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF).....	33
2 OBJETIVOS.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Eutanásia dos animais.....	38
3.2 Preparação dos espécimes para avaliação histológica e histoquantitativa.....	38
3.3 Análise histológica qualitativa.....	39
3.4 Análise histométrica.....	39
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Análise histomorfológica.....	41
4.1.1 Grupo I.....	41
4.1.2 Grupo II.....	41
4.1.3 Grupo III.....	42
4.1.4 Grupo IV.....	43
4.2 Análise imunohistoquímica.....	44
4.3 Análise Histoquantitativa.....	44
5 DISCUSSÃO.....	45
6 CONCLUSÃO.....	50

REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO.....	66

1 INTRODUÇÃO

Baseados na necessidade do desenvolvimento de técnicas de manuseio de biomateriais de enxerto ósseo e, principalmente no entendimento da cascata molecular da osteoindução, acreditamos que a avaliação da matriz dentinária humana desmineralizada (MDHD) e sua influencia na expressão de VEGF, fator de crescimento importante para o reparo ósseo, aplicada ao processo de reparação óssea seja de relevância, sobretudo na área odontológica, onde são inúmeras as condições patológicas que levam a significativas perdas ósseas na cavidade bucal. (DUMAS ET AL. 2006)

1.1 Tecido ósseo e mecanismos de reparo.

A capacidade de regeneração do tecido ósseo é limitada e mesmo quando o reparo acontece, pode ser acompanhado de defeitos intraósseos (KRYST, 1997), e devido a esse fato o reparo de fraturas complexas e defeitos ósseos de grande extensão, causados por diversos fatores etiológicos como traumas, doenças, deformidades de desenvolvimento ou ressecção de tumores, não raro se torna frustrante. As técnicas clássicas de enxertia ósseas, quando usadas, nem sempre fornecem resultados satisfatórios (HAMMERLE *et al.*, 1998; KARRING *et al.*, 1982; DAHLIN *et al.*, 1988).

Encontramos no tecido ósseo células como fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos que constituem os principais agentes da modificação da matriz óssea, como o osteoblasto que produz a matriz que se mineraliza de maneira bem regulada e o osteoclasto que quando ativado, remove esta matriz (MARTIN e NG, 1994). A formação do tecido resulta de uma complexa cascata de ocorrências que envolvem a proliferação de células mesenquimais primitivas, diferenciação em células precursoras osteoblásticas (osteoprogenitora, préosteoblasto), maturação dos osteoblastos, formação de matriz e mineralização (ERIKSEN; MOSEKILDE; MELSEN, 1986).

No processo de formação óssea ocorre inicialmente a atração quimiotática dos precursores dos osteoblastos, provavelmente mediada por fatores locais. Em seguida, ocorre a proliferação de células precursoras dos osteoblastos. A quimiotaxia e a indução mitótica dessas células é mediada por fatores de crescimento liberados a partir do tecido ósseo degradado durante o processo de reabsorção. Um dos mediadores responsáveis por este efeito é o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). (PFEILSCHIFTER; BONEWALD, MUNDY, 1990; MARTIN e NG, 1994).

Na busca por melhores resultados nas regenerações ósseas, reparos ósseos guiados (ROG), mecânica, química e biologicamente, vêm sendo exaustivamente estudados (BOLOURI; HAGHIGHAT; FREDERIKSEN, 2001; CHRISTGAU *et al.*, 1997; CORTELLINI; PINI PRATO; TONETTI, 1993 ; SATO, 2000; WOJTOWICZ *et al.*, 2001).

O osso é capaz de reparar-se por remodelação ou por regeneração após o trauma, o que inclui a exodontia e inserção de implantes. Enxertos e implantes podem ser colocados, segundo Misch e Dietsch (1993), visando aumento de massa óssea, podendo incorporar-se a este tecido dando suporte ou estimulando o crescimento ósseo em áreas onde este tecido poderia ser reabsorvido como resultado de processos fisiológico ou patológico. Estes substitutos podem agir no osso hospedeiro por meio de dois diferentes mecanismos que são a osteocondução e a osteoindução (BOLOURI; HAGHIGHAT; FREDERIKSEN, 2001).

As profissões da área da saúde atuais estão inseridas em um avançado contexto de progresso tecnológico, e isso fez com que surgissem diferentes aplicações na área de biomateriais, permitindo sua utilização com o intuito de acelerar o processo de regeneração óssea. As pesquisas realizadas com materiais de enxertos ósseos vão desde o uso em alvéolos dentários pós-exodontia, até a complementação de cirurgias de implantes osseointegrados ou defeitos ósseos periodontais e deformidades craniofaciais. Existem, portanto, duas classes de biomateriais: 1 osteoindutores e 2 osteocondutores. Os materiais osteoindutores se caracterizam pela capacidade de induzir a transformação de células indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, mesmo em áreas onde não se espera tal comportamento e têm participação na reparação de uma ferida estimulando a formação de novo tecido ósseo. Dentre os biomateriais osteoindutores mais estudados destaca-se o osso autógeno, a matriz orgânica de osso humano, a matriz orgânica de osso bovino, o osso liofilizado e matriz dentinária desmineralizada (NOCITI *et al.*, 2001).

Já os materiais osteocondutores preenchem a cavidade orientando o tecido ósseo em sua neoformação. A osteocondução caracteriza a regeneração óssea por aposição sobre o tecido ósseo pré-existente e também sobre o material enxertado. Portanto, este processo deve ocorrer na presença de osso ou células mesenquimais diferenciadas. Os materiais osteocondutores são biocompatíveis, não apresentando reação tóxica evidente. Já os autoenxertos ósseos constituem, uma alternativa muito comumente utilizadas nas reconstruções ósseas craniofaciais pelo fato das áreas doadoras serem limitadas podendo provocar defeitos locais existe a preocupação dos especialistas em procurar novos materiais que possam substituí-los com resultados satisfatórios. (CARVALHO *et al.*, 2004) Estes materiais de enxerto apresentam-se com grande variedade de texturas, tamanho de partículas e

formas, prontamente disponíveis. Podem ainda, ser separados em cerâmicos, polímeros e compósitos, existindo também a categoria de materiais osteocondutores reabsorvíveis para manutenção e aumento do tecido ósseo, como o osso congelado ou irradiado (GOMES, 2001).

Os enxertos ósseos homogêneos, pertencentes a um indivíduo da mesma espécie que o receptor, porém de genótipo diverso, surgem como alternativa nas cirurgias reconstrutivas, pelo fato de serem armazenados e utilizados sem aumentar a morbidade, eliminando a necessidade de um local doador pelo próprio paciente. Além disso, sua disponibilidade permite seu emprego em grande quantidade e possuem, ainda, capacidade osteoindutora (MACEDO *et al.*, 2007).

Na osteoindução o material é capaz de induzir a transformação de células indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, mesmo em áreas onde não se espera tal comportamento. Os materiais osteoindutores contribuem mais eficientemente para a formação de osso durante o processo de remodelação (MACEDO *et al.*, 2007).

De acordo com Tuominen *et al.* (2001) em 1931, Huggins demonstrou a osteoindução em cães, através de um auto implante de epitélio de transição da bexiga urinária no músculo da parede abdominal, e percebeu que havia a formação de osso ectópico. Posteriormente Levander em 1937 obteve neoformação óssea injetando extrato alcoólico de ossos crus em tecido muscular isto permitiu que em 1938, Spemann formulasse sua teoria explicando o processo através de substâncias indutoras que estimulam células mesenquimais a diferenciarem-se em células ósseas.

Tais descobertas estimularam as pesquisas acerca das substâncias osteoindutoras na matriz óssea. Urist (1965) descreveu a formação de osso ectópico em implante intramuscular de matriz óssea desmineralizada em roedores como coelhos e ratos. A partir dessa pesquisa, a busca pela “substância osteoindutora”, dentro da matriz óssea, tornou-se o foco de muitas pesquisas que demonstraram que as proteínas de baixo peso molecular, nomeadas de proteínas ósseas morfogenéticas (BMP- Bone Morphogenetic Proteins), poderiam ser extraídas da matriz óssea desmineralizada (URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983).

A aplicação da dentina como material de enxerto originou-se da observação clínica e experimental de que partículas de cimento e dentina, acidentalmente ou intencionalmente deixadas no leito cirúrgico, serviam de foco estimulador da osteogênese e da cementogênese (KLEINHEINZ *et al.*, 2005).

Substitutos ósseos representam alternativa para reduzir a necessidade de mobilização de áreas doadoras (CIANI *et al.*, 2006).

A dentina humana desmineralizada pode representar uma alternativa para a indução do reparo ósseo, por oferecer vantagens como facilidade de processamento, biocompatibilidade e capacidade de estimular a angiogênese e a formação óssea. (MACHADO, 2008) Esse tecido conjuntivo mineralizado poderia ser utilizado no tratamento de defeitos ósseos e fraturas causadas por traumas, doenças, deformidades de desenvolvimento ou ressecção de tumores, visto que as técnicas clássicas de enxertia óssea nem sempre fornecem resultados satisfatórios (MENDES *et al.*, 2008).

Durante o processo de reparo ósseo a angiogênese, que é altamente regulada, pois inicia-se sobre breves períodos (dias) e então é inibida completamente (FOLKMAN e SHING, 1992), tem um papel importante para a formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes (CHAIN; JONES; TARNAWSKI, 2004).

Os fatores de crescimento são polipeptídios sintetizados por uma variedade de células que, em determinadas situações, podem agir como agentes sistêmicos, mas geralmente agem como substâncias reguladoras locais, aumentando a replicação celular e também induzindo à diferenciação celular. Entre eles estão os membros da superfamília do TGF- β e vários outros que são seqüestrados da matriz óssea e estimulam a proliferação do osteoblasto, incluindo os fatores de crescimento insulínico I e II (IGF-I e II), fator de crescimento do fibroblasto (FGF) e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). Estes fatores de crescimento podem, inclusive, evitar a apoptose osteoblástica *in vitro* (HILL; TUMBER; MEIKLE, 1997).

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é o fator mais importante da neovascularização, tanto fisiológica quanto patológica. O VEGF estimula as células endoteliais na degradação da matriz extracelular, migração e formação de túbulos que darão origem aos novos vasos sanguíneos *in vitro*. Já *in vivo*, funciona como regulador da permeabilidade vascular sendo considerada importante para o início da angiogênese. A sobrevivência de células endoteliais em vasos recém formados é VEGF-dependente. Coerente com seu papel na sobrevivência celular, o VEGF induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas nas células endoteliais.

Numa fase mais avançada tem-se a diferenciação dos osteoblastos em células maduras que promovem a síntese de matriz óssea com posterior mineralização. Vários fatores de crescimento podem causar o surgimento de marcadores dos fenótipos dos osteoblastos diferenciados incluindo a expressão da atividade da fosfatase alcalina, colágeno do tipo I e osteocalcina, sendo os mais importantes o IGF-I e a BMP-2 (MASSAGUE, 1985; ROBERTS *et al.*, 1985). O tecido ósseo difere dos demais tecidos não só na sua estrutura físico-química como também na sua capacidade de remodelação e de regeneração durante todo o período

pós-fetal. O osso, em diversos momentos, precisa modificar sua forma ou sua estrutura seja para um osso primário se tornar maduro, para crescer mantendo sua forma, para um osso esponjoso se tornar compacto, ou para se adaptar a novas situações fisiológicas ou patológicas. Em todos esses casos, fenômenos simultâneos ou sequenciais de formação e de reabsorção óssea constituem o processo de remodelação.

A habilidade inata do tecido ósseo de remodelação e regeneração ao longo da vida tem sido atribuída tanto à proliferação de células osteoprogenitoras pré-formadas quanto à indução da proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, resultante de complicadas interações entre mediadores químicos liberados localmente de forma ativa, como consequência do processo de reabsorção (CORMACK, 1991; MANOLAGAS e JILKA, 1995).

Os mecanismos que controlam a remodelagem óssea ainda não são compreendidos. Uma questão-chave é como os osteoclastos são direcionados a um lugar específico para realizar a reabsorção óssea. Osteoblastos estimulados por hormônios ou, talvez, por alterações locais, como a movimentação dentária, podem proporcionar um mecanismo de controle para reabsorção óssea. Sabe-se que os osteoclastos só podem reabsorver superfícies mineralizadas. Deve ocorrer, também, sinalização hormonal, uma vez que a calcitonina e a leupeptina inibem a liberação de cálcio e a atividade colagenolítica, presumivelmente por terem como alvo os osteoclastos. Por outro lado, o processo de reabsorção pode ser autoregulável devido à dissolução mineral que precede a degradação da matriz orgânica no interior da lacuna de Howship, formada pelo osteoclasto. A repetida atividade de deposição e remoção de tecido ósseo acomoda o crescimento de um osso, sem que ele perca a função ou o relacionamento com as estruturas adjacentes durante o processo de remodelação (TEN CATE, 2008).

1.2 reparo ósseo

O osso é um dos tecidos do organismo com capacidade de regeneração, restaurando, completamente, a sua estrutura e função original quando lesado (SCHENK, 1994; SZACHOWICZ, 1995; HOLLINGER e WONG, 1996). O processo de reparação óssea é similar ao desenvolvimento ósseo embriogênico normal, incluindo migração de células mesenquimais, proliferação e diferenciação em células osteogênicas. Essa resposta ocorre como uma seqüência contínua de eventos celulares que se inicia pelo dano tecidual, terminando com completa remodelação sem deixar cicatriz, sendo esse processo semelhante à ossificação intramembranosa ou endocondral (BOSTROM, 1998; JUNQUEIRA *et al.*, 2002).

A regeneração e remodelação óssea são reguladas por hormônios sistêmicos e por fatores locais que afetam as células da linhagem dos osteoclastos e osteoblastos e exercem seus efeitos sobre a replicação de células não diferenciadas, no recrutamento das mesmas e na função diferenciada destas (CANALIS, 1983; MARTIN e NG, 1994).

O uso de barreiras mecânicas para isolar um sítio anatômico (JUNQUEIRA *et al.*, 2002), no intuito de selecionar determinado tecido e excluir outros, direcionando a regeneração da área, foi relatado primeiramente por Murray *et al.* (1957). Os autores removeram um fragmento do íliaco de cães e recobriram o defeito com material plástico, rígido o suficiente para manter um espaço entre o tecido ósseo e a face interna do material quando os retalhos fossem suturados em posição. Após dez semanas verificaram crescimento de tecido ósseo com as características histológicas próprias deste tecido. Posteriormente, outros autores empregaram o mesmo princípio para a reconstrução dos defeitos de ossos longos e mandibulares. Na década de 1980, essa técnica foi testada em vários estudos experimentais para a regeneração de tecidos periodontais, onde foi criado o conceito de regeneração tecidual guiada (NYMAN *et al.*, 1982). A aplicação dessa técnica para a correção de defeitos ósseos periodontais foi o passo seguinte, criando-se o conceito de regeneração óssea guiada (DAHLIN *et al.*, 1988).

Sendo assim, busca-se um melhor conhecimento de todos esses fatores que permitam manipulação da reparação óssea. Atualmente, o reparo ósseo guiado (ROG) é um dos campos de maior crescimento principalmente na Odontologia e Medicina. Muitas pesquisas têm sido realizadas para acelerar a resposta de regeneração óssea em cirurgias utilizando-se materiais osteoindutores de ação local como, por exemplo, a matriz óssea desmineralizada autógena (ALPER *et al.*, 1989; BESSHO; TAGAWA; MURATA, 1992), a matriz dentinária autógena desmineralizada (GUIMARÃES *et al.*, 1986; BESSHO; TAGAWA; MURATA, 1990; GUIMARÃES, 1993; GONÇALVES *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2001, 2002; ALMEIDA e ALVES, 2007) e ainda alguns fatores de crescimento ósseo (BECKER *et al.*, 1992), sendo a ação destes baseada no aumento da proliferação osteoblástica e da síntese de matriz óssea. Segundo Guimarães (1993) todo o processo de osteoindução e/ou osteopromoção é controlado por complexas interações moleculares e mensagens celulares de curta e longa extensão que influenciam quimiotaxia, proliferação, diferenciação e subseqüentemente, a velocidade e duração do trabalho das células de linhagem osteoblástica e osteoclástica. Alguns autores afirmam que a proliferação celular, no processo de regeneração óssea, é iniciada por fatores estimuladores locais como a proteína morfogenética óssea (BMP) (URIST e STRATES, 1971; GOMES *et al.*, 2001, 2002). Esses fatores locais são sintetizados por células do tecido ósseo e

incluem fatores de crescimento, citocinas e prostaglandinas. Os fatores de crescimento regulam a replicação e função diferenciada das células, exercendo seus efeitos sobre as células da mesma classe (fatores autócrinos) ou sobre as células de outras classes dentro do tecido (fatores parácrinos), porém, também podem os fatores produzidos localmente possuírem funções mais diretas e importantes no crescimento celular, podendo desempenhar papel fundamental na aposição da matriz óssea e reabsorção da mesma e, possivelmente, na patofisiologia das disfunções ósseas (HILL; TUMBER; MEIKLE, 1997).

Dessa maneira, a matriz óssea é uma rica fonte de fatores de crescimento, como o fator de crescimento insulínico I e II (IGF I e II), o transformador α (TGF- α -I e TGF- α -II), o derivado de plaquetas (PDGF), o fibroblástico ácido e básico (aFGF e bFGF) e a proteína morfogenética óssea (BMP) que, segundo Busch *et al.* (1996), teriam sua produção regulada por hormônios sistêmicos e estresse mecânico local. Dentre os fatores de crescimento acima citados, a proteína morfogenética óssea foi originalmente identificada como proteína da matriz óssea com capacidade de induzir formação óssea heterotópica quando enxertada em músculo de ratos (URIST, 1965). Foi a partir desse estudo que surgiu a idéia de que fatores indutores de formação óssea residem dentro do tecido ósseo (BROWNELL, 1990).

Por meio de técnicas moleculares, identificou-se uma família de proteínas morfogenéticas ósseas estruturalmente relacionadas, contendo seqüências de aminoácidos homólogas às proteínas do TGF- α . A análise de identificação das BMPs permitiu sua divisão em várias subfamílias. O exame da seqüência de aminoácidos das proteínas morfogenéticas demonstrou que as proteínas BMP-2 e BMP-4 são constituintes do subgrupo mais relacionado na literatura. Estas proteínas apresentam 86% da seqüência de aminoácidos idênticas entre si e 33-35% idênticas à seqüência do TGF- α . O segundo subgrupo, formado por BMP-5, BMP-6 (Vgr), BMP-7 (OP-1) e BMP-8 (OP-2), exibe cerca de 73-83% de aminoácidos similares entre si e são provavelmente homólogos do gene Vgr/60. A BMP-6 humana apresenta 91% da seqüência de aminoácidos do Vgr-1, um peptídeo derivado da hibridação cruzada de aminoácidos do embrião de camundongo com Vgr-1, uma proteína envolvida com o desenvolvimento embrionário. Por esta razão, considera-se o Vgr-1 como homólogo, nos roedores, da BMP-6 humana. A BMP-7 diferencia-se das demais BMPs por não apresentar atividade morfogenética e não pertencer à família do TGF- α , sendo hoje considerada como uma procolágeno C-proteinase. O terceiro subgrupo é formado apenas pela BMP-3, ou osteogenina, com 45% de seqüências idênticas ao BMP-2. Descreve-se, ainda, uma subfamília de proteínas similares a BMP, importantes na formação óssea clonadas mais recentemente, as quais foram denominadas de fator de crescimento e diferenciação 5 (GDF-5) ou proteínas

morfogênicas derivadas de cartilagem 1 (CDPM-1), GDF-6 ou CDMP-2 e GDF-7 ou BMP-12. Estas são homólogas em 80-86% entre si, e 46-57% idênticas às BMP-2 e até à BMP-8 (RIPAMONTI e REDDI, 1994; ROSEN e THIES, 1995; HELDER *et al.*, 1998; GONÇALVES *et al.*, 2002).

BMPs são um produto do metabolismo dos osteoblastos, odontoblastos e de várias células tumorais, sendo armazenada na forma de concentrados no osso, dentina e em células neoplásicas do osteossarcoma e de certos tumores odontogênicos, tais como: fibroma cementificante, cementoblastoma benigno, dentinoma, fibroma odontogênico e odontoma (URIST e STRATES, 1971; RAVAL *et al.*, 1996; GAO, YANG, YAMAGUCHI, ., 1997).

As BMPs têm função de regular a diferenciação do tecido cartilaginoso e ósseo *in vivo*, apresentando vários papéis durante o desenvolvimento embrionário e durante a organogênese, incluindo a esqueletogênese e o desenvolvimento crânio-facial dos tecidos ósseos e dentários. Durante a reabsorção óssea, os osteoclastos degradam a matriz óssea, propiciando a liberação da BMP que induz quimiotaxia, proliferação e diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos, bem como aumentam a síntese de matriz óssea (URIST e STRATES, 1971; BESSHO; TAGAWA; MURATA, 1990; 1992). Entretanto, pouco se conhece sobre o papel das BMPs na regeneração óssea de fraturas ou das demais lesões no tecido ósseo (BOSTROM, 1998).

Jin e Yang (1990) foram os primeiros autores a descrever a presença de proteínas morfogenéticas ósseas durante a reparação de fraturas. Usando um anticorpo contra essa proteína, os autores revelaram a presença de BMP nas células mesenquimais ao redor do perióstio e dentro da medula óssea. Ishidou *et al.* (1995) também verificaram a presença de BMP na reparação de fraturas em ratos utilizando técnicas de imunohistoquímicas mostraram que as expressões de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 foram consideravelmente maiores nas células osteogênicas do perióstio próximo às extremidades da fratura durante estágios iniciais da reparação. O reparo ósseo decorrente de lesões, fraturas, defeitos e/ou após inserção de enxertos é ativado pela liberação de fatores de crescimento, como as BMPs abundantes na matriz óssea e produzidas por osteoblastos.

Relata-se a aplicação de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento insulínico (IGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), pois estes são capazes de estimular a proliferação de células com fenótipo osteoblástico ou do ligamento periodontal, promovendo a formação óssea ou a regeneração periodontal em estudos em animais ou *in vitro*. Seu uso na terapia periodontal é

bastante promissor necessitando pesquisas mais extensas para garantir a utilização em humanos.

A osteoindução no processo de reparação óssea tem sido descrita como um fenômeno de transformação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras ou osteoprecursoras, classificadas como osteoprecursoras ou osteogênicas determinadas e osteoprecursoras indizíveis, segundo Friedstein (1976) e Nakashima (1990), podendo estas últimas, serem encontradas em vários tecidos conjuntivos. As células osteoprecursoras determinadas encontram-se em tecidos diretamente relacionados ao tecido ósseo, tais como medula óssea e camada profunda do periósteo e do endósteo. Quando substâncias osteoindutoras, como a proteína morfogenética óssea purificada e/ou matriz óssea desmineralizada (GUIMARÃES *et al.*, 1986; BESSHO; TAGAWA; MURATA, 1990, 1992) atuam sobre estas células, a reação ocorre pela neoformação óssea direta, ou ossificação intramembranosa, também conhecida por reação óssea ortotópica. Neste caso, a osteogênese é mais rápida, sendo o osso neoformado depositado diretamente sobre as superfícies ósseas pré-existentes.

Estas células reagem à indução diretamente com proliferação e diferenciação em osteoblastos. As células osteoprecursoras podem ser encontradas em tecidos distantes do tecido ósseo, sendo abundantes no tecido conjuntivo subcutâneo, no tecido muscular esquelético, baço e fígado e, normalmente, não produzem ossos. Entretanto, em contato com um indutor adequado, como a proteína morfogenética óssea, estas células diferenciam-se em condroblastos e/ou osteoblastos resultando na produção ectópica de cartilagem e tecido ósseo imitando a ossificação endocondral (REDDI, 1981; GONÇALVES *et al.*, 2002).

No contexto da ROG, não está claro se as macromoléculas indutoras que atuam nas células osteoprecursoras predeterminadas são as mesmas que atuam nas osteoprecursoras, no entanto sabe-se, que os eventos em cascata, que culminam com a formação óssea heterotópica envolvem etapas da ossificação endocondral como a migração, a proliferação de células mesenquimais precursoras indizíveis, a condrogênese, a mineralização de cartilagem, a reabsorção, a invasão da cartilagem por tecido conjuntivo vascular e neoformação óssea estimulada por membros da superfamília do fator de crescimento transformador beta (BUSER *et al.*, 1994; GONÇALVES *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2001).

Os eventos celulares acima descritos, fundamentais no processo de regeneração óssea podem, eventualmente, serem inibidos pela proliferação de tecido mole no defeito ósseo. A penetração e a rápida formação de tecido conjuntivo frouxo na área de reparação constituem obstáculo para o sucesso do processo de neoformação óssea, pois podem alterar ou impedir totalmente a osteogênese (BRUDER *et al.*, 1994).

Os mecanismos que atuam no tecido conjuntivo frouxo interferindo na osteogênese ainda não estão totalmente conhecidos. Experimentos, *in vivo*, demonstram que os fibroblastos produzem um ou mais fatores solúveis inibidores da diferenciação de células ósseas e osteogênicas (OGISO *et al.*, 1991). Outra possível explicação sugerida por Schmitz *et al.* (1990) é que a ocorrência da reparação conjuntiva, não óssea, pode ser devida a uma falha das células presentes para calcificar a matriz, talvez causada pela ausência de formação óssea adequada e pela diferenciação osteoblástica deficiente em grandes defeitos ósseos. Visando impedir a proliferação tecidual indesejada na área a ser reparada, o princípio da osteopromoção indica o uso de meios físicos como membranas ou barreiras, para vedar um local anatômico de modo a prevenir que outros tecidos, principalmente, o tecido conjuntivo, interfiram com a osteogênese bem como com a formação óssea direta (DAHLIN *et al.*, 1998).

Um polímero denominado politetrafluoretileno (PTFE), que consiste em um polímero quimicamente estável e biologicamente inerte, capaz de resistir ao ataque enzimático e microbiológico, tem sido muito utilizado. Schmitz *et al.* (1990) em estudo experimental da utilização de barreiras mecânicas na técnica de ROG analisaram o reparo de alvéolos dentários, com e sem o uso de PTFE em estudo imuno-histoquímico. Os alvéolos foram recobertos por PTFE no grupo teste e observados microscopicamente quatro semanas após a exodontia. Observou-se que nos dois grupos analisados havia a presença de infiltrado de células inflamatórias mononucleares, sendo este, entretanto, escasso no grupo que recebeu a proteção da PTFE. A marcação histoquímica das células e matriz extracelular na região de reparação evidenciou colágeno tipo I, osteonectina e sialoproteína óssea indicando que essas células eram de linhagem osteoblástica.

Strates *et al.* (1988) analisaram o uso de PTFE quanto às mudanças cronológicas no osso neoformado e alterações em sua natureza estrutural, assim como os efeitos dos períodos de aplicação da membrana no osso neoformado e seu processo de remodelação após a remoção da membrana experimental. Após duas semanas de aplicação da técnica de ROG as cavidades ósseas do grupo tratado haviam sido completamente preenchidas por tecido ósseo neoformado. Já no grupo controle a corticalização na superfície do osso neoformado mostrava um decréscimo. Os espaços ósseos medulares alargaram-se por volta da 12ª semana pós-cirurgia no grupo tratado, denotando-se maior atividade de remodelação óssea no referido grupo. Concluiu-se que a aplicação de membrana em defeitos ósseos durante o processo de reparação dos mesmos leva a um aumento do volume dos espaços ósseos medulares. Atualmente, a regeneração óssea guiada apresenta uma vasta indicação e tem sido também testada no tratamento de fratura óssea contínua, em defeitos de ossos longos, na correção de

rebordos edêntulos ou defeitos residuais, em alvéolos após exodontia, em implantes imediatos e na recuperação de implantes por perimplantite (JUNQUEIRA *et al.*, 2002).

1.3 Materiais biológicos de enxertos ósseos

Os enxertos estão sendo aplicados cada vez mais em defeitos nos ossos maxilo-faciais, especialmente na mandíbula, reconstruindo desde pequenas fendas alveolares até grandes defeitos resultantes de mandibulectomia. O enxerto de tecido mais comumente utilizado para reconstrução dessas estruturas anatômicas é o ósseo. Esses enxertos têm sido utilizados há várias décadas alcançando graus variados de sucesso. Os recentes avanços na compreensão da fisiologia óssea, nos conceitos imunológicos, nos procedimentos de armazenamento, na criação de bancos de tecidos e nos princípios cirúrgicos têm aumentado bastante a margem de sucesso e qualidade dos resultados dos enxertos (SIMÕES, 1997).

Existem três classes de materiais para enxertos ósseos, baseados na origem e no modo de ação (MISCH e DIETSH, 1993), podendo ser autógenos, homogêneos ou heterogêneos. Os enxertos ósseos mais usados são os autógenos, compostos de tecido do próprio indivíduo, devido à sua maior compatibilidade imunológica e por apresentar melhores resultados em relação à regeneração óssea. Além do tecido ósseo, hidroxiapatita e partículas de dentina e de cimento têm sido usados para induzir a osteogênese em cirurgias ósseas, particularmente em cirurgias periodontais e tratamento de perimplantite (GUIMARÃES *et al.*, 1986; NOCITI *et al.*, 2001).

Os enxertos ósseos mais comumente utilizados têm sido os de osso esponjoso, especialmente em áreas com grande perda tecidual, como nas correções de defeitos maxilo-faciais, em cirurgias ósseas oncológicas, em cirurgias corretivas do periodonto e no tratamento de perdas ósseas alveolares (KNUDSEN *et al.*, 1974; VEIS *et al.*, 1989; NADE, 1994; CHIAPASCO *et al.*, 1999; PALLESEN *et al.*, 2002). Enxertos autógenos, intramembranosos e endocondrais podem ser usados frescos ou s. Alguns estudos demonstraram que a matriz óssea endocondral desmineralizada induz a formação óssea via cartilagem, enquanto outros trabalhos mostraram que na ossificação intramembranosa o osso se forma sem que haja uma fase de cartilagem intermediária (ISAKSSON e ALBERIUS, 1992; RABIE *et al.*, 1996; SCHLIEPHAKE *et al.*, 2000).

Para analisar clinicamente a reconstrução de rebordos estreitos e desdentados antes da instalação do implante, Chiapasco *et al.*, (1999). enxertaram fragmentos ósseos retirados de outras áreas da cavidade bucal, que foram fixados com parafusos de aço inoxidável. Estes autores observaram um ganho ósseo significativo de até 4 mm com a utilização desse tipo de

enxerto. Pallesen *et al.* (2002) testaram o papel de diferentes tamanhos de partículas (entre 2 e 10 μm^3) de osso autógeno mineralizado e triturado em estágios iniciais da reparação óssea. As partículas menores se mostraram preferenciais, pois aceleraram a reparação óssea nos períodos iniciais, além de induzir formação de maior quantidade de osso, o qual também apresentou um maior grau de maturação. Observou-se ainda, neste experimento, que a reação de reabsorção foi mais intensa com partículas de tamanho menor, apresentando, portanto, alto grau de substituição óssea após quatro semanas.

Lundgren *et al.* (1997a) avaliaram o enxerto de partículas de osso liofilizado autógeno mineralizado, após doze semanas do implante de titânio de Branemark e notaram aumento de volume do osso neoformado pelo aumento do espaço medular, não havendo, entretanto, aumento de massa óssea mineralizada. Ainda Lundgren *et al.* (1997), enxertaram partículas de osso liofilizado autógeno em defeitos ósseos em calota craniana de coelhos com e sem cobertura de membrana reabsorvível. Os autores concluíram que a associação de membrana reabsorvível mais osso autógeno resultou em um aumento significativo de formação óssea após doze semanas, tanto em volume, quanto em massa estrutural do tecido neoformado. Trabalhos utilizando enxertos ósseos liofilizados heterógenos também são relacionados na literatura e testaram partículas de 300 μm de osso bovino desproteínizado em calvária de coelhos e observaram sua propriedade osteocondutora, acelerando a neoformação óssea nas fases iniciais do processo de regeneração guiada, pelo aumento no recrutamento dos osteoblastos. (CAPLANIS *et al.*, 1998; CHO *et al.*, 1998, e HAMMERLE *et al.*, 1997).

Efeitos do osso desproteínizado liofilizado bovino (BIO OSS) (HAMMERLE *et al.*, 1998) foi utilizado em deiscência de defeitos em torno de implantes, em macacos e após seis meses da cirurgia, os autores puderam concluir que o BIO OSS exibiu propriedade osteocondutora, sendo recomendado para enxertos em defeitos de deiscência, pois promoveu o crescimento ósseo vertical e horizontal, já Carvalho *et al.* (1998) testaram a capacidade de neoformação óssea da matriz de osso esponjoso bovino liofilizado associado a implantes de titânio em ratos e concluíram que esse material de enxerto atuou como osteocondutor nos estágios iniciais da reparação, além de ser parcialmente reabsorvido durante o processo de regeneração óssea. A neoformação óssea devido à implantação de matriz óssea desmineralizada ou de proteína morfogenética óssea purificada, em defeitos ósseos cirúrgicos também tem sido bastante estudada. A atuação das proteínas morfogenéticas ósseas e de fatores de crescimento ósseo seria primeiramente local, atuando de forma coordenada e sequencial. A proteína morfogenética óssea atuaria na proliferação e na diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas enquanto o TGF estimularia a produção da matriz óssea

neste sistema estimulado, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (URIST e STRATES, 1971; BESSHO; TAGAWA; MURATA, 1992).

Foi sugerido para a regeneração óssea guiada uma combinação de enxertos de osso mineralizado com matriz óssea desmineralizada (BESSHO; TAGAWA; MURATA, 1990). Os autores acreditam que a função do enxerto com fragmentos ósseos mineralizados seja induzir à neovascularização no interior do defeito, enquanto que as células mesenquimais indiferenciadas da região perivascular dos novos vasos sanguíneos seriam induzidas a se diferenciarem em osteoblastos pelas proteínas morfogenéticas ósseas da matriz óssea desmineralizada.

Alper *et al.* (1989), Rabie *et al.* (1996) e Lundgren *et al.* (1997) afirmaram que os enxertos em ossos podem agir como barreira física, prevenindo o crescimento do tecido conjuntivo para o interior do defeito e favorecendo, desta maneira, a regeneração óssea por células específicas osteogênicas. Assim também, Caplanis *et al.* (1998) utilizaram enxertos homogêneos de matriz óssea desmineralizada em defeitos periodontais induzidos em cães e concluíram que as partículas de matriz óssea auxiliaram no processo de reparação por meio de osteocondução e também por impedirem a proliferação conjuntiva na área estudada.

1.4 Dentina

Em 1989, um estudo de Linde mostra que a dentina pode ser considerada um tecido conjuntivo mineralizado cuja fase orgânica, a matriz, é fundamental na determinação da velocidade de formação e das características da fase mineral. Nos dentes humanos a fase mineral constitui 70% da dentina por peso enquanto que 20% é formado pela fase orgânica, entretanto no mesmo artigo ele diz que a composição química da dentina varia em diferentes espécies, dependendo do estágio maturacional da mesma (p. ex. pré-dentina e dentina madura) e da sua localização no dente (p. ex. dentina peripulpar e dentina marginal)

Uma rede fibrosa de colágeno I predomina na matriz orgânica dentinária constituindo assim 90% do conteúdo orgânico, além de outros tipos de colágeno em menores quantidades. Os outros 10% da matriz dentinária são formados por proteínas não colagenosas (NCPs) que podem ser classificadas nas seguintes categorias: fosfoproteínas, Gla-proteínas, proteoglicanas, glicoproteínas ácidas e proteínas séricas. As NCPs da dentina, em geral, estão fortemente associadas à fase mineral, sendo extraídas apenas após a desmineralização do tecido (LINDE, 1989).

A dentina humana desmineralizada apresenta características osteocondutoras, uma vez que túbulos dentinários se prolongam por toda a parede e funcionam como matriz por onde penetram células e capilares, permitindo assim a deposição de matriz óssea bem próximo ao material do enxerto (KING *et al.*, 1998; ALMEIDA e ALVES, 2007).

Ainda dentre as características desejadas de um material de enxerto, a dentina humana desmineralizada apresenta: o custo baixo, a facilidade de obtenção e processamento, a baixa antigenicidade, a ausência de problemas médico-legais associados ao seu uso, a fácil confecção de próteses e a fácil adaptação a superfícies (GEBHART E LANE, 1991).

Paralelamente às pesquisas realizadas com a aplicação de matriz óssea e osso liofilizado como materiais de enxerto ósseo, desde 1960, com os estudos de Urist (1965), enxertos de dentina desmineralizada vêm sendo pesquisados em animais experimentais. Vários estudos têm utilizado dentina desmineralizada para reconstrução óssea em cirurgias bucais e defeitos ósseos (URIST e STRATES, 1971; VEIS *et al.*, 1989; GONÇALVES *et al.*, 2002; CARVALHO, 2001; GOMES *et al.*, 2001, 2002).

O potencial quimiotático e osteogênico da matriz óssea e dentinária estão associados à proteína morfogenética óssea (BESSHO; TAGAWA; MURATA, 1990). A matriz óssea, a rigor, é a maior fonte de fatores de crescimento dentre os tecidos mineralizados. Alguns fatores de crescimento são produzidos pelos osteoblastos, como o IGF-I e II, TGF- β , FGF e o PDGF. Além da proteína morfogenética óssea, a matriz dentinária também é rica nestes outros fatores de crescimento (BESSHO; TAGAWA; MURATA, 1990, 1992; BUSER *et al.*, 1994; TZIAFAS *et al.*, 1995; GONÇALVES *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2001). Estes dados sugerem fortemente a importância da matriz dentinária desmineralizada como material de enxerto (GUIMARÃES *et al.*, 1986; ALPER *et al.*, 1989; CARVALHO, 2001; GOMES *et al.*, 2001, 2002; ALMEIDA e ALVES 2007).

Butler *et al.* (1977) removeram os componentes solúveis presentes na matriz dentinária desmineralizada de rato sem prejudicar a atividade da BMP e caracterizaram as proteínas não colágenas (NCP) que permaneceram na matriz insolúvel. Neste estudo, os autores verificaram que a matriz dentinária desmineralizada mostrava atividade da proteína morfogenética óssea, pois permitiu a indução da formação de cartilagem e osso quando enxertada em região intramuscular de ratos. A partir deste trabalho, a atividade da BMP foi atribuída às proteínas não colágenas do osso e da dentina e, então, a natureza destas proteínas da dentina de ratos foi examinada. Após o tratamento da matriz dentinária desmineralizada com colagenase bacteriana purificada, três NCP foram solubilizadas concomitantemente, com a digestão do colágeno da dentina para peptídeos menores. Das três proteínas separadas, duas eram ricas em

aspartato, glutamato, glicina, serina e alanina e, desta forma, exibiam composições similares às das proteínas acídicas de outros tecidos conjuntivos. A terceira NCP mostrava composição de aminoácidos como aspartato e fosfoproteínas ricas em serina, as quais encontravam-se principalmente na forma solúvel na dentina de rato. Os autores notaram que a atividade da BMP da dentina desmineralizada de rato, similar àquela encontrada no tecido ósseo, estava presente no tecido após remoção dos principais componentes solúveis.

Kawai e Urist (1989) implantaram frações de proteínas não colágenas (NCP) de dente descalcificado, no músculo de camundongo. Estas frações protéicas foram extraídas de dentes bovinos em três diferentes estágios de evolução: germe dentário, dente não erupcionado e dente erupcionado. A atividade osteoindutora de cada fração protéica, dos respectivos elementos dentários, foi mensurada por meio da análise de imagem computadorizada, após a sua implantação. Induziram formação óssea, 71% a 83% dos 41 implantes de fração de NCP de dente. A quantidade de formação óssea foi maior quando se implantou fração de NCP, de dentes não erupcionados, quando comparada com a fração de NCP de dentes erupcionados.

Um estudo comparou o papel osteoindutor da dentina desmineralizada enxertada *in vivo* no tecido muscular, no tecido conjuntivo subcutâneo, na cavidade medular do fêmur e no ligamento periodontal de ratos, em relação ao osso enxertado nestes mesmos tecidos. E observaram a ocorrência de osteoindução em todos os tecidos enxertados e relataram haver indução da condrogênese *in vivo* por enxerto de dentina desmineralizada, ocorrendo mais rapidamente e em maior quantidade no tecido muscular, seguida do tecido conjuntivo subcutâneo, cavidade medular do fêmur e por fim, num processo mais lento, no ligamento periodontal de ratos. (INOUE *et al.* 1986)

Além de a dentina desmineralizada induzir a formação óssea em áreas heterotópicas e ortotópicas Nakashima (1990, 1992, 1994), Sovieiro *et al.* (1998) e Torres *et al.* (2000) verificaram que a diferenciação de células ectomesenquimais em odontoblastos na polpa dentária de cães, após o enxerto de matriz dentinária desmineralizada ou da BMP parcialmente purificada. Os autores como Tziafas *et al.* (1995) sugerem ainda que a matriz dentinária enxertada, poderia constituir uma superfície adequada para a fixação das células mesenquimais indiferenciadas, auxiliando a orientação celular e induzir a diferenciação das células ectomesenquimais em células semelhantes a odontoblastos na polpa dentária de molares de cães, promovendo a sua polarização ou a secreção de uma zona intermediária de matriz.

Gould *et al.* (1982) sugeriram a utilização de gelatina de matriz dentinária, como um material de enxerto universal em cirurgias periodontais. Os autores utilizaram matriz

dentinária desmineralizada homogênea em defeitos ósseos de tamanho crítico no osso parietal de ratos. Decorridas duas, quatro, oito e dez semanas, a análise microscópica permitiu observar que o processo de reparo ósseo foi completo em todos os períodos de observação do grupo tratado, enquanto que, no grupo controle, o defeito foi reparado por cicatrização fibrosa. Os pesquisadores concluíram, então, que a gelatina de matriz dentinária homogênea parece ter um forte potencial osteoindutor. Guimarães *et al.* (1986) enxertaram matriz dentinária autógena na forma de fatias e de partículas em defeitos experimentais na mandíbula de cães que posteriormente, foram analisados em microscopia óptica, nos períodos de 15, 30 e 90 dias. No enxerto de partículas de matriz dentinária, observou-se reabsorção e substituição das partículas óssea e na matriz dentinária em fatias, verificou-se a incorporação das mesmas ao tecido ósseo neoformado. Enxertos de matriz dentinária apresentaram algumas propriedades relevantes como: fácil manuseio, facilidade de obtenção, presença de potencial osteoindutor e biocompatibilidade.

Guimarães (1993) relatou que enxertos de matriz de dentina desmineralizada, nas mais variadas formas ou apresentações (gel, partículas, fatias, etc.), induziram formação de trabéculas ósseas, cortical e medula óssea em quaisquer sítios de implantação. A osteoindução seria controlada por complexas interações moleculares que atuam sobre as células osteoprogenitoras derivadas das células mesenquimais, influenciando sua proliferação, migração, ancoragem e, subseqüentemente, a velocidade e duração das células das linhagens osteoblástica e clástica. Sugeriu que a dentina possui BMP lábil e que suas propriedades osteoindutoras estão firmemente associadas com a matriz colagênica.

Estudos sobre os efeitos da associação da matriz dentinária desmineralizada autógena à membrana amniótica humana em defeitos cirúrgicos no osso parietal de coelhos, Gomes *et al.* (2001), concluíram que a membrana amniótica humana não interferiu no processo de regeneração óssea e que a reparação do defeito foi acelerada pela presença das fatias de matriz dentinária, as quais foram degradadas durante o processo de remodelação. Gomes *et al.* (2002) avaliaram a atividade osteoindutora da matriz dentinária desmineralizada autógena (MDDA) em defeitos ósseos cirúrgicos tratados pela técnica de ROG associada à utilização da PTFE. Os resultados possibilitaram concluir que a PTFE não interferiu no processo de regeneração óssea, permanecendo na região de implantação durante todos os períodos e que as fatias de MDDA estimularam a neoformação óssea de forma direta, sendo rapidamente incorporadas ao osso neoformado e reabsorvidas durante o processo de remodelação óssea. Estes autores

relataram, ainda, a propriedade quimiotática das fatias de matriz dentinária autógena sobre as células osteoprogenitoras da região de reparo ósseo como fator acelerador de osteopromoção.

O comportamento biológico da matriz dentinária humana no processo de reparo em alvéolos dentários de ratos avaliado por Gomes *et al.* (2002) mostrou que MDH possui propriedade osteocondutora, sendo biocompatível e diminuindo a reação inflamatória na área experimental. Abreu (2003) avaliou o comportamento biológico da matriz orgânica dentinária autógena na reparação óssea de alvéolos dentários humanos, concluindo que a mesma possui propriedade osteocondutora, sendo ainda compatível com a regeneração óssea alveolar.

Bang (1972) comparou o grau de antigenicidade da matriz dentinária desmineralizada xenogênica (pertencente a indivíduos de diferentes espécies) com o da matriz dentinária desmineralizada homogênea. Neste estudo, notou-se o alto grau de antigenicidade do enxerto xenogênico, sem a presença de osteoindução, enquanto a matriz dentinária homogênea provocava discreta reação imunológica, evidenciando ainda, certo potencial osteoindutor.

Yoshida *et al.* (1998) realizaram estudo histopatológico da biocompatibilidade da matriz dentinária homogênea liofilizada aplicada como barreira biológica na região periapical após pulpectomia em dentes de cães. Após três meses de observação pôde-se constatar a formação de tecido calcificado envolvendo a região periapical, o que demonstra a boa compatibilidade biológica deste material com os tecidos periapicais, indicando sua aplicabilidade clínica. Em 1999, Okamoto *et al.* (2009) avaliaram os efeitos do enxerto de matriz dentinária homogênea preservada em glicerina a 98%, estocada no máximo por 20 dias, em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Os resultados após 10, 20, 30, e 60 dias mostraram que a matriz dentinária é parcialmente reabsorvida e substituída por tecido ósseo neoformado, sobretudo, após 30 a 60 dias. A dentina, portanto, se comportou como material osteoindutor. Carvalho (2001) utilizou a matriz dentinária desmineralizada homogênea como material de enxerto em defeitos ósseos cirúrgicos em mandíbulas de coelhos, concluindo que a matriz dentinária atuou de forma efetiva na osteopromoção, aumentando significativamente a quantidade de matriz óssea neoformada, apresentando boa tolerância biológica, não obstante o fato de ser um material biológico oriundo de outro indivíduo da mesma espécie.

Hamata *et al.* (2002) realizaram estudo histomorfométrico comparativo entre a capacidade osteoindutora da matriz óssea e dentinária homogênea, quando enxertadas na região intramuscular de ratos e concluíram que, as diferenças na composição química e estrutural da matriz óssea e dentinária alteram os mecanismos de osteoindução. Houve formação de cartilagem numa fase intermediária da osteogênese nos animais que receberam enxerto de

matriz dentinária, entretanto, a quantidade e a qualidade final do tecido ósseo neoformado foram semelhantes.

Cheng *et al.* (2001) utilizaram a matriz dentinária desmineralizada autógena em reparos de fraturas ósseas decorrentes de traumatismos cranianos em 22 pacientes submetidos à neurocirurgia. O acompanhamento pós-operatório permitiu observar que os pacientes que receberam enxertos de matriz dentinária apresentaram sinais de ossificação sete dias após a cirurgia. Os pacientes apresentaram reparo adequado com compatibilidade ao material de enxerto, sendo este recomendado para o uso em defeitos ósseos de calota craniana. Kim *et al.* (2002) avaliaram o efeito de partículas de dentina associadas ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP) e aplicadas a defeitos ósseos em cães. Após análise histomorfológica e histomorfométrica os autores puderam concluir que houve a formação de grande quantidade de tecido ósseo nos grupos que receberam os enxertos de partículas de dentina, mesmo quando estas não foram associadas ao PRP..

Kim *et al.* (1999) avaliaram o desempenho da dentina particulada associada a emplastro de Paris como material de enxerto ósseo em defeitos mandibulares de mais de 20 mm de diâmetro em humanos. Após análises radiográfica e clínica os pesquisadores concluíram que a mistura de pasta de dentina foi biocompatível e acelerou o processo de regeneração óssea.

1.5 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

A angiogênese é um processo fundamental, altamente regulado, para a formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes, e a regeneração tecidual somente ocorre com a formação adequada dos vasos sanguíneos (CHAIN; JONES; TARNAWISK, 2004).

A formação de vasos sanguíneos ocorre por 2 mecanismos diferentes, a vasculogênese e a angiogênese. Na vasculogênese ocorre a diferenciação de células endoteliais a partir de precursores mesodérmicos (angioblastos), manifestando-se somente durante o período embrionário, levando a formação de um plexo vascular primário. Com o tempo, esses canais endoteliais vão se desenvolvendo formando um sistema mais complexo e se ramificando. Na angiogênese, os novos vasos são formados a partir de outros já existentes (AUERBACH; AUERBACH, 2002). Em adultos a angiogênese é essencial para o reparo, remodelação e regeneração dos tecidos (FOLKMAN e SHING, 1992).

O processo de angiogênese é regulado por fatores de crescimento, citocinas pro-angiogênicas e inibidores da neovascularização. Mediadores angiogênicos podem ser divididos em dois grupos: estimuladores e inibidores (POLVERINI, 1995). A maioria as moléculas estimuladoras são proteínas e muitas delas são fatores de crescimento, que participam da formação de um novo vaso (POLVERINI, 1995; CARMELIET; KERBEL, 2000; TOMANEK e SCHATTEMAN, 2000).

Os inibidores fornecem o equilíbrio requerido para manter a população de células endoteliais inativas porém altamente responsivas através de sinais anulados, que, se ativados, podem levar a uma resposta angiogênica deletéria para o organismo. Eles agem bloqueando ou atenuando a proliferação de células endoteliais, transdução sinalizadora, migração celular, expressão de metaloproteinases matriciais, sobrevivência celular, desenvolvimento de precursor celular endotelial e ou recrutamento (POLVERINI 1995; CARMELIET; YANCOPOULOS, 2000).

Vasos sanguíneos capilares consistem de células endoteliais e pericitos. Esses dois tipos de células carregam toda a informação genética necessária para as ramificações, formação de tubos e redes capilares. Moléculas angiogênicas específicas podem iniciar esse processo, enquanto as moléculas inibitórias desempenham função contrária. Fatores angiogênicos e inibidores têm sido investigados durante décadas quanto às suas propriedades, porém o estudo de suas interações está apenas começando a ser descoberto (FOLKMAN e KLAGSBRUN, 1987; FOLKMAN e SHING, 1992).

Os fatores angiogênicos são classificados como diretos e indiretos. Os fatores angiogênicos diretos (aFGF, bFGF, IL-8 e VEGF) tem a função de estimular a proliferação das células endoteliais e ou migração da mesmas. Quando o fator angiogênico não estimula as células *in vitro*, ele é chamado fator angiogênico indireto porque é assumido que a proliferação endotelial e migração, observada *in vivo*, deve ter sido induzida por algum outro fator ou célula (FOLKMAN e KLAGSBRUN, 1987; FOLKMAN e SHING; 1992). O macrófago além de reger o papel central no processo de reparo é responsável por coordenar a formação e remodelação do tecido durante o processo de cicatrização (POLVERINI, 1995). Ele libera VEGF, e sua atividade angiogênica ocorre em regiões mais profundas do tecido em processo de cicatrização (FOLKMAN e SHING, 1992).

O VEGF é um mitógeno potente para o endotélio vascular; modula e expressão de muitas enzimas proteolíticas envolvidas no processo de angiogênese. Ele é capaz de regular todos os passos do processo de neovascularização sendo importante nos processos fisiológicos e patológicos da angiogênese. VEGF é encontrado em tecidos adultos, demonstrando ser

importante não somente na angiogênese mais também na manutenção dos vasos existentes (COLBATZKY e HERMANNNS, 1987).

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

a) objetivo geral

Avaliar, o potencial osteoindutor da matriz dentinária humana desmineralizada na cicatrização de feridas alveolares de ratos.

b) objetivo específico

Avaliar por meio de técnicas imunohistoquímicas e histoquantitativas a presença e distribuição de VEGF em alveolos de ratos preenchidos com matriz dentinária humana desmineralizada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente trabalho, foram utilizados trinta e dois ratos da raça *Rattus norvegicus albinus*, variedade *Wistar*, machos com massa corporal média de 160 gramas, fornecidos pelo Biotério do Campus aeroporto da Universidade de Uberaba – UNIUBE. Estes foram divididos em quatro grupos, sendo oito animais para cada grupo, distribuídos da seguinte forma:

- a) grupo I - 8 animais, sacrificados após três dias da exodontia;
- b) grupo II - 8 animais, sacrificados após sete dias da exodontia;
- c) grupo III - 8 animais, sacrificados após quatorze dias da exodontia;
- d) grupo IV - 8 animais, sacrificados após vinte e um dias da exodontia.

Em todos os grupos, uma ferida óssea provocada pela exodontia do segundo molar superior, de ambos os lados, sendo que do lado esquerdo introduziu-se matriz dentinária humana desmineralizada dentro do alvéolo e o lado direito foi conduzido como controle, recebendo somente a sutura das bordas mucosas, para contenção do coágulo usando-se fio agulhado Vycril® 6.0 (Ethicon) reabsorvível.

Os animais foram submetidos a um período de observação específico para cada grupo, como citado anteriormente, mantidos em gaiolas com 5 animais, forradas com maravalha, com dieta de ração amolecida durante os três primeiros dias e *in natura* nos demais bem como água *ad libitum*, conforme aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal parecer numero 022/2009 (ANEXO).

Os animais não receberam antibióticos durante os experimentos. A anestesia foi realizada por via intramuscular com associação de Cloridrato de Ketamina (80mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (15mg/kg), e os segundos molares superiores foram extraídos, utilizando-se um instrumento de Holleback (Duflex) para sindesmotomia e uma pinça dente de rato (Edlo) para a luxação e remoção do dente.

A matriz dentinária humana desmineralizada foi obtida a partir de dentes humanos sem qualquer lesão cariiosa e sem outro procedimento. Suas raízes foram seccionadas e limpas de quaisquer resíduos da polpa dental ou do ligamento periodontal, sendo em seguida desmineralizadas em EDTA a 10%, pH 7,2, à temperatura ambiente, durante aproximadamente três meses, sendo posteriormente cortadas em criostato.

3.1 Eutanásia dos animais

A eutanásia dos animais foi feita com a administração intraperitoneal de dose excessiva de tiopental sódico (Thiopentax®) soluto 50mg/ml dose 50mg/kg de massa corporal seguida de deslocamento cervical. A seguir as cabeças dos animais foram removidas e dissecadas. Fragmentos dos maxilares envolvendo as áreas experimentais e controles foram removidos e imediatamente fixados em formol a 10% tamponado, por 48 horas, em temperatura ambiente.

3.2 Preparação dos espécimes para avaliação histológica e histoquantitativa

Após dois dias em solução de formol a 10% tamponado, os fragmentos dos maxilares, correspondentes as áreas experimentais e controle, foram colocados em solução ra de EDTA a 10% tamponado pH 7,2, por aproximadamente quatro semanas. Posteriormente à desmineralização, o palato foi seccionado por um corte na sutura palatina mediana, e as duas hemimaxilas preparadas para estudos histológicos microscópicos, procedendo-se a inclusão do material nas etapas abaixo:

Desidratação: Série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, 95%, absoluto I, absoluto II, absoluto III) com um tempo de 30 minutos em cada banho.

Diafanização do tecido em três banhos de xilol, com duração de 15 minutos cada. Infiltração: foram realizados três banhos em parafina a 58° C, com duração de 20 minutos cada banho. Após o último banho o material foi incluído em parafina.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo. Cortes transversais seriados com 5 micrômetros de espessura, das áreas correspondentes aos alvéolos dos primeiros molares direitos e esquerdos foram coletados em lâminas histológicas previamente tratadas com silano (SIGMA código 3648) e mantidos à temperatura ambiente durante no mínimo 12 horas para secagem. Após este procedimento, foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE).

Para coloração imunohistoquímica, foi utilizado anticorpo anti-VEGF de acordo com instruções do fabricante, laboratório Santa cruz biotecnology-Inc. Após desparafinização e re-hidratação foram cobertas com 3% de H₂O₂ por 5 minutos para bloqueio da peroxidase endógena, lavadas em água destilada e posteriormente em PBS. Em seguida foram colocadas em câmara úmida e encubadas por 30 minutos com os anticorpos primários anti-VEGF. Após duas lavagens em tampão foram cobertas com o anticorpo secundário, utilizando-se o kit KC6090 (Dako). Controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário. As

preparações foram contra-coradas com hematoxilina de Harris montadas com Etelam e lamínulas conforme técnicas laboratoriais comumente utilizadas e avaliadas.

3.3 Análise histológica qualitativa

Os cortes foram feitos com 5µm de espessura e cerca de 10 cortes do maior eixo do alvéolo foram considerados, tomando como referencia cortes onde se observa a raiz distal inteira do terceiro molar, as lâminas foram preparadas pelas técnicas histológicas rotineiras para coloração com hematoxilina-eosina. Em seguida, as lâminas foram analisadas pela microscopia de luz convencional para estudo histomorfológico. Os cortes foram analisados procedendo-se à leitura em varredura longitudinal, através de microscopia de luz, utilizando-se um microscópio (Nikon, Eclipse E200).

Os parâmetros para análise histológica foram:

- a) característica do tecido conjuntivo que preenche o alvéolo, sua organização e maturação;
- b) presença de células ósseas imunomarcadas (osteoclastos, osteoblastos), bem como a presença de tecido ósseo neoformado, vasos sanguíneos e;
- c) presença de reação inflamatória nas áreas experimental e controle.

3.4 Análise histométrica

Para análise semiquantitativa dos parâmetros avaliados, foi utilizado um retículo milimetrado (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995), construído no programa Power Point ® 2003. Este retículo foi elaborado a partir de um sistema de linhas, dividindo a imagem em quadrados espaçados por um intervalo de 1 cm, que foi superposto às fotomicrografias obtidas através do programa Confocal Assistance© evitando assim, distorção durante superposição de imagens. Foram avaliadas as estruturas localizadas na interseção das linhas do retículo. Para contagem das células foi utilizado o software UTHSCSA Image Tool© 2.03.

Após a contagem, os dados foram avaliados estatisticamente. Esta técnica foi aplicada em todos os grupos de estudo, com o propósito de quantificar a matriz óssea neoformada dentro dos períodos considerados. Segundo o sistema, a contagem morfométrica, conforme figura 1, foi obtida pela quantificação do número de pontos que incidiram sobre as trabéculas ósseas neoformada.

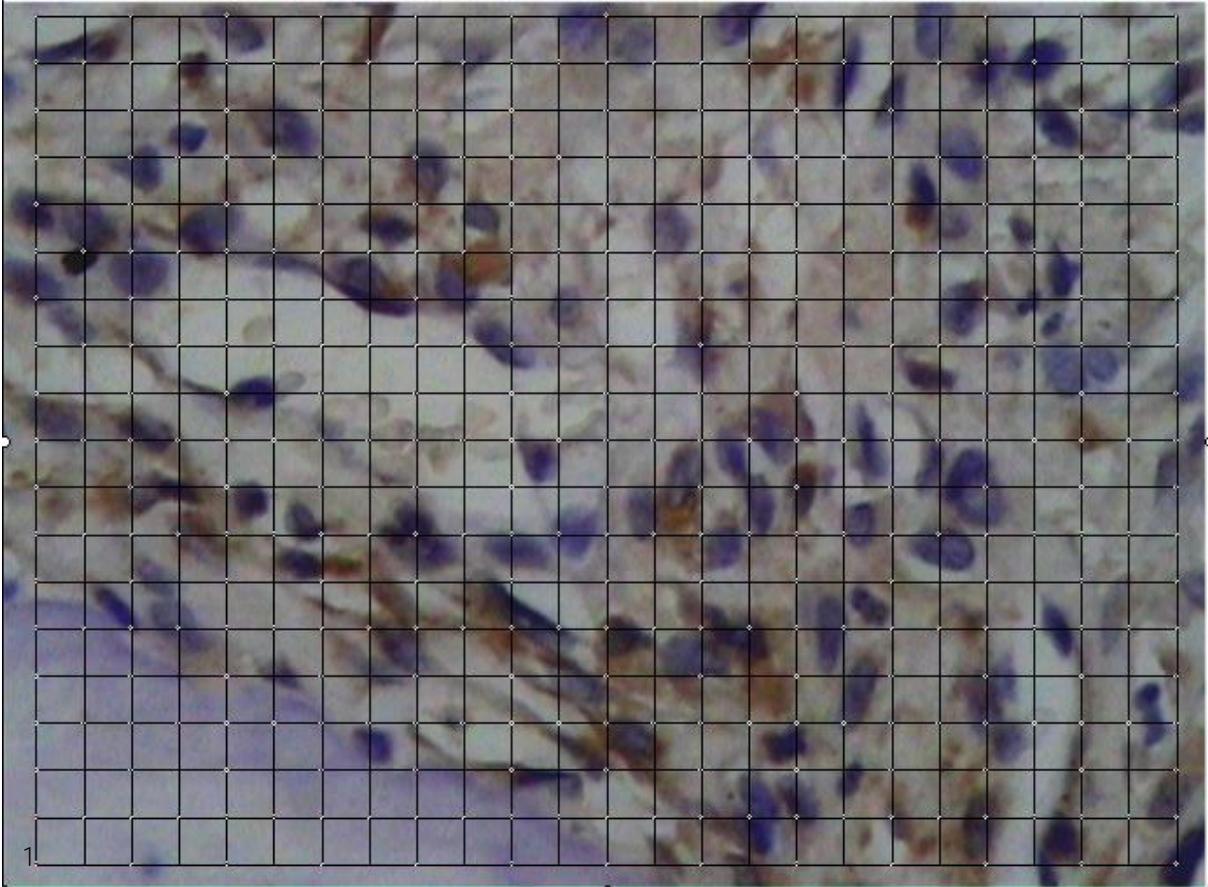


Figura 1: Figura histológica mostrando a colocação de retículo milimetrado com o propósito de quantificar a o numero de células himunomarcadas dentro dos períodos considerados. (objetiva de 40x)

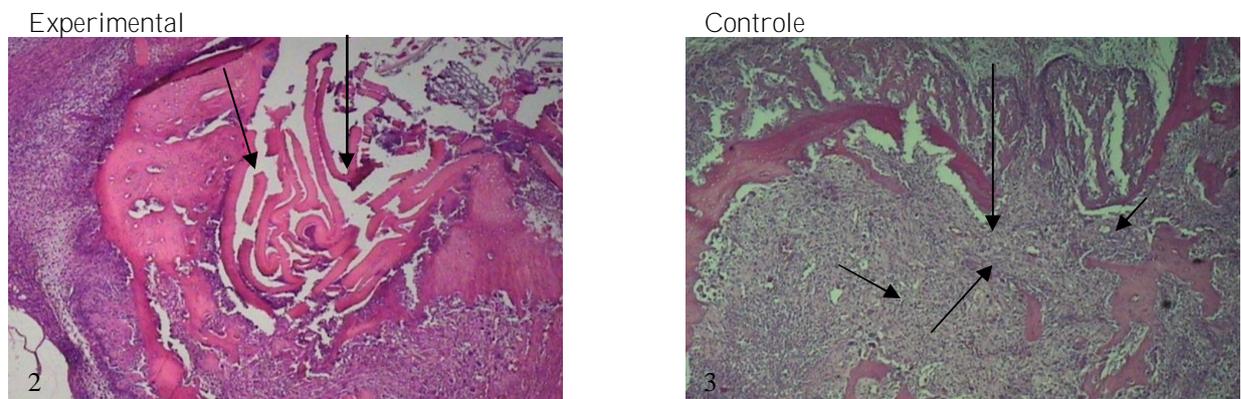
4 RESULTADOS

4.1 Análise histomorfológica

Os resultados da análise histomorfológica dos grupos experimental, esquerdo e controle, direito, referem-se respectivamente ao lado tratado com MDHD e controle dentro de cada período considerado no experimento.

4.1.1 Grupo I

No grupo I, 3 dias, a área do defeito ósseo cirúrgico, considerado experimental (figura 1 lado esquerdo), apresentou-se preenchida por tecido inflamatório, em toda a extensão do alvéolo. Ainda nesse grupo, a área do defeito ósseo cirúrgico, considerado controle (figura 2 lado direito), apresentou-se preenchida por reação inflamatória, em toda a extensão do alvéolo.



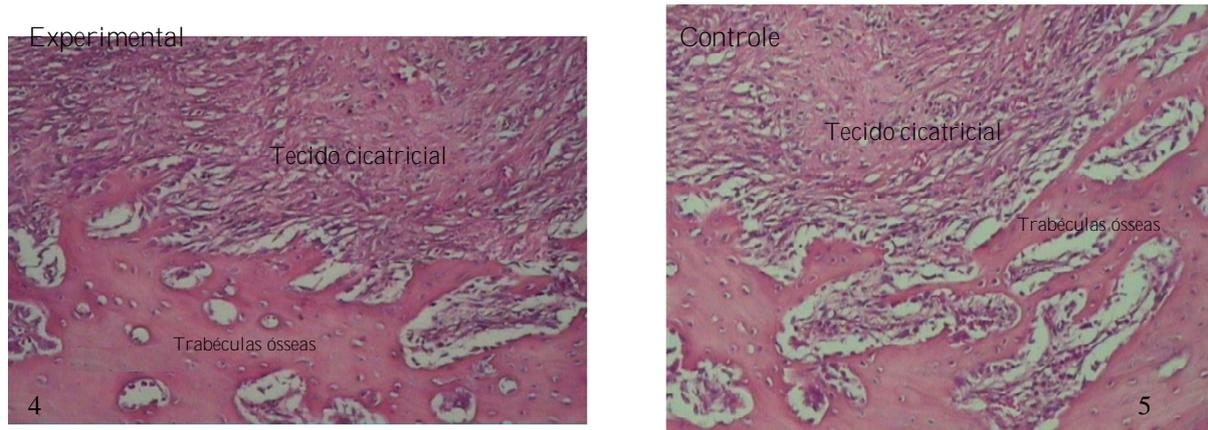
Figuras 2 e 3: Experimental - Figura histológica mostrando a presença da matriz dentro do alvéolo esquerdo (setas). Controle - Figura histológica mostrando a presença de processo inflamatório (setas). Coradas com HE, (objetiva de 20x).

4.1.2 Grupo II

No grupo II, 7 dias lado experimental (fig 4), a região do defeito ósseo apresentou-se com maior quantidade de tecido ósseo em formação, principalmente no fundo do alvéolo. Na região central do defeito foi observada maior quantidade de tecido conjuntivo frouxo,

apresentando este, maior quantidade de células osteogênicas. O tecido ósseo desta região era, bastante celularizado, apresentando espaços medulares menores

já no grupo controle, (fig 5) a região do defeito ósseo apresentou-se preenchida por tecido ósseo em formação, principalmente no fundo do alvéolo. Na região central do defeito foi observada grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo, apresentando este, pequena quantidade de células osteogênicas. O tecido ósseo desta região era imaturo, bastante celularizado, apresentando amplos espaços medulares.

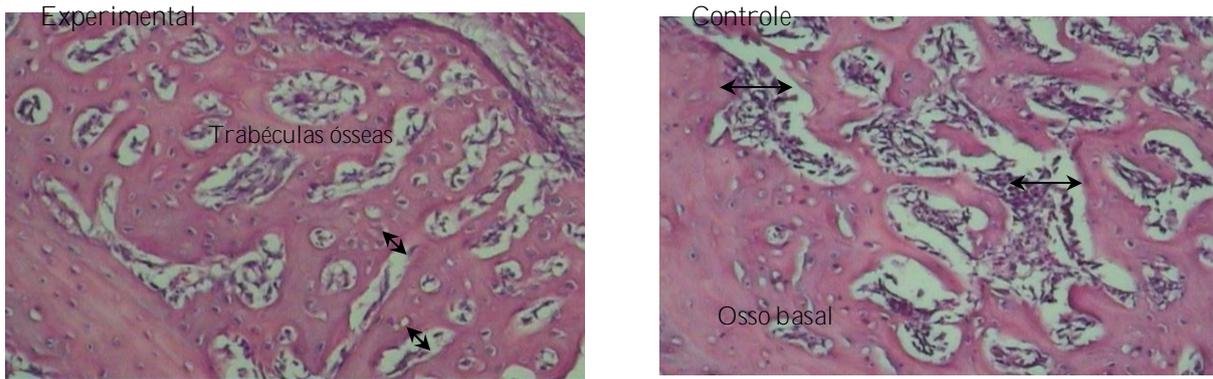


Figuras 4 e 5: Experimental - Corte longitudinal do alvéolo esquerdo. Controle - Corte longitudinal do alvéolo direito. Tempo: 7 dias. Ambas Coradas com HE, (objetiva de 40x).

4.1.3 Grupo III

No grupo III, 14 dias lado controle, a região do defeito ósseo apresentou-se preenchida por tecido ósseo em formação, em quantidades mais significativas que os grupos controles citados anteriormente. Na região central do defeito foi observada grande quantidade de tecido ósseo, bem como no fundo do alvéolo. O tecido ósseo desta região era imaturo, bastante celularizado, apresentando amplos espaços medulares, porém já era possível observar a presença de tecido ósseo maduro,

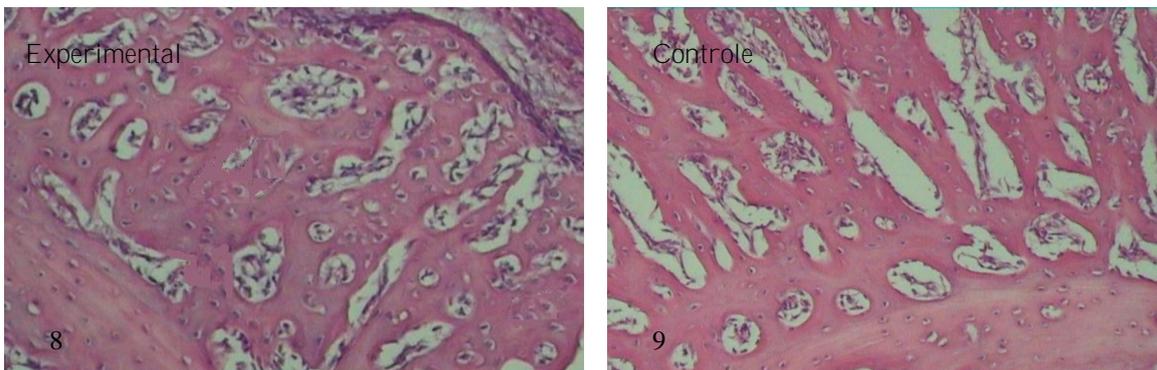
No lado experimental, a região do defeito ósseo apresentou-se preenchida por tecido ósseo em formação, em quantidades mais significativas que o lado controle do mesmo grupo. Na região central do defeito foi observada grande quantidade de tecido ósseo, bem como no fundo do alvéolo. O tecido ósseo apresentou-se em sua maioria maduro menos celularizado, apresentando espaços medulares DIMINUIDOS (figuras 6 e 7).



Figuras 6 e 7: Experimental - Corte longitudinal do alvéolo esquerdo mostrando área com diminuição dos espaços medulares (setas). Controle - Corte longitudinal do alvéolo direito mostrando áreas dos espaços medulares (setas). Ambas Coradas com HE, (objetiva de 40x)..

4.1.4 Grupo IV

No grupo IV, 21 dias lado controle, a região do defeito ósseo apresentou-se quase que completamente preenchida por tecido ósseo. Observou-se no alvéolo grau avançado de formação óssea, sendo este tecido maduro, pouco celularizado, apresentando espaços medulares estreitos. No grupo IV, lado experimental, a região do defeito ósseo apresentou-se em estagio mais avançado de regeneração tecidual que o lado controle do mesmo grupo. Observou-se no alvéolo praticamente regenerado grau avançado de formação óssea, sendo este tecido maduro, pouco celularizado, apresentando espaços medulares estreitos. (figuras 8 e 9)

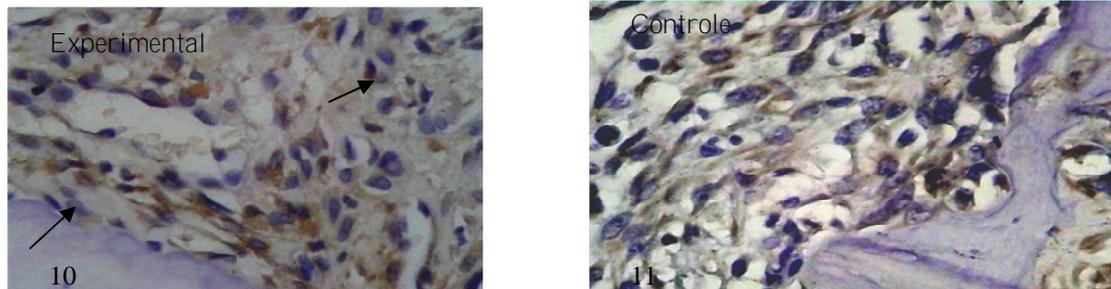


Figuras 8 e 9: A - Corte longitudinal do alvéolo direito, lado controle. B - Corte longitudinal do alvéolo esquerdo, lado controle. Ambas Coradas com HE, (objetiva de 40x)..

4.2 Análise imunohistoquímica

A expressão de VEGF nos fibroblastos e osteoblastos durante o período estudado (3,7,14 e 21 dias) mostrou baixos níveis de reatividade aos 3 e 21 dias em ambos os alvéolos.

Aos 7 e 14 dias observou-se aumento significativo ($P < 0,05$) no número de células marcadas, nos alvéolos do lado experimental quando comparado com o lado controle (Fig. 9).



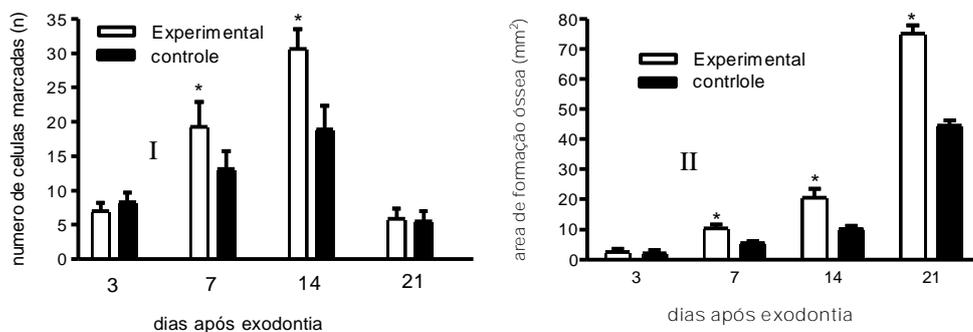
Figuras 10 e 11: Experimental - Expressão do VEGF em fibroblastos do tecido cicatricial em alvéolo (marcação intensa no tecido cicatricial) (setas) e Controle - Expressão do VEGF em fibroblastos do tecido cicatricial em alvéolo 7 dias.. (objetiva de 40x).

Análise Histoquantitativa

A análise histoquantitativa teve como finalidade determinar a área de trabéculas ósseas e o número de células expressando VEGF, durante o processo de reparo nos defeitos ósseo dos grupos I, II, III e IV, bem como fornecer os dados necessários à análise estatística. As médias e desvios estão expressos nos gráficos I e II

O gráfico I mostra que o número de células imunomarcadas com anti-VEGF foi estatisticamente maior no lado esquerdo ($P < 0,05$) do que no lado direito

Gráfico II mostra que a área de neo-formação óssea foi sempre maior no lado esquerdo (preenchido com matriz dentinária) do que no lado direito (lado controle), sendo estatisticamente maior ($P < 0,05$) aos sete, quatorze e vinte e um dias (figura 10). Segundo teste de Kruskal-wallis, seguido pelo teste de Dunn.



Gráficos 1: Mostra a neo-formação óssea no lado esquerdo (preenchido com matriz dentinária) do que no lado direito (lado controle), sendo estatisticamente maior ($P < 0,05$) aos sete, quatorze e vinte e um dias Gráfico II. mostra que a área de neo-formação óssea foi sempre maior no lado esquerdo (preenchido com matriz

dentinária) do que no lado direito (lado controle), sendo estatisticamente maior ($P < 0.05$) aos sete, quatorze e vinte e um dias

5 DISCUSSÃO

Numerosas pesquisas têm sido relatadas na busca de biomateriais para enxertos ósseos homogêneos que proporcionem a aceleração do processo de regeneração óssea. Os enxertos homogêneos eliminam a necessidade de um local doador pelo próprio paciente e permitem maior disponibilidade em seu uso pela possibilidade de armazenamento em grandes quantidades e por longos períodos. Entretanto, ressalta-se a necessidade da biocompatibilidade que esses biomateriais homogêneos devem apresentar, para que não sejam desencadeadas reações de incompatibilidade imunológica com conseqüente rejeição do material de enxerto utilizado e prejuízo da regeneração óssea desejada.

A angiogênese é um processo fundamental, altamente regulado, para a formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes, e a regeneração tecidual somente ocorre com a formação adequada dos vasos sanguíneos (CHAIN; JONES; TARNAWISK, 2004).

O VEGF é o fator mais importante da neovascularização, tanto fisiológica quanto patológica. Ele estimula as células endoteliais na degradação da matriz extracelular, migração e formação de túbulos *in vitro*. *In vivo*, funciona como regulador da permeabilidade vascular, que é considerada importante para o início da angiogênese. A sobrevivência de células endoteliais em vasos recém formados é VEGF-dependente. Coerente com seu papel na sobrevivência celular, o VEGF induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas nas células endoteliais (ALMEIDA e ALVES, 2007). No presente trabalho, o enxerto ósseo homogêneo de MDHD mostrou-se biocompatível, apresentando reação imune desprezível do hospedeiro, verificada na análise histomorfológica pela presença de infiltrado discreto de células inflamatórias mononucleares na região de reparação óssea, assim como, pela incorporação das partículas do enxerto de MDHD ao tecido ósseo neoformado

Segundo Smiler *et al.* (1992), um enxerto ideal deve ser atóxico, não antigênico, sempre viável, de fabricação simples e barata, permitindo fácil manipulação e inserção tecidual, além de não apresentar risco de transmissão de infecções. A MDHD preparada nesta pesquisa satisfaz os requisitos mencionados, pois a técnica de preparo utilizada requer procedimentos e aparelhos mecânicos e eletrônicos de baixa complexidade, e componentes químicos rotineiros, de baixo custo, facilmente obtidos no mercado, ermitindo assim, o preparo da MDHD em grandes quantidades e viabilizando sua aplicação clínica em larga

escala. Além disso, sua apresentação permite facilidade no manuseio trans-operatório e na inserção óssea do material durante o procedimento cirúrgico.

Relacionando ainda a técnica de preparo da MDHD, observou-se que a desmineralização das partículas de dentina contribuiu para a aceleração da reparação óssea estudada. A observação relatada pode ser explicada pelo fato de ser a matriz orgânica dentinária um reservatório de fatores indutores da proliferação celular e quimiotaxia como IGF-I e II, TGF- β e as BMPs (BESSHO; TAGAWA; MURATA, 1992; GUIMARÃES, 1993). Acredita-se que a desmineralização das partículas de dentina, neste estudo, proporcionou uma maior disponibilidade e acesso aos componentes polipeptídicos estimuladores da matriz dentinária no local de reparação óssea. Desta maneira, a ação osteopromotora da MDHD não se restringiu apenas à osteocondução, mas também à indução da proliferação de células osteogênicas e quimiotaxia das mesmas.

A osteoindução no processo de reparação óssea tem sido descrita como um fenômeno de transformação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras ou osteoprecursoras classificadas como osteoprecursoras ou osteogênicas determinadas e osteoprecursoras indizíveis, segundo Friedenstein (1976) e Nakashima, (1990, 1992), sendo que estas últimas podem ser encontradas em tecidos distantes do tecido ósseo, como subcutâneo, tecido muscular esquelético, baço e fígado onde, normalmente, não produzem osso. Entretanto, em contato com um indutor adequado, como a proteína morfogenética óssea, estas células diferenciam-se em condroblastos e/ou osteoblastos resultando na produção ectópica de cartilagem e tecido ósseo imitando a ossificação endocondral (REDDI, 1981).

Segundo Gonçalves *et al.* (2002), Urist, (1965) e Torres *et al.* (2000), defeitos ósseos são passíveis de sofrerem instabilidade biomecânica, principalmente nas áreas centrais dos defeitos, sujeitas à ação dos músculos adjacentes. A mobilidade acima do nível fisiológico prejudica a angiogênese e reduz tensão de oxigênio, criando assim um microambiente condrogênico. Uma vez que o tecido cartilaginoso possui necessidades metabólicas reduzidas em relação ao tecido ósseo, este poderá se desenvolver em áreas sem estabilidade funcional. Sendo assim, a matriz dentinária pode induzir a formação de cartilagem em áreas heterotópicas ou quando enxertada em defeitos ósseos.

O processo de reparação óssea envolve migração de células mesenquimais, proliferação e diferenciação de células osteogênicas. (Junqueira *et al.*, 2002). Segundo Guimarães (1993), Canalis (1983), Martin e Ng (1994) todo o processo de osteoindução é controlado por complexas interações moleculares que influenciam quimiotaxia, proliferação, diferenciação das células de linhagens osteoblástica e osteoclástica. A matriz orgânica

dentinária além da indução da proliferação e diferenciação osteoblásticas possui propriedades quimiotáticas (GUIMARÃES, 1993; GOMES *et al.*, 2001; CARVALHO, 2001; GOMES *et al.*, 2002). Fatores estimuladores locais, presentes na matriz dentinária, como as BMPs, iniciam a proliferação celular no processo de reparação óssea (URIST e STRATES, 1971) podendo, também, proteínas estruturais como os colágenos participarem deste processo (MUNDY, 1994).

Houve formação de grande quantidade de células do tecido conjuntivo osteogênico que se formou no local de reparação óssea guiada. O que esta de acordo com a literatura. (TUOMINEN, 2001; ALMEIDA e ALVES, 2007). Esta proliferação celular, provavelmente, é decorrente da liberação de fatores indutores da multiplicação celular durante o processo de reabsorção da MDHD. Além da proliferação evidente de células osteogênicas, pôde-se constatar que ,grande número dessas células envolvia as partículas de MDHD, demonstrando a capacidade quimiotática para VEGF deste material de enxerto, portanto levantamos a hipótese de que atividade estimulante, por parte da MDHD, provoque a diferenciação de células indiferenciadas em células osteogênicas, não terem sido realizadas análises que permitissem o reconhecimento das células da linhagem osteogênica no local de reparação óssea. No entanto, para a caracterização da atividade osteoindutora da MDHD, análises para evidencição imunohistoquímica da expressão de VEGF nas células osteoprecursoras foram realizadas.

A função do enxerto de matriz óssea desmineralizada, seja de induzir a neovascularização no interior do defeito, enquanto que as células mesenquimais indiferenciadas da região perivascular dos novos vasos sanguíneos, seriam induzidas a se diferenciarem em osteoblastos pelas proteínas morfogenéticas da matriz óssea desmineralizada (BESSHO; TAGAWA; MURATA, 1990; 1992). No presente estudo as observações a respeito da expressão de VEGF no interior do defeito ficaram evidentes no período de 7 dias (lado experimental) onde o tecido ósseo neoformado apresentou amplos canais vasculares permeando suas trabéculas, caracterizando intensa vascularização na região de reparação.

A ocorrência de grande quantidade de células osteogênicas localizadas sobre as partículas de MDHD, nos períodos de 7 e 14, lado experimental, vem confirmar os resultados de Nakashima (1990), Guimarães *et al.* (1986), Gomes *et al.*, (2001, 2002) e Carvalho (2001) que analisaram matriz dentinária desmineralizada sob as formas de partículas e/ou fatias, sugerindo que a matriz dentinária enxertada, poderia promover uma superfície adequada para

fixação das células mesenquimais indiferenciadas, auxiliando na orientação celular, caracterizando sua ação osteocondutora.

Estes autores Nakashima (1990), Guimarães *et al.* (1986), Gomes *et al.*, (2001, 2002) e Carvalho (2001) também descreveram a atividade osteocondutora da matriz dentinária em fatias, porém, alguns deles constataram osteocondução também com emprego de dentina particulada. Este fato deve-se, provavelmente, à maior superfície de contato oferecida pelas numerosas partículas de MDHD com o tecido osteogênico da região, fornecendo substrato favorável à deposição de matriz óssea.

Os reparos ósseos decorrente de lesões, fraturas e defeitos são ativados pela liberação de fatores de crescimento, como as BMPs abundantes na matriz óssea e produzidas por osteoblastos (HELDER *et al.*, 1998). Entretanto, autores como Lundgren *et al.* (1997, 1997a), Hammerle *et al.* (1997, 1998) e Caplanis *et al.* (1998), relatam a osteocondução inicial, no processo de reparação óssea, de biomateriais de enxertos particulados. Essa ação osteocondutora aceleraria a neoformação óssea provocada pelo aumento do recrutamento de células osteoprogenitoras.

Segundo Simões (1997), a atividade inicial de condução da regeneração óssea levaria à aceleração do processo de remodelação no local, com conseqüente liberação de fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas. Acredita-se que esta mesma seqüência de fenômenos ocorra no enxerto de MDHD no processo de regeneração óssea, pois a capacidade de osteocondução e de osteoindução da matriz dentinária foi constatada em inúmeros trabalhos relacionados na literatura como os de: Butler *et al.* (1977), Alper *et al.* (1989), Bessho; Tagawa; Murata (1992) Buser *et al.* (1994), Tziafas *et al.* (1995), Yoshida *et al.* (1998), Okamoto *et al.* (1999), Cheng *et al.* (2001), Hamata *et al.* (2002), Kim *et al.* (2002), entre outros.

Os resultados das análises microscópica dos grupos estudados mostraram que no lado experimental dos grupos III e IV, houve o completo preenchimento das lojas cirúrgicas por tecido ósseo neoformado após o enxerto, o que vai ao encontro dos trabalhos de vários autores que usaram a matriz dentinária (CARVALHO, 2001; GOMES *et al.*, 2001, 2002).

Pesquisadores que utilizaram a gelatina de MDHD testando defeitos ósseos de tamanho crítico no osso parietal de ratos, evidenciaram regeneração completa, comprovando a alta eficiência osteoformadora da dentina (GOULD *et al.*, 1982). Considerando as propriedades osteopromotoras da MDHD anteriormente discutidas, deve-se ressaltar a significância estatística no aumento da neoformação óssea no lado experimental em relação ao

lado controle, sobretudo aos 7 e 14 dias. Observou-se, no lado experimental, uniformidade e constante aumento da quantidade de matriz óssea neoformada ao longo do tempo.

Este fato poderia estar relacionado à estimulação da proliferação e da atividade de células osteoblásticas e clásticas pelas partículas de MDHD na região do reparo, resultando na extensão deste processo de regeneração. Por outro lado, no lado controle observou-se a heterogeneidade do processo e do volume de neoformação óssea. Isto pode ser decorrente de uma compactação e organização da cortical óssea, resultante do processo de maturação do tecido formado, traduzindo uma diminuição do volume final do osso e talvez indicando a presença de menor quantidade de fatores estimuladores locais.

Além da superioridade quantitativa de tecido ósseo neoformado no lado experimental, é importante e notória a superioridade qualitativa do osso neoformado, quando comparado ao lado controle. A melhor qualidade estrutural óssea revela-se no maior grau de organização deste tecido, além de apresentar trabeculado espesso e numeroso com distribuição regular e uniforme tanto na extensão quanto na profundidade da loja cirúrgica.

Muitos parâmetros para os variados estudos sobre os materiais biológicos osteoindutores têm sido considerados. Dentre eles, a biocompatibilidade, estocagem sem perda da viabilidade, facilidade de obtenção do material e relação custo/benefício, importantes requisitos a serem preenchidos por materiais biológicos osteoindutores testados atualmente (BANG, 1972; KNUDSEN *et al.*, 1974; STRATES *et al.*, 1988; VEIS *et al.*, 1989; NADE, 1994).

Considerando as características acima mencionadas, verificamos propriedades relevantes do emprego da matriz dentinária desmineralizada, neste estudo, uma vez que se evidenciou significativo potencial osteopromotor, preenchendo plenamente os requisitos acima descritos. Essas características favoráveis contribuem para a indicação da MDHD como material de enxerto em feridas ósseas, com resultados extremamente positivos e grandes perspectivas de sucesso em sua aplicação nas mais variadas áreas das ciências biomédicas e, sobretudo na Odontologia. Futuras pesquisas, com metodologia específica para a identificação das outras substâncias ativadas pelo processo de osteoindução da MDHD, poderão complementar os resultados obtidos neste experimento visando o esclarecimento necessário das diversas etapas envolvidas na atividade indutora do enxerto homogêneo, bem como as moléculas que tem sua expressão induzidas pela MDHD.

6 CONCLUSÃO

Em conformidade com os objetivos propostos, os resultados obtidos e dentro das condições experimentais desta pesquisa, pode-se concluir que:

a) A técnica desenvolvida no preparo da MDHD mostrou-se adequada para a manutenção das características estruturais de seus componentes bioativos e, por conseguinte sua avaliação histológica e imunohistoquímica;

b) A MDHD estimulou de forma significativa a proliferação de células osteogênicas, evidenciando sua ação osteopromotora no processo de regeneração óssea;

c) O uso da MDHD promoveu a neoformação óssea de maneira mais rápida e em maior volume no lado tratado, em todos os períodos observados e estatisticamente significantes aos 7 , 14 dias e 21 dias.

d) O tecido ósseo neoformado no lado experimental apresentou, além da superioridade quantitativa, notória superioridade qualitativa quando comparado ao grupo controle;

e) A MDHD promoveu aumento na expressão de VEGF, o que pode estar relacionado com a superioridade regenerativa do tecido ósseo.

REFERÊNCIAS

ABREU P. P. Efeitos da matriz dentinária desmineralizada autógena no alvéolo dentário cruento, tratado pela técnica de regeneração óssea guiada, em humanos. São José dos Campos: UNESP, 2003. 54 p. Relatório referente à Bolsa de Iniciação científica da FAPESP, 02/03952-8].

ALMEIDA, J. M. de; ALVES J. B. Efeito da matriz dentinária humana no reparo alveolar de ratos: avaliação histológica e imunohistoquímica. RGO, Porto Alegre, v. 55, n. 2, p. 133-138, Abr./Jun. 2007.

ALPER G. et al. Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. Am J Med Sci., Virginia, v. 6, n. 298, p. 371-376, Dec. 1989.

ANNERTH, G.; BANG, G. The effect of allogeneic demineralized dentin as a pulp capping agent in Java monkeys. Odontol Revy, Sweden, v. 23, p. 315-32, 1972.

AUERBACH, R.; AUERBACH, W. Vasculogenesis and angiogenesis. In.: FAN, T. D.; KOHN, E. C. The new angiotherapy, Totowa: Humana Press, 2002. p. 1-6.

BAGRI, A.; TESSIER, L. M. Neuropilins as semaphorin receptors: *in vivo* functions in neuronal cell migration and axon guidance. Adv Exp Med Biol., New York, v. 515, p. 13-31, 2002.

BANG G. Induction of heterotopic bone formation by demineralized dentin in guinea pigs: antigenicity of the dentin matrix. J Oral Pathol, Copenhagen, v. 1., p.172-185, 1972.

BARANDON, L. et al. Gene therapy for chronic peripheral arterial disease: what role for the vascular surgeon? Ann Vasc Surg, New York, v.18, n. 6, p. 758-765, Nov. 2004.

BECKER W. et al. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. J Periodontol, Chicago, v. 11, n. 63, p. 929-940, Nov. 1992.

BESHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. J Oral Maxillofac Surg., Edinburgh, v. 48, p. 162-169, 1990.

_____. Comparison of bone matrix-derived bone morphogenetic proteins from various animals. *J Oral Maxillofac Surg*, Edinburgh, v. 5, n. 50, p.162-169, May. 1992.

BOOTH, V. et al. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontal Res.*, Copenhagen, v. 33, p. 491-499, 1998.

BOLOURI, A.; HAGHIGHA, T. N.; FREDERIKSEN N. Evaluation of the effect of immediate grafting of mandibular postextraction sockets with synthetic bone. *Compend. Contin. Educ. Dent.*, Lawrenceville, v. 22, p. 955-958, 2001.

BOSTROM, M. P. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop.*, North AM, p. 355, Oct., 1998. Supplement.

BROWNELL, A. G. Osteogenesis inhibitory protein: a preview. *Connect Tissue Res.*, London, v24(1): 13-6, sep.,1990

BRUDER, S. P.; FINK, D. J.; CAPLAN A. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*, California, v. 3, n. 56, p. 283-294, Nov. 1994.

BUSCH O. et al. Guided tissue regeneration and local delivery of insulinlike growth factor I by bioerodible polyorthoester membranes in rat calvarial defects. *Int J Oral Maxillofac Implants.*, Pasadena, v. 4, n. 11, p. 498-505, Jul-Aug. 1996.

BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence Books,1994.

BUTLER, W. T. et al. Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity. *J Dent Res.*, Washington, v. 3, n. 56, p. 228, Mar. 1977.

CANALIS, E. The hormonal and local regulation of bone formation., *Endocr Rev.*, Chevy Chase, v. 1, n. 4, p. 62-77, Winter 1983.

CAPLANIS, N. et al. Effect of allogeneic freeze-dried demineralized bone matrix on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment in dogs. *J Clin Periodontol.*, Copenhagen, v. 10, n. 25, p. 801-806, Oct. 1998.

CARLILE, J. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumor progression and field cancerisation. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 30, n. 8, p. 449-457, Sept. 2001.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other. *Nature*, London, v. 407, n. 7, p. 249-257, Sept. 2000.

CARVALHO P. S. P. et al. Estudo experimental sobre a matriz natural de osso esponjoso em cavidades ósseas. *Innovations*, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 13-20, Jan. 1998.

CARVALHO, V. A. P. Efeitos da matriz dentinária desmineralizada homogênea sobre a reparação óssea em mandíbulas de coelhos – análise histomorfométrica. *Dissertação (Mestrado)*. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas, Piracicaba. 2001.

_____ et al. Histomorfometric analysis of homogenous desmineralized dentin matrix as osteopromotive material in rabbit mandibules. *The international journal of oral e maxilofacialinplantis*, Illinois, v.5, p. 679-686, 2004.

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. *The Faseb Journal*, Washington, p.1-19, Jun. 2004.

CHENG, K. et al. Decalcificated human dentin matrix in autogenous repair of skull defects. *Chin J Traumatol*, Chine, v. 4, n. 4, p. 248-250, Nov. 2001.

CHIAPASCO, M. et al. Clinical outcome of autogenous bone blocks or guided bone regeneration with e-PTFE membranes for the reconstruction of narrow edentulous ridges. *Clin Oral Implants Res.*, Philadelphia, v. 4, n. 10, p. 278-288, Aug. 1999.

CHRISTGA, U. M. et al. Periodontal regeneration of intrabony defects with resorbable and non-resorbable membranes: 30-month results. *J Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 24, p. 17-27, 1997.

CHO, K. S. et al. Alveolar bone formation at dental implant dehiscence defects following guided bone regeneration and xenogeneic freeze-dried demineralized bone matrix. *Clin Oral Implants Res.*, Philadelphia, v. 6, n. 9, p. 419-428, Dec. 1998.

COLBATZKY, F.; HERMANNNS, W. Immunohistochemical demonstration of various antigens in tissues embedded in plastic. *Histochem J*, London, v. 19, p. 589- 593, 1987

CORMACK, D. H. Ham histologia. 9. ed. Rio de Janeiro: Lippincott, 1991.

CORTELLINI, P.; PINI PRATO, G.; TONETTI, M. S. Periodontal regeneration of human infrabony defects. Re-entry procedures and bone measures. J. Periodontol., Chicago, v. 64, p. 254-268, 1993.

DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. Plast Reconstr Surg., Washington, v. 5, n. 81, p. 672-676, May 1998.

DUMAS, A. et al. The influence of process for the purification of human bone allograft on the matrix surface and cytocompatibility. Biomaterials, v. 27, n. 23, p. 4204-4211, Aug. 2006.

DVORAK, H. F. et al. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. Am J Pathol., Philadelphia, v. 146, n. 5, p. 1029-1035, May 1995.

ELCIN, Y. M.; DIXIT, V.; GITNICK, G. Extensive *in vivo* angiogenesis following onrolled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. Artif Organs, Cleveland, v. 25, n. 7, p. 558-565, Jul. 2001.

ERIKSEN, E. F.; MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. Trabecular bone remodeling and balance in primary hyperparathyroidism. J Bone Miner Res., Toronto, v. 3, n. 7, p. 213-221. 1986.

FERRARA, N. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature, London, v. 380, n. 6573, p. 439-442, Apr. 1996a.

_____. Vascular endothelial growth factor. Eur J Cancer, Oxford, v. 32, n. 14, p 2413-2422, Dec. 1996.

_____. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. J Mol Med, Heidelberg, v. 77, n. 7, p.527-543, Jul. 1999a.

FERRARA, N.; ALITALO, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. Nat Med, New York, v. 5, n. 12, p. 1359-1364, Dec. 1999.

FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for Vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, New York, v. 161, n. 2, p. 851-858, Jun. 1989.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LeCOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, New York, v. 9, n. 6, p. 669-676, Jun. 2003.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. *Science*, Washington, v. 235, n. 4787, p. 442-447, Jan. 1987.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, Jun. 1992.

FONG, G. H. et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, London, v. 376, n. 6535, p. 66-70, Jul. 1995.

FRIEDENSTEIN A. J. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol.*, New York, v. 47, p. 327-59, 1976.

GAO, Y. H.; YANG, L. J.; YAMAGUCHI, A. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein in odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med.*, Copenhagen, v. 6, n. 26, p. 273-277, Jul. 1997.

GEBHART, M.; LANE, J. A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. *Acta Orthop Belg.*, Belgica, v. 57, p.130-143, 1991.

GOMES M. F. et al. Autogenous demineralized dentin matrix for tissue engineering applications: radiographic and histomorphometric studies. *Int J Oral Maxillofac Implants*. Pasadena, v. 4, n. 17, p. 488-497, Jul-Aug. 2002.

Gomes MF, Abreu PP, Morosolli AR, Araujo MM, Goulart MG. Densitometric analysis of the autogenous demineralized dentin matrix on the dental socket wound healing process in humans. *Pesquisa Odontologica Brasileira = Brazilian Oral Research*. 2006 Oct-Dec;20(4):324-30.

_____. Histologic evaluation of the osteoinductive property of autogenous demineralized dentin matrix on surgical bone defects in rabbit skulls using human amniotic membrane for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants.*, Pasadena, v. 4, n. 16, p. 563-571, Jul-Aug. 2001.

GONÇALVES E. A. L. et al. Atividade morfogenética da matriz dentinária desmineralizada: estudo em cães. *Rev Fac Odontol Bauru, Bauru*, v. 1, n. 10, p. 51-56, 2002.

_____. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo. *Rev Odontol USP, São Paulo*, v. 12, p.299-304, 1998.

GOUNIS, M. J. et al. Angiogenesis is confined to the transient period of VEGF expression that follows adenoviral gene delivery to ischemic muscle. *Gen Ther, London*, v. 12, n. 9, p. 1-10, Mar. 2005.

GOULD, T. R.; WESTBUR, Y. L.; TILLMAN, J. Dentin matrix gelatin (DMG) as a possible "universal" grafting material in periodontics. *J Periodontol., Chicago*, v. 1, n. 53, p. 22-25, Jan. 1982.

GUIMARÃES, S. A. C. Possibility to reinforce bone repair with decalcified dentin matrix. In: _____. *Jahrbuch für oral implantologie. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH*, 1993. p.33-34.

GUIMARÃES, S. A. C. et al. Osteogenic potential of autogenic demineralized dentin implanted in bone defects in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg., Edinburgh*, v. 15, p.160-169, 1986.

GUIMARÃES, B. P. N. C. Capacidade ósteo-indutora da matriz dentinária autógena, utilizada sob a forma de partículas e fatias, em defeitos ósseos experimentais em cães. 1979. 80 f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

HAMATA, M. M; YUNOMAE, A.; CESTARI TM, T. R. Avaliação morfométrica comparativa da capacidade osteoindutora na matriz óssea e dentinária alogênica. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA, 19., 2002. Anais... Águas de Lindóia: SBPqO, 2002.

HAMMERLE C. H. et al. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res., Philadelphia*, v. 3, n. 9, p. 151-162, Jun. 1998.

_____. The biological effect of natural bone mineral on bone neoformation on the rabbit skull. *Clin Oral Implants Res., Philadelphia*, v. 3, n. 8, p. 198-207, Jun. 1997.

_____. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg.*, Edinburgh, v. 2, n. 53, p. 167-174, Feb. 1995.

HELDER, M. et al. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1, OP-1) and tooth development. *J Dent Res.*, Washington, v. 4, n. 77, p. 545-554, Apr. 1998.

HILL, P. A.; TUMBER A.; MEIKLE M. C. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology*, Chevy Chase, v. 9, n. 138, p. 3849-3858, Sep. 1997.

HICKLIN, D.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, New York, v. 23, n. 5, p. 1011-1027, Feb. 2005.

HOEBEN, A. et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev*, Baltimore, v. 56, n. 4, p.549-580, Dec. 2005.

HOLLINGER, J.; WONG, M. E. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, St. Louis, v. 6, n. 82, p. 594-606, Dec. 1996.

HOUCK, K. A. et al. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanism s. *J Biol Chem.*, Baltimore, v. 267, n. 36, p. 26031-26037, Dec. 1992.

HUGGINS C. The formation of bone under the influence of epithelium of the urinary tract. *Arch Surg*, New York, v. 22, p. 377, 1931.

INOUE, T.; DEPORTER, D. A.; MELCHER, A. H. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix *in vivo* and *in vitro*. *J Dent Res.*, Washington, v. 65, p.12-22, 1986.

ISAKSSON, S.; ALBERIUS, P. Comparison of regenerative capacity elicited by demineralized bone matrix of different embryonic origins. *J Craniomaxillofac Surg.*, Edinburgh, v. 2, n. 20, p. 73-80, Feb-Mar. 1992.

ISHIDOU Y. et al. Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Miner Res.*, Toronto, v. 11, n. 10, p. 1651-1659, Nov. 1995.

JIN, Y.; YANG, L. J. The relationship between bone morphogenetic protein and neoplastic bone diseases. *Clin Orthop.*, North Am., n. 259, p. 233-238, Oct. 1990.

JUNQUEIRA, J. C. et al. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. *J Oral Sci., Copenhagen*, v. 3-4, n. 44, p. 117-124, Dec. 2002.

KARRING, T. et al. Bone regeneration of orthodontically produced alveolar bone dehiscences. *J Periodontal Res, Copenhagen*, v. 17, p. 309-315, Jun. 1982.

KATCHBURIAN, E.; ARANA-CHAVEZ, V. E. *Histologia e Embriologia oral*. São Paulo: Medicina Panamericana, 1999.

KATSUBE, K. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transfer enhances surgical revascularization of necrotic bone. *J Orthop Res, Wiley*, v. 23, n. 2, p. 469-474, Mar. 2005.

KAWAI, T.; URIST, M. R. Bovine tooth-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res., Washington*, v. 68, p. 1069-1074, 1989.

KECK, P. M. et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science, Washington*, v. 246, n. 4935, p.1309-1312, Dec. 1989.

KERBEL, R. S. Tumor angiogenesis: past, present and near future. *Carcinogenesis, New York*, v. 21, n. 3, p. 505-515, 2000.

KIM, H. J. et al. Vascular endothelial growth factor- induced angiogenic gene therapy in patients with peripheral artery disease. *Exp Mol Med, Seoul*, v. 36, n. 4, p. 336-344, Aug. 2004.

KIM, S. G. et al. Use of particulate dentinplaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants., Pasadena*, v. 1, n. 17, p. 86-94, Jan-Feb. 2002.

KIM, S. G.; YEO, H. H.; KIM; Y. K. Grafting of large defects of the jaws with a particulate dentin-plaster of Paris combination. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., St. Louis*, v. 1, n. 88, p. 22-25, Jul. 1999.

KING, G. N.; KING, N.; HUGHES, F. J. The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *J Periodontol., Chicago*, v. 69, p. 561-570, 1998.

KLAGSBRUN, M.; TAKASHIMA, S.; MAMLUK, R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol*, New York, v. 515, p. 33-48, 2002.

KLEINHEIN, Z. et al. VEGF-Activated Angiogenesis. *J Oral Maxillofac Surg*, Edinburgh, v. 63, p. 1310-1316, 2005.

KNUDSEN, G. E.; BANG, G.; KRISTOFFERSEN, T. Implanting of allogenic demineralized dentin in human gingival tissue. *J Clin Periodontol.*, Copenhagen, v. 69, n. 1, p. 153-159, 1974.

KRYST, L. *Chirurgia stomatologiczna*. Urban & Partner, Wrocław, n.2, p.211–259, 1997.

LEUNG, D. W. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, Washington, v. 246, n. 4935, p.1306-1309, Dec. 1989.

LINDE, A. Dentin Matrix Proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec.*, Philadelphia, v. 224, p.154-166, 1989.

LUNDGREN, A. K. et al. Augmentation of skull bone using a bioresorbable barrier supported by autologous bone grafts. An intra-individual study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. Philadelphia, v. 2, n. 8, p. 90-95, Apr.1997a.

_____. Bone augmentation at titanium implants using autologous bone grafts and a bioresorbable barrier. An experimental study in the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res*. Philadelphia, v. 2, n. 8, p. 82-89, Apr.1997.

MACEDO, L. G. S. et al. Osso humano fresco congelado em reconstruções ósseas: estudo retrospectivo e relato de casos. *Implant News*, São Paulo, v. 4, n. 1, Jan.-Fev. 2007.

MACHADO, S F., *Propriedades biológicas e aplicação clínica da matriz dentinária desmineralizada: revisão de literatura Monografia-Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2008*

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. *Métodos quantitativos em morfologia*. Rio de Janeiro: EdUERJ, 1995.

MANOLAGAS, S. C.; JILKA R. L. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.*, London, v. 5, n. 332, p. 305-311, Feb.1995.

MARTIN, T. J.; NG, K. W. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation; and activity. *J Cell Biochem.*, California, v. 3, n. 56, p. 357-366, Nov. 1994.

MASSAGUE, J. Transforming growth factor-beta modulates the high-affinity receptors for epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha. *J Cell Biol.*, New York, v. 5, n. 100, p. 1508-1514, May. 1985.

MENDES, R. M. et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol.*, Oxford, v. 12, n. 53, p. 1155-1162, Dec. 2008.

MISCH, C. E., DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent.*, Los Angeles, v. 3, n. 2, p. 158-167, 1993.

MUNDY, G. R. Peptides and growth regulatory factors in bone. *Rheum Dis N Amer.*, North America, v. 20, p.577-587, 1994.

MURRAY, G.; HOLDEN, R.; ROSCHLAU, W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *Am J Surg.*, Amsterdam, v. 3, n. 93, p. 385-387, Mar.1957.

NADE, S. Stimulating osteogenesis. *Injury.*, Amsterdam, v. 9, n. 25, p. 577-583, Nov.1994.

NAKASHIMA, M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. *Arch Oral Biol.*, Oxford, v. 7, n. 35, p. 493-497, 1990a.

_____. An ultrastructural study of the differentiation of mesenchymal cells in implants of allogeneic dentine matrix on the amputated dental pulp of the dog. *Arch Oral Biol.*, Oxford, v. 4, n. 35, p. 277-281, 1990.

_____. Mitogenic and dentin-inductive effects of crude bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*, St. Louis, v. 4, n. 73, p. 484-489, Apr.1992.

_____. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol.*, Oxford, v. 12, n. 39,

p. 1085-1089, Dec. 1994.

NEUFELD, G. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. The FASEB Journal, Washington, v. 13, n. 1, p.9-22, Jan. 1999.

NISSEN, N. N. et al. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. Am J Pathol, Philadelphia, v. 152, n. 6, p. 1445-1452, Jun. 1998.

NOCITI FH, J. R. et al. Absorbable versus nonabsorbable membranes and bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs. Part I. A clinical investigation. Clin Oral Implants Res., Philadelphia, v. 2, n. 12, p. 115-120, Apr. 2001.

NÖR, J. E. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. Am J Pathol, Philadelphia, v. 154, n. 2, p. 375-384, Feb. 1999.

NYMAN, S. et al. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. J Clin Periodontol., Copenhagen, v. 3, n. 9, p. 257-265, May. 1982.

OGISO, B. et al. Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells *in vitro*. J Cell Physiol., New York, v. 3, n. 146, p. 442-450, Mar. 1991.

OKAMOTO, T. et al. Implante homogêneo de matriz dentinária conservada em glicerina a 98%: estudo microscópico em tecido conjuntivo subcutâneo de rato. Revista da Faculdade de Ciências Odontológicas de Marília, Marília, v. 2, n. 2 1999. Disponível em: <<http://www.unimar.br/publicacoes/revistafco/paginas/pag5.htm>>. Acesso em: 16 fev. 2009.

PALLESEN, L. et al. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. Int J Oral Maxillofac Implants., Pasadena, v. 4, n. 17, p. 498-506, Jul-Aug. 2002.

PARK, J. E.; KELLER, G. A.; FERRARA, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix- bound VEGF. Mol Biol Cell, Bethesda, v. 4, n. 12, p. 1317- 1326, Dec. 1993.

PARK, J. E. et al. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity, *in vitro* and *in vivo*, and high affinity bind Flt-1 but not Flk-1/ KDR. J Biol Chem, Baltimore, v. 269, n. 41, p. 25646-25654, Oct. 1994.

PFEILSCHIFTER, J.; BONEWALD, L.; MUNDY, G. R. Characterization of the latent transforming growth factor beta complex in bone. *J Bone Miner Res.*, Toronto, v. 1, n. 5, p. 49-58, Jan. 1990.

POLVERINI, P. J. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, Boca Raton, v. 6, n. 3, p. 230-247, 1995.

_____. Angiogenesis in health and disease: insights into mechanisms and therapeutic opportunities. *J Dent Educ*, Washington, v. 66, n. 8, p. 962- 975, Aug. 2002.

RABIE, A. B. et al. The effect of demineralized bone matrix on the healing of intramembranous bone grafts in rabbit skull defects. *J Dent Res*. Washington, v. 4, n. 75, p. 1045-1051, Apr. 1996.

RABIE, A. B.; SHUM, L.; CHAYANUPATKUL, A. COLÁGENO TIPO II and bone formation in the glenoid fossa during forward mandibular positioning. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, St. Louis, v. 122, p. 202-209, 2002.

RAVAL, P. et al. Expression of bone morphogenetic proteins by osteoinductive and non-osteoinductive human. *J Dent Res.*, Washington, v. 75, n. 7, p. 1518-1523, 1996.

REDDI A, H. Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. *Coll Relat Res*. Philadelphia, v. 2, n. 1, p. 209-226, Feb. 1981.

RIBATTI, D. The crucial role of vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br. J Haematol*, Oxford, v. 128, n. 3, p. 303-309, Feb. 2004.

RIPAMONTI, U.; REDDI, A. H. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetics proteins. *J Periodont Res.*, Copenhagen, v. 29, p. 225-235, 1994.

ROBERTS, A. B. et al. Sporn MB. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci, USA*, v. 1, n. 82, p. 119-123, Jan. 1985.

ROSEN, V.; THIES, R. S. The cellular and molecular basis of bone formation and repair. Heidelberg: Springer, c1995.

ROSENSTEIN, J. M. et al. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci, United States of America, v. 95, n. 12, p. 7086- 7091, Jun. 1998.

SATO, N. Guided bone regeneration. W. Periodontal surgery. A clinical atlas. Quintessence: Publishing Co. Inc. Warsaw, 2000.

SCHENK, R. K. Bone regeneration biologic basis. In: BUSER, D.; DAHLIN, C., SCHENK, R. K. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence books; 1994. p. 49-100.

SCHLIEPHAKE, H. et al. Alveolar ridge repair using resorbable membranes and autogenous bone particles with simultaneous placement of implants: an experimental pilot study in dogs. Int J Oral Maxillofac Implants. , Pasadena, v. 3, n. 15, p. 364-373, May-Jun. 2000.

SCHMITZ, J. P. et al. Characterization of rat calvarial nonunion defects. Acta Anat (Basel)., Basel , v. 3, n. 138, p. 185-192, 1990.

SENGER, D. R. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation os ascites fluid. Science, Washington, v. 219, n. 4587, p. 983-985, Feb. 1983.

_____. Purification and NH₂- terminal amino acid sequence of guinea pig-tumor-secreted vascular permeability factor. Cancer Res, Philadelphia, v. 50, n. 6, p. 1774-1778, Mar. 1990.

SHALABAY, F. et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature, London, v. 376, n. 6535, p. 62-66, Jul. 1995.

SHWEIKI, D. et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature, London, v. 359, n. 6396, p. 843-845, Oct. 1992

SIMÕES, M. R. G. Aplicação de enxertos ósseos liofilizados. 1997. Monografia - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1997.

SIMONS, M.; WARE, J. A. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. Nature Reviews, London, v. 2, p. 1-9, Nov. 2003.

SMILER, D. G. et al. Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. Dent Clin North Am., Philadelphia, v. 1, n. 36, p. 187-188, Jan. 1992.

SOKER, S. et al. Neuropilin- 1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell, Massachusetts*, v. 92, n. 6, p. 735-745, Mar. 1998.

SOVIEIRO, V. M.; SOUZA, I. P. R.; GAMA, F. V. A. Proteínas dentinogênicas: uma nova tendência para realização de pulpotomia. *Rev Bras Odontol., São Paulo*, v. 6, n. 55, p. 314, 1998.

STRATES, B. S.; STOCK, A. J.; CONNOLLY, J. F. Skeletal repair in the aged: a preliminary study in rabbits. *Am J Med Sci., Virginia*, v, 4, n. 296, p. 266-269, Oct. 1988.

SZACHOWICZ, E. H. Facial bone wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am., Philadelphia*, v. 5, n. 28, p. 865-880, Oct. 1995.

TAMMELA, T. et al. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res, London*, v. 65, n. 3, p. 550- 563, Feb. 2005.

TEN CATE, A. R. Formação e destruição dos tecidos duros. In: TEN CATE, A. R. *Histologia Bucal: desenvolvimento, estrutura e função*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.68-75.

TEZUKA, K. et al. Identification of osteopontin in isolated rabbit osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun., Cambridge*, v. 186, p. 911-917, 1992.

TISCHER, E. The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem, Baltimore*, v. 266, n. 18, p. 11947- 11954, Jun. 1991.

TOMANEK, R. J.; SCHATTEMAN, G. C. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat. Rec, Philadelphia*, v. 261, n. 3, p.126-135, Jun. 2000.

TORRES, C. R. G. et al. Materiais ósseoindutores para o complexo dentino pulpar. *Rev Fac Odontol Sao Jose dos Campos, São José dos Campos*, v. 1, n. 3, p. 88-96, 2000.

TUOMINEN, T. et al. Bovine bone implant with bovine bone morphogenetic protein in healing a canine ulnar defect. *International Orthopaedics, Berlin*, v. 25, n. 1, p.5-8, 2001.

TZIAFAS, D. et al. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after *in vivo* implantation of dentine matrix components. *Arch Oral Biol., Oxford*, v. 10, n. 40, p. 883-893, Oct. 1995.

URIST, M. R. Bone Formation by Autoinduction. *Science, Washington*, n. 150, p. 893-899, 1965.

URIST, M. R.; DELANGE, R. J.; FINERMAN, G. A. Bone cell differentiation and growth factors. *Science, Washington*, v. 220, p. 680-686, 1983.

URIST, M. R.; STRATES, B. S. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res., Washington*, v. 6, n. 50, p. 1392-1406, Nov.-Dec. 1971.

VEIS, A.; SIRES, B.; CLOHIS, Y. J. A search for the osteogenic factor in dentin. Rat incisor dentin contains a factor stimulating rat muscle cells *in vitro* to incorporate sulfate into an altered proteoglycan. *Connect Tissue Res., London*, v. 2-3, n. 23, p. 137-144, 1989.

VICENTI, V. et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation, Texas*, v. 93, n. 8, p. 1493-1495, Apr. 1996.

WANG, J. et al. Expression of bone microsomal casein kinase II, bone sialoprotein, and osteopontin during the repair of calvarial defects. *J Bone Miner Res., Toronto*, v. 22, n. 6, p. 621-628, 1998.

WOJTOWICZ, A. et al. Odtworzenie kości wyrostka zębodołowego szczęki w leczeniu przedimplantologicznym z wykorzystaniem masy p3ytkowej i Bio-Oss – opis przypadku. *Prot. Stomat., Washington*, v. 51, p. 274-279, 2001.

YANCOPOULOS, G. D. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature, London*, v. 407, n. 6801, p. 242-248, Sept. 2000.

YOSHIDA, K. et al. Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg., Edinburgh*, v. 26, p. 112-115, Apr. 1998.

ANEXO

Ofício CEEA-029/2009

Uberaba, 30 de março de 2009

Ilmo. Prof.

José Bento Alves

Assunto: Encaminha parecer nº 022/2009, sobre o protocolo de pesquisa "Expressão do vegf após utilização de matriz dentinária humana desmineralizada em alvéolos de ratos: análise imunohistoquímica e histoquantitativa." – Processo 022/2009.

Prezado Professor.

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à avaliação do CEEA-UNIUBE na reunião do dia 20/03/2009, sendo **aprovado**.

Atenciosamente,



Prof. Juliana Trindade Clemente Napimoga
Coordenadora do CEEA-UNIUBE