

# **UNIVERSIDADE DE UBERABA**

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

**LAÍS YUMI SOUZA NAKAO**

**EXPRESSÃO DO COLÁGENO TIPO III APÓS UTILIZAÇÃO DE MATRIZ  
DENTINÁRIA HUMANA DESMINERALIZADA EM ALVÉOLOS DE RATOS:  
ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA**

UBERABA, MG  
2014

**LAÍS YUMI SOUZA NAKAO**

**EXPRESSÃO DO COLÁGENO TIPO III APÓS UTILIZAÇÃO DE MATRIZ  
DENTINÁRIA HUMANA DESMINERALIZADA EM ALVÉOLOS DE RATOS:  
ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elisângela Ribeiro da Silva

UBERABA, MG  
2014

LAÍS YUMI SOUZA NAKAO

EXPRESSÃO DO COLÁGENO TIPO III APÓS UTILIZAÇÃO DE MATRIZ  
DENTINÁRIA HUMANA DESMINERALIZADA EM ALVÉOLOS DE RATOS:  
ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

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

Linha de pesquisa: Área de concentração  
Biopatologia.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Álvaro Ribeiro Barale  
Universidade Federal de Uberlândia -  
UFU

---

Profa. Dra. Elisângela Ribeiro da Silva  
Universidade de Uberaba - UNIUBE

---

Profa. Dra. Elizabeth Uber Bucek  
Universidade de Uberaba - UNIUBE

*Dedico carinhosamente este trabalho,*

*À DEUS razão do meu viver com alegria!!*

*Aos meus amados pais,*

*À minha querida irmã,*

*À minha avó, mãe do coração.*

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, autor da vida, sem Ele tenho a plena convicção de que este capítulo da minha história não teria sido escrito com tamanha perfeição.

À minha família, Nelson Hiroshi Nakao (pai), Maria de Fátima Gonçalves Souza Nakao (mãe) e Lívia Yumi Souza Nakao (irmã), pelo amor, dedicação em me educar e acompanhar nesta trajetória. Obrigada por me ensinarem os gestos mais simples para a arte de viver.

À minha Avó Zanira por abrir as portas de sua casa acolhedora, participar de vitórias, dificuldades e estar sempre presente na minha vida.

À minha família do coração que me ensinou que Deus prepara um caminho no deserto.

À minha orientadora Prof. Dra. Elisângela Ribeiro da Silva, pela confiança, apoio, dedicação, competência e sabedoria com que teve para direcionar-me nesta etapa de minha vida. Deixo minha gratidão e respeito pelos seus ensinamentos. Muito obrigada por me conceder o privilégio de ser sua orientada e possibilitar alcançar meus objetivos.

Ao Prof. Dr. José Bento Alves pela orientação, apoio e pelos ensinamentos científicos passados.

À Polyanna Miranda Alves da UFTM pela amizade e pelo compartilhar de seus conhecimentos e experiências.

À Universidade de Uberaba e aos professores do Programa que me possibilitaram aprender e desenvolver habilidades.

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa da Universidade de Uberaba pelo auxílio nos experimentos.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro e à Prof. Dra. Denise Bertulucci por possibilitar aprender e complementar os conhecimentos técnico-científicos.

Aos tios Clarindo e Catarina por me receberem em sua casa sempre com um sorriso no rosto, por me proporcionar momentos inesquecíveis de alegria.

As famílias Batista, Santos, Souza e Gonçalves por me acompanhar e colaborar nesta caminhada.

As amigas, Andrea Cristina da Costa, Cristina Menezes Gattoni e Lucimar de Paiva Gonçalves, pela amizade e por demonstrarem a importância de que a humildade e simplicidade são quesitos fundamentais para a vida.

### **A sabedoria de Deus**

*Um homem que está preparando o terreno para semear trigo não gasta todo o seu tempo arando a terra, cavando e remexendo nela. Depois de ter aplanado a terra, ele semeia o endro e o cominho e planta o trigo, a cevada e outros cereais nos lugares certos. Ele faz tudo direito porque Deus o ensinou. E no tempo da colheita ele não usa um instrumento pesado para debulhar os grãos de endro e de cominho; pelo contrário, ele usa varas pequenas e leves. Quando malha o trigo, ele não continua malhando até quebrar os grãos. Ele sabe passar a carreta por cima das espigas sem esmagar os grãos. Esse conhecimento também vem do SENHOR Todo-Poderoso. Os seus planos são maravilhosos, e ele é sábio em tudo o que faz.*

**Isaías 28:24 a 29**

## RESUMO

O processo de reparo ósseo é mediado por uma cascata de eventos moleculares. Neste trabalho foi avaliada a presença e distribuição de colágeno tipo III em feridas alveolares de ratos, preenchidas com matriz dentinária humana desmineralizada (MDHD), foram utilizados 32 ratos, machos, linhagem *Wistar* com aproximadamente 250 gramas. O procedimento consistiu da extração dos segundos molares maxilares esquerdo e direito, e do preenchimento dos alvéolos esquerdos com MDHD e os alvéolos direitos com coágulo, utilizados como controle. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo I, grupos II, III e IV compostos por 8 animais cada, submetidos à eutanásia respectivamente, aos 3, 7, 14 e 21 dias após procedimentos cirúrgicos. As regiões onde foram realizados os experimentos foram removidas, examinadas, e em seguida processadas para análise em microscopia de luz. Os resultados demonstraram que a expressão de colágeno tipo III foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) aos 3 e 7 dias no lado experimental, apresentando um pico aos 7 dias, o que sugere a atividade osteoindutora do material. A MDHD também apresentou capacidade osteocondutora durante o reparo ósseo, fato demonstrado pela sua íntima relação com células osteogênicas. Dessa forma, a MDHD pode ser um eficiente biomaterial para o reparo ósseo.

**Palavras-chave:** Reparo ósseo, Fator de crescimento, Osteocondução. Osteoindução.

## ABSTRACT

The bone repair process is mediated by a series of molecular events, involving growth factors. This work evaluated the presence and distribution of type III collagen in rat alveolar wound filled with demineralized human dentin matrix (DHDM), thirty two male *Wistar* rats weighing approximately 250 g were used. The procedure, the second molar left and right jaws were extracted and the alveolus on the left filled with DHDM and the right ones were used as controls. The animals were divided into four experimental groups: group I, groups II, III and IV consisting of eight animals each, sacrificed respectively at 3, 7, 14, 21 days after surgical procedures. The area where the experiments were made were removed, examined and processed for analysis by microscopy. The results demonstrated that the expression of collagen type III was significantly higher ( $p < 0.05$ ) of 3 and 7 days, with a higher growth on the seventh day, which showed osteoinductive activity of the material. The DHDM also presented osteoconductive during bone repair, as demonstrated by its close relationship with osteogenic cells. Further showed that DHDM may represent as efficient biomaterial for bone repair.

**Keywords:** Bone repair, Growth factor, Osteoconductive, Osteoinduction.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BMPs	Bone morphogenetic proteins - Proteína morfogenética óssea
BMP-2	Bone morphogenetic proteins 1 - Proteína morfogenética óssea 2
BMP-4	Bone morphogenetic proteins 2 - Proteína morfogenética óssea 4
DAB	Diaminobenzidina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico - Epidermal growth factor
FC	Fator de crescimento
FGF	Fibroblast growth factor - Fator de crescimento do fibroblasto
FGF-2	Fibroblast growth factor - Fator de crescimento do fibroblasto 2
IGF	Insulin-like growth fator - Fator de crescimento insulínico
IGF-1	Insulin-like growth factor 1 - Fator de crescimento insulínico 1
IGF-2	Insulin-like growth factor 2 - Fator de crescimento insulínico 2
LP	Ligamento periodontal
MDHD	Matriz dentinária humana desmineralizada
MEC	Matriz extracelular
NCPs	Proteínas não colágenas
OC	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
PDGF	Platelet-derived growth fator - Fator de crescimento derivado de plaqueta
RER	Retículo endoplasmático rugoso
ROG	Reparo ósseo guiado
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta - Fator transformador beta
VEGF	Vascular endothelial growth factor - Fator de crescimento vascular endotelial

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Organograma demonstrando os grupos experimentais..... 15
- Figura 2.** Reticulo milimetrado com o propósito de quantificar a imunomarcação dentro dos períodos considerados. (40x)..... 19
- Figura 3.** Lado experimental – Corte histológico mostrando a presença de MDHD dentro do alvéolo dentário esquerdo (seta ), 3 dias. Picrosirius (10 x)..... 20
- Figuras 4. A:** Lado experimental – Corte longitudinal do alvéolo esquerdo apresentando a MDHD envolvida por tecido conjuntivo frouxo (seta amarela). **B:** Lado controle – Corte longitudinal do alvéolo direito apresentando sequestro ósseo (seta vermelha): 7 dias. Picrosirius (20 x). **C:** MDHD incorporada ao tecido conjuntivo, 7 dias. Picrosirius (40x). **D:** Células dentro dos túbulos dentinários e envolvendo as partículas de MDHD, demonstrando a capacidade osteocondutora e quimiotática desse material. Imunohistoquímica (40x), 7 dias..... 21
- Figura 5. A:** Experimental – Corte longitudinal do alvéolo esquerdo mostrando menor distância entre o tecido ósseo e o epitélio que recobre o alvéolo (linha). **B:** Controle – Corte longitudinal do alvéolo mostrando maior quantidade de tecido conjuntivo frouxo dentro do alvéolo, 14 dias. Picrosirius (20x)..... 22
- Figura 6. A:** Experimental: Corte longitudinal do alvéolo esquerdo. **B – Controle:** corte longitudinal do alvéolo direito. Ambas coradas em picrosirius (40x). **C:** MDHD

incorporada ao tecido neoformado, 21  
dias..... 23

**Figura 7. A:** Lado experimental e **B.** Lado controle. Grupo II (7 dias). Marcação intensa para Colágeno tipo III, principalmente para o lado experimental (setas vermelhas), o que sugere que a MDHD favorece a expressão de colágeno tipo III durante o reparo ósseo.

(20X)..... 24

**Figura 8.** Resultados da imunomarcação para todos os grupos..... 24

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 TECIDO ÓSSEO.....	2
1.2 FORMAÇÃO, REMODELAÇÃO E REPARO ÓSSEO.....	4
1.3 MOLÉCULAS INDICADORAS DE REPARO ÓSSEO.....	6
1.4 COLÁGENO.....	8
1.5 MATRIZ DENTINÁRIA HUMANA DESMINERALIZADA COMO MATERIAL BIOLÓGICO DE ENXERTO ÓSSEO.....	9
<b>2.OBJETIVO GERAL</b> .....	12
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	13
3.1. SELEÇÃO DE ANIMAIS.....	13
3.2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	13
3.3 MATRIZ DENTINÁRIA HUMANA DESMINERALIZADA.....	14
3.4 DISTRIBUIÇÕES DOS ANIMAIS.....	14
3.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES.....	16
3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA.....	16
3.7 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	17
3.8 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	18
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
<b>4.RESULTADOS</b> .....	20
4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA.....	20
4.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E HISTOMORFOMÉTRICA.....	23
<b>5.DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>6.CONCLUSÃO</b> .....	30
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
<b>ANEXOS</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

Muitos procedimentos invasivos são limitados pela presença de injúrias ósseas tais como traumas, neoplasias, infecções, anomalias do desenvolvimento, deformidades, tumores e outras condições patológicas que levam a significativas perdas ósseas (Dumas *et al.*, 2006). Para tratar estas injúrias, abordagens terapêuticas são desenvolvidas a fim de acelerar, melhorar, diminuir o período de maturação do tecido ósseo e restabelecer perdas ósseas que não se regeneram sozinhas. Assim, o desenvolvimento de biomateriais de enxerto ósseo poderia proporcionar condições adequadas para a recuperação e reconstrução óssea (Schroeder e Mosheiff, 2011).

Diversos biomateriais podem ser utilizados como enxerto, dentre eles o enxerto autógeno, alógeno, xenógeno além dos materiais sintéticos. O enxerto autógeno é o material de escolha, pois tem pouca possibilidade de provocar resposta imune e pode conter propriedades de osteoindução e osteocondução. No entanto, este enxerto é obtido a partir de uma área doadora, sendo necessárias cirurgias adicionais, o que resulta em maior morbidade pós-operatória e enfraquecimento dos sítios doadores (Almeida e Alves, 2007).

A utilização da dentina humana como um material de enxerto originou-se da observação clínica e experimental de partículas de dentina, deixadas na loja cirúrgica de modo acidental ou intencional, que serviram de foco estimulador da osteogênese (Kleinheinz *et al.*, 2005).

A dentina é um tecido cuja composição, modo de formação e características são semelhantes ao tecido ósseo. Há estudos que relatam que a dentina humana desmineralizada (MDHD) é uma alternativa para a indução do reparo ósseo, por ser biocompatível e apresentar capacidade de estimular a angiogênese e formação óssea (Dimitriou *et al.*, 2011).

Nesse contexto, o presente estudo avaliou a MDHD como biomaterial de enxerto e sua influência na expressão de colágeno tipo III, marcador importante para o reparo ósseo, pois pode ter grande relevância, sobretudo em diversas áreas onde

a utilização de materiais de enxerto é necessária para se restabelecer a função e estética.

## 1.1 TECIDO ÓSSEO

Dotado de alto metabolismo e capacidade de regeneração, o tecido ósseo é classificado como tecido conjuntivo de suporte, formado por um conjunto de células e matriz extracelular (MEC) mineralizada que representa o principal constituinte do esqueleto, protege órgãos vitais e funciona como reserva de moléculas envolvidas na homeostase (Junqueira *et al.*, 2000).

A fase inorgânica da matriz óssea é composta por cristais de hidroxiapatita, sendo o cálcio e o fósforo os seus principais componentes. A porção orgânica deste tecido é formada por proteínas colágenas e não colágenas, sendo o colágeno tipo I, seu principal componente. As proteínas não colágenas (NCPs) são divididas em várias categorias, incluindo proteoglicanos e glicoproteínas, com atividades potenciais de adesão celular. Essas proteínas ainda não foram bem elucidadas, mas é possível que tenham várias funções como a regulação da deposição mineral e regulação da atividade das células ósseas (Clarke, 2008).

Diferentes células são responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção da arquitetura óssea. Essas células possuem morfologia distinta, de acordo com os estágios de maturação e origem, sendo os osteoblastos e osteócitos pertencentes à mesma linhagem mesenquimal, enquanto os osteoclastos derivam de monócitos do sangue circulante (Aarestrup, 2012).

As células osteoprogenitoras originam os osteoblastos, e encontram-se recobrendo as superfícies ósseas. Estas células exibem escassas organelas de síntese e secreção de proteínas, e formam uma contínua camada de células interconectadas, capazes de manter a homeostase e regulando a concentração plasmática de cálcio, por mecanismos parcialmente independentes daqueles relacionados à remodelação óssea, sendo consideradas como sítio primário de troca de íons entre sangue e tecido ósseo (Nanci, 2008).

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal, mononucleadas, de núcleo esférico e citoplasma basófilo, responsáveis pela síntese da matriz orgânica do tecido, denominada osteóide, a qual funciona como arcabouço para deposição de

cristais de hidroxiapatita (Cardaropoli, Araujo e Lindhe, 2003). Essas células são capazes de concentrar fosfato e cálcio, participando da mineralização da MEC, e após a mineralização do tecido ficam aprisionadas na matriz, tornando-se osteócitos (Kumar, 2011).

Constituinte do sistema mononuclear fagocitário, os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas, de citoplasma granuloso e superfície ativa voltada para a matriz óssea, onde tem lugar a reabsorção do tecido. Essas células secretam ácidos, colagenase e outras hidrolases, capazes de digerir a matriz orgânica e liberar os cristais de sais de cálcio, sob a coordenação de citocinas e hormônios como a calcitonina e o paratormônio (Raggatt e Partridge, 2010).

Anatomicamente o tecido ósseo pode ser classificado como compacto ou cortical, localizado nas regiões externas dos ossos, e trabecular ou esponjoso, caracterizado por um arranjo que delimita pequenas cavidades preenchidas por medula óssea. As superfícies internas e externas são revestidas por uma membrana conjuntiva, rica nas células osteoprogenitoras, e são denominadas respectivamente, endóstio e o perióstio (Junqueira *et al.*, 2000).

O endóstio proporciona a separação física entre a superfície óssea e a medula (Nanci, 2008). O perióstio possui duas camadas, sendo a externa composta de tecido conjuntivo irregular e denso, e a interna, em contato com o tecido ósseo, composta de células osteoprogenitoras e rico suprimento microvascular (Katchburian e Histologia, 2004).

Histologicamente o tecido ósseo pode ser classificado em imaturo ou primário e maduro ou secundário. Apesar de possuírem as mesmas células e constituintes da matriz, apresentam disposição diferente das fibras colágenas. O tecido imaturo possui fibras colágenas desorganizadas, menor quantidade de cristais de hidroxiapatita e maior porcentagem de osteócitos (Junqueira *et al.*, 2000; Kumar, 2011). O tecido ósseo maduro também conhecido como haversiano ou lamelar, é altamente organizado, forte e bem mineralizado, surgindo em substituição ao tecido imaturo formado imediatamente após fraturas, osteotomias e implantes ósseos apresenta fibras colágenas organizadas em lamelas paralelas ou concêntricas, formando os sistemas de Harvers (Clarke, 2008; Kumar, 2011).

## 1.2 FORMAÇÃO, REMODELAÇÃO E REPARO ÓSSEO

Sabe-se que a reparação óssea segue caminhos ou etapas muito similares àquelas vistas durante a remodelação e formação embriogênica desse tecido, sugerindo que mecanismos moleculares e celulares sejam semelhantes em ambos processos (Alves *et al.*, 2009).

A formação óssea pode se dar por dois processos distintos: a ossificação endocondral e intramembranosa. O primeiro processo envolve a diferenciação local de células progenitoras em condrócitos, que sintetizam uma matriz de cartilagem hialina. A cartilagem é então substituída por osso, por meio de uma sequência de acontecimentos que compreende a degradação da cartilagem, a angiogênese e vasculogênese, diferenciação de osteoblastos e formação óssea (Shapiro, 2008). A formação intramembranosa envolve a diferenciação de células progenitoras diretamente em osteoblastos, sem o intermédio cartilaginosa. Ambas as vias levam a formação de osso imaturo (*wovenbone*), que sofre remodelação em osso maduro lamelar. Estudos sobre osteogênese apontam fatores de crescimento com capacidade de estimular um ou mais passos envolvidos na formação óssea, tanto endocondral quanto intramembranosa (Simpson, Mills e Noble, 2006).

No alvéolo dentário, cavidade óssea deixada após as exodontias, observa-se apenas ossificação intramembranosa, sem presença de condrócitos ou formação de cartilagem (Kanyama *et al.*, 2003).

Mesmo na ausência de injúrias, o tecido ósseo apresenta-se em constante modificação, na intenção de preservar o tamanho, forma e a integridade estrutural do esqueleto, além de regular a homeostase mineral (Clarke, 2008). Esse processo, denominado remodelação, é fortemente coordenado, exigindo a atividade sincronizada de vários participantes celulares para garantir que a reabsorção e formação óssea ocorram sequencialmente, de forma discreta na superfície do osso cortical e medular na mesma localização anatômica, preservando assim a massa óssea (Raggatt e Partridge, 2010; Trouvin e Goëb, 2010).

De acordo com Senta e colaboradores (2009) o ciclo celular de remodelação óssea pode ser dividido em cinco eventos: (1) quiescência; (2) recrutamento de pré-osteoclastos e diferenciação osteoclástica; (3) reabsorção óssea pelos osteoclastos; (4) recrutamento de pré-osteoblastos e diferenciação osteoblástica; (5) formação óssea.

O fenômeno de regeneração óssea acontece após injúrias, sendo caracterizado por ações integradas de diferentes células que atuam em fases sequenciais de inflamação, migração, diferenciação e proliferação de células osteogênicas (Raggatt e Partridge, 2010), síntese de MEC, mineralização do osteóide, maturação e remodelação óssea. (Lalani *et al.*, 2005).

O reparo alveolar seguido da exodontia foi estudado em diferentes modelos animais (Cardaropoli, Araujo e Lindhe, 2003; Sato e Takeda, 2007; Alves *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013), e muitos estudos demonstraram que esse processo de reparo passa por uma série de eventos, tais como (1) formação e maturação do coágulo sanguíneo; (2) infiltração de fibroblastos substituindo o coágulo; (3) estabelecimento de uma matriz provisional que permite a formação de tecido ósseo (Cardaropoli, Araujo e Lindhe, 2003).

O processo de reparo do alvéolo dental parece ser histologicamente similar àquele observado em outros sítios do esqueleto, no entanto, o ambiente oral abriga grande número de espécies microbianas e o reparo ósseo, em um ambiente contaminado e pode apresentar uma situação diferente daquela encontrada em outros sítios ósseos. (Lalani *et al.*, 2005).

Um componente essencial ao reparo ósseo, que sucede a extração dental, é o adequado suprimento sanguíneo. Durante as fases iniciais, o brotamento de capilares angiogênicos invade o coágulo e em poucos dias, se organizam em uma rede microvascular formando parte do tecido de granulação (Aguirre *et al.*, 2010).

Para que ocorra o início do reparo, o coágulo sanguíneo, os restos celulares e a matriz devem ser removidos pelos macrófagos (Junqueira *et al.*, 2000). Sincronicamente à formação do coágulo, o tecido próximo à injúria se necrosa. Esse tecido necrótico estimula uma resposta inflamatória intensa, caracterizada por vasodilatação, exsudação do plasma, leucócitos e células mesenquimais (Amadei *et al.*, 2006).

O coágulo, passo fundamental para as fases subsequentes do reparo, é progressivamente reabsorvido e invadido por fibroblastos derivados do ligamento periodontal (LP), que proliferam ativamente, formando um tecido conjuntivo imaturo. Posteriormente, ocorre a diferenciação de osteoblastos, responsáveis por produzir novo tecido ósseo durante o reparo alveolar (Teófilo, Brentegani e Lamano Carvalho, 2001). E as fibras colágenas inicialmente depositadas pelos fibroblastos, formam uma trama preliminar sobre a qual ocorre a deposição de osso neoformado

(Shyng *et al.*, 1999). Já os osteoclastos atuam na remodelação óssea das margens do alvéolo e dos septos interradiculares remanescentes, presentes após a cirurgia (Lindhe, 2010). Por fim, os eventos de reparo alveolar levam ao preenchimento do alvéolo com trabéculas ósseas (Devlin e Sloan, 2002).

Após dez dias da exodontia em ratos, os alvéolos já se apresentam com grande quantidade de trabéculas ósseas, embora existam relatos de que o alvéolo encontra-se, neste período, ocupado por grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo (Teófilo, Brentegani e Lamano Carvalho, 2001). Após quinze dias de reparo, a crista óssea está completamente remodelada e recoberta com epitélio da mucosa gengival (Zied *et al.*, 2005). Ao final da terceira semana de reparo, o alvéolo é preenchido por uma rede de trabéculas ósseas espessas, circundando espaços medulares contendo tecido conjuntivo frouxo (Teófilo, Brentegani e Lamano Carvalho, 2001). Apesar do preenchimento do alvéolo com trabéculas ósseas espessas e bem definidas, aos vinte e quatro dias, a densidade óssea alveolar máxima é alcançada apenas em torno do trigésimo dia pós-operatório (Carvalho, Bombonato e Brentegani, 1997).

### 1.3 MOLÉCULAS INDICADORAS DE REPARO ÓSSEO

O tempo de duração do reparo ósseo depende de alguns fatores, como o tipo de osso envolvido, a idade do indivíduo, o estado de saúde geral e nutricional, a intensidade do trauma, presença ou não de forças mecânicas, imobilização e ausência de infecção. Essa capacidade de regeneração óssea é dependente de muitas moléculas, envolvidas em todas as fases do reparo (Hing *et al.*, 2004).

Os fatores de crescimento (FC), bem como a expressão de algumas macromoléculas da MEC como colágeno, fibronectina, osteopontina (OPN), osteocalcina (OC), dentre outras, têm sido referenciados como moléculas indicativas do processo de reparo ósseo (Stein *et al.*, 2005).

Fatores de crescimento como fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), são expressos de modo sequencial nos processos de cicatrização tecidual, e provavelmente estão envolvidos na sinalização, controle e indução durante o

processo de reparo ósseo. Graças à íntima relação entre a angiogênese e a osteogênese, a formação de brotos capilares antecede a formação de tecido ósseo, e o VEGF é um dos mais importantes fatores de crescimento envolvidos na angiogênese. A expressão do VEGF é estimulada por citocinas e fatores de crescimento, tais como o PDGF e TGF- $\beta$  (Almeida e Alves, 2007). Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fator de crescimento insulínico (IGF) também estão presentes no reparo ósseo, e funcionam em conjunto durante formação óssea e processo de reparação de fraturas (Lee e Shin, 2007).

De fato, o reparo ósseo guiado (ROG) mediado pela aplicação de FC tem demonstrado a inter-relação entre as moléculas envolvidas no reparo (Gerard *et al.*, 2006; Anitua *et al.*, 2007; Mooren *et al.*, 2007; Ranly *et al.*, 2007; Da Silva e Alves, 2008). Nesse sentido, osteopontina, osteocalcina, osteonectina, fibronectina e colágeno tipo III são marcadores moleculares do reparo ósseo (Devlin; Sloan, 2002).

A OPN é uma proteína glicosilada, fosforilada e sulfatada, existente tanto intra como extracelular, podendo interagir com vários receptores, incluindo as integrinas (Gao *et al.*, 2006). É produzida e secretada por osteoblastos e osteoclastos, e sua expressão coincide com a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas durante a formação do tecido ósseo (Perrien *et al.*, 2002). Sendo, portanto, considerada um marcador de maturação de células tronco osteogênicas (Shyng *et al.*, 1999). Essa molécula promove a adesão e quimiotaxia, tanto para osteoblastos, quanto para osteoclastos (Bouletreau, Warren e Longaker, 2002; Perrien *et al.*, 2002). Outro aspecto da estrutura da OPN é seu potencial de interação com outras macromoléculas da matriz extracelular, tais como o colágeno (Ritter, Farach-Carson e Butler, 1992), e pode ligar-se também ao cálcio e à fibronectina (Nemir, Devouge e Mukherjee, 1989). Estas considerações nos levam a presumir que a OPN interage com outras proteínas do osso para formar uma estrutura supramolecular (Ritter, Farach-Carson e Butler, 1992), sendo essencial para a resistência do tecido.

A OC é derivada da síntese, tanto de osteoblastos quanto de osteoclastos. Dessa maneira, também inibe a mineralização, atuando na remodelação óssea, em vez de ser um marcador específico de formação (Clarke, 2008).

A osteonectina é a proteína não colágena mais prevalente no osso, representando aproximadamente 2% do total das proteínas responsáveis pelo desenvolvimento desse tecido. Sua função é regular o diâmetro das fibras colágenas, além de ser solicitada para assumir o crescimento e/ou a proliferação

dos osteoblastos e mineralização da matriz (Clarke, 2008). Essa proteína funciona como elo para minerais do osso e o colágeno, pois se liga seletivamente com a hidroxiapatita e a proteína (Termine *et al.*, 1981).

A fibronectina é uma glicoproteína multifuncional, expressa por variedades celulares, que possui papel importante em muitas funções celulares como a adesão, migração, diferenciação, entre outras (Schmidinger *et al.*, 2003; Clarke, 2008).

Os colágenos são os principais componentes da matriz extracelular do osso maduro, e parecem desempenhar papel crítico durante a cicatrização óssea, por facilitar a formação de espículas ósseas iniciais. A matriz extracelular do tecido ósseo é composta por 90% de proteínas colágenas (97% colágeno tipo I e 3% colágeno tipo V) e 10% de proteínas não colágenas. Estas e muitas outras proteínas são sintetizadas por osteoblastos, sendo fundamentais no processo de mineralização, ou seja, na ligação do colágeno aos cristais de hidroxiapatita (Tzaphlidou *et al.*, 2005).

Sendo assim, a formação MEC é necessária para o reparo do tecido ósseo, e as moléculas que compõem essa matriz são influenciadas pelos fatores de crescimento.

#### 1.4 COLÁGENO

Atualmente, na superfamília colágena há 28 tipos de moléculas, que funcionam como componente essencial do tecido estrutural. Os colágenos estão na MEC da pele, tendão, osso, cartilagem e outros tecidos, e devido a sua força de tração representam um material ideal para conferir regularidade a esses tecidos (Schiller e Huster, 2012).

A síntese de colágeno inicia-se nos ribossomos aderidos à membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER), que a partir deste momento desenvolvem com o intuito de entrar no retículo endotelial, formando o pró-colágeno e ao deixar a célula, o pró-colágeno torna-se colágeno (Clow, Cohen e Diegelmann, 1979). As moléculas dos colágenos tipos I, II e III são capazes de interagir entre si, associando-se de modo estável entre os resíduos de lisina.

Quando no tecido ocorre o rompimento da estrutura, faz-se necessário que o colágeno atue na reparação, restabelecendo tanto a estrutura como a função do tecido (Diegelmann, 2000).

Colágeno tipo III está presente temporariamente no desenvolvimento de fraturas mais frequentemente em regiões de deposição de matriz óssea inicial, sendo um elemento importante das fibras reticulares (Page, Hogg e Ashhurst, 1986). Sua função é de sustentar os órgãos expansíveis, como os vasos sanguíneos. No decorrer da fase inicial de reparo, há um aumento da porção desse tipo de colágeno, por esta razão sua importância na cicatrização da ferida cirúrgica (Diegelmann, 2000). A literatura relata a presença do colágeno tipo III na fase inicial do reparo ósseo, já presente em quantidades importantes após 10 horas do início deste processo (Barnes, Gordon e Macintyre, 1976; Clore, Cohen e Diegelmann, 1979).

Como principal constituinte para todos os tecidos conectivos intersticiais, o colágeno tipo III é fundamental no estabelecimento da integridade estrutural e fisiológica da regeneração dos tecidos (Ivanovski *et al.*, 2000). Previamente Tung e colaboradores (1985) relatam que o colágeno tipo III tem papel na regulação da composição da MEC, sendo um marcador para células e tecidos que ainda estão em processo de modificação e/ou diferenciação.

Mendes e colaboradores (2010) em um estudo sobre o reparo alveolar após exodontia em ratos observaram que após sete dias das extrações, o colágeno tipo III estava expresso nos alvéolos controles e tratados e à medida que expressão de colágeno tipo I aumentou no osteóide o colágeno tipo III diminuía de forma progressiva.

## 1.5 MATRIZ DENTINÁRIA HUMANA DESMINERALIZADA COMO MATERIAL BIOLÓGICO DE ENXERTO ÓSSEO

Os materiais de enxerto surgiram diante à necessidade de se restabelecer regiões de perda óssea, que não se regeneram sozinhas. A utilização favorece o processo de reparo do defeito ósseo, apresentando-se como um arcabouço e levando à neoformação óssea, através de mecanismos de osteoindução e osteocondução (Dimitriou *et al.*, 2011).

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 (Macedo *et al.*, 2007).

Já a osteocondução é tratada como a propriedade de produção de novo osso por proliferação e migração de células ósseas do leito receptor, através da superfície do enxerto, que age como um arcabouço (Gao *et al.*, 2006). O material é considerado osteocondutor quando permite a aposição de um novo tecido ósseo em sua superfície, a partir da presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras. A matriz do enxerto deve ser reabsorvida e simultaneamente substituída pelo tecido ósseo neoformado (Xiao *et al.*, 2004).

A aplicabilidade de materiais em organismos humanos depende de suas propriedades biológicas, como biocompatibilidade, estabilidade enzimática e hidrolítica, além de suas propriedades químicas, físicas e mecânicas (Dimitriou *et al.*, 2011).

Há relatos de que a dentina humana desmineralizada apresenta potencial osteocondutor, pois os túbulos se prolongam por toda a parede dentinária. (Almeida e Alves, 2007; Guo *et al.*, 2009).

Estudos demonstram que a dentina implantada apresenta no interior dos canalículos dentinários extensas áreas de reabsorção, assim como presença de células ao longo de extensas superfícies (Oliveira *et al.*, 2013). Este processo de reabsorção na superfície da matriz dentinária e no interior dos canalículos origina cavidades, que são preenchidas por células mesenquimais em propagação, além de brotos capilares. Após este evento, as células mesenquimais indiferenciadas transformam-se em células osteoprogenitoras e osteoblastos. Assim, a reabsorção do material implantado é essencial, pois antecede a fase osteogênica.

A MDHD quando presente no interior do alvéolo é envolvida por um tecido conjuntivo altamente vascularizado, sugerindo um efeito sobre a angiogênese. O VEGF é o fator mais importante da neovascularização, tanto fisiológica quanto patológica, pois estimula as células endoteliais na degradação da MEC, migração e formação de túbulos *in vitro* e *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 também é VEGF-dependente (Reis-Filho *et al.*, 2012). A expressão deste fator é estimulada por certas

citocinas e fatores de crescimento, tais como TGF- $\beta$  e PDGF (Fukuyama *et al.*, 2004).

Vários outros fatores de crescimento presentes no tecido ósseo foram também isolados da dentina, como fator de crescimento insulínico 1 (IGF-1), fator de crescimento insulínico 2 (IGF-2), proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) e proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4), com a finalidade de avaliar o potencial quimiotático e osteogênico da matriz dentinária (Oliveira *et al.*, 2013).

Um estudo demonstrou que preencher o alvéolo dental com a MDHD aumenta a formação óssea, o que pode ser correlacionado com o número avançado de células imunomarcadas por BMP-2 e BMP-4. O estudo ao identificar uma rede de fibras colágenas perto da matriz, sugere que a degradação da MDHD e, fatores de crescimento retidos na matriz dentinária (Guo *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2013).

Nesse contexto, a matriz dentinária pode ser utilizada em defeitos ósseos na forma de fatias ou partículas, servindo de arcabouço e reservatório de fatores de crescimento, acelerando a neoformação óssea pelo aumento do recrutamento de células osteoprogenitoras (Stern *et al.*, 2009; Murata *et al.*, 2011).

A biocompatibilidade da MDHD foi comprovada anteriormente quando, ao verificar que este material acelera a formação óssea e é incorporado pelo tecido ósseo neoformado (Carvalho *et al.*, 2004; Almeida e Alves, 2007). Gomes e colaboradores (2002) também demonstraram que a MDHD induziu a formação óssea, e que ela foi incorporada pelo tecido ósseo recém-formado, sem, contudo perder sua individualidade.

Estes dados demonstram a importância do uso da matriz dentinária desmineralizada como material de enxerto.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

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

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Avaliar por meio de técnicas histológicas, histomorfométricas e imunohistoquímicas a presença e distribuição de colágeno tipo III em feridas alveolares de ratos, preenchidas com matriz dentinária humana desmineralizada.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

O estudo utilizou trinta e dois ratos da raça *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar*, adultos machos, com massa corporal média de 250 gramas, fornecidos pelo Biotério da Universidade de Uberaba – UNIUBE, campus aeroporto.

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade de Uberaba (UNIUBE), protocolo número 022/2009 (Vide anexo).

Durante o período experimental os animais foram mantidos em biotério, acondicionados em gaiolas forradas com maravalha, contendo 4 animais cada, com dieta de ração amolecida durante os três primeiros dias após o procedimento cirúrgico, a dieta de ração foi oferecida *in natura* nos dias restantes. A ração foi da marca Labina®, Purina, água *ad libitum*, os ratos foram mantidos sob temperatura ambiente e controle de luz automatizada (07h-19h), sem controle de umidade (Reis-Filho *et al.*, 2012).

#### 3.2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Observando as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CoBEA), o procedimento cirúrgico se deu da seguinte forma:

1. Pesagem do animal para determinação da quantidade de sedativo e anestésico.
2. Sedação dos animais com injeção intramuscular de Cloridrato de Xilazina 2% (Rompun®, Bayer) (0,1ml/100g).
3. Anestesia dos animais com injeção intramuscular de Cloridrato de Ketamina 10% (Ketalar®, Parke-Davis) (0,1ml/100g).
4. Sindesmotomia, utilizando-se de um instrumental de Holleback (Duflex).
5. Luxação e exodontia dos segundos molares superiores direitos e esquerdos, por meio de uma pinça dente de rato (Edlo).

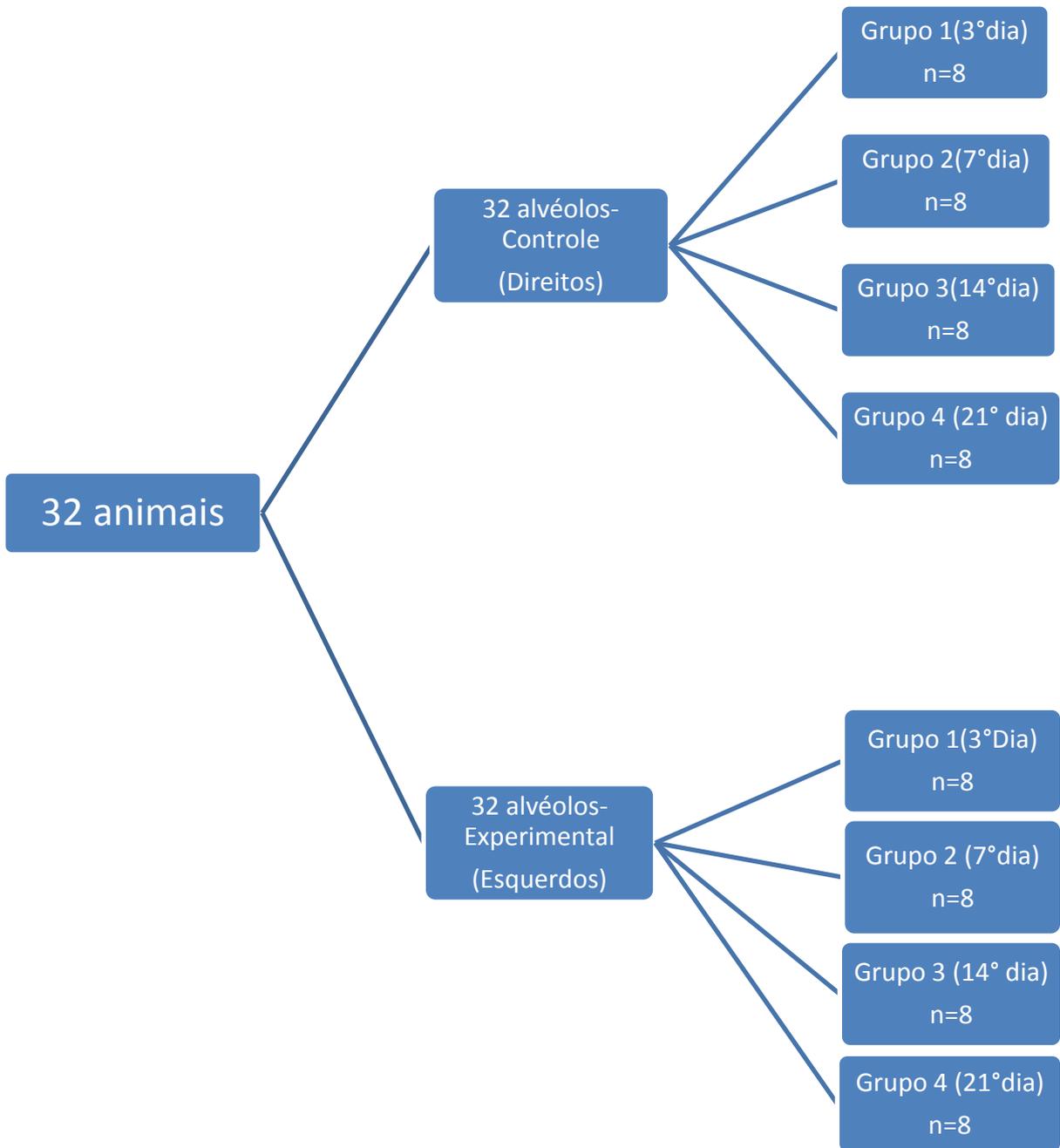
6. Introdução de Matriz dentinária humana desmineralizada (MDHD) no alvéolo esquerdo, ficando o lado direito preenchido com coágulo (controle), sem utilização de sutura.

### 3.3 MATRIZ DENTINÁRIA HUMANA DESMINERALIZADA

A matriz dentinária humana desmineralizada foi obtida a partir de dentes humanos, sem qualquer lesão cariosa ou outro procedimento. Suas raízes foram seccionadas e limpas de quaisquer resíduos da polpa dental ou do ligamento periodontal, sendo em seguida desmineralizadas em Ácido etileno diaminotetracético (EDTA) a 10%, pH 7,2, à temperatura ambiente, durante aproximadamente três meses. As fatias foram obtidas em criostato apropriado (Leica CM1850UV) (Oliveira *et al.*, 2013).

### 3.4 DISTRIBUIÇÕES DOS ANIMAIS

A escolha dos períodos experimentais deve-se ao fato de o reparo ósseo do modelo experimental escolhido se completar em aproximadamente de 21 dias, ficando então as amostras analisadas dividida em quatro grupos, sendo de 03, 07, 14 e 21 dias, após o processo cirúrgico como apresentado na Figura 1



**Figura 1:** organograma demonstrando os grupos experimentais.

### 3.5. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Ao término do período experimental os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésico e posterior deslocamento cervical. Em seguida foram decapitados, e suas maxilas foram dissecadas. As maxilas foram fixadas por 48 horas, à temperatura ambiente, em solução de formalina neutra tamponada a 10%. Após fixação, as peças foram rapidamente lavadas em água corrente e transferidas para solução tamponada de EDTA (pH entre 7,2 e 7,4) a 10%, à temperatura ambiente, com trocas a cada 2 dias da solução tampão durante um período de 40 dias. Após a desmineralização, as maxilas foram lavadas em água corrente por uma noite, e separadas em metades, direita e esquerda. Os fragmentos foram então, processados para análise histológica e imunohistoquímica, conforme protocolo a seguir:

- Desidratação: os tecidos foram mergulhados em uma série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II, absoluto III), com um tempo de 30 minutos em cada banho;

- Diafanização: os tecidos foram mergulhados em três banhos de xilol, durante 30 minutos em cada banho;

- Infiltração: foram realizados três banhos em parafina a 58°C, durante 90 minutos em cada banho. Após o último banho, as peças foram incluídas em blocos de parafina.

Os blocos de parafina de todos os animais foram cortados no sentido longitudinal ântero-posterior, em micrótomo (Leica RM2125 RT), obtendo-se cortes seriados de 5µm de espessura. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro e deixados secar. Em seguida as amostras foram divididas em dois grupos: coloração com picrossirius, e análise imunohistoquímica.

### 3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA

As lâminas foram avaliadas em microscopia de luz convencional, para estudo histomorfológico. Os cortes foram analisados procedendo-se à leitura em varredura longitudinal, utilizando-se um microscópio Nikon, Eclipse E200.

Os critérios para análise histológica foram:

- 1) característica do tecido conjuntivo que preenche o alvéolo, sua organização e maturação;
- 2) presença de reação inflamatória nas áreas experimental e controle.

### 3.7 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram utilizados cortes com 5 µm de espessura para os procedimentos de imunohistoquímica. A padronização da técnica foi obtida após otimização da concentração e recuperação antigênica. Foi utilizado o anticorpo primário anti-Colágeno tipo III de coelho, fabricante Santa Cruz Biotechnology Inc., Califórnia, EUA COL3A1(S-17):sc-8780-R com diluição de 1:100 (V/V).

Os cortes foram montados em lâminas histológicas, previamente limpas e desengorduradas, preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO, EUA) e mantidos à temperatura ambiente para secagem. Posteriormente realizou-se o seguinte protocolo:

- 1- Desparafinização em quatro banhos de Xilol, por 10 minutos cada.
- 2- Hidratação em série decrescente de etanol: duas passagens em etanol absoluto, seguidas por etanol 95%, 85%, 80%, 70% por 5 minutos cada.
- 3- Lavagem (uma vez no PBS 1X para remoção do excesso do álcool).
- 4- Recuperação de Antígeno, com as lâminas em Banho Maria (90°C) no ácido cítrico 0,01M e pH 6 por 30 minutos.
- 5- Remoção das lâminas em Banho Maria e permanência dentro da solução tampão.
- 6- Bloqueio das ligações inespecíficas, com aproximadamente 100µl (ul volume que cubra o corte) em cada corte de PBS-BSA 2% por 30 minutos.
- 7- Incubação com Anticorpo primário, sendo este diluído em PBS/BSA 2% de acordo com as especificações. Deixando por este por aproximadamente 18 horas em câmara úmida.
- 8- Lavagens (duas vezes com PBS 1X mais Tween 20, a 0,05% por 5 min cada lavada).
- 9- Bloqueio da peroxidase endógena tecidual por 10 minutos em solução de 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 volumes) em metanol.

10- Lavagens (duas vezes no PBS 1X mais Tween 20, a 0,05% por 5 min cada lavada).

11- Incubação do complexo streptoavidina-biotina (LSAB, Dakopatts, Dinamarca), com o link amarelo, seguido do link vermelho.

12- Lavagens (quatro vezes em PBS 1X mais Tween 20, a 0,05% por 5 min cada lavada).

13- Revelação da reação em solução cromógena de diaminobenzidina (DAB) (3,3'-diaminobenzidina, Sigma) a partir da imersão dos cortes histológicos em 1 ml de solução tampão e 1 gota de DAB líquido, durante 3 minutos.

14- Lavagem em água corrente e contra-coloração rápida com hematoxilina de Mayer.

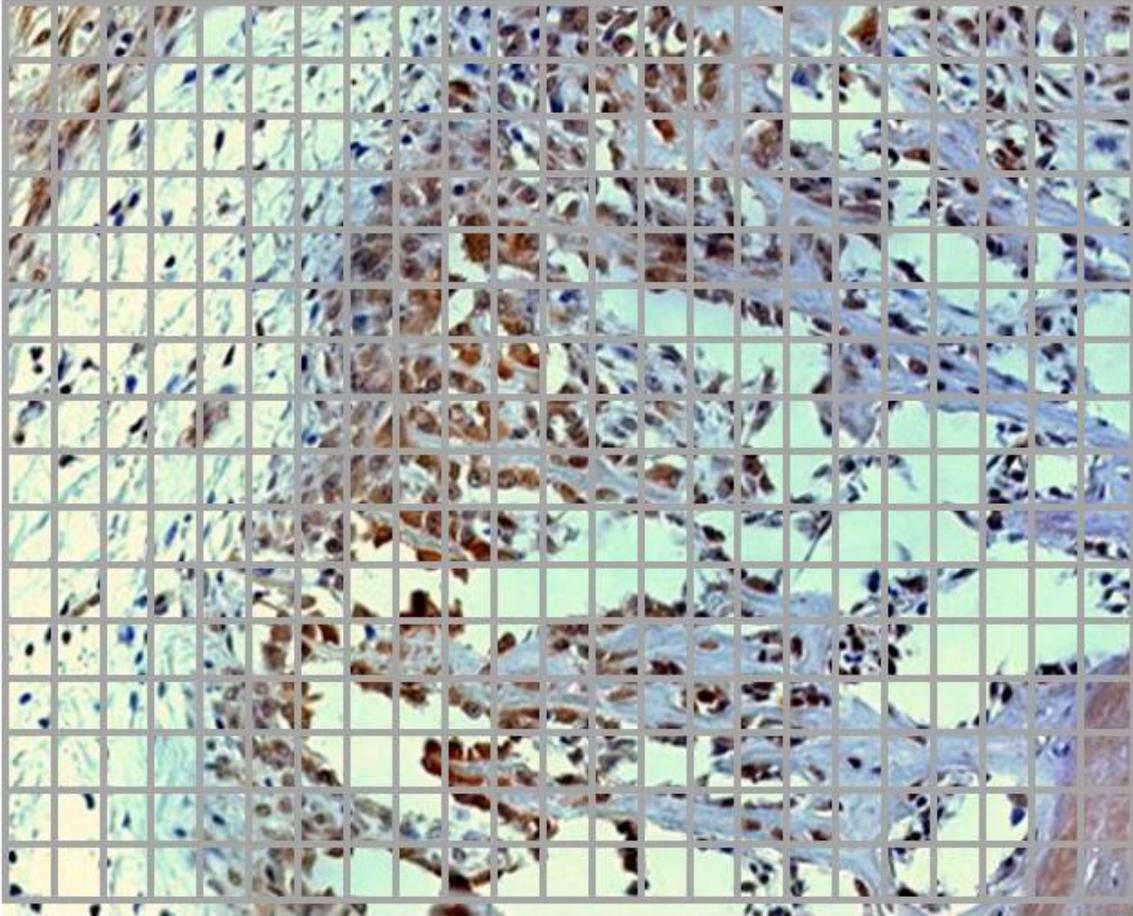
15- Secagem das secções histológicas, seguida da montagem com Entellan® e lamínulas de vidro conforme técnicas laboratoriais.

O controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

### 3.8 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para análise dos parâmetros avaliados, foi utilizado retículo milimetrado, construído no programa Power Point® 2003. Este retículo foi elaborado a partir de sistema de linhas, dividindo a imagem em quadrados espaçados por intervalo de 1,0 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 da região imunomarcada foi utilizado o software UTHSCSA Image Tool© 2.03 (Reis-Filho *et al.*, 2012).

Posteriormente a contagem, os dados foram avaliados estatisticamente. Esta técnica foi aplicada em todos os grupos de estudo, com o propósito de quantificar a expressão do colágeno tipo III dentro dos períodos considerados. De acordo com o sistema, a contagem morfométrica, foi obtida pela quantificação do número de pontos que incidiram sobre as regiões imunomarcadas (Figura 2).



**Figura 2:** Reticulo milimetrado com o propósito de quantificar a imunomarcção dentro dos períodos considerados. (Aumento 40x)

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

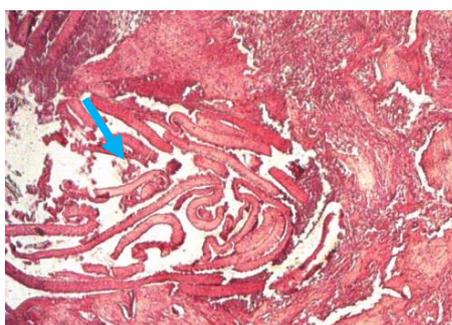
Os valores quantitativos da imunomarcção obtidos dos grupos controle e experimentais: 3, 7, 14 e 21 dias foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Os grupos foram analisados quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA

Após a observação dos espécimes corados em picrosirius, constatou-se que tanto o lado direito (controle), quanto o esquerdo (experimental) de todos os grupos, apresentaram os períodos clássicos da reparação óssea em graus diferentes de: inflamação, formação do tecido de granulação, formação de tecido ósseo primário e substituição deste por osso lamelar.

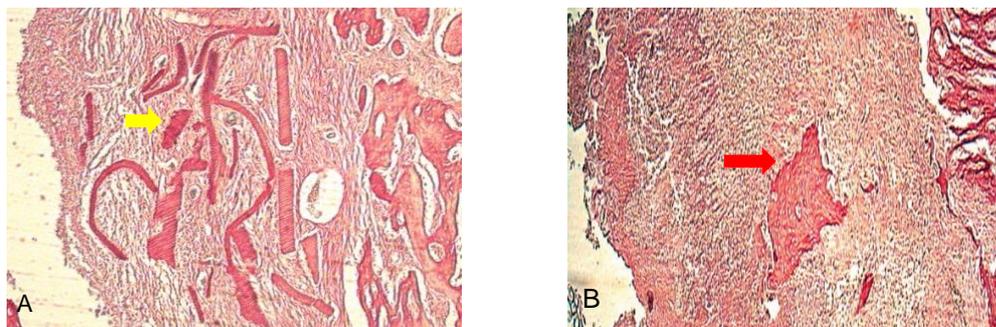
Para o grupo I (período de 3 dias) a área do defeito ósseo cirúrgico (lado experimental), apresentou-se preenchida por MDHD e tecido inflamatório, em toda a extensão do alvéolo (Figura 3).



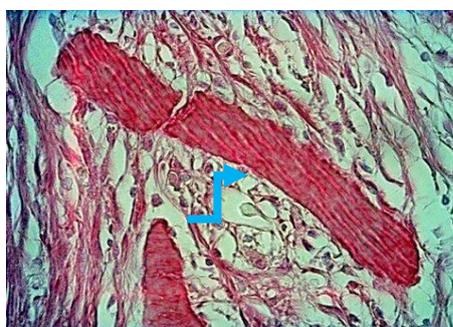
**Figura 3** – Lado experimental – Corte histológico mostrando a presença de MDHD dentro do alvéolo dentário esquerdo (seta ) após 3 dias de intervenção. Picrosirius (10 x).

Para o grupo II (período de 7 dias) observou-se no lado experimental tecido ósseo em formação partindo do fundo do alvéolo ( Figura 4 A), células localizadas sobre e dentro das partículas de MDHD (figuras 4 C e D).

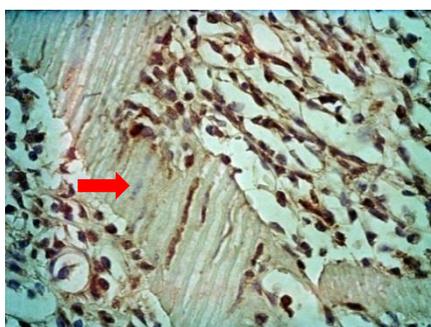
Já no lado controle não foi observado tecido ósseo em formação secundária, estando a região do defeito preenchida com tecido conjuntivo frouxo (Figura 4B).



Figuras 4 A e B – A: Lado experimental – Corte longitudinal do alvéolo esquerdo apresentando a MDHD envolvida por tecido conjuntivo frouxo (seta amarela). B: Lado controle – Corte longitudinal do alvéolo direito apresentando sequestro ósseo (seta vermelha): após 7 dias de intervenção. Picosirius (20 x)



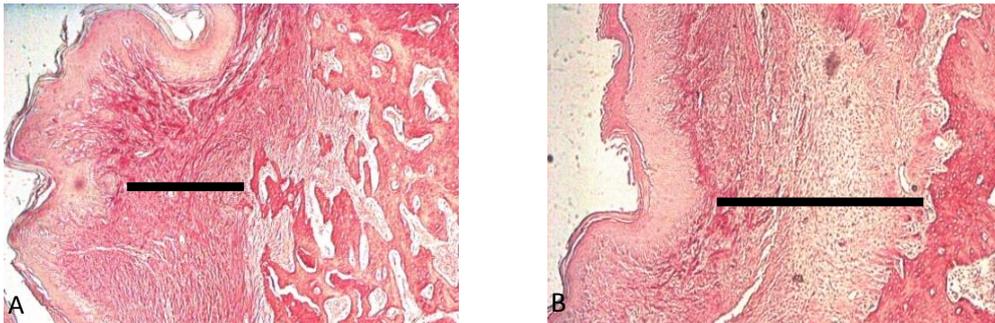
**Figura 4 C:** MDHD incorporada ao tecido conjuntivo: após 7 dias de intervenção. Picosirius (40x)



**Figura 4 D:** Células dentro dos túbulos dentinários e envolvendo as partículas de MDHD, demonstrando a capacidade osteocondutora e quimiotática desse material. Após 7 dias de intervenção. Imunohistoquímica (40x)

No grupo III (período de 14 dias após intervenção) 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. O tecido ósseo apresentou-se em sua maioria maduro, menos celularizado e com menores espaços

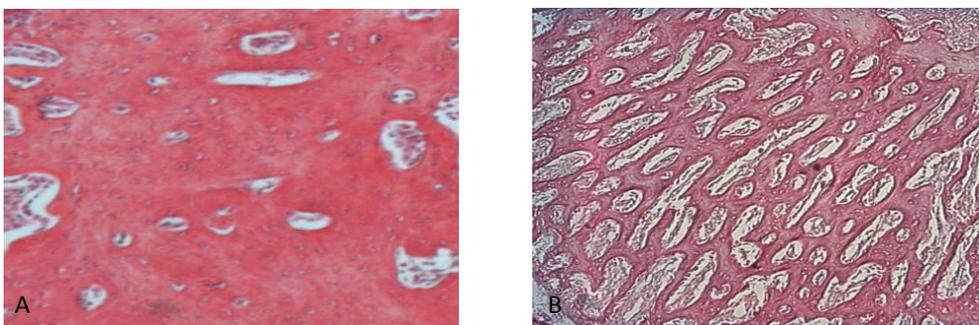
medulares. Reabsorções foram visualizadas na superfície da MDHD irregular nesse período. Já no lado controle a região da injúria apresentou-se preenchida por tecido ósseo em formação, em quantidades mais significativas que o grupo controle aos 7 dias. O tecido ósseo desta região apresentou-se imaturo com amplos espaços medulares, no entanto, já era possível observar regiões pontuais com tecido ósseo maduro.



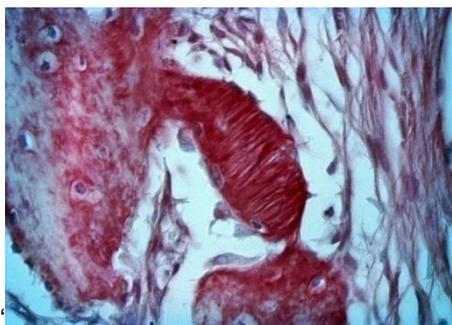
**Figura 5.** A: Lado experimental – Corte longitudinal do alvéolo esquerdo mostrando menor distancia entre o tecido ósseo e o epitélio que recobre o alvéolo (linha). B: Controle – Corte longitudinal do alvéolo mostrando maior quantidade de tecido conjuntivo frouxo dentro do alveolo. 14 dias após intervenção. Picrosirius (20x).

No grupo IV (período de 21 dias após intervenção) observou-se no lado controle, um estágio avançado de formação óssea, preenchendo quase todo o alvéolo, apresentando ainda grande quantidade de espaços medulares (Figura 6B).

No lado experimental observou-se que o processo de reparo se apresentava em um estágio mais avançado, quando comparado ao lado controle, totalmente preenchido por tecido ósseo maduro (Figura 6A) e com MDHD incorporada ao tecido ósseo neoformado (Figura 6).



**Figura 6.** A – Lado experimental: Corte longitudinal do alvéolo esquerdo. B – Controle: corte longitudinal do alvéolo direito. 21 dias após intervenção. Picrosirius (40x).

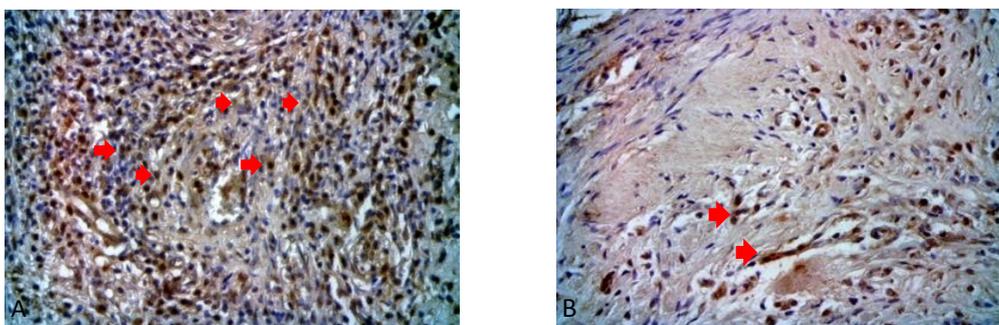


**Figura C:** Lado experimental – MDHD incorporada ao tecido neoformado. 21 dias após intervenção

#### 4.2. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E HISTOMORFOMÉTRICA

A expressão de colágeno tipo III foi observada durante todo o período estudado (3, 7, 14 e 21 dias), porém com baixos níveis de expressividade aos experimentos de 14 e 21 dias após a intervenção em ambos os alvéolos ( figura 8).

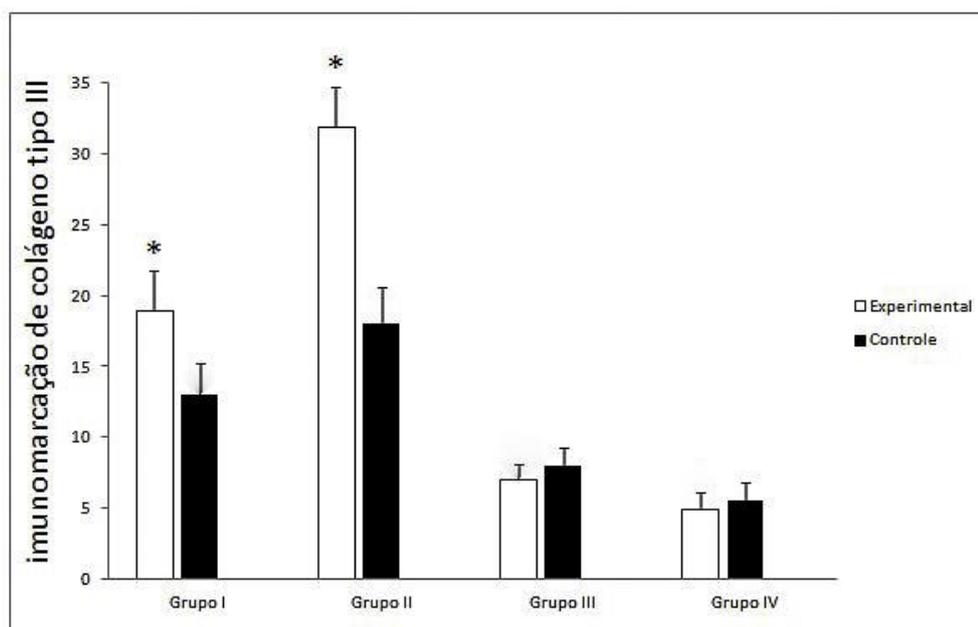
Nos grupos I e II (3 e 7 dias) observou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da expressão do colágeno tipo III, tanto no lado controle quanto experimental, com pico de expressão no 7º dia após os procedimentos cirúrgicos.



**Figura 7:** **A** - Lado experimental e **B** – Lado controle. Grupo II (7 dias). Marcação intensa para Colágeno tipo III, principalmente para o lado experimental (setas vermelhas), o que sugere que a MDHD favorece a expressão de colágeno tipo III durante o reparo ósseo. Imunohistoquímica (Aumento 20X)

Para os demais períodos, grupo III e IV, foi verificada uma menor expressão de colágeno tipo III tanto para o lado controle quanto para o lado experimental, com menor expressão para o lado experimental, sugerindo um efeito adaptativo\reacional do animal ao biomaterial. Os valores obtidos foram submetidos ao teste de Kruskal-wallis, seguido pelo teste de Dunn. Os dados histoquantitativos da expressão de

colágeno tipo III na matriz extracelular intra-alveolar estão demonstrados no gráfico I.



**Figura 8.** Resultados da imunomarcção para todos os grupos, com significância estatística ( $p < 0,05$ ) lado experimental, quando comparado com o lado controle e com os demais grupos.

Tabela 1. Resultados estatísticos da imunomarcção para todos os grupos, com significância estatística ( $p < 0,05$ ).

3 dias		7 dias		14 dias		21 dias	
Controle	Experimental	Controle	Experimental	Controle	Experimental	Controle	Experimental
12	18	17	33	6	7	5	6
14	19	16	34	9	6	6	4
13	20	17	33	7	7	6	3
13	19	17	31	9	8	6	6
13	20	16	34	8	8	5	5
12	20	16	34	7	6	6	5
14	18	17	33	9	7	6	5

## 5. DISCUSSÃO

Diversos biomateriais são estudados como alternativas para tratamento das injúrias ósseas que não se curam sozinhas. Atualmente, os enxertos ósseos autógenos são os melhores e muito usados, porém, possuem desvantagens, principalmente quanto à morbidade e à quantidade de enxerto disponível (Almeida e Alves, 2007).

Um bom modelo experimental deve ser capaz de simular situações clínicas, e o escolhido para essa pesquisa possibilitou condições ideais para criação de injúrias pós-exodontia, servindo como meio benéfico para o entendimento dos processos moleculares.

Entre diversos modelos animais utilizados, os ratos são os de primeira escolha, pois são baixo custo, fácil manutenção e enquadram-se nos conceitos de bioética (Fagundes e Taha, 2004). A utilização dos mesmos mostra-se satisfatória, uma vez que elimina problemas tais como o controle genético e outras variáveis. Além disso, possibilita que o experimento seja realizado com um maior número de animais, em um menor intervalo de tempo entre o experimento e a análise dos resultados, considerando seu metabolismo mais acelerado em comparação a outros animais (Karaharju-Suvanto, 1994). Consideramos que a imediata recuperação dos animais submetidos ao procedimento de exodontia ocorreu devido ao seu acelerado metabolismo.

Quanto à escolha do peso dos animais, deve-se ao fato de que o osso é um tecido metabolicamente dinâmico, influenciado por fatores nutricionais e deficiências protéico-nutricionais (Junqueira *et al.*, 2000).

A escolha dos períodos experimentais deve-se ao fato de o reparo ósseo do modelo experimental escolhido se completar em aproximadamente de 21 dias, ficando então a amostra dividida em quatro grupos, sendo de 03, 07, 14 e 21 dias (Carvalho *et al.*, 2004).

No que se refere a procedimentos de antisepsia intrabucal, nenhum procedimento pré-operatório foi realizado, pois de acordo com o estudo realizado por Magro-Filho e colaboradores (1996), o uso prévio de gluconato de clorexidina (0,2%) para a exodontia do incisivo superior direito em ratos de linhagem *Wistar* não

interferiu na cronologia da reparação das feridas de extração dental. Desta maneira, a eliminação de tal procedimento não comprometeu o processo de reparo, uma vez que não foi observado nenhum sinal de infecção nos dias seguintes a inserção do material de enxerto.

Após as exodontias não foi utilizada sutura, fato que não comprometeu a formação do coágulo e o reparo ósseo. Possivelmente o efeito da anestesia e relaxamento muscular no pós-operatório foi suficiente para a organização e verificação do coágulo.

A reconstrução óssea ideal depende, principalmente, da atividade da população de células osteoprogenitoras (Marsell e Einhorn, 2011). Entretanto, seu número é limitado e sua ação é dependente de estímulos, como os promovidos por fatores de crescimento.

Atualmente, reconhece-se que o hematoma formado próximo às linhas de fratura não é um coágulo estático, mas sim uma miscelânea de mediadores químicos que são capazes de favorecer a formação do calo ósseo, proporcionando a união da fratura e fornecendo estabilidade temporária. A coagulação pode ativar ainda o sistema complemento, e atrair células inflamatórias, especialmente macrófagos, que liberam interleucinas a fim de estimular a síntese e liberação de prostaglandinas. As plaquetas são ricas em fatores de crescimento, como o PDGF e o EGF (Oliveira *et al.*, 2013). Analisando todas essas propriedades favoráveis do coágulo, nosso estudo não teve como objetivo a remoção do mesmo, mas sim avaliar o efeito da implantação das fatias de MDHD no processo de reparo do osso alveolar.

A matriz dentinária pode ser empregada em defeitos ósseos sob a forma de partículas ou fatias. No presente estudo, optou-se pela utilização de fatias de MDHD pois de acordo com Catanzaro-Guimarães (1993), desta maneira o processo de reparo ósseo é mais eficiente pela maior capacidade osteoindutora. Essa resposta deve-se ao maior contato das células mesenquimais do hospedeiro com a superfície da matriz dentinária implantada, o que possibilita uma citodiferenciação mais rápida (Catanzaro-Guimarães *et al.*, 1986).

O enxerto ideal deve ser atóxico, não antigênico, de fabricação simples e de baixo custo permitindo fácil manipulação e inserção tecidual, além de não apresentar risco de transmissão de infecções (Knabe *et al.*, 2005; Fardin *et al.*, 2010). A MDHD preparada nesta pesquisa satisfaz os requisitos mencionados, permitindo assim, o

preparo em grandes quantidades e viabilizando sua aplicação clínica. Além disso, sua apresentação permite facilidade no manuseio trans-operatório e na inserção óssea do material durante o procedimento cirúrgico.

No presente trabalho, o enxerto ósseo xenógeno de MDHD mostrou-se biocompatível, apresentando reação imune desprezível do hospedeiro, verificada na análise histológica pela presença de infiltrado discreto de células inflamatórias na região de reparação óssea, assim como, pela incorporação das partículas do enxerto de MDHD ao tecido ósseo neoformado (Figura 3). Foram observadas células dentro dos túbulos dentinários, bem como envolvendo as partículas de MDHD, demonstrando a capacidade quimiotática desse material. Essa quimiotaxia e a morfologia da matriz dentinária enxertada favorece o reparo, promovendo uma superfície adequada para fixação das células mesenquimais indiferenciadas, que auxilia na orientação celular e caracteriza sua ação osteocondutora.

Mesmo com todas essas evidências a respeito do potencial da MDHD como material de enxerto xenógeno, de acordo com Yagihashi e colaboradores (2009), há ainda a possibilidade de utilização do enxerto autógeno de MDHD, se utilizados dentes extraídos ortodonticamente ou terceiros molares. Isso reduziria ainda mais as possibilidades de insucesso e os riscos de infecção ou reações imunogênicas. Assim, tecidos que normalmente são desprezados poderiam representar uma eficaz e segura alternativa para o enxerto na reparação óssea.

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado, cuja fase orgânica é fundamental na determinação da velocidade de formação e das características da fase mineral. Nos dentes humanos 70% da dentina constitui a fase mineral, enquanto 20% são formados pela fase orgânica. Uma rede fibrosa de colágeno I predomina na matriz orgânica dentinária constituindo 90% do conteúdo orgânico, além de outros tipos de colágenos. Os outros 10% da matriz dentinária são formados por proteínas não colagenosas (NCPs), como os fatores de crescimento (Linde, 1989).

As NCPs da dentina, em geral, estão fortemente associadas à fase mineral, sendo extraídas apenas após a desmineralização do tecido (Linde, 1989). Para a realização desse estudo optou-se pela desmineralização da dentina na intenção de expor a matriz orgânica dentinária, um reservatório de fatores indutores da proliferação celular e quimiotaxia, como IGF-1 e 2, TGF- $\beta$  e as BMPs (Catanzaro-Guimarães *et al.*, 1986; Bessho, Tagawa e Murata, 1990). Indícios que

proporcionam uma maior disponibilidade e acesso a estes componentes estimuladores no local do reparo ósseo.

Além destes achados que fortalecem o uso da dentina desmineralizada como biomaterial de enxerto ósseo, pesquisas relatam que o uso de cristais de hidroxiapatita foi associado com a presença de exacerbada reação inflamatória, formação de reação granulomatosa com consequente inibição do reparo (Salata, Craig e Brook, 1998).

Nossos resultados histológicos mostraram grande quantidade de células osteogênicas localizadas sobre as partículas de MDHD, no período de 3 e 7 dias (figura 4) confirmando os resultados de Nakashima (1990), Catanzaro-Guimarães *et al.*, (1986), Carvalho (1997), Gomes *et al.* (2002) e Gomes *et al.* (2006), que analisaram o potencial osteoindutor e osteocondutor da matriz dentinária desmineralizada. Ainda nestes períodos, no lado experimental, os resultados demonstraram que a MDHD parece atuar como substrato favorável à deposição de matriz óssea, uma vez que túbulos dentinários se prolongam por todo o tecido funcionando como matriz por onde penetram células, permitindo assim a deposição de matriz óssea bem próxima ao material do enxerto, achados que confirmam com os de King, King e Hughes (1998) e Almeida e Alves (2007).

No grupo de 14 dias, a MDHD na ferida óssea apresentou-se com superfície irregular, o que indica um processo de reabsorção na superfície da matriz dentinária e no interior dos canalículos, produzindo lacunas que foram preenchidas por células mesenquimais em proliferação e brotos capilares. Posteriormente, as células mesenquimais indiferenciadas transformaram-se fenotipicamente em células osteoprogenitoras e osteoblastos. Estes achados corroboram com os dados encontrados por Gould, Westbury e Tillman, (1982); Catanzaro-Guimarães *et al.*, (1986) e Gomes *et al.*, (2002), que observaram a presença de uma população celular em íntimo contato com a matriz dentinária.

Aos 14 e 21 dias (lado experimental) foi evidenciada também a incorporação da MDHD ao osso neoformado e um estágio mais avançado de reparo, quando comparado ao lado controle, fato esse também observado por outros pesquisadores, como Gomes *et al.*, (2006) e Almeida e Alves (2007). Tal achado sugere a baixa antigenicidade, propriedades e ressalta o potencial quimiotático da matriz.

As fibras de colágeno são produzidas por fibroblastos e formam uma rede fibrilar no início do processo de cicatrização tecidual. Este *scaffold* ou suporte

tridimensional de fibras colágenas, o que chamamos de matriz provisional, permite a deposição de matriz óssea no alvéolo dentário (Shyng *et al.*, 1999; Bouletreau, Warren e Longaker, 2002). Em concordância com estudos prévios, os resultados na análise imunohistoquímica demonstraram um aumento significativo na expressão ( $p < 0,05$ ) de colágeno tipo III aos 3 e 7 dias. Estes resultados vão ao encontro de dados previamente reportados, onde altas concentrações de fatores de crescimento foram encontradas durante as etapas iniciais de reparo, quando a matriz óssea está sendo simultaneamente estruturada por proteínas da matriz, inclusive colágeno tipo III (Gurkan, Gargac e Akkus, 2010). No entanto, aos 14 e 21 dias observou-se menor expressão de colágeno para o grupo experimental, fato decorrente de uma provável adaptação compensatória do tecido frente a maior exposição a moléculas provenientes da MDHD em reabsorção.

As BMPs liberadas da MDHD em reabsorção são responsáveis, assim como outros fatores de crescimento, pela osteoindução e aumento da produção de colágeno tipo III. Pesquisas adicionais deverão ser realizadas no sentido de identificar novos mecanismos responsáveis por estas propriedades da matriz dentinária e outros elementos que podem ter sua expressão alterada pela presença da MDHD.

O grau de resposta do hospedeiro a um enxerto pode também estar relacionado à concentração do antígeno e à dose total (Burchardt, 1983). Apesar de que os molares de ratos assemelham-se aos molares humanos (Macapanpan, Weinmann e Brodie, 1954), as dimensões do alvéolo são muito reduzidas, o que possivelmente dificultou a padronização da inserção da quantidade de matriz dentinária nos alvéolos. Para esclarecer melhor este evento, novos estudos devem ser realizados no sentido de estabelecer critérios para a espessura e quantidade ideal de fatias deste material a ser inserido.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos dentro das condições experimentais desta pesquisa demonstraram que a MDHD possui capacidade osteocondutora e indutora durante o reparo ósseo e promoveu aumento na expressão de colágeno tipo III, com maior intensidade no período de 7 dias, devido a regulação da expressão desta proteína pelas moléculas presentes na dentina.

Assim, o tratamento dos alvéolos com MDHD favorece o reparo trazendo grandes benefícios à reabilitação de pacientes com lesões ósseas que não se regeneram adequadamente por si só, devolvendo assim as funções e restabelecendo a qualidade de vida aos pacientes.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, B. J. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 457p. 2012.
- AGUIRRE, J. et al. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. **Oral diseases**, v. 16, n. 7, p. 674-685, 2010. ISSN 1601-0825.
- ALMEIDA, J. M. D.; 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, 2007. ISSN 0103-6971.
- ALVES, J. B. et al. Local delivery of EGF–liposome mediated bone modeling in orthodontic tooth movement by increasing RANKL expression. **Life sciences**, v. 85, n. 19, p. 693-699, 2009. ISSN 0024-3205.
- AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol méd lab**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
- ANITUA, E. et al. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4551-4560, 2007. ISSN 0142-9612.
- BARNES, M. J.; GORDON, J. L.; MACINTYRE, D. E. Platelet-aggregating activity of type I and type III collagens from human aorta and chicken skin. **Biochem. J**, v. 160, p. 647-651, 1976.
- BESSHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 48, n. 2, p. 162-169, 1990. ISSN 0278-2391.
- BOULETREAU, P. J.; WARREN, S. M.; LONGAKER, M. T. The molecular biology of distraction osteogenesis. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2002. ISSN 1010-5182.
- BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 174, p. 28-34, 1983.

CARDAROPOLI, G.; ARAUJO, M.; LINDHE, J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. **Journal of clinical periodontology**, v. 30, n. 9, p. 809-818, 2003. ISSN 1600-051X.

CARVAIHO, V. A. P. et al. Histomorphometric analysis of homogenous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in rabbit mandibles. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 19, n. 5, 2004. ISSN 0882-2786.

CARVALHO, T. L.; BOMBONATO, K. F.; BRENTGANI, L. G. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. **Braz Dent J**, v. 8, n. 1, p. 9-12, 1997. ISSN 0103-6440.

CATANZARO-GUIMARÃES, S. Possibility to reinforce bone repair with decalcified dentin matrix. **Jahrbuch für orale Implantologie. Berlin: Quintessenz**, p. 33-4, 1993.

CATANZARO-GUIMARÃES, S. et al. Osteogenic potential of autogenic demineralized dentin implanted in bony defects in dogs. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 15, n. 2, p. 160-169, 1986. ISSN 0901-5027.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. Supplement 3, p. S131-S139, 2008. ISSN 1555-9041.

CLORE, J. N.; COHEN, I. K.; DIEGELMANN, R. F. Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. **Experimental Biology and Medicine**, v. 161, n. 3, p. 337-340, 1979. ISSN 1535-3702.

DA SILVA, E. R.; ALVES, J. B. A genética da odontogênese. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 2, 2008. ISSN 1981-3163.

DEVLIN, H.; SLOAN, P. Early bone healing events in the human extraction socket. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 31, n. 6, p. 641-645, 2002. ISSN 0901-5027.

DIEGELMANN, R. F. Collagen metabolismo. **Wounds: Health Management Publications Inc.**;13(5):177-82. 2000.

DIMITRIOU, R. et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC medicine**, v. 9, n. 1, p. 66, 2011. ISSN 1741-7015.

DUMAS, A. et al. The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cytocompatibility. **Biomaterials**, v. 27, n. 23, p. 4204-4211, 2006. ISSN 0142-9612.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FARDIN, A. C. et al. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innovations Implant Journal**, v. 5, n. 3, p. 48-52, 2010. ISSN 1984-5960.

FUKUYAMA, R. et al. Statins inhibit osteoblast migration by Inhibiting Rac-Akt Signaling. **Biochemical and biophysical research communications**, V. 315, N. 3, P. 636-642, 2004. ISSN 0006-291X.

GAO, Y. et al. Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone. **Journal of materials science: materials in medicine**, V. 17, N. 9, P. 815-823, 2006. ISSN 0957-4530.

GERARD, D. et al. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 64, n. 3, p. 443-451, 2006. ISSN 0278-2391.

GOMES, M. F. et al. Densitometric analysis of the autogenous demineralized dentin matrix on the dental socket wound healing process in humans. **Brazilian oral research**, v. 20, n. 4, p. 324-330, 2006. ISSN 1806-8324.

GOMES, M.F. et al. Autogenous demineralized dentin matrix for tissue engineering applications: radiographic and histomorphometric studies. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 17, n. 4, 2002. ISSN 0882-2786.

GOULD, T.; WESTBURY, L.; TILLMAN, J. Dentin matrix gelatin (DMG) as a possible "universal" grafting material in periodontics. **Journal of periodontology**, v. 53, n. 1, p. 22-25, 1982. ISSN 0022-3492.

GUO, W. et al. The use of dentin matrix scaffold and dental follicle cells for dentin regeneration. **Biomaterials**, v. 30, n. 35, p. 6708-6723, 2009. ISSN 0142-9612.

GURKAN, U. A.; GARGAC, J.; AKKUS, O. The sequential production profiles of growth factors and their relations to bone volume in ossifying bone marrow explants. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 7, p. 2295-2306, 2010. ISSN 1937-3341.

HING, K. A. et al. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 68, n. 1, p. 187-200, 2004. ISSN 1552-4965.

IVANOVSKI, S. et al. An immunohistochemical study of matrix molecules associated with barrier membrane-mediated periodontal wound healing. **Journal of periodontal research**, v. 35, n. 3, p. 115-126, 2000. ISSN 1600-0765.

JUNQUEIRA, L. C. et al. **Histologia básica**. Masson Barcelona, 2000. ISBN 8445809792.

KANYAMA, M. et al. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. **Archives of oral biology**, v. 48, n. 10, p. 723-730, 2003. ISSN 0003-9969.

KARAHARJU-SUVANTO, T. Cephalometric changes after gradual lengthening of the mandible: an experimental study in sheep. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 23, n. 3, p. 159-162, 1994. ISSN 0250-832X.

KATCHBURIAN, E.; HISTOLOGIA, A. V. **embriologia oral: texto-atlas-correlações clínicas**: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2004.

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\*. **Journal of periodontology**, v. 69, n. 5, p. 561-570, 1998. ISSN 0022-3492.

KLEINHEINZ, J. et al. VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 63, n. 9, p. 1310-1316, 2005. ISSN 0278-2391.

KNABE, C. et al. The effect of bioactive glass ceramics on the expression of bone-related genes and proteins in vitro. **Clinical oral implants research**, v. 16, n. 1, p. 119-127, 2005. ISSN 1600-0501.

KOHNO, S. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement. **Journal of dental research**, v. 82, n. 3, p. 177-182, 2003. ISSN 0022-0345.

KUMAR, V. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier Brasil, 2011. ISBN 8535246339.

LALANI, Z. et al. Spatial and temporal localization of FGF-2 and VEGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 63, n. 10, p. 1500-1508, 2005. ISSN 0278-2391.

LEE, S.-H.; SHIN, H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 4, p. 339-359, 2007. ISSN 0169-409X.

LINDE, A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. **The Anatomical Record**, v. 224, n. 2, p. 154-166, 1989. ISSN 1097-0185.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 5 ed. Guanabara Koogan; Rio de Janeiro. 2010.

MACAPANPAN, L. G.; WEINMANN, J. P.; BRODIE, A. G. Early Tissue Changes Following Tooth Movement In Rats\*. **The Angle Orthodontist**, v. 24, n. 2, p. 79-95, 1954. ISSN 0003-3219.

MACEDO, L. G. S. D. et al. Osso humano fresco congelado em reconstruções ósseas: estudo retrospectivo e relato de casos. **ImplantNews**, v. 4, n. 1, p. 50-56, 2007. ISSN 1678-6661.

MAGRO-FILHO; TOLEDO, F. M. C.; OKAMOTO, T.; GARCIA JÚNIOR, L. R. Influência da antisepsia intrabucal com clorexidina 0,2% na reparação do alvéolo dental. **Rev. APCD**, p.243-246. 1996.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551-555, 2011. ISSN 0020-1383.

MENDES, R. M. et al. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. **Life sciences**, v. 87, n. 7, p. 215-222, 2010. ISSN 0024-3205.

MOOREN, R. et al. The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 36, n. 7, p. 626-631, 2007. ISSN 0901-5027.

MURATA, M. et al. Human dentin as novel biomaterial for bone regeneration. **Biomaterials-Physics and Chemistry**, p. 127-140, 2011.

NANCI, A. **Ten Cate, Histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função**: Rio de Janeiro: Elsevier 2008.

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

NEMIR, M.; DEVOUGE, M. W.; MUKHERJEE, B. Normal rat kidney cells secrete both phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin showing different physiological properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 30, p. 18202-18208, 1989. ISSN 0021-9258.

OLIVEIRA, G. et al. Enhanced bone formation during healing process of tooth sockets filled with demineralized human dentine matrix. **Australian dental journal**, v. 58, n. 3, p. 326-332, 2013. ISSN 1834-7819.

PAGE, M.; HOGG, J.; ASHHURST, D. E. The effects of mechanical stability on the macromolecules of the connective tissue matrices produced during fracture healing. I. The collagens. **The Histochemical Journal**, v. 18, n. 5, p. 251-265, 1986. ISSN 0018-2214.

PERRIEN, D. S. et al. Immunohistochemical study of osteopontin expression during distraction osteogenesis in the rat. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 4, p. 567-574, 2002. ISSN 0022-1554.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103-25108, 2010. ISSN 0021-9258.

RANLY, D. M. et al. Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 89, n. 1, p. 139-147, 2007. ISSN 0021-9355.

REIS-FILHO, C. R. et al. Demineralised human dentine matrix stimulates the expression of VEGF and accelerates the bone repair in tooth sockets of rats. **Archives of oral biology**, v. 57, n. 5, p. 469-476, 2012. ISSN 0003-9969.

RITTER, N. M.; FARACH-CARSON, M. C.; BUTLER, W. T. Evidence for the formation of a complex between osteopontin and osteocalcin. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 8, p. 877-885, 1992. ISSN 1523-4681.

SALATA, L. A.; CRAIG, G. T.; BROOK, I. M. Bone healing following the use of hydroxyapatite or ionomeric bone substitutes alone or combined with a guided bone regeneration technique: an animal study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 13, n. 1, 1998. ISSN 0882-2786.

SATO, H.; TAKEDA, Y. Proliferative activity, apoptosis, and histogenesis in the early stages of rat tooth extraction wound healing. **Cells Tissues Organs**, v. 186, n. 2, p. 104-111, 2007. ISSN 1422-6421.

SCHILLER, J.; HUSTER, D. New methods to study the composition and structure of the extracellular matrix in natural and bioengineered tissues. **Biomatter**, v. 2, n. 3, p. 115-131, 2012. ISSN 2159-2527.

SCHMIDINGER, G. et al. Effect of tenascin and fibronectin on the migration of human corneal fibroblasts. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 29, n. 2, p. 354-360, 2003. ISSN 0886-3350.

SCHROEDER, J. E.; MOSHEIFF, R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 609-13, Jun 2011. ISSN 0020-1383.

SENTA, H. et al. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n. 3, p. 213-222, 2009. ISSN 1359-6101.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **Eur Cell Mater**, v. 15, p. 53-76, 2008.

SHYNG, Y. et al. Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. **Archives of oral biology**, v. 44, n. 9, p. 751-757, 1999. ISSN 0003-9969.

SIMPSON, A.; MILLS, L.; NOBLE, B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. **Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume**, v. 88, n. 6, p. 701-705, 2006. ISSN 0301-620X.

STEIN, A. et al. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 23, n. 2, p. 161-166, 2005. ISSN 1549-5418.

STERN, M. M. et al. The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2393-2399, 2009. ISSN 0142-9612.

TERMINE, J. D. et al. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. **Cell**, v. 26, n. 1, p. 99-105, 1981. ISSN 0092-8674.

TEÓFILO, J.; BRENTGANI, L.; LAMANO CARVALHO, T. A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipine on bone healing after tooth extraction. **Archives of oral biology**, v. 46, n. 4, p. 375-379, 2001. ISSN 0003-9969.

TROUVIN, A.-P.; GOËB, V. Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. **Clin Interv Aging**, v. 5, p. 345-354, 2010.

TUNG, P. et al. Specific immunohistochemical localization of osteonectin and collagen types I and III in fetal and adult porcine dental tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 33, n. 6, p. 531-540, 1985. ISSN 0022-1554.

TZAPHLIDOU, M. et al. High resolution Ca/P maps of bone architecture in 3D synchrotron radiation microtomographic images. **Applied radiation and isotopes**, v. 62, n. 4, p. 569-575, 2005. ISSN 0969-8043.

XIAO, Y. et al. Development and transplantation of a mineralized matrix formed by osteoblasts in vitro for bone regeneration. **Cell transplantation**, v. 13, n. 1, p. 15-25, 2004. ISSN 0963-6897.

YAGIHASHI, K.; MIYAZAWA, K.; TOGARI, K.; GOTO, S. Demineralized dentin matrix acts as a scaffold for repair of articular cartilage defects. **Calcif Tissue Int**; 84:210–220. 2009.

ZIED, I. C. et al. Estudo histológico do processo de reparo alveolar em ratos após exodontia e pressão com compressa de gaze embebida em solução de peróxido de hidrogênio. **Rev. Odontol. Araçatuba**, v. 26, n. 1, p. 9-13, 2005. ISSN 1677-6704.

## ANEXOS

**UNIUBE** Educação e Responsabilidade Social **Comitê de Ética em Experimentação Animal**

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 emalvéolos 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,



Profa. Juliana F. Cidade Clemente Napimoga  
Coordenadora do CEEA-UNIUBE

Uberaba, 20 de março de 2009

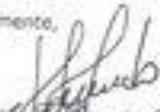
**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº 0022/2009 relativo ao projeto intitulado "**Expressão do VEGF após utilização de matriz dentinária humana desmineralizada em alvéolos de ratos: análise imunohistoquímica e histoquantitativa**" que tem como responsável **Prof. José Bento Alves**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.704/09.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the protocol nº 0022/2009 related to the project entitled "**Deminerallized Human Dentin Matrix stimulates the expression of VEGF and accelerates the bone repair in tooth sockets of rats**", under the supervision of **Prof. José Bento Alves**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.704/09.

Atenciosamente,

  
**Prof. José B. Aguiar de Brito**  
 Vice-Coordenadora do CEEA-UNIUBE



CURSO DE ODONTOLOGIA  
BANCO DE DENTES HUMANOS - BDH-UNIUBE

DECLARAÇÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Para fins de avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), o Banco de Dentes Humanos do Curso de Odontologia da Universidade de Uberaba (BDH-UNIUBE), compromete-se a auxiliar mais uma vez os pesquisadores na realização de seus projetos de pesquisa.

Sendo assim, após a aprovação do CEP, contribuiremos no fornecimento de 5 dentes, caninos humanos, para a execução do trabalho de pesquisa intitulado: "Expressão do colágeno tipo III na utilização de matriz dentinária humana desmineralizada em alvéolos de ratos: análise imunohistoquímica" a ser realizado pelo Prof. Dr. José Bento Alves e pela Profa. Dra. Elisângela Ribeiro da Silva.

Uberaba, 24 de Fevereiro de 2014

Prof. Ms. Marcelo Nistri de Araújo  
Banco de Dentes Humanos (BDH-UNIUBE)  
Curso de Odontologia - Universidade de Uberaba  
Av. Nene Sabino nº 1.801 sala 2D35  
Fone: (341) 3319 8978  
Uberaba-MG CEP: 38055-550