CHRISTIANE WATANABE YORIOKA

**Expressão da família de proteínas SIBLING nos tecidos regenerados em
defeitos de furca em cães**

São Paulo

2010

CHRISTIANE WATANABE YORIOKA

**Expressão da família de proteínas SIBLING nos tecidos regenerados em
defeitos de furca em cães**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Yorioka, Christiane Watanabe

Expressão da família de proteínas SIBLING nos tecidos regenerados em defeitos de furca em cães / Christiane Watanabe Yorioka; orientador Francisco Emílio Pustiglioni. -- São Paulo, 2010.

85p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Tratamento regenerativo de furca – Proteínas SIBLING. 2. Periodontia.
I. Pustiglioni, Francisco Emílio. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Yorioka CW. Expressão da família de proteínas SIBLING nos tecidos regenerados em defeitos de furca em cães. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovada em: / /2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida família, base de toda minha essência:

Ao meu querido pai Mário, exemplo digno que sigo com orgulho.

*Ele já não se encontra entre nós, mas sei que está,
sem dúvida, sempre ao meu lado e presente
em todos os momentos da minha vida.*

*À minha querida mãe Fumie, companheira e incentivadora em momentos decisivos e
importantes, principalmente à distância, durante a realização deste trabalho de doutorado,
com estágio no exterior.*

*Aos meus irmãos Marcelo e Marco Aurélio, pelo apoio,
compreensão e ajuda em todos os momentos
de minha carreira acadêmica.*

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Meu eterno agradecimento ao meu orientador, *Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni*, pela orientação, dedicação e confiança desde o Mestrado em 2001. Todo o meu aprendizado, sob sua orientação, não foi restrito somente à Periodontia: estendeu-se para a esfera pessoal e de vida!

Agradeço meu co-orientador, *Prof. Dr. Saso Ivanovski*, pela oportunidade de participar do Programa Doutorado - Sanduíche na Griffith University – Austrália – uma experiência pessoal e acadêmica únicas, o meu muito obrigada!

Ao *Prof. Larry W. Fisher*, do NIDCR (National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), pela doação dos anticorpos utilizados neste trabalho.

A *CAPES* pela concessão da bolsa PDEE - Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (processo 1173/08-1) e pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos científico-acadêmicos na Griffith University – Austrália.

A *FAPESP* – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - processo 06/52179-0 e a *ADRF* - Australian Dental Research Foundation Incorporated – processo 84/2009, pelos auxílios financeiros à pesquisa.

A todos os *docentes da Disciplina de Periodontia da FOUSP*, responsáveis pela formação de minha pós-graduação, nesta casa, desde 2001.

Ao Prof. Dr. Luiz Alves P. Alves de Lima, pela amizade, incentivo na realização do doutorado no exterior e sugestões deste trabalho.

À Profa. Dra. Marinella Holzhausen pelas valiosas sugestões e revisão deste trabalho.

Aos pesquisadores *Stephen Hamlet* da Griffith University – Austrália e *Robert Simpson* da University of Queensland – Austrália pela ajuda e orientação durante meu estágio de doutorando.

À doutoranda *Haifa Hannawi* e mestranda *Inoka Wimaladharma* pela amizade verdadeira e apoio constante durante meu estágio de doutorando no exterior.

Às pessoas que participaram de minha vida durante um ano em Southport (Gold Coast – Austrália) e que, de alguma maneira, colaboraram com este trabalho: *Fernando, Latfiya, Jelena, Chris, Mohammad Alfarsi, Vinod, Alie, Zhou, Charlie, Jacob, Emily, Prof. Nikos, Mohammad Nassiri, Ana Barragan, Joy, Andrea, Prasana, Amal, Mahamood, Karen, Leanne, Ana, Jimmy, Renata, Jason, Susan, Nelsinho, Naoko, Carol e Daniel* – o meu sincero agradecimento!

Aos colegas de pós-graduação na FOUSP: *Fernando Hayashi* e *Fernando Peixoto Soares* pela amizade e trabalho em equipe.

À técnica *Elisa dos Santos* e à Profa. Dra. *Karen Renata Nakamura Hiraki* pelos ensinamentos da técnica de imunohistoquímica.

À *Alessandra Moreira de Lima* e *Cátia Tiezzi dos Santos* e *Marcia dos Santos* pela ajuda solícita em todos os momentos do curso de pós-graduação, principalmente

durante o estágio no exterior e à bibliotecária *Maria Cláudia Pestana* pelas correções bibliográficas deste trabalho.

Ao *Dr. João Francisco S. de Santis, Geni Dias Cândido e Margareth Hiroko Yorioka Ogata* pelos conselhos, companheirismo e incentivo sempre! Muito obrigada!

As minhas “amigas-irmãs”: *Ana Karina, Ayda, Danielle, Fátima Martuccelli, Isabella, Laís, Mitiko, Patrícia, Priscila, Simone e Vanessa* pelo apoio e ajuda em todos os momentos, principalmente os difíceis - amizade assim não encontramos facilmente!

A todas as pessoas, que mesmo não mencionadas, também colaboraram de alguma maneira para a realização deste trabalho, o meu eterno agradecimento!

EPÍGRAFE

“Inteligente é quem se conhece;

Sapiente é quem conhece a si mesmo;

Forte é quem outros vence;

“Poderoso é quem domina a si mesmo”.

Lao Tsé – filósofo chinês – séc. 6 a.C.

RESUMO

Yorioka CW. Expressão da família de proteínas SIBLING nos tecidos regenerados em defeitos de furca em cães [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a expressão da família SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins) após tratamento regenerativo de furca com enxerto de tecido reparativo de alvéolos dentários. Para isto, os 2^{os} e 3^{os} pré-molares superiores foram extraídos em quatro cães s.r.d. Cinco dias após as extrações, defeitos padronizados de furca classe II foram criados nos 2^{os}, 3^{os} e 4^{os} pré-molares inferiores, bilateralmente. Estes defeitos foram tratados imediatamente com raspagem, alisamento e polimento corono-radicular (RAPCR) e retalho deslocado coronariamente (RDC) (Grupo Controle) ou com RAPCR + RDC + enxerto de tecido reparativo de alvéolos dentários (Grupo Teste) em um experimento de boca-dividida. Após um período de 6 semanas de reparação, os animais foram sacrificados e foi realizada análise imuno-histoquímica para avaliar a localização dos membros da família de proteínas SIBLING, composta pelas seguintes proteínas não-colágenas da matriz extracelular: osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP), proteína da matriz dentinária 1 (DMP1), sialofosfoproteína da dentina (DSPP) e fosfoglicoproteína da matriz extracelular (MEPE). Não foram encontradas diferenças na expressão da família SIBLING entre os grupos teste e controle. Todas as proteínas foram expressas no novo osso, novo cimento e novo ligamento periodontal, em ambos os grupos. Os osteoclastos demonstraram imunolocalização intracelular intensa somente para a OPN. Cementócitos e o novo ligamento periodontal demonstraram, particularmente, marcação intensa para a MEPE. Houve uma diferença evidente entre o padrão de marcação entre o lado tratado (vestibular) e o não-tratado (lingual) de todos os espécimes, com presença de maior marcação do lado vestibular, para todos os anticorpos testados. Podemos concluir que não houve diferenças no padrão de expressão da família SIBLING após o uso do enxerto de tecido reparativo de alvéolos dentários. A família de proteínas SIBLING é expressa durante o processo de reparação de defeitos de furca, indicando possíveis papéis e funções para as proteínas OPN, BSP, DMP1, DSP e MEPE como moléculas alvo em terapias de regeneração periodontal.

Palavras-chave: Defeitos da furca. Imuno-histoquímica. Proteínas da matriz extracelular.

ABSTRACT

Yorioka CW. The SIBLING family of proteins expression in regenerative tissues in furcation defects in dogs [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

The present study aimed in characterizing the expression of the SIBLING (Small Integrin- Binding Ligand, N-linked Glycoproteins) family in a regenerative treatment of furcation defects with a reparative tissue graft obtained from extraction sockets. The second and third upper premolars were extracted in four mixed breed dogs. Five days later, standardized class II furcation defects were created in the second, third and fourth mandibular premolars, bilaterally. The defects were immediately treated with either debridement and root planning (DRP) combined with a coronally positioned flap (CPF) (Control Group), or with DRP+CPF + a reparative tissue graft derived from the second and third premolar extraction sockets (Experimental Group) in a split-mouth design. After 6 weeks period of healing, the animals were sacrificed and immunohistochemistry was carried out to assess the localization of members of the SIBLING family of noncollagenous extracellular matrix proteins, namely osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), dentin matrix protein 1 (DMP1), dentin sialophosphoprotein (DSPP) and matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE). No differences in the SIBLING family of proteins expression were noted between the control and experimental group. All proteins were expressed in new bone, new cementum and new periodontal ligament in both groups. Osteoclasts exhibited intense intracellular localization only for OPN. Cementocytes and the newly formed periodontal ligament demonstrated particularly intense staining for MEPE. There was an evident difference between the staining pattern between the treated (buccal side) and non-treated (lingual) side of the specimens, with a more intense staining pattern in the buccal side, for all the tested antibodies. In conclusion, there were no differences in the pattern of SIBLING expression following the use of a reparative tissue graft obtained from extraction sockets. The SIBLING family of proteins is expressed during the healing process of furcation defects indicating possible roles and functions of OPN, BSP, DMP1, DSPP and MEPE as target molecules in periodontal regeneration therapies.

Keywords: Furcation Defects. Immunohistochemistry. Extracellular matrix proteins

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Esquema do defeito de furca classe II34
- Figura 4.2 - Dispositivo (A); utilização do dispositivo na padronização dos defeitos (B)34
- Figura 4.3 - Área de novo osso (No) após reação imuno-histoquímica. Alguns osteoblastos se apresentam negativos (setas brancas); o centro da matriz óssea apresenta marcação fraca e a periferia da matriz apresenta marcação moderada (*). Osteoblastos delineando a parte inferior da matriz apresentam marcação forte (setas pretas). Aumento 20x 40
- Figura 4.4 - Área do ligamento periodontal. Aspecto observado quando consideramos marcação heterogênea dentro de uma população celular: alguns fibroblastos estão fortemente marcados (setas pretas) e outros não expressaram a proteína, considerados então negativos (setas brancas). Aumento 20x..... 40
- Figura 5.1 - Visão panorâmica do defeito em um controle negativo, com omissão do anticorpo primário, de espécime do grupo teste. No – Novo Osso; O – Osso pré-existente. Aumento 2x.....41
- Figura 5.2 - Visão panorâmica do defeito criado – Neste espécime do grupo teste foi realizada reação imuno-histoquímica para a BSP. Observar nítida diferença no padrão de marcação entre a região de novo osso (No) e osso pré-existente (O). Aumento 2x41
- Figura 5.3 - **Imunolocalização da OPN. Espécime teste (a-f).** (a) Visão panorâmica da área de bifurcação. Aumento 2x; (b) Detalhe do quadro da Figura a: Marcação intensa para OPN na interface dentina/novo cimento (setas pretas), assim como na interface cimento pré-existente/novo cimento (seta branca). Aumento 20x; (c) Área de bifurcação com interface dentina/novo cimento e novo cimento/novo ligamento com marcação intensa para OPN, assim como nos cementoblastos (setas brancas)

delineando o novo cemento. Aumento 20x; (d) Nova trabécula óssea com osteoclasto positivo (seta preta) para OPN em sua periferia. Aumento 20x; (e) Interface osso pré-existente/novo osso (setas brancas). Notar marcação fraca na matriz óssea pré-existente e marcação moderada na matriz do novo osso. Presença de vários osteoblastos positivamente marcados para OPN ao redor das matrizes ósseas (setas pretas). Aumento 20x; (f) Linhas de reversão com marcação positiva para OPN (setas pretas). Aumento 20x. **Espécime controle (g-h).** (g) Partícula óssea (P) em processo de reabsorção com sua periferia intensamente marcada para OPN. Aumento 20x; (h) Osteoblastos (setas pretas) delineando a periferia de uma nova trabécula óssea. Aumento 20x. Cem – Cimento; Den - Dentina; Ncem – Novo Cimento; Nlig - Novo Ligamento Periodontal; No – Novo Osso; O – Osso pré-existente; Tc – Tecido conjuntivo45

Figura 5.4 - **Imunolocalização da BSP. Espécime teste (a-e).** (a) Visão panorâmica da área de bifurcação. Aumento 2x; (b) Detalhe do quadro da Figura a: Interface novo cemento/novo ligamento periodontal com marcação positiva para a BSP; notar expressão de BSP na matriz do novo ligamento periodontal. Aumento 20x; (c) Área de bifurcação com interface novo cemento/novo ligamento periodontal com intensa marcação para a BSP (setas brancas); notar que a interface dentina/novo cemento apresentou marcação positiva para a BSP (setas pretas). Aumento 10x; (d) Osteoblastos intensamente marcados (setas pretas) pela BSP circundando uma nova trabécula óssea. Notar que a periferia (frente mineralizadora) da trabécula apresenta maior expressão de BSP do que o restante da matriz. Aumento 20x; (e) Novas trabéculas ósseas com marcação positiva para a BSP. Aumento 20x. **Espécime controle (f-h).** (f) Interface dentina/novo cemento com marcação intensa para a BSP (setas brancas). Aumento 20x; (g) Osso pré-existente com marcação fraca para a BSP. Aumento 20x; (h) Nova trabécula óssea com matriz óssea intensamente marcada para BSP, assim como os osteoblastos ao seu redor (setas pretas). Aumento 20x. Cem – Cimento; Den - Dentina; Ncem – Novo Cimento ; Nlig - Novo Ligamento Periodontal; No – Novo Osso; O – Osso pré-existente; Tc – Tecido conjuntivo48

Figura 5.5 - **Imunolocalização da DMP1. Espécime teste (a-d).** (a) Visão panorâmica da área de bifurcação. Aumento 2x; (b) Detalhe do quadro da Figura a: Marcação positiva para DMP1 na interface novo cemento/ligamento periodontal, assim como na matriz do ligamento periodontal e nos cementócitos (seta preta) do cemento pré-existente. Aumento 20x; (c) Processo de remodelação óssea, notado pela presença de vários osteoclastos no interior (setas brancas) e na periferia da trabécula óssea (seta preta). Aumento 20x; (d) Osso pré-existente com marcação intensa para a DMP1 no citoplasma dos osteócitos.

Aumento 20x; **Espécime controle (e-h).** (e) Cementóide/novo cimento (setas brancas) moderadamente marcado pela DMP1. Aumento 20x; (f) Matriz do osso pré-existente com expressão de DMP1 na forma de grânulos, com citoplasma de osteócitos (setas pretas) e canalículos (*) que ligam os osteócitos intensamente marcados para a DMP1. Aumento 20x; (g) Nova trabécula óssea em processo de remodelação com osteoclasto (seta preta) no interior de uma lacuna de Howship. Aumento 20x; (h) Matriz do osso pré-existente com intensa marcação tanto nos prolongamentos dos osteócitos (setas pretas) quanto nos canalículos (*) entre os osteócitos. Aumento 40x. Cem – Cimento; Den - Dentina; Ncem – Novo Cimento ; Nlig - Novo Ligamento Periodontal; No – Novo Osso; O – Osso pré-existente; Tc – Tecido conjuntivo 51

Figura 5.6 - **Imunolocalização da DSP. Espécime teste (a-c).** (a) Visão panorâmica da área de bifurcação. Aumento 2x; (b) Detalhe do quadro maior da Figura a: Limite cimento pré-existente/novo cimento. Notar intensa marcação para DSP nos cementócitos (setas pretas) no interior do cimento pré-existente, no novo cimento e nos túbulos dentinários. Marcação heterogênea de fibroblastos do ligamento – alguns com marcação positiva (setas brancas) e outros negativos. Aumento 20x; (c) Detalhe do quadro menor da Figura a: Novas trabéculas ósseas em processo de remodelação, com presença de osteoclastos (setas pretas). Aumento 20x. **Espécime controle (d-h).** (d) Dentina intensamente marcada para DSP; novo cimento, alguns cementoblastos (setas pretas) e a matriz do novo ligamento periodontal se apresentam positivamente marcados. Aumento 20x; (e) Área da interface novo cimento/ligamento periodontal positivamente marcada pela DSP, assim como os túbulos dentinários e a matriz do ligamento periodontal. Aumento 20x; (f) Nova trabécula óssea com osteócitos (setas pretas) marcados positivamente pela DSP e presença de osteoclasto (seta branca) em sua periferia. Aumento 20x; (g) Marcação intensa para DSP localizada na periferia do novo osso; notar pequena trabécula óssea totalmente marcada pela DSP (seta branca). Aumento 20x; (h) Osso pré-existente com expressão de DSP no citoplasma de alguns osteócitos (setas pretas). Aumento 20x. Cem – Cimento; Den - Dentina; Ncem – Novo Cimento ; Nlig - Novo Ligamento Periodontal; No – Novo Osso; O – Osso pré-existente; Tc – Tecido conjuntivo 54

Figura 5.7 - **Imunolocalização da MEPE. Espécime teste (a-d).** (a) Visão panorâmica da área de bifurcação. Aumento 2x; (b) Detalhe do quadro maior da Figura a: limite cimento pré-existente/novo cimento. Notar marcação positiva para a MEPE na matriz do ligamento periodontal, nos cementócitos (seta preta) no interior do cimento pré-existente e em cementoblastos (setas brancas) delineando o novo cimento. Aumento 20x; (c) Nova trabécula óssea em processo de remodelação, com presença de osteoclasto (seta vermelha) e osteoblastos com marcação

heterogênea - positivos (setas pretas) e negativos (setas brancas). Aumento 20x; (d) Osso pré-existente com presença de osteócitos positivos (setas pretas) e negativos (setas brancas) para MEPE. Aumento 20x; **Espécime controle (e-h)**. (e) Limite cimento pré-existente/novo cimento. Notar marcação positiva para MEPE na matriz do ligamento periodontal. Alguns fibroblastos apresentaram marcação positiva (setas pretas) para a MEPE. Aumento 20x; (f) Novo osso com osteoclastos (setas pretas) em sua periferia. Aumento 20x; (g) Notar marcação positiva para a MEPE localizada mais na periferia do osso pré-existente. Aumento 20x; (h) Osso pré-existente com expressão de MEPE nos osteócitos (setas pretas). Aumento 20x. Cem – Cimento; Den - Dentina; Ncem – Novo Cimento ; Nlig - Novo Ligamento Periodontal; No – Novo Osso; O – Osso pré-existente; Tc – Tecido conjuntivo.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Anticorpo, fonte, origem, hospedeiro, diluição e tempo de incubação dos anticorpos primários	36
Tabela 5.1- Intensidade de marcação dos anticorpos no modelo experimental em cães – T- Grupo Teste; C - Grupo Controle; L – Face Lingual (não-tratada).....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP	proteína morfogenética óssea
BSA	albumina sérica bovina
BSP	sialoproteína óssea
CAP	proteína de ligação do cimento
CFH	fator complemento H
DMP1	proteína da matriz dentinária 1
DSPP	sialofosfoproteína da dentina
DSP	sialoproteína dentinária
DPP	fosfoproteína dentinária ou fosforina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ETA-1	fator de ativação-1 precoce de linfócitos T
H&E	hematoxilina e eosina
IGF-I	fator de crescimento semelhante à insulina – I
kDa	kiloDaltons
MEPE	fosfoglicoproteína da matriz extracelular
MMPs	metaloproteinases de matriz
OF45	fator de osteoblasto/osteócito 45
OPN	osteopontina
PDGF-BB	fator de crescimento derivado de plaquetas - BB
PTFE-e	politetrafluoretileno expandido
RDC	retalho deslocado coronariamente
RGD	domínio-seqüência composto pelos aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido aspártico
RTG	regeneração tecidual guiada
SIBLINGs	sigla, em inglês, para Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoproteins
SPP1	fosfoproteína secretada 1
TRIS-HCl	hidroximetil-amino-metano

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	milímetro
%	porcentagem
pH	potencial hidrogeniônico
μm	micrômetro
°C	graus Celsius
M	molar
$\alpha_v\beta_3$	integrina do tipo alfa-v beta 3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Enxertos de tecido ósseo e Reparação de defeitos periodontais	20
2.2 Família de proteínas SIBLING	22
2.2.1 Osteopontina (OPN/ Eta-1/ SPP1)	24
2.2.2 Sialoproteína Óssea (BSP)	25
2.2.3 Proteína da matriz dentinária 1 (DMP1/AG1)	25
2.2.4 Sialofosfoproteína da dentina (DSPP)	27
2.2.5 Fosfoglicoproteína da matriz extracelular (MEPE)	28
2.3 Caracterização de marcadores ósseos na regeneração periodontal ..	29
3 PROPOSIÇÃO	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Amostras para o Processamento Imuno-histoquímico	33
4.2 Processamento Imuno-histoquímico.....	36
4.2.1 Método de Análise das Reações Imuno-histoquímicas.....	38
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Imunolocalização da Osteopontina (OPN)	43
5.2 Imunolocalização da Sialoproteína óssea (BSP)	46
5.3 Imunolocalização da Proteína da matriz dentinária 1 (DMP1)	49
5.4 Imunolocalização da Sialoproteína dentinária (DSP)	52
5.5 Imunolocalização da Fosfoglicoproteína da matriz extracelular(MEPE) ...	55
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXO	85

1 INTRODUÇÃO

A regeneração parcial dos tecidos de suporte perdidos devido à doença periodontal pode ser alcançada, apesar das modalidades terapêuticas utilizadas para este propósito nem sempre serem previsíveis. A completa regeneração do periodonto através de procedimentos regenerativos pode ser um objetivo por vezes ilusório em diversas situações clínicas, devido, em parte, à grande complexidade de eventos biológicos, fatores e células essenciais envolvidos para se alcançar a regeneração periodontal (AAP, 2005).

O processo de reparação do periodonto em si, consiste de um fenômeno não totalmente compreendido, sendo este o grande objetivo da terapia periodontal: entender quais moléculas e em que ordem cronológica estas estão envolvidas e são necessárias para a tão desejada regeneração dos tecidos periodontais perdidos.

Visto que a doença periodontal é uma das doenças associadas à perda marcante de tecidos mineralizados, a caracterização de proteínas relacionadas à dentina, poderia estar relacionada também aos tecidos mineralizados do periodonto: o osso alveolar e o cimento.

O osso e a dentina são tecidos mineralizados que se assemelham em seus mecanismos de formação e composição por ambos serem constituídos de uma grande matriz colágena e proteínas não-colágenas. Acredita-se que as proteínas não-colágenas desempenhem um papel biológico importante na osteogênese e dentinogênese, por serem secretadas na matriz extracelular durante a mineralização destes tecidos (Butler; Ritchie, 1995; Butler, 1998; Gorski, 1998). O cimento também é um tecido mineralizado com composição semelhante ao osso. Aproximadamente 50% do cimento é composto por hidroxiapatita e o restante composto por colágeno e proteínas não-colágenas (Birkedal-Hansen et al., 1977).

A estrutura de colágeno secretada por odontoblastos e osteoblastos, na dentinogênese e osteogênese, respectivamente, é mineralizada de maneira controlada. O colágeno sozinho não é capaz de iniciar ou controlar a formação de cristais de apatita. Dessa maneira, a matriz extracelular da dentina e do osso contém proteínas não-colágenas que parecem ser responsáveis pela iniciação e modulação

da mineralização de fibras colágenas quando a pré-dentina e osteóide são convertidos, respectivamente, em dentina e osso (Qin et al., 2004).

Dentre as proteínas não-colágenas, encontra-se a família de proteínas SIBLING, composta pela osteopontina, sialoproteína óssea, proteína da matriz dentinária 1, sialofosfoproteína da dentina e fosfoglicoproteína da matriz extracelular. Esta família de glicofosfoproteínas foi inicialmente descrita e associada somente aos tecidos mineralizados. Atualmente, considera-se que elas se encontrem amplamente distribuídas e expressas em tecidos normais não-mineralizados, como células epiteliais de ductos metabolicamente ativos (Bellahcène et al., 2008).

Tendo em mente que na doença periodontal existe perda de grande quantidade de tecidos mineralizados, incluindo osso alveolar e cemento, este trabalho teve como objetivo avaliar se podemos localizar, através de avaliações imuno-histoquímicas, os membros da família SIBLING no processo de regeneração de defeitos periodontais de furca classe II, em cães. A caracterização de proteínas expressas nos tecidos periodontais possibilitaria uma melhor compreensão da atividade de marcadores de tecidos duros (osso e cemento) e moles (ligamento periodontal), diretamente envolvidos no processo de regeneração. As evidências encontradas poderiam, pelo menos em parte, esclarecer como ocorre a complexa dinâmica e os fenômenos relacionados ao processo de regeneração do periodonto.

Até o momento, nenhum trabalho na literatura demonstrou a expressão de todos os membros da família SIBLING em tratamento de defeitos de furca. A BSP e a OPN já foram caracterizadas anteriormente em trabalhos de tratamento regenerativo ósseo (Kawaguchi et al., 2001; Sculean et al., 2002) ou de furca (Ivanovski et al., 2000; Christgau et al., 2007). Já a caracterização dos dois componentes anteriormente relacionados à dentina, DMP1 e DSPP e da mais recentemente descrita, MEPE, não foram realizados em tratamentos de defeitos de furca. Devido às similaridades bioquímicas encontradas entre os membros desta família e considerando-se as propriedades dos três novos membros da família (DMP1, DSPP e MEPE), mais informações sobre como elas poderiam atuar no periodonto poderiam ser obtidas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Enxertos de tecido ósseo e Reparação de defeitos periodontais

Há várias décadas, diversas técnicas foram descritas na literatura para a obtenção de enxertos de tecido ósseo neoformado intra-orais. Enxertos ósseos autógenos têm sido empregados como ferramentas auxiliares, e com sucesso parcial, na tentativa de obter preenchimento de defeitos ósseos periodontais.

Na década de 60, Halliday (1969) foi o primeiro autor a descrever o uso de enxerto de tecido ósseo neoformado em defeitos periodontais. O sítio doador era uma área edêntula da mandíbula. Uma ferida foi criada cirurgicamente com uma trefina, de onde o osso foi removido. Após 6 a 7 semanas, o enxerto originado da lesão em cicatrização foi transplantado para o defeito. Cirurgias de reentrada foram realizadas de 7 a 9 meses depois. Os resultados foram inconclusivos, devido à diferença da configuração dos defeitos de cada paciente.

Alguns anos mais tarde, Hiatt e Schallhorn (1973) estudaram o potencial de reparação de enxertos autógenos humanos de três fontes intra-orais: de áreas edêntulas, da tuberosidade maxilar e de sítios de extração. De acordo com os autores, o grau de regeneração de um defeito ósseo, com um determinado volume e morfologia, é proporcional à quantidade de recobrimento por tecido mole e pelo número de paredes ósseas que circundam o defeito. E é inversamente proporcional à quantidade de superfície radicular presente no defeito.

Ellegaard et al. (1973) também estudaram a reparação de defeitos de furca tratados com enxerto de coágulo (com maturação de 12 a 15 semanas). Este trabalho foi pioneiro no método de indução de defeitos de furca classe III. Em 44% dos defeitos foi observado fechamento total da bifurcação. Ocorreu 38% de regeneração óssea e 34% de nova inserção (novo cemento com formação de ligamento periodontal).

A utilização do coágulo ósseo em defeitos periodontais infra-ósseos, de três pacientes, também foi demonstrada por Froum et al. (1976). De acordo com os autores, este tipo de enxerto proporciona uma regeneração óssea significativamente maior quando comparado somente à curetagem dos defeitos.

Em um estudo de Passanezi et al. (1989), foi utilizado o enxerto de tecido ósseo neoformado para tratar defeitos periodontais infra-ósseos em humanos e em defeitos de furca classe II, em cães. Nos cães, os sítios experimentais possuíam níveis mais adiantados de neoformação óssea quando comparados aos controles. Nos humanos, os resultados clínicos demonstraram que este tipo de enxerto possui grande potencial osteogênico.

Cordioli et al. (2000) realizaram, em cães, um estudo para avaliar as características histológicas de alvéolos em reparação. O lado teste recebeu membrana de PTFE-e e o lado controle não. Após 14 dias de reparação, houve preenchimento completo dos alvéolos por osso imaturo no lado teste, quando não houve exposição das membranas. No lado controle, houve formação de tecido semelhante, compreendendo desde o terço apical até quase a totalidade do alvéolo. Concluíram que os alvéolos tiveram um padrão de reparação óssea semelhante em ambos os grupos.

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa avaliaram o suposto potencial de enxerto de tecido reparativo de alvéolos em defeitos de furca classe II em cães: com uso do enxerto isolado (Yorioka, 2004); deste com complemento de RTG (Hayashi, 2004) e deste com uma combinação de fatores de crescimento (Soares et al., 2005).

Resumidamente, o primeiro trabalho deste conjunto (Yorioka, 2004) tratou defeitos de furca classe II, criados cirurgicamente, nos segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores, bilateralmente, de quatro cães. Utilizou-se somente o enxerto de tecido reparativo de alvéolos, com 5 dias de reparação, do lado teste. No lado controle houve somente instrumentação e alisamento radiculares e sutura do retalho deslocado coronariamente (RDC). Após 45 dias de reparação, os animais foram sacrificados e os espécimes foram preparados histologicamente para avaliação histomorfométrica dos tecidos periodontais (formação de epitélio juncional longo, tecido conjuntivo, novo osso, novo cimento) com auxílio de colorações de hematoxilina e eosina e tricrômico de Masson. As porcentagens médias de reparação dos defeitos (n=4), após o tratamento, foram: Tecido conjuntivo – 79,46% (C) e 69,19% (T); Novo cimento – 55,04% (C) e 47,41% (T); Novo Osso – 52,14% (C) e 49,04% (T) e Epitélio Juncional – 20,24% (C) e 30,89% (T). Concluiu-se que o uso de enxerto de tecido reparativo de alvéolos não foi capaz de acelerar a reparação dos defeitos de furca.

Já o segundo trabalho (Hayashi, 2004), de metodologia semelhante ao de Yorioka (2004), utilizou além do enxerto de tecido reparativo de alvéolos, membranas reabsorvíveis à base de ácidos poliglicólico e polilático. Da mesma maneira que o estudo anterior (Yorioka, 2004), não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

O último trabalho do nosso grupo de pesquisa (Soares et al., 2005) seguiu a mesma metodologia de Yorioka (2004), com a diferença de que os alvéolos de onde eram provenientes os enxertos de tecido reparativo foram tratados com uma combinação de fatores de crescimento: PDGF-BB (Fator de crescimento derivado de plaquetas - BB) e o IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina – I). Da mesma maneira, não houve diferença entre os grupos na formação dos tecidos periodontais.

2.2 Família de proteínas SIBLING

A família de proteínas *SIBLING* (*S*mall *I*ntegrin *B*inding *L*igand *N*-linked *G*lycoproteins) é composta por cinco genes agrupados ao longo do cromossomo 4: Sialoproteína óssea (BSP), Osteopontina (OPN), Proteína da matriz dentinária 1 (DMP1), Sialofosfoproteína da dentina (DSPP) e Fosfoglicoproteína da matriz extracelular (MEPE). O termo SIBLING se refere às características bioquímicas e genéticas em comum desta família de proteínas não-colágenas e não às suas atividades funcionais (Fisher et al., 2001; Bellahcène et al., 2008).

Dentre estas características ressalta-se o fato de: apresentarem na superfície celular o domínio RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico) - uma pequena sequência de aminoácidos que é crítica para a ligação de receptores das integrinas. As integrinas são uma grande família de receptores de adesão da superfície celular que se ligam a matriz extracelular e a ligantes da superfície celular. Elas promovem interações estáveis entre células e seu ambiente e mediam sinalizações intracelulares (Bellahcène et al., 2008).

Além das integrinas, a família de proteínas SIBLING também pode se ligar a diferentes proteínas como a família das metaloproteinases de matriz (MMPs) e fator complemento H (CFH). Estas interações permitem a localização da superfície

celular e seqüestro de MMPs e CFH pela OPN, BSP e DMP1, o que torna suas atividades celulares possíveis de serem realizadas (degradação da matriz extracelular e evasão de lise celular mediada pelo complemento, por exemplo) (Bellahcène et al., 2008).

Quatro membros com características ácidas, BSP (Fisher et al., 1983), DMP-1 (George et al., 1993), DSPP (Feng et al., 1998) e OPN (Oldberg et al., 1986) foram descobertas como proteínas abundantes dentro de matrizes mineralizadas de osso e dentina. Nos últimos anos, cada uma destas proteínas foi caracterizada como específica para tecidos esqueléticos e por ter um papel de enucleação direta de cristais de hidroxiapatita dentro dos tecidos mesenquimais, através dos seus grupos fosfato e/ou domínios aminoácidos poliácidos (George et al., 1993; Hunter et al., 1996). Já a proteína básica MEPE, foi descoberta recentemente, em associação com tumores que causam perda de fosfato (Rowe et al., 2000).

Alguns dos membros das proteínas SIBLING apresentam expressão significativamente alta em tumores epiteliais, que são conhecidos por exibirem microcalcificações patológicas e ter uma grande propensão a causar metástases ósseas (Bellahcène; Castronovo, 1997). Recentemente, foi demonstrado que todos os membros da família são expressos em células epiteliais de ductos normais, metabolicamente ativos, de glândulas salivares e rins (Ogbureke; Fisher, 2004, 2005), mas não em ductos normais metabolicamente passivos (Ogbureke; Fisher, 2007). As proteínas SIBLING são secretadas e podem ser localizadas através de interações com receptores das suas próprias superfícies celulares, permitindo atividades autócrinas, ou por difusão a curtas distâncias, a células próximas, onde podem ter função em sinalização parácrina. Portanto, as proteínas SIBLING propagam sinais biológicos. Iniciam a sinalização através das integrinas e por ligação e seqüestro de outras proteínas através da superfície celular (Bellahcène et al., 2008).

2.2.1 Osteopontina (OPN/ Eta-1/ SPP1)

O nome osteopontina foi criado para refletir o potencial desta proteína como ponte de ligação entre células e a hidroxiapatita através dos domínios RGD e do ácido poliaspártico, descobertos quando a OPN foi seqüenciada pela primeira vez (Oldberg et al., 1986). Entretanto, a OPN foi identificada em linfócitos e macrófagos e também chamada de Eta-1 (fator de ativação-1 precoce de linfócitos T) (Patarca et al., 1989). Outro nome alternativo foi criado, fosfoproteína secretada 1 (SPP1), com o intuito de demonstrar o papel funcional variado que a proteína pode ter. Entretanto, o termo osteopontina ainda é a nomenclatura mais utilizada.

Apesar da osteopontina estar presente em tecidos mineralizados, em quantidades relativamente grandes, ela também é encontrada em níveis relativamente elevados em uma variedade de células e tecidos não-mineralizados como rins, cérebro e útero (Sodek et al., 2000; Qin et al., 2004). Em tecidos mineralizados, a OPN é expressa em osso, cimento, pré-dentina e dentina terciária. No tecido ósseo, a OPN é expressa por osteoblastos diferenciados e osteócitos (McKee; Nanci, 1995; Sodek et al., 1995) e também por osteoclastos (Dodds et al., 1995). Alguns estudos *in vitro* demonstraram que a OPN é um inibidor eficaz da formação e crescimento da apatita (Boskey et al., 1993; Hunter et al., 1994; Wada et al., 1999).

A OPN está presente na matriz extracelular do dente, residindo principalmente no cimento (McKee et al., 1996; D'Errico et al., 1997; Bosshardt et al., 1998). Tanto o cimento celular quanto o acelular contêm níveis abundantes de OPN, sendo até substancialmente maiores do que no tecido ósseo, principalmente o cimento acelular. O acúmulo de OPN no cimento ocorre entre as fibras de colágeno, podendo guiar e estabilizar o padrão de mineralização interfibrilar dentro deste tecido. Um acúmulo adicional da OPN também pode ser observado na junção dentina-cimento, um local onde proteínas não-colágenas do cimento se acumulam em um padrão variado, de acordo com a topografia da superfície e o preenchimento das fibrilas colágenas da dentina (McKee et al., 1996; Bosshardt et al., 1998).

2.2.2 Sialoproteína óssea (BSP)

A sialoproteína óssea foi inicialmente caracterizada por Fisher et al. (1983). A seqüência primária da BSP foi descoberta do cDNA de rato e contém 303 aminoácidos (Oldberg et al., 1988).

A sialoproteína óssea é expressa principalmente em osso, cartilagem em mineralização, cimento e dentina (Oldberg et al., 1988; Bianco et al., 1991; Somerman et al., 1991; Chen et al., 1993; Moses et al., 2006; Huang et al., 2008b). Entretanto, os níveis de expressão em cartilagem, dentina e esmalte são muito menores do que em osso recém-formado e cimento (Chen et al., 1992; Shen et al., 1995). As funções biológicas da BSP em tecidos mineralizados ainda são desconhecidas. Alguns trabalhos sugerem que a BSP aja como um enucleador na formação inicial de cristais de hidroxiapatita (Hunter; Goldberg, 1993).

Apesar da BSP não ser claramente evidenciada em pré-osteoblastos, ele é facilmente detectado em osteoblastos de osso embrionário (Bianco et al., 1991; Chen et al., 1991) e em osteócitos (Shapiro et al., 1993; Arai et al., 1995), sugerindo que o gene da BSP seja induzido quando osteoblastos são gerados. De maneira similar, uma análise detalhada da formação de cimento mostrou que o gene da BSP é ativado com a diferenciação dos cementoblastos e que altos níveis de expressão desta são associados com uma formação precoce e rápida de matriz de cimento mineralizada (MacNeil et al., 1994; MacNeil et al., 1996).

Na dentina, a BSP foi localizada em odontoblastos e seus processos e na dentina peritubular, mas também por condrócitos hipertróficos e trofoblastos da placenta (Young et al., 1992). A BSP pode também contribuir com a atividade de osteoclastos através das integrinas da superfície celular (Ross et al., 1993; Razzouk et al., 2002).

2.2.3 Proteína da matriz dentinária 1 (DMP1/AG1)

A proteína da matriz dentinária 1 foi a primeira proteína não-colágena identificada a partir da matriz dentinária, através de cDNA de um complexo de

fibroblastos e odontoblastos da polpa de ratos (George et al., 1993). Inicialmente foi chamada de AG1 e depois denominada DMP1.

A DMP1 é uma fosfoproteína ácida expressa predominantemente na dentina, osso e cimento (George et al., 1993; MacDougall et al., 1998). Tecidos não-mineralizados como cérebro, rins, pâncreas e glândulas salivares também mostraram expressão de DMP1, mas em níveis menores (Terasawa et al., 2004).

Assim como a DSPP, a DMP1 na matriz extracelular do osso e da dentina é processada proteoliticamente em duas formas distintas: em um fragmento N-terminal (de 37kDa) e outro C-terminal (de 57kDa) (Qin et al., 2003). Recentemente, a forma completa da DMP1 foi identificada na matriz extracelular da dentina e do osso de ratos, mas em uma concentração muito menor do que os dois fragmentos processados (Huang et al., 2008a).

Além de participar do processo de mineralização, a DMP1 modula a expressão gênica em células mesenquimais embrionárias, regulando a expressão de marcadores moleculares específicos de osteoblastos e de linhagem de odontoblastos como a osteocalcina, a fosfatase alcalina e a DSPP (Narayanan et al., 2001).

Estudos imuno-histoquímicos e de hibridização *in situ* têm sido empregados para estudar a expressão de DMP1. Estudos mostraram que a DMP1 era predominantemente expressa em osteócitos e osteoblastos maduros de ratos e camundongos (Toyosawa et al., 2001; Feng et al., 2003). A maioria dos sinais da proteína DMP1 foi localizada na matriz pericelular de osteócitos, incluindo seus processos celulares (Toyosawa et al., 2001). Algum tempo depois, o mesmo grupo (Toyosawa et al., 2004) estudou a expressão da DMP1, em ratos, durante a formação da dentina radicular e demonstrou a localização dela em cementócitos e no cimento.

O estudo de Baba et al. (2004b) comparou a expressão de DMP1 e DSP em estágios avançados do desenvolvimento de molares de ratos. A DMP1 foi encontrada principalmente nos túbulos dentinários e odontoblastos maduros em estágios avançados de desenvolvimento dentário. Esse padrão de distribuição foi coincidente com a expressão de DSP nos túbulos dentinários, odontoblastos e pré-dentina, indicando que ambas as proteínas podem ter função complementar e/ou sinérgica no desenvolvimento e na manutenção dos dentes.

2.2.4 Sialofosfoproteína da dentina (DSPP)

A sialofosfoproteína da dentina (DSPP) é uma das proteínas não-colágenas envolvidas no processo de desenvolvimento e mineralização dentários (Butler; Ritchie, 1995). A DSPP é proteoliticamente processada em duas proteínas principais encontradas na dentina humana: a sialoproteína dentinária (DSP) e a fosfoproteína dentinária ou fosforina (DPP) (MacDougall et al., 1997; George et al., 1999). Ambas possuem papéis distintos durante a mineralização da dentina: A DSP regularia o início da mineralização da dentina e a DPP estaria envolvida no estágio de maturação da dentina mineralizada (Suzuki et al., 2009). Originalmente, pensava-se que o gene da DSPP fosse expresso somente por odontoblastos na formação da dentina (MacDougall et al., 1997), mas também é expresso em níveis baixos em osso (Qin et al., 2002) e em células epiteliais de ductos de glândulas salivares metabolicamente ativas (Ogbureke; Fisher, 2004, 2005, 2007).

Duas classes de desordens dentinárias têm sido diretamente correlacionadas com mutações da DSPP: a dentinogênese imperfeita e a displasia dentinária, que são doenças não-sindrômicas da dentina e autossômicas dominantes (Hart; Hart, 2007; McKnight et al., 2008a; McKnight et al., 2008b). Clinicamente, estas doenças são caracterizadas por dentes opacos e amarronzados, com esmalte com uma grande propensão à fraturas durante a mastigação devido à dentina defeituosa logo abaixo, que se torna vulnerável à um rápido desgaste e cáries.

O trabalho de Qin et al. (2002) demonstrou que a presença de DSP em osso longo de ratos é muito similar à da dentina, mas diferente em quantidade: a quantidade de DSP no osso é 1/400 em relação à dentina. Essa diferença marcante no nível de expressão entre osso e dentina sugere que os mecanismos regulatórios da DSP entre esses dois tecidos seja diferente e que este gene possa ter importância na osteogênese, mesmo que em níveis baixos.

O primeiro trabalho a identificar a presença da DSP no periodonto foi o de Baba et al. (2004a). Através de análise imuno-histoquímica, com anticorpos mono e policlonais, em ratos, os autores puderam caracterizar a presença da DSP, não somente em odontoblastos, matriz extracelular da dentina e pré-ameloblastos, mas também no osso alveolar, cemento celular, osteócitos, cementócitos e suas

matrizes. Os resultados da hibridização *in situ* confirmaram os resultados obtidos pela análise imuno-histoquímica, demonstrando a expressão da DSP em osteoblastos do osso alveolar, fibroblastos do ligamento periodontal e cementoblastos do cemento celular. A presença da DSP em sítios ativos de formação radicular e de tecido ósseo poderiam sugerir funções importantes da DSP no periodonto em desenvolvimento. Dessa maneira, os autores especulam que a DSP estaria envolvida não somente na formação das estruturas dentárias, mas também na formação do periodonto.

2.2.5 Fosfoglicoproteína da matriz extracelular (MEPE)

A fosfoglicoproteína da matriz extracelular foi o último membro da família SIBLING a ser descoberto. É uma proteína glicosilada que foi originalmente clonada de tumores de pacientes com osteomalácia hipofosfatêmica oncogênica, que é uma síndrome rara de raquitismo e hipofosfatemia associada a um tumor coexistente (Rowe et al., 2000).

Além disso, a MEPE parece estar associada com a mineralização óssea. Em estudos *in vitro*, com células de ratos e camundongos (Petersen et al., 2000; Argiro et al., 2001), a MEPE ou o fator de osteoblasto/osteócito 45 (OF45), demonstrou ser expresso, especificamente, no tecido ósseo e, em níveis elevados, principalmente durante a mineralização da matriz, mediada por osteoblastos derivados da medula óssea. Osteócitos dentro das trabéculas ósseas também expressaram a MEPE (Petersen et al., 2000).

Em ratos e camundongos, foi demonstrado que a MEPE/OF45 tem expressão aumentada durante a diferenciação de osteoblastos (Argiro et al., 2001; MacDougall et al., 2002), mas com o maior nível de expressão encontrado nos osteócitos de camundongos.

O primeiro estudo que evidenciou a presença da MEPE em tecido ósseo humano foi o de Nampei et al. (2004). Através de análises imuno-histoquímicas, este grupo de autores pôde caracterizar a presença marcante da MEPE em osteócitos, mas não em osteoblastos de pacientes normais. Entretanto,

em pacientes com osteomalácia e osteoporose, a MEPE estava especificamente localizada em osteócitos embebidos nas trabéculas ósseas.

A possível modulação da MEPE em osteócitos submetidos a forças/cargas mecânicas foi estudado por Gluhak-Heinrich et al. (2007). Através de movimentação ortodôntica em ratos, de 6 horas a 7 dias, observou-se que os osteócitos dos alvéolos demonstraram altos níveis basais que diminuíram durante o primeiro dia de carga aplicada, seguido de um aumento de 2.8 vezes no terceiro dia e de retorno aos níveis controle no sétimo dia. Nenhuma expressão da MEPE em osteoblastos foi observada tanto antes quanto após a aplicação da carga mecânica.

Siggelkow et al. (2004) demonstraram através de cultura de osteoblastos humanos que, em contraste com resultados encontrados em camundongos (Argiro et al., 2001), a expressão de MEPE foi progressivamente diminuída em osteoblastos cultivados sob condições de diferenciação adaptada, desenvolvidos por Owen et al. (1991) para células da calvária de ratos. A MEPE parece exercer sua atividade máxima durante a proliferação e a fase inicial de maturação da matriz óssea.

Em contrapartida, o trabalho de Chen et al. (2008) conseguiu caracterizar a presença da MEPE tanto no citoplasma, quanto no núcleo de duas linhagens de osteoblastos de ratos.

2.3 Caracterização de marcadores ósseos na regeneração periodontal

Até o momento, nenhum trabalho na literatura caracterizou a presença de todos os membros da família SIBLING em tratamentos regenerativos periodontais. Algumas proteínas, como a BSP e a OPN, já foram descritas em diversos trabalhos do gênero, principalmente por serem conhecidas há mais tempo e terem suas propriedades e funções mais estudadas através de trabalhos anteriores.

Alguns trabalhos publicados desde a década de noventa avaliaram o processo de reparação em defeitos de furca, tanto através da imunolocalização de componentes da matriz extracelular (Matsuura et al., 1995; Amar et al., 1995; Amar et al., 1997), quanto através de histometria dos tecidos periodontais, após tratamento regenerativo (Bogle et al., 1997).

Matsuura et al. (1995) realizou um dos primeiros trabalhos onde se obteve informações sobre a expressão seqüencial de componentes da matriz extracelular. Defeitos de furca classe III de cães foram tratados com regeneração tecidual guiada (RTG). A expressão de fibronectina e vitronectina foram detectadas no tecido de granulação no início do processo de reparação. Já após 4 e 8 semanas, o colágeno tipo I, fibronectina e vitronectina estavam presentes em tecido conjuntivo, novo ligamento periodontal, cimento e osteóide. A osteonectina foi detectada tanto em tecidos moles (novo ligamento) quanto em tecidos duros (cimento e osso), enquanto a sialoproteína óssea foi encontrada somente a novo cimento e osso. Mas curiosamente, a BSP também foi detectada no ligamento periodontal em áreas adjacentes a formação óssea ativa.

Biópsias retiradas debaixo de membranas de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) em dentes humanos já condenados, foram avaliadas por Amar et al. (1995). Foi demonstrada a imunolocalização de osteonectina em áreas de condensações celulares, da sialoproteína óssea tanto em tecidos duros como moles e da fosfatase alcalina nas superfícies celulares da membrana. O mesmo grupo investigou alguns anos depois (Amar et al., 1997) a presença de marcadores de osso e cimento em defeitos periodontais proximais e na face palatina de incisivos de macacos tratados com RTG (membranas de PTFE-e). A marcação por osteonectina, sialoproteína óssea e a proteína de ligação do cimento (CAP) foi observada na área de tecido conjuntivo adjacente ao novo tecido duro. A BMP-2 e -4 concentraram-se em áreas de condensação celular, no novo tecido duro formado. A osteopontina teve padrão semelhante à BMP-2, mas predominantemente na matriz de tecido duro. Os autores sugerem que os tecidos em formação abaixo da membrana contém células e macromoléculas normalmente associadas ao osso e cimento.

Já Bogle et al. (1997) demonstraram que a RTG com membrana reabsorvível proporcionou regeneração (novo osso, cimento e ligamento periodontal) de 71% de defeitos de furca classe II comparado com 14% de regeneração nos sítios controle, através de histometria dos tecidos periodontais em cães.

A partir da última década, outros estudos imunohistoquímicos continuaram a investigar esse assunto que ainda é não é totalmente compreendido (Ivanovski et al., 2000; Kawaguchi et al., 2001; Christgau et al., 2007).

Desta maneira, Ivanovski et al. (2000) decidiu investigar, além da presença de marcadores de tecidos moles (colágeno tipo I, III, decorin, biglican), a presença de uma maior quantidade de marcadores de tecidos duros como osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, a BMP-2 e a BMP-4 após RTG em defeitos de furca classe II em cães. O colágeno tipo I foi localizado predominantemente dentro do osso em regeneração enquanto o colágeno tipo III se encontrava no tecido conjuntivo do defeito. A marcação para decorin e biglican foi fraca dentro da matriz extracelular do tecido conjuntivo em regeneração. Já a osteopontina e a sialoproteína óssea foram fortemente encontradas no osso e cimento em regeneração, assim como no cimento maduro. A osteocalcina estava presente tanto no cimento maduro e em regeneração e nos cementoblastos e fracamente marcado no osso em regeneração quando comparado ao osso maduro.

Já o trabalho de Kawaguchi et al. (2001), sugeriu que o acúmulo tanto de sialoproteína óssea quanto de osteopontina seria um evento primário durante a formação de novo cimento em superfícies radiculares desnudadas, em ratos.

Recentemente, o estudo de Christgau et al. (2007) comparou tratamentos de defeito de furca classe II naturais, em cães, que foram tratados com cirurgia à retalho somente ou com o uso de RTG (membranas reabsorvíveis e não-reabsorvíveis). A expressão de colágeno tipo I e III, fibronectina, sialoproteína óssea e osteopontina foram avaliadas através de imunohistoquímica. Após 2 semanas, o defeito foi preenchido com tecido de granulação e fibronectina. Este tecido foi gradualmente substituído por tecido conjuntivo que expressou fibronectina e colágeno tipos I e III. Tanto osteoclastos quanto odontoclastos reabsorveram osso e cimento, respectivamente e expressaram osteopontina. As superfícies óssea e do cimento demonstraram forte marcação tanto para BSP quanto OPN. Em um momento mais adiantado do processo de reparação (a partir de 4 semanas), o novo osso e cimento apresentaram deposição de colágeno tipo I, fibronectina, BSP e OPN. Já o novo ligamento periodontal expressou fibronectina, colágeno tipo I e III, mas não demonstrou marcação tanto para BSP quanto para OPN.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como proposta:

Avaliar, através de análise imuno-histoquímica, a localização e o padrão de marcação da família de proteínas SIBLING (Sialoproteína óssea, Osteopontina, Proteína da matriz dentinária 1, Sialofosfoproteína da dentina e Fosfoglicoproteína da matriz extracelular) em defeitos de furca tratados ou não com enxerto de tecido reparativo de alvéolos dentários, após 45 dias de reparação, em cães.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras para o Processamento Imuno-histoquímico

As amostras utilizadas neste estudo foram provenientes de um estudo anterior (Yorioka, 2004) aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – USP – protocolo 155/2002 (Anexo A).

Foram utilizados 4 cães de porte médio, sem raça definida, com idade entre 3 e 4 anos. Resumidamente, os defeitos de furca foram divididos aleatoriamente em 2 grupos e tratados da seguinte forma:

GRUPO I – Retalho de espessura total deslocado coronariamente (RDC) com instrumentação e alisamento radiculares – **CONTROLE**;

GRUPO II – Retalho de espessura total deslocado coronariamente com instrumentação e alisamento radiculares, mais a colocação de um enxerto de tecido reparativo de alvéolo dental em reparação, do próprio cão – **TESTE**.

Em cada cão, utilizamos os segundos, os terceiros e quartos pré-molares inferiores direitos e esquerdos, num esquema de boca dividida (*split-mouth*).

No dia denominado -5 (menos cinco), os cães foram submetidos à anestesia geral e submetidos à extração dos segundos e terceiros pré-molares superiores direitos e esquerdos. Para isto, foram realizados retalhos de espessura total com excisão de margem e incisões relaxantes divergentes para o fundo do vestibulo para que estes retalhos fossem deslocados coronariamente até que houvesse o fechamento completo dos alvéolos no momento da sutura.

Cinco dias após as exodontias, no dia denominado 0 (zero), os cães foram novamente anestesiados. Foram realizados retalhos de espessura total com excisão de margem, na face vestibular, para exposição das áreas de furca dos segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores, bilateralmente. Foram criados cirurgicamente, por meio de instrumentos rotatórios e cinzéis de Ochsenbein, defeitos de furca classe II com as seguintes dimensões: 5 mm de altura (a partir do teto da bifurcação), 5 mm de largura no sentido méso-distal e 4 mm de profundidade

no sentido vestibulo-lingual (Figura 4.1). Os defeitos foram padronizados com o auxílio de um dispositivo que tinha as mesmas dimensões desejadas para os defeitos (Figura 4.2).

Figura 4.1 – Esquema do defeito de furca classe II

Figura 4.2 – Dispositivo (A); utilização do dispositivo na padronização dos defeitos (B)

As superfícies radiculares expostas foram devidamente desbridadas com instrumentos manuais e com aparelho de ultrassom¹ para remoção de todo cimento radicular. Marcas sobre as superfícies radiculares foram realizadas junto aos limites do defeito e na junção esmalte-cimento para servirem como referência para a análise microscópica. Foi realizada também uma marca na coroa dental, acima do teto da furca, como referência para os cortes histológicos.

Posteriormente à criação dos defeitos de furca, procedeu-se a coleta do tecido reparativo dos alvéolos a ser enxertado nestes defeitos. Foram removidos os pontos de sutura da região das extrações e elevados os retalhos. O tecido reparativo dos alvéolos foi cuidadosamente removido com o auxílio de delicadas espátulas e mini-curetas de haste longa. Este tecido foi imediatamente aparado e inserido nos três defeitos de furca criados de um dos lados da mandíbula, escolhido aleatoriamente. O outro lado serviu como controle. Os retalhos foram deslocados coronariamente, recobrando quase que totalmente as coroas clínicas dos pré-molares e suturados.

Após todos os procedimentos cirúrgicos foram administrados antibióticos e antiinflamatórios para se minimizar o risco de infecções pós-

¹ Mini Piezon®, EMS

operatórias e um meticuloso controle de placa com aplicação tópica diária, por meio de spray, de solução de digluconato de clorexidina a 0,12%² durante todo o período experimental.

Após 45 dias da criação e tratamento dos defeitos, os cães foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento da anestesia geral. Após a perfusão da cabeça dos animais com solução fixadora de paraformaldeído a 10%, as mandíbulas foram dissecadas e seccionadas em seis espécimes em bloco, contendo um dente controle ou teste cada. As marcas de referência realizadas no esmalte das coroas foram aprofundadas até a câmara pulpar para que continuassem evidentes após a descalcificação. Os espécimes foram fixados em paraformaldeído a 10% por 24 horas e descalcificados em solução de ácido etilenodiaminotetracético³ (EDTA) a 10% - pH 7.8, em um aparelho de microondas⁴. O frasco contendo os espécimes e o EDTA era parcialmente imerso em gelo, para que se mantivesse constante a temperatura em 33° C. A descalcificação completa ocorreu, aproximadamente, após 80 horas de realização do processo descrito acima, dependendo de cada cão.

Foram realizadas tomadas radiográficas de todos os espécimes para determinarmos o plano de corte do dente no sentido vestibulo-lingual, já que nem sempre o meio da coroa corresponde ao ponto onde as raízes se separam (meio da bifurcação).

Os dentes foram cortados no sentido vestibulo-lingual, incluídos em parafina e codificados para cegamento do experimento. Neste trabalho utilizamos dois blocos de parafina de cada cão, contendo um espécime do grupo teste (n=4) e um do grupo controle (n=4), contendo as raízes distais dos terceiros pré-molares direitos e esquerdos. Portanto, para cada anticorpo utilizamos quatro cortes histológicos para o grupo teste e quatro para o grupo controle. Os blocos com os dentes em parafina foram seccionados em micrótomo com 5µm de espessura. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro silanizadas (SuperFrost® Plus) para evitar que estes se soltassem durante o processamento histológico, especialmente por se constituir de tecido duro como dentina e osso.

² Periogard®, Colgate-Palmolive

³ Titriplex® III - Merck

⁴ Pelco 3441 Laboratory Microwave System – Ted Pella Inc. Redding, California

4.2 Processamento Imuno-histoquímico

Todo o processamento imuno-histoquímico foi realizado nas dependências do Laboratório de Pesquisa da School of Dentistry and Oral Health da Griffith University – Gold Coast – Austrália.

Os anticorpos primários policlonais utilizados neste trabalho foram gentilmente desenvolvidos e cedidos pelo Prof. Larry W. Fisher (National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), sendo eles: Sialoproteína óssea (LF-84), Osteopontina (LF-166), Proteína da matriz dentinária 1 (LF-148), Sialoproteína dentinária (LF-151) e Fosfoglicoproteína da matriz extracelular (LF-155). Vale ressaltar que utilizamos o anticorpo primário para a sialoproteína dentinária (DSP), para fins de identificação da sialofosfoproteína da dentina (DSPP).

Eles foram diluídos em albumina sérica bovina (BSA) (Sigma Aldrich®) a 1% com concentrações (otimizadas através de experimentos pilotos prévios) específicas para cada marcador e incubados de 1 hora a 1 hora e meia, de acordo com a tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Anticorpo, fonte, origem, hospedeiro, diluição e tempo de incubação dos anticorpos primários

Anticorpo	Fonte	Origem do antígeno	Hospedeiro	Diluição	Tempo de incubação
Sialoproteína Óssea	LF-84	Humano	Coelho	1:750	90'
Osteopontina	LF-166	Humano	Coelho	1:250	60'
Proteína da matriz dentinária 1	LF-148	Humano	Coelho	1:500	60'
Sialoproteína dentinária	LF-151	Humano	Coelho	1:100	60'
Fosfoglicoproteína da matriz extracelular	LF-155	Humano	Coelho	1:400	60'

Todas as reações de imuno-histoquímica foram realizadas manualmente e em temperatura ambiente. O seguinte protocolo para o processamento imuno-histoquímico foi seguido:

1. Antes do início do processamento, as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C para derreter levemente a parafina. Os cortes dos espécimes foram delimitados com caneta liquid blocker - Super pap pen (Daido Sangio Co., Tokyo, Japan) para evitar extravasamento dos produtos incubados em cada corte histológico.

2. Os cortes histológicos foram então desparafinizados em xilol (1 banho de 30 minutos a 60°C seguido de banho de 20 minutos em temperatura ambiente).

3. Reidratação em série de etanol em concentrações descendentes (3 vezes em etanol absoluto 95% e 85%) em banhos de 5 minutos cada, seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 banhos de imersão em água destilada.

4. Foi realizado banho de 10 minutos em hidróxido de amônio (Sigma Aldrich®) a 10% em etanol 95% para remoção de pigmentos formólicos, seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 banhos de imersão em água destilada.

5. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 6% (Chem Supply®) em metanol (Merck®) na proporção 1:1, em 2 banhos de 15 minutos cada. Posteriormente realizou-se lavagem em água corrente por 10 minutos, 2 banhos de imersão de água destilada e 2 banhos de 5 minutos cada em solução tampão de TRIS-HCl (hidroximetil-amino-metano - Merck®) a 0,5M, pH 7.4.

6. O bloqueio de reações em sítios antigênicos inespecíficos foi realizado com soro suíno normal (X0901- Dako® Denmark A/S, Glostrup, Denmark) a 10% diluído em albumina sérica bovina (BSA- Sigma Aldrich®) a 1%, em câmara úmida, por 60 minutos (para OPN, DMP-1, DSP e MEPE) ou 90 minutos (para a BSP). Após o bloqueio foi realizado banho de imersão em solução de TRIS-HCl a 0,5M, pH 7.4.

7. Incubação com os anticorpos primários contra OPN, DMP-1, DSP e MEPE por 60 minutos, e para a BSP por 90 minutos, seguido de 2 banhos de 3 minutos cada com solução TBST (solução tampão de TRIS-HCl 0,5M, pH 7.6 acrescida de Tween 1%) e um banho de 3 minutos com TRIS-HCl a 0,5M , pH 7.4.

8. Incubação com o anticorpo secundário – em frasco comercial pronto para uso (Dako® Biotinylated Link - LSAB®System HRP K0690 – Dako Corp.,

Carpenteria, CA, USA) por 15 minutos, seguido de 2 banhos de 3 minutos cada com TBST e um banho de 3 minutos com TRIS-HCl a 0,5M , pH 7.4.

9. Incubação com o complexo terciário estreptavidina-biotina (Dako® Streptavidin-HRP - LSAB® System HRP K0690 – Dako Corp., Carpenteria, CA, USA) por 30 minutos, seguido de 2 banhos de 3 minutos cada com TBST e um banho de 3 minutos com TRIS-HCl a 0,5M, pH 7.4.

10. Revelação da reação com diaminobenzidina (Dako® Liquid DAB + Substrate Chromogen System K3467 – Dako Corp., Carpenteria, CA, USA) por 5 minutos, seguido de banho de imersão de TRIS-HCl a 0,5M, pH 7.4 e contra-coloração com Hematoxilina de Mayer (Sigma Aldrich®) por 10 minutos.

11. Desidratação dos cortes histológicos em série de etanol com concentrações crescentes (70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 3 vezes em etanol absoluto) em banhos de 5 minutos cada. Em seguida os cortes foram diafanizados em 2 banhos de xilol de 5 minutos cada.

12. As lâminas foram montadas manualmente com lamínulas de vidro e cola para montagem de lâminas (Pertex®, Germany).

Cortes contendo espécimes com os defeitos de furca do próprio cão foram usados como controle negativo. Estes cortes foram tratados com os mesmos procedimentos descritos acima exceto pela omissão dos anticorpos primários (uso de TRIS-HCl pH 7.4 somente). Controles negativos foram incluídos em cada experimento realizado.

4.2.1 Método de Análise das Reações Imuno-histoquímicas

Após o processamento imuno-histoquímico, todas as lâminas com os espécimes foram escaneadas através do aparelho de escaner Scanscope® GL System (Aperio Technologies, Inc., CA, USA). As imagens digitalizadas foram analisadas através do programa Aperio ImageScope® Viewer Software (Aperio Technologies, Inc., CA, USA), uma nova tecnologia que dispensa o uso do microscópio óptico para a análise das lâminas. Uma lâmina foi escaneada por vez,

com uma objetiva Olympus® UPLSAPO20x com especificações 20x/0.75 Plan Apo, acoplada ao escaner. O escaneamento completo de cada lâmina levou cerca de dois minutos, com uma magnificação de 20x e com uma resolução de 0.50µm/pixel. Este programa de imagens permite a análise de várias lâminas ao mesmo tempo, podendo-se melhor comparar o padrão de marcação das proteínas.

Uma observadora previamente calibrada e cega, aos grupos analisados, identificou a presença ou ausência de marcação para cada proteína, assim como o padrão de marcação e localização destas proteínas tanto nos tecidos reparativos neoformados (lado vestibular) quanto nos tecidos pré-existentes (lado lingual) de cada espécime. Toda a extensão do defeito foi avaliada e o padrão de marcação observado foi determinado. Foi então realizada uma média do padrão de marcação para os espécimes dos grupos controle e teste. A metodologia de análise do padrão de marcação das proteínas foi subjetiva e baseada nos trabalhos de Ivanovski et al. (2000) e Christgau et al. (2007).

Consideramos o seguinte padrão de marcação de valores (scores) para as proteínas analisadas: **0 - sem marcação (negativa); + - marcação fraca; ++ - marcação moderada; +++ - marcação forte e H - indica marcação heterogênea da proteína dentro da população celular** (quando parte das células estão marcadas e parte são negativas dentro da mesma população celular analisada). Esta escala subjetiva pode ser visualizada de acordo com os exemplos ilustrados nas figuras 4.3 e 4.4 .

Figura 4.3 – Área de novo osso (No) após reação imuno-histoquímica. Alguns osteoblastos se apresentam **negativos** (setas brancas); o centro da matriz óssea apresenta marcação **fraca** e a periferia da matriz apresenta marcação **moderada** (*). Osteoblastos delineando a parte inferior da matriz apresentam marcação **forte** (setas pretas). Aumento 20x

Figura 4.4 – Área do ligamento periodontal. Aspecto observado quando consideramos **marcação heterogênea** dentro de uma população celular: alguns fibroblastos estão fortemente marcados (setas pretas) e outros não expressaram a proteína, considerados então negativos (setas brancas). Aumento 20x

No lado tratado cirurgicamente (vestibular) os seguintes tecidos foram avaliados: **Novo osso** (osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, osteóide/novo osso medular, linhas de crescimento/reversão e prolongamentos celulares dos osteócitos), **Novo cimento** (cementoblastos, cementócitos, odontoclastos, interface cimento pré-existente/novo cimento, interface novo cimento/ligamento periodontal e cementóide/novo cimento), **Novo ligamento periodontal** (fibroblastos e matriz) e **Tecido conjuntivo gengival** (fibroblastos e matriz).

No lado pré-existente (lingual) os seguintes tecidos foram avaliados: **Osso pré-existente** (osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, osso lamelar pré-existente e prolongamentos celulares dos osteócitos), **Cimento pré-existente** (cementoblastos, cementócitos, odontoclastos, cimento pré-existente), **Ligamento periodontal pré-existente** (fibroblastos e matriz) e **Tecido Conjuntivo Gengival** (fibroblastos e matriz).

5 RESULTADOS

Os períodos pós-operatórios (tanto após as exodontias quanto após a criação e tratamento dos defeitos) transcorreram sem intercorrências, para todos os animais, de ambos os grupos.

Houve formação de novo cemento e tecido conjuntivo em todos os espécimes. A formação de novo osso foi observada pela presença de trabéculas ósseas jovens, ainda não totalmente fusionadas, circundadas por vários osteoblastos ativos. Vários osteócitos foram observados no interior da matriz óssea das trabéculas. Osteoclastos foram encontrados isoladamente ou em grupos na superfície das trabéculas ósseas, demonstrando áreas de remodelação óssea.

Não houve detecção de nenhum dos anticorpos da família de proteínas SIBLING nos controles negativos das reações imuno-histoquímicas (Figura 5.1).

Após a utilização de anticorpos policlonais altamente purificados, fomos capazes de caracterizar a presença de todos os membros da família SIBLING no periodonto regenerado e na face lingual (não-tratada), de acordo com a tabela 5.1.

O aspecto geral dos espécimes pode ser visualizado na figura 5.2.

Figura 5.1 – Visão panorâmica do defeito em um controle negativo, com omissão do anticorpo primário, de espécime do grupo teste. No – Novo Osso; O – Osso pré-existente. Aumento 2x

Figura 5.2 – Visão panorâmica do defeito criado – Neste espécime do grupo teste foi realizada reação imuno-histoquímica para a BSP. Observar nítida diferença no padrão de marcação entre a região de novo osso (No) e osso pré-existente (O). Aumento 2x

Tabela 5.1 – Intensidade de marcação dos anticorpos no modelo experimental em cães. T- Grupo Teste; C - Grupo Controle; L – Face Lingual (não-tratada)

	OPN			BSP			DMP1			HSP			MEPE		
	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L
OSSO															
Osteoblastos	++(H)	+(H)	+(H)	++(H)	++(H)	+(H)	++(H)	++(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+++ (H)	++(H)	+++ (H)
Osteócitos	+(H)	0	0	++	++	+(H)	+++	+++	+++	++(H)	++(H)	+(H)	++(H)	++(H)	+++ (H)
Osteoclastos	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Osteóide/Novo Osso medular	++	++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	++	++	-	++	++	-
Linhas de crescimento/reversão	++	++	-	+++	+++	-	++	++	-	+	+	-	++	++	-
Osso lamelar pré-existente	-	-	+	-	-	+	-	-	++(H)	-	-	+	-	-	+
Prolongamento dos Osteócitos	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0
CEMENTO															
Cementoblastos	+(H)	+(H)	+(H)	0	0	0	+(H)	+(H)	+(H)	++(H)	+(H)	0	+(H)	+(H)	+(H)
Cementócitos	+	+	+	+(H)	0	0	++(H)	+(H)	++(H)	++	++	++(H)	++(H)	++(H)	+++ (H)
Odontoclastos	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Interface cimento pré-existente/Novo cimento	+++	+++	-	+++	+++	-	++	++	-	++	+	-	++	++	-
Interface novo cimento/Ligamento periodontal	++	++	-	++	++	-	++	++	-	++	++	-	++	+++	-
Cementóide/Novo Cimento	+++	+++	-	++	++	-	++	++	-	++	++	-	++	++	-
Cimento pré-existente	-	-	++	-	-	+	-	-	0	-	-	0	-	-	0
LIGAMENTO PERIODONTAL															
Matriz conjuntiva	++	+	+	++	+	+	+	+	+(H)	+	+	+	++	++	++
Fibroblastos	++(H)	+(H)	++(H)	0	0	0	0	0	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)
TECIDO CONJUNTIVO GENGIVAL															
Matriz conjuntiva	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	+	+	+
Fibroblastos	+(H)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+(H)	+(H)	+(H)	+(H)	0

0 - negativa

+ - | fraca |

++ - | moderada |

+++ - | forte |

5.1 Imunolocalização da Osteopontina (OPN)

Dentre os espécimes dos grupos teste e controle, no limite cimento pré-existente/novo cimento, foi marcante a expressão da OPN, assim como no limite da dentina com o novo cimento e na matriz do novo cimento (Figura 5.3 b). Notamos, na maioria dos espécimes, reabsorções da dentina e conseqüente formação de novo cimento sobre esta dentina reabsorvida. Esta interface demonstrou forte expressão da OPN (Figura 5.3 c). Da mesma maneira, a interface novo cimento/ligamento periodontal foi marcada positivamente (Figura 5.3 c). Cementoblastos e cementócitos tiveram a mesma marcação para a OPN, em ambos os grupos e na face lingual (não-tratada) (Tabela 5.1).

Células multinucleadas, geralmente presentes no processo de remodelação, como osteoclastos (Figura 5.3 d) e odontoclastos apresentaram marcação intensa para a osteopontina. No novo osso foi evidente a diferença na imunolocalização da OPN entre o osso pré-existente (marcação fraca) e o novo osso (marcação moderada), como mostrado na figura 5.3 e. Além disso, a OPN apresentou marcação intensa nas linhas de crescimento/reversão (Figura 5.3f). Curiosamente, a periferia (frente mineralizadora) das novas trabéculas ósseas apresentaram intensa marcação para a OPN, nitidamente observada na figura 5.3h.

Ocasionalmente, foram encontradas partículas ósseas em processo de reabsorção, com intensa marcação para a OPN, como visualizado na figura 5.3 g.

Na área de cimento em reparação, não houve diferenças entre os grupos teste e controle do lado experimental (vestibular). Já na área de osso em reparação, houve diferença entre a expressão de osteoblastos e osteócitos. Ela foi ligeiramente maior nos espécimes do grupo teste. O mesmo fato foi observado no novo ligamento periodontal, com fibroblastos e matriz do grupo teste demonstrando marcação mais intensa para a OPN em relação ao grupo controle (Tabela 5.1).

No tecido conjuntivo gengival, em geral, houve fraca marcação na matriz conjuntiva e nos fibroblastos.

Figura 5.3 - Imunolocalização da OPN. Espécime teste (a-f). (a) Visão panorâmica da área de bifurcação. Aumento 2x ; (b) Detalhe do quadro da Figura a: Marcação intensa para OPN na interface dentina/novo cimento (setas pretas), assim como na interface cimento pré-existente/novo cimento (seta branca). Aumento 20x; (c) Área de bifurcação com interface dentina/novo cimento e novo cimento/novo ligamento com marcação intensa para OPN, assim como nos cementoblastos (setas brancas) delineando o novo cimento. Aumento 20x; (d) Nova trabécula óssea com osteoclasto positivo (seta preta) para OPN em sua periferia. Aumento 20x; (e) Interface osso pré-existente/novo osso (setas brancas). Notar marcação fraca na matriz óssea pré-existente e marcação moderada na matriz do novo osso. Presença de vários osteoblastos positivamente marcados para OPN ao redor das matrizes ósseas (setas pretas). Aumento 20x; (f) Linhas de reversão com marcação positiva para OPN (setas pretas). Aumento 20x. **Espécime controle (g-h).** (g) Partícula óssea (P) em processo de reabsorção com sua periferia intensamente marcada para OPN. Aumento 20x; (h) Osteoblastos (setas pretas) delineando a periferia de uma nova trabécula óssea. Aumento 20x. Cem – Cimento; Den - Dentina; Ncem – Novo Cimento ; Nlig - Novo Ligamento Periodontal; No – Novo Osso; O – Osso pré-existente; Tc – Tecido conjuntivo

5.2 Imunolocalização da Sialoproteína óssea (BSP)

No novo osso não houve diferenças entre os grupos teste e controle, no lado tratado (vestibular). De maneira geral, houve marcação moderada nos osteoblastos e osteócitos e forte expressão na matriz do novo osso e nas linhas de crescimento/reversão (Figura 5.4 d, e, g, h). A BSP não foi expressa por osteoclastos. Aparentemente, trabéculas ósseas recentemente formadas apresentavam maior expressão da BSP, principalmente em sua periferia (Figura 5.4 d, h). No lado lingual (não-tratado), o osso pré-existente apresentou fraca marcação para a BSP (Figura 5.4 a, g).

Já na área de novo cimento, houve intensa marcação nos limites cimento pré-existente/novo cimento, novo cimento/novo ligamento periodontal e no novo cimento (Figura 5.4 b, c, f). O mesmo padrão de marcação da OPN, na interface entre a dentina reabsorvida e o novo cimento foi observado (Figura 5.4 c). Já na face lingual (não-tratada), a matriz do cimento pré-existente apresentou fraca marcação para a BSP (Figura 5.4 b). Do lado vestibular (tratado), alguns cementócitos do grupo teste apresentaram maior marcação para a BSP em comparação com o grupo controle. Cementoblastos não apresentaram marcação para a BSP (Figura 5.4 b, f).

A matriz do ligamento periodontal demonstrou marcação para a BSP nos dois grupos e na face lingual (não-tratada), sendo ligeiramente maior no grupo teste (Figura 5.4 b e c).

No tecido conjuntivo gengival, em geral, houve fraca marcação na matriz conjuntiva e nos fibroblastos.

Figura 5.4 - Imunolocalização da BSP. Espécime teste (a-e). (a) Visão panorâmica da área de bifurcação. Aumento 2x; (b) Detalhe do quadro da Figura a: Interface novo cimento/novo ligamento periodontal com marcação positiva para a BSP; notar expressão de BSP na matriz do novo ligamento periodontal. Aumento 20x; (c) Área de bifurcação com interface novo cimento/novo ligamento periodontal com intensa marcação para a BSP (setas brancas); notar que a interface dentina/novo cimento apresentou marcação positiva para a BSP (setas pretas). Aumento 10x; (d) Osteoblastos intensamente marcados (setas pretas) pela BSP circundando uma nova trabécula óssea. Notar que a periferia (frente mineralizadora) da trabécula apresenta maior expressão de BSP do que o restante da matriz. Aumento 20x; (e) Novas trabéculas ósseas com marcação positiva para a BSP. Aumento 20x. **Espécime controle (f-h).** (f) Interface dentina/novo cimento com marcação intensa para a BSP (setas brancas). Aumento 20x; (g) Osso pré-existente com marcação fraca para a BSP. Aumento 20x; (h) Nova trabécula óssea com matriz óssea intensamente marcada para BSP, assim como os osteoblastos ao seu redor (setas pretas). Aumento 20x. Cem – Cimento; Den - Dentina; Ncem – Novo Cimento ; Nlig - Novo Ligamento Periodontal; No – Novo Osso; O – Osso pré-existente; Tc – Tecido conjuntivo

5.3 Imunolocalização da Proteína da matriz dentinária 1 (DMP1)

De maneira geral, não houve diferenças marcantes entre os grupos teste e controle na imunolocalização da DMP1.

Encontramos marcação positiva para o novo osso no lado vestibular (tratado) para os dois grupos (teste e controle). Osteoblastos e linhas de crescimento/reversão foram moderadamente marcados. Um aspecto único notado, dentre todos os membros da família SIBLING, no padrão de marcação da proteína DMP1 foi observado no citoplasma dos osteócitos, com seus prolongamentos celulares fortemente marcados (Figura 5.5 d, f, h). Esse aspecto foi notado tanto no novo osso quanto no osso pré-existente. Da mesma maneira, encontramos intensa expressão da DMP1 nos canalículos que unem os osteócitos embebidos na matriz óssea mineralizada, como ilustrado na figura 5.5 f, h. Já a matriz do novo osso teve marcação mais intensa quando comparada à matriz do osso pré-existente (Tabela 5.1).

Tanto do lado vestibular quanto lingual, cementoblastos e cementócitos, de ambos os grupos tiveram marcação positiva para a DMP1, sendo que os cementócitos demonstraram maior marcação para a DMP1. As interfaces do cimento (cimento pré-existente/novo cimento e novo cimento/novo ligamento periodontal) apresentaram marcação moderada.

O ligamento periodontal demonstrou marcação fraca em sua matriz conjuntiva assim como nos fibroblastos .

No tecido conjuntivo gengival, em geral, houve fraca marcação na matriz conjuntiva e nos fibroblastos.

Figura 5.5 - Imunolocalização da DMP1. *Espécime teste (a-d)*. (a) Visão panorâmica da área de bifurcação. Aumento 2x; (b) Detalhe do quadro da Figura a: Marcação positiva para DMP1 na interface novo cimento/ligamento periodontal, assim como na matriz do ligamento periodontal e nos cementócitos (seta preta) do cimento pré-existente. Aumento 20x; (c) Processo de remodelação óssea, notado pela presença de vários osteoclastos no interior (setas brancas) e na periferia da trabécula óssea (seta preta). Aumento 20x; (d) Osso pré-existente com marcação intensa para a DMP1 no citoplasma dos osteócitos. Aumento 20x; ***Espécime controle (e-h)*.** (e) Cementóide/novo cimento (setas brancas) moderadamente marcado pela DMP1. Aumento 20x; (f) Matriz do osso pré-existente com expressão de DMP1 na forma de grânulos, com citoplasma de osteócitos (setas pretas) e canalículos (*) que ligam os osteócitos intensamente marcados para a DMP1. Aumento 20x; (g) Nova trabécula óssea em processo de remodelação com osteoclasto (seta preta) no interior de uma lacuna de Howship. Aumento 20x; (h) Matriz do osso pré-existente com intensa marcação tanto nos prolongamentos dos osteócitos (setas pretas) quanto nos canalículos (*) entre os osteócitos. Aumento 40x. Cem – Cimento; Den - Dentina; Ncem – Novo Cimento ; Nlig - Novo Ligamento Periodontal; No – Novo Osso; O – Osso pré-existente; Tc – Tecido conjuntivo

5.4 Imunolocalização da Sialoproteína dentinária (DSP)

A marcação para a DSP, num aspecto geral, foi similar entre os grupos teste e controle.

Observou-se a presença nítida da DSP na dentina dos espécimes, com pontos amarronzados nos túbulos dentinários, no corte transversal da coroa dentária (Figura 5.6 b, d, e).

Na região de novo osso, osteoblastos apresentaram marcação heterogênea, com algumas células negativas e outras levemente positivas, em ambos os grupos. A nova matriz óssea e os osteócitos embebidos nela (Figura 5.6 c, f, g) demonstraram marcações mais intensas do que o osso pré-existente e os osteócitos da face lingual (não-tratada) (Figura 5.6 h).

A matriz do novo cimento teve marcação positiva mais intensa do lado vestibular do que do lado lingual (cimento pré-existente) em ambos os grupos (Figura 5.6 b, d, e). Os cementoblastos demonstraram marcação positiva somente no lado vestibular (tratado). Já os cementócitos embebidos nas matrizes do cimento novo e pré-existente apresentaram marcação positiva em ambos os grupos e na face lingual (não-tratada) (Figura 5.6 b).

No ligamento periodontal observamos marcação positiva da matriz conjuntiva em ambos os grupos e na face lingual (não-tratada). Notamos marcação heterogênea, com alguns fibroblastos positivos e outros negativos dentro do ligamento periodontal (Figura 5.6 b, d, e).

No tecido conjuntivo gengival, em geral, houve fraca marcação na matriz conjuntiva e alguns fibroblastos demonstraram marcação leve para a DSP.

Figura 5.6 - Imunolocalização da DSP. Espécime teste (a-c). (a) Visão panorâmica da área de bifurcação. Aumento 2x; (b) Detalhe do quadro maior da Figura a: Limite cimento pré-existente/novo cimento. Notar intensa marcação para DSP nos cementócitos (setas pretas) no interior do cimento pré-existente, no novo cimento e nos túbulos dentinários. Marcação heterogênea de fibroblastos do ligamento – alguns com marcação positiva (setas brancas) e outros negativos. Aumento 20x; (c) Detalhe do quadro menor da Figura a: Novas trabéculas ósseas em processo de remodelação, com presença de osteoclastos (setas pretas). Aumento 20x. **Espécime controle (d-h).** (d) Dentina intensamente marcada para DSP; novo cimento, alguns cementoblastos (setas pretas) e a matriz do novo ligamento periodontal se apresentam positivamente marcados. Aumento 20x; (e) Área da interface novo cimento/ligamento periodontal positivamente marcada pela DSP, assim como os túbulos dentinários e a matriz do ligamento periodontal. Aumento 20x; (f) Nova trabécula óssea com osteócitos (setas pretas) marcados positivamente pela DSP e presença de osteoclasto (seta branca) em sua periferia. Aumento 20x; (g) Marcação intensa para DSP localizada na periferia do novo osso; notar pequena trabécula óssea totalmente marcada pela DSP (seta branca). Aumento 20x; (h) Osso pré-existente com expressão de DSP no citoplasma de alguns osteócitos (setas pretas). Aumento 20x. Cem – Cimento; Den - Dentina; Ncem – Novo Cimento ; Nlig - Novo Ligamento Periodontal; No – Novo Osso; O – Osso pré-existente; Tc – Tecido conjuntivo

5.5 Imunolocalização da Proteína fosforilada da matriz extracelular (MEPE)

De maneira geral, a marcação para a MEPE nas faces vestibular e lingual, para ambos os grupos, foi semelhante para todos os tecidos analisados (osso, cimento, ligamento periodontal e tecido conjuntivo gengival).

Na região de novo osso, a matriz óssea e as linhas de crescimento/reversão apresentaram marcação moderada para MEPE. Os osteoblastos e osteócitos expressaram a MEPE de maneira heterogênea (Figura 5.7 c), com algumas células positivas e outras negativas. No osso pré-existente (lado lingual), os osteoblastos e osteócitos apresentaram intensa marcação em algumas células (Figura 5.7 d). O padrão de marcação dos osteócitos foi semelhante ao encontrado na DMP1 no citoplasma das células, mas não nos prolongamentos celulares (Figura 5.7 d, h). Já a matriz do osso pré-existente expressou levemente a MEPE quando comparada à matriz do novo osso.

Na área do novo cimento observou-se marcação positiva para as interfaces entre o novo cimento/cimento pré-existente, entre o novo cimento/ligamento periodontal (Figura 5.7 e) e na matriz do novo cimento em si (Figura 5.7 b). Cementócitos apresentaram marcação ligeiramente maior que os cementoblastos, em ambos os grupos, na área em reparação. No cimento pré-existente, os cementócitos apresentaram marcação positiva para a MEPE. Em contrapartida, a matriz do cimento pré-existente não expressou a MEPE.

Dentre todas os membros da família SIBLING, a MEPE foi a que demonstrou marcação mais intensa na matriz do novo ligamento periodontal. Encontramos marcação heterogênea para os fibroblastos do ligamento periodontal (alguns células positivas e outros negativas), como ilustrado na figura 5.7 e.

No tecido conjuntivo gengival também encontramos marcação positiva para a MEPE na matriz conjuntiva, assim como nos fibroblastos gengivais.

Figura 5.7 - Imunolocalização da MEPE. *Espécime teste (a-d)*. (a) Visão panorâmica da área de bifurcação. Aumento 2x; (b) Detalhe do quadro maior da Figura a: limite cimento pré-existente/novo cimento. Notar marcação positiva para a MEPE na matriz do ligamento periodontal, nos cementócitos (seta preta) no interior do cimento pré-existente e em cementoblastos (setas brancas) delineando o novo cimento. Aumento 20x; (c) Nova trabécula óssea em processo de remodelação, com presença de osteoclasto (seta vermelha) e osteoblastos com marcação heterogênea - positivos (setas pretas) e negativos (setas brancas). Aumento 20x; (d) Osso pré-existente com presença de osteócitos positivos (setas pretas) e negativos (setas brancas) para MEPE. Aumento 20x; ***Espécime controle (e-h)*.** (e) Limite cimento pré-existente/novo cimento. Notar marcação positiva para MEPE na matriz do ligamento periodontal. Alguns fibroblastos apresentaram marcação positiva (setas pretas) para a MEPE. Aumento 20x; (f) Novo osso com osteoclastos (setas pretas) em sua periferia. Aumento 20x; (g) Notar marcação positiva para a MEPE localizada mais na periferia do osso pré-existente. Aumento 20x; (h) Osso pré-existente com expressão de MEPE nos osteócitos (setas pretas). Aumento 20x. Cem – Cimento; Den - Dentina; Ncem – Novo Cimento ; Nlig - Novo Ligamento Periodontal; No – Novo Osso; O – Osso pré-existente; Tc – Tecido conjuntivo

6 DISCUSSÃO

Visto que os defeitos de furca representam uma situação freqüente dentro do tratamento periodontal, caracterizar a possível influência do uso de enxertos de tecido reparativo de alvéolos dentários, no processo de reparação de defeitos de furca classe II, poderia ser útil, já que podem existir dentes condenados durante o tratamento periodontal e os alvéolos destes dentes podem servir como fonte para este tipo de enxerto.

A utilização do enxerto de tecido reparativo de alvéolos de cães, com 5 dias de maturação, para tratamento de defeitos de furca classe II, foi escolhido por este tecido ainda se apresentar relativamente imaturo, em intensa atividade celular, com células com grande potencial para formação óssea (osteogênese) (Ellegaard et al., 1973) que estão formando e remodelando ativamente o alvéolo em reparação (Soehren; Van Swol, 1979). Estas células com características osteoblásticas poderiam induzir e/ou acelerar o processo de regeneração.

Como ambos os grupos (controle e teste) obtiveram regeneração parcial do periodonto, com o mesmo modelo experimental utilizado por Yorioka (2004), pensou-se na possibilidade de caracterizar a família de proteínas SIBLING e verificar se os defeitos que utilizaram o enxerto de tecido reparativo apresentariam um padrão de expressão diferente da família de proteínas SIBLING em relação ao grupo controle.

Após a análise dos resultados dos experimentos de imuno-histoquímica, consideramos que não houve diferenças evidentes no padrão de marcação de todos os membros da família SIBLING entre os grupos controle (RAPCR + RDC) e teste (RAPCR + RDC + enxerto de tecido reparativo de alvéolos). A hipótese de que poderíamos encontrar diferenças no padrão de expressão da família de proteínas SIBLING se baseia no fato de que o enxerto de tecido reparativo de alvéolos poderia ter células com características osteoblásticas em intensa atividade celular, com capacidade de induzir a regeneração óssea. Além disso, o enxerto poderia funcionar como um arcabouço tecidual para melhorar a estabilização do retalho, acelerando o processo de regeneração. Uma das razões por não termos encontrado diferença entre os grupos pode estar relacionada ao fato de que no

enxerto de tecido reparativo em si não encontrarmos células provenientes do ligamento periodontal, fonte de células responsáveis pela regeneração do periodonto (Melcher, 1976; McCulloch; Bordin, 1991; Herr et al., 1995). O lado controle se regenerou tão bem quanto o lado teste, provavelmente pelo fato de células do ligamento periodontal terem repovoado o defeito, independentemente do uso do enxerto de tecido reparativo de alvéolos ou não. Mesmo assim, a diferenciação de fibroblastos do ligamento periodontal em osteoblastos e cementoblastos próximos às superfícies do osso e cemento parece ser um processo rigidamente controlado (Berendsen et al., 2010). Diferentes fatores como PDGF (Han et al., 2007), BMP-2 (Komaki et al., 2007) e ácido ascórbico (Ishikawa et al., 2004) podem estimular a diferenciação osteogênica de fibroblastos do ligamento periodontal. Portanto, a influência de fatores presentes no meio em que as células do ligamento se encontram parece ser determinante na diferenciação para outro tipo celular.

Apesar de não encontrarmos diferenças no padrão de expressão da família de proteínas SIBLING entre os grupos controle e teste, encontramos diferenças claras somente quando comparamos a face vestibular tratada (independente de ser do grupo teste ou controle) e a face lingual (não – tratada) de cada espécime.

Mesmo tendo utilizado somente um tempo de observação de reparação – 6 semanas (45 dias), em um mesmo espécime, fomos capazes de analisar tecidos em reparação (face vestibular) ou não (face lingual). Isto nos possibilita ter uma visão de como ocorre a imunolocalização das proteínas SIBLING no presente estudo, nos tecidos em diferentes fases.

O período de observação, de 45 dias (6 semanas) de reparação do presente estudo, baseia-se no fato de que, neste período, já ocorreu grande parte da reparação dos tecidos periodontais, a serem estudados histologicamente. Em uma a duas semanas, já ocorreu formação de tecido conjuntivo, processo não dependente da formação de novo cemento (Haney et al., 1993). O cemento não se forma sobre a superfície radicular até 3 semanas após a cirurgia (Crigger et al., 1978). Só após 6 semanas, quantidade considerável de novo cemento já se formou. Quatro semanas costuma ser o tempo mínimo para se observar o processo de reparação do tecido conjuntivo, novo cemento e novo osso, apesar de neste período, os dois últimos poderem não estar totalmente formados (Wikesjö et al., 1994).

Uma vez compreendidas as razões para se utilizar um enxerto de tecido reparativo de alvéolos, ainda imaturo, outro aspecto muito importante a ser avaliado é a adesão do coágulo à superfície radicular, com adequada estabilização do retalho. O retalho deve proteger e, ao mesmo tempo, manter um espaço para o coágulo. Na ausência de uma adesão estável do coágulo, o defeito pode reparar com a migração apical do epitélio juncional (Polson; Proye, 1983; Wikesjö; Nilvéus, 1991). No presente trabalho, o uso do retalho deslocado coronariamente pôde, clinicamente, manter o enxerto em posição adequada e demonstrou bons resultados após o período de reparação observado. A razão para o sucesso limitado do tratamento regenerativo de defeitos de furca pode estar relacionada com as dificuldades de se manter um retalho, de maneira estável e adequada, sobre o defeito, na maioria das situações clínicas.

Defeitos de furca grau II criados cirurgicamente, possuem algumas vantagens, assim como desvantagens, sobre defeitos crônicos naturais ou induzidos para acumular placa. Uma vez que seja executada uma correta instrumentação, com descontaminação da superfície radicular doente, o processo de reparação ocorrerá da mesma maneira, a despeito de como a superfície radicular perdeu seus tecidos de suporte: com desenvolvimento natural da doença periodontal (Bogle et al., 1997), por indução de acúmulo de placa (Isidor et al., 1985), por procedimentos cirúrgicos somente (Wikesjö et al., 1994) ou pelos dois últimos (criação cirúrgica com cronificação dos defeitos) (Klinge et al., 1981; Wikesjö et al., 1994).

Defeitos naturais crônicos apresentam alturas ósseas e morfologia gengival variáveis entre si. Além disto, se distribuem ao acaso entre os dentes e as superfícies afetadas. Tudo isto faz com que não haja material representativo para análises histométricas adequadas no estudo do processo de reparação periodontal (Wikesjö et al., 1994). Este fato justifica o uso de defeitos agudos, criados cirurgicamente. Este modelo de estudo, além de economizar tempo, garante uma padronização do tamanho dos defeitos, diferente do que ocorre na doença periodontal natural ou induzida por artifícios que facilitem o acúmulo de placa, onde os defeitos apresentam configurações diferentes (Crigger et al., 1978). A padronização dos defeitos facilita a comparação entre os resultados propiciados por diferentes técnicas empregadas, visando compreender melhor o processo de reparação.

Algum nível de regeneração espontânea era esperado nos defeitos criados, após o período de reparação de 45 dias. Entretanto, como o próprio cão foi seu controle, mesmo ocorrendo regeneração espontânea, esta ocorreria nos dois grupos e não alteraria a possível diferença no nível de reparação entre os mesmos.

A escolha da realização dos cortes histológicos no sentido vestibulo-lingual, ao invés do sentido méso-distal, comumente observado em estudos similares ao nosso, possui justificativas. Uma das justificativas seria de que em cortes no sentido méso-distal existe a dificuldade de saber qual a distância em que o corte foi obtido em relação ao fundo do defeito (Selvig, 1994). Cortes próximos ao fundo do defeito podem mostrar uma resposta regenerativa maior que cortes afastados desta área. Isto é esperado simplesmente pelo fato destes cortes estarem mais próximos das células precursoras (células do ligamento periodontal e do tecido ósseo) de tecidos para a regeneração. Portanto, cortes no sentido vestibulo-lingual, permitem uma avaliação mais precisa do processo de reparação de defeitos de furca classe II, desde sua extensão mais lingual (fundo do defeito) até a entrada da furca, na junção esmalte-cimento (Bogle et al., 1997).

É essencial destacar que a descrição da presença da família das proteínas SIBLING no modelo experimental do presente estudo e sua possível relação com outros trabalhos, já descritos na literatura, é meramente especulativa, devido às diferentes espécies de animais (como em camundongos, ratos, cães e humanos) utilizadas nos estudos. As características funcionais das proteínas em questão podem ter semelhanças entre diferentes espécies, mas a sua presença e expressão temporais nos tecidos podem ter diferenças entre as espécies e não podem ser tão claramente comparadas.

No presente estudo, observamos a presença marcante tanto da sialoproteína óssea quanto da osteopontina, especialmente no novo osso e novo cimento. A caracterização de ambas as proteínas nos tecidos mineralizados do periodonto regenerado está de acordo com estudos em cães semelhantes ao nosso (Matsuura et al., 1995; Ivanovski et al., 2000; Christgau et al., 2007). Tanto cementoblastos quanto osteoblastos sintetizam e secretam OPN e BSP (Bosshardt et al., 1998; Nanci, 1999), mas outras fontes como plasma sanguíneo (Bautista et al., 1996) e células inflamatórias (McKee; Nanci, 1996b; Take et al., 2009; Zhao et al., 2010) devem ser levadas em consideração.

A osteopontina é particularmente prevalente nas interfibrilas colágenas da matriz extracelular do osso medular. Primeiramente, a OPN aparece como pequenos focos de calcificação dentro do osteóide ainda não mineralizado. Em um período mais adiantado do processo de mineralização, altos níveis de OPN são observados na frente mineralizadora e na matriz óssea mineralizada propriamente dita (Sodek et al., 2000). Este aspecto, de maior expressão de proteínas na periferia (ou frente mineralizadora) foi observado nos nossos espécimes, sugerindo que a OPN e BSP sirvam como guias na regulação do crescimento dos cristais de hidroxiapatita da matriz óssea. Tanto a OPN quanto a BSP parecem ser fatores importantes para a atração química, adesão e diferenciação de células osteoprogenitoras do tecido conjuntivo adjacente (McKee; Nanci, 1996a; Romano et al., 1997).

A nítida expressão da OPN e da BSP em linhas de reversão (cementantes) no tecido ósseo foi um aspecto importante observado no presente trabalho. As linhas de reversão indicam que ocorreu uma intensa atividade celular na área, entre fases de formação e reabsorção neste tecido. Estas áreas demarcam o limite entre o novo osso e o osso pré-existente e têm como uma de suas características conter uma alta quantidade de OPN e de BSP (Bosshardt et al., 1998). A OPN nas linhas de reversão pode ser utilizada para a adesão de células osteoblásticas ou para guiar eventos iniciais de calcificação nesta junção, podendo iniciar um novo ciclo de mineralização neste local (Sodek et al., 2000).

No presente trabalho, as novas trabéculas ósseas, juntamente com os osteoblastos delineando suas periferias, apresentaram-se marcadas positivamente para ambas as proteínas. A formação das trabéculas ósseas foi mais avançada próxima à superfície radicular do que no restante no defeito. A imunolocalização da OPN e da BSP na interface novo cimento/ligamento periodontal poderia sugerir uma influência positiva de ambas as proteínas em um possível recrutamento de células do ligamento periodontal para a formação de novo osso e cimento. O fato de não termos detectado a presença de anquilose, no presente trabalho, pode ter sido devido a um possível efeito inibitório da OPN no processo de mineralização. (MacNeil et al., 1995). Já a BSP parece ser responsável pela diferenciação de pré-cementoblastos, sua ligação à superfície radicular, assim como a mineralização precoce da matriz do cimento (MacNeil et al., 1995).

Marcações distintas entre a BSP e a OPN foram encontradas principalmente nos osteoclastos e odontoclastos – marcados positivamente somente para a OPN, como já descrito por Christgau et al. (2007), em cães. Já foi demonstrado que os osteoclastos apresentam grande quantidade de integrinas do tipo $\alpha_v\beta_3$ (Horton, 1997). Estas integrinas se ligam à osteopontina através do domínio RGD, mostrando a função da OPN em promover a ligação de osteoclastos junto à matriz óssea mineralizada (Ek-Rylander et al., 1994). O grupo de Ek-Rylander et al. (1994) demonstrou que a desfosforilação da OPN por uma fosfatase produzida pelo osteoclasto inviabiliza a ligação do osteoclasto à superfície óssea através do domínio RGD, sugerindo que a secreção desta fosfatase pelo osteoclasto ativo possa regular a ligação do osteoclasto à OPN *in vivo*. O trabalho de Flores et al. (1992) também confirmou que os osteoclastos se ligam através de suas integrinas à osteopontina do osso. Já foi demonstrado também, que esta ligação do osteoclasto com a osteopontina possa inibir o processo de reabsorção óssea *in vivo* (Fisher et al, 1993 ; Engleman et al., 1997). Portanto, a presença de marcação positiva da OPN em osteoclastos, sugere que ocorra a ligação entre a OPN presente na matriz óssea e os osteoclastos ativos. Além disso, a OPN parece atuar como um substrato para os osteoclastos estabelecerem um ambiente ácido para o processo de descalcificação (Reinholt et al., 1990). A função da OPN parece então ser o de, inicialmente, facilitar o processo de reabsorção mas, posteriormente, parece ser capaz de inibi-lo, funcionando como um fator regulatório do processo de remodelação/reabsorção óssea.

Como já descrito detalhadamente por Yorioka (2004), em diversos espécimes do presente trabalho foi observada a presença de reabsorções na dentina antes da formação/deposição de novo cimento. Esta interface dentina/novo cimento demonstrou presença marcante para a OPN e BSP. Bosshardt et al. (2005) foram os primeiros a evidenciar, em dentes decíduos humanos, a presença de ambas as proteínas na interface estabelecida entre o cimento em reparação e a dentina reabsorvida. Segundo estes autores, a primeira detecção da BSP e OPN coincide com a exposição das fibrilas colágenas pelos odontoclastos. Os odontoclastos então dissolvem os cristais minerais e degradam a matriz orgânica da dentina. A BSP e a OPN poderiam então regular a propagação de minerais e acomodá-los nesta interface, formando uma forte união entre a dentina reabsorvida

e o novo cimento. A propagação de minerais e a interdigitação das fibrilas colágenas podem auxiliar na formação desta união forte e resistente entre dentina e cimento. Portanto, o condicionamento da dentina pelos odontoclastos permitiria a adesão firme do novo cimento à dentina (Bosshardt et al., 2005).

Após analisarmos o padrão de marcação dos membros da família SIBLING, notamos que somente a BSP e a OPN estariam relacionadas na união entre a dentina reabsorvida e o novo cimento. Os outros três membros não foram detectados nesta região específica.

Além disso, no presente trabalho, foi demonstrada uma nítida diferença na marcação de ambas as proteínas quando se comparou a localização delas nos tecidos mineralizados na face vestibular (tratada) e lingual (não-tratada). Tanto o novo osso quanto o novo cimento demonstraram maior expressão da OPN e BSP quando comparado ao osso e cimento pré-existentes da face lingual (não-tratada). Isso sugere que ambas as proteínas tenham maior atuação na fase ativa da mineralização, mas mesmo assim ainda mantêm algum nível de atividade em tecidos mineralizados maduros.

A matriz do ligamento periodontal expressou tanto a BSP quanto a OPN, mas alguns fibroblastos do ligamento periodontal foram positivos somente para a OPN, assim como nos trabalhos de Matsuura et al. (1995) e de Ivanovski et al. (2000), que também encontraram expressão da BSP no ligamento periodontal. Em contrapartida, um trabalho em ratos (MacNeil et al., 1995) não encontrou a presença da BSP no ligamento periodontal. Isto sugere que podem existir variações entre as espécies na expressão da BSP no periodonto.

De acordo com os resultados do presente trabalho, a distribuição espacial da DMP1 parece ser muito mais abrangente do que inicialmente demonstrado pelos trabalhos de George et al. (1994) e George et al. (1995), que detectaram a presença da DMP1 somente em odontoblastos de ratos.

O presente trabalho detectou a presença da DMP1 em cementoblastos, cementócitos, osteoblastos e, principalmente, em osteócitos em cães, da mesma forma que D'Souza et al. (1997), em um estudo onde a DMP1 foi expressa tanto em osteoblastos diferenciados como em osteócitos de camundongos. Em contrapartida, MacDougall et al. (1998), através de hibridização *in situ*, foram capazes de detectar

a presença da DMP1 em odontoblastos, ameloblastos, osteoblastos e cementoblastos de camundongos, mas não em osteócitos.

Apesar da função dos osteócitos ainda não ser totalmente conhecida, a imunolocalização predominante da DMP1, em comparação com os outros membros da família SIBLING, na matriz pericelular e prolongamento dos osteócitos assim como nos canalículos que unem os osteócitos entre si, poderia estar relacionada a um possível papel desta proteína na manutenção do osso maduro. A expressão da DMP1 nos osteócitos poderia ter um papel na homeostase óssea devido à alta capacidade de ligação da DMP1 aos íons de cálcio. No presente trabalho, a matriz óssea do novo osso alveolar e do osso pré-existente também expressaram a DMP1 em altas quantidades. Já o trabalho de Toyosawa et al. (2001) demonstrou a presença da DMP1 em osteócitos de ratos, mas não em osteoblastos, sugerindo que a DMP1 fosse uma proteína específica para osteócitos.

Além disso, no presente trabalho, a DMP1 teve marcação positiva nos cementócitos embebidos na matriz do novo cimento e do cimento pré-existente e como discutido acima em relação ao tecido ósseo maduro, poderia participar da homeostase do cimento. Da mesma maneira, mas com menor intensidade, detectamos a presença da DMP1, em cementoblastos, assim como os trabalhos de MacDougall et al. (1998) em camundongos e Toyosawa et al. (2004) na formação radicular de ratos. A presença de DMP1 em cementoblastos poderia sugerir que uma das funções da DMP1 estaria relacionada à mineralização do cimento.

No presente trabalho pudemos caracterizar a presença fraca da DMP1 na matriz conjuntiva e em alguns fibroblastos do ligamento periodontal, indicando que a DMP1 possa ter alguma atividade na área do periodonto. Recentemente, o trabalho de Berendsen et al. (2010) utilizou um gel de colágeno tridimensional embebido com meio indutor de mineralização, em fibroblastos do ligamento periodontal humano. Foi demonstrado que esse meio indutor, composto de fosfatase alcalina, alterou o fenótipo de alguns fibroblastos do ligamento periodontal, fazendo com que eles produzissem a DMP1. A DMP1 poderia então exercer um papel importante em estágios mais avançados do processo de mineralização, estimulando fibroblastos do ligamento periodontal a participar do processo de reparação de tecidos mineralizados do periodonto.

No presente trabalho, em cães, a detecção da DSP nos tecidos periodontais em reparação são semelhantes ao primeiro trabalho que demonstrou a presença da DSP nesses tecidos, em ratos (Baba et al., 2004a). Além disso, o presente trabalho foi capaz de detectar claramente uma menor expressão da DSP no osso alveolar do que na dentina, da mesma maneira que Qin et al. (2002).

Foi curioso detectar a presença da DSP em co-localização com a BSP e a OPN no novo osso, onde foi mais intensa do que no osso pré-existente. Essa marcação positiva se caracterizou, por vezes, de maneira mais uniforme em toda extensão da matriz óssea e não somente na periferia da mesma, como observado freqüentemente nas marcações para a BSP e OPN. Este padrão de marcação para a DSP no novo osso indica que esta proteína pode ter papel importante no início do processo de mineralização óssea, assim como já discutido para a BSP e a OPN.

No presente estudo, apesar dos osteócitos em geral apresentarem marcação positiva para a DSP, os osteócitos do novo osso demonstraram marcação mais intensa do que os osteócitos do osso pré-existente, o que poderia sugerir uma maior atividade e expressão desta proteína quando osteócitos são recém-incorporados na nova matriz óssea.

De maneira similar ao novo osso, a matriz do novo cimento demonstrou marcação positiva para a DSP quando comparada à matriz do cimento pré-existente, onde não detectamos a presença da DSP. Já os cementócitos, de maneira geral, demonstraram marcação positiva para a DSP. Somente os cementoblastos do defeito em reparação expressaram a DSP quando comparados aos cementoblastos da face lingual (não-tratada). O ligamento periodontal apresentou marcação positiva, porém fraca, em sua matriz conjuntiva e em alguns dos seus fibroblastos.

Reunindo-se as evidências descritas para a maior expressão da DSP em tecidos recentemente formados, sugere-se que a DSP regule fases iniciais do processo de mineralização do osso e cimento. Esta nova evidência está de acordo com o que Suzuki et al. (2009) sugeriu em relação à dentina: de que a DSP regularia o início da mineralização da mesma. Desta maneira, poderíamos especular que a DSP estaria envolvida na formação dos tecidos mineralizados do dente (Suzuki et al., 2009), do periodonto em desenvolvimento (Baba et al., 2004a) e do periodonto em reparação (dados do presente estudo).

Alguns trabalhos procuraram demonstrar uma possível relação na expressão e co-localização da DSP e da DMP1 em trabalhos de desenvolvimento da formação radicular de ratos. O grupo de D'Souza et al. (1997) não encontrou semelhanças na expressão da DSP e DMP1. Enquanto a DMP1 mostrou ser sintetizada tanto por odontoblastos quanto por osteoblastos totalmente diferenciados, a DSP não foi produzida por osteoblastos. Já Baba et al. (2004b) pôde demonstrar e confirmar a co-localização de ambas as proteínas. Após 3-5 semanas de desenvolvimento, houve co-localização das proteínas em odontoblastos e cementócitos. Portanto, ambas as proteínas poderiam funcionar de maneira complementar e/ou sinérgica na formação e desenvolvimento dentários. O fator principal de um trabalho não ter e o outro ter encontrado uma relação entre as duas proteínas recai nos tempos estudados em cada experimento. O primeiro trabalho (D'Souza et al., 1997) acompanhou o desenvolvimento da fase embrionária até 6 dias pós-natais, enquanto o trabalho de Baba et al. (2004b) avaliou os ratos com 1 dia pós-natal até 8 semanas de desenvolvimento. Desta forma podemos sugerir que a expressão e possível co-localização das proteínas possa estar relacionada ao tempo em que elas são expressas e detectadas nos diferentes tecidos envolvidos na dentinogênese e osteogênese.

O presente trabalho pôde demonstrar a presença e co-localização de ambas as proteínas no tecido ósseo e no cimento de maneira generalizada mas, com algumas diferenças. A expressão da DMP1 foi mais intensa nos osteócitos e osso em geral do que a DSP. Já a DSP foi imunolocalizada em alguns fibroblastos do ligamento periodontal, no momento de 6 semanas de reparação, em cães.

Até pouco tempo, a MEPE só havia sido descrita e caracterizada no tecido ósseo de ratos (Petersen et al., 2000), camundongos (Argiro et al., 2001; Gowen et al., 2003; Gluhak-Heinrich et al., 2007) e humanos (Nampei et al., 2004) e em dentina (MacDougall et al., 2002). Recentemente ela foi descrita no ligamento periodontal humano (Wu et al., 2009).

No presente trabalho, a MEPE foi expressa tanto em osteócitos, quanto em osteoblastos, delineando a matriz óssea após 6 semanas de reparação de defeitos de furca. Vale ressaltar que a expressão da MEPE foi mais intensa nos osteócitos do osso pré-existente da face lingual (não-tratada) quando comparada aos osteócitos do novo osso. Assim como o presente trabalho, alguns estudos

(Petersen et al., 2000; Argiro et al., 2001) também demonstraram a expressão da MEPE tanto em osteoblastos diferenciados como em osteócitos durante a mineralização da matriz óssea. Já o trabalho de Nampei et al. (2004) demonstrou expressão da MEPE somente em osteócitos embebidos na matriz óssea mineralizada, não em osteoblastos. Um dos possíveis papéis da MEPE pode estar relacionado à inibição do processo de mineralização, já que camundongos com ausência de MEPE demonstraram mineralização acelerada, com aumento do número e atividade de osteoblastos (Gowen et al., 2003). Mas, como no presente trabalho, a MEPE também foi intensamente expressa por osteoblastos, ela poderia ter também um papel na indução do processo de mineralização (Petersen et al., 2000; Argiro et al., 2001). A matriz do novo osso demonstrou marcação mais intensa para a MEPE, quando comparada à matriz do osso pré-existente. Mais uma vez, esta evidência traz indícios de uma atividade maior desta proteína em fases iniciais de mineralização.

Dentre todos os membros da família SIBLING, a MEPE foi a proteína que demonstrou maior expressão no ligamento periodontal, principalmente na matriz conjuntiva e marcação heterogênea para os fibroblastos - com alguns fibroblastos do ligamento positivos e outros negativos para a MEPE. Da mesma maneira, o trabalho de Wu et al. (2009) também demonstrou a expressão da MEPE em células do ligamento periodontal cultivadas em meio osteogênico. Este dado poderia sugerir que a expressão de MEPE, no ligamento periodontal, poderia influenciar positivamente o processo de regeneração.

O presente trabalho também foi capaz de detectar, pela primeira vez, a presença da MEPE na matriz do novo cimento, com alguns cementoblastos e cementócitos marcados. Já no cimento pré-existente a MEPE não foi detectada. Desta forma, poderíamos sugerir um papel da MEPE na indução da mineralização do novo cimento em regeneração.

A ampla distribuição da família de proteínas SIBLING no periodonto pode ser relacionada com a presença do domínio RGD. Esta sequência de aminoácidos é conhecida como sítio de ligação celular da matriz extracelular, sangue e proteínas da superfície celular. A ligação celular mediada pelas integrinas ao domínio RGD influencia e regula a migração, crescimento e diferenciação celulares e o processo de apoptose (Bellahcène et al., 2008). Esta característica,

que todos os membros da família SIBLING tem em comum, poderia justificar a diversificada imunolocalização destas nos diferentes tipos de tecido que constituem o periodonto.

Da mesma maneira, já foi mostrado que quando as proteínas da matriz dentinária são expostas ou liberadas da dentina reabsorvida, induzem a diferenciação celular e a formação de tecidos mineralizados (Somerman et al., 1987; Silva et al., 2004). Portanto, situações como trauma, movimentações ortodônticas e doença periodontal, em si, poderiam expor a dentina e liberar as proteínas da matriz dentinária, principalmente a DMP-1 e a DSP, presentes em grandes quantidades na dentina.

Os resultados do presente trabalho, em conjunto com um recente estudo (Wu et al., 2008) que demonstrou que alguns dos membros da família SIBLING (BSP, DMP1 e DSP) estimulam células do folículo dental a se diferenciarem em linhagens de cementoblastos, demonstram a influência da família de proteínas SIBLING no processo de mineralização dos tecidos duros do periodonto (osso e cimento). Além disso, o presente estudo demonstrou a imunolocalização das proteínas não-colágenas desta família, inclusive no ligamento periodontal. Tendo todas estas novas informações e evidências em mente, poderíamos sugerir que os membros da família SIBLING desempenham papel importante, cada uma com sua característica e atividade particulares, dentro do processo de regeneração do periodonto.

O presente estudo avaliou a imunolocalização e o padrão de marcação da família de proteínas SIBLING no periodonto em regeneração. Tendo identificado a presença destas proteínas, no modelo experimental utilizado, o planejamento de novos estudos sobre o tema deveria ser voltado para o modo de atuação específico destas proteínas, principalmente em tecidos não-mineralizados, como o ligamento periodontal, para aumentar nosso conhecimento sobre o papel fisiológico transitório delas.

Outros tipos de avaliações já estão sendo realizados, baseados no presente trabalho, para se evidenciar a expressão gênica temporal dos membros da família SIBLING em células envolvidas na reparação do periodonto humano (osteoblastos, fibroblastos gengivais e fibroblastos do ligamento periodontal) através de cultura de células e RT-PCR. Seria muito interessante demonstrar em quais

momentos ocorrem os maiores níveis de expressão e atividade de cada proteína, por tipo celular.

A utilização destas proteínas em conjunto com novas tentativas terapêuticas regenerativas, como usar meios carreadores juntamente com as proteínas não-colágenas aqui avaliadas, seria mais uma alternativa para se conseguir a tão almejada e complexa regeneração dos tecidos periodontais perdidos. Possivelmente, este processo necessite de vários fatores específicos, devidamente orquestrados, com picos conhecidos de maior atividade.

7 CONCLUSÕES

Dentro dos limites deste trabalho, podemos concluir que:

- 1) A família de proteínas SIBLING (OPN, BSP, DMP1, DSPP e MEPE) é expressa durante o processo de reparação de defeitos de furca, no processo de mineralização dos tecidos periodontais.
- 2) O padrão de expressão da família de proteínas SIBLING após o uso do enxerto de tecido reparativo de alvéolos dentários foi semelhante ao grupo controle que utilizou RAPCR e retalho deslocado coronariamente, mostrando que ambos os grupos se encontravam em estágios similares de reparação.

REFERÊNCIAS⁵

AAP. Periodontal regeneration. J Periodontol. 2005 Sep;76(9):1601-22.

Amar S, Chung K, Nam S, Karatzas S, Myokai F, Van Dyke T. Markers of bone and cementum formation accumulate in tissues regenerated in periodontal defects treated with expanded polytetrafluoroethylene membranes. J Periodontal Res. 1997 Jan;32(1 Pt 2):148-58.

Amar S, Petrungaro P, Amar A, Van Dyke T. Immunolocalization of bone matrix macromolecules in human tissues regenerated from periodontal defects treated with expanded polytetrafluoroethylene membranes. Arch Oral Biol. 1995 Jul;40(7):653-61.

Arai N, Ohya K, Kasugai S, Shimokawa H, Ohida S, Ogura H, et al. Expression of bone sialoprotein mRNA during bone formation and resorption induced by colchicine in rat tibial bone marrow cavity. J Bone Miner Res. 1995 Aug;10(8):1209-17.

Argiro L, Desbarats M, Glorieux FH, Ecarot B. Mepe, the gene encoding a tumor-secreted protein in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia, is expressed in bone. Genomics. 2001 Jun 15;74(3):342-51.

Baba O, Qin C, Brunn JC, Jones JE, Wygant JN, McIntyre BW, et al. Detection of dentin sialoprotein in rat periodontium. Eur J Oral Sci. 2004a Apr;112(2):163-70.

Baba O, Qin C, Brunn JC, Wygant JN, McIntyre BW, Butler WT. Colocalization of dentin matrix protein 1 and dentin sialoprotein at late stages of rat molar development. Matrix Biol. 2004b Oct;23(6):371-9.

Bellahcène A, Castronovo V. Expression of bone matrix proteins in human breast cancer: potential roles in microcalcification formation and in the genesis of bone metastases. Bull Cancer. 1997 Jan;84(1):17-24.

Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke K, Fisher L, Fedarko N. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. Nat Rev Cancer. 2008 Mar;8(3):212-26.

⁵ De acordo com Estilo Vancouver.

Berendsen A, Smit T, Schoenmaker T, Walboomers X, Harris S, Everts V, et al. Inorganic Phosphate Stimulates DMP1 Expression in Human Periodontal Ligament Fibroblasts Embedded in Three-Dimensional Collagen Gels. *Cells Tissues Organs*. 2010 Feb. [Epub ahead of print]

Bianco P, Fisher L, Young M, Termine J, Robey P. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int*. 1991 Dec;49(6):421-6.

Birkedal-Hansen H, Butler W, Taylor R. Proteins of the periodontium. Characterization of the insoluble collagens of bovine dental cementum. *Calcif Tissue Res*. 1977 May;23(1):39-44.

Bogle G, Garrett S, Stoller N, Swanbom D, Fulfs J, Rodgers P, et al. Periodontal regeneration in naturally occurring Class II furcation defects in beagle dogs after guided tissue regeneration with bioabsorbable barriers. *J Periodontol*. 1997 Jun;68(6):536-44.

Boskey A, Maresca M, Ullrich W, Doty S, Butler W, Prince C. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner*. 1993 Aug;22(2):147-59.

Bosshardt D, Degen T, Lang N. Sequence of protein expression of bone sialoprotein and osteopontin at the developing interface between repair cementum and dentin in human deciduous teeth. *Cell Tissue Res*. 2005 Jun;320(3):399-407.

Bosshardt D, Zalzal S, McKee M, Nanci A. Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anat Rec*. 1998 Jan;250(1):13-33.

Butler W, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*. 1995 Feb;39(1):169-79.

Butler WT. Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci*. 1998 Jan;106 Suppl 1:204-10.

Chen J, McCulloch C, Sodek J. Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues: cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin. *Arch Oral Biol*. 1993 Mar;38(3):241-9.

Chen J, Shapiro H, Sodek J. Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Miner Res*. 1992 Aug;7(8):987-97.

Chen J, Shapiro H, Wrana J, Reimers S, Heersche J, Sodek J. Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization. *Matrix*. 1991 Apr;11(2):133-43.

Chen S, Chen L, Jahangiri A, Chen B, Wu Y, Chuang H, et al. Expression and processing of small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins in mouse odontoblastic cells. *Arch Oral Biol*. 2008 Sep;53(9):879-89.

Christgau M, Caffesse R, Schmalz G, D'Souza R. Extracellular matrix expression and periodontal wound-healing dynamics following guided tissue regeneration therapy in canine furcation defects. *J Clin Periodontol*. 2007 Aug;34(8):691-708.

Cordioli MAG, Pustiglioni FE, Georgetti MAP. Reparação óssea alveolar pós-exodontia em cães, com e sem o uso de membrana de PTFE-e: análise histológica. *RPG* 2000;7(4):320-7.

Crigger M, Bogle G, Nilvéus R, Egelberg J, Selvig K. The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. *J Periodontal Res*. 1978 Nov;13(6):538-49.

D'Errico J, MacNeil R, Takata T, Berry J, Strayhorn C, Somerman M. Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and in vitro. *Bone*. 1997 Feb;20(2):117-26.

Dodds R, Connor J, James I, Rykaczewski E, Appelbaum E, Dul E, et al. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res*. 1995 Nov;10(11):1666-80.

D'Souza R, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni A, et al. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res*. 1997 Dec;12(12):2040-9.

Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegård D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem*. 1994 May;269(21):14853-6.

Ellegaard B, Karring T, Listgarten M, Loe H. New attachment after treatment of interradicular lesions. *J Periodontol*. 1973 Apr;44(4):209-17.

Engleman V, Nickols G, Ross F, Horton M, Griggs D, Settle S, et al. A peptidomimetic antagonist of the $\alpha(v)\beta3$ integrin inhibits bone resorption in vitro and prevents osteoporosis in vivo. *J Clin Invest*. 1997 May;99(9):2284-92.

Feng J, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni A, et al. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dspp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem*. 1998 Apr;273(16):9457-64.

Feng JQ, Huang H, Lu Y, Ye L, Xie Y, Tsutsui TW, et al. The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J Dent Res*. 2003 Oct;82(10):776-80.

Fisher J, Caulfield M, Sato M, Quartuccio H, Gould R, Garsky V, et al. Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an "arginyl-glycyl-aspartyl" (RGD)-containing protein. *Endocrinology*. 1993 Mar;132(3):1411-3.

Fisher L, Torchia D, Fohr B, Young M, Fedarko N. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan;280(2):460-5.

Fisher L, Whitson S, Avioli L, Termine J. Matrix sialoprotein of developing bone. *J Biol Chem*. 1983 Oct;258(20):12723-7.

Flores M, Norgard M, Heinegard D, Reinholt F, Andersson G. RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin. *Exp Cell Res*. 1992 Aug;201(2):526-30.

Froum S, Ortiz M, Witkin R, Thaler R, Scopp I, Stahl S. Osseous autografts. III. Comparison of osseous coagulum-bone blend implants with open curetage. *J Periodontol*. 1976 May;47(5):287-94.

George A, Gui J, Jenkins N, Gilbert D, Copeland N, Veis A. In situ localization and chromosomal mapping of the AG1 (Dmp1) gene. *J Histochem Cytochem*. 1994 Dec;42(12):1527-31.

George A, Sabsay B, Simonian P, Veis A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *J Biol Chem*. 1993 Jun;268(17):12624-30.

George A, Silberstein R, Veis A. In situ hybridization shows Dmp1 (AG1) to be a developmentally regulated dentin-specific protein produced by mature odontoblasts. *Connect Tissue Res.* 1995;33(1-3):67-72.

George A, Srinivasan R, Thotakura S, Liu K, Veis A. Rat dentin matrix protein 3 is a compound protein of rat dentin sialoprotein and phosphophoryn. *Connect Tissue Res.* 1999;40(1):49-57.

Gluhak-Heinrich J, Pavlin D, Yang W, MacDougall M, Harris SE. MEPE expression in osteocytes during orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2007 Jul;52(7):684-90.

Gorski J. Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(2):201-23.

Gowen L, Petersen D, Mansolf A, Qi H, Stock J, Tkalecivic G, et al. Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J Biol Chem.* 2003 Jan;278(3):1998-2007.

Halliday D. The grafting of newly formed autogenous bone in the treatment of osseous defects. *J Periodontol.* 1969 Sep;40(9):511-4.

Han J, Meng H, Tang J, Li S, Tang Y, Chen Z. The effect of different platelet-rich plasma concentrations on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *Cell Prolif.* 2007 Apr;40(2):241-52.

Haney J, Nilvéus R, McMillan P, Wikesjö U. Periodontal repair in dogs: expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes support wound stabilization and enhance bone regeneration. *J Periodontol.* 1993 Sep;64(9):883-90.

Hart P, Hart T. Disorders of human dentin. *Cells Tissues Organs.* 2007;186(1):70-7.

Hayashi F. Retalho deslocado coronariamente, associado ou não à regeneração tecidual guiada e enxerto de coágulo pós-extração, em defeitos de furca grau II, em cães [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2004.

Herr Y, Matsuura M, Lin W, Genco R, Cho M. The origin of fibroblasts and their role in the early stages of horizontal furcation defect healing in the beagle dog. *J Periodontol.* 1995 Aug;66(8):716-30.

Hiatt W, Schallhorn R. Intraoral transplants of cancellous bone and marrow in periodontal lesions. *J Periodontol.* 1973 Apr;44(4):194-208.

Horton M. The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 May;29(5):721-5.

Huang B, Maciejewska I, Sun Y, Peng T, Qin D, Lu Y, et al. Identification of full-length dentin matrix protein 1 in dentin and bone. *Calcif Tissue Int.* 2008a May;82(5):401-10.

Huang B, Sun Y, Maciejewska I, Qin D, Peng T, McIntyre B, et al. Distribution of SIBLING proteins in the organic and inorganic phases of rat dentin and bone. *Eur J Oral Sci.* 2008b Apr;116(2):104-12.

Hunter G, Goldberg H. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep;90(18):8562-5.

Hunter G, Hauschka P, Poole A, Rosenberg L, Goldberg H. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1996 Jul;317 (Pt 1):59-64.

Hunter G, Kyle C, Goldberg H. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J.* 1994 Jun;300 (Pt 3):723-8.

Isidor F, Karring T, Nyman S, Lindhe J. New attachment-reattachment following reconstructive periodontal surgery. *J Clin Periodontol.* 1985 Oct;12(9):728-35.

Ishikawa S, Iwasaki K, Komaki M, Ishikawa I. Role of ascorbic acid in periodontal ligament cell differentiation. *J Periodontol.* 2004 May;75(5):709-16.

Ivanovski S, Li H, Daley T, Bartold P. An immunohistochemical study of matrix molecules associated with barrier membrane-mediated periodontal wound healing. *J Periodontal Res.* 2000 Jun;35(3):115-26.

Kawaguchi H, Ogawa T, Kurihara H, Nanci A. Immunodetection of noncollagenous matrix proteins during periodontal tissue regeneration. *J Periodontal Res.* 2001 Aug;36(4):205-13.

Klinge B, Nilvéus R, Kiger R, Egelberg J. Effect of flap placement and defect size on healing of experimental furcation defects. *J Periodontal Res.* 1981 Mar;16(2):236-48.

Komaki M, Karakida T, Abe M, Oida S, Mimori K, Iwasaki K, et al. Twist negatively regulates osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Cell Biochem.* 2007 Feb;100(2):303-14.

MacNeil R, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Piotrowski B, Somerman M. Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res.* 1995;33(1-3):1-7.

MacNeil R, Berry J, Strayhorn C, Somerman M. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. *Arch Oral Biol.* 1996 Aug-Sep;41(8-9):827-35.

Macneil R, Sheng N, Strayhorn C, Fisher L, Somerman M. Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis. *J Bone Miner Res.* 1994 Oct;9(10):1597-606.

MacDougall M, Gu T, Luan X, Simmons D, Chen J. Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein 1: spatial expression in mineralized tissues. *J Bone Miner Res.* 1998 Mar;13(3):422-31.

MacDougall M, Simmons D, Gu T, Dong J. MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):320-30.

MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu T. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J Biol Chem.* 1997 Jan;272(2):835-42.

Matsuura M, Herr Y, Han K, Lin W, Genco R, Cho M. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components of normal and healing periodontal tissues in the beagle dog. *J Periodontol.* 1995 Jul;66(7):579-93.

McCulloch C, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res.* 1991 May;26(3 Pt 1):144-54.

McKee M, Nanci A. Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Apr;760:177-89.

McKee M, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech.* 1996a Feb;33(2):141-64.

McKee M, Nanci A. Secretion of Osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. *Anat Rec.* 1996b Jun;245(2):394-409.

McKee M, Zalzal S, Nanci A. Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *Anat Rec.* 1996 Jun;245(2):293-312.

McKnight D, Simmer J, Hart P, Hart T, Fisher L. Overlapping DSPP mutations cause dentin dysplasia and dentinogenesis imperfecta. *J Dent Res.* 2008a Dec;87(12):1108-11.

McKnight D, Suzanne Hart P, Hart T, Hartsfield J, Wilson A, Wright J, et al. A comprehensive analysis of normal variation and disease-causing mutations in the human DSPP gene. *Hum Mutat.* 2008b Dec;29(12):1392-404.

Melcher A. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976 May;47(5):256-60.

Moses KD, Butler WT, Qin C. Immunohistochemical study of small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins in reactionary dentin of rat molars at different ages. *Eur J Oral Sci.* 2006 Jun;114(3):216-22.

Nampei A, Hashimoto J, Hayashida K, Tsuboi H, Shi K, Tsuji I, et al. Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(3):176-84.

Nanci A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol.* 1999 Jun;126(3):256-69.

Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr;98(8):4516-21.

Ogbureke K, Fisher L. Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in salivary glands. *J Dent Res*. 2004 Sep;83(9):664-70.

Ogbureke K, Fisher L. SIBLING expression patterns in duct epithelia reflect the degree of metabolic activity. *J Histochem Cytochem*. 2007 Apr;55(4):403-9.

Ogbureke KU, Fisher LW. Renal expression of SIBLING proteins and their partner matrix metalloproteinases (MMPs). *Kidney Int*. 2005 Jul;68(1):155-66.

Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Dec;83(23):8819-23.

Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J Biol Chem*. 1988 Dec;263(36):19430-2.

Owen T, Aronow M, Barone L, Bettencourt B, Stein G, Lian J. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology*. 1991 Mar;128(3):1496-504.

Passanezi E, Janson W, Nahas D, Campos Júnior A. Newly forming bone autografts to treat periodontal infrabony pockets: clinical and histological events. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1989;9(2):140-53.

Patarca R, Freeman G, Singh R, Wei F, Durfee T, Blattner F, et al. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med*. 1989 Jul;170(1):145-61.

Petersen D, Tkalcovic G, Mansolf A, Rivera-Gonzalez R, Brown T. Identification of osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45), a bone-specific cDNA encoding an RGD-containing protein that is highly expressed in osteoblasts and osteocytes. *J Biol Chem*. 2000 Nov;275(46):36172-80.

Polson A, Proye M. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J Periodontol*. 1983 Mar;54(3):141-7.

Qin C, Baba O, Butler W. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(3):126-36.

Qin C, Brunn J, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, et al. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res*. 2002 Jun;81(6):392-4.

Qin C, Brunn J, Cook R, Orkiszewski R, Malone J, Veis A, et al. Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J Biol Chem*. 2003 Sep;278(36):34700-8.

Razzouk S, Brunn J, Qin C, Tye C, Goldberg H, Butler W. Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone*. 2002 Jan;30(1):40-7.

Reinholt F, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun;87(12):4473-5.

Ross F, Chappel J, Alvarez J, Sander D, Butler W, Farach-Carson M, et al. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem*. 1993 May;268(13):9901-7.

Rowe P, de Zoysa P, Dong R, Wang H, White K, Econs M, et al. MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics*. 2000 Jul;67(1):54-68.

Sculean A, Junker R, Donos N, Berakdar M, Brex M, Dünker N. Immunohistochemical evaluation of matrix molecules associated with wound healing following regenerative periodontal treatment in monkeys. *Clin Oral Investig*. 2002 Sep;6(3):175-82.

Selvig K. Discussion: animal models in reconstructive therapy. *J Periodontol*. 1994 Dec;65(12):1169-72.

Shapiro H, Chen J, Wrana J, Zhang Q, Blum M, Sodek J. Characterization of porcine bone sialoprotein: primary structure and cellular expression. *Matrix*. 1993 Nov;13(6):431-40.

Shen Z, Heinegård D, Sommarin Y. Distribution and expression of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein show marked changes during rat femoral head development. *Matrix Biol.* 1995 Dec;14(9):773-81.

Siggelkow H, Schmidt E, Hennies B, Hübner M. Evidence of downregulation of matrix extracellular phosphoglycoprotein during terminal differentiation in human osteoblasts. *Bone.* 2004 Aug;35(2):570-6.

Silva T, Rosa A, Lara V. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues? *Oral Dis.* 2004 Mar;10(2):63-74.

Soares F, Hayashi F, Yorioka C, Pannuti C, Gioso M, de Lima L, et al. Repair of Class II furcation defects after a reparative tissue graft obtained from extraction sockets treated with growth factors: a histologic and histometric study in dogs. *J Periodontol.* 2005 Oct;76(10):1681-9.

Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan RJ, Li I, et al. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Apr;760:223-41.

Sodek J, Ganss B, McKee M. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):279-303.

Soehren S, Van Swol R. The healing extraction site: a donor area for periodontal grafting material. *J Periodontol.* 1979 Mar;50(3):128-33.

Somerman M, Nathanson M, Sauk J, Manson B. Human dentin matrix induces cartilage formation in vitro by mesenchymal cells derived from embryonic muscle. *J Dent Res.* 1987 Oct;66(10):1551-8.

Somerman M, Sauk J, Foster R, Norris K, Dickerson K, Argraves W. Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodontal Res.* 1991 Jan;26(1):10-6.

Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 2009 May;28(4):221-9.

Take Y, Nakata K, Hashimoto J, Tsuboi H, Nishimoto N, Ochi T, et al. Specifically modified osteopontin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes supports

interaction with B cells and enhances production of interleukin-6. *Arthritis Rheum.* 2009 Dec;60(12):3591-601.

Terasawa M, Shimokawa R, Terashima T, Ohya K, Takagi Y, Shimokawa H. Expression of dentin matrix protein 1 (DMP1) in nonmineralized tissues. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(5):430-8.

Toyosawa S, Okabayashi K, Komori T, Ijuhin N. mRNA expression and protein localization of dentin matrix protein 1 during dental root formation. *Bone.* 2004 Jan;34(1):124-33.

Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N, et al. Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2001 Nov;16(11):2017-26

Wada T, McKee M, Steitz S, Giachelli C. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res.* 1999 Feb;84(2):166-78.

Wikesjö U, Kean C, Zimmerman G. Periodontal repair in dogs: supraalveolar defect models for evaluation of safety and efficacy of periodontal reconstructive therapy. *J Periodontol.* 1994 Dec;65(12):1151-7.

Wikesjö U, Nilvéus R. Periodontal repair in dogs. Healing patterns in large circumferential periodontal defects. *J Clin Periodontol.* 1991 Jan;18(1):49-59.

Wu J, Jin F, Tang L, Yu J, Xu L, Yang Z, et al. Dentin non-collagenous proteins (dNCPs) can stimulate dental follicle cells to differentiate into cementoblast lineages. *Biol Cell.* 2008 May;100(5):291-302.

Wu L, Wei X, Ling J, Liu L, Liu S, Li M, et al. Early osteogenic differential protein profile detected by proteomic analysis in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2009 Oct;44(5):645-56.

Yorioka CW. Tratamento de defeitos de furca classe II com o uso de enxerto de coágulo e retalho deslocado coronariamente: estudo em cães [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2004.

Young M, Kerr J, Ibaraki K, Heegaard A, Robey P. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res.* 1992 Aug(281):275-94.

Zhao W, Wang L, Zhang L, Yuan C, Kuo P, Gao C. Differential expression of intracellular and secreted osteopontin isoforms by murine macrophages in response to TLR agonists. *J Biol Chem*. 2010 Apr. [Epub ahead of print]

ANEXO**ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Reparação periodontal de defeitos de furca classe II com o uso de enxerto de tecido ósseo neoformado em alvéolos em reparação (Tratados com fatores de crescimento e/ou membranas) estudo em cães", Protocolo nº 155/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. Marco Antonio Gioso, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sendo aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Preiodontal healing in furcation defect class II with new bone graft in alveolous (treated with growth factors or membranes) in dogs" protocol number 155/2002, under the responsibility of Prof.Dr. Marco Antonio Gioso, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting.)

São Paulo, 21 de junho de 2002

Prof.^ª Dr.^ª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP