FERNANDO PEIXOTO SOARES

**AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR NA
REPARAÇÃO DE DEFEITOS DE FURCA CLASSE II APÓS O
ENXERTO DE TECIDO REPARATIVO DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS
TRATADOS COM FATORES DE CRESCIMENTO**

São Paulo

2009

Fernando Peixoto Soares

**Avaliação de componentes da matriz extracelular na reparação de
defeitos de furca classe II após o enxerto de tecido reparativo de
alvéolos dentários tratados com fatores de crescimento**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suzana C. Orsini Machado de Sousa

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Soares FP. Avaliação de componentes da matriz extracelular na reparação de defeitos de furca classe II após o enxerto de tecido reparativo de alvéolos dentários tratados com fatores de crescimento [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, ____/____/2009

Banca Examinadora

1) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa, amiga, colega e companheira...

Ariana

Obrigado por você estar ao meu lado. Eu te amo.

Ao meu filho

Enrico

Luz da minha vida.

Aos meus amados pais

Mary e Marcos

Fontes de amor incondicional e infinito. Exemplos maiores de profissionais, de honestidade e caráter. Uma vida dedicada a um propósito maior. Espero conseguir passar ao meu filho os mesmos valores.

Aos meus queridos irmãos

Celso, Cristina e Eloisa

Seu apoio e compreensão, tornaram este sonho realidade. Obrigado por todo o suporte.

Aos amigos de ontem, hoje e sempre que porventura tenham nos auxiliado na caminhada, meu eterno agradecimento.

A vocês, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Emílio Pustiglioni, Prof. Titular da disciplina de Periodontia da FOU SP. Um modelo de orientador, que deu liberdade e confiança a um desconhecido e seus colegas para desenvolver este trabalho. Também foi a mão forte, quando necessário. Seu exemplo de conduta reforça a minha convicção que o caráter ainda deve ser a medida do ser humano.

À Prof^a. Dr^a. Suzana C. Orsini Machado de Sousa, Prof^a. Titular da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, que tão gentilmente aceitou ser a minha orientadora, e que, mais uma vez, abriu todas as portas dos laboratórios da disciplina de Patologia Bucal.

Aos companheiros de experimento Fernando Hayashi e Christiane Watanabe Yorioka. Mais uma vez ficou claro que apenas o trabalho em equipe proporciona os melhores resultados.

À Prof^a. Dr^a. Karen Renata Nakamura Hiraki, pelas valorosas orientações durante o exaustivo processo de otimização dos anticorpos.

Ao pesquisador Larry W. Fisher (NIH, Bethesda, MD, USA), que gentilmente nos cedeu os anticorpos utilizados neste trabalho.

Aos professores da Disciplina de Periodontia da FOU SP, que tanto contribuíram para o meu desenvolvimento profissional, científico e acadêmico, o saudoso amigo Prof. Dr. Roberto F. M. Lotufo Prof. Dr. Luiz A. P. A. Lima, Prof. Dr. Giorgio De Micheli, Prof. Dr. Giuseppe A. Romito, Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti, Prof. Dr. Cesário A. Duarte, Prof. Dr. Koto Nakae e Prof. Dr. Marco A. P. Georgetti, Prof^a Dr^a Marina Conde.

Aos estagiários Cássio V. Carvalho, meu amigo de longa data, Dácio Pantano Jr., Ana Vitória Imbronito, Luciana Saraiva. É uma satisfação tê-los como colegas e amigos.

À técnica do laboratório de Patologia Bucal da FOUSP, Elisa do Santos, pela paciência que nos atendeu, praticamente formando três novos técnicos em imuno-histoquímica.

À bibliotecária Glauce, pela revisão do trabalho, e demais funcionários da biblioteca da FOUSP.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela ajuda financeira, referente ao auxílio-pesquisa número 02/09757-2.

A todos os colegas e amigos que, embora não citados nominalmente um a um, contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho e me deram o prazer do convívio durante este período.

O meu MUITO OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Professor Francisco Roberto Bueno de Moraes, que foi o primeiro a me incentivar a seguir a carreira acadêmica. Exemplo de profissional, ser humano e professor. Um grande amigo.

Professores Luis S. G. Egreja e Helio L. Franco, grandes amigos, com quem eu aprendi a “fazer” Periodontia.

Os amigos e companheiros, já de longa data, Christian Wehba, Celso Emilio Tormena Jr. e Rodrigo Guerreiro Bueno de Moraes. Continuo com a certeza que, juntos, ainda realizaremos muito mais.

À nossa Equipe, o meu sincero agradecimento.

ALGUMAS DEFINIÇÕES

Benfeitor – é o que ajuda e passa.

Amigo – é o que ampara em silêncio.

Companheiro – é o que colabora sem constranger.

Renovador – é o que se renova para o bem.

Forte – é o que sabe esperar no trabalho pacífico.

Esclarecido – é o que se conhece.

Corajoso – é o que nada teme de si mesmo.

Defensor – é o que coopera sem perturbar.

Eficiente – é o que age em benefício de todos.

Vencedor – é o que vence a si mesmo.

ANDRÉ LUIZ

Soares FP. Avaliação de componentes da matriz extracelular na reparação de defeitos de furca classe II após o enxerto de tecido reparativo de alvéolos dentários tratados com fatores de crescimento [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O tecido reparativo de alvéolos de extração foi proposto como material de enxerto no tratamento de defeitos periodontais e a adição de fatores de crescimento aos alvéolos de extração melhoraria o potencial regenerativo deste tecido quando utilizado como enxerto. O objetivo deste trabalho foi avaliar qualitativamente, por meio de análise imuno-histoquímica, a reparação de defeitos agudos de furca classe II após o enxerto deste tecido. Foram extraídos os segundos e terceiros pré-molares superiores de 4 cães. Nos alvéolos resultantes foram aplicados fator de crescimento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), na concentração de 6 µg/ml cada. Após cinco dias, 24 defeitos agudos (12 controles e 12 testes) foram criados nos segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores. Apenas os sítios teste receberam o enxerto. Os retalhos foram posicionados coronariamente em ambos os lados e suturados. Após 45 dias, os espécimes foram analisados, em um plano vestibulo-lingual, por meio de técnica imuno-histoquímica para osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e osteonectina (ONC). Nos tecidos periodontais originais, a marcação para os anticorpos testados foi fracamente positiva para a matriz extracelular (MEC), caracterizando a presença de tecidos maduros. Já no interior dos defeitos, houve diferença na marcação entre grupos, com marcação mais pronunciada para BSP e

OPN no grupo controle, evidenciando uma maior atividade metabólica neste grupo, sugerindo que os tecidos reparativos do grupo teste já se encontravam em uma fase mais avançada do processo de reparação.

Palavras-Chave: enxerto ósseo – fator de crescimento derivado de plaquetas-BB – fator de crescimento semelhante à insulina-I – osteonectina – osteopontina – sialoproteína óssea

Soares FP. Histological study of the healing of class II furcation defects following the graft of healing tissue from extraction sockets previously treated with growth factors. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

ABSTRACT

The tissue from healing extraction sockets is considered an excellent bone grafting material in the therapy of periodontal defects and the association of growth factors to the extraction sockets would increase the regenerative potential of this tissue when utilized as a bone graft. The aim of this investigation was to evaluate qualitatively the healing of acute class II furcation defects when grafted with granulation tissue from healing extraction sockets previously treated with an association of platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) and insulin-like growth factor-I (IGF-I), both in a concentration of 6 µg/ml. The second and third upper premolars of four dogs were extracted and the growth factors were applied into the sockets. After a healing period of five days, 24 class II furcation defects (12 tests and 12 controls) were surgically created at the buccal surface of the second, third and fourth mandibular premolars. The 12 experimental sites were grafted with the tissue from the healing sockets, while the 12 control sites healed without any graft. The flaps were coronally positioned and sutured. After 45 days, tissues were analyzed by immunohistochemistry for osteopontina (OPN), bone sialoprotein (BSP) and osteonectina (ONC), in a buccal-lingual plane. Histologically, healing occurred similarly in both groups. Pristine periodontal tissues extracellular matrix stained faintly for the tested antibodies, which characterized the presence of mature tissues. The staining of test and control healing tissues showed a more intense metabolic activity

of the control group. This fact suggests that the tissues in the treated defect of test group were already in a more advanced phase of the repair process.

Keywords: Bone transplant – Insulin-like growth factor – Platelet derived growth factor

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 – Aspecto histológico panorâmico de espécime do grupo teste, mostrando o epitélio gengival (E), infiltrado inflamatório (*), extensão apical do epitélio juncional, bordo da marca de referência vestibular (MV) utilizada como referência na histometria, bordo marca de referência do fundo do defeito (MD) utilizada como referência na histometria, novo osso (NO) e osso preexistente (OP). Área de novo osso estudada (A) (2,5 X – H.E.) 52
- Figura 5.2 – Espécime do grupo controle, mostrando o epitélio gengival (E), extensão lingual do epitélio juncional, bordos da marca de referência vestibular (MV) e da marca de referência do fundo do defeito (MD) utilizados como referência na histometria; novo osso (NO) e osso preexistente (OP) (Tricrômico de Masson – 2,5 X)..... 53
- Figura 5.3 – Marcação imuno-histoquímica (anti-OPN) dos tecidos reparativos do grupo teste, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação fracamente positiva de novo tecido conjuntivo (NTC) e novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadro linear maior em “a”: marcação fracamente positiva e homogênea do NTC e marcação positiva do novo cimento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação positiva de NC e fracamente positiva de NTC, com algumas marcações positivas das células; (e) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação positiva e heterogênea da MEC de NO e marcação positiva de alguns osteoblastos; (f) – 2,5 X – marcação fracamente positiva da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de cimento (C), ligamento periodontal (LP), e osso (O); (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de C, LP e O; (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “f”: marcação positiva de células do

LP e fracamente positiva da MEC de C e LP; (i) – 40 X – detalhe do quadrado tracejado menor em “f”: marcação fracamente positiva de O e positiva de uma linha de reversão no osso lamelar 57

Figura 5.4 – Marcação imuno-histoquímica (anti-OPN) dos tecidos reparativos do grupo controle, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação positiva de novo tecido conjuntivo (NTC) e novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadro linear maior em “a”: marcação positiva e homogênea do NTC e marcação positiva do novo cimento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação positiva heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação positiva de NC e NTC, com algumas marcações positivas das células; (e) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação positiva da MEC de NO e marcação positiva de osteoblastos; (f) – 2,5 X – marcação positiva da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de cimento (C), ligamento periodontal (LP) e osso (O); (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de C e O e positiva de LP; (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “f”: marcação positiva de células do LP e positiva da MEC de C e LP; (i) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “f”: marcação fraca de O 58

Figura 5.5 – Marcação imuno-histoquímica (anti-BON ou anti-SPARC) dos tecidos reparativos do grupo teste, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação fracamente positiva novo tecido conjuntivo (NTC) e novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadro linear maior em “a”: marcação positiva e homogênea do NTC e marcação positiva do novo cimento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação fracamente positiva heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação fracamente positiva de NC e NTC; (e) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação fracamente positiva da MEC de NO; (f) – 2,5 X – marcação fracamente positiva da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de cimento (C),

ligamento periodontal (LP) e osso (O); (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de C, O e LP; (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “f”: ausência marcação de células do LP e fracamente positiva da MEC de cemento celular (CC) e LP; (i) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “f”: marcação fracamente positiva de O. 60

Figura 5.6 – Marcação imuno-histoquímica (anti-BON ou anti-SPARC) dos tecidos reparativos do grupo controle, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação positiva de novo tecido conjuntivo (NTC) e novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadro linear maior em “a”: marcação positiva e homogênea do NTC e marcação positiva do novo cemento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação positiva heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação positiva de NC e NTC; (e) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação fracamente positiva da MEC de NO; (f) – 2,5 X – marcação fracamente positiva da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de CC, LP e O; (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de C, O e LP; (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: ausência marcação de células do LP e fracamente positiva da MEC de CC e LP; (i) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “f”: marcação fraca de O 61

Figura 5.7 – Marcação imuno-histoquímica (anti-BSP) dos tecidos reparativos do grupo teste, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação fracamente positiva de novo tecido conjuntivo (NTC) e novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadrado linear maior em “a”: marcação fracamente positiva e homogênea do NTC e marcação positiva do novo cemento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação fracamente positiva heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação positiva de NC e fracamente positiva de NTC; (e) – 40 X – detalhe de

quadro tracejado menor em “a”: marcação fracamente positiva da MEC de NO; (f) – 2,5 X – fraca marcação da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de C, LP, e O; (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de cimento (C), osso (O) e ligamento periodontal (LP); (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “f”: ausência marcação de células do LP e fracamente positiva da MEC de cimento celular (CC) e LP; (i) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “f”: marcação fracamente positiva de O 63

Figura 5.8 – Marcação imuno-histoquímica (anti-BSP) dos tecidos reparativos do grupo controle, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação positiva de novo tecido conjuntivo (NTC) e fortemente positiva de novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadro linear maior em “a”: marcação positiva e homogênea do NTC e marcação fortemente positiva do novo cimento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação positiva heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação fortemente positiva de NC e positiva de NTC; (e) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação positiva da MEC de NO; (f) – 2,5 X – marcação fracamente positiva da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de cimento (C) e osso (O) e positiva de ligamento periodontal (LP); (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de C e O e positiva de LP; (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “f”: ausência marcação de células do LP e cimento celular (CC) e fracamente positiva da MEC de CC e LP; (i) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação positiva heterogênia de O 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Clone, título de tempo de incubação dos anticorpos primários.....	47
Tabela 5.1 – Resumo da análise imuno-histoquímica.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EJ	epitélio juncional
H.E.	hematoxilina e eosina
IGF-I	fator de crescimento semelhante à insulina-I
MD	marca de referência do fundo do defeito
MV	marca de referência vestibular
NC	novo cimento
NO	novo osso
PD	profundidade horizontal do defeito
PDGF-BB	fator de crescimento derivado de plaquetas-BB
TC	tecido conjuntivo
NTC	novo tecido conjuntivo
ONC	osteonectina
SPARC	sigla, em ingles, para proteína secretada, acídica, rica em cisteína (osteonectina)
BSP	sigla, em inglês, para bone sialoprotein, (sialoproteína óssea)
OPN	osteopontina
MEC	matriz extracelular
TRIS	hidroximetil-amino-metano

LISTA DE SÍMBOLOS

µg	micrograma
µm	micrômetro
n	tamanho da amostra ou número de variáveis
p	nível de significância calculado
°C	graus Celsius
pH	medida do potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
3 PROPOSIÇÃO	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Observações clínicas.....	51
5.2 Análise histológica em H.E.....	51
5.3 Análise imuno-histoquímica.....	55
5.3.1 Osteopontina (OPN)	56
5.3.2 Ostenectina (BON ou SPARC).....	59
5.3.3 Sialoproteína óssea (BSP)	62
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

O tratamento periodontal ideal deveria levar à regeneração dos tecidos periodontais de suporte destruídos pela doença, entendendo-se por regeneração periodontal, a reprodução ou reconstituição dos tecidos perdidos, de modo que a forma e a função das estruturas sejam restauradas (AAP, 1992), ou seja, deve ocorrer a formação de novo cemento, ligamento periodontal e osso alveolar.

O tratamento periodontal regenerativo pode empregar técnicas “passivas” ou “ativas” (CAFFESSE; QUIÑONES, 1993). As “passivas” são aquelas que não interferem deliberadamente no metabolismo das células envolvidas no processo de reparação da ferida periodontal, tais como os enxertos ósseos, condicionamento da superfície radicular e as técnicas de regeneração tecidual guiada (RTG). Os enxertos de tecido reparativo de alvéolos de extração também estão entre estas técnicas.

As técnicas “ativas” têm o objetivo de estimular as células que circundam a ferida periodontal a se multiplicarem, diferenciarem, migrarem e/ou a produzirem proteínas da matriz extracelular. Dentre elas, destacam-se as que empregam os fatores de crescimento e diferenciação, proteínas de matriz extracelular, fatores de adesão, os mediadores de metabolismo ósseo e a engenharia de tecidos (BARTOLD et al., 2000).

As substâncias com propriedades bioativas mais estudadas são os fatores de crescimento e diferenciação. São uma classe de mediadores biológicos naturais que regulam eventos fundamentais na reparação tecidual. (ARMITAGE, 1999; CAFFESSE; QUIÑONES, 1993). No tratamento periodontal, a utilização tópica dos

fatores de crescimento, principalmente do PDGF-BB e do IGF-I, durante a realização de cirurgias, tem demonstrado potencial para estimular os níveis de reparação dos tecidos periodontais, tanto no aspecto quantitativo como no qualitativo.

O mecanismo de ação dos fatores de crescimento, dos enxertos e substâncias utilizadas nos tratamentos regenerativos disponíveis, dependem de delicadas e íntimas interações com os componentes não colágenos da matriz extracelular, de forma bastante particular no periodonto, regulando vários aspectos do metabolismo celular e tecidual.

As técnicas empregadas com finalidade de regenerar os tecidos periodontais, apresentam pouca previsibilidade de resultados. A associação de duas ou mais técnicas pode ser uma alternativa na busca de maior efetividade do tratamento regenerativo periodontal, por isto associamos a utilização de fatores de crescimento nos alvéolos de extração de cães com o objetivo de melhorar seu potencial reparativo quando utilizado como enxerto no tratamento de defeitos periodontais.

Para que, no futuro, seja possível o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento reconstrutivo, devem ser conhecidas a seqüência de eventos e as substâncias envolvidas em cada estágio do processo reparativo da ferida periodontal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fatores de crescimento

Fatores de crescimento formam uma classe de polipeptídios naturais que atuam como mediadores biológicos, regulando a proliferação celular, quimiotaxia, diferenciação e síntese celular, eventos estes que ocorrem durante o ciclo celular (HEATH, 1993) . Portanto, agem também na reparação tecidual. Atuam através da ligação a receptores da superfície celular (AAP, 1996; GIANNOBILE et al., 1996; TERRANOVA; WIKESJÖ, 1987). Parece existir receptores específicos para cada fator de crescimento, podendo também se ligar a diferentes fatores de crescimento, com menores afinidades (WATERFIELD, 1989).

Dentre os vários fatores de crescimento caracterizados até o presente momento, o fator de crescimento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) e o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) parecem desempenhar importantes funções no processo de reparação da ferida periodontal (WATERFIELD, 1989; MATSUDA et al., 1992).

2.1.1 IGF-I

O IGF, quando inicialmente descrito, (RINDERKNECHT; HUMBEL, 1976ba; RINDERKNECHT; HUMBEL, 1976a) recebeu esta denominação devido às semelhanças estruturais e funcionais com a insulina (CLEMMONS, 1989). São encontrados receptores para o IGF em células de praticamente todos os tipos de tecidos (FROESCH et al., 1996). A literatura também se refere ao IGF como somatomedina-C (KLAPPER; SVOBODA; VAN WYK, 1983; VAN WYK; SVOBODA; UNDERWOOD, 1980).

Vários estudos, *in vitro*, verificaram os efeitos do IGF no aumento do metabolismo ósseo. O IGF-I estimula a síntese de DNA ósseo, colágeno e proteínas não colágenas (CANALIS, 1980). Também aumenta a produção de matriz óssea por efeito direto na ativação da síntese de DNA no osteoblasto e, por ação indireta, age na multiplicação das células osteoprogenitoras, promovendo o aumento do número de osteoblastos funcionais (HOCK; CENTRELLA; CANALIS, 1988). Pode, ainda, estimular a síntese de colágeno ao mesmo tempo em que diminui a sua degradação (MCCARTHY; CENTRELLA; CANALIS, 1989). Células ósseas, em meios de cultura, secretam IGF-I, com capacidade regulatória na aposição óssea (CANALIS; MCCARTHY; CENTRELLA, 1988) caracterizando regulação autócrina.

Blom, Holmstrup e Dabelsteen (1992) relataram a presença de receptores de superfície para IGF-I na superfície de células do ligamento periodontal de ratos. Notaram que IGF-I pode estimular a síntese de DNA em fibroblastos do ligamento periodontal.

Além da ação do IGF-I sobre os osteoblastos na síntese óssea, também foram constatados efeitos deste fator de crescimento sobre os osteoclastos. Mochizuki et al., (1992) estudaram a reação de osteoclastos cultivadas sobre lâminas de dentina, quando adicionado o IGF-I. Verificaram que, o IGF-I pode

estimular a reabsorção óssea tanto de forma direta, estimulando a diferenciação e a ativação dos osteoclastos.

2.1.2 PDGF-BB

O PDGF, uma glicoproteína básica, é um dímero composto de duas cadeias polipeptídicas denominadas cadeia α -A e α -B, que podem formar homo ou heterodímeros: PDGF-AA, -AB e -BB. As cadeias α -A e α -B possuem 60% de sua seqüência de aminoácidos iguais. (HART et al., 1990) Existem duas classes de receptores para o PDGF (α e β). O dímero $\beta\beta$ do receptor se liga e é regulado somente pelo PDGF-BB. O dímero $\alpha\alpha$ do receptor liga-se e é regulado pelos PDGF-AA, -AB e -BB e o dímero $\alpha\beta$ se liga ao PDGF-AB com o receptor β , sendo esta a forma predominante. (HART et al., 1988)

Já foi demonstrado, *in vitro*, que o PDGF tem a capacidade de reverter significativamente os efeitos inibitórios dos lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos na proliferação de fibroblastos humanos gengivais. (BARTOLD; NARAYANAN; PAGE, 1992)

O PDGF-BB possui características e media mecanismos celulares que podem ser úteis na regeneração periodontal.

O PDGF-BB se mostrou, *in vitro*, como o mitógeno mais potente, e também obteve os melhores resultados quanto à quimiotaxia de células do ligamento periodontal, quando comparado às isoformas PDGF-AA e PDGF-AB. (BOYAN et al.,

1994) Baseado neste achado, o PDGF-BB se tornou a isoforma de eleição para o uso em procedimentos regenerativos periodontais.

As células do ligamento periodontal exibem resposta proliferativa significativamente maior ao PDGF (*in vitro*), quando comparados aos fibroblastos gengivais, os quais não apresentam resposta ao PDGF, independentemente das concentrações utilizadas (MUMFORD et al., 2001).

Apesar de ter sido verificado que a meia vida dos fatores de crescimento é curta, aproximadamente 4 horas, foram observados seus efeitos, sobre células do periodonto, mesmo após 5 semanas da aplicação. Ou seja, os fatores de crescimento podem estimular uma cascata de eventos envolvidos no processo de reparação que continuam ocorrendo mesmo na sua ausência (LYNCH et al., 1991).

Com o objetivo de aumentar o período de tempo em que este fator de crescimento possa permanecer em concentrações ativas na região a ser reparada, alguns estudos associaram o PDGF-BB a veículos de liberação controlada com efeitos positivos. Esta liberação controlada dos FC foi demonstrado *in vitro*, com culturas de células do ligamento periodontal (MAILHOT et al., 1996) e culturas primárias de células osteoblásticas de rato (STEPHAN et al., 2000) e, *in vivo*, quando utilizados em defeitos de calvária de ratos, promovendo significativo aumento na regeneração óssea (LEE et al., 2000).

A utilização do PDGF, sozinho, ou em combinação com membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), em feridas periodontais de cães, aumentou a proliferação de fibroblastos durante a fase inicial de cicatrização periodontal (WANG et al., 1994).

Para que um fator de crescimento possa agir sobre um determinado tipo celular, é necessário que esta célula possua receptores de superfície específicos

para ele. A presença e distribuição das cadeias A e B do PDGF e dos receptores α e β em células presentes em feridas gengivais humanas foi estudada por Green et al. (1997). Verificaram que a cadeia A parece exercer papel proeminente durante as fases iniciais de cicatrização, enquanto que a expressão do receptor β do PDGF aparece mais tardiamente, indicando que o PDGF-B deve regular eventos mais avançados na cicatrização.

2.1.3 associação de IGF-I e PDGF-BB

Alguns trabalhos demonstraram os efeitos sinérgicos e a superioridade da combinação do IGF-I e PDGF-BB em relação a outros fatores de crescimento, isolados ou em outras combinações, na reparação de feridas cutâneas em porcos, (LYNCH et al., 1987; LYNCH; COLVIN; ANTONIADES, 1989), no aumento do metabolismo, síntese e replicação de células ósseas de calvária de rato, *in vitro* (CANALIS, 1980; CANALIS; MCCARTHY; CENTRELLA, 1989), no maior estímulo de aposição óssea, *in vitro* (PFEILSCHIFTER et al., 1990), e no efeito sinérgico sobre a atividade mitótica e síntese de proteínas de osteoblastos bovinos (GIANNOBILE; WHITSON; LYNCH, 1997). Portanto, pode-se presumir que esta associação de fatores de crescimento poderia beneficiar a regeneração periodontal.

O PDGF-BB e o IGF-I demonstram capacidade de estimular maiores respostas mitogênicas, quimiotáticas, e de síntese de colágeno quando adicionados a culturas de células do ligamento periodontal de ratos, e em combinação, apresentam os melhores resultados na proliferação deste tipo celular (MATSUDA et

al., 1992). Apresentam, também, maior estímulo proliferativo em fibroblastos do ligamento periodontal humano, *in vitro* (SANT'ANA et al., 2007)

Em células do ligamento periodontal e fibroblastos gengivais em cultura, o PDGF e o IGF-I, aumentam a resposta migratória de ambos os tipos celulares em uma forma dose-dependente (NISHIMURA; TERRANOVA, 1996).

A aplicação da combinação PDGF-BB/IGF-I proporcionou um aumento significativo na adesão de fibroblastos provenientes do ligamento periodontal a superfícies radiculares, *in vitro*, quando comparados aos grupos controle (GAMAL et al., 1998; SANT'ANA et al., 2007).

Cementoblastos de ratos, *in vitro*, aos quais foram adicionados três fatores de crescimento (IGF-I, PDGF-BB e TGF- β), mostraram significativo aumento da proliferação celular e foram influenciados positivamente no perfil de expressão genética fenotípica e no potencial de biomineralização. Todos os fatores de crescimento estimularam aumento na síntese de DNA e os cementoblastos mantiveram a capacidade de promover mineralização quando reimplantados nos ratos (SAYGIN et al., 2000).

Os trabalhos realizados *in vitro* forneceram subsídios para que estas substâncias fossem testadas *in vivo* no tratamento periodontal. Os fatores de crescimento foram associados ao uso de membranas reabsorvíveis (CHO; LIN; GENCO, 1995) e como resultado desta terapêutica, foi obtida regeneração mais efetiva de defeitos de furca classe III em cães, quando comparados à utilização apenas de membranas.

A aplicação do IGF-I em combinação com o PDGF, em defeitos periodontais naturais de cães beagle, estimulou o metabolismo ósseo e, significativamente, maior regeneração periodontal que apenas a realização de cirurgia para desbridamento, atingindo níveis de 5 a 10 vezes maior de regeneração óssea e de cemento que nos dentes controle, dependendo da concentração utilizada. Os melhores resultados foram obtidos com a aplicação de 3 µg de cada fator de crescimento (GIANNOBILE; FINKELMAN; LYNCH, 1994; LYNCH et al., 1989; LYNCH et al., 1991).

Em macacos, defeitos criados artificialmente, por meio da inserção de ligaduras (RUTHERFORD et al., 1992) ou cirurgicamente (GIANNOBILE; FINKELMAN; LYNCH, 1994; GIANNOBILE et al., 1996), apresentaram importante melhora nos níveis de reparação periodontal quando tratados com a combinação de IGF-I e PDGF-BB, em comparação aos controles. Mais uma vez, a utilização da combinação do PDGF-BB e do IGF-I mostrou-se mais eficiente em promover a regeneração periodontal que o uso deste fatores isoladamente (GIANNOBILE et al., 1996).

Em ambos os modelos animais estudados (cães e macacos), houve aumento dos níveis de regeneração periodontal quando utilizados estes fatores de crescimento. O modelo canino apresentou maior resposta óssea, enquanto os primatas obtiveram maior resultado quanto à nova inserção conjuntiva (GIANNOBILE; FINKELMAN; LYNCH, 1994).

Em humanos, (HOWELL et al., 1997) a utilização de dois fatores de crescimento recombinantes humanos (rh), rhIGF-I e rhPDGF-BB no tratamento de defeitos periodontais se mostrou segura nas dosagens de 50 e 150 µg/ml de cada. Em cirurgias de reentrada, 6 ou 9 meses após o tratamento, verificou-se que os defeitos tratados com a menor dosagem (50 µg/ml de cada fator de crescimento),

não apresentaram diferenças em relação aos controles, enquanto que os tratados com a maior dosagem (150 μ g/ml de cada fator de crescimento) obtiveram preenchimento ósseo significativamente maior.

Nevins et al. (2003) mostraram resultados clínicos, radiográficos e histológicos da utilização de enxertos ósseos alógenos embebidos em altas concentrações de rhPDFG-BB (0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml e 5 mg/ml) em alguns defeitos interproximais e de furca classe II. Relataram que esta modalidade de tratamento quase sempre (8 de 10 defeitos testados) estimulou uma resposta regenerativa nestes tipos de defeitos severos, apesar de não apresentarem um grupo controle, para comparação. Este foi o primeiro estudo a documentar histologicamente a regeneração do aparelho de inserção completo (osso, cimento e ligamento periodontal) em defeitos de furca classe II, em humanos.

2.2 Tecido reparativo de alvéolos de extração

Vários tipos de enxertos ósseos autógenos foram utilizados com o objetivo de se preencher ou regenerar defeitos ósseos periodontais. Entre os tipos de enxertos ósseos autógenos, encontra-se o uso do tecido de alvéolos em reparação ou de lojas ósseas criadas cirurgicamente (HIATT; SCHALLHORN, 1973; KREJCI; FARAH, 1987; KREJCI; FARAH; BISSADA, 1987).

A reparação de alvéolos de extração segue um padrão básico, no qual, inicialmente, há o preenchimento do alvéolo por um coágulo. Este coágulo é substituído por um tecido de granulação por volta de 7 dias e este, por sua vez, é

substituído por tecido conjuntivo, por volta do vigésimo dia. No fundo do alvéolo é notada a presença de um tecido osteóide, por volta do sétimo dia, e ao final de 5 semanas, dois terços do alvéolo estão preenchidos por osso trabecular. A epitelização da ferida, por sua vez, inicia-se por volta do quarto dia e termina entre 24 e 35 dias (AMLER, 1969; AMLER; JOHNSON; SALMAN, 1960). A fase mais ativa deste processo ocorre por volta do décimo dia em indivíduos mais jovens (< 20 anos) e por volta do vigésimo dia em indivíduos com mais de 60 anos (AMLER, 1981). Isto é explicado pelo fato de que a reparação de indivíduos mais velhos, aparentemente, apresenta uma fase de repouso após o décimo dia de reparação, tendo uma reaceleração da reparação após três semanas, igualando o padrão de reparação de indivíduos mais jovens por volta de 30 a 40 dias (AMLER, 1993).

Segundo um estudo em cães, (CARDAROPOLI; ARAÚJO; LINDHE, 2003) na reparação de alvéolos de extração ocorre uma série de eventos. As principais fases seriam: a formação de um coágulo, que é substituído, progressivamente, por uma matriz de tecido conjuntivo provisório, osso imaturo e finalmente por osso lamelar de baixa densidade. Nas fases mais avançadas de reparação, ocorre a formação de uma ponte de tecido mineralizado, o osso cortical, que cobre o alvéolo.

Para estudar a evolução da reparação de alvéolos de extração e as características dos tecidos encontrados nestes alvéolos, foi criada uma linha de pesquisa na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP).

Penteado, Romito e Pustiglioni (2005) estudaram o tecido reparativo de alvéolos de humanos cobertos ou não com membranas de PTFE-e, 4 semanas após a exodontia. Através de análises imuno-histoquímicas, para identificação de células de linhagem osteoblástica e para obtenção do índice de proliferação celular, concluíram que não houve diferenças entre os grupos testados. No entanto, notaram

que as células do terço coronário do alvéolo apresentaram maior atividade mitótica que as do terço apical, que já estavam mais maduras, portanto com menos atividade mitótica.

Com metodologia semelhante, mas em cães, Cordioli, Pustiglioni e Georgetti (2000) concluíram que, após 14 dias das extrações, os alvéolos tiveram padrão de reparação semelhante, com ou sem o uso de membranas. O tecido contido no seu interior, apresentaram características de osso imaturo. Nos casos em que houve exposição e deslocamento da membrana ocorreu um retardo da reparação em relação ao controle e aos casos em que a membrana se manteve estável.

Cordioli (2002) em sua tese de doutorado, analisou o tecido reparativo de alvéolos dentários de cães após adição de uma combinação de IGF-I e PDGF-BB, ambos nas concentrações de 0,1 e 0,3 µg/ml em gel de metilcelulose a 2%. Após 10 dias de reparação, os espécimes não apresentaram diferenças entre os grupos teste e os controles (alvéolos sem adição de fatores de crescimento), tanto na análise histológica quanto no índice de proliferação celular. O autor considera algumas explicações possíveis para a não detecção de diferenças estatisticamente significativas: o n reduzido da amostra, as baixas concentrações de fatores de crescimento utilizadas, o prazo de reparação ser reduzido (10 dias) ou a forma do alvéolo, que não era cônica como em estudos em humanos.

Usando a mesma metodologia, De Vuono (2002) e Ferraro (2002) utilizaram, respectivamente, apenas o IGF-I ou o PDGF-BB em concentrações de 0,1 e 0,3 µg/ml de gel de metilcelulose a 2%. Concluíram que na concentração de 0,3 µg/ml, o IGF-I estimulou a neoformação óssea no interior dos alvéolos e o índice de proliferação celular no terço apical dos alvéolos em reparação, em relação aos controles. O PDGF-BB, histologicamente, parece acelerar o processo de reparação

do interior dos alvéolos, apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significantes no índice de proliferação celular a favor do grupo teste.

Existe uma certa controvérsia quanto ao momento mais adequado para a coleta do tecido reparativo dos alvéolos de extração com finalidade de enxerto. Evian et al. (1982) consideram ideal, em humanos, o período de 8 a 12 semanas, quando é encontrado um tecido já com osso formado, com uma margem osteóide e com osteoblastos ao redor das trabéculas.

Para estudar qual o grau necessário de maturidade do osso alveolar para que tenha potencial osteogênico, (AMLER; JOHNSON, 1961) foram criados defeitos no fêmur de ratos, implantaram uma esponja de polivinil, e transplantaram estas esponjas, já povoadas com células ósseas, após uma e duas semanas, para as cavidades oculares dos animais. Verificaram que os enxertos das esponjas que permaneceram 2 semanas no fêmur tiveram a capacidade de produzir osso após a transferência para a área receptora. Nenhuma formação óssea foi notada com a utilização das esponjas que permaneceram uma semana em contato com o osso medular do fêmur.

Seguindo a premissa de que o tecido ósseo imaturo, em fases iniciais de reparação, possui potencial osteogênico, Halliday (1969) apresentou uma série de três casos em que utilizou a técnica de enxerto autógeno de osso imaturo. O tecido a ser transplantado provinha de uma loja óssea em cicatrização, criada cirurgicamente, há seis ou sete semanas. Um dos casos foi considerado, clinicamente, um sucesso. Os outros dois foram considerados sucessos parciais.

Uma descrição detalhada da técnica para a utilização do alvéolo dentário em reparação como área doadora foi feita por Soehren e Van Swol (1979). Especial ênfase foi dada ao plano de tratamento, no sentido de se escolher o melhor

momento para se realizar a extração, para que o tecido a ser transplantado tenha atingido o estágio ideal de maturação no ato do transplante. Os autores consideram que um período de 6 a 14 semanas seja necessário para que este tecido possa ser coletado. Esta variação de tempo se deve a variáveis como o tamanho do alvéolo, infecções e seqüestros ósseos. Alertam para os cuidados necessários no momento da extração, principalmente para que não haja comprometimento das tábuas corticais do alvéolo, o que poderia diminuir muito o volume do tecido ósseo em reparação.

O maior potencial osteogênico do osso imaturo ficou claramente demonstrado no estudo de Amler (1984). O autor criou cavidades no fêmur de ratos e colheu o osso reparativo em dois diferentes momentos: quando havia osso em regeneração e em uma fase mais avançada, já com traços de osso maduro, e os enxertou na cavidade ocular dos animais. Houve formação óssea em 72,7% dos casos em que o enxerto de osso imaturo foi utilizado, contra 17,4% dos quais foi testado osso maduro.

Paasanezi et al. (1989) apresentaram resultados clínicos (em humanos) e histológicos (em cães) da utilização do tecido ósseo em formação, como enxerto em defeitos periodontais. Nos dois casos clínicos apresentados (humanos), o tecido reparativo foi colhido de um alvéolo criado cirurgicamente. Nos cães, o tecido enxertado em defeitos de furca classe II, criados cirurgicamente, nos primeiros molares superiores, foi colhido dos alvéolos de extração dos incisivos inferiores. Histologicamente, na fase inicial de reparação (até 12 dias), iniciou-se uma atividade osteoclástica nas paredes ósseas do defeito, que gradualmente deu lugar a uma resposta mais osteoblástica. Na fase intermediária, o padrão de reparação e formação de osso, de ligamento periodontal e de cimento, era semelhante em

ambos os grupos, mas no grupo teste havia maior formação de novo cemento. Na fase avançada de reparação, além de 30 dias, o lado teste exibia abundância de novo osso preenchendo completamente a bifurcação, com grande número de osteoblastos, e osteóide recobrindo quase todas as trabéculas. No grupo controle, a formação óssea ocorreu apenas próximo às paredes apicais e linguais do defeito, o qual foi parcialmente preenchido por tecido conjuntivo.

Nenhum caso de reabsorção radicular extensa ou anquilose foi relatado quando este tipo de enxerto foi utilizado (HIATT; SCHALLHORN, 1973; PASSANEZI et al., 1989; ROSENBERG, 1971; SOEHREN; VAN SWOL, 1979; SOARES et al., 2005).

2.3. Componentes da Matriz Extracelular (MEC)

A regeneração dos tecidos periodontais é um processo altamente complexo. Depende da ação de diferentes tipos celulares (células ósseas, cementoblastos, e fibroblastos do ligamento periodontal e da gengiva) e da expressão de diversas moléculas da matriz extracelular (MEC), de devem interagir coordenadamente em uma seqüência temporal definida. O tipo de reparação – regeneração ou cicatrização – depende da disponibilidade dos tipos celulares e sinalização corretas, e das suas interações com o ambiente, para que estas células sejam recrutadas e estimuladas no momento adequado. (CHRISTGAU et al., 2007) Uma vez que estes sinais são provenientes de substâncias como fatores de crescimento e citocinas, a matriz extracelular regula a resposta das células a estes sinais. Portanto, a

expressão temporal de diferentes componentes da MEC é essencial para a regeneração dos tecidos periodontais (GRZESIK; NARAYANAN, 2002, CHRISTGAU et al., 2007). Devido às propriedades de participar da estrutura da matriz extracelular e, também, ter funções ativas de sinalização, migração e adesão sobre diferentes tipos celulares, a BSP (GANSS; KIM; SODEK, 1999; ARAMBAWATTA; YAMAMOTO; WAKITA, 2006), a OPN (BORNSTEIN, 2000, BORNSTEIN, 2000; ARAMBAWATTA; YAMAMOTO; WAKITA, 2006) e a ONC (BREKKEN; SAGE, 2001; BRADSHAW; SAGE, 2001) hoje podem ser denominadas como “*proteínas matricelulares*”. Esta categoria pode ser situada entre a categoria das moléculas que são primariamente estruturais e a das moléculas bioativas, como os fatores de crescimento e citocinas (BORNSTEIN, 2000).

A imunolocalização, realizada em dentes e tecidos periodontais de suporte, mostrou a presença de OPN, ONC, e BSP em tecidos mineralizados como dentina, cimento, e osso alveolar, em grandes mamíferos. (MCKEE; ZALZAL; NANJI, 1996)

Existe um pequeno número de estudos imuno-histoquímicos avaliando os tecidos regenerados de defeitos periodontais, mostrando a presença de colágeno tipo I e III, vitronectina, fibronectina, proteína óssea morfogenética tipo -2, -4 e -7, osteopontina e sialoproteína óssea (PRITLOVE-CARSON et al., 1994; AMAR et al., 1995; AMAR et al., 1997; MATSUURA et al., 1995; IVANOVSKI et al., 2000; SCULEAN et al., 2002; SCULEAN et al., 2003; CHRISTGAU et al., 2007).

A OPN e a BSP são glicoproteínas não colágenas que são secretadas em diferentes estágios da osteogênese e cementogênese. Ambas as proteínas parecem ter uma distribuição única no periodonto, e localizam-se, predominantemente, em interfaces de tecidos duros (MACNEIL et al., 1995a; MACNEIL et al., 1995b;

BOSKEY, 1996; GANSS; KIM; SODEK, 1999; SOMERMAN et al., 1999; SODEK; GANSS; MCKEE, 2000; GRZESIK; NARAYANAN, 2002; CHRISTGAU et al., 2007).

2.3.1 Sialoproteína óssea

A sialoproteína óssea (BSP) é uma glicoproteína ácida fosforilada e sulfatada que é achada quase que exclusivamente em tecidos conjuntivos mineralizados. Das proteínas ósseas não colágenas caracterizadas, a BSP é a única que parece ter as propriedades físicas e químicas para exercer o papel de nucleação dos cristais de hidroxiapatita durante o processo de mineralização de tecidos conjuntivos, como osso e cimento. (GANSS; KIM; SODEK, 1999) Portanto, parece ter papel fundamental no processo de mineralização tecidual, *in vivo* (COGAN et al., 2004), devido também à sua capacidade de se ligar, simultaneamente, à hidroxiapatita e a integrinas de superfícies celulares.

A BSP, durante a formação óssea, também interage com as células endoteliais, estimulando a angiogênese e dando suporte ao processo de invasão vascular (GANSS; KIM; SODEK, 1999). A expressão do gene da BSP é induzida por osteoblastos recém-formados e regulada por fatores e citocinas que estimulam e suprimem a formação óssea.

A BSP também foi associada à formação de cristais mineralizados em diversas patologias, incluindo o câncer de mama. Portanto, suas propriedades de adesão e sinalização a células, indicam que esta proteína pode exercer diversas funções na formação e remodelação óssea e em várias patologias.

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a BSP pode iniciar a formação de cristais de hidroxiapatita durante a formação de novo osso (CHEN; SHAPIRO; SODEK, 1992; KASUGAI; NAGATA; SODEK, 1992; SODEK; OVERALL, 1992). A BSP, é encontrada em altos níveis quando há a formação de novo osso, ou osso reparativo, sendo localizado, principalmente, em regiões de osso mais imaturo, ou osso entrelaçado (CHEN; SHAPIRO; SODEK, 1992; BIANCO et al., 1993) e cimento (MACNEIL et al., 1995a; MCKEE; ZALZAL; NANJI, 1996; BOSSHARDT et al., 1998). A relação entre BSP e a formação de osso mais maduro é menos convincente, pois os níveis da BSP declina rapidamente após a formação do novo osso (CHEN; SHAPIRO; SODEK, 1992).

A BSP parece ter outras funções, como adesão (ARAMBAWATTA; YAMAMOTO; WAKITA, 2006) e sinalização celular. A sua presença em linhas de reversão e em cimento indicam um papel potencial na adesão celular a superfícies mineralizadas. Esta função parece ser compartilhada com a OPN, apesar de diferirem na expressão temporal durante a formação óssea. (CHEN; SHAPIRO; SODEK, 1992).

O processo de reabsorção e remodelação óssea parece ter a participação da BSP, uma vez que juntamente com a OPN, é produzida por osteoclastos durante a remodelação óssea, *in vivo*. (BIANCO et al., 1993; ARAI et al., 1995; MASI et al., 1995).

Devido à sua localização restrita, a BSP fornece um importante marcador para diferenciação osteogênica e formação óssea, e também pode ser utilizada como molécula alvo para o estudo dos mecanismos regulatórios envolvidos na osteogênese. (GANSS; KIM; SODEK, 1999)

Em estudos de regeneração periodontal, a BSP foi determinada como o único marcador específico para a marcação de osso e cimento. (PRITLOVE-CARSON et al., 1994; MATSUURA et al., 1995; AMAR et al., 1995). Há evidências que sugerem que a BSP pode ter importante papel na cementogênese. (MACNEIL et al., 1995a)

2.3.2. Osteopontina

A osteopontina (OPN) é uma sialoproteína altamente fosforilada, descrita como um importante componente da matriz extracelular mineralizada de ossos e dentes e que tem importantes funções de adesão e sinalização celular. A presença da OPN em uma grande variedade de tecidos indica uma multiplicidade de funções. Apesar de não estarem ainda claras, estudos recentes indicam que a OPN pode ter várias funções em eventos biológicos diversos, como processos de desenvolvimento, cicatrização, resposta imunológica, tumorigênese, reabsorção óssea e calcificação. (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000).

A OPN é produzida em vários tecidos. No osso é produzida por osteoblastos em diferentes estágios de diferenciação (ZOHAR et al., 1997), por osteoblastos diferenciados e osteócitos (MCKEE; NANJI, 1995; SODEK et al., 1995) e, ainda por osteoclastos (DODDS et al., 1995).

A produção da OPN é influenciada por um grande número de hormônios, citocinas e fatores de crescimento, como o PDGF, o TGF- β e as BMPs, que podem aumentar a velocidade da síntese desta proteína a nível celular (DENHARDT; NODA, 1998).

A associação entre a presença da OPN e a formação de cristais minerais sugere fortemente uma função na regulação da mineralização de tecidos normais e patológicos, uma vez que OPN presente no osso inibe a nucleação e o crescimento dos cristais de hidroxiapatita. (BOSKEY, 2003; HUNTER; KYLE; GOLDBERG, 1994)

A integração entre a OPN e integrinas pode mediar a adesão celular, migração celular, quimiotaxia e sinalização intracelular em vários tipos celulares, incluindo osteoblastos e osteoclastos. Esta grande variabilidade de funções e sinais que a OPN pode realizar, em um ou mais tipos celulares, pode ser explicada pela existência de múltiplas combinações de cadeias de integrinas que se ligam à OPN e às diferentes formas de OPN, uma vez que a cadeia primária de OPN pode sofrer modificações, por meio de fosforilação, glicosilação, sulfatação e outros processos. (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000)

Foi verificado que a OPN secretada por macrófagos, e/ou derivada do sangue, recobre as superfícies fraturadas, expostas, de tecidos mineralizados, como osso e dentes, logo após a injúria, e também a superfície de biomateriais, logo após a sua implantação cirúrgica. Nestas circunstâncias, a OPN parece mediar a adesão celular a estas superfícies, como um pré-requisito para a cicatrização tecidual e a integração do biomaterial implantado. (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000)

A osteopontina foi localizada, imuno-histoquimicamente, em regiões específicas de ossos e dentes. Foi localizada, mais comumente, em linhas de reversão do osso em remodelação, demarcando o limite entre osso mais antigo e osso recém formado e também nos limites laminares nas superfícies ósseas. Estes dois tipos de localização definem limites entre matriz e matriz, e células e matriz, respectivamente. Esta OPN tem origem celular controversa, embora pareça que

osteoclastos e osteoblastos contribuam para a formação desta interface. (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000).

Os domínios de ligação a minerais da OPN pode ter a função de ligar a matriz aos minerais, e de guiar e regular a formação precisa dos cristais de hidroxiapatita nos espaços interfibrilares da matriz óssea. A OPN parece exercer função também sobre a superfície óssea, fornecendo uma superfície para a adesão de osteoclastos, osteoblastos, osteócitos, e células de revestimento, os quais geralmente são marcadas por OPN (MCKEE; ZALZAL; NANJI, 1996; SODEK et al., 2002). A marcação do cimento é mais uniforme que a do osso, com marcação positiva para cementoblastos e cementócitos (SODEK et al., 2002).

Além de ser um importante componente no acúmulo de camadas de cimento, a OPN é um importante componente no limite entre as superfícies ósseas interna e externa, desempenhando um papel crítico na interface entre o osso (matriz e minerais) e as células, influenciando adesão (ARAMBAWATTA; YAMAMOTO; WAKITA, 2006) e sinalização celulares e exercendo um papel na limitação do crescimento ósseo. Na seqüência temporal de formação óssea, a OPN age de forma bifásica. Inicialmente, durante a diferenciação de células ósseas, e, depois, com maior intensidade após o início da mineralização (MCKEE; NANJI, 1995; SODEK et al., 1995).

Nos dentes, a OPN está presente principalmente no cimento. Tanto o cimento celular quanto o acelular contem altos níveis de OPN, bem mais altos que os presentes no osso, sendo mais evidente no tipo acelular. (MCKEE; ZALZAL; NANJI, 1996; D'ERRICO et al., 1997; BOSSHARDT et al., 1998) Evidências sugerem que a OPN pode ter importante papel na cementogênese (BRONCKERS et al., 1994; MACNEIL et al., 1995a; IVANOVSKI et al., 2000) e também age como

inibidor de mineralização durante a formação do ligamento periodontal durante a odontogênese. (MACNEIL et al., 1995a)

A OPN não é normalmente localizada em células do ligamento periodontal (SODEK et al., 2002), no entanto, a localização da OPN em células do ligamento periodontal em reparação foi observada em um estudo em ratos (LEKIC; SODEK; MCCULLOCH, 1996a; LEKIC; SODEK; MCCULLOCH, 1996b). A OPN, a nível celular, parece exercer função na migração e no processo de formação de osteoclastos multinucleados, além de modular a capacidade de reabsorção de osteoclastos, *in vitro* (SODEK et al., 2002). Juntamente com a OPN extracelular, que pode atuar na quimiotaxia de células e também pode se ligar a receptores de membrana, ativando a sinalização de processos intracelulares, a OPN intracelular pode contribuir para diversas atividades biológicas da OPN, envolvendo processos de desenvolvimento, de reparação, de resposta imune e processos de tumorigênese e metastáticos (SODEK et al., 2002).

2.3.3. Osteonectina / SPARC

A osteonectina (ONC), ou SPARC (sigla em inglês para proteína secretada, acídica, rica em cisteína), é uma glicoproteína que se liga ao cálcio, e é encontrada na maioria dos tecidos conjuntivos em desenvolvimento, incluindo os tecidos moles e mineralizados dos dentes e de seus tecidos de suporte. É a proteína não colágena mais abundante em tecidos ósseos (BOSKEY, 1998; TERMINE et al., 1981).

A SPARC, devido à alta afinidade por fibras colágenas e hidroxiapatita, tem importante papel na adesão entre ambas as estruturas, ligando-se a elas por meio de dois domínios diferentes (TERMINE et al., 1981). Devido a esta propriedade, participa do processo de deposição do fosfato de cálcio no colágeno tipo I (MARTINEZ; ARAÚJO, 2004), parecendo exercer um papel na mineralização do osso, *in vivo* (ROBEY, 1996).

Por ter funções de inibição de progressão celular e por modular a ação de fatores de crescimento, foi sugerido que a SPARC pode exercer função na homeostase durante a remodelação óssea, na reparação de feridas e na angiogênese, (BREKKEN; SAGE, 2001; BRADSHAW; SAGE, 2001) além de exercer função na manutenção da densidade óssea. (DELANY et al., 2000)

Foi demonstrada (SOMMER et al., 1996) que a matriz dentinária apresenta níveis de SPARC tão altos quanto no osso. Outros estudos mostram que em tecidos dentais e periodontais, a SPARC tem fraca presença nos tecidos mineralizados, em contraste com sua forte marcação no ligamento periodontal (WASI et al., 1984; MCKEE; ZALZAL; NANJI, 1996).

A SPARC, conhecida como componente da matriz extracelular de tecidos conjuntivos e das membranas basais tem sido caracterizada como uma proteína secretada. No entanto, estudos mais recentes indicam que esta proteína foi encontrada no interior de células especializadas, indicando que a SPARC pode ter funções regulatórias a nível intracelular (SODEK et al., 2002). Mais recentemente, devido às descobertas de novas funções regulatórias, a SPARC foi incluída na nova classe de “proteínas matricelulares”, assim como a OPN e a BSP (BORNSTEIN, 2000; ALFORD; HANKENSON, 2006).

3 PROPOSIÇÃO

Diante do exposto, tem-se por objetivos:

1. verificar, por meio de análise imuno-histoquímica, o padrão de imuno-localização de componentes não colágenos da matriz extracelular – osteonectina, sialoproteína óssea e osteopontina – nas células e tecidos reparativos de defeitos de furca classe II, em cães, após o enxerto do tecido proveniente de alvéolos de extração, tratados previamente com IGF-I e PDGF-BB.
2. verificar o padrão de imuno-localização das proteínas não colágenas acima nas células e nos tecidos periodontais originais.
3. comparar os padrões de imuno-localização das proteínas supra citadas nas células e nos tecidos reparativos, verificando se existem diferenças entre os grupos teste e controle.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Foram utilizados para este estudo 4 cães jovens e saudáveis, de porte médio e sem raça definida.

4.1 Terapêutica Periodontal Reconstructiva

O material analisado neste estudo é proveniente de estudo anterior, realizado durante o mestrado. Maiores detalhes podem ser encontrados em nosso estudo anterior (SOARES et al., 2005).

Resumidamente, 4 cães, saudáveis, de porte médio, sem raça definida foram incluídos no estudo. No dia denominado -5, os animais foram sedados e submetidos à anestesia geral. Após a elevação de um retalho de espessura total por vestibular, foram extraídos os segundos e terceiros pré-molares superiores de ambos os lados. O retalho foi posicionado e suturado de modo que cobrisse totalmente os alvéolos. No interior do alvéolo resultante, foi aplicado uma combinação dos fatores de crescimento diluídos em um gel de metilcelulose^{*} a 2 % nas concentrações de 6 µg/ml de PDGF-BB[†] e 6 µg/ml[‡] de IGF-I. Foi aplicado, em cada alvéolo, 0,5 ml desta medicação. A sutura foi então completada.

^{*} Sigma Aldrich do Brasil Ltda.

[†] Sigma Aldrich do Brasil Ltda.

[‡] Sigma Aldrich do Brasil Ltda.

Cinco dias após as exodontias, no dia denominado 0 (zero), os cães foram novamente sedados e anestesiados e um retalho de espessura total com excisão de margem foi realizado envolvendo os segundos, terceiros e quartos pré-molares mandibulares, bilateralmente. Foram criados defeitos ósseos de furca grau II com dimensões padronizadas: 5 mm de altura (medidos a partir do teto da furca), 5 mm de largura mesio-distal e 4 mm de profundidade no sentido vestibulo-lingual.

As superfícies radiculares expostas foram cuidadosamente raspadas e aplainadas com aparelho de ultrassom[§] e curetas, com a finalidade de se remover o cimento das raízes expostas. Marcas foram realizadas nas superfícies radiculares, junto ao fundo do defeito e à junção esmalte cimento, para delimitar o defeito e servir como referências auxiliares durante a análise histométrica.

Posteriormente à criação dos defeitos de furca, o tecido reparativo dos alvéolos foi coletado. Este tecido foi inserido nos três defeitos de furca de um dos lados da mandíbula, escolhido aleatoriamente. O outro lado serviu como controle, reparando sem a adição de nenhum material de enxerto.

Os retalhos foram posicionados coronariamente à junção esmalte-cimento e suturados^{**}. O retalho da região doadora foi novamente suturado.

Para diminuir o risco de infecções pós operatórias alguns cuidados foram tomados. A todos os cães foram administrados antibiótico e antiinflamatório após cada intervenção cirúrgica. Os cães foram mantidos durante todo o experimento sob um rigoroso regime de controle de placa por meio da aplicação tópica diária de uma solução de digluconato de clorhexidina a 0,12%^{††}.

Após um período de reparação de 45 dias, os cães foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento da anestesia geral.

[§] Mini Piezon®, EMS

^{**} Vycril 4-0 – Ethicon – Johnson & Johnson

^{††} Periogard®, Colgate-Palmolive

4.2 Processamento histológico e imuno-histoquímico

Após a perfusão da cabeça dos animais com paraformaldeído a 10%, as mandíbulas foram dissecadas e seccionadas em blocos, contendo um dente controle ou teste. Os blocos foram imersos em solução fixadora por 24 horas e então descalcificados em EDTA^{††} a 10%. Os espécimes foram codificados, de modo que a análise histológica e imuno-histoquímica fosse cega.

Após completa descalcificação, os blocos foram seccionados no sentido vestibulo-lingual, para a determinação do plano de corte inicial, como descrito anteriormente (BOGLE et al., 1997). Os espécimes foram incluídos em parafina, e cortes de 7 µm de espessura foram estendidos em lâminas para a análise histológica em hematoxilina e eosina (H.E.) e cortes de 5 µm de espessura foram estendidos em lâminas silanizadas^{§§}, para a realização das reações imuno-histoquímicas.

Em seguida foram realizadas as reações imunoistoquímicas contra os componentes não colágenos da matriz extracelular (MEC), utilizando os seguintes anticorpos policlonais desenvolvidos em coelho: contra osteonectina (BON-I), contra osteopontina humana (LF-166) e o anticorpo contra sialoproteína óssea (LF-84) (FISHER et al., 1987). Os anticorpos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Larry

^{††} Sigma-Aldrich Ltda.

^{§§} ImmunoSlide, EasyPath, São Paulo, Brasil

W. Fisher.^{***} Os clones, titulação e tempo de incubação dos anticorpos estudados foram definidos após otimização e estão indicados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Clone, título de tempo de incubação dos anticorpos primários

Anticorpo	Clone	Título	Tempo de incubação
Osteonectina	BON-I	1:900	60'
Osteopontina	LF-166	1:250	60'
Sialoproteína óssea	LF-84	1:750	90'

Foi seguido o protocolo para a técnica imuno-histoquímica estabelecido pelo Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal na FOUSP para os anticorpos utilizados:

1. Desparafinização em 2 banhos de xilol: (1) por 30 minutos à temperatura de 60°C; e (2) por 20 minutos à temperatura ambiente.
2. Reidratação em uma série de etanol em concentrações decrescentes (absoluto por 3 vezes, 95%, 85%) em banhos de 5 minutos cada, realizando, ao final, um banho de 10 minutos em hidróxido de amônio a 10% em etanol 95% para a remoção de pigmentos formólicos, seguidos de 10 minutos em água corrente e 2 banhos em água destilada.
3. Bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 6% em metanol na proporção de 1:1, em 2 banhos de 15 minutos cada.
4. Lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 banhos em água destilada.
5. Dois banhos em solução tampão de TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) a 0,5 M, pH 7.4, cinco minutos cada imersão.

^{***} Matrix Biochemistry Unit, Craniofacial and Skeletal Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA

8. Incubação com soro suíno normal, diluído a 30% em BSA,^{†††} em câmara úmida, por 60 minutos para OPN e BON e por 90 minutos para BSP, para bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos.

Após estas etapas, todos os cortes seguiram para o equipamento DAKO Autostainer Universal Staining System,^{‡‡‡} onde se concluiu a reação com o seguinte protocolo:

1. Incubação dos anticorpos primários sob temperatura controlada a 37°C.
2. Incubação com o complexo terciário estreptavidina-biotina do Kit LSAB Peroxidase (código K0690).^{§§§}
3. Revelação da reação com DAKO Liquid DAB plus (código K3468)^{****}
4. Contra-coloração com hematoxilina de Mayer.

Entre cada uma das reações realizadas automaticamente, os cortes foram lavados duas vezes em TBST.

A seguir, todos os cortes foram desidratados numa série de etanol em concentrações crescentes (80%, 95% e 3 vezes em álcool absoluto) por 5 minutos cada e em seguida, diafanizados em xilol, seguindo para montagem final.

4.3 Método de análise do material

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz por um observador previamente calibrado, para identificar a presença ou ausência de marcação para

^{†††} Dako Corp. ®, Carpinteria, CA, USA

^{‡‡‡} Dako Corp. ®, Carpinteria, CA, USA

^{§§§} Dako Corp. ®, Carpinteria, CA, USA

^{****} Dako Corp. ®, Carpinteria, CA, USA

cada proteína e seu padrão de imuno-localização nos tecidos reparativos neoformados no interior dos defeitos periodontais.

A imunorreatividade foi determinada em ambos os grupos para matriz extracelular e células dos tecidos reparativos. As marcações foram consideradas negativas (-), fracamente positivas (+), positivas (++) ou fortemente positivas (+++) de acordo com a intensidade de impregnação da substância cromógena. (IVANOVSKI et al., 2000; PENTEADO; ROMITO; PUSTIGLIONI, 2005; CHRISTGAU et al., 2007)

4.3.1 Matriz extracelular

Foram analisados, na região de defeito periodontal, o novo tecido conjuntivo, o novo osso, e o novo cimento. Do lado lingual, onde foram preservados os tecidos periodontais originais, foram analisados o tecido conjuntivo gengival, o ligamento periodontal, o cimento e o osso alveolar.

4.3.2 Células

Foram analisados, na região de defeito periodontal, as células presentes no tecido conjuntivo neoformado, no novo osso, e no novo cimento. Do lado lingual,

foram analisadas as células do tecido conjuntivo gengival, as células do ligamento periodontal, os cementoblastos, os cementócitos, os osteoblastos e os osteócitos.

5 RESULTADOS

5.1 Observações clínicas

Todos os cães toleraram bem o período pós-operatório. Clinicamente, a reparação dos alvéolos de extração, após a adição dos fatores de crescimento ocorreu normalmente. Todos os sítios experimentais, tanto no grupo teste quanto no grupo controle, de todos os cães, repararam sem nenhum incidente, como infecção ou deiscência de retalho. Os tecidos periodontais apresentaram plena maturação no dia do sacrifício.

5.2 Análise histológica em H.E.

Os espécimes do grupo controle apresentaram um padrão de reparação bastante similar ao encontrado no grupo controle, com semelhantes níveis de formação de osso, cemento e ligamento periodontal. Uma imagem que representativa dos espécimes do grupo teste é apresentada na figura 5.1, e do grupo controle, na figura 5.2. As marcas (MV e MD) realizadas na superfície radicular para definir, respectivamente, os limites vestibular e lingual do defeito eram claramente visíveis, assim como os demais componentes estruturais da região.

Figura 5.1 – Aspecto histológico panorâmico de espécime do grupo teste, mostrando o epitélio gengival (E), infiltrado inflamatório (*), extensão apical do epitélio juncional, bordo da marca de referência vestibular (MV) utilizada como referência na histometria, bordo marca de referência do fundo do defeito (MD) utilizada como referência na histometria, novo osso (NO) e osso preexistente (OP). Área de novo osso estudada (A) (2,5 X – H.E.)

O epitélio juncional apresentou migração apical, em relação ao bordo vestibular da marca vestibular, e tinha espessura variável, de acordo com o espécime analisado. Subjacente a este epitélio, por vezes, encontrava-se um leve infiltrado inflamatório, predominantemente linfocitário, localizado na lâmina própria, próximo ao sulco gengival.

A análise histológica indicou que os tecidos neoformados apresentavam ainda elevada atividade metabólica e de remodelação, tanto no tecido ósseo quanto no tecido conjuntivo que preenchia o defeito.

O novo osso preenchia, em média, mais da metade da extensão vestibulo lingual do defeito. Este osso tinha características de osso primário ou imaturo. No grupo teste, assim como no grupo controle, este tecido apresentou diferentes níveis

de maturação e diferentes níveis de densidade óssea, dependendo do espécime e do corte analisado, não parecendo existir, portanto, uma relação entre o tratamento proposto e estes achados. A área de novo osso analisada foi a que se situava na área subjacente à dentina, por ser a região na qual se forma a nova inserção conjuntiva.

Figura 5.2 – Espécime do grupo controle, mostrando o epitélio gengival (E), extensão lingual do epitélio juncional, bordos da marca de referência vestibular (MV) e da marca de referência do fundo do defeito (MD) utilizados como referência na histometria; novo osso (NO) e osso preexistente (OP) (Tricrômico de Masson – 2,5 X)

Os osteoblastos tinham formato ovalado e citoplasma basófilo, caracterizando atividade funcional, ou seja, indicativos de produção e secreção de matriz extracelular. O endósteo também apresentava células de face ovalada e citoplasma basófilo, também caracterizando atividade. Estas células eram alternadas com

outras células de revestimento ósseo achatadas e alguns osteoclastos, o que sugeriu que este osso neoformado estava passando por uma fase de remodelação. Em nenhum espécime foi observada anquilose entre novo osso e as superfícies radiculares instrumentadas.

O tecido formado entre o novo osso e a superfície radicular tinha características de tecido conjuntivo frouxo, bastante celular, com grande densidade de feixes colágenos. Sobre as superfícies radiculares raspadas, notou-se uma repopulação por uma camada de células, que pareciam secretar uma camada de matriz com aparência consistente com a formação de novo cimento.

Parte das fibras colágenas apresentavam-se com orientação paralela à superfície radicular e também ao novo osso. Porém, eram visíveis feixes colágenos se inserindo em novo osso, sobre as superfícies radiculares e também a novo cimento, caracterizando fibras de Sharpey. Em alguns casos, foram observadas irregularidades sobre as superfícies radiculares, indicativas de reabsorção dentinária superficial.

O cimento neoformado sobre a superfície radicular tinha características de cimento reparativo, ou seja, era espesso e bastante celular, com predomínio de fibras intrínsecas e com poucas fibras de Sharpey se inserindo em sua superfície. As fibras colágenas extrínsecas (fibras de Sharpey) também se inseriam em novo osso, caracterizando um esboço de novo ligamento periodontal. A extensão de formação de novo cimento variou bastante entre os espécimes, se estendendo, em média, até a metade da extensão vestibulo-lingual do defeito.

O tecido utilizado como enxerto foi totalmente incorporado, sendo que em nenhum dos cortes analisados foram encontrados vestígios do material enxertado.

5.3 Análise imuno-histoquímica

A imunorreatividade foi determinada nas células e matriz componentes dos tecidos reparativos no interior dos defeitos nas vestibulares das bifurcações e também nos tecidos normais, na parte lingual das bifurcações. Os resultados estão resumidos na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Resumo da análise imuno-histoquímica

	Osteopontina		SPARC		Sialoproteína Óssea	
	Teste	Controle	Teste	Controle	Teste	Controle
Tecidos Regenerados						
Defeito						
Células	+/-	+++/-	-	+/-	-	++/-
Matriz	+	++	+	+	+	++
Osso						
Células	+/-	++(H)	-	++	+	++/-
Matriz	++	++	++	++(H)	+	+++ (H)
Cimento						
Células na superfície da raiz	+/-	++/-	+/-	+++	-	+/-
Matriz	+	++	+	++	++	+++ (H)
Tecidos normais						
Gengiva						
Células	-	-	-	-	-	++/-
Matriz	+	+	+	++	+	++
Ligamento Periodontal						
Células	+/-	+++/-	-	++/-	-	-
Matriz	+	+	+	++	+	++
Cimento						
Cementoblastos	++/-	+/-	-	+/-	-	++/-
Cementócitos	-	-	-	-	-	-
Matriz	+	+	+	+	+	+
Osso						
Osteoblastos	++/-	-	-	+	-	+/-
Osteócitos	-	-	-	-	-	-
Matriz	+	+	+	+	+	+

(H) imuno-localização heterogênia da proteína

- ausência de marcação

+ marcação fracamente positiva

++ marcação positiva

+++ marcação fortemente positiva

+/- marcação ambígua

5.3.1 Osteopontina (OPN)

O tecido conjuntivo, no interior do defeito, que corresponde ao ligamento periodontal neoformado apresentou marcação fracamente positiva para OPN no grupo teste (Figuras 5.3 A e B) e positiva no grupo controle (Figura 5.4 A e B). No grupo teste, os fibroblastos presentes no ligamento periodontal neoformado apresentaram alguma marcação intracelular fraca. No grupo controle, a marcação intracelular foi fortemente positiva.

Já a matriz do tecido ósseo neoformado apresentou marcação positiva em ambos os grupos, sendo que a marcação era levemente mais suave nas regiões mais centrais das trabéculas e mais forte na periferia destas trabéculas neoformadas e marcadamente mais forte em linhas reversão (Figuras 5.3 C e 5.4 C). As células ósseas presentes neste tecido apresentaram-se positivos no grupo controle e fracamente positiva no grupo teste (Figuras 5.3 E e 5.4 E).

A marcação do cemento neoformado foi fracamente positiva no grupo teste e positiva no grupo controle, enquanto que as células que recobrem a superfície radicular, no grupo teste foi fracamente positiva e no grupo controle foi positiva (Figuras 5.3 D e 5.4 D).

Do lado lingual, onde se encontram os tecidos periodontais originais, houve pouca ou nenhuma diferença entre os grupos teste e controle (Tabela 5.1). Sendo que a matriz extracelular do tecido gengival, do ligamento periodontal, do cemento e do osso apresentaram marcação fraca (Figuras 5.3 F, G, H, I, e 5.4 F, G, H, I). As linhas de reversão no osso alveolar original apresentavam marcação bem evidentes.

Figura 5.3 – Marcação imuno-histoquímica (anti-OPN) dos tecidos reparativos do grupo teste, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação fracamente positiva de novo tecido conjuntivo (NTC) e novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadro linear maior em “a”: marcação fracamente positiva e homogênea do NTC e marcação positiva do novo cimento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação positiva de NC e fracamente positiva de NTC, com algumas marcações positivas das células; (e) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação positiva e heterogênea da MEC de NO e marcação positiva de alguns osteoblastos; (f) – 2,5 X – marcação fracamente positiva da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de cimento (C), ligamento periodontal (LP), e osso (O); (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de C, LP e O; (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “f”: marcação positiva de células do LP e fracamente positiva da MEC de C e LP; (i) – 40 X – detalhe do quadrado tracejado menor em “f”: marcação fracamente positiva de O e positiva de uma linha de reversão no osso lamelar.

Figura 5.4 – Marcação imuno-histoquímica (anti-OPN) dos tecidos reparativos do grupo controle, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação positiva de novo tecido conjuntivo (NTC) e novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadro linear maior em “a”: marcação positiva e homogênea do NTC e marcação positiva do novo cimento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação positiva heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação positiva de NC e NTC, com algumas marcações positivas das células; (e) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação positiva da MEC de NO e marcação positiva de osteoblastos; (f) – 2,5 X – marcação positiva da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de cimento (C), ligamento periodontal (LP) e osso (O); (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de C e O e positiva de LP; (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “f”: marcação positiva de células do LP e positiva da MEC de C e LP; (i) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “f”: marcação fracamente positiva de O.

5.3.2 Ostenectina (BON ou SPARC)

O tecido conjuntivo, no interior do defeito, apresentou marcação fracamente positiva nos grupos teste e controle (Figuras 5.5 e 5.6 A e B). No grupo teste, os fibroblastos presentes no ligamento periodontal neoformado não foram marcados pelo anticorpo, enquanto que no grupo controle, a marcação intracelular quando presente, foi fraca.

A matriz do tecido ósseo neoformado apresentou marcação positiva em ambos os grupos, sendo que a marcação era levemente mais forte nas regiões mais centrais das trabéculas e mais suave na periferia destas trabéculas neoformadas (Figuras 5.5 C e 5.6 C). As células ósseas presentes neste tecido tinham marcação predominantemente negativas, com excessão de algumas células positivos nas superfícies externas de trabéculas ósseas neoformadas no grupo controle e (Figuras 5.5 E e 5.6 E).

A marcação do cemento neoformado foi fracamente positiva no grupo teste e positiva no grupo controle, enquanto que as células que recobrem a superfície radicular, no grupo teste foi fracamente positiva e no grupo controle foi fortemente positiva (Figuras 5.5 D e 5.6 D).

Do lado lingual, nos tecidos periodontais originais, houve pouca ou nenhuma diferença na marcação para SPARC entre os grupos teste e controle (Tabela 5.1). A matriz extracelular do tecido gengival, do ligamento periodontal, do cemento e do osso apresentaram, predominantemente, marcação fraca (Figuras 5.5 e 5.6 F, G, H, I).

Figura 5.5 – Marcação imuno-histoquímica (anti-BON ou anti-SPARC) dos tecidos reparativos do grupo teste, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação fracamente positiva novo tecido conjuntivo (NTC) e novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadro linear maior em “a”: marcação positiva e homogênea do NTC e marcação positiva do novo cimento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação fracamente positiva heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação fracamente positiva de NC e NTC; (e) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação fracamente positiva da MEC de NO; (f) – 2,5 X – marcação fracamente positiva da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de cimento (C), ligamento periodontal (LP) e osso (O); (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de C, O e LP; (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “f”: ausência marcação de células do LP e fracamente positiva da MEC de cimento celular (CC) e LP; (i) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “f”: marcação fracamente positiva de O.

Figura 5.6 – Marcação imuno-histoquímica (anti-BON ou anti-SPARC) dos tecidos reparativos do grupo controle, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação positiva de novo tecido conjuntivo (NTC) e novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadro linear maior em “a”: marcação positiva e homogênea do NTC e marcação positiva do novo cimento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação positiva heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação positiva de NC e NTC; (e) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação fracamente positiva da MEC de NO; (f) – 2,5 X – marcação fracamente positiva da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de CC, LP e O; (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de C, O e LP; (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: ausência marcação de células do LP e fracamente positiva da MEC de CC e LP; (i) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “f”: marcação fracamente positiva de O.

5.3.3 Sialoproteína óssea (BSP)

O tecido conjuntivo, no interior do defeito, apresentou marcação fracamente positiva no grupo teste e positiva no grupo controle para a BSP (Figuras 5.7.a,b e 5.8.a,b). No grupo teste, os fibroblastos presentes no ligamento periodontal neoformado não foram marcadas pelo anticorpo, enquanto que no grupo controle houve marcação intracelular positiva, em alguns espécimes.

Já a matriz do tecido ósseo neoformado apresentou marcação fraca no grupo teste e fortemente positiva no grupo controle, sendo que em ambos os grupos a marcação era levemente mais forte nas regiões periféricas das trabéculas neoformadas e nas paredes internas dos ósteons primários e secundários (Figuras 5.7.c e 5.8.c). As células ósseas localizadas nas superfícies externas presentes neste tecido tinham marcação predominantemente positivas, nos grupos teste e controle (Figuras 5.7.e e 5.8.e).

A marcação do cemento neoformado foi positiva no grupo teste e fortemente positiva no grupo controle, enquanto que as células adjacentes a este tecido, e que recobrem a superfície radicular, em geral não foram marcadas por anti-BSP, com exceção de alguns espécimes do grupo controle em que estas células foram marcadas fracamente (Figuras 5.7.d e 5.8.d).

Nos tecidos periodontais originais, do lado lingual, não houve diferença na marcação para BSP entre os grupos teste e controle (Tabela 5.1). A matriz extracelular do tecido gengival, do ligamento periodontal e do cemento apresentaram, predominantemente, marcação fraca (Figuras 5.5 e 5.6 F, G, H, I), enquanto que as células destes tecidos, com raras exceções tiveram marcação

negativa para a BSP. O osso alveolar original apresentou predominantemente marcação fraca, no entanto, as linhas de reversão, e a face interna dos canais de Harvers apresentaram marcação mais forte.

Figura 5.7 – Marcação imuno-histoquímica (anti-BSP) dos tecidos reparativos do grupo teste, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação fracamente positiva de novo tecido conjuntivo (NTC) e novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadro linear maior em “a”: marcação fracamente positiva e homogênea do NTC e marcação positiva do novo cimento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação fracamente positiva heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação positiva de NC e fracamente positiva de NTC; (e) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação fracamente positiva da MEC de NO; (f) – 2,5 X – marcação fracamente positiva da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de C, LP, e O; (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de cimento (C), osso (O) e ligamento periodontal (LP); (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “f”: ausência marcação de células do LP e fracamente positiva da MEC de cimento celular (CC) e LP; (i) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “f”: marcação fracamente positiva de O

Figura 5.8 – Marcação imuno-histoquímica (anti-BSP) dos tecidos reparativos do grupo controle, no interior do defeito (a, b, c, d, e) e no tecidos periodontais originais, na fase lingual (f, g, h, i); (a) – 2,5 X – m marcação positiva de novo tecido conjuntivo (NTC) e fortemente positiva de novo osso (NO); (b) – 10 X – detalhe de quadro linear maior em “a”: marcação positiva e homogênea do NTC e marcação fortemente positiva do novo cemento (NC); (c) – 10 X – detalhe de quadro tracejado maior em “a”: marcação positiva heterogênea de NO; (d) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “a”: marcação fortemente positiva de NC e positiva de NTC; (e) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação positiva da MEC de NO; (f) – 2,5 X – marcação fracamente positiva da MEC, dos tecidos originais, do lado lingual, de cemento (C) e osso (O) e positiva de ligamento periodontal (LP); (g) – 10 x – detalhe do quadrado maior de “f”: marcação fracamente positiva da MEC de C e O e positiva de LP; (h) – 40 X – detalhe de quadro linear menor em “f”: ausência marcação de células do LP e cemento celular (CC) e fracamente positiva da MEC de CC e LP; (i) – 40 X – detalhe de quadro tracejado menor em “a”: marcação positiva heterogênea de O.

6 DISCUSSÃO

As técnicas reconstrutivas periodontais devem ser criteriosamente avaliadas para que possam ser propostas como modalidades terapêuticas (SELVIG, 1994; WEINBERG; BRAL, 1999). Clinicamente, é possível a avaliação de alguns parâmetros como posição da margem gengival, profundidade clínica de sondagem, nível clínico de inserção, sangramento a sondagem e preenchimento ósseo, quando verificada cirurgicamente (GARRETT, 1996) ou quando realizada a sondagem transulcular (JARDINI; PUSTIGLIONI, 2000).

Portanto, as análises histológicas, histométricas e, mais recentemente, imuno-histoquímicas do potencial das técnicas reconstrutivas periodontais são importantes para a compreensão dos eventos biológicos envolvidos no processo de reparação e para a avaliação do tipo de reparação ocorrida: se houve regeneração dos tecidos perdidos ou alguma outra forma de reparação da ferida periodontal.

Os resultados clínicos e histológicos das terapêuticas regenerativas são bem documentados na literatura, enquanto pouco se conhece da dinâmica da cicatrização dos defeitos periodontais a nível celular e molecular durante o complexo processo regenerativo periodontal. (SOMERMAN et al., 1999; CHRISTGAU et al., 2007).

Dadas as dificuldades óbvias na obtenção de espécimes de humanos para avaliação histológica foi escolhido o modelo animal, com a utilização de cães, para a realização do presente trabalho.

O número proposto para o presente estudo foi de 4 animais, o qual foi considerado adequado para o objetivo de realizar uma análise descritiva

(MATSUURA et al., 1995; IVANOVSKI et al., 2000), que é o modelo de estudo mais adequado para análise imuno-histoquímica.

A opção, no presente estudo, pela utilização do defeito ósseo agudo (CATON et al., 1994), realizado com o auxílio de brocas e cinzéis, em detrimento dos defeitos induzidos por ligaduras, com acúmulo de placa bacteriana e defeitos periodontais naturais decorrentes de periodontite, foi devido à possibilidade de maior padronização dos defeitos entre diferentes dentes, grupos experimentais e cães, levando a um semelhante ponto de partida no processo de reparação (SELVIG, 1994), fato comprovado por nosso estudo anterior (SOARES et al., 2005), onde as dimensões dos defeitos se mostraram virtualmente idênticas na comparação de ambos os grupos, no modelo utilizado no presente estudo. Este tipo de modelo caracteriza-se, portanto, por avaliar o potencial de reparação de um determinado procedimento ou produto, sem se preocupar com a eliminação dos fatores etiológicos da doença periodontal (CATON et al., 1994).

Na análise histológica e histométrica, o plano de corte histológico no sentido mesio-distal é o mais comumente encontrado na literatura para a análise da reparação de defeitos periodontais de furca. No caso da análise da reparação de furcas grau II, alguns cuidados e considerações devem ser feitas, pois o valor real da análise de cortes no sentido mesio-distal foram questionadas (SELVIG, 1994). Cortes neste plano podem levar a dificuldades de interpretação, pois é muito difícil se certificar em que ponto, no sentido vestibulo-lingual, o corte foi realizado. Quando um corte é obtido de um ponto mais próximo do aparelho de inserção intacto (da parede lingual do defeito de furca vestibular, por exemplo), a análise pode mostrar uma falsa idéia de maior resposta regenerativa que um corte obtido de um ponto

mais distante do periodonto remanescente, simplesmente porque no primeiro caso, há uma menor distância das células precursoras (BOGLE et al., 1997).

O plano de corte utilizado no presente estudo, no sentido vestibulo-lingual, permite a completa avaliação da resposta reparativa do defeito de furca classe II, desde a sua porção mais lingual até o seu limite mais vestibular. Este tipo de análise permite também a avaliação precisa da resposta regenerativa em toda a extensão do defeito, principalmente na região próxima ao teto da bifurcação, na interface entre a superfície radicular e os tecidos neoformados.

O padrão histológico de reparação encontrado em ambos os grupos foi semelhante ao encontrado no grupo teste (membranas reabsorvíveis) do estudo de BOGLE et al., 1997) que utilizaram o mesmo tipo de plano de corte para análise histológica de defeitos de furca classe II. Naquele trabalho, entretanto, os defeitos eram provenientes de cães com doença periodontal natural e diferiam entre si nas suas dimensões. Portanto, havia chance de diferenças dimensionais dos defeitos entre os grupos, de acordo com a distribuição dos dentes para cada modalidade tratamento. Ademais, o fato de utilizarem dentes com periodontite natural pode ter criado mais variáveis entre os dentes e entre os grupos, pois as superfícies radiculares poderiam ter diferentes tempos de exposição à doença e poderiam estar contaminadas com placa bacteriana composta por microorganismos com virulências distintas.

Por outro lado, quando as superfícies radiculares expostas ao acúmulo de placa são raspadas, com a intenção de se remover o cemento, elas adquiririam as mesmas características de superfícies radiculares de defeito agudos (WIKESJÖ; KEAN; ZIMMERMAN, 1994). Assim, a reparação ocorreria de forma semelhante em

ambas as situações. Isto posto, foi escolhido o modelo de defeito agudo para a realização do experimento.

Foi adotado um desenho experimental de boca dividida, ou seja, um dos lados recebeu aleatoriamente o grupo teste e o outro, o grupo controle. Esta abordagem, já consagrada na literatura, permite que para cada dente testado, exista um dente controle homólogo, com as mesmas características anatômicas e de semelhante potencial reparativo no mesmo cão, permitindo a obtenção de dados de diferentes tratamentos do mesmo animal. Este desenho tem como principal vantagem a possibilidade da utilização de um menor número de animais para compor a amostra (SUSIN; ROSING, 1999). Pode-se argumentar que quando são utilizadas substâncias modificadoras da resposta do hospedeiro, como os fatores de crescimento, pode ocorrer um efeito “spill over”. Ou seja, por proximidade, ou através da circulação sanguínea, estas substâncias poderiam atuar sobre os sítios controle. O desenho ideal de estudo, para se contornar este efeito “spill over”, seria a aplicação das substâncias testadas em um grupo de animais e a aplicação de um placebo em outro grupo de animais, os quais deveriam ser pareados. A maior desvantagem deste modelo é a necessidade de um número muito elevado de animais, para diminuir a influência da resposta individual e, como já demonstrado na revisão de literatura, o modelo de boca dividida foi e continua a ser amplamente utilizado no estudo do potencial de utilização dos fatores de crescimento no tratamento periodontal reconstrutivo (CHO; LIN; GENCO, 1995; GIANNOBILE; FINKELMAN; LYNCH, 1994; GIANNOBILE et al., 1996; LYNCH et al., 1989; LYNCH et al., 1991; RUTHERFORD et al., 1992; WANG et al., 1994).

Um modelo experimental que tenha a mínimo possibilidade de regeneração espontânea, após as modalidades de tratamento convencionais, incluindo cirurgia,

seria desejável para a realização de estudos experimentais em animais (SELVIG, 1994; WEINBERG; BRAL, 1999; WIKESJÖ; KEAN; ZIMMERMAN, 1994), pois ficaria evidente que a regeneração obtida seria resultado, exclusivamente, da aplicação da técnica terapêutica proposta. O presente modelo apresentou significantes níveis de preenchimento ósseo e de formação de cemento no grupo controle, o que pode explicar, pelo menos em parte, os resultados quantitativos semelhantes de regeneração periodontal alcançados em ambos os grupos. Estes níveis de regeneração espontânea, comum a este tipo de modelo (CATON et al., 1994), constituiria a única desvantagem deste modelo, pois poderia diminuir a sensibilidade para a interpretação do potencial quantitativo de técnicas regenerativas.

Por outro lado, a regeneração espontânea do grupo controle deste modelo pode ser desejável e se apresentar como um ponto positivo, pois foi possível realizar uma comparação qualitativa entre os grupos teste e controle no presente estudo. A certeza de que haverá um percentual pré definido de regeneração neste modelo em cães, permite que sejam estudados os fatores, substâncias e seqüências temporais de expressão destas substâncias bioativas e dos eventos envolvidos na regeneração “natural” dos tecidos periodontais. Este conhecimento pode fornecer informações importantes para o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento periodontal reconstrutivo, uma vez que se mostrou um modelo bastante previsível para se estudar regeneração periodontal, além de ter uma ótima relação custo benefício, devido ao período reduzido dos animais em cativeiro.

Finalmente, este modelo deve ser escolhido quando novos materiais, drogas ou substâncias são estudados, para a verificação da segurança do seu uso e estabelecimento do risco de reações adversas durante o processo de reparação

periodontal. O estudo de Soares et al. (2005) observou a segurança da utilização de fatores de crescimento no presente modelo.

O tempo de reparação dos defeitos foi determinado em 45 dias, pois este período pós-operatório fornece parâmetros confiáveis do potencial quantitativo de reparação. Foi demonstrado (SELVIG, 1994) que, após este período, ocorre pouca ou nenhuma mudança nos parâmetros analisados, e já são encontradas consideráveis quantidades de novo osso e novo cimento na região das furcas. No entanto, mesmo não verificando diferenças quantitativas no nosso estudo anterior, (SOARES et al., 2005), consideramos que poderia existir alguma diferença qualitativa entre os grupos testados. Como observado no presente estudo imuno-histoquímico, foram verificadas diferenças nos estágios de reparação entre os grupos, com diferentes estágios da remodelação óssea e maturação dos tecidos neoformados, entre os grupos testados e nas diferentes regiões dos tecidos reparativos de ambos os grupos.

Houve grande semelhança nos aspectos histológicos morfológicos encontrados entre os dois grupos experimentais. Em ambos, houve pequena migração epitelial para o interior da furca e, conseqüentemente, predominou a interface do dente com tecido conjuntivo na extensão vestibulo-lingual do defeito. O osso neoformado apresentou semelhante extensão de neoformação, em ambos os grupos, assim como o novo cimento. A análise histométrica revelou altos níveis de nova inserção conjuntiva, formação de novo cimento e novo osso em ambos os grupos experimentais (SOARES et al., 2005).

Outro fator a ser considerado na análise dos resultados, são os cuidados que foram tomados para prevenir a movimentação e deiscência dos retalhos. No estudo de Bogle et al. (1997), onde foram utilizados cães com doença periodontal, o autor

relatou que durante o período pós-operatório, em alguns sítios experimentais as membranas foram deslocadas coronariamente por um tipo de tecido de granulação que cresceu entre a membrana e a superfície radicular. Pode-se considerar que, por se tratar de periodontite natural, os retalhos não tinham a integridade e quantidade de tecido disponível de quando são realizados defeitos agudos. Esta hipótese está de acordo com um estudo anterior (WIKESJÖ et al., 1991) que afirmou que a quantidade e qualidade de tecido dos retalhos, e a contaminação residual que pode permanecer após a raspagem podem afetar negativamente a reparação periodontal. Os retalhos, quando posicionados de maneira a prevenir a deiscência, e conseqüentemente, a exposição das membranas, e mantidos em posição sem distúrbios durante a fase de cicatrização, proporcionam melhores resultados com a utilização da técnica de RTG (LINDHE et al., 1995). Estes resultados podem ser extrapolados para o presente estudo, que demonstrou significativos ganhos de inserção conjuntiva e formação de novo cemento, e onde a cicatrização ocorreu sem qualquer movimentação aparente dos retalhos em ambos os grupos experimentais. O posicionamento coronário do retalho também pode ser considerado como um importante fator para os altos níveis de reparação, tanto no grupo teste quanto no grupo controle.

O objetivo de se usar o enxerto de tecido reparativo de alvéolos de extração para o tratamento de defeitos periodontais é transportar para o defeito um tecido com potencial de formação de tecido ósseo. Apesar de ser uma idéia relativamente antiga, (EVIAN et al., 1982; HALLIDAY, 1969; HIATT; SCHALLHORN, 1973; KREJCI; FARAH; BISSADA, 1987; PASSANEZI et al., 1989; ROSENBERG, 1971, SOEHREN; VAN SWOL, 1979) é possível traçar um paralelo com o novo conceito de engenharia de tecidos, que consiste no desenvolvimento de técnicas de

fabricação de novos tecidos, com a finalidade de substituir estruturas perdidas, baseados em princípios de biologia celular, biologia de desenvolvimento e ciências de desenvolvimento de biomateriais (BARTOLD et al., 2000). O tecido encontrado no interior dos alvéolos em reparação possui algumas características de um biomaterial ideal, como células em intensa atividade proliferativa e de diferenciação, com matriz extracelular contendo fatores de crescimento e diferenciação e componentes da MEC como proteínas colágenas e não colágenas diretamente envolvidas no processo de reparação óssea.

Alvéolos de extração foram propostos como fontes viáveis de material de enxerto (HIATT; SCHALLHORN, 1973) e devem ser cuidadosamente analisados, pois alguns alvéolos podem ser preenchidos por tecido conjuntivo fibroso, sem que ocorra regeneração óssea. Este tecido reparativo não seria um material apropriado para enxerto ósseo. Clinicamente, entretanto, a avaliação da qualidade deste tecido torna-se difícil.

A principal diferença do tecido reparativo de alvéolos em fase de reparação em relação aos demais tipos de enxertos ósseos autógenos intrabuciais é que sua população celular está primariamente voltada para produzir e remodelar tecido ósseo para o preenchimento ósseo do alvéolo, ao passo que os enxertos de tecidos ósseos já maduros encontram-se em uma fase metabólica estável. (SOEHREN; VAN SWOL, 1979).

Pode-se presumir que durante as diversas fases de reparação de um defeito ósseo, o tecido reparativo possui diferentes potenciais osteogênicos (AMLER, 1984; AMLER; JOHNSON, 1961; EVIAN et al., 1982). Portanto, existe alguma controvérsia na literatura quanto ao melhor momento para se coletar o material de enxerto dos alvéolos em reparação.

Evian et al. (1982) preconizam, baseados em um estudo histológico deste tecido em diferentes períodos de reparação (4, 6, 8, 10, 12 e 16 semanas), que o melhor momento para a coleta do tecido reparativo dos alvéolos seria da oitava à décima segunda semana após a exodontia, onde já haveria osso jovem presente, com poucos osteoblastos e osteóide, apesar de afirmarem em outro momento que da quarta à oitava semana era o período em que o tecido analisado tinha maior atividade osteogênica, com grande proliferação celular e de elementos de tecido conjuntivo.

Alvéolos com 8 a 12 semanas de reparação, em humanos, propostos como áreas doadoras (EVIAN et al., 1982), são considerados como fonte de osso maduro por Amler (1984), já que a partir da sexta semana depois da extração dois terços do alvéolo já estaria preenchido por novo osso. O ideal, segundo este autor, seria a coleta do tecido reparativo no momento em que este estivesse em sua fase mais regenerativa, ou seja, que apresentasse o maior potencial osteogênico. Esta hipótese foi reforçada pelos resultados de outro estudo (AMLER, 1984) no qual foi transplantado osso medular maduro e osso medular em regeneração para a cavidade ocular de ratos, mostrando claramente o maior potencial osteogênico do osso imaturo. Portanto, este autor sugere que o tecido com maior potencial osteogênico proviria de alvéolos em fases mais precoces de reparação.

Passanezi et al. (1989) sugerem que o tecido de alvéolos de extração de humanos com 25 a 30 dias de reparação têm grande potencial de formação óssea, pois durante esta fase o osso está imaturo e em uma fase proliferativa e de desenvolvimento. Por estar imaturo, este tecido apresenta grande celularidade e vascularização, o que tornaria maior a sua viabilidade após o transplante. Esta fase

pode ocorrer em diferentes períodos de reparação, segundo a idade do paciente (AMLER, 1981).

Um estudo em humanos (PENTEADO; ROMITO; PUSTIGLIONI, 2005) examinou, histologicamente e imuno-histoquimicamente, biópsias do tecido reparativo de alvéolos de extração e em 4 semanas de reparação foram caracterizadas células de linhagem osteoblástica em todos os espécimes analisados, além de ter sido verificado um alto índice de proliferação celular. Seus resultados indicam um alto potencial osteogênico deste tecido e os autores sugerem a possibilidade de sua utilização como enxerto ósseo em fases mais precoces de reparação.

Estas premissas nortearam o presente trabalho, no qual foi utilizado o tecido reparativo das fases iniciais de reparação do alvéolo.

Uma vez demonstrado, em estudo *in vivo*, que o PDGF-BB e o IGF-I possuem importante papel na reparação óssea e periodontal (GIANNOBILE et al., 1996; LYNCH et al., 1987; LYNCH et al., 1989; LYNCH et al., 1991; LYNCH; COLVIN; ANTONIADES, 1989; RUTHERFORD et al., 1992), estes fatores de crescimento foram adicionados aos alvéolos com o objetivo de estimular a multiplicação, diferenciação, migração e síntese de matriz extracelular das células envolvidas nos eventos iniciais da reparação do alvéolo, o que resultaria, em hipótese, em um tecido com capacidades osteogênicas e reparativas melhoradas, quando utilizadas como enxerto. (CORDIOLI, 2002; DE VUONO, 2002; FERRARO, 2002)

A concentração da combinação de IGF-I e PDGF-BB utilizada no presente estudo, 6 µg diluído em 1 ml de gel de metilcelulose a 2%, foi definida baseada nos estudos *in vivo* que utilizaram estes fatores de crescimento como estimuladores da reparação óssea e periodontal (GIANNOBILE et al., 1996; GIANNOBILE;

FINKELMAN; LYNCH, 1994; LYNCH et al., 1989; LYNCH et al., 1991; RUTHERFORD et al., 1992). A dose aplicada por alvéolo foi de 3 µg de cada fator de crescimento, uma vez que foi depositado 0,5 ml da medicação preparada no interior de cada alvéolo. Alguns trabalhos na literatura informam apenas, ou a dose aplicada, ou a concentração utilizada, sendo que este fator pode alterar por completo a interpretação dos resultados.

De Vuono (2002) e Ferraro (2002) adicionaram, respectivamente, IGF-I e PDGF-BB em alvéolos de extração de cães. Ambas utilizaram estes fatores de crescimento nas concentrações de 0,1 e 0,3 µg/ml e não verificaram significantes diferenças quanto às características histológicas e taxas de proliferação celular em relação a alvéolos que repararam sem a adição de fatores de crescimento. Cordioli (2002), com o mesmo modelo, não encontrou significantes diferenças na adição das mesmas concentrações dos dois fatores de crescimento em combinação nos alvéolos de extração. Estes autores consideram que um dos prováveis motivos tenha sido as baixas concentrações de fatores de crescimento utilizadas e o tempo analisado. Apesar de verificarem um aspecto histológico mais avançado na reparação nos grupos teste, não encontraram diferenças nas taxas de proliferação celular entre os grupos. Consideraram, portanto, que os fatores de crescimento provavelmente obtiveram seu pico de ação em fases mais iniciais no processo de reparação. Baseado nesta afirmação, foi decidido, no presente trabalho, pela coleta do material de enxerto aos 5 dias após as extrações.

A utilização dos fatores de crescimento com o objetivo de se obter regeneração periodontal tem sido realizada, com relativo sucesso, em experimentos *in vivo* (GIANNOBILE et al., 1996; GIANNOBILE; FINKELMAN; LYNCH, 1994; LYNCH et al., 1989; LYNCH et al., 1991; RUTHERFORD et al., 1992). Seu uso tem

se mostrado seguro em altas concentrações, inclusive em humanos (HOWELL et al., 1997, NEVINS et al., 2003). Entretanto, sua aplicação, nestes trabalhos, foi realizada diretamente nos defeitos periodontais, diferente do presente trabalho onde a utilização destes fatores foi feita de modo indireto, nos alvéolos que forneceram o tecido de enxerto.

Ao final do período experimental, entretanto, os resultados das análises histológica e histométrica revelaram que não houve diferença quantitativas entre os grupos testados, em nenhum dos componentes horizontais analisados. (SOARES et al., 2005)

A ausência de diferenças a favor do grupo teste quanto aos níveis quantitativos de regeneração, ou seja, formação de novo cemento, ligamento periodontal e osso, também pode ser atribuída a uma interpretação equivocada do potencial do enxerto em um estágio de maturação no qual se encontra as maiores taxas de proliferação celular. Talvez uma fase mais avançada na reparação dos alvéolos possa fornecer um tecido que, apesar de ter menores taxas de proliferação celular, seja composto por um conjunto de substâncias reguladoras, células e matriz extracelular que confirmam a este enxerto um maior potencial osteogênico quando transplantado.

O trabalho que ainda suporta esta teoria é o estudo realizado por AMLER, (1984), no qual demonstrou que o osso imaturo tem maior potencial osteogênico que o osso maduro, quando transplantado para cavidades oculares de ratos. Na literatura, os dados disponíveis sobre este tema vêm, quase sempre, de opiniões subjetivas dos autores, sendo que raros estudos experimentais controlados foram realizados para elucidar qual o tempo de maturação ideal deste enxerto.

Apesar das evidências apontarem o potencial da utilização deste tipo de enxerto no tratamento reconstrutivo das lesões periodontais, ainda faltam dados mais confiáveis sobre o seu real valor terapêutico, e em qual fase, durante a reparação do alvéolo, este tecido deve ser coletado com a finalidade de ser enxertado em defeitos periodontais. Ainda não é claro quando, exatamente, este tecido teria seu maior potencial osteogênico para ser transplantado. Estes são alguns subsídios que ainda faltam para o estabelecimento de um protocolo de tratamento, e que só estarão disponíveis quando estas perguntas forem respondidas através de trabalhos experimentais controlados, com o modelo experimental adequado.

A regeneração de tecidos periodontais perdidos depende da disponibilidade de células necessárias, do ligamento periodontal, e a presença ou ausência de estímulos e sinalização necessárias para recrutar e estimular estas células. A matriz extracelular (MEC) regula como estas células responderão a estes sinais (POLIMENI; XIROPAIDIS; WIKESJÖ, 2006). Nosso estudo anterior (SOARES et al., 2005) apenas verificou os níveis quantitativos do processo de reparação da técnica proposta. Com o objetivo de se conhecer um pouco mais o processo envolvido na reparação do nosso estudo anterior e caracterizar os tecidos e células que preenchem a região do defeito, foi realizada uma análise imuno-histoquímica com os espécimes daquele estudo, para os principais componentes não colágenos da MEC: osteopontina (OPN), osteonectina (BON ou SPARC) e sialoproteína óssea (BSP), seguindo a tendência atual de se pesquisar os fatores biológico que favorecem a migração e proliferação dos tecidos periodontais.

A OPN e a BSP são glicoproteínas não colágenas que são secretadas em diferentes estágios da osteogênese e cementogênese, tendo distribuição

semelhante, entre si, no periodonto, localizando-se principalmente nas interfaces de tecidos duros. (MACNEIL et al., 1995a, BOSKEY, 1996, GANSS; KIM; SODEK, 1999, SOMERMAN et al., 1999, SODEK; GANSS; MCKEE, 2000, GRZESIK; NARAYANAN, 2002, ARAMBAWATTA; YAMAMOTO; WAKITA, 2006)

A marcação imuno-histoquímica foi avaliada por meio de um microscópio ótico de luz, por um examinador calibrado, classificando-a como negativas (-), fracamente positivas (+), positivas (++) ou fortemente positivas (+++) de acordo com a intensidade de impregnação da substância cromógena, método comumente utilizado em estudos imuno-histoquímicos que avaliam a reparação periodontal. (IVANOVSKI et al., 2000; SIQUEIRA, 2006; CHRISTGAU et al., 2007) Quando, no mesmo espécime, em um dos parâmetros analisados, a marcação variava de acordo com a área analisada, a marcação era considerada heterogênea (H). Marcação heterogênea ocorreu principalmente em matriz óssea, onde foi possível observar que houve marcação de diferentes intensidades de acordo com a região analisada. Quando alguns espécimes de um grupo, em um dos parâmetros, apresentavam marcação e outros espécimes apresentavam ausência de marcação, a marcação era considerada ambígua (+/-), como foi observado na marcação, para os três anticorpos estudados, das células presentes no interior dos defeitos.

No osso alveolar intocado, do lado lingual da furca, observou-se, em ambos os grupos, diversas linhas de reversão e canálculos de Harvers que sofreram marcação mais forte por OPN, e BSP, confirmando a literatura, (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000) que demonstra que esta área é composta de osso lamelar maduro, mas que encontra-se em constante remodelação, possivelmente devido aos estímulos mastigatórios.

A presença de marcação por BSP e OPN, nas interfaces entre tecidos e também nas linhas de reversão indica a participação destas macromoléculas no mecanismo de adesão dos tecidos componentes de dente, osso alveolar e cimento. (ARAMBAWATTA; YAMAMOTO; WAKITA, 2006)

A análise de um momento apenas da reparação periodontal, torna difícil a interpretação da seqüência temporal do processo reparativo, o que poderia ser contornado com a inclusão de diferentes tempos de análise (MATSUURA et al., 1995; CHRISTGAU et al., 2007). Por outro lado, como demonstrado no presente estudo, pela marcação imuno-histoquímicas heterogênea da MEC de novo osso, o processo de reparação ainda apresenta regiões de osteogênese na periferia do osso neoformado, em suas porções mais vestibulares, o que possibilita a identificação de diferentes fases de maturação óssea em um mesmo espécime, fornecendo um interessante panorama da reparação periodontal no momento estudado. A localização de BSP e OPN nas porções mais coronárias e vestibulares do osso neoformado e em regiões de osso jovem deixa clara, uma vez que estas proteínas têm um papel importante na formação e remodelação óssea, a atividade metabólica aumentada nestas regiões, indicando que o processo reparativo ainda está em andamento. (IVANOVSKI et al., 2006)

A forte marcação de BSP em áreas com neoformação óssea, principalmente em áreas onde estava ocorrendo a deposição de matriz por odontoblastos, evidencia que a deposição temporal e espacial das BSP na MEC do osso e a habilidade da BSN em nuclear a formação de cristais de hidroxiapatita, indica um papel potencial da BSP na mineralização inicial de osso e cimento (OGATA, 2008).

O presente estudo demonstrou uma marcante presença de BSP e OPN nos tecidos neoformados no interior dos defeitos de ambos os grupos, sugerindo que

estes tecidos contêm células e macromoléculas da MEC que estão normalmente associadas com osso e cimento. A marcação por estes dois componentes, em conjunto, não colágenos da MEC indica também que estes tecidos e células estão associados ao processo de mineralização. (AMAR et al., 1995, AMAR et al., 1997)

Os sinais de reabsorção dentinária observados nos espécimes de ambos os grupos, foi descrita anteriormente (LINGHORNE; O'CONNELL, 1950; FRANK et al., 1974; BOSSHARDT; DEGEN; LANG, 2005; SOARES et al., 2005; CHRISTGAU et al., 2007), e parece expor fibras colágenas da dentina para facilitar a adesão da MEC com o novo cimento, fato caracterizado, no presente estudo, pela intensa marcação de OPN e BSP na interface entre dentina e novo cimento, que por sua vez foi marcada fortemente OPN e BSP.

O tecido neoformado no defeito, correspondente ao novo ligamento periodontal teve marcação positiva fraca para BSP e OPN, em contraste com o estudo de Christgau et al. (2007). Este fato pode ser explicado pelo fato deste estudo ter utilizado defeitos periodontais naturais, ao passo que o presente estudo ter utilizado o modelo com defeitos agudos, sem contaminação bacteriana, ou ainda por fatores gerais, como a idade dos animais. Recentemente, foi demonstrada ausência de marcação para OPN e BSP na superfície de raízes humanas, extraídas, com doença periodontal prévia, demonstrado uma possível influência negativa no potencial de regeneração periodontal em raízes previamente expostas a contaminação bacteriana (LAO; MARINO; BARTOLD, 2006).

O cimento neoformado também foi marcado fortemente para BSP e OPN, confirmando estudos anteriores (MATSUURA et al., 1995; IVANOVSKI et al., 2000; CHRISTGAU et al., 2007). Estes estudos sugerem que este padrão de marcação

para BSP e OPN parece indicar que a neoformação de cimento pode ter paralelo com a cementogênese.

A heterogeneidade de marcação de células entre os espécimes e até no mesmo espécime, está de acordo com estudos prévios (IVANOVSKI et al., 2000) e destaca a complexidade das populações celulares recrutadas para a área onde está ocorrendo o processo de reparação periodontal.

Foi possível verificar claramente, com o plano de corte vestibulo-lingual, que nas porções mais vestibulares dos defeitos, ainda existiam áreas de osteogênese em sua fase ativa, caracterizada pela marcação positiva de osteoblastos por BSP e BON, e pela marcação mais intensa das trabéculas ósseas neoformadas destas regiões, enquanto que em suas porções mais linguais, o tecido ósseo já se encontrava em uma fase mais avançada de reparação, com menor atividade metabólica.

Nas fases mais avançadas, após 12 meses, do processo de reparação periodontal, o padrão de marcação do tecidos neoformados é similar ao achado em regiões de tecidos periodontais originais (CHRISTGAU et al., 2007). No presente estudo, os tecidos neoformados no interior dos defeitos do grupo teste apresentou intensidade de marcação mais próximo ao do lado lingual, com os tecidos originais. Podemos inferir, também baseados em outros estudos (DENHARDT; GUO, 1993; GANSS; KIM; SODEK, 1999; SODEK; GANSS; MCKEE, 2000; CHRISTGAU et al., 2007) que demonstraram que osteóide neoformado tem forte imuno-localização de BSP e OPN, e que osso em fase de reparação apresenta marcação mais intensa para proteínas matricelulares, (ALFORD; HANKENSON, 2006) que o grupo teste estava em um estágio de reparação mais adiantado, com tecidos mais maduros, que o grupo controle.

A extrapolação do conhecimento advindo dos resultados do presente estudo, em cães, para humanos deve ser vista com reservas. Um estudo de imunolocalização em tecidos periodontais de humanos (IVANOVSKI et al., 2001) mostrou resultados diferentes do presente estudo. Neste estudo em humanos, a localização de osteopontina foi mais forte no ligamento periodontal do que na gengiva e no nosso estudo, ambas as regiões tiveram marcação semelhante, com maior marcação celular no novo ligamento periodontal. No estudo em humanos (IVANOVSKI et al., 2001), a BSP não foi localizada no ligamento periodontal, em contraste com o nosso e outros estudos em cães (IVANOVSKI et al., 2000). Por outro lado, em um estudo em ratos (MACNEIL et al., 1995a) a BSP foi localizada em tecidos moles no interior de defeitos periodontais em reparação, mostrando claramente a variabilidade interespecies apresentada na imuno-localização destas proteínas não colágenas da MEC.

Poucos estudos imuno-histoquímicos sobre reparação periodontal utilizaram um grupo controle, onde é realizado apenas a cirurgia a retalho. (CHRISTGAU et al., 2007) Sua ausência acarreta a falta de um parâmetro confiável na comparação e análise dos resultados do procedimento testado. No presente trabalho foi incluído um grupo controle, o qual apresentou significantes níveis de regeneração tecidual, fato que normalmente ocorre neste modelo em cães (SOARES et al., 2005). Tal fato, apesar de dificultar a análise do real potencial da técnica testada, forneceu ainda mais dados de análise e comparação dos eventos e das substâncias envolvidas no processo de regeneração natural.

Atualmente, a osteopontina, a osteonectina e a sialoproteína óssea são definidas como proteínas matricelulares, uma classe de proteínas componentes da MEC altamente expressas em ossos maduros ou em formação. Agem como

mediadores biológicos de função celular interagindo diretamente com as células ou modulando a ação de fatores de crescimento, proteases e outras proteínas da MEC. No entanto, como os efeitos biológicos destas proteínas estão diretamente com o ambiente em que elas estão presentes, os estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser observados em conjunto para maior apreciação de suas possíveis funções no processo de regeneração periodontal. Mais importante é realização de novos estudos em animais e humanos para se conhecer as funções específicas destas proteínas durante a regeneração periodontal e também na odontogênese, processo este que fornece informações importantes acerca da formação de cemento e da inserção conjuntiva, fundamentais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas na reconstrução periodontal

Com este modelo, abre-se um excelente campo de pesquisa para o estudo pormenorizado do processo de regeneração espontânea de defeitos periodontais, devido à alta reprodutibilidade dos níveis de regeneração espontânea. Estudos futuros, analisando em detalhe vários momentos da reparação periodontal espontânea, presente neste modelo animal, poderão fornecer dados importantes sobre a dinâmica e a seqüência temporal dos eventos biológicos e substâncias bioativas envolvidas neste processo, fornecendo valiosos conhecimentos para o desenvolvimento de futuras técnicas reconstrutivas.

7 CONCLUSÃO

Frente à metodologia empregada e dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que, após a utilização, como enxerto, do tecido reparativo proveniente de alvéolos dentários previamente tratados com uma combinação de PDGF-BB e IGF-I, no tratamento de defeitos de furca classe II em cães:

1. O padrão de imuno-localização das proteínas não colágenas da MEC estudadas, osteonectina, sialoproteína óssea e osteopontina, no interior dos defeitos, indicou a presença de tecidos mineralizados neoformados, que puderam ser caracterizados como novo cimento e nosso osso, este último com característica de osso imaturo, com núcleos de deposição destas proteínas, indicando que se encontrava em fase de remodelação em suas porções mais linguais e em fase de deposição destas proteínas por osteoblastos nas porções mais vestibulares.

2. O padrão de imuno-localização das proteínas estudadas, do lado lingual das bifurcações, indicou a presença de tecidos mineralizados maduros, que foram caracterizados, histologicamente e imuno-histoquimicamente como cimento e osso, apresentando padrões semelhantes nos grupos teste e controle

3. A maior intensidade de marcação para OPN, BSP e SPARC nos tecidos neoformados do grupo controle sugerem uma diferença no estágio de maturação tecidual entre os grupos teste e controle, onde o grupo teste estaria em um estágio menos ativo do ponto de vista metabólico, portanto mais avançado em relação ao controle.

REFERÊNCIAS¹

AAP, editor. Glossary of Periodontal Terms; 1992.

AAP. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. J Periodontol 1996;67(5):545-53.

Alford AI, Hankenson KD. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. Bone 2006;38(6):749-57.

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

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

Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1969;27(3):309-18.

Amler MH. The lag phase factor in bone healing and suggested application to marrow grafting. J Periodont Res 1981;16(6):617-27.

Amler MH. The effectiveness of regenerating versus mature marrow in physiologic autogenous transplants. J Periodontol 1984;55(5):268-72.

Amler MH. Age factor in human alveolar bone repair. J Oral Implantol 1993;19(2):138-42.

Amler MH, JOHNSON PL. Transference of osteogenic tissue to the anterior eye chamber by means of polyvinyl plastic sponge grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1961;14:868-76.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo Bases de Dados MEDLINE.

AMLER MH, JOHNSON PL, SALMAN I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc* 1960;61:32-44.

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;10(8):1209-17.

Arambawatta AK, Yamamoto T, Wakita M. An immunohistochemical study of the attachment mechanisms in different kinds of adhesive interfaces in teeth and alveolar bone of the rat. *J Periodont Res* 2006;41(4):259-65.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4(1):1-6.

Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000 2000;24:253-69.

Bartold PM, Narayanan AS, Page RC. Platelet-derived growth factor reduces the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation. *J Periodont Res* 1992;27(5):499-505.

Bianco P, Riminucci M, Bonucci E, Termine JD, Robey PG. Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition. *J Histochem Cytochem* 1993;41(2):183-91.

Blom S, Holmstrup P, Dabelsteen E. The effect of insulin-like growth factor-I and human growth hormone on periodontal ligament fibroblast morphology, growth pattern, DNA synthesis, and receptor binding. *J Periodontol* 1992;63(12):960-8.

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

Bornstein P. Matricellular proteins: an overview. *Matrix Biol* 2000;19(7):555-6.

Boskey AL. Matrix proteins and mineralization: an overview. *Connect Tissue Res* 1996;35(1-4):357-63.

Boskey AL. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:83-91.

Boskey AL. Biomineralization: an overview. *Connect Tissue Res* 2003;44 Suppl 1:5-9.

Bosshardt DD, Degen T, Lang NP. 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;320(3):399-407.

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

Boyan LA, Bhargava G, Nishimura F, Orman R, Price R, Terranova VP. Mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to the different isoforms of platelet-derived growth factor. *J Dent Res* 1994;73(10):1593-600.

Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 2001;107(9):1049-54.

Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* 2001;19(8):816-27.

Bronckers AL, Farach-Carson MC, Van Waveren E, Butler WT. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in the rat. *J Bone Miner Res* 1994;9(6):833-41.

Caffesse RG, Quiñones CR. Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol 2000* 1993;1:69-79.

Canalis E. Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest* 1980;66(4):709-19.

Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Isolation and characterization of insulin-like growth factor I (somatomedin-C) from cultures of fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1988;122(1):22-7.

Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J Cell Physiol* 1989;140(3):530-7.

Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2003;30(9):809-18.

Caton J, Mota L, Gandini L, Laskaris B. Non-human primate models for testing the efficacy and safety of periodontal regeneration procedures. *J Periodontol* 1994;65(12):1143-50.

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

Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 1995;66(6):522-30.

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

Clemmons DR. Structural and functional analysis of insulin-like growth factors. *Br Med Bull* 1989;45(2):465-80.

Cogan G, Bansal AK, Ibrahim S, Zhu B, Goldberg HA, Ganss B, et al. Analysis of human bone sialoprotein in normal and pathological tissues using a monoclonal antibody (BSP 1.2 mab). *Connect Tissue Res* 2004;45(1):60-71.

Cordioli MAG. Análise histológica e índice de proliferação celular do tecido reparativo de alvéolos dentários de cães, tratados ou não com os fatores de crescimento PDGF-BB e IGF-I, associados. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

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;7:320-7.

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

De Vuono MS. Análise histológica e do índice de proliferação celular da reparação de alvéolos dentários de cães tratados com o fator de crescimento IGF-I. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* 2000;105(7):915-23.

Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 1993;7(15):1475-82.

Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:92-102.

Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, 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;10(11):1666-80.

Evian CI, Rosenberg ES, Coslet JG, Corn H. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. *J Periodontol* 1982;53(2):81-5.

Ferraro AQ. Análise comparativa, histológica e imuno-histoquímica, da reparação de alvéolos tratados ou não com o fator de crescimento PDGF-BB. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* 1987;262(20):9702-8.

Frank R, Fiore-Donno G, Cimasoni G, Matter J. Ultrastructural study of epithelial and connective gingival reattachment in man. *J Periodontol* 1974;45(8):626-35.

Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J. Actions of insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* 1985;47:443-67

Gamal AY, Mailhot JM, Garnick JJ, Newhouse R, Sharawy MM. Human periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCl conditioned root surfaces. *J Clin Periodontol* 1998;25(5):404-12.

Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):79-98.

Garrett S. Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol* 1996;1(1):621-66.

Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol* 1994;65(12):1158-68.

Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodont Res* 1996;31(5):301-12.

Giannobile WV, Whitson SW, Lynch SE. Non-coordinate control of bone formation displayed by growth factor combinations with IGF-I. *J Dent Res* 1997;76(9):1569-78.

Green RJ, Usui ML, Hart CE, Ammons WF, Narayanan AS. Immunolocalization of platelet-derived growth factor A and B chains and PDGF-alpha and beta receptors in human gingival wounds. *J Periodont Res* 1997;32(2):209-14.

Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(6):474-84.

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

Hart CE, Bailey M, Curtis DA, Osborn S, Raines E, Ross R, et al. Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* 1990;29(1):166-72.

Hart CE, Forstrom JW, Kelly JD, Seifert RA, Smith RA, Ross R, et al. Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. *Science* 1988;240(4858):1529-31.

Heath JK. *Growth factors*: Oxford: IRL Press at Oxford University Press;1993.

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

Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1988;122(1):254-60.

Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1997;68(12):1186-93.

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

Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral diseases* 2006;12(4):358-63.

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

Ivanovski S, Li H, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res* 2001;36(3):131-41.

Jardini MAN, Pustiglioni FE. Estudo biométrico do espaço biológico em humanos por meio de sondagem transulcular. *RPG* 2000;7(4):295-302.

Kasugai S, Nagata T, Sodek J. Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro. *J Cell Physiol* 1992;152(3):467-77.

Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1983;112(6):2215-7.

Krejci CB, Farah CF. Osseous grafting in periodontal therapy, Part I: Osseous graft materials. *Compendium* 1987;8(9):722-4.

Krejci CB, Farah CF, Bissada NF. Osseous grafting in periodontal therapy, Part II: Nonosseous graft materials. *Compendium* 1987;8(10):785-7.

Lao M, Marino V, Bartold PM. Immunohistochemical study of bone sialoprotein and osteopontin in healthy and diseased root surfaces. *J Periodontol* 2006;77(10):1665-73.

Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Klokkevold PR, et al. The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J Periodontol* 2000;71(3):418-24.

Lekic P, Sodek J, McCulloch CA. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. *Anat Rec* 1996a;244(1):50-8.

Lekic P, Sodek J, McCulloch CA. Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. *Cell Tissue Res* 1996b;285(3):491-500.

Lindhe J, Pontoriero R, Berglundh T, Araújo M. The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 1995;22(4):276-83.

Linghorne WJ, O'Connell DC. Studies in the regeneration and reattachment of supporting structures of the teeth; soft tissue reattachment. *J Dent Res* 1950;29(4):419-28.

Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* 1989;84(2):640-6.

Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991;62(7):458-67.

Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84(21):7696-700.

Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 1989;16(8):545-8.

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

MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Somerman MJ. Localization and expression of osteopontin in mineralized and nonmineralized tissues of the periodontium. *Ann N Y Acad Sci* 1995b;760:166-76.

Mailhot JM, Sharawy MM, Galal M, Oldham AM, Russell CM. Porous polysulfone coated with platelet-derived growth factor-BB stimulates proliferation of human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 1996;67(10):981-5.

Martinez EF, Araújo VC. In vitro immunoexpression of extracellular matrix proteins in dental pulpal and gingival human fibroblasts. *Int End J* 2004;37(11):749-55.

Masi L, Brandi ML, Robey PG, Crescioli C, Calvo JC, Bernabei P, et al. Biosynthesis of bone sialoprotein by a human osteoclast-like cell line (FLG 29.1). *J Bone Miner Res* 1995;10(2):187-96.

Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992;63(6):515-25.

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

McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology* 1989;124(1):301-9.

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

McKee MD, 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;245(2):293-312.

Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, et al. Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology* 1992;131(3):1075-80.

Mumford JH, Carnes DL, Cochran DL, Oates TW. The effects of platelet-derived growth factor-BB on periodontal cells in an in vitro wound model. *J Periodontol* 2001;72(3):331-40.

Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol* 2003;74(9):1282-92.

Nishimura F, Terranova VP. Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors. *J Dent Res* 1996;75(4):986-92.

Ogata Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *J Periodont Res* 2008;43(2):127-35.

Passanezi E, Janson WA, 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.

Penteado R, Romito GA, Pustiglioni FEP. Morphological and proliferative analysis of the healing tissue in human alveolar sockets covered or not by an e-PTFE Membrane: A preliminary immunohistochemical and ultrastructural study. *Braz J Oral Sci* 2005;4(12):664-9.

Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A, Gronwald RG, Minne HW, Ziegler R. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor beta. *Endocrinology* 1990;127(1):69-75.

Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjö UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000* 2006;41:30-47.

Pritlove-Carson S, Palmer RM, Floyd PD, Morgan PM. Immunohistochemical analysis of tissues regenerated from within periodontal defects treated with expanded polytetrafluoroethylene membranes. *J Periodontol* 1994;65(2):134-8.

Rinderknecht E, Humbel RE. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976a;73(12):4379-81.

Rinderknecht E, Humbel RE. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976b;73(7):2365-9.

Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect Tissue Res* 1996;35(1-4):131-6.

Rosenberg MM. Free osseous tissue autografts as a predictable procedure. *J Periodontol* 1971;42(4):195-209.

Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE, Charette MF. Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodont Res* 1992;27(4 Pt 1):285-90.

Sant'Ana AC, Marques MM, Barroso TE, Passanezi E, de Rezende ML. Effects of TGF-beta1, PDGF-BB, and IGF-1 on the rate of proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro. *J Periodontol* 2007;78(10):2007-17.

Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol* 2000;71(10):1591-600.

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 Invest* 2002;6(3):175-82.

Sculean A, Junker R, Donos N, Windisch P, Brex M, Dünker N. Immunohistochemical evaluation of matrix molecules associated with wound healing following treatment with an enamel matrix protein derivative in humans. *Clin Oral Invest* 2003;7(3):167-74.

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

Siqueira FM. Distribuição dos componentes não colágenos da matriz extracelular em tumores odontogênicos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

Soares FP, Hayashi F, Yorioka CW, Pannuti CM, Gioso MA, de Lima LA, 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;76(10):1681-9.

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

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

Sodek J, Overall CM. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. *Matrix Suppl* 1992;1:352-62.

Sodek J, Zhu B, Huynh MH, Brown TJ, Ringuette M. Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Connect Tissue Res* 2002;43(2-3):308-19.

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

Somerman MJ, Ouyang HJ, Berry JE, Saygin NE, Strayhorn CL, D'Errico JA, et al. Evolution of periodontal regeneration: from the roots' point of view. *J Periodont Res* 1999;34(7):420-4.

Sommer B, Bickel M, Hofstetter W, Wetterwald A. Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone* 1996;19(4):371-80.

Stephan EB, Renjen R, Lynch SE, Dziak R. Platelet-derived growth factor enhancement of a mineral-collagen bone substitute. *J Periodontol* 2000;71(12):1887-92.

Susin C, Rosing CK. *Praticando odontologia baseada em evidências*. Canoas: ULBRA, 1999.

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981;26(1 Pt 1):99-105.

Terranova VP, Wikesjö UM. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. A review. *J Periodontol* 1987;58(6):371-80.

Van Wyk JJ, Svoboda ME, Underwood LE. Evidence from radioligand assays that somatomedin-C and insulin-like growth factor-I are similar to each other and different from other somatomedins. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;50(1):206-8.

Wang HL, Pappert TD, Castelli WA, Chiego DJ, Shyr Y, Smith BA. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. *J Periodontol* 1994;65(5):429-36.

Wasi S, Otsuka K, Yao KL, Tung PS, Aubin JE, Sodek J, et al. An osteonectinlike protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. *Can J Biochem Cell Biol* 1984;62(6):470-8.

Waterfield MD. Growth factor receptors. *Br Med Bull* 1989;45(2):541-53.

Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol* 1999;26(6):335-40.

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

Wikesjö UM, Selvig KA, Zimmerman G, Nilvéus R. Periodontal repair in dogs: healing in experimentally created chronic periodontal defects. *J Periodontol* 1991;62(4):258-63.

Zohar R, Lee W, Arora P, Cheifetz S, McCulloch C, Sodek J. Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *J Cell Physiol* 1997;170(1):88-100.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

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 alveólos 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

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP