**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

RICARDO VINICIUS NUNES ARANTES

**Estudo da angiogênese e da expressão temporal do VEGF e dos
seus receptores VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 durante o reparo
ósseo alveolar normal e com uso terapêutico de um
antiinflamatório não esteroideal seletivo para COX-2 em ratos**

**BAURU
2011**

RICARDO VINICIUS NUNES ARANTES

Estudo da angiogênese e da expressão temporal do VEGF e dos seus receptores VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 durante o reparo ósseo alveolar normal e com uso terapêutico de um antiinflamatório não esteroidal seletivo para COX-2 em ratos

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rumio Taga

BAURU

2011

Ar14e Arantes, Ricardo Vinicius Nunes
Estudo da angiogênese e da expressão temporal do VEGF e dos seus receptores VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 durante o reparo ósseo alveolar normal e com uso terapêutico de um antiinflamatório não esteroidal seletivo para COX-2 em ratos / Ricardo Vinicius Nunes Arantes. – Bauru, 2011.
187 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Rumio Taga

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo número: CEEPA 014/2009
Data: 1 de julho de 2009

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

A **Deus** por me conceder vida, saúde e por me guiar sempre pelo melhor caminho.

A minha querida Família, **Olavo Batista Arantes** (Pai), **Heloisa Nunes Lima** (Mãe) e **Fernanda Nunes Arantes** (Irmã), pelo amor incondicional, dedicação em minha educação e pelo exemplo de honestidade e princípios valiosos de caráter e dignidade. Obrigado por me ensinarem desde cedo a arte de dividir e compartilhar, seja no mais simples gesto de bondade a mais complexa forma de amor. Sempre me ORGULHAREI de vocês.

Ao meu tio **Laércio de Souza** por ser um exemplo de homem e por me ensinar que embora a vida seja repleta de “felicidades”, o que realmente importa é ter um grande coração e estar perto dos que você ama.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rumio Taga**, pela confiança dedicação, paciência e sabedoria com que soube conduzir-me nesta etapa da minha vida. Deixo aqui todo meu respeito e gratidão pelos ensinamentos ao longo destes anos. MUITO OBRIGADO por me conceder a honra de ser seu orientado e possibilitar alcançar meus objetivos. Tenho muito orgulho de dizer que fui orientado por um profissional tão competente.

A minha “co-orientadora”, **Dra. Tânia Mary Cestari**, pela estimável amizade, competência e pela generosidade ao longo deste trabalho. Obrigado por me acolher, me ensinar e demonstrar a arte em fazer ciência.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini** (UNESP-Bauru) e **Profa Dra. Irene Vicentini** (UNESP-Bauru), por despertarem em mim a vontade de fazer ciência e por me acompanhar em muitos momentos da minha vida.

Aos Professores do Laboratório de Histologia, **Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis**, **Profa. Dra Camila de Oliveira Rodini Pegoraro**, **Prof. Dr. Dagoberto S. Filho** e **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet**, por abrirem as portas deste laboratório e por contribuírem em meu aprendizado.

Aos **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, **Prof. Dr. Antônio de Castro Rodrigues** e **Profa Dra. Sandra Lia do Amaral** (UNESP-Bauru), por permitirem a realização dessa pesquisa nos laboratórios de Farmacologia, Anatomia e LEFEX.

A **Faculdade de Odontologia de Bauru** e aos **professores** que me possibilitaram aprender e a crescer profissional e pessoalmente.

A secretária **Vera Cruz Rufino** pela dedicação, empenho e disposição que sempre demonstrou em todo o mestrado.

Ao Laboratório Histologia, por me ensinar que competência e alegria podem caminhar junto. Em especial aos amigos e amigas, **Aldivina Alves**, **Andréa Spinolla**, **Gabriela Genaro**, **Elcia V. Silveira**, **Jéssica Paulin**, **Débora Furlaneto**, **Reinaldo Germino**, **Eduardo Belai**, **Tamiris Vallin**, **Caroline Rocha**, **Isabel Cristina Meneghetti**, **Teresa Silva** e **Carla** pela amizade, momentos de risada e descontração.

As amigas, **Daniele Ceolin, Patrícia Mortágua e Bruna Bighetti** por se fazerem sempre presente, participarem integralmente desse trabalho e pelos incentivos constantes, principalmente nos momentos difíceis.

Aos amigos **Bruno Alvares Viscelli, Carlos Eduardo Repeke, Renato Martins e Thiago José Dionísio** pelos ensinamentos tanto na ciência como na vida. Em especial ao meu grande amigo **Bruno Alvares Viscelli**, agradeço pela confiança, pela paciência, pela força nos momentos difíceis e por me conceder o prazer de alcançar esse sonho. Muito obrigado de coração.

Aos alunos de graduação de Fonoaudiologia e Odontologia e de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) por contribuírem em meu aprendizado. Em especial aos amigos **Guilherme Cardia, Enio Ratton e Juan Valdivia** por todas as histórias engraçadas e as muitas risadas.

Aos amigos **Bruno Constantini e Elder Marcon** pela amizade, incontáveis risadas e por sempre demonstrarem a importância de que simplicidade e humildade são características essenciais e admiráveis.

Aos amigos **David Mandl e Rafael Maekawa** pela amizade, pelos momentos alegres e pela convivência nesses anos de moradia.

As amigas, **Eliza Chiqueto, Luana Pagan e Naiara Abreu** que mesmo com a distância fizeram presentes com palavras amigas e confortadoras. Muito especiais.

Aos meus amigos de longa data, **Adriano Nuevo, Clóvis e Cleber Correia, Luciano Caetano, Julio Robson, Marcio Esdras, Rafael, Renato e Rodrigo Agápio, Rodrigo e Vitor Gouvea, Pablo, Eliza Carolina, Thamara Cristina**, por demonstrarem que a distância é insignificante perto de tamanha fraternidade. Realmente são irmãos incondicionais.

A Família **Constantini (Vilércio, Eliana, Marina, Bruno e Vó)** por me receber sempre em sua casa com um sorriso estampado no rosto, por me proporcionar momentos memoráveis de alegria e por me ensinar o quão magnífico é ser simples.

As Famílias **Bastos, Macedo, Nuevo, Arantes, Lima, Nunes, Porfírio e Silva** que sempre me acompanharam, adotaram e me ajudaram em minha jornada. Em especial a Família **Silva (Claudia, Jeziel e André)** responsável pela minha vinda a Bauru, pelas vitórias nos muitos momentos difíceis e por serem amigos presentes.

Aos **membros** da Igreja Presbiteriana do Centenário que mesmo distante sempre oraram e intercederam por mim.

Aos **ratos** que deram suas vidas para que outras vidas sejam salvas.

E a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** por conceder auxílio em forma de bolsa (2009/11333-5) e possibilitar o desenvolvimento desta pesquisa.

MUITO OBRIGADO.

“Deus sabe de todas as coisas e tenho fé
de que conduzirá meus passos...”

Ricardo Vinicius Nunes Arantes

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

(Ayrton Senna, *Tri-Campeão de F-1*, 1960-1994).

“SIM, VOCÊ PODE... Não há no nosso vocabulário a palavra impossível. Esse é o nosso lema.

(Equipe Hoyt, 2008)

Dick Hoyt (66 anos idade) após completar uma prova de Iron Man (3,8 Km de natação, 180 Km de ciclismo e uma maratona inteira no fim: 42,195 Km de corrida em mais de 13 horas) com RICK, SEU FILHO PORTADOR DE PARAPLEGIA (2008).

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do Meloxicam sobre a expressão do VEGF e de seus receptores durante o reparo alveolar pós-exodontia em ratos. **Material e Método:** Foi realizada a exodontia do incisivo superior direito em 180 ratos Wistar, machos, com 60 dias de idade, subdivididos em dois grupos: 1) Grupo controle (n=90): os animais receberam injeção intraperitoneal de 0,1 ml de solução 0.9% NaCl diariamente, durante 7 dias; e 2) Grupo experimental (n=90): os animais receberam injeção diária de 3mg/kg de massa corporal de Meloxicam em solução 0.9%NaCl, durante 7 dias. Após 3, 7, 10, 14, 21 e 30 dias, os alvéolos foram coletados, fixados em formol a 10% em tampão fosfato, radiografados e processados histologicamente. Para o PCR-RT, as peças foram colocadas em Trizol[®] e armazenadas a -80°C e para o *Western blotting* armazenado a -80°C. Cortes histológicos semi-seriados (250µm de intervalo entre os cortes) de todo o alvéolo no sentido transversal foram obtidos e corados pela hematoxilina e eosina. Avaliou-se nesses cortes pelo método morfométrico de volumetria de pontos a densidade de volume de tecido ósseo (%TO), tecido conjuntivo (%TC), coágulo sanguíneo (%Coa) e vaso sanguíneo (%VS). Os dados obtidos foram submetidos ao teste “t” para comparação entre os grupos por período e a ANOVA seguido do teste de Tukey para comparação entre períodos dentro de cada grupo, adotando nível de significância de $p < 0,05$. **Resultados:** A análise radiográfica mostrou ocorrência com o transcorrer do tempo alterações no contorno da cortical óssea e redução no tamanho do alvéolo, além de um pequeno aumento na radiodensidade na região central do alvéolo. Morfologicamente, o grupo experimental exibiu em todos os períodos analisados, um atraso no processo de reparo em relação ao controle, exibindo maior quantidade de coágulo sanguíneo com lenta substituição por tecido conjuntivo e menor reabsorção da cortical óssea alveolar e da formação/remodelação óssea. Na análise morfométrica a %TO no grupo controle foi de 0.817, 0.255, 0.368, 0.409 e 0.453 vezes maior em relação ao grupo experimental nos períodos de 3, 7, 10, 14 e 21 dias, respectivamente. Quanto a %Coa, os valores no grupo controle foram 0,097, 0,611, 1,189 e 1.497 vezes menor em relação ao grupo experimental nos períodos de 7, 10, 14 e 21 dias, respectivamente. A %VS no grupo controle apresentou 0,328 e 0,439 vezes maiores em relação ao grupo experimental nos períodos de 10 e 14 dias, respectivamente. A %TC não apresentou diferença estatística entre os grupos. As imunomarcações para VEGF e VEGFR-1 foram observadas em osteoblastos e osteócitos na cortical alveolar, e em fibroblastos no interior do alvéolo, com diferença estatisticamente significativa apenas para VEGFR-1, onde a imunomarcação no grupo controle foi 0,544; 0,325 e 0,325 vezes maior em relação ao grupo experimental nos períodos de 3, 7 e 10 dias, respectivamente. As análises do PCR-RT para VEGF no grupo controle foi 1,274 vezes maior no período de 10 dias em relação ao grupo experimental. Na expressão de RNAm para VEGFR-1, o grupo controle foi 1,431; 0,951 e 0,845 vezes maior nos períodos de 3, 10 e 30 dias, respectivamente, em relação ao grupo experimental e VEGFR-2 no grupo controle de 4,649 e 0,790 vezes maior nos períodos de 3 e 7 dias, respectivamente. A expressão protéica do VEGF no grupo controle foi 0,365; 1,056; 2,187 e 0,350 vezes maior nos períodos de 3; 7; 10 e 14 dias em relação ao grupo experimental. **Conclusões:** Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que o uso do antiinflamatório Meloxicam, administrado diariamente por 7 dias, altera a expressão do RNAm e das proteínas do VEGF e de seus receptores VEGFR, além de atrasar o processo de reparo e de remodelação óssea alveolar pós-exodontia.

Palavras-Chave: Alvéolo dental. Antiinflamatórios. Agentes indutores da angiogênese. Inibidores da ciclooxigenase -2. Fator de crescimento endotelial vascular.

ABSTRACT

Study of angiogenesis and temporal expression of VEGF and its receptors VEGFR-1/Flt-1 VEGFR-2/Flk-1 during the normal alveolar bone repair and with therapeutic use of a nonsteroidal anti-inflammatory selective for COX-2 in rats

Objective: To evaluate the effect of Meloxicam on the expression of VEGF and its receptors during the post-extraction alveolar healing in rats. **Material and Methods:** The extraction of the right upper incisor was made in 180 male Wistar rats, aged 60 days old. The sample was divided in: 1) Control group (n=90) - the rats received intraperitoneal injection of 0.1 ml of 0.9% NaCl daily for 7 days, and 2) experimental group (n=90) - the rats received intraperitoneally 3mg/kg body weight of Meloxicam in 0.9% NaCl solution daily for 7 days. At 3, 7, 10, 14, 21 and 30 days later, the alveolar samples were collected, fixed in 10% formaldehyde in phosphate buffer, radiographed and histologically processed. For RT-PCR, the samples were placed in Trizol and stored at -80 ° and for *Western blotting* stored at -80 °. Transversal semi-serial histological sections (with 250 μ m interval) of the whole alveolus were obtained and stained with hematoxylin and eosin. In these sections the volume density of bone tissue (% TO), connective tissue (% CT), blood clot (Coa%) and blood vessel (% VS) was evaluated by point counting volumetry morphometric method. The obtained data were compared between groups for period by "t" test and between periods within each group by ANOVA and Tukey test, with a $p < 0.05$ significance level. **Results:** **a)** The radiographic analysis showed changes in the contour of the cortical alveolar bone, reduction in size of the alveolus, and a small increase in radiodensity in their central region; **b)** Morphologically the experimental group showed, in all periods, a delay in the repair process as compared to control, displaying greater amount of blood clot with slow replacement by connective tissue and lower cortical alveolar bone resorption and bone formation / remodeling **c)** In morphometric analysis the %TO in the control group were 0.817, 0.255, 0.368, 0.409 and 0.453 times higher than the experimental group during periods of 3, 7, 10, 14 and 21 days, respectively. The %Coa, the values in the control group were 0.097, 0.611, 1.189 and 1.497 times lower than in the experimental group on days 7, 10, 14 and 21 days respectively. The %VS in the control group showed 0.328 and 0.439 times higher than in the experimental group on days 10 and 14 days respectively. The %CT showed no statistical difference between groups. **d)** The immunostaining for VEGF and VEGFR-1 were observed in osteoblasts and osteocytes in the cortical alveolar, and fibroblasts within the alveolus, which was statistically significant only for VEGFR-1, where the immunostaining in the control group was 0.544; 0.325 and 0.325 times higher than the experimental group during periods of 3, 7 and 10 days respectively **e)** The RT-PCR analysis for VEGF in the control group was 1.274 times higher within 10 days compared to the experimental group. In the expression of mRNA for VEGFR-1, the control group was 1.431; 0.951 and 0.845 times higher in periods of 3, 10 and 30 days, respectively, compared to the experimental group and VEGFR-2 was 4.64 and 0.79 times higher in periods of 3 and 7 days, respectively, and **f)** The protein expression of VEGF in the control group was 0.365; 1.056; 2.187 and 0.350 times higher in periods of 3, 7, 10, 14 and 21 days compared to the experimental group. **Conclusions:** Based on the present results it was concluded that the use of Meloxicam, antiinflammatory administered daily for 7 days, alters the expression of mRNA and protein of VEGF and its receptors VEGFR, and slows the process of repair and remodeling post extraction alveolar

Keywords: Tooth socket. Anti-inflammatory. Angiogenesis inducing Agents. Cyclooxygenase-2 inhibitors. Vascular endothelial growth factor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Total de área analisada
Aines	Antiinflamatório não esteroideal
Ang-1	Angiopietinas
ANOVA	Análise de variância
AVβ3	Integrina Alfa (v) β 3
Bcl-2	Célula B do linfoma 2
BMP	Proteína morfogenética óssea
°C	Grau <i>Celsius</i> (centígrado)
CEEPA	Comissão de Ética no Ensino de Pesquisa em Animais
cm	Centímetros
Coa	Coágulo sanguíneo
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
COX-2-/-	Ciclooxigenase 2 <i>Knockout</i>
CT	Ciclo limiar
CTL	Grupo controle
DAB	Solução líquida de 3'3 - Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAc	Ácido desoxirribonucléico complementar
dNTPs	Nucleotídeos (A, T, C e G)
dp	Desvio Padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
DEPC	Água com dietil pirocarbonato
EGF	Fator de crescimento epidermal
EP-2	Receptor de prostagladina 2
EP-4	Receptor de prostagladina 4
ETs	Endotelinas
EUA	Estados Unidos da América
EXP	Grupo experimental
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto

FGFb	Fator de crescimento de fibroblasto b
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
g	Grama
h	Hora
HE	Hematoxilina-Eosina
HIF	Fator de transcrição induzido pela hipóxia
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HSPG	Proteoglicana heparana sulfato
I	Cada estrutura
IgG	Imunoglobulina G
Inc.	Incorporação
IL-1α	Interleucina 1 α
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-8	Interleucina 8
IL -12	Interleucina 12
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IFNγ	Interferon γ
kDa	QuiloDalton
Kg	Quilograma
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
KVp	Pico quilovoltagem
LPS	Lipopolissacarídeo
Ltda	Limitada
M	Molar
m	Média
mM	Micromolar
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitro
mm²	Milímetros quadrados
mm³	Milímetros cúbicos
MMP-2	Metaloproteinase 2
MMP-9	Metaloproteinase 9

NGF	Neutrofinas
Nm	Número de células marcadas
ng/uL	Nanograma por microlitro
NRP	Neurofilia
P	Alvéolo inteiro
p	Valores de “p”
PBS	Tampão fosfato salino
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PG	Prostaglandina
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2	Prostaglandina F2
PGH2	Prostaglandina H2
PGI2	Prostaglandina I2
pH	Potencial de hidrogênio
pi	Número de pontos
PIS	Solução de isolamento de proteína
PLGF	Fator de crescimento placentário
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
PTH	Paratohormônio
RNA	Ácido ribonucléico
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
RLP13	Proteína ribossomal L13
rpm	Rotação por minuto
RQ	Quantitative reaction (Reação quantitativa)
RT- PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia polimerase em tempo real)
Runx2/cbfa1	Fator de transcrição com domínio Runt
S.A.	Sociedade Anônima
sc	Santa Cruz
TBS	Solução salina tamponada
TC	Tecido conjuntivo
TGF- α	Fator de crescimento tumoral alfa
TGF-β	Fator de crescimento tumoral beta

TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TXA2	Tromboxanas 2
TO	Tecido ósseo
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF₁₂₁	Fator de crescimento endotelial vascular ₁₂₁
VEGF₁₆₅	Fator de crescimento endotelial vascular ₁₆₅
VEGF₁₈₉	Fator de crescimento endotelial vascular ₁₈₉
VEGF₂₀₆	Fator de crescimento endotelial vascular ₂₀₆
VEGFR-1/ Flt-1	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1
VEGFR-2/ K1-1	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2
VEGFR-3	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 3
VS	Vaso sanguíneo
VSF	Fator estimulação vascular
V	Voltagem
Vti	Volume total de cada estrutura estudada
Vvi	Densidade de volume ou percentual do volume
WB	<i>Western blotting</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	17
2	PROPOSIÇÃO	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	ANIMAIS.....	29
3.2	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	30
3.3	TRATAMENTO PÓS-OPERATÓRIO	32
3.4	MORTE DOS ANIMAIS E COLETA DO MATERIAL	32
3.5	ANÁLISE RADIOGRÁFICA	33
3.5.1	Obtenção e análise das imagens radiográficas.....	33
3.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA	33
3.6.1	Procedimentos histológicos.....	33
3.6.2	Avaliação morfológica do processo de reparo alveolar nos cortes histológicos corados pela HE.....	35
3.6.3	Determinação morfométrica da densidade de volume (%) de cada estrutura envolvida no processo de reparo ósseo nos cortes corados pela HE.....	36
3.6.4	Procedimentos para a análise do VEGF e dos seus receptores por métodos imunoistoquímicos	37
3.6.5	Procedimento para a análise do VEGF por <i>Western blotting</i>	38
3.7	PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE DO VEGF E DOS RECEPTORES POR RT-PCR EM TEMPO REAL.....	41
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4	RESULTADOS	45
4.1	DADOS PONDERAIS.....	47
4.2	RESULTADOS RADIOGRÁFICOS	48
4.3	RESULTADOS MORFOLÓGICOS DOS CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS PELA HE.....	61
4.4	DENSIDADE DE VOLUME (V_{vi}) DE CADA ESTRUTURA NO ALVÉOLO	101
4.5	RESULTADOS MORFOLÓGICOS DOS CORTES IMUNOMARCADOS PARA VEGF E VEGFR-1	107

4.5.1	Imunomarcção para VEGF.....	107
4.5.2	Imunomarcção para VEGFR-1	121
4.6	NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS PARA VEGF/mm ² E VEGFR-1/mm ²	135
4.7	EXPRESSÃO DO RNAm PARA AS PROTEÍNAS VEGF, VEGFR-1 E VEGFR-2 por RT-PCR.....	137
4.8	DENSITOMETRIA DA ANÁLISE PROTÉICA POR <i>WESTERN BLOTTING</i> PARA O VEGF.....	142
5	DISCUSSÃO	145
5.1	MODELO EXPERIMENTAL E METODOLOGIA UTILIZADA	147
5.2	A UTILIZAÇÃO DOS AINES E O REPARO ÓSSEO ALVEOLAR	149
5.3	PRODUÇÃO INICIAL DA COX-2 E PARTICIPAÇÃO NA ANGIOGÊNESE DURANTE O PROCESSO DE REPARO ÓSSEO	151
5.4	A IMPORTÂNCIA DA VASCULARIZAÇÃO E DAS PROSTAGLANDINAS NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO	153
5.5	A EXPRESSÃO DO VEGF E SEUS RECEPTORES NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR	156
6	CONCLUSÃO	161
	REFERÊNCIAS	165
	ANEXOS	183

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas décadas, os estudos sobre reparo ósseo têm ganhado grande destaque, visando compreender e conhecer os principais fatores que influenciam e interferem direta e indiretamente neste processo.

Historicamente, os primeiros autores a destacar a importância da vascularização na osteogênese foram Albrecht von Haller (1763) e John Hunter (1794), o primeiro sugerindo que os vasos sanguíneos eram responsáveis pela formação óssea e segundo salientando a importância da vascularização no desenvolvimento e no reparo do tecido ósseo lesionado. A seguir, durante 150 anos os estudos focaram principalmente na participação das células ósseas na osteogênese, ficando o papel da vascularização quase que esquecido. O grande interesse sobre a participação da vascularização óssea na osteogênese foi reavivado, quando Trueta (1968) propôs que existia um fator de estimulação vascular (VSF) ativo em um sítio de lesão óssea e o tempo tem mostrado com precisão que esse prognóstico inicial era verdadeiro. Assim, hoje se sabe que a diminuição na formação óssea e na massa óssea está fortemente associada à insuficiência ou a inadequada vascularização sanguínea dentro e ao redor do tecido ósseo (BURKHARDT et al., 1987; GLOWACKI, 1998). Para salientar a importância desse fato, convém lembrar que só nos Estados Unidos ocorrem 6 milhões de fraturas ósseas por ano, sendo que, 5-10% apresentam falhas na reparação, causando dor e incapacidade e em alguns casos deformidade com a presença de uma não união atrófica (EINHORN et al., 1995). Em modelos animais, a inibição da angiogênese também leva a um quadro histológico de uma não união atrófica similar ao que ocorre em humano (HAUSMAN et al., 2001). Clinicamente, vários fatores como a inadequada imobilização, utilização de drogas, idade avançada, diabetes e desnutrição (EINHORN et al., 1995) estão relacionados com um fluxo sanguíneo inadequado ou uma lesão na vascularização local, sugerindo que efeitos adversos na vascularização podem ser o mecanismo pelo qual alguns fatores de risco podem prejudicar a reparação óssea (GLOWACKI, 1998).

Inúmeros fatores estão envolvidos na neoangiogênese, sendo os principais, o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento e transformação

beta (TGF- β), a proteína morfogenética óssea (BMP), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de transcrição induzido pela hipóxia (HIF), sendo que todos são expressos e ativos durante o desenvolvimento e o reparo ósseo (EINHORN et al., 1995; HAUSER et al., 1997; EINHORN, 1998; GLOWACKI, 1998; BARNES et al., 1999; FERGUSON et al., 1999; GERBER; FERRARA, 2000; STREET et al., 2000; TATSUYAMA et al., 2000; MANDRACCHIA et al., 2001; STREET et al., 2001; ZELZER et al., 2002; GERSTENFELD et al., 2003). Outros fatores com propriedades angiogênicas incluem as angiopoietinas (Ang-1), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), a família do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1, IGF-2) e as neurotrofinas (NGF) (MADEDDU, 2005). Dentre todas essas moléculas, salienta-se o VEGF, conhecido por ser um fator angiogênico *in vivo* e *in vitro*, mitógeno para células endoteliais e, por atuar na permeabilidade vascular (DVORAK et al., 1995). O VEGF tem participação no crescimento de tumor e na angiogênese patológica, mas também na formação dos vasos sanguíneos e na angiogênese durante o desenvolvimento embrionário (RISAU, 1997).

A família das moléculas relacionadas ao VEGF incluem 7 membros, o VEGF, o fator de crescimento placentário (PLGF) e o VEGF-B, -C, -D, -E e -F, e sua função biológica é mediada pela ligação com 3 tipos de receptores, o VEGFR-1/Flt-1, o VEGFR-2/Flk-1, e o VEGFR-3/Flt-4, e 2 co-receptores de neurofilina (NRP) e a proteoglicana heparana sulfato (HSPGs) (DAÍ; RABIE, 2007). Dentre os vários tipos de VEGF, o VEGF-A tem ação direta nos osteoblastos/condroblastos e condroclastos/osteoclastos (DAÍ; RABIE, 2007). A inibição da atividade do VEGF atrasa o reparo ósseo em camundongos (CHU et al., 2002; STREET et al., 2002) e diminui o fluxo sanguíneo na área lesionada em coelhos. Deste modo, durante o reparo ósseo, o VEGF é necessário não somente para a formação dos vasos sanguíneos, mas também para a formação do calo ósseo com volume e mineralização normal. Esses resultados indicam que a angiogênese normal é fundamental para o reparo tecidual, sendo o VEGF a principal molécula sinalizadora para a ligação da angiogênese à osteogênese durante o reparo (CHU et al., 2002; PENG et al., 2002; STREET et al., 2002; COLNOT et al., 2003).

Por outro lado, prostaglandinas (PGs) produzidas no osso em resposta ao processo inflamatório, a uma lesão e ao estresse mecânico (MURRAY; RUSHTON, 1990), têm também influência na regulação da formação óssea (RAISZ, 1984). Vários estudos têm demonstrado que o tratamento de perda óssea com a administração contínua de PGE-2 promove maior proliferação, diferenciação e atividade osteoblástica (XU et al., 2007) por alterar a expressão de moléculas essenciais para o desenvolvimento e a função destas células, como o fator de transcrição Runx2 (ZHANG et al., 2002) e o receptor tipo III para o TGF- β (GERSTENFELD et al., 2003). Os efeitos das PGs nos osteoblastos são mediados principalmente pelos receptores de PGE₂ tipos 2 e 4 (EP₂ e EP₄) (RADI; KHAN, 2005).

Além disso, um dos efeitos principais das prostaglandinas *in vivo* é a estimulação da angiogênese (ZICHE et al., 1982; FORM; AUERBACH, 1983; SPISNI et al., 1992). Contudo, essa atuação não se dá diretamente sobre o crescimento das células endoteliais, mas sobre outros tipos celulares como osteoblastos e fibroblastos, estimulando a expressão e liberação do VEGF que por sua vez age paracrinamente sobre as células endoteliais (CLARKIN et al., 2008).

Sabe-se que, a síntese de PGs ocorre a partir do ácido araquidônico pela catálise da ciclooxigenase (COX-1 e COX2). A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, enquanto que, a COX-2 é induzida pelo estímulo antiinflamatório (SEIBERT et al., 1994; DUBOIS et al., 1998; CAO; PRESCOTT, 2002), sendo especialmente hiper-regulada durante as fases iniciais do reparo ósseo. Vários estudos indicam uma relação entre o VEGF e a expressão de COX-2, correlacionando-os positivamente com a densidade de vasos, que estão fortemente ligados a angiogênese (CIANCHI et al., 2001).

Os efeitos terapêuticos das drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs) freqüentemente usadas no controle do edema, febre e dor, são devidos a sua ação inibitória sobre a COX-2, enquanto que efeitos negativos gastrointestinais são decorrentes da inibição da COX-1. Por isso, o uso de AINEs que inibem seletivamente a COX-2 reduz o risco de eventos gastrointestinais indesejáveis (BOMBARDIER et al., 2000; SILVERSTEIN et al., 2000; HOOPER et al., 2004; GARNER et al., 2005; MOORE et al., 2005; RAMEY et al., 2005). Os inibidores da COX são drogas eficientes no tratamento da dor e do processo inflamatório pós-

operatório e alguns estudos têm demonstrado seu efeito superior comparado a outros analgésicos, como o acetaminofen, codeína e opióides (O'HARA et al., 1987; MCLOUGHLIN et al., 1990; DAHL et al., 1995; FOGARTY et al., 1995; DAHL et al., 2004).

Desde meados da década de 1970, os efeitos negativos das drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINES), principalmente os inibidores da COX, no metabolismo ósseo e no processo de reparo de fraturas, têm sido avaliados. As pesquisas mostraram que essas drogas inibem a atividade osteoclástica, retardam a formação óssea e prejudicam o reparo de fraturas (SUDMANN, 1975; SUDMANN et al., 1979; ALLEN et al., 1980; KELLER et al., 1987; ENGESAETER et al., 1992; HØGEVOLD et al., 1992; ALTMAN et al., 1995; REIKERAAS; ENGEBRETSEN, 1998). No entanto, a maioria dos trabalhos existentes na literatura mostra resultados muito controversos (HUO et al., 1991; PRITCHETT, 1995; AKMAN et al., 2002; GAJRAJ, 2003; SEIDENBERG; AN, 2004; RADI; KHAN, 2005; MULLIS et al., 2006a,b).

Em um artigo de revisão, Fracon et al. (2008) salientam que esses resultados contraditórios estão ligados a variações metodológicas como a dosagem e o tempo de tratamento, além de variações quanto a sensibilidade intra e interespecies, fatores locais e sistêmicos compensatórios, o grau de remodelação óssea e a farmacocinética da droga citados por outros autores (RADI; KHAN, 2005; MULLIS et al., 2006b). Ainda para esses mesmo autores existe a necessidade, em modelos animais, de mais informações relacionadas às dosagens farmacocinéticas comparativas com as utilizadas em humanos, além de rever o seu uso em altas doses por um longo período de tempo, considerando que clinicamente o seu uso mais freqüente se dá no controle da dor aguda intra-operatória (GERSTENFELD, et al., 2003; MULLIS et al., 2006a). O seu uso prolongado é mais indicado para casos onde ocorre a necessidade de controle da dor crônica como nas desordens músculoesqueléticas, na osteoartrite e na artrite reumatóide. Devido a essa variedade de fatores, vários autores que relatam falhas no processo de reparo de fraturas ou interferências na fusão espinhal tanto em humanos como em animais, salientam que para a compreensão dos efeitos deletérios dos AINEs seletivos da COX-2 na osteogênese existe a necessidade de mais evidências clínicas e experimentais (FRACON et al., 2008).

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

No presente trabalho propomo-nos a avaliar pela morfometria, imunoistoquímica, *Western blotting* e RT-PCR a expressão do VEGF e dos receptores VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 durante o reparo ósseo alveolar normal e com uso terapêutico de um antiinflamatório não esteroide seletivo para COX-2 em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para obtenção dos dados radiográficos, morfológicos, morfométricos e moleculares foram utilizados 180 ratos (**Rattus norvegicus**) Wistar, machos, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), subdivididos conforme o cronograma apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Cronograma de utilização dos animais

Os ratos foram alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor-Anderson & Clayton S.A) e água *ad libitum*, com exceção das primeiras 24 horas pós-exodontia, em que essa alimentação foi triturada. Os animais foram acondicionados em caixas individuais, previamente descontaminadas por ação de detergente enzimático (Detergerm Enzimático Johnson Diversey) e desinfetadas por

fricção de álcool 70% por 3 vezes, aguardando a secagem entre uma aplicação e outra, e finalmente forradas com maravalha estéril.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru Universidade de São Paulo (FOB/USP) no dia 06 de Agosto de 2009, processo CEEPA nº 014/2009 (Anexo A) e no dia 04 de Maio de 2010 foi aprovado o uso de mais 80 animais (Anexo B) para substituírem os que foram perdidos durante os procedimentos cirúrgicos devido a permanência de parte da raiz do incisivo no interior do alvéolo.

3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Com os animais sob anestesia geral por injeção intramuscular de Cloridrato de Ketamina (Dopalen AgriBrands Ltda) e Cloridrato de Xilazina (Anasedan - AgriBrands Ltda), sedativo e relaxante muscular de uso animal, respectivamente, realizou-se a extração do incisivo central direito de cada rato (OKAMOTO; RUSSO, 1973), (Figura 2a) com instrumentais cirúrgicos adaptado para esse fim.

Inicialmente, foi feito uma sindesmotomia seguida de luxação lateral do dente (Figura 2b-d), tomando-se cuidado para a não ocorrência de fratura do dente ou da tábua óssea externa, até a extração propriamente dita do dente (Figura 2e-f), mantendo sempre a integridade da crista óssea (Figura 2g).

Após os procedimentos cirúrgicos, cada animal foi mantido em gaiola individual durante todo o período experimental no Biotério Central da FOB-USP.

Figura 2 - Procedimentos cirúrgicos: **a)** visão panorâmica da cavidade bucal mostrando o incisivo superior (seta) que foi extraído; **b)** dissecção da mucosa gengival; **c)** deslocamento do incisivo da respectiva crista alveolar; **d)** luxação do incisivo com auxílio de um porta agulha; **e)** extração do incisivo através de movimento circular de vestibular para a lingual; **f)** incisivo (seta) e a abertura da cavidade alveolar após a extração; e **g)** integridade da crista do osso alveolar (seta)

3.3 TRATAMENTO PÓS-OPERATÓRIO

Grupo controle: os animais receberam injeção intraperitoneal de 0,1 ml de solução 0.9%NaCl diariamente durante 7 dias.

Grupo experimental: os animais receberam injeção intraperiotoneal de 3mg/kg de massa corporal de Meloxicam em 0,1 ml de solução 0.9% NaCl em dose única diária, durante 7 dias. A concentração do Meloxicam utilizada foi de 3mg/ml, sendo que um animal pesando 250g recebeu a dosagem diária de 0,25mL (BEZERRA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008).

3.4 MORTE DOS ANIMAIS E COLETA DO MATERIAL

Decorridos os períodos experimentais 3, 7, 10, 14, 21 e 30 dias, os animais foram mortos por dose excessiva de anestésico e, imediatamente, a maxila direita foi separada da esquerda através de uma incisão com utilização de bisturi com lâmina 10 ao nível do plano sagital mediano, acompanhando a sutura intermaxilar. Com auxílio de uma tesoura reta fez-se um corte tangencial a face distal do último molar, obtendo-se a peça com alvéolo dental direito. Conforme o tipo de análise a ser realizada, as hemimaxilas foram processadas da seguinte maneira:

- a) **Análise histológica e imunoistoquímica:** a hemimaxila foi fixada em formol neutro à 10% em tampão fosfato por 24 horas e subsequentemente, submetidas ao processamento histológico.
- b) **Análise da expressão do RNAm:** a região do alvéolo do dente incisivo superior direito foi dissecada com auxílio de lâminas de bisturi e tesoura de tal forma a remover o excesso de tecido ao redor do alvéolo. O alvéolo coletado foi triturado com auxílio de um alveolótomo e armazenado em tubo de microcentrífuga contendo 1ml de Trizol[®] (Invitrogen, EUA) a temperatura de -80°C.
- c) **Análise protéica:** o alvéolo foi cuidadosamente dissecado como descrito no item anterior e armazenado em tubo de microcentrífuga a -80° C.

3.5 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

3.5.1 Obtenção e análise das imagens radiográficas

Após o período de fixação das peças, imagens radiográficas foram obtidas no Departamento de Estomatologia (Disciplina de Radiologia), da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB/USP), com filme oclusal para radiografia dental Kodak Insight IO-41 (Eastman Kodak Company – EUA) e o aparelho de raios-X, modelo X-707 (Yoshida Dental MFC Co. Tóquio, Japão regulado em 70 KVp e 7mA, sendo a distância foco-filme de 40cm e o tempo de exposição de 0,17s. A revelação foi realizada em conjunto e com critérios rigorosos de temperatura e tempo.

Na análise radiográfica procurou-se observar o aspecto geral do alvéolo e as possíveis alterações entre grupos (controle x experimental por período) e entre os diferentes períodos dentro do grupo quanto à densidade radiográfica.

3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

3.6.1 Procedimentos histológicos

Em seguida, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA (solução contendo 4,13% de Tritriplex III Merck® e 0,44 de hidróxido de sódio) à temperatura de 2 a 8°C, por aproximadamente 30 dias. Em seguida, as peças foram processadas histologicamente até a inclusão em Histosec® (Merck). Cortes semi-seriados de 5 µm de espessura foram obtidos no sentido transversal e coletados em lâminas comuns para coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE) e em lâminas silanizadas para as imunomarcações.

Uma metodologia nova foi aqui introduzida para permitir a obtenção de dados absolutos quanto ao volume total do alvéolo e das estruturas segundo o método de Cavalieri (1635 apud HOWARD; REED, 1998), sendo desenvolvido como

um projeto a parte por uma aluna de IC (com solicitação de bolsa para a FAPESP processo nº 2010/20747-5).

Assim, ao invés de cortes longitudinais, inicialmente propostos, foram obtidos cortes transversais, semi-seriados de todo o alvéolo, abrangendo os terços da região coronal, da região média, e da região apical.

Para a padronização da distância entre os cortes semi-seriados foi realizado um projeto piloto utilizando-se dois alvéolos: um obtido aos 3 dias pós-cirúrgico, quando o alvéolo se encontrava intacto e o outro após 30 dias, quando já havia ocorrido uma acentuada redução no seu volume. Cortes transversais seriados de 5 μm de espessura foram obtidos de todo o alvéolo (Figura 3) e corados pela HE. A área do alvéolo em todos os cortes seriados foi determinada em um sistema de análise digital KS300 (Carl Zeiss).

Figura 3 - Esquema representativo do alvéolo de rato obtido aos 3 e 30 dias pós-operatório mostrando que aos 30 dias ocorre uma acentuada redução da região coronal e menor na apical, reduzindo o número de cortes seriados

O volume médio obtido em cortes sequenciais de 5 μm e alternado a cada 25 cortes (125 μm), 50 cortes (250 μm) e 100 cortes (500 μm) está apresentado na tabela abaixo. A espessura T máxima entre os cortes dentro de um erro aceitável de 5% foi de 250 μm (Figura 4).

Figura 4 - Esquema representativo do alvéolo de rato obtido aos 3 e 30 dias pós-operatório mostrando os cortes a serem avaliados segundo o método de Cavalieri para o cálculo do volume total do alvéolo

3.6.2 Avaliação morfológica do processo de reparo alveolar nos cortes histológicos corados pela HE

Os cortes histológicos foram analisados no microscópio Axioscope 2 (Zeiss). Na análise histológica procurou-se observar os seguintes eventos: a) intensidade da angiogênese; b) reabsorção do coágulo sanguíneo; c) formação de tecido conjuntivo, ósseo e medular; d) remodelação óssea com a presença de osteoclastos; e e) o grau de maturação do tecido ósseo neoformado.

3.6.3 Determinação morfométrica da densidade de volume (%) de cada estrutura envolvida no processo de reparo ósseo nos cortes corados pela HE

A densidade de volume (V_{vi}) definida como a fração de volume do todo (alvéolo) ocupada por um determinado constituinte do todo (tecido conjuntivo, vaso sanguíneo, tecido ósseo e medula óssea) foi avaliada no sistema de análise de imagens Kontron KS-300 (Carl Zeiss, Alemanha). Para tanto, foram analisados cortes representativos de cada terço (apical, médio e coronal) de cada alvéolo. Em cada terço foram avaliadas 60 imagens, selecionadas por amostragem sistemática (WEIBEL, 1969), sendo no total 180 imagens para cada alvéolo. Salientando-se que nesse esquema de amostragem os campos histológicos são escolhidos a intervalos regulares, de maneira que todas as regiões do corte histológico estejam representadas.

A densidade de volume (V_{vi}) de tecido ósseo, coágulo sanguíneo, tecido conjuntivo, vaso sanguíneo, medula óssea, infiltrado inflamatório e outras estruturas foram avaliados com uma objetiva de imersão de 100X e uma ocular Kpl 8x contendo um graticulo de integração II Zeiss® (Figura 5), composta de 10 linhas paralelas e de 100 pontos numa área quadrangular. A imagem do graticulo foi superposta, sucessivamente, aos 180 campos histológicos (Figura 5) e os seguintes dados foram anotados: a) número de pontos (p_i) que caíram sobre cada estrutura (i) e sobre o alvéolo inteiro (P). A densidade de volume de cada estrutura foi calculada segundo a relação: $V_{vi} = p_i/P$ (WEIBEL, 1969).

Figura 5 - Graticulo de integração II Zeiss® sobre a imagem de um corte histológico

3.6.4 Procedimentos para a análise do VEGF e dos seus receptores por métodos imunoistoquímicos

a) Anticorpos a serem utilizados

VEGF: rabbit anti-human VEGF (A-20): sc-152, Santa Cruz Biotechnology[®], glicoproteína dimérica como estrutura homóloga ao PDGF que possui atividade mitogênica aparentemente só para células endoteliais, exibindo peso molecular de 21 kDa (monômero) e 42 kDa (dímero).

VEGFR-1/Flt-1: rabbit anti-human Flt-1: ab2350, Abcam[®], receptor com alta afinidade para fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) com peso molecular de 180 kDa.

VEGFR-2/Flk1: rabbit anti-human Flk-1: ab-39256, Abcam[®], receptor com alta afinidade para fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) com peso molecular de 150 kDa na forma imatura e de 200 kDa na forma intermediária glicosilada.

b) Procedimentos para imunomarcção

Os cortes de 4µm obtidos em lâminas silanizadas (cola a base de poli-D-lisina) foram colocados na estufa a 60°C por 40 minutos para o início da desparafinização e adesão na lâmina. Em seguida, foram acomodadas em berços com ranhuras de polietileno, onde passaram por três banhos de xilol por 10 minutos, dois banhos de etanol absoluto por 10 minutos e um banho de álcool 70% de 5 minutos cada. Por último, as lâminas foram lavadas e deixadas em dois banhos de PBS (Solução fosfato tamponada, pH 7,4) por 5 minutos. Subsequentemente, foi realizada a inativação da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos e após a lavagem em PBS foi realizada a recuperação dos epítomos por ação pepsina (Dako - S3002) por 20 minutos. Os cortes foram lavados em PBS e foi realizado o bloqueio das proteínas sorológicas com solução de leite em pó Molico 7% (Nestlé[®]) por 15 min. Após este período, o excesso da solução bloqueadora foi aspirado e os cortes foram incubados com os anticorpos primários específicos para VEGF e VEGFR1/Flt1 diluídos em; 1:250; 1:170; respectivamente, em diluidor de anti-corpo ADS-125 (Spring Bioscience) por 1 hora em câmara úmida

e temperatura ambiente. Para controle negativo, um dos cortes foi incubado somente com o diluidor. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS e incubados no N-Histofine – Simple stain Rat MAX PO (Multi) (Universal Immuno-peroxidase Polymer for rat tissue anti-mouse and rabbit – *NICHIREI BIOSCIENCES INC.*) por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram lavados e expostos a solução do DAB (solução líquida de 3,3'-diaminobenzidine, *Dakocytomation*) por 2-3 minutos e contra coradas por Hematoxilina de Harris por 1 minuto.

Obs.: Para o anticorpo VEGFR-2/Flk1, foram realizados vários protocolos sugeridos pelo fornecedor, porém não se observou nenhuma marcação nem mesmo no controle positivo. Estamos solicitando a troca para futura complementação do trabalho e publicação.

c) Determinação do número de células marcadas por mm² de tecido

O número de células marcadas/mm³ de tecido foi determinado no sistema de análise de imagem Kontron KS300 (KontronElectronic GMBM). Para tanto, em cada terço do alvéolo (apical, médio e coronal) por animal foram capturadas 20 imagens, selecionadas por amostragem sistemática (WEIBEL, 1969). Para cada imagem foram avaliados o número de células marcadas (Nm) e a área total analisada (A). Conhecendo-se a área total analisada e obtendo-se o número total de marcação, determinou-se o índice de marcação por mm².

3.6.5 Procedimento para a análise do VEGF por *Western blotting*

Primeiramente informamos que não foi obtido um padrão de bandas satisfatório para os receptores, a fim de quantificá-los. Por isso, serão apresentados apenas os procedimentos e dados realizados para a proteína VEGF.

Os alvéolos coletados foram descongelados e homogenizados no homogenizador Polytron (T10 Ultra Thurax, IKA, Alemanha) por 10 segundos com velocidade máxima, em solução de isolamento de proteína (PIS), contendo sacarose 250 mM, EDTA 1 mM, fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) 0,1 mM e fosfato de potássio a 5 mM, pH 7,7. A concentração total de proteína em cada amostra foi

determinada pelo método de Bradford utilizando kit comercial (Bio-Rad Kit, Hercules, CA) e albumina como padrão de proteína. Os valores obtidos para a absorbância foram submetidos a ajuste por equação linear (Figura 6 e Gráfico 7).

A equação obtida foi:

$y = 0,1145x + 0,0399$ onde: y = absorbância e x = concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Figura 6 - Determinação da concentração total de proteína pelo método de Bradford no espectrofotômetro

Figura 7 - Gráfico obtido para a equação linear na quantificação protéica

As amostras foram estocadas a -20°C até serem utilizadas para o procedimento de *Western blotting*.

Foram utilizados 30 µg de proteína total de cada amostra por poço e as mesmas foram separadas por tamanho através da eletroforese, de acordo com o peso molecular de cada uma, usando o sistema de gel de poliacrilamida (acrilamida e bisacrilamida) de 10%. A solução tampão utilizada durante a corrida das amostras consiste de: glicina 192 mM, Tris 25 mM, SDS 0,5%, pH 8,3. A eletroforese foi realizada inicialmente com voltagem de 60 V por 15 min, até as amostras ultrapassarem a marca do primeiro gel (stacking) e posteriormente 120 V, por aproximadamente 60 min, corrigindo a voltagem pela amperagem momentânea que deverá ser constante, para não interferir na corrida das amostras. Simultaneamente, foram utilizados marcadores de peso molecular como tamanho padrão. As proteínas foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose (120 V por 1h e 20 minutos) em tampão de transferência que consiste de: glicina 192 mM, Tris 25 mM, Metanol 20%, pH 8,3. As membranas foram lavadas (3x10 minutos) em solução salina tamponada por Tris (TBS), e bloqueada com leite desnatado sem gorduras 5% (DMSF) em TBS por 2h. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBS (3x10min) e incubadas no anticorpo primário contra VEGF (**BD Transduction Laboratories**) diluídos 1:1.000 com albumina 3%, ficando por toda a noite em temperatura de 4º C. As membranas foram então lavadas em TBS por 30 minutos e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo biotinilado (**Bio-Rad Life Sciences**) contra IgG do anticorpo primário, diluídos 1:10.000 - com albumina 1% por 3h e 30 min. A detecção do sinal foram realizada com luminescência química aumentada - SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate - (Pierce, Rockford, IL, USA), e as membranas foram expostas a filme radiográficos. Depois disso, os filmes radiográficos foram escaneados (impressora Epson 1600) e a densitometria das bandas de proteína foram quantificadas através da intensidade de pixels com auxílio do software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

3.7 PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE DO VEGF E DOS RECEPTORES POR RT-PCR EM TEMPO REAL

a) Extração de RNA: as amostras foram descongeladas e homogenizadas (homogenizador PRO 200 – PRO Scientific Inc) por 30 segundos, e em seguida foram deixados à temperatura ambiente por 5 minutos e adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Sigma). Os tubos foram agitados por 15 segundos, sendo em seguida incubados em temperatura ambiente por 2-3 minutos e posteriormente, centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (em torno de 400µL) foi colocado em tubos de microcentrífuga (1,5 mL) contendo 400µL álcool 70%, agitado por 10 segundos. Essa mistura foi transferida para colunas de purificação do kit (PureLink – Micro-to-Midi, Total RNA Purification System, Invitrogen) as quais foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Nesse momento, as amostras de RNA foram tratadas com DNase, o que consistiu na incubação das amostras com 1U da DNase por 15 minutos em temperatura ambiente. Após o tratamento com DNase, foi adicionado a coluna 700µL da solução Wash buffer I e centrifugados a 12.000 rpm por 15 segundos em temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi feito com a solução Wash buffer II, até que o último passo da extração de RNA consistiu na eluição do RNA com 30µL com água livre de RNase.

b) Quantificação e qualificação do RNA total: A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por meio de um espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Este equipamento dispõe de dois valores de absorbância, 260 e 280 nm, fornece a quantidade (ng/µL) e qualidade do RNA total. A garantia de uma boa qualidade de RNA total é que a razão obtida entre as absorbâncias 260 e 280 nm esteja entre 1,9 e 2,1.

c) Transcrição reversa (RNA em cDNA): Foram utilizados 1µg de RNA total para a transcrição em DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa (Kit de transcrição reversa - Superscript III, Invitrogen®, EUA). Em seguida, foi adicionada 1 µL de hexadeoxinucleotídeos (dNTPs) e 1µL de Oligo dT primer, sendo essa mistura incubada a 65°C por 5 minutos e colocada em gelo por 1 minuto, sendo o volume final de 14 µL. Subseqüentemente, foi colocados 1µL

de DTT, 1µL da enzima transcriptase reversa e 4µL de tampão e incubado a 50°C por 1 hora, seguido de outra incubação a 70°C por 15 minutos, sendo o volume final de 20 µL.

d) Reações em cadeia da polimerase em tempo real: A quantificação da expressão de RNAm foi realizada por meio do Real-Time PCR, utilizando-se o sistema SYBRGreen (Invitrogen®, EUA) em um aparelho Viia7 (Applied Biosystems, EUA). Pares de primers adequados para cada reação de amplificação foram criados a partir de sequências de RNAm dos genes alvo, utilizando-se o programa Primer Express (Applied Biosystems- EUA). Para todas as reações de Real Time PCR, foram utilizados 2,5µL do reagente SYBRGreen Master Mix (Invitrogen®, EUA), 1µL do cDNA, 1µL do primers (Forward e reverse à 2µM) e 0,5µL de água ultrapura. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos primers utilizados para garantir a não contaminação da reação.

Previamente, as reações do Real Time PCR foram otimizadas com relação às concentrações ideais de cada par de primers e temperatura de anelamento, de modo a maximizar eficiência e a especificidade de amplificação.

Os resultados foram analisados com base no valor de CT (cycle threshold – ou ciclo limiar), ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação atinge o limiar exponencial da PCR, permitindo a análise quantitativa do nível de expressão do fator avaliado em relação ao de um gene constitutivo RPL13.

Tabela 1 - Primers utilizados no RT- PCR em tempo real para os alvos e tamanhos antecipados dos produtos de amplificação

Alvo	Tamanho antecipado	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
RPL13	-	-	-
VEGF ₁₆₅	80pb	ATCATGCGGATCAAACCTCACC	GGTCTGCATTACATCTGCTATGC
VEGFR-1	83pb	CGACACTCTTTTGGCTCCTTC	TGACAGGTACTCCGTCTTTACTTCG
VEGFR-2	92pb	GTACCAAACCATGCTGGATTGC	CTTGCAGGAGATTTCCCAAGTG

O gene RPL13 não apresenta dados informativos quanto ao tamanho, *Foward* e *reverse*, porém a empresa fabricante (Applied Biosystems, EUA) atesta e confirma a efetividade do primer utilizado. Para possível conferência é fornecido o site: <http://bioinfo.appliedbiosystems.com/genomicproducts/searchResultLink?offset=0&productTypeSelect=ge&targetTypeSelect=ge_all&keyword=Rn00821258> e número do catálogo (Rn00821258_G1).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados morfométricos de densidade de volume das análises histológicas, do número de células imunomarcadas para cada proteína/mm² e da expressão de RNAm para as proteínas alvos em relação ao RNAm do RLP13 foram submetidos ao teste de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov*) e de homocedasticidade (*Bartlett*) e subsequentemente submetidas ao teste “t” Student para comparação entre grupos por período e pela análise de variância (ANOVA) para a comparação entre os períodos por grupo, sendo as médias contrastadas pelo teste de Tukey, usando software Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA) para Windows, com um nível de significância de 5%.

Os valores de densidade óptica obtidos pelo *Western blotting* para VEGF foram comparadas entre grupos por período pelo teste “t” de Student.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 DADOS PONDERAIS

Os resultados obtidos para massa corporal dos animais no momento da cirurgia (P_{inicial}) e ao término dos períodos experimentais (P_{final}), bem como o ganho e/ou perda no período pós-cirúrgico ($P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}$) dos diferentes grupos e períodos experimentais estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação entre a massa corporal (g) dos grupos controle e experimental no dia da cirurgia (P_{inicial}), ao término de cada período experimental (P_{final}) e o ganho de massa corporal ($P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}$) pelo teste “t” independente. Média (m), Desvio Padrão (dp) e valores de “p” (p)

Período (dias)	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	Teste “t” (p)
	P _{Inicial}		
3	201,59 ± 5,98	260,47± 16,92	0,000
7	217,64 ± 17,46	216,67 ± 47,64	0,855
10	196,53 ± 20,57	232,23 ± 21,80	0,034
14	241,00 ± 15,16	190,00 ± 24,40	0,020
21	245,47 ± 23,65	222,03 ± 27,08	0,144
30	260,64 ± 16,21	232,3 ± 27,43	0,033
P _{Final}			
3	207,55± 5,53	268,46 ± 16,80	0,000
7	227,5 ± 15,98	245,5 ± 45,52	0,806
10	236,35 ± 24,97	266,64 ± 19,59	0,052
14	274,70 ± 21,86	241,64 ± 25,88	0,079
21	310,32 ± 18,72	277,25 ± 25,74	0,129
30	343,3 ± 11,06	313,2 ± 26,56	0,049
P _{Inicial} - P _{Final}			
3	5,96 ± 2,36	7,99 ± 0,69	0,102
7	11,44 ±3,10	10,23± 2,26	0,498
10	36,58 ± 6,46	34,73 ± 2,88	0,574
14	38,52 ± 8,42	45,22 ± 7,33	0,216
21	59,37 ± 10,68	63,70 ± 10,11	0,681
30	89,47 ± 15,71	96,41 ± 10,49	0,435

A análise da Tabela 2a-f e da Figura 8 juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- 1) O P_{inicial} dos animais do grupo controle foi 0,226 e 0,154 vezes menor aos 3 e 10 dias, respectivamente, e 0,268 e 0,121 vezes maior aos 14 e 30 dias, respectivamente, em relação aos do grupo experimental, enquanto que aos 7 e 21 dias não houve diferenças entre grupos ($p>0,05$).
- 2) Porém, o P_{final} dos animais do grupo controle foi 0,226 vezes menor apenas aos 3 dias e 0,096 vezes maior aos 30 dias em relação aos do grupo experimental, enquanto que aos 7, 10, 14 e 21 dias não apresentaram diferenças entre grupos ($p>0,05$).
- 3) A diferença entre as massas corporais final e inicial ($P_{\text{final}}-P_{\text{inicial}}$), mostrou que houve um ganho proporcional de massa corporal entre os grupos por períodos.

4.2 RESULTADOS RADIOGRÁFICOS

Os resultados das imagens radiográficas das hemimaxilas dos diferentes grupos e períodos experimentais estão representados nas Figuras 8-13.

A análise das imagens radiográficas mostrou que aos 3 (Figura 8) e 7 dias (Figura 9) em ambos os grupos, a área do alvéolo mostrou-se delimitada por uma linha contínua e homogênea mais radiodensa referente a cortical óssea e no interior por uma área mais radiopaca referente à loja alveolar preenchida por coágulo sanguíneo. Embora, aos 10 dias (Figura 10), as imagens dos alvéolos de ambos os grupos mostrarem-se similares aos períodos anteriores, em um alvéolo do grupo controle já havia sinais de reabsorção da cortical óssea (seta azul).

Já, aos 14 dias, em ambos os grupos (Figura 11) era nítido em alguns alvéolos a alteração no contorno da cortical óssea com áreas mais radiopacas referente à reabsorção óssea e redução do alvéolo no sentido vestibulo lingual, sendo isso mais evidente no grupo controle.

Aos 21 (Figura 12) e 30 dias (Figura 13) em ambos os grupos, ocorreu acentuada alteração no contorno da cortical óssea e redução do alvéolo tanto no sentido vestibulo lingual quanto crânio caudal, além de um pequeno aumento na radiodensidade no interior do alvéolo.

Figura 8 - Imagens radiográficas das hemimaxilas dos animais dos grupos controle e experimental **3 dias pós-cirurgia**. Observar a integridade da cortical óssea alveolar (seta vermelha) e a similaridade da densidade entre os grupos

Figura 9 - Imagens radiográficas das hemimaxilas dos animais dos grupos controle e experimental **7 dias pós-cirurgia**. Observar a integridade da cortical óssea alveolar e a similaridade da densidade entre os grupos e em relação ao período de 3 dias

Figura 10 - Imagens radiográficas das hemimaxilas dos animais dos grupos controle e experimental **10 dias pós-cirurgia**. Observar a integridade da cortical óssea alveolar (seta vermelha) e a similaridade da densidade entre os grupos e em relação ao período de 3 e 7 dias. Apenas em um indivíduo a cortical óssea exibiu sinais de reabsorção óssea (seta azul)

Figura 11 - Imagens radiográficas das hemimaxilas dos animais dos grupos controle e experimental **14 dias pós-cirurgia**. Observar a alteração no contorno da cortical óssea com redução do alvéolo dentário (seta azul) na maioria animais principalmente do grupo controle

Figura 12 - Imagens radiográficas das hemimaxilas dos animais dos grupos controle e experimental **21 dias pós-cirurgia**. Observar a alteração no contorno da cortical óssea com redução do alvéolo dentário (seta azul) em todos os animais do grupo controle e em e animais do experimental

Figura 13 - Imagens radiográficas das hemimaxilas dos animais dos grupos controle e experimental **30 dias pós-cirurgia**. Observar a alteração no contorno da cortical óssea com redução do alvéolo dentário (seta azul) e o aumento da radiodensidade em relação ao período de 3 dias

4.3 RESULTADOS MORFOLÓGICOS DOS CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS PELA HE

a) 3 dias pós-exodontia

Os resultados morfológicos dos cortes dos grupos controle e experimental estão representados nas Figuras 14a-c.

Na **região apical** (Figura 14a), no grupo controle (C1-C3) o alvéolo dental, apresentou várias áreas de reabsorção da cortical alveolar associada à formação óssea e o coágulo sanguíneo no interior do alvéolo mostrava-se invadido por tecido conjuntivo. Já no grupo experimental (E1-E3) ocorreu a reabsorção óssea apenas na região da cortical voltada para a face palatina, a formação óssea principalmente pela atividade dos osteoblastos presentes na superfície da cortical alveolar intacta e o invasão parcial do coágulo sanguíneo por células do tecido conjuntivo.

Na **região média** (Figura 14b) e **coronal** (Figura 14c), em ambos os grupos ocorreu intensa migração e proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos oriundos do ligamento periodontal que passaram a preencher os espaços do coágulo em reabsorção e a sintetizarem fibras colágenas (C4-C9 e E4-E9). Como descrito para o terço apical, no grupo controle a formação óssea estava associada principalmente a áreas de reabsorção da cortical óssea alveolar, enquanto que, no grupo experimental a superfície óssea íntegra.

Figura 14a - Fotomicrografias da **região apical** do alvéolo dentário após **3 dias** de extração do incisivo. Observar na imagem panorâmica do grupo experimental (E1) maior preenchimento do alvéolo por coágulo sanguíneo (Co) em relação ao controle (C1). Nos detalhes observar no grupo controle (C2 e C3) maior superfície da cortical óssea reabsorvida (seta vermelha) associada à pequena formação óssea (seta azul) e menor quantidade de coágulo sanguíneo (Co) comparado ao grupo experimental (E2 e E3). Objetivas de 4X e 20X, HE

Figura 14b - Fotomicrografias da **região média** do alvéolo dentário após **3 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar tanto no grupo experimental (E4) como controle (C4) grande quantidade de coágulo sanguíneo (Co). Nos detalhes observar no grupo controle (C5) maior reabsorção da cortical óssea (seta vermelha) em relação ao experimental (E5). Observar também no grupo controle (C6) maior formação óssea (seta azul) na superfície da cortical óssea (asterisco) e menor quantidade de coágulo sanguíneo (Co) circundado por tecido conjuntivo (Tc) quando comparado ao grupo experimental (E6). Objetivas de 4X e 20X, HE

Figura 14c - Fotomicrografias da **região coronal** do alvéolo dentário após **3 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar tanto no grupo experimental (E7) como controle (C7) grande quantidade de coágulo sanguíneo (Co), sendo mais exuberante no experimental (E1). Nos detalhes observar no grupo controle (C8) maior formação óssea (seta vermelha) na superfície da cortical (asterisco) em relação ao experimental (E8). Observar nos grupos controle (C9) a cavidade alveolar preenchida por menor quantidade de coágulo sanguíneo (Co) em relação ao experimental (E9), sendo invadida por vasos (seta preta) e células do tecido conjuntivo. Objetivas de 4X e 20X, HE

b) 7 dias pós-exodontia

Os resultados morfológicos dos cortes dos grupos controle e experimental estão representados nas Figuras 15 a-c.

Na **região apical** (Figura 15a), em ambos os grupos (C1-C3 e E1-E3) ocorreram áreas de reabsorção da cortical alveolar associada à pequena formação de tecido ósseo de arranjo trabecular e reabsorção do coágulo sanguíneo e sua substituição por tecido conjuntivo ricamente vascularizado e celularizado. Esses eventos foram mais acentuados nos animais do grupo controle.

Na região **média** (Figura 15b) e **coronal** (Figura 15c), no grupo controle (C4-C9) ocorreu intensa reabsorção da cortical alveolar associada a maior formação óssea em relação ao experimental (E4-E9). O tecido ósseo formado exibiu características de osso imaturo, com arranjo trabecular e recoberto por uma densa camada de osteoblastos com núcleos grandes e eucromáticos e citoplasma abundante, indicando alta atividade destas células, além de áreas de reabsorção por osteoclastos, indicando a ocorrência simultânea de remodelação do tecido neoformado. Além disso, o grupo controle (C4-C9) apresentou maior substituição do coágulo sanguíneo por tecido conjuntivo ricamente vascularizado e celularizado em relação ao experimental (E4-E9).

Figura 15a - Fotomicrografias da **região apical** do alvéolo dentário após **7 dias** de extração do incisivo. Observar na imagem panorâmica do grupo experimental (E1) maior quantidade de coágulo sanguíneo (Co) no interior do alvéolo em relação ao controle (C1). Observar nos grupos controle (C2) e experimental (E2) ausência da cortical óssea (asterisco) e formação óssea (seta azul) mais organizada no fundo do alvéolo em relação ao período anterior. Observar no grupo controle (C3) reabsorção óssea na superfície da cortical (asterisco) vestibular enquanto que no experimental (E3) mais íntegra. No interior do alvéolo formação óssea (seta azul), tecido conjuntivo (Tc) e o coágulo sanguíneo (Co). Objetivas de 4X e 40X, HE

Figura 15b - Fotomicrografias da **região média** do alvéolo dentário após **7 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar no grupo experimental (E4) maior quantidade de coágulo sanguíneo (Co) no interior do alvéolo em relação ao grupo controle (C4). Observar no grupo controle (C5) ausência da cortical óssea (asterisco) e a formação de tecido ósseo (seta azul) envolta por tecido conjuntivo (Tc). No grupo experimental (E5) presença da cortical óssea (asterisco) parcialmente reabsorvida (seta vermelha), pequena formação óssea (seta azul) e o coágulo sanguíneo (Co). Observar grupo controle (C6) presença de tecido conjuntivo (Tc) mais organizado em relação ao grupo experimental (E6). Objetivas de 4X e 40X, HE

Figura 15c - Fotomicrografias da **região coronal** do alvéolo dentário após **7 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar no grupo experimental (E7) maior quantidade de coágulo sanguíneo (Co) no interior do alvéolo em relação ao grupo controle (C7). Observar nos grupos controle (C8 e C9) reabsorção da cortical óssea (asterisco) e formação de tecido ósseo (seta azul) circundada por tecido conjuntivo (Tc) ricamente vascularizado e celularizado, enquanto que no grupo experimental (E8 e E9) a formação óssea está associada (seta azul) a cortical óssea (asterisco) parcialmente reabsorvida e o coágulo (Co) ocupa grande parte da cavidade alveolar. Objetivas de 4X e 40X, HE

d) 14 dias pós-exodontia

Os resultados morfológicos dos cortes dos grupos controle e experimental estão representados nas Figuras 16a-c.

Na **região apical** (Figura 16a), no grupo controle (C1-C3) ocorreu intensa reabsorção da cortical alveolar, grande redução do coágulo sanguíneo e formação mais desorganizada de tecido ósseo de arranjo trabecular em relação aos demais terços, ficando grandes áreas preenchidas por tecido conjuntivo ricamente vascularizado e celularizado. No grupo experimental (E1-E3) na maioria dos alvéolos o quadro histológico era semelhante ao do período anterior de 10 dias, ou seja, grande parte do alvéolo preenchido por coágulo sanguíneo e pequena formação óssea localizada apenas na superfície da cortical alveolar pouco reabsorvida.

Na **região média** (Figura 16b) e **coronal** (Figura 16c), principalmente no grupo controle (C4-C9) ocorreram grandes áreas de reabsorção da cortical alveolar alterando o contorno do alvéolo, levando em alguns casos a redução do alvéolo. A formação óssea ocorreu de forma centrípeta, ficando a região central preenchida por restos de coágulo sanguíneo entremeados pelo tecido conjuntivo. O tecido ósseo formado como observado no período anterior mostrava-se imaturo e em remodelação por células osteoclásticas, e os espaços entre as trabéculas mostraram-se ocupados por tecido conjuntivo ricamente celularizado e vascularizado.

Figura 16a - Fotomicrografias da **região apical** do alvéolo dentário após **14 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar no grupo experimental (E1) maior quantidade de coágulo sanguíneo (Co) no interior do alvéolo em relação ao controle (C1). Observar no grupo controle (C2 e C3) maior reabsorção da cortical óssea (asterisco) e da formação óssea (seta azul) em relação ao experimental (E2 e E3). Notar a presença no grupo experimental (E2 e E3) maior quantidade de coágulo sanguíneo coágulo sanguíneo (Co) envolto por tecido conjuntivo (Tc) e ósseo (Tc). Objetivas de 4X e 20X, HE

Figura 16b - Fotomicrografias da **região média** do alvéolo dentário após **14 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar no grupo experimental (E4) maior quantidade de coágulo sanguíneo (Co) no interior do alvéolo em relação ao grupo controle (C4). Observar no grupo controle (C5 e C6) ausência da cortical óssea (asterisco) e a formação de tecido ósseo (seta azul) envolta por tecido conjuntivo (Tc). No grupo experimental (E5 e E6) menor formação óssea (seta azul) associada a superfície da cortical óssea (asterisco) parcialmente reabsorvida e a presença de grande quantidade de coágulo sanguíneo (Co) no interior do alvéolo. Objetivas de 4X e 20X, HE

Figura 16c - Fotomicrografias da **região coronal** do alvéolo dentário após **14 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar no grupo experimental (E7) maior quantidade de coágulo sanguíneo (Co) no interior do alvéolo em relação ao grupo controle (C7). Observar no grupo controle (C8 e C9) reabsorção da cortical óssea (asterisco) e formação de tecido ósseo (seta azul) circundada por tecido conjuntivo (Tc), e no grupo experimental (E8 e E9) a formação óssea (seta azul) associada a cortical óssea (asterisco) parcialmente reabsorvida (seta vermelha) e o coágulo (Co) ocupando grande parte da cavidade alveolar. Objetivas de 4X e 40X, HE

d) 21 dias pós-exodontia

Os resultados morfológicos dos cortes dos grupos controle e experimental estão representados nas Figuras 17a-c.

Na **região apical** (Figura 17a), no grupo controle ocorreu substituição da cortical alveolar por novo tecido ósseo alterando o contorno do alvéolo, o tecido ósseo formado no interior do alvéolo exibia densas trabéculas e ocupava apenas algumas regiões do alvéolo sendo o restante ocupado por tecido conjuntivo menos celularizado e mais organizado em relação aos períodos anteriores. Já o grupo experimental, o reparo mostrou-se mais atrasado, com o coágulo sanguíneo ainda ocupando maior parte do alvéolo e o tecido ósseo restrito a borda óssea alveolar.

Na **região média** (Figura 17b) e **coronal** (Figura 17c), no grupo controle (C1-C3) o quadro histológico foi similar ao do período anterior, porém com aumento na espessura das trabéculas ósseas formadas, que se mostravam mais compactas. Já, no grupo experimental (E1-E3), as alterações foram mais acentuadas em relação ao período anterior, com drástica redução do coágulo sanguíneo que em algumas regiões se mostrava envolta por uma fina cápsula de tecido conjuntivo, aumento das trabéculas ósseas e a formação de um tecido conjuntivo mais organizado entre as trabéculas. Em ambos os grupos, osteoclastos estavam presentes na superfície óssea formada indicando que o mesmo se encontrava em remodelação.

Figura 17a - Fotomicrografias da **região apical** do alvéolo dentário após **21 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar no grupo controle (C₁) preenchimento do alvéolo por tecido conjuntivo (Tc) e grande quantidade de tecido ósseo (To), enquanto que, no experimental (E₁), o coágulo sanguíneo (Co) ocupando grande parte do interior do alvéolo e o restante preenchido por tecido ósseo (To) e conjuntivo (Tc). Observar no grupo controle (C₂) ausência da cortical óssea original, a formação óssea (seta azul) e o tecido conjuntivo ricamente vascularizado (seta preta), e no experimental (E₂) o coágulo sanguíneo (Co) ocupando grande parte do alvéolo. Notar no grupo controle (C₃) o tecido conjuntivo (Tc) ricamente vascularizado e a ausência do coágulo sanguíneo, e no experimental (E₃) o coágulo sanguíneo (Co) ocupando grande parte do alvéolo e se encontra envolto por uma fina cápsula de tecido conjuntivo (seta verde). Objetivas de 4X e 20X, HE

Figura 17b - Fotomicrografias da **região média** do alvéolo dentário após **21 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar no grupo controle (E4) e experimental (E4) a redução do coágulo sanguíneo (Co) e maior formação óssea (seta azul) em relação aos períodos anteriores. Observar em detalhe no grupo controle (C5 e C6) a formação de um tecido ósseo (seta azul) mais compacto em relação ao experimental (E5 e E6). Notar também a presença do coágulo sanguíneo (Co) envolto por uma fina cápsula de tecido conjuntivo (seta verde). Objetivas de 4X e 20X, HE

Figura 17c - Fotomicrografias da **região coronal** do alvéolo dentário após **21 dias** de extração do incisivo. O quadro histológico semelhante ao observado na região média, porém com maior formação óssea e menor quantidade de coágulo sanguíneo. Nas imagens panorâmicas, observar no grupo controle (C7) e experimental (E7) a redução do coágulo sanguíneo (Co) e maior formação óssea (seta azul) em relação aos períodos anteriores. Observar em detalhe no grupo controle (C8 e C9) a formação de um tecido ósseo (seta azul) mais compacto em relação ao experimental (E8 e E9). Notar também a presença do coágulo sanguíneo (Co) envolto por uma fina cápsula de tecido conjuntivo (seta verde). Objetivas de 4X e 20X, HE

d) 30 dias pós-exodontia

Os resultados morfológicos dos cortes dos grupos controle e experimental estão representados nas Figuras 18a-c.

Na **região apical** (Figura 18a), o quadro histológico (C1-C3) foi similar ao do período anterior, porém o tecido ósseo ocupava maior parte do alvéolo e as trabéculas mostravam-se mais espessas. No grupo experimental (E1-E3) o coágulo sanguíneo ainda estava presente.

Na **região média** (Figura 18b) e **coronal** (Figura 18c), em ambos os grupos (C4-C9 e E4-E9) ocorreu redução do alvéolo com alteração do seu contorno, o tecido ósseo formado exibiu acentuado aumento da espessura das trabéculas, reduzindo o espaço entre elas e dando origem aos canais nutritivos e o coágulo sanguíneo também havia diminuído significativamente sendo substituído por tecido conjuntivo ricamente vascularizado. No grupo controle reparo alveolar mostrou-se mais adiantado em relação ao experimental.

Figura 18a - Fotomicrografias da **região apical** do alvéolo dentário após **30 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar no grupo controle (C₁) preenchimento do alvéolo por tecido conjuntivo (Tc) e grande quantidade de tecido ósseo (To), e no experimental (E₁) o coágulo sanguíneo (Co) ocupando ainda grande parte do interior do alvéolo e o restante preenchido por tecido ósseo (To) e conjuntivo (Tc). Observar no grupo controle (C₂) a formação de uma nova cortical óssea (asterisco) mais espessa e desorganizada que a original e o preenchimento do alvéolo por tecido conjuntivo ricamente vascularizado, e no experimental (E₂) ocorre áreas com a cortical original (asterisco) parcialmente íntegra e grande quantidade de coágulo sanguíneo (Co) no interior do alvéolo. Notar no grupo controle (C₃) a formação óssea (seta azul), o tecido conjuntivo (Tc) mais organizado e a ausência do coágulo sanguíneo. No experimental (E₃) notar que o coágulo sanguíneo (Co) ainda esta presente. Objetivas de 4X e 20X, HE

Figura 18b - Fotomicrografias da **região média** do alvéolo dentário após **30 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar no grupo controle (C4) maior formação óssea (seta azul) em relação ao grupo experimental (E₄). Observar no grupo controle (C5 e C6) e experimental a formação de um tecido ósseo mais maduro ou compacto (seta azul) em relação aos períodos anteriores entremeado por tecido conjuntivo (Tc) mais organizado no grupo controle (C5 e C6) e com presença de coágulo sanguíneo (Co) no experimental (E5 e E6). Objetivas de 4X e 40X, HE

Figura 18c - Fotomicrografias da **região coronal** do alvéolo dentário após **30 dias** de extração do incisivo. Nas imagens panorâmicas, observar tanto no grupo controle (C7) quanto experimental (E7) que ocorreu maior formação óssea (seta azul) e redução em espessura do alvéolo dentário que os demais terços. Observar em detalhe no grupo controle (C5 e C6) e experimental (E5 e E6) a intensa formação tecido ósseo (seta azul) mais compacto em relação aos períodos anteriores, pequena quantidade de tecido conjuntivo (Tc) e restos de coágulo sanguíneo (Co). Objetivas de 4X e 20X, HE

4.4 DENSIDADE DE VOLUME (Vvi) DE CADA ESTRUTURA NO ALVÉOLO

Os resultados de densidade de volume (%) dos componentes envolvidos no processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e experimental nos diversos períodos analisados, encontram-se apresentados nas Tabelas 3-6 e nas Figuras 19-22.

Tabela 3 - Comparação entre a densidade de volume (%) do tecido ósseo dos grupos controle e experimental por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo pela ANOVA a um critério. Média (m), Desvio Padrão (dp) e valores de “p” (p)

Período (dias)	Tecido ósseo (%)		Teste “t” (p)
	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	
3	14,25 ± 4,84 ^a	7,84 ± 0,84 ^a	0,019
7	21,85 ± 3,42 ^{a,b}	17,40 ± 2,11 ^{a,b}	0,038
10	29,99 ± 3,13 ^{b,c}	22,72 ± 5,53 ^{b,c}	0,034
14	35,48 ± 2,59 ^c	25,18 ± 3,29 ^{b,c}	0,001
21	45,65 ± 8,41 ^d	31,40 ± 7,44 ^c	0,022
30	52,45 ± 5,55 ^d	46,11 ± 9,84 ^d	0,245
ANOVA (P)	0,000	0,000	

Letras diferentes p<0,05

Figura 19 - Densidade de volume (%) de **Tecido ósseo** durante o processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e experimental dos diversos períodos analisados

Tabela 4 - Comparação entre a densidade de volume (%) do coágulo sanguíneo dos grupos controle e experimental por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo pela ANOVA a um critério. Média (m), Desvio Padrão (dp) e valores de “p” (p)

Período (dias)	Coágulo sanguíneo (%)		Teste “t” (p)
	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	
3	41,96 ± 16,85 ^a	46,07 ± 10,65 ^a	0,657
7	27,20 ± 6,13 ^b	37,68 ± 7,48 ^a	0,042
10	13,77 ± 2,69 ^{b,c}	22,19 ± 5,28 ^b	0,013
14	9,41 ± 4,83 ^c	20,60 ± 4,25 ^b	0,005
21	6,25 ± 2,03 ^c	15,61 ± 5,77 ^{b,c}	0,009
30	3,42 ± 2,94 ^c	5,47 ± 2,61 ^c	0,276
ANOVA (P)	0,000	0,000	

Letras diferentes p<0,05

Figura 20 - Densidade de volume (%) do **Coágulo sanguíneo** durante o processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e experimental dos diversos períodos analisados

Tabela 5 - Comparação entre a densidade de volume (%) do tecido conjuntivo dos grupos controle e experimental por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo pela ANOVA a um critério. Média (m), Desvio Padrão (dp) e valores de “p” (p)

Período (dias)	Tecido conjuntivo (%)		Teste “t” (p)
	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	
3	42,06 ± 14,32 ^{a,b}	46,10 ± 9,98 ^a	0,619
7	49,34 ± 5,84 ^{a,b}	42,28 ± 7,06 ^a	0,123
10	53,55 ± 3,91 ^a	51,89 ± 2,85 ^a	0,464
14	55,11 ± 3,84 ^a	52,43 ± 4,85 ^a	0,344
21	46,00 ± 9,74 ^{a,b}	49,60 ± 5,82 ^a	0,449
30	39,48 ± 6,21 ^b	45,90 ± 5,89 ^a	0,132
ANOVA (P)	0,007	0,136	

Letras diferentes p<0,05

Figura 21 - Densidade de volume (%) do **tecido conjuntivo** durante o processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e experimental dos diversos períodos analisados

Tabela 6 - Comparação entre a densidade de volume (%) do vaso sanguíneo dos grupos controle e experimental por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo pela ANOVA a um critério. Média (m), Desvio Padrão (dp) e valores de “p” (p)

Período (dias)	Vaso sanguíneo (%)		Teste “t” (p)
	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	
3	20,69 ± 4,23 ^a	25,01 ± 4,30 ^a	0,148
7	15,82 ± 6,73 ^a	20,23 ± 7,50 ^{a,b}	0,356
10	17,99 ± 2,89 ^a	13,54 ± 2,97 ^b	0,043
14	19,53 ± 4,69 ^a	13,57 ± 1,57 ^b	0,027
21	20,07 ± 3,96 ^a	16,54 ± 3,96 ^{a,b}	0,196
30	19,09 ± 1,69 ^a	19,98 ± 8,74 ^{a,b}	0,830
ANOVA (P)	0,428	0,019	

Letras diferentes p<0,05

Figura 22 - Densidade de volume (%) do **vaso sanguíneo** durante o processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e experimental dos diversos períodos analisados

A análise das Tabelas 3-6 e das Figuras 19-22 juntamente com a análise estatística dos dados mostraram que:

- 1) A densidade de volume do tecido ósseo no grupo controle foi 0,817, 0,255, 0,368, 0,409 e 0,453 vezes maior em relação ao grupo experimental nos períodos de 3, 7, 10, 14 e 21 dias, respectivamente. Aos 30 dias a densidade de volume de tecido ósseo foi similar entre os grupos controle e experimental; já a densidade de volume do tecido ósseo no grupo controle e experimental foi de, respectivamente, 21,85 e 17,40%, não apresentando diferenças estatisticamente significantes com os respectivos valores aos 7 dias. Em seguida, o percentual de tecido ósseo do grupo controle aumentou gradativamente até os 21 dias passando a ocupar 45,65% do alvéolo. Embora o percentual de tecido ósseo passe a ocupar 52,45% aos 30 dias, não observou diferença estatística entre 21 e 30 dias. No grupo experimental nos períodos de 10 e 14 dias, o percentual de tecido ósseo foi de 22,70 e 25,18% respectivamente, com diferenças estatisticamente significantes em relação ao período de 3 dias. A densidade de volume do tecido ósseo continuou a aumentar gradativamente até 21 dias, passando a ocupar o percentual 31,40% com diferença estatística em relação aos períodos de 3 e 7 dias. No período de 30 dias o percentual foi de 46,11% com diferenças estatisticamente significantes em relação aos períodos de 3, 7, 10, 14 e 21 dias.
- 2) A densidade de volume do coágulo sanguíneo no período de 3 dias não apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e experimental. Porém, nos períodos de 7, 10, 14 e 21 dias os valores no grupo controle foram 0,097, 0,611, 1,189 e 1.497 vezes menor, respectivamente em relação ao grupo experimental. Aos 30 dias a redução de coágulo sanguíneo foi semelhante em ambos os grupos, não apresentando diferença estatística significante. Aos 3 dias a densidade de volume do coágulo sanguíneo no grupo controle foi de 41,96%, com uma redução significativa nos períodos de 7 e 10 dias com os percentuais caindo para 27,20% e 13,77%, respectivamente. A seguir houve uma redução gradativa até o período de 30 dias, mas sem

diferença estatisticamente significativa. Com relação ao grupo experimental, a densidade de coágulo sanguíneo nos períodos de 3 e 7 dias foi de 46,07% e 37,68%, respectivamente, não apresentando diferença estatística entre si. Entretanto, no período de 10 dias houve uma redução significativa para 22,19% quando comparado aos grupos anteriores, diminuindo gradativamente para 15,61% aos 21 dias, mas sem diferença estatisticamente significativa. Já no período de 30 dias houve redução estatisticamente significativa para 5,47%.

- 3) A densidade de volume do tecido conjuntivo não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em todos os períodos experimentais. No grupo controle a densidade de tecido conjuntivo aumentou gradativamente nos períodos de 3, 7, 10 e 14 dias com percentuais de 42,06%, 49,34%, 53,11%, 55,11%, respectivamente. Já no período de 21 dias a densidade de tecido conjuntivo diminuiu para 46% sem diferença estatística significativa. Entretanto no período de 30 dias, a densidade de tecido conjuntivo caiu para 39,48% com diferenças estatisticamente significantes em relação aos períodos de 10 e 14 dias.
- 4) A densidade de volume dos vasos sanguíneos não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos períodos de 3 e 7 dias. No entanto, nos períodos de 10 e 14 dias os valores no grupo controle foram 0,328 e 0,439 vezes maiores do que o grupo experimental. Já nos períodos de 21 e 30 dias os percentuais foram praticamente similares, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos. Na comparação entre períodos, o grupo controle não apresentou diferença estatística em nenhum dos períodos. Com relação ao grupo experimental a densidade de vasos sanguíneos não apresentou diferença estatística entre os grupos 3 e 7 dias, sendo os percentuais de 25,01% e 20,23%, respectivamente. Já nos períodos de 10 e 14 dias a densidade de vasos sanguíneos foi de 13,54% e 13,57%, respectivamente, com diferenças estatísticas quando comparado ao período de 3 dias. Nos períodos subsequentes de 21 e 30 dias a densidade de vasos sanguíneos não apresentou diferenças estatisticamente significantes em comparação aos demais períodos.

Convém salientar que o infiltrado inflamatório foi mínimo ($<0,2\%$) e esteve presente em alguns indivíduos e a medula óssea ocorreu apenas em alguns animais de 30 dias, sendo estes dados não apresentados.

4.5 RESULTADOS MORFOLÓGICOS DOS CORTES IMUNOMARCADOS PARA VEGF E VEGFR-1

4.5.1 Imunomarcção para VEGF

Os resultados morfológicos para a imunomarcções para o VEGF dos grupos controle e experimental estão representados nas Figuras 23-28.

No período de **3 dias** (Figura 23), tanto no grupos controle como no experimental ocorreu formação óssea na superfície da cortical alveolar com células ósseas imunomarcadas contra o VEGF, principalmente osteoblastos e osteócitos recém aprisionados na matriz óssea. No interior do alvéolo, o coágulo sanguíneo mostrou-se invadido por células do tecido conjuntivo, tipo fibroblastos que apresentavam também imunomarcção para o VEGF.

No período de **7 dias** (Figura 24), em ambos os grupos controle e experimental (C1-C3 e E1-E3), os osteoblastos que circundavam as trabéculas ósseas neoformadas apresentavam imunomarcção para o VEGF, sendo mais expressivas nos osteoblastos em alta atividade sintética, mais altos e com amplo citoplasma, do que os osteoblastos de proteção, mais achatados e com pouco citoplasma. Na matriz recém sintetizada também os osteócitos apresentavam imunomarcção para VEGF. No grupo experimental, o coágulo sanguíneo ainda ocupava grande parte do alvéolo com invasão de células fibroblásticas imunomarcadas para VEGF, enquanto que, no controle o tecido conjuntivo apresentava-se mais organizado com raras células imunomarcadas para VEGF.

No período de **10 dias** (Figura 25) e **14 dias** (Figura 26) tanto no grupo controle (C1-C3) como no grupo experimental (E1-E3), ocorreu o aumento de trabéculas ósseas no interior do alvéolo em relação ao período anterior. Como o observado nos períodos anteriores, aqui também os osteoblastos e os osteócitos,

recém aprisionados na matriz, apresentavam imunomarcção para VEGF. No tecido conjuntivo que circundava as trabéculas ósseas, raros fibroblastos imunomarcados foram observados localizados próximos a superfície óssea e aos vasos sanguíneos.

No período de **21 dias** (Figura 27) e **30 dias** e (Figura 28) em ambos os grupos, controle (C1-C3) e experimental (E1-E3) ocorreu gradual espessamento da cortical e das trabéculas ósseas, com a matriz óssea circundando os vasos sanguíneos e formando os canais nutritivos (Figura 25 C3), que geralmente exibiam um vaso sanguíneo central envolto por fina camada de tecido conjuntivo. Nestas regiões onde o tecido ósseo mostrou-se mais maduro, com arranjo lamelar, eram raras as marcações em osteoblastos e ausentes em osteócitos. No período mais tardio do reparo, principalmente no grupo controle (Figuras 26 C1-C3), algumas regiões já apresentavam formação de espaços medulares contendo adipócitos e células hematopoiéticas, com os osteoblastos apresentando imunomarcção para VEGF. Nas áreas de neoformação óssea tanto os osteoblastos quanto os osteócitos apresentavam imunomarcção para VEGF, enquanto que, no tecido conjuntivo eram raras as imunomarcações.

Figura 23 - Fotomicrografias do alvéolo dentário imunomarcado para VEGF após **3 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no experimental (E1-E3) pequena formação óssea na superfície da cortical alveolar (asterisco) exibindo células ósseas imunomarcadas (seta verde) caracterizadas por osteoblastos ativos e recém aprisionados na matriz extracelular. Notar também, no interior do alvéolo, a presença de células tipo fibroblastos imunomarcadas (seta vermelha) invadindo o coágulo sanguíneo (Coa) e mais raramente fibroblastos (seta azul) presentes no tecido conjuntivo (TC). Objetivas de 40X e 100X

Figura 24 - Fotomicrografias do alvéolo dentário imunomarcados para VEGF após **7 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no experimental (E1-E3) maior formação óssea na superfície da cortical alveolar (asterisco) e o aumento na vascularização (VS) em relação ao período anterior. Notar no grupo controle (C1 e C2) as trabéculas ósseas mais organizadas com imunomarcagem em osteoblastos (setas verdes) dispostos linearmente sobre a superfície da matriz óssea, menos imunomarcações em células recém aprisionadas (setas azuis) e nas células do tecido conjuntivo (TC). No grupo experimental (E1) a formação óssea menos expressiva e mais imatura em relação ao grupo controle. Neste caso, observar que os osteoblastos (setas verdes) também exibem imunomarcagem, porém, estão dispostos desorganizadamente na superfície da matriz. Notar no grupo experimental (E3), algumas células do tecido conjuntivo exibindo imunomarcagem (setas verdes), e no grupo controle (C3) ausência de imunomarcagem

Figura 25 - Fotomicrografias do alvéolo dentário imunomarcados para VEGF após **10 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no experimental (E1-E3) maior formação óssea em relação ao período anterior. Em ambos os grupos, as imunomarcações para VEGF estão presentes em osteoblastos (setas verdes) na superfície das trabéculas ósseas e nos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea. Notar a grande quantidade de vasos sanguíneos (VS) entre as trabéculas ósseas (setas vermelhas) e algumas células do tecido conjuntivo (TC) imunomarcadas. Objetivas de 40X e 100X

Figura 26 - Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcados para VEGF após **14 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no experimental (E1-E3) o mesmo padrão de marcação em relação aos períodos anteriores, ou seja, em osteoblastos (setas verdes) na superfície das trabéculas ósseas e nos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea. Notar, no grupo controle maior espessamento das trabéculas ósseas em relação ao grupo experimental. Notar também a grande quantidade de vasos sanguíneos (VS) entre as trabéculas ósseas e raras células do tecido conjuntivo (TC) imunomarcadas. Objetivas de 40X e 100X

Figura 27 - Fotomicrografias do alvéolo dentário imunomarcados para VEGF após **21 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no experimental (E1-E3) o mesmo padrão de marcação em relação aos períodos anteriores, ou seja, em osteoblastos (setas verdes) na superfície das trabéculas ósseas (asterisco) e nos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea, porém com intensidade menor. Notar também, o maior espessamento das trabéculas ósseas (asterisco) em relação ao período anterior, e a grande quantidade de vasos sanguíneos (VS) entre as trabéculas ósseas e a ausência de imunomarcagem nas células do tecido conjuntivo (TC). Objetivas de 40X e 100X

Figura 28 - Fotomicrografias do alvéolo dentário imunomarcados para VEGF após **30 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no experimental (E1-E3) a presença de tecido ósseo em arranjo compacto (asterisco) com a formação de canais nutritivos e medulares (seta vermelha), evidentes no grupo controle. Notar que, o padrão de marcação é similar ao do período anterior, ou seja, nos osteoblastos (setas verdes) presentes na superfície óssea e nos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea. Observar os vasos sanguíneos (VS) próximos ao tecido ósseo. Objetivas de 40X e 100X

4.5.2 Imunomarcção para VEGFR-1

Os resultados morfológicos para a imunomarcção para VEGFR-1 dos cortes dos grupos controle e experimental estão representado nas Figuras 29-34.

No período de **3 dias** (Figura 29) e **7 dias** (Figura 30), como o observado para a proteína VEGF, em ambos os grupos, controle (C1-C3) e experimental (E1-E3), ocorreu imunomarcção para o VEGFR-1 em osteoblastos altamente ativos e nos osteócitos recém aprisionados na matriz óssea. No tecido conjuntivo/granulação presente no interior do alvéolo células tipo fibroblastos, fibroblastos típicos e células endoteliais apresentavam imunomarcção para VEGFR-1. Como o grupo controle apresentava maior formação óssea e um tecido conjuntivo rico em células e vasos sanguíneos, a marcação para o VEGFR-1 mostrou-se mais expressiva neste grupo em relação ao experimental.

Nos períodos de **10 dias** (Figura 31) e **14 dias** (Figura 32) em ambos os grupos, controle (C1-C3) e experimental (E1-E3) ocorreu gradual aumento das trabéculas ósseas recém formadas a partir da cortical óssea em direção ao centro do alvéolo, apresentando osteoblastos ativos e osteócitos imunomarcados para VEGF. Os vasos sanguíneos localizavam-se principalmente próximos às áreas de formação óssea e tanto as células endoteliais quanto os fibroblastos mostravam-se imunomarcados para VEGF, enquanto que, no tecido conjuntivo mais distante das áreas de formação óssea havia poucas imunomarcações.

No período de **21 dias** (Figura 33) em ambos os grupos, controle (C1-C3) e experimental (E1-E3) ocorreu intensa marcação para VEGFR-1 em osteoblastos, tanto nos altamente ativos quanto nos de revestimento, principalmente nas áreas de formação dos canais nutritivos e raramente em osteócitos. Nas áreas de formação dos canais nutritivos, os fibroblastos e algumas células endoteliais apresentavam imunomarcadas para VEGFR-1. Aos **30 dias** (Figura 34), o padrão de marcação foi similar ao do período de 21 dias, porém em menor intensidade.

Figura 29 - Fotomicrografias do alvéolo dentário imunomarcados para VEGFR-1 após **3 dias** da extração do incisivo. Observar no grupo controle (C1-C3) formação óssea na superfície da cortical alveolar (asteriscos) exibindo maior número de células ósseas imunomarcadas (setas verdes) caracterizada por osteoblastos ativos e recém aprisionados (setas azuis) na matriz extracelular em relação ao grupo experimental (E1-E3). Notar também, no grupo controle, o interior do alvéolo com mais células tipo fibroblastos e fibroblastos imunomarcadas (setas vermelhas) do que o grupo experimental (E1-E3). Ambos os grupos exibem a presença de vasos sanguíneos (VS). Objetivas de 40X e 100X

Figura 30 - Fotomicrografias do alvéolo dentário imunomarcados para VEGFR-1 após **7 dias** da extração do incisivo. Observar no grupo controle (C1-C3) a superfície da cortical alveolar (asterisco) apresentando maior formação óssea e maior organização nas trabéculas ósseas que são sintetizadas por osteoblastos imunomarcados (setas verde) dispostos sobre a superfície da matriz óssea ou pelos poucos osteócitos aprisionados (seta azul). No grupo experimental (E1-E3) a formação óssea é menos expressiva e mais imatura em relação ao grupo controle. Esse mesmo grupo apresenta grande quantidade de coágulo sanguíneo (Coa) e poucas células imunomarcadas (seta vermelha) penetrando nessa região. Os osteoblastos (seta verde) e os osteoblastos recém aprisionados (setas azuis) também exibem menos imunomarcações na superfície da matriz. Notar que, no grupo controle (C3), as células do tecido conjuntivo (TC) exibem muitas células imunomarcadas, enquanto que, no grupo experimental (E3) há menos imunomarcção sobre essas mesmas células. Objetivas de 40X e 100X

Figura 31 - Fotomicrografias do alvéolo dentário imunomarcados para VEGFR-1 após **10 dias** da extração do incisivo. Observar no grupo controle (C1-C3) que a formação óssea manteve-se em relação aos períodos anteriores, porém, ainda foi maior em relação ao grupo experimental do mesmo período. A cortical alveolar (asterisco) do grupo controle exibe células ósseas, como osteoblastos (setas verdes) e osteoblastos recém aprisionados (seta azul) na superfície dessa região, além de vasos sanguíneos (VS). No grupo experimental (E1-E3) as imunomarcações para VEGF foram menos expressivas nos osteoblastos (setas verdes) presentes na superfície da cortical óssea alveolar (asterisco) e nas células recém aprisionados (setas azul) na matriz óssea. Notar a presença de vasos sanguíneos (VS) próximos as trabéculas ósseas. Objetivas de 40X e 100X

Figura 32 - Fotomicrografias do alvéolo dentário imunomarcados para VEGFR-1 após **14 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no experimental (E1-E3) o mesmo padrão de marcação, ou seja, os osteoblastos (setas verdes) na superfície das trabéculas ósseas e os recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea apresentam similaridades em ambos os grupos. Notar, no grupo controle maior espessamento das trabéculas ósseas (asterisco) em relação ao grupo experimental. Notar também uma pequena formação óssea no grupo controle (E3) a presença de vasos sanguíneos (VS) e células imunomarcadas (setas vermelha) no tecido conjuntivo (TC). Objetivas de 40X e 100X

Figura 33 - Fotomicrografias do alvéolo dentário imunomarcados para VEGFR-1 após **21 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no experimental (E1-E3) o mesmo padrão de marcação em relação ao período anterior, ou seja, osteoblastos imunomarcados (setas verdes) e células recém aprisionadas (seta azuis) sintetizando a matriz óssea na superfície das trabéculas. Notar também, o maior espessamento das trabéculas ósseas em relação ao período anterior, e grande quantidade de vasos sanguíneos (VS) entre as trabéculas ósseas. Objetivas de 40X e 100X

Figura 34 - Fotomicrografias do alvéolo dentário imunomarcados para VEGFR-1 após **30 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no experimental (E1-E3) a formação de tecido ósseo compacto (asterisco). Notar que, o padrão de marcação é similar ao do período anterior, ou seja, nos osteoblastos (setas verdes) presentes na superfície óssea e nos osteócitos (setas azuis) na matriz óssea apresentam diminuição na marcação em relação aos grupos anteriores de 14 e 21 dias. Observar os vasos sanguíneos próximos ao tecido ósseo. Objetivas de 40X e 100X

4.6 NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS PARA VEGF/mm² E VEGFR-1/mm²

Os resultados do número de células imunomarcadas para VEGF e VEGFR-1 por mm² no processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo dos grupos controle e experimental nos diversos períodos analisados, encontram-se apresentados nas Tabelas 7 e 8 e nas Figuras 35 e 36

Tabela 7 - Comparação entre o número de células imunomarcadas para o **VEGF** por mm² dos grupos controle e experimental por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo pela ANOVA a um critério. Média (m), Desvio Padrão (dp) e valores de “p” (p)

Período (dias)	Número de células VEGF+/ mm ²		Teste “t” (p)
	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	
3	407, 53± 9798 ^a	354,41 ± 80,23 ^a	0,501
7	578,38 ± 92,46 ^b	492,75± 65,94 ^a	0,219
10	603,50 ± 88,87 ^b	504,63 ± 74,28 ^a	0,183
14	540,17 ± 95,96 ^{a,b}	565,81 ± 39,82 ^b	0,690
21	548,45 ± 45,07 ^{a,b}	602,07 ± 122,49 ^b	0,428
30	481,09 ± 65,39 ^{a,b}	415,36 ± 50,29 ^{a,c}	0,236
ANOVA (P)	0,0129	0,000	

Letras diferentes p<0,05

Figura 35 - Número de células imunomarcadas para VEGF por mm² durante o processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e experimental dos diversos períodos analisados

Tabela 8 - Comparação entre o número de células imunomarcadas para o **VEGFR-1** por mm^2 dos grupos controle e experimental por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo pela ANOVA a um critério. Média (m), Desvio Padrão (dp) e valores de “p” (p)

Período (dias)	Número de células VEGFR-1+/mm ²		Teste “t” (p)
	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	
3	589,05 ± 66,62 ^a	381,31 ± 34,78 ^{a,d}	0,003
7	549,78 ± 67,08 ^a	414,67 ± 44,20 ^{a,d}	0,012
10	607,37 ± 26,89 ^a	458,38 ± 60,43 ^{a,c}	0,007
14	681,43 ± 123,06 ^a	585,05 ± 75,63 ^b	0,287
21	630,22 ± 66,10 ^a	557,52 ± 45,42 ^{b,c}	0,161
30	336,64 ± 67,69 ^b	335,64 ± 63,31 ^d	0,924
ANOVA (P)	0,000	0,000	

Letras diferentes p<0,05

Figura 36 - Número de células imunomarcadas para VEGFR-1 por mm^2 durante o processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e experimental dos diversos períodos analisados

A análise das Tabelas 7 e 8 e das Figuras 35-36 juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- 1) O número de células imunomarcadas para VEGF não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos diferentes períodos analisados. Com relação a cada grupo individualmente, verificou-se que, no grupo controle o número de células imunomarcadas aos 3 dias

foi de 470 células/mm² aumentando 0,434 vezes aos 7 dias e mantendo-se constante até os 30 dias. Já, no grupo experimental, aos 3 dias, o número de células foi de 354 células; mm², aumentando gradativamente 0,695 vezes até os 21 dias e reduzindo 0,438 vezes aos 30 dias.

- 2) O número de células imunomarcadas para VEGFR-1 no grupo controle foi 0,544; 0,325 e 0,325 vezes maior em relação ao grupo experimental nos períodos de 3, 7 e 10 dias, respectivamente. Nos demais períodos estudados, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos/período. A comparação do número de células imunomarcadas para VGFR1 nos diferentes períodos dentro do grupo, mostrou que, no grupo controle não houve diferenças entre os períodos, exceto aos 30 dias, quando ocorreu uma redução de 0,749 vezes. Já, no grupo experimental ocorreu um aumento gradativo de 0,534 vezes entre 3 a 14 dias, mantendo-se constante aos 21 dias e reduzindo 0,661 vezes entre 21 e 30 dias.

4.7 EXPRESSÃO DO RNAm PARA AS PROTEÍNAS VEGF, VEGFR-1 E VEGFR-2 POR RT-PCR

Os resultados obtidos para a expressão do RNAm do VEGF e de seus receptores em relação a expressão do gene constitutivo RPL13 dos grupos controle e experimental estão apresentados nas Tabelas 9-11 e Figuras 37-39.

Tabela 9 - Comparação entre a expressão de RNAm do VEGF em relação ao RNAm do RPL13 dos grupos controle e experimental por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo e pela ANOVA a um critério. Média (m), Desvio Padrão (dp) e valores de “p” (p)

Período (dias)	Expressão de RNAm do VEGF		Teste “t” (p)
	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	
3	0,913 ± 0,38 ^a	1,010 ± 0,20 ^a	0,571
7	0,595 ± 0,17 ^{a,b}	0,572 ± 0,25 ^b	0,870
10	0,788 ± 0,14 ^{a,b}	0,346 ± 0,04 ^b	0,002
14	0,649 ± 0,17 ^{a,b}	0,587 ± 0,10 ^b	0,513
21	0,498 ± 0,13 ^b	0,418 ± 0,10 ^b	0,338
30	0,665 ± 0,27 ^{a,b}	0,566 ± 0,08 ^b	0,456
ANOVA (P)	0,006	0,000	

Letras diferentes p<0,05

Figura 37 - Expressão de RNAm do VEGF em relação ao RNAm do RPL13 durante o processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e experimental dos diversos períodos analisados

Tabela 10 - Comparação entre a expressão de RNAm do VEGFR-1 em relação ao RNAm do RPL13 dos grupos controle e experimental por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo e pela ANOVA a um critério. Média (m), Desvio Padrão (dp) e valores de “p” (p)

Período (dias)	Expressão de RNAm do VEGFR-1		Teste “t” (p)
	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	
3	1,617 ± 0,47 ^{a,b}	0,665 ± 0,20 ^a	0,003
7	1,778 ± 0,47 ^{a,b}	1,107 ± 0,22 ^a	0,133
10	1,487 ± 0,29 ^{a,b}	0,762 ± 0,36 ^a	0,008
14	1,007 ± 0,50 ^a	0,776 ± 0,10 ^a	0,349
21	2,088 ± 0,64 ^b	2,223 ± 0,53 ^b	0,726
30	1,489 ± 0,48 ^{a,b}	0,807 ± 0,09 ^a	0,014
ANOVA (P)	0,077	0,000	

Letras diferentes p<0,05

Figura 38 - Expressão de RNAm do VEGFR-1 em relação ao RNAm do RPL13 durante o processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e experimental dos diversos períodos analisados

Tabela 11 - Comparação entre a expressão de RNAm do VEGFR-2 em relação ao RNAm do RPL13 dos grupos controle e experimental por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo e pela ANOVA a um critério. Média (m), Desvio Padrão (dp) e valores de “p” (p)

Período (dias)	Expressão de RNAm do VEGFR-2		Teste “t” (p)
	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	
3	3,740 ± 1,22 ^a	0,662 ± 0,35 ^a	0,000
7	1,848 ± 0,52 ^b	1,032 ± 0,28 ^a	0,015
10	1,169 ± 0,30 ^b	1,501 ± 0,68 ^a	0,352
14	1,996 ± 0,73 ^b	1,406 ± 0,61 ^a	0,207
21	1,774 ± 0,30 ^b	1,151 ± 0,75 ^a	0,124
30	1,738 ± 0,47 ^b	1,177 ± 0,95 ^a	0,271
ANOVA (P)	0,000	0,411	

Letras diferentes p<0,05

Figura 39 - Expressão de RNAm do VEGFR-2 em relação ao RNAm do RPL13 durante o processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e experimental dos diversos períodos analisados

A análise das Tabelas 9-11 e das Figuras 37-39 juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- 1) A expressão de RNAm para VEGF, não apresentou diferenças significativas entre os grupos por período, exceto aos 10 dias quando a expressão no grupo controle foi 1,274 vezes maior em relação ao experimental. Com relação aos períodos por grupo, no grupo controle como no experimental a expressão de RNAm apresentou seu pico aos 3 dias com 0,912 RQ para o controle e 1,01 RQ para o experimental. No grupo controle entre 3 e 7 dias ocorreu uma redução de 0,398 vezes e manteve-se constante até os 30 dias. Esse mesmo padrão foi observado no grupo experimental, onde a redução nos períodos de 3 e 7 dias foi de 0,443 vezes, mantendo-se até os 30 dias.
- 2) A expressão de RNAm para VEGFR-1, entre 3 e 10 dias, no grupo controle (média de 1,63 RQ) foi 0,917 vezes maior em relação ao grupo experimental (média de 0,85 RQ). Entre 14 e 21 dias, a expressão do VEGFR-1 foi similar entre controle e experimental, porém aos 30 dias volta a ser maior no grupo controle. Quando se analisa a evolução da expressão do VEGFR-1 no grupo/período, verifica-se que o pico ocorre aos 21 dias em ambos os grupos, nos demais períodos a expressão foi constante com média de $1,48 \pm 0,287$ RQ para o controle e $0,823 \pm 0,167$ RQ para o experimental.
- 3) A expressão de RNAm para VEGFR-2, entre 3 e 7 dias, no grupo controle (média de 2,79 RQ) foi 0,638 vezes maior em relação ao grupo experimental (média de 1,69 RQ). Entre 10 e 30 dias, a expressão do VEGFR-1 foi similar entre os grupos. O pico de expressão do VEGFR-2 foi aos 3 dias no grupo controle e manteve-se constante nos demais períodos com média de $1,71 \pm 0,315$ RQ, enquanto que, no experimental os valores foram constantes durante todos os períodos experimentais com valor médio de $1,15 \pm 0,297$.RQ.

4.8 DENSITOMETRIA DA ANÁLISE PROTÉICA POR *WESTERN BLOTTING* PARA O VEGF

Os resultados obtidos para a análise protéica por *Western blotting* para o VEGF dos grupos controle e experimental estão apresentados nas Tabelas 12 e 13 nas Figuras 40 e 41.

Tabela 12 - Valores densitométricos obtidos (AOU) para o VEGF nos grupos controle e experimental nos diferentes períodos pós-exodontia

Período (dias)	Valores densitométricos para as Bandas de VEGF de 42kDa (AOU)		Teste “t” (p)
	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	
3	10000 ± 160,74 ^a	7309,29 ± 326,20 ^a	0,000
7	10000 ± 434,85 ^b	6698,78 ± 317,85	0,000
10	10000 ± 400,36	5261,57 ± 368,26	0,000
14	10000 ± 324,25	7441,54 ± 626,54	0,000
21	10000 ± 742,99	8916,53 ± 314,68	0,020
30	10000 ± 263,39	10530,61 ± 266,27	0,034

Tabela 13 - Valores densitométricos (AOU) obtidos para o VEGF nos grupos controle e experimental nos diferentes períodos pós-exodontia

Período (dias)	Valores densitométricos para as Bandas de VEGF de 21kDa (AOU)		Teste “t” (p)
	Controle (m±dp)	Experimental (m±dp)	
3	9906,79 ± 574,35	7256,48 ± 656,63	0,000
7	8939,44 ± 570,77	4347,05 ± 846,95	0,000
10	8879,76 ± 1305,18	2785,65 ± 682,28	0,000
14	9630,08 ± 400,94	7128,77 ± 569,77	0,000
21	9014,47 ± 1119,48	8028,12 ± 436,02	0,109
30	9023,69 ± 468,65	9045,30 ± 358,77	0,963

Figura 40 - Valores densitométricos das bandas obtidas por *Western blotting* para a proteína VEGF durante o reparo ósseo alveolar em ratos nos diferentes períodos analisados

Figura 41 - Imagens obtidas das películas radiográficas das bandas de 42kDa (dímero) e 21kDa (monômero) obtidas para a proteína VEGF por Western blotting para os grupos controle e experimental para cada período

Para todas as proteínas em todos os períodos, os valores densitométricos para o controle interno α -tubulina não apresentaram diferenças estatisticamente significante entre os grupos.

A análise da Tabelas 12 e 13 e das Figuras 40 e 41 juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- 1) A expressão protéica para VEGF para as bandas de 42kDa no grupo controle foi em média 0,278 vezes maior em relação ao experimental entre 3 e 21 dias e 0,05 vezes menor aos 30 dias. O padrão de expressão para as bandas de 21 kDa foi similar para ambos os grupos, sendo que, entre 3 e 14 dias, no grupo controle foi 0,472 vezes maior em relação ao experimental e entre 21 e 30 dias não ocorreu diferenças significantes entre os grupos.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Com o objetivo de facilitar a compreensão dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho, serão discutidos: 1) os aspectos referentes ao modelo experimental e a metodologia utilizada; 2) a utilização dos AINES e o reparo ósseo alveolar; 3) produção inicial da COX-2 e participação na angiogênese durante o processo de reparo ósseo; 4) a importância da vascularização e das prostaglandinas no processo de reparo ósseo; e 5) a expressão do VEGF e seus receptores no processo de reparo ósseo alveolar.

5.1 MODELO EXPERIMENTAL E METODOLOGIA UTILIZADA

O reparo ósseo alveolar escolhido como modelo experimental no presente trabalho, encontra-se amplamente descrito na literatura desde o início do século 20 (EULER, 1923; CLAFLING, 1936; HUEBSCH et al., 1952; SHAFER, 1954; AMLER et al., 1960; SIMPSON, 1960; BOYNE, 1966; OKAMOTO; RUSSO, 1973; CARVALHO et al., 1980; CARVALHO; OKAMOTO, 1987; CARVALHO et al., 1997; YUGOSHI et al., 2002; ELSUBEIHI; HEERSCHKE, 2004), em estudos clínicos em seres humanos (EVIAN et al., 1982; BECKER et al., 1998; DEVLIN; SLOAN, 2002; MUNHOZ, 2005) e em animais, como cães (CLAFLING, 1936; HUEBSCH; HANSEN, 1969; CARDAROPOLI et al., 2003), macaco (SIMPSON, 1960), coelhos (KURITA et al., 1985; OCAÑA, 2001; LALANI et al., 2004) e principalmente em ratos (MAGALHÃES et al., 1982; OKAMOTO et al., 1994; FRACON et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; TEÓFILO et al., 2011). Contudo, ainda são escassos os estudos quanto aos efeitos dos AINES sobre o reparo ósseo alveolar (FRACON et al., 2008) e especialmente, os efeitos dos AINES sobre a expressão do VEGF nesse tipo de reparo. Desta maneira, optou-se por estudar os efeitos do Meloxicam, um AINES amplamente usado na odontologia, utilizando-se de uma metodologia já muito bem descrita na literatura.

A escolha do rato como animal de experimentação é em decorrência, principalmente, da maior facilidade de aquisição e de alojamento, bem como da alta

resistência que o mesmo apresenta à manipulação e à agressão cirúrgica (EMERY; SANDERSON, 1995). Microscopicamente, o reparo ósseo alveolar em ratos é um excelente modelo para o estudo de vários aspectos da reparação óssea por exibir sequência evolutiva similar a observada em humanos (AMLER, 1969; DOTTO et al., 1970; OKAMOTO; RUSSO, 1973; EVIAN et al., 1982; CARVALHO et al., 1983; OKAMOTO; FIALHO, 1990).

No presente trabalho, observou-se que após a exodontia em ratos, o alvéolo estava predominantemente preenchido por coágulo sanguíneo resultante do rompimento dos vasos sanguíneos durante os procedimentos de extração dentária. Gradualmente esse coágulo sanguíneo era invadido por pequenos capilares neoformados, células inflamatórias e células tipo fibroblastos, oriundos de tecidos remanescentes da proximidade da cortical óssea alveolar, constituindo um tecido de granulação. Concomitantemente a isso ocorria o início de atividade osteoblástica na superfície interna da cortical óssea com o aparecimento das primeiras formações ósseas que se expandiam rumo ao centro do alvéolo. Aos 21 e 30 dias já havia um acentuado aumento na espessura das trabéculas ósseas e a formação de um tecido ósseo mais maduro com alguns espaços já preenchidos por medula óssea.

Apesar dessa intensa formação óssea, o alvéolo sofre reabsorção/remodelação da sua cortical, devido à ausência física do dente e dos efeitos das forças mastigatórias, resultando em alterações dimensionais tanto na espessura quanto em altura da cortical óssea, o que pode ser verificado nas imagens radiográficas dos alvéolos no grupo controle nos períodos entre 21 e 30 dias, inicialmente como uma descontinuidade da cortical óssea e mais tarde pela deformação do contorno alveolar. O volume absoluto dos alvéolos em mm³ em diferentes períodos experimentais avaliado em estudo complementar (processo FAPESP 2010/20747-5) utilizando-se do método de Cavalieri (1635 apud (HOWARD; REED, 1998) e dos cortes transversais semi-seriados dos mesmos alvéolos usados aqui mostrou uma acentuada diminuição de volume de 0,261 vezes no grupo controle entre 3 e 30 dias (FURLANETO et al., 2011).

Segundo Okamoto e Russo (1973), o processo de reparação alveolar se completa quando o alvéolo dentário estiver totalmente preenchido por espessas trabéculas ósseas e com espaços medulares bem definidos, além da crista óssea remodelada, o que seria alcançado aos 21 - 30 dias (MAGALHÃES et al., 1982;

CARVALHO et al., 1983; ALVES; OKAMOTO, 1989; OKAMOTO; FIALHO, 1990; CARVALHO et al., 1997). Porém, na atual pesquisa, mesmo decorridos 30 dias o alvéolo ainda continuava com 39,48% do seu volume preenchido por tecido conjuntivo e raramente por medula óssea, além da presença de osteoblastos ativos e de matriz recém sintetizada na superfície das trabéculas ósseas, indicativos de processo de reparo ainda em curso. Nesse sentido, Carvalho et al. (1997) sugere que o reparo alveolar em ratos continua até os 42 dias.

Convém salientar que estudos filogenéticos indicam que quanto mais evoluída a espécie animal, mais lento é o processo de reparo ósseo alveolar (MARZOLA, 1973; KENNER, 2003) e que no homem o término da reparação só é observada por volta de 64 dias pós-operatório (AMLER, 1969; EVIAN et al., 1982; CARVALHO; OKAMOTO, 1987; OKAMOTO; FIALHO, 1990).

Diante do exposto, fica claro que a reparação ósseo alveolar em rato é um excelente modelo para estudar mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de reparação óssea, assim como a interferências de medicamentos e/ou fatores de crescimento nesse processo.

5.2 A UTILIZAÇÃO DOS AINES E O REPARO ÓSSEO ALVEOLAR

Nas últimas décadas vêm sendo amplamente discutido os efeitos negativos do uso dos AINES no tratamento da dor em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos, traumas ou mesmo com doenças auto-imunes ou crônicas (GAJRAJ, 2003; GERSTENFELD; EINHORN, 2004). Dentre esses, salienta-se os efeitos gastrointestinais gerados pela utilização prolongada de AINES que bloqueia a via da COX (ALLEN et al., 1980; ALTMAN et al., 1995; SIMON et al., 2002; ENDO et al., 2005; SASSIOTO et al., 2006; KRISCHAK et al., 2007), bem como, os efeitos na inibição da atividade osteoclástica e no atraso na formação óssea associado a fraturas de ossos longos e fusão espinal (SUDMANN, 1975; SUDMANN et al., 1979; ALLEN et al., 1980; KELLER et al., 1987; ENGESAETER et al., 1992; HØGEVOLD et al., 1992; ALTMAN et al., 1995; REIKERAAS; ENGBRETSSEN, 1998).

No entanto, no início da década de 90, com a descoberta das isoformas da COX, e a criação de novos medicamentos que bloqueavam seletiva ou preferencialmente a COX-2 resultaram na diminuição dos efeitos adversos associados à isoforma da COX-1 (ENGELHARDT et al., 1996; WARNER et al., 1999; RIENDEAU et al., 2001; PATRIGNANI et al., 2003). Porém, relatos dos efeitos negativos dos AINES sobre o reparo ósseo ainda predominam na literatura mesmo com o uso dos medicamentos seletivos para COX-2 (GOODMAN et al., 2002; SIMON et al., 2002; BERGENSTOCK et al., 2005; MURNAGHAN et al., 2006; GERSTENFELD et al., 2007; SIMON; O'CONNOR, 2007; DIMMEN et al., 2008).

Por outro lado, vale destacar, que também existem alguns estudos demonstrando que a utilização de AINES seletivos para COX-2 não interferem no processo de reparo ósseo (LONG et al., 2002; BROWN et al., 2004; MULLIS et al., 2006a; MATSUMOTO et al., 2008). De acordo com Fracon et al. (2008) esses resultados contraditórios são decorrentes de variações metodológicas, como dosagem e o tempo de tratamento, além de variações quanto à sensibilidade intra e inter-espécies, fatores locais e sistêmicos compensatórios, grau de remodelação óssea e a farmacocinética da droga citado por outros autores (RADI; KHAN, 2005; MULLIS et al., 2006a).

No que se refere especificamente ao reparo ósseo alveolar os poucos estudos relacionados à utilização dos AINES são controversos (BEZERRA et al., 2000; YUGOSHI et al., 2002; FRACON et al., 2008; FRACON et al., 2010; TEÓFILO et al., 2011), o que justifica a necessidade de novas investigações quanto a utilização desse medicamento nesse modelo experimental de reparação.

No atual estudo optou-se pela utilização do Meloxicam, baseados no trabalho desenvolvido por Busch et al. (1997), que verificaram que o perfil farmacocinético da droga em ratos, dentre outras espécies utilizadas em modelos experimentais (camundongos, mini-porcos e babuínos), é o que mais se assemelha ao observado em humanos. Quanto ao período de tratamento e a dosagem da droga seguiu-se os estudos de Bezerra et al. (2000) e Oliveira et al. (2008), que utilizaram meloxicam na dose de 3mg/kg por via intraperitoneal aplicados diariamente durante 7 dias. O veículo usado para o Meloxicam foi a solução de 0.9% NaCl para produzir a concentração adequada permitindo a administração de 0.1 ml intraperitoneal diariamente durante o período de indução.

Quanto aos efeitos do meloxicam no grupo experimental, notou-se que esse medicamento atrasou o processo de reparo ósseo alveolar em ratos. A análise dos resultados morfológicos qualitativos e quantitativos mostrou que a administração de Meloxicam durante 7 dias interfere no processo de reparo inicial do alvéolo de rato pós-exodontia por promover a inibição da reabsorção do coágulo sanguíneo, uma menor formação óssea e uma menor reabsorção/ remodelação da cortical pré existente e também do tecido ósseo neoformado, atrasando dessa maneira significativamente a reparação. Esses dados corroboram com os resultados de outros estudos realizados sobre o reparo ósseo nas regiões do fêmur e tíbia de ratos (SIMON et al., 2002; GERSTENFELD et al., 2003; BERGENSTOCK et al., 2005; MURNAGHAN et al., 2006; GERSTENFELD et al., 2007; DIMMEN et al., 2008) e também em alvéolos de ratos (BEZERRA et al., 2000; YUGOSHI et al., 2002).

5.3 PRODUÇÃO INICIAL DA COX-2 E PARTICIPAÇÃO NA ANGIOGÊNESE DURANTE O PROCESSO DE REPARO ÓSSEO

Logo após a exodontia, devido à alta vascularização do tecido ósseo alveolar ocorre formação do coágulo sanguíneo, queda na tensão de oxigênio e a liberação local de inúmeros fatores de crescimento e citocinas iniciando uma resposta inflamatória caracterizada por grande número de neutrófilos e macrófagos. Citocinas pró-inflamatórias e mitógenos gerados localmente como IL-1 β , IFN γ , TNF- α induzem diferentes tipos celulares, como macrófagos, osteoblastos e células endoteliais a sintetizarem COX-2. Por outro lado, a produção de COX-2 também pode ser induzida por hormônios (AKARASEREENONT et al., 2000) e fatores de crescimento como FGF e VEGF (HE et al., 1999; HERNANDEZ et al., 2001; HOULISTON et al., 2002; TAMURA et al., 2002).

A expressão da COX-2 é essencial para ao reparo ósseo (SIMON et al., 2002; ZHANG et al., 2002) principalmente por estimular as células endoteliais na produção de inúmeras prostaglandinas, dentre elas a PGE2, PGI2 e tromboxano A2 em resposta a vários estímulos (MARCUS et al., 1978; CAMACHO et al., 1998). Dentre esses prostanóides, salienta-se a PGE2 que está relacionado à angiogênese (LEAHY et al., 2000) por promover a síntese e liberação de fatores angiogênicos e

subseqüentemente o brotamento, migração e formação do tubos vasculares (GATELY, 2000; GATELY; LI, 2004). A produção contínua de VEGF promove a liberação de PG dependente de COX2, que por sua vez induz a produção de VEGF (Figura 42). Xie et al. (2009) verificaram por análise quantitativa por microCT que ocorre uma acentuada redução na angiogênese durante o processo de reparação de fratura em animais nocautes para COX-2^{-/-}, associado a uma redução na expressão de MMP-9, levando com isso a um atraso no processo de reparo ósseo endocondral. A administração diária do agonista para EP4 melhora marcadamente em 70% a angiogênese nesses animais nocautes e a associação concomitante dos agonistas PGE₂/EP4 estimula a expressão da MMP-9 necessária para a invasão vascular durante a ossificação endocondral, restaurando a formação óssea aos 14 dias pós-fratura. Esse efeito negativo do uso de AINE inibidor da COX-2 no fluxo sanguíneo e consequentemente no reparo de fraturas em camundongos também foi demonstrado por Murnaghan et al. (2006), que aconselham precaução quanto ao seu uso em lesões onde a vascularização é tênue ou está muito comprometida.

Figura 42 - Esquema representativo da via da COX-2 produzindo prostanóides (PGs) responsáveis pela angiogênese em resposta a um estímulo-lesão na célula endotelial. Adaptado de Gately e Li (2004)

Vale a pena salientar que, o crescimento de um tumor é dependente da angiogênese, por isso, fatores pro-angiogênicos, tais como fatores de crescimento angiogênicos, receptores para fatores de crescimento angiogênicos, vias de transdução de sinal nas células endoteliais, integrinas vasculares e as metaloproteinases tem sido alvo de extensivos estudos visando o desenvolvimento de potenciais drogas anti cancerígena. Nesse sentido, os AINES inibidores da COX-2 têm sido propostos como agente antiangiogênico para a prevenção e tratamento do câncer (GATELY; LI, 2004).

Diante do acima exposto pode-se inferir que, o atraso no processo de reparo no grupo experimental deveu-se inicialmente a inibição parcial da angiogênese e da transmigração de células inflamatórias responsáveis pela degradação do coágulo, ocasionando um retardo na formação do tecido conjuntivo/ósseo. Morfometricamente, entre 7 e 21 dias nos animais tratados com Meloxicam, o percentual de coágulo sanguíneo no alvéolo foi significativamente maior em relação ao controle. Aos 21 dias, no grupo experimental, aproximadamente 16% do alvéolo ainda estava preenchido por coágulo, enquanto que, no controle este percentual era de apenas 6%. Neste período como nos demais, o percentual de tecido conjuntivo foi similar em ambos os grupos, enquanto que, o de tecido ósseo foi 10% maior no grupo controle. Outro fator indicativo de atraso no processo de reparo foi que, no grupo controle o tecido conjuntivo mostrava-se mais fibroso, organizado e rico em vasos de maior calibre, enquanto que, no tratado com Meloxicam, áreas de tecido conjuntivo frouxo, rico em células tipo fibroblastos e capilares sanguíneos estavam presentes em substituição ao coágulo sanguíneo. Como o reparo no alvéolo de rato é extremamente dinâmico e rápido e fases de reparo se sobrepõem, assim conforme o coágulo vai sendo reabsorvido e substituído por tecido conjuntivo, o mesmo vai sendo substituído por tecido ósseo e/ou medular.

5.4 A IMPORTÂNCIA DA VASCULARIZAÇÃO E DAS PROSTAGLANDINAS NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO

Como comentado anteriormente, durante todo o processo de reparo o percentual de tecido conjuntivo foi similar em ambos os grupos, e o aumento da

vascularização esteve associado à maior presença do tecido de granulação, como observado no grupo experimental, ou a maior formação óssea como observado no grupo controle. O percentual de vasos no tecido conjuntivo no grupo controle foi em média 0,38 vezes maior apenas nos períodos de 10 e 14 dias, quando grande parte do alvéolo estava preenchida por tecido ósseo primário, cujas trabéculas eram mais delgadas e circundadas por vasos sanguíneos.

Estes resultados corroboram, com outros estudos (MAYER et al., 2005; QU; VON SCHROEDER, 2006; BYUN et al., 2007; CLARKIN et al., 2008; GRELLIER et al., 2009) que demonstraram que o crescimento, a remodelação e o reparo ósseo requerem uma interação coordenada entre os osteoblastos, osteoclastos e as células endoteliais. O aumento na vascularização desempenha importante papel na maturação das células ósseas pela ação de fatores de crescimento via *feedback* entre essas células. Essa complexa via de comunicação é dependente de citocinas osteogênicas, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e endotelinas (ETs) produzidas pelas células endoteliais que estimulam a diferenciação dos osteoblastos e a síntese de matriz óssea. Como parte dessa interação, os osteoblastos maduros (PARFITT, 2000) posicionam-se nas proximidades de capilares sanguíneos e produzem fatores angiogênicos, incluindo o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e angiopoetinas que estimulam a angiogênese na modelação e na remodelação óssea (HORNER et al., 2001). Esse *feedback* positivo entre a osteogênese e a angiogênese são fatores apropriados para o contínuo crescimento ósseo. Por isso, recentemente tem sido proposto na engenharia de tecidos a utilização de pré-cultura de células endoteliais associado à co-cultura de osteoblastos para a rápida vascularização do *scaffold* necessária para a sobrevivência das células ósseas e síntese da matriz (GHANAATI, et al., 2010).

Por outro lado, estudos têm demonstrado a direta interferência das PGs na formação óssea. Estudos *in vivo* em ratos, cães e humanos mostraram que a administração de PG aumenta a massa óssea cortical e medular (UEDA et al., 1980; NORRDIN; SHIH, 1988; FAYE-PETERSEN et al., 1996), enquanto estudos *in vitro* tem mostrado que principalmente a PGE2 exógena estimula a diferenciação osteoblástica tanto em cultura de células estromais da medula óssea quanto dos precursores de osteoblastos obtidos de calvária de ratos (FLANAGAN; CHAMBERS,

1992; NAGATA et al., 1994; SCUTT; BERTRAM, 1995; KANEKI et al., 1999). Convém ressaltar que corroborando com esta hipótese, ocorre redução na diferenciação osteoblástica em cultura de células estromais de medula óssea obtidas de camundongos nocaute para COX-2 em relação aos *wild-type* (WT) (ZHANG et al., 2002; OKADA et al., 2003).

As diferentes respostas das células ósseas à PGE2 são decorrentes das inúmeras vias de sinalização ativadas pelos seus receptores (MINAMIZAKI et al., 2009). Os receptores EP2 e EP4 têm sido relacionados com os efeitos anabólicos da PGE2 no tecido ósseo (LI et al., 2002; AKHTER et al., 2004; MINAMIZAKI et al., 2009). Estudo com células-tronco mesenquimais tem demonstrado que a PGE2 ativa o receptor EP4 que leva a expressão da BMP-2 (ARIKAWA et al., 2004). Por outro lado, a transcrição da BMP-2 induz a expressão de COX-2 nos osteoblastos via ligação com o fator de transcrição RUNX2/Cbfa1 e que a indução da COX-2 contribui para o efeito da BMP-2 sobre a diferenciação osteoblástica e a formação de osteoclastos (ZHANG et al., 2002; CHIKAZU et al., 2011). Estes fatos corroboram com estudos *in vitro* com células de calvária de camundongos knockout (KO) para COX-2 versus *wild-type* (WT), que mostraram uma redução nos níveis de RUNX2 e osterix, que é restaurada com administração exógena de PGE2 (ZHANG et al., 2002), sendo que, a PG reduz a proliferação osteoblástica, provavelmente direcionando-as para sua diferenciação final, porém aumenta o crescimento de células precursoras (XU et al., 2007). Estudos *in vivo* com uso de AINES seletivos para COX-2 tem demonstrado falhas na diferenciação final dos osteoblastos com redução da expressão de RNAm para *c-fos* e osteocalcina no processo de reparo ósseo.

Na presente pesquisa também foi evidente já nos primeiros dias no grupo controle, a presença de áreas de reabsorção primeiramente na cortical óssea alveolar e subsequentemente no tecido ósseo neoformado. No grupo experimental, estas áreas de reabsorção foram menos evidentes e o processo de reabsorção estava praticamente ausente nos primeiros 7 dias. Estudos em andamento no nosso laboratório (SAKUMA et al., 2004) têm demonstrado que aos 21 dias, o volume do alvéolo no grupo controle era 23,6% menor em relação aos dos animais tratados com o Meloxicam, indicando que o antiinflamatório também interfere na atividade osteoclástica local.

Vale a pena salientar que, PGE2 exógeno é um forte estimulador da reabsorção óssea em sistemas *in vitro* de cultura de tecido ósseo e da diferenciação osteoclástica em cultura de células de medula óssea (CHOUDHARY et al., 2008). Em cultura de células de medula óssea de camundongos KO para COX-2 (Ptgs2-prostaglandin-endoperoxide synthase 2) ou tratados com inibidores seletivos para COX-2, quando submetidos a COX-2 exógena induzem a produção de PGE2 e a subsequente diferenciação de osteoclastos por inúmeros agonistas da reabsorção de LPS, citocinas pro-inflamatórias (IL-1 α , TNF- α), hormônios (PTH e vitamina D3) e fatores de crescimento (FGFb). O maior efeito da PGE2 na reabsorção óssea ocorre indiretamente via hiperegulação da expressão do RANKL e da inibição da OPG através da via de sinalização EP4-AMPC nos osteoblastos e potencializada pela ativação do EP2 (MIYAURA et al., 2000; LI et al., 2002; SAKUMA et al., 2004). Porém, estudos *in vitro* realizado por Kobayashi et al. (2005) tem demonstrado que precursores de macrófagos da medula óssea expressam receptores EP1, EP2, EP3 β , e EP4, e que a expressão de EP2 e EP4 é hiporegulada durante a diferenciação osteoclástica induzida pelo RANKL e M-CSF (KOBAYASHI et al., 2005). Em contraste, o EP1 é continuamente expresso em osteoclastos maduros, que como a calcitonina eleva o fluxo de Ca⁺² intracelular, necessário para a formação do anel de actina e das lacunas de reabsorção na superfície da matriz.

5.5 A EXPRESSÃO DO VEGF E SEUS RECEPTORES NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR

Com relação ao VEGF foi observado pela técnica de imunoistoquímica que são expressos por vários tipos celulares, inicialmente pelas células endoteliais dos capilares recém formados e células tipo fibroblastos presentes no tecido de granulação e depois nos osteoblastos presentes na superfície da matriz óssea recém sintetizada e nos osteócitos recém aprisionados na matriz osteóide. Subsequentemente, a sua expressão fica restrita principalmente às células osteoblásticas e osteócitos presentes na matriz osteóide, a fibroblastos localizados próximos aos osteoblastos altamente ativos e mais raramente em células

endoteliais. Os fibroblastos presentes no tecido conjuntivo fibroso, osteócitos presentes no tecido ósseo mineralizado e osteoblastos alongados e com citoplasma reduzido que recobria a superfície do tecido ósseo maduro/lamelar não apresentaram imunomarcção para VEGF. Byun et al. (2007) em cães, verificaram também que nos períodos iniciais de reparo após distração osteogênica mandibular, a expressão de VEGF era acentuada em osteoblastos, células tipo fibroblasto e osteócitos, e que, nos períodos entre 14 e 28 dias, essa expressão predominava em osteoblastos e era raro em fibroblasto e osteócitos.

No atual trabalho, esse padrão de expressão temporal foi diferente para os dois grupos devido a diferença na velocidade do processo de reparo em cada um. No grupo controle tanto a reabsorção do coágulo e a substituição por tecido conjuntivo, quanto a formação/remodelação óssea foi mais rápida em relação ao grupo experimental. Assim, nos períodos iniciais de 3 a 10 dias, o grupo experimental apresentou mais células endoteliais e tipo fibroblastos imunomarcadas, enquanto que, no controle a marcação foi mais evidente em osteoblastos. Assim sendo, o número total de células marcadas/mm² não apresentou diferenças entre os grupos.

Por outro lado, a expressão do RNAm por RT-PCR não mostrou diferenças entre os grupos controle e experimental exceto aos 10 dias quando a expressão foi maior no grupo controle. Convém ressaltar que, Oliveira et al. (2008) em seu estudo sobre o VEGF na doença periodontal inflamatória induzida experimentalmente em ratos, relataram alteração na expressão de RNAm para VEGF no período de 14 dias no grupo tratado com o Meloxicam. Já, a expressão protéica do VEGF por *Western blotting* mostrou significativamente maior no grupo controle entre 3 e 21 dias. Essa limitada correlação observada entre a expressão do RNAm para o VEGF e os seus níveis protéicos também foi relatado por Reumann et al. (2010). Porém, todos os nossos resultados tendem a mostrar que, a utilização do antiinflamatório Meloxicam altera a expressão do VEGF, atrasando a formação óssea, já que, o VEGF aumenta a quimiotaxia, proliferação e diferenciação das células osteoblásticas (GARNER et al., 2005; MOORE et al., 2005; RAMEY et al., 2005) além de, induzir a formação óssea tanto em cultura de tecidos como *in vivo* pela participação direta no recrutamento e na estimulação dos osteoblastos (DAHL et al., 2004). Como pode-se notar, os osteoblastos foram as células sintetizadoras de VEGF na área do reparo e

é sabido que, essas células podem pela regulação autócrina mediar à formação óssea ou a reabsorção dependendo do balanço entre a expressão do receptor e o estado de diferenciação das células, além das citocinas e fatores de crescimento que podem estar presentes no local (MAYER et al., 2005; STREET; LENEHAN, 2009).

No que diz respeito à expressão do VEGF, vale a pena enfatizar que, além da importante via da COX-2, outros fatores também exercem importante influência na indução do VEGF (OLIVEIRA et al., 2008). Concomitantemente a ocorrência da lesão óssea acontece a hipóxia tecidual, que estimula a síntese local do fator de crescimento induzido pela hipóxia (HIF), que por sua vez regulará o aumento de síntese do VEGF no tecido lesionado (SENEZA et al., 2002). Muitos outros fatores de crescimento, dentre esses o fator de crescimento epidermal (EGF), TGF α , TGF β , fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) e fator de crescimento plaquetário (PDGF), exercem influência na regulação da síntese do VEGF, sugerindo que a ação parácrina e/ou autócrina desses fatores cooperem juntamente com o HIF na estimulação da expressão tecidual do VEGF (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; NEUFELD et al., 1999).

Com relação aos receptores do VEGF, foi obtido imunomarcacão apenas para o VEGFR-1, principalmente em células osteoblásticas e osteócitos recém aprisionados na matriz e em células endoteliais e fibroblastos próximos de regiões de intensa formação óssea durante todo o período analisado em ambos os grupos. O número de células imunomarcadas para VEGFR-1 positivas/mm² nos períodos de 3, 7 e 10 dias, foi maior no grupo controle em relação ao experimental devido, principalmente, a maior quantidade de osteoblastos imunomarcados. Neste caso, também foi detectado maior expressão de RNAm nos períodos de 3 e 10 dias no grupo controle, indicando que, esta redução do receptor no grupo experimental se deve ao menor número de osteoblastos.

Não foi possível com o anticorpo adquirido a imunomarcacão do VEGFR-2 e nem a sua detecção por *Western blotting*. Quanto ao RNAm para o VEGFR-2, também foi verificado uma maior expressão no grupo controle, salientando o período 7 dias.

A hipóxia, além de induzir a liberação de VEGF, também é um potente estimulador dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 in vivo (TUDER et al., 1995; LI, et

al., 1996). Com semelhanças estruturais ao VEGF, VEGFR-1 tem uma seqüência similar em sua região promotora, ao HIF-1 (GERBER et al., 1997), enquanto que, o VEGFR-2 não, assim, sua transcrição é parcialmente diminuída pela hipóxia (THIEME et al., 1995; GERBER et al., 1997). O VEGFR-2 pode ser estimulado em nível pós-transcricional por fatores parácrinos, liberados a partir de tecidos isquêmicos (BROGI et al., 1994; WALTENBERGER et al., 1994).

O VEGFR-1 está envolvido principalmente na migração e na manutenção vascular e na indução de fatores teciduais e quimiotaxia de monócitos e o aumento da expressão das metaloproteinases nas células do músculo liso vascular (BARLEON et al., 1996; CLAUSS et al., 1996). Alguns autores relataram que o VEGFR-1 estaria envolvido na artrite por mecanismos de ativação dos macrófagos e aumento da angiogênese (BARLEON et al., 1996; CLAUSS et al., 1996; SAWANO et al., 2001). Shibuya (2006) relata que a expressão inicial do VEGFR-1 durante a resposta inflamatória é comumente associada com a ativação/migração celular, apresentando-se em um nível constante nos períodos iniciais da inflamação, indicando que esse receptor promoveria a formação da rede vascular nos estágios iniciais do reparo ósseo. Suportando essa concepção estudos *in vitro* mostraram que a ativação do VEGFR-1 transmembrana e da sua porção intracelular é necessário para a proliferação endotelial, enquanto que, a sua forma solúvel outros fatores chave, incluindo o VEGFR-3 são necessários para a ramificação vascular (KEARNEY et al., 2004; KAPPAS et al., 2008).

Embora, o VEGFR-2 também participe da mitogênese e da proliferação celular, induzindo as células endoteliais à mitogênese, quimiotaxia e alterações na morfologia celular. (FURUMATSU et al., 2003), trabalho recente de Reumann et al. (2010) mostrou uma mudança dinâmica nos níveis de expressão do VEGFR-2 durante o processo de reparo de fratura em camundongo, aumentando gradualmente durante as fases de reparação com um pico na formação do calo maduro (14 dias), enquanto que, os níveis de VEGFR-1 mantiveram-se constante. Aparentemente, esse modelo de atuação dos receptores foi compatível com o observado no atual trabalho. Limitando-se ao modelo e aos períodos experimentais observou-se aqui que, em ambos os grupos, os níveis do receptor VEGFR-1 foi constante entre 3 e 14 dias, tendo um pico aos 21 dias que culmina com o início da formação do tecido hematopoiético, enquanto que, o nível de VEGFR-2 elevado aos

3 dias no grupo controle e aos 10 dias no experimental. Reumann et al. (2010) foram os primeiros a avaliarem a expressão do VEGF e dos seus receptores 1 e 2 a níveis transcricional e protéico. Neste modelo o nível protéico do VEGFR-1 mostrou-se constante durante o reparo sendo inferido sua importante participação na formação da rede vascular especialmente durante os estágios iniciais, enquanto que, os níveis protéicos do VEGFR-2 exibiu grande alteração, incluindo ausência da proteína no osso intacto à elevados níveis durante a formação do calo e maturação sugerindo considerável especificidade do VEGFR-2 durante o reparo. Vale a pena salientar que, o VEGFR-2 é um receptor de domínio para inserção de quinase tipo III e que tem alta capacidade de ativar as quinases estimulando uma grande variedade de sinais biológicos tanto nas células endoteliais quanto em outros tipos celulares.

Ainda não se sabe, quais são as funções desses receptores de VEGF expressos nas células ósseas e se o mecanismo de ação se assemelharia às suas funções nas células endoteliais. A expressão dos receptores para VEGF durante a diferenciação dos osteoblastos em cultura de células progenitoras é divergente entre os muitos estudos na literatura. Decker et al. (2000) reportaram que o VEGF₁₂₀ e o VEGF₁₆₄, que corresponde ao VEGF₁₂₁ e o VEGF₁₆₅ humano, e os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, respectivamente são expressados em pré-osteoblastos de camundongos da linhagem KS483. Já Villars et al. (2000) reportaram que o VEGF₁₂₁ e o VEGF₁₆₅ e os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 são detectados em osteoblastos progenitores da medula óssea. Porém, Furumatsu et al. (2003) verificaram que as quatro isoformas de VEGF (VEGF₁₂₁; o VEGF₁₆₅; VEGF₁₈₉ e o VEGF₂₀₆) e a neuropilina são expressados durante a osteoblastogênese de células mesenquimais, entretanto, os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 não foram detectados por RT-PCR. Esses resultados discrepantes sugerem que a expressão das isoformas de VEGF e dos seus receptores podem depender da espécie, do status de fisiologia das células do doador, da fonte anatômica das células progenitoras coletada e do método experimental utilizado.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A análise conjunta dos resultados obtidos nesse trabalho, com a utilização de diferentes técnicas, sugere que a aplicação diária do Meloxicam para o tratamento da dor aguda pós-exodontia em ratos retarda a absorção do coágulo sanguíneo e consequentemente a angiogênese e a formação/remodelação óssea, interferindo diretamente na expressão do VEGF e seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 durante os estágios iniciais do reparo ósseo alveolar.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AKARASEREENONT, P. et al. The induction of cyclooxygenase-2 by 17beta-estradiol in endothelial cells is mediated through protein kinase C. **Inflamm Res**, v. 49, n. 9, p. 460-465, Sep. 2000.
- AKHTER, M. P. et al. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. **Bone**, v. 35, n. 1, p.162-169, Jul. 2004.
- AKMAN, S. et al. Effect of diclofenac sodium on union of tibial fractures in rats. **Adv Ther**, v. 19, n. 3, p. 119-125, May-Jun. 2002.
- ALLEN, H. L. et al. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. **Acta Orthop Scand**, v. 51, n. 4, p. 595-600, Aug. 1980.
- ALTMAN, R. D. et al. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. **J Orthop Trauma**, v. 9, n. 5, p. 392-400, 1995.
- ALVES, M. C. R.; OKAMOTO, T. Influência do "stress" no processo no reparo de feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. **Rev Odont UNESP**, v.18, n.1/2, p.119-130, 1989.
- AMLER, M. H. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 27, n. 3, p. 309-318, Mar. 1969.
- AMLER, M. H. et al. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. **J Am Dent Assoc**, v. 61, p. 32-44, Jul. 1960.
- ARIKAWA, T. et al. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. **J Cell Physiol**, v. 200, n. 3, p. 400-406, Sep. 2004.
- BARLEON, B. et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. **Blood**, v. 87, n. 8, p. 3336-3343, Apr. 1996.
- BARNES, G. L. et al. Growth factor regulation of fracture repair. **J Bone Miner Res**, v. 14, n. 11, p.1805-1815, Nov, 1999.

BECKER, W. et al. Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports. **J Periodontol**, v. 69, n. 4, p. 414-421, Apr. 1998.

BERGENSTOCK, M. et al. A comparison between the effects of acetaminophen and celecoxib on bone fracture healing in rats. **J Orthop Trauma**, v. 19, n. 10, p. 717-723, Nov./Dec. 2005.

BEZERRA, M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, Jun. 2000.

BOMBARDIER, C. et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. **N Engl J Med**, v. 343, n. 21, p. 1520-1528, 2 p following 1528, Nov. 2000.

BOYNE, P. J. Osseous healing after oblique osteotomy of the mandibular ramus. **J Oral Surg**, v. 24, n. 2, p.125-133, Mar. 1966.

BROGI, E. et al. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. **Circulation**, v. 90, n. 2, p.649-652, Aug. 1994.

BROWN, K. M. et al. Effect of COX-2-specific inhibition on fracture-healing in the rat femur. **J Bone Joint Surg Am**, v. 86-A, n. 1, p.116-123, Jan. 2004.

BURKHARDT, R. et al. Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. **Bone**, v. 8, n. 3, p. 157-164, 1987.

BYUN, J. H. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors after mandibular distraction osteogenesis. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, n. 4, p. 338-44, Apr. 2007.

CAMACHO, M. et al. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. **Circ Res**, v. 83, n. 4, p. 353-365, Aug. 1998.

CAO, Y.; Prescott. S. M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **J Cell Physiol**, v. 190, n. 3, p. 279-286, Mar. 2002.

CARDAROPOLI, G. et al. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 9, p. 809-818, Sep. 2003.

CARVALHO, A. C. P.; OKAMOTO, T. Reparação do Alvéolo Dental. In: CARVALHO, A. C. P.; OKAMOTO, T. **Cirurgia Bucal: Fundamentos Experimentais Aplicados à Clínica**. São Paulo: Panamericana, 1987. p. 55-80.

CARVALHO, P. S. P. et al. Processo de reparo em feridas de extração dental: Influência de irrigação e da curetagem e irrigação intra-alveolar. Estudo histológico em ratos. **RGO**, v. 31, n. 1, p. 19-22, 1983.

CARVALHO, T. L. et al. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. **Braz Dent J**, v. 8, n. 1, p. 9-12, 1997.

CHIKAZU, D. et al. Cyclooxygenase-2 activity is important in craniofacial fracture repair. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 40, n. 3, p. 322-326, Mar. 2011.

CHOUDHARY, S. et al. Effect of deletion of the prostaglandin EP2 receptor on the anabolic response to prostaglandin E2 and a selective EP2 receptor agonist. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 86, n. 1-4, p. 35-40, Jun. 2008.

CHU, T. W. et al. Effect of vascular endothelial growth factor in fracture healing. **Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**, v. 16, n. 2, p. 75-78, Mar. 2002.

CIANCHI, F. et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 121, n. 6, p. 1339-1347, Dec. 2001.

CLAFLING, R. S. Healing of disturbed and undisturbed extraction wounds. **J Am Dent Assoc**, v. 23, n. 5, p. 945-959, 1936.

CLARKIN, C. et al. Heterotypic contact reveals a COX-2-mediated suppression of osteoblast differentiation by endothelial cells: A negative modulatory role for prostanoids in VEGF-mediated cell: cell communication? **Exp Cell Res**, v. 314, n. 17, p. 3152-3161, Oct., 2008.

CLAUSS, M. et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. **J Biol Chem**, v. 271, n. 30, p. 17629-17634, Jul. 1996.

COLNOT, C. et al. Altered fracture repair in the absence of MMP9. **Development**, v. 130, n. 17, p. 4123-4133, Sep. 2003.

DAHL, V. et al. Ibuprofen vs. acetaminophen vs. ibuprofen and acetaminophen after arthroscopically assisted anterior cruciate ligament reconstruction. **Eur J Anaesthesiol**, v. 21, n. 6, p. 471-475, Jun. 2004.

DAHL, V. et al. Prophylactic oral ibuprofen or ibuprofen-codeine versus placebo for postoperative pain after primary hip arthroplasty. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 39, n. 3, p. 323-326, Apr. 1995.

DAI, J.; RABIE, A. B. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. **J Dent Res**, v. 86, n. 10, p. 937-950, Oct. 2007.

CARVALHO, A. et al. Mineralização no processo de reparo em feridas de extração dentária em ratos. **Ars Curandi Odontol**, v. 7, n. 7, p. 304-305, 308-312, 1980.

DEVLIN, H.; SLOAN, P. Early bone healing events in the human extraction socket. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 31, n. 6, p. 641-645, Dec. 2002.

DIMMEN, S. et al. Negative effect of parecoxib on bone mineral during fracture healing in rats. **Acta Orthop**, v. 79, n. 3, p. 438-444, Jun. 2008.

DOTTO, C. A. et al. Quantitative study of vascular response in irradiated wounds. **Surg Gynecol Obstet**, v. 130, n. 5, p. 875-878, May 1970.

DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J**, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, Sep. 1998.

DVORAK, H. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol**, v. 146, n. 5, p. 1029-1039, May 1995.

EINHORN, T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin Orthop Relat Res**, n. 355 Suppl, p. S7-21, Oct. 1998.

EINHORN, T. A. et al. The expression of cytokine activity by fracture callus. **J Bone Miner Res**, v. 10, n. 8, p. 1272-1281, Aug. 1995.

ELSUBEIHI, E. S; HEERSCHE. J. N. Quantitative assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. **Arch Oral Biol**, v. 49, n. 5, p. 401-412, May 2004.

EMERY, P. W.; SANDERSON. P. Effect of dietary restriction on protein synthesis and wound healing after surgery in the rat. **Clin Sci (Lond)**, v. 89, n. 4, p.383-388, Oct. 1995.

ENDO, K. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor delays fracture healing in rats. **Acta Orthop**, v. 76, n. 4, p. 470-474, Aug. 2005.

ENGELHARDT, G. et al. General pharmacology of meloxicam--Part II: Effects on blood pressure, blood flow, heart rate, ECG, respiratory minute volume and interactions with paracetamol, pirenzepine, chlorthalidone, phenprocoumon and tolbutamide. **Gen Pharmacol**, v. 27, n. 4, p. 679-688, Jun. 1996.

ENGESAETER, L. B. et al. Fracture healing in rats inhibited by locally administered indomethacin. **Acta Orthop Scand**, v. 63, n. 3, p. 330-333, Jun. 1992.

EULER, H. Die Heilung von Extraktionswunden. **Deutsche Monat Zahnheilk**, v. 41, p. 685-700, 1923.

EVIAN, C. I. et al. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. **J Periodontol**, v. 53, n. 2, p. 81-85, Feb. 1982.

FAYE-PETERSEN, O. M. et al. Prostaglandin E1-induced hyperostosis: clinicopathologic correlations and possible pathogenetic mechanisms. **Pediatr Pathol Lab Med**, v. 16, n. 3, p. 489-507, May/Jun. 1996.

FERGUSON, C. et al. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? **Mech Dev**, v. 87, n. 1-2, p. 57-66, Sep. 1999.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH. T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev**, v. 18, n. 1, p. 4-25, Feb. 1997.

FLANAGAN, A. M.; CHAMBERS. T. J. Stimulation of bone nodule formation in vitro by prostaglandins E1 and E2. **Endocrinology**, v. 130, n. 1, p. 443-448, Jan. 1992.

FOGARTY, D. J. et al. Intramuscular ketorolac following total hip replacement with spinal anaesthesia and intrathecal morphine. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 39, n. 2, p. 191-194, Feb. 1995.

FORM, D. M.; AUERBACH. R. PGE2 and angiogenesis. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 172, n. 2, p. 214-218, Feb. 1983.

FRACON, R. N. et al. Treatment with paracetamol, ketorolac or etoricoxib did not hinder alveolar bone healing: a histometric study in rats. **J Appl Oral Sci**, v. 18, n. 6, p. 630-634, Dec. 2010.

FRACON, R. N. et al.. Prostaglandins and bone: potential risks and benefits related to the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical dentistry. **J Oral Sci**, v. 50, n. 3, p. 247-252, Sep. 2008.

FURLANETO, D. et al. **Avaliação morfométrica do volume total de tecido ósseo neoformado durante o processo de reparo alveolar pós-exodontia com uso de antiinflamatório não esteroidal seletivo para COX2.** (Trabalho de Iniciação Científica). Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, Bauru, 2011.

FURUMATSU, T.; Z. Shen, N. et al. Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. **J Biochem**, v. 133, n. 5, p. 633-639, May 2003.

GAJRAJ, N. M. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on bone healing. **Reg Anesth Pain Med**, v. 28, n. 5, p. 456-465, Sep./Oct. 2003.

GARNER, S. E. et al. Rofecoxib for osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD005115, 2005.

GATELY, S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 19, n. 1-2, p. 19-27. 2000.

GATELY, S.; LI, W. W. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. **Semin Oncol**, v. 31, n. 2 Suppl 7, p. 2-11, Apr. 2004.

GERBER, H. P. et al. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. **J Biol Chem**, v. 272, n. 38, p. 23659-23667, Sep. 1997.

GERBER, H. P.; FERRARA. N. Angiogenesis and bone growth. **Trends Cardiovasc Med**, v. 10, n. 5, p. 223-228, Jul. 2000.

GERSTENFELD, L. C. et al. Selective and nonselective cyclooxygenase-2 inhibitors and experimental fracture-healing. Reversibility of effects after short-term treatment. **J Bone Joint Surg Am**, v. 89, n. 1, p. 114-125, Jan. 2007.

GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. COX inhibitors and their effects on bone healing. **Expert Opin Drug Saf**, v. 3, n. 2, p. 131-136, Mar. 2004.

GERSTENFELD, L. C. et al. Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Orthop Res**, v. 21, n. 4, p. 670-675, Jul. 2003.

GHANAATI, S. et al. Rapid vascularization of starch-poly(caprolactone) in vivo by outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 5, n. 6, p. e136-413, Jun. 2010.

GLOWACKI, J. Angiogenesis in fracture repair. **Clin Orthop Relat Res**, n. 355 Suppl, p. S82-89, Oct. 1998.

GOODMAN, S. et al. COX-2 selective NSAID decreases bone ingrowth in vivo. **J Orthop Res**, v. 20, n. 6, p. 1164-1169, Nov. 2002.

GRELLIER, M. et al. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells. **J Cell Biochem**, v. 106, n. 3, p. 390-398, Feb. 2009.

HALLER, A. Experimentorum de ossium formatione. In: GRASSET, F. (Ed.). **Opera Minora**. Lausanne, 1763. Experimentorum de ossium formatione, p. 400

HAUSER, C. J. et al. The immune microenvironment of human fracture/soft-tissue hematomas and its relationship to systemic immunity. **J Trauma**, v. 42, n. 5, p. 895-903; discussion 903-904, May 1997.

HAUSMAN, M. R. et al. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. **Bone**, v. 29, n. 6, p. 560-564, Dec. 2001.

HE, H. et al. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. **J Biol Chem**, v. 274, n. 35, p. 25130-25135, Aug. 1999.

HERNANDEZ, G. L. et al. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. **J Exp Med**, v. 193, n. 5, p. 607-620, Mar. 2001.

HØGEVOLD, H. E. et al. Effects of short-term treatment with corticosteroids and indomethacin on bone healing. A mechanical study of osteotomies in rats. **Acta Orthop Scand**, v. 63, n. 6, p. 607-611, Dec. 1992.

HOOPER, L. T. et al. The effectiveness of five strategies for the prevention of gastrointestinal toxicity induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review. **BMJ**, v. 329, n. 7472, p. 948, Oct. 2004.

HORNER, A. et al. Tie2 ligands angiopoietin-1 and angiopoietin-2 are coexpressed with vascular endothelial cell growth factor in growing human bone. **Bone**, v. 28, n. 1, p. 65-71, Jan. 2001.

HOULISTON, R. A. et al. Protease-activated receptors upregulate cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. **Thromb Haemost**, v. 88, n. 2, p. 321-328, Aug. 2002.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. Three dimensional measurement in microscopy In: A. Methods (Ed.). **Unbiased stereology**. Oxford: BIOS scientific Publishers 1998. three dimensional measurement in microscopy. p. 246.

HUEBSCH, R. F. et al. The healing process following molar extraction. I. Normal male rats (long-evans strain). **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 5, n. 8, p. 864-876, Aug. 1952.

HUEBSCH, R. F.; HANSEN, L. S. A histopathologic study of extraction wounds in dogs. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 28, n. 2, p. 187-196, Aug. 1969.

HUNTER, J. Treatise on the Blood, Inflammation and Gunshot Wounds. In: NICOL, G. (Ed.). **Treatise on the Blood, Inflammation and Gunshot Wounds**. London, 1794.

HUO, M. H. et al. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. **J Orthop Res**, v. 9, n. 3, p. 383-390, May 1991.

KANEKI, H. et al. Prostaglandin E2 stimulates the formation of mineralized bone nodules by a cAMP-independent mechanism in the culture of adult rat calvarial osteoblasts. **J Cell Biochem**, v. 73, n. 1, p. 36-48, Apr. 1999.

KAPPAS, N. C. et al. The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and blood vessel branching. **J Cell Biol**, v. 181, n. 5, p. 847-858, Jun. 2008.

KEARNEY, J. B. et al. The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4527-4535, Jun. 2004.

KELLER, J. et al. Bone repair inhibited by indomethacin. Effects on bone metabolism and strength of rabbit osteotomies. **Acta Orthop Scand**, v. 58, n. 4, p. 379-383, Aug. 1987.

KENNER, M. E. **Estudo Microscópico do Reparo Ósseo em Alvéolo de Ratos Irrradiados com Laser de Er:YAG**. (Dissertação de Mestrado). Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2003.

KOBAYASHI, Y. et al. Prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 are down-regulated during differentiation of mouse osteoclasts from their precursors. **J Biol Chem**, v. 280, n. 25, p. 24035-24042, Jun. 2005.

KRISCHAK, G. D. et al. Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model. **Arch Orthop Trauma Surg**, v. 127, n. 1, p. 3-9, Jan. 2007.

KURITA, K.; Hashimoto, Y. et al. Changes in collagen types during the healing of rabbit tooth extraction wounds. **J Dent Res**, v. 64, n. 1, p. 28-32, Jan. 1985.

LALANI, Z. et al. Spatial and temporal localization of secretory IgA in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 4, p. 466-472, Apr. 2004.

LEAHY, K. M. et al. Role of cyclooxygenases in angiogenesis. **Curr Med Chem**, v. 7, n. 11, p. 1163-1170, Nov. 2000.

LI, J. et al. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. **Am J Physiol**, v. 270, n. 5 Pt 2, p.H1803-1811, May 1996.

LI, X. et al. Prostaglandin receptor EP2 mediates PGE2 stimulated hypercalcemia in mice in vivo. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 67, n. 3-4, p. 173-180, Apr. 2002.

LONG, J. et al. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on spinal fusion. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84-A, n. 10, p. 1763-1768, Oct. 2002.

MADEDDU, P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. **Exp Physiol**, v. 90, n. 3, p. 315-326, May 2005.

MAGALHÃES, A. E. O. Influência da fratura da crista óssea alveolar no processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos. **Rev Ass Paul Cirurg Dent**, v. 36, n. 2, 1982.

MANDRACCHIA, V. J. et al. Current concepts of bone healing. **Clin Podiatr Med Surg**, v. 18, n. 1, p. 55-77, Jan. 2001.

MARCUS, A. J. et al. Enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxide H₂ and arachidonic acid to prostacyclin by cultured human endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 253, n. 20, p. 7138-7141, Oct. 1978.

MARZOLA, C. Ferida Cirúrgica: Regeneração e Reparação: Processo de Reparo Alveolar. In: (Ed.). **Manual de Cirurgia: Manobra Fundamentais da Cirurgia**. Bauru, v. 2, 1973. p. 55-66

MATSUMOTO, M. A. et al. Short-term administration of non-selective and selective COX-2 NSAIDs do not interfere with bone repair in rats. **J Mol Histol**, v. 39, n. 4, p. 381-387, Aug. 2008.

MAYER, H. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. **J Cell Biochem**, v. 95, n. 4, p. 827-839, Jul. 2005.

MCLOUGHLIN, C. et al. Diclofenac for day-care arthroscopy surgery: comparison with a standard opioid therapy. **Br J Anaesth**, v. 65, n. 5, p. 620-623, Nov. 1990.

Minamizaki, T. et al. EP2 and EP4 receptors differentially mediate MAPK pathways underlying anabolic actions of prostaglandin E₂ on bone formation in rat calvaria cell cultures. **Bone**, v. 44, n. 6, p. 1177-1185, Jun. 2009.

MIYAURA, C. et al. Impaired bone resorption to prostaglandin E₂ in prostaglandin E receptor EP4-knockout mice. **J Biol Chem**, v. 275, n. 26, p. 19819-19823, Jun. 2000.

MOORE, R. A. et al. Tolerability and adverse events in clinical trials of celecoxib in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis of information from company clinical trial reports. **Arthritis Res Ther**, v. 7, n. 3, p. R644-665, 2005.

MULLIS, B. H. et al. Effect of COX-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model. **Injury**, v. 37, n. 9, p. 827-837, Sep. 2006a.

MULLIS, B. H. et al. Effect of COX-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model. **Injury**, v. 37, n. 9, p. 827-837, Sep. 2006b.

MUNHOZ, E. A. **Avaliação radiográfica de enxerto ósseo xenôgeno em alvéolos de terceiros molares inferiores não inrrompidos.**(Dissertação de Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

MURNAGHAN, M. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced fracture nonunion: an inhibition of angiogenesis? **J Bone Joint Surg Am**, v. 88 Suppl 3, p. 140-147, Nov. 2006.

MURRAY, D. W.; RUSHTON, N. The effect of strain on bone cell prostaglandin E2 release: a new experimental method. **Calcif Tissue Int**, v. 47, n. 1, p. 35-39, Jul. 1990.

NAGATA, T. et al. Effect of prostaglandin E2 on mineralization of bone nodules formed by fetal rat calvarial cells. **Calcif Tissue Int**, v. 55, n. 6, p. 451-457, Dec. 1994.

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

NORRIN, R. W.; SHIH, M. S. Systemic effects of prostaglandin E2 on vertebral trabecular remodeling in beagles used in a healing study. **Calcif Tissue Int**, v. 42, n. 6, p. 363-368, Jun. 1988.

O'HARA, D. A. et al. Ketorolac tromethamine as compared with morphine sulfate for treatment of postoperative pain. **Clin Pharmacol Ther**, v. 41, n. 5, p. 556-561, May 1987.

OCAÑA, R. P. **Avaliação da neorformação óssea em enxertos de hidroxiapatita em alvéolos de coelhos.** (Dissertação de mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

OKADA, Y. et al. Role of cyclooxygenase-2 in bone resorption. **J UOEH**, v. 25, n. 2, p. 185-195, Jun. 2003.

OKAMOTO, T.; RUSSO, M. C. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. **Rev Fac Odontol Aracatuba**, v. 2, n. 2, p. 153-169, 1973.

OKAMOTO, T.; FIALHO, A. C. Estudo histológico comparativo entre dois métodos de obtenção de cortes de alvéolos de ratos. **Rev Odont UNESP**, v. 19, n. 1, p. 63-74, 1990.

OKAMOTO, T. et al. Processo de Reparação Óssea após Osteotomia com Instrumentos Rotatórios de Alta Rotação. Estudo Histológico em Cães após Emprego de Dois Tipos de Broca com e sem Resfriamento. **Rev Bras Odontol**, v. 51, n. 1, p. 21-25, 1994.

OLIVEIRA, T. M. et al. COX-2 inhibition decreases VEGF expression and alveolar bone loss during the progression of experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 79, n. 6, p. 1062-1069, Jun. 2008.

PARFITT, A. M. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. **Bone**, v. 26, n. 4, p. 319-323, Apr. 2000.

PATRIGNANI, P. et al. Clinical pharmacology of etoricoxib: a novel selective COX2 inhibitor. **Expert Opin Pharmacother**, v. 4, n. 2, p. 265-284, Feb. 2003.

PENG, H. et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. **J Clin Invest**, v. 110, n. 6, p. 751-759, Sep. 2002.

PRITCHETT, J. W. Ketorolac prophylaxis against heterotopic ossification after hip replacement. **Clin Orthop Relat Res**, n. 314, p. 162-165, May 1995.

QU, G.; VON SCHROEDER, H. P. Role of osterix in endothelin-1-induced downregulation of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. **Bone**, v. 38, n. 1, p. 21-29, Jan. 2006.

RADI, Z. A.; KHAN, N. K. Effects of cyclooxygenase inhibition on bone, tendon, and ligament healing. **Inflamm Res**, v. 54, n. 9, p. 358-366, Sep. 2005.

RAISZ, L. G. Studies on bone formation and resorption in vitro. **Horm Res**, v. 20, n. 1, p. 22-27, 1984.

RAMEY, D. R. et al. The incidence of upper gastrointestinal adverse events in clinical trials of etoricoxib vs. non-selective NSAIDs: an updated combined analysis. **Curr Med Res Opin**, v. 21, n. 5, p. 715-722, May 2005.

REIKERAAS, O; ENGBRETSSEN, L. Effects of ketoralac tromethamine and indomethacin on primary and secondary bone healing. An experimental study in rats. **Arch Orthop Trauma Surg**, v. 118, n. 1-2, p. 50-2, 1998.

REUMANN, M. K. et al. Production of VEGF receptor 1 and 2 mRNA and protein during endochondral bone repair is differential and healing phase specific. **J Appl Physiol**, v. 109, n. 6, p. 1930-1938, 2010.

RIENDEAU, D. et al. Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 296, n. 2, p. 558-566, Feb. 2001.

SAKUMA, Y. et al. Stimulation of cAMP production and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E(2) and selective prostaglandin receptor agonists in murine osteoblastic cells. **Bone**, v. 34, n. 5, p. 827-34, May 2004.

SASSIOTO, M. C.; Inouye, C. M. et al. Bone repair in rats treated with sodic diclofenac and calcitonin. **Acta Cir Bras**, v. 21 Suppl 4, p. 40-44, 2006.

SAWANO, A. et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 785-791, Feb. 2001.

SCUTT, A.; BERTRAM, P. Bone marrow cells are targets for the anabolic actions of prostaglandin E2 on bone: induction of a transition from nonadherent to adherent osteoblast precursors. **J Bone Miner Res**, v. 10, n. 3, p. 474-87, Mar. 1995.

SEIBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n. 25, p. 12013-12017, Dec. 1994.

SEIDENBERG, A. B.; AN, Y. H. Is there an inhibitory effect of COX-2 inhibitors on bone healing? **Pharmacol Res**, v. 50, n. 2, p. 151-156, Aug. 2004.

SHAFER, W. G. The effect of cortisone on the healing of extraction wounds in the rat. **J Dent Res**, v. 33, n. 1, p. 4-11, Feb. 1954.

SHIBUYA, M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. **J Biochem Mol Biol**, v. 39, n. 5, p. 469-478, Sep. 2006.

SILVERSTEIN, F. E. et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. **JAMA**, v. 284, n. 10, p. 1247-1255, Sep. 2000.

SIMON, A. M. et al. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. **J Bone Miner Res**, v. 17, n. 6, p. 963-976, Jun. 2002.

SIMON, A. M.; O'CONNOR, J. P. Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. **J Bone Joint Surg Am**, v. 89, n. 3, p. 500-511, Mar. 2007.

SIMPSON, H. E. Experimental investigation into the healing of extraction wounds in macacus rhesus monkeys. **J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv**, v. 18, p. 391-399, Sep. 1960.

SPISNI, E. et al. Involvement of prostanoids in the regulation of angiogenesis by polypeptide growth factors. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 47, n. 2, p. 111-115, Oct. 1992.

STREET, J. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, n. 15, p. 9656-9661, Jul. 2002.

STREET, J.; LENEHAN, B. Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival - evidence for an autocrine feedback mechanism. **J Orthop Surg Res**, v. 4, p. 19, 2009.

STREET, J. et al. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? **Clin Orthop Relat Res**, n. 378, p. 224-237, Sep. 2000.

STREET, J. T. et al. The angiogenic response to skeletal injury is preserved in the elderly. **J Orthop Res**, v. 19, n. 6, p. 1057-1066, Nov. 2001.

SUDMANN, E. Effect of indomethacin on bone remodelling in rabbit ear chambers. **Acta Orthop Scand Suppl**, v. 160, p. 91-115, 1975.

SUDMANN, E. et al. Inhibition of fracture healing by indomethacin in rats. **Eur J Clin Invest**, v. 9, n. 5, p. 333-339, Oct. 1979.

TAMURA, M. et al. Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 7, p. 3504-3507, Jul. 2002.

TATSUYAMA, K. et al. Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone. *Eur J Histochem*, v. 44, n. 3, p. 269-278, 2000.

TEÓFILO, J. M. et al. Histometric study of alveolar bone healing in rats treated with the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide. **Implant Dent**, v. 20, n. 2, p.e7-13, Apr. 2011.

THIEME, H. et al. Comparative analysis of vascular endothelial growth factor receptors on retinal and aortic vascular endothelial cells. **Diabetes**, v. 44, n. 1, p. 98-103, Jan. 1995.

TRUETA, J. The role of vessels in osteogenesis. **J. Bone Joint Surg [Br]**, v. 45-B, p. 402-418, 1963.

TUDER, R. M. et al. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. **J Clin Invest**, v. 95, n. 4, p. 1798-1807, Apr. 1995.

UEDA, K. et al. Cortical hyperostosis following long-term administration of prostaglandin E1 in infants with cyanotic congenital heart disease. **J Pediatr**, v. 97, n. 5, p. 834-836, Nov. 1980.

WALTENBERGER, J. et al. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. **J Biol Chem**, v. 269, n. 43, p. 26988-26995, Oct. 1994.

WARNER, T. D. et al. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 13, p. 7563-8, Jun. 1999.

XU, Z. et al. Cyclooxygenase-2 gene disruption promotes proliferation of murine calvarial osteoblasts in vitro. **Bone**, v. 41, n. 1, p. 68-76, Jul. 2007.

YUGOSHI, L. I. et al. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. **Braz Dent J**, v. 13, n. 2, p. 92-96, 2002.

ZELZER, E. et al. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. **Development**, v. 129, n. 8, p. 1893-904, Apr. 2002.

ZHANG, X. et al. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. **J Clin Invest**, v. 109, n. 11, p. 1405-1145, Jun. 2002.

ZICHE, M. et al. Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. **J Natl Cancer Inst**, v. 69, n. 2, p. 475-482, Aug.1982.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 014/2009

Bauru, 6 de agosto de 2009.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado "*Estudo da angiogênese e da expressão temporal da VEGF e do seu receptor VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 durante o reparo ósseo alveolar normal e com o uso terapêutico de um antiinflamatório não esteroide seletivo para a COX-2 em ratos*", de autoria de Ricardo Vinícius Nunes Arantes foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito "*ad referendum*" desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rumio Taga

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO PARA ACRÉSCIMO DE 80 ANIMAIS EXTRAS

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Of. CEEPA Nº 014/2009

Bauru, 4 de maio de 2010.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria, autorizamos o acréscimo de 80 animais para finalizar os experimentos da pesquisa intitulada *“Estudo da angiogênese e da expressão temporal da VEGF e do seu receptor VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 durante o reparo ósseo alveolar normal e com o uso terapêutico de um antiinflamatório não esteroide seletivo para a COX-2 em ratos”*, de autoria de Ricardo Vinícius Nunes Arantes, sob sua orientação, considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pempermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rumio Taga
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO C – APROVAÇÃO DA ALTERAÇÃO DO TÍTULO DO PROJETO

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 014/2009

Bauru, 23 de novembro de 2011.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de alteração no título do projeto de pesquisa **"Estudo da angiogênese e da expressão temporal da VEGF e do seu receptor VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 durante o reparo ósseo alveolar normal e com o uso terapêutico de um antiinflamatório não esteroide seletivo para a COX-2 em ratos"** de autoria de Ricardo Vinícius Nunes Arantes, sob sua orientação, para *ESTUDO DA ANGIOGÊNESE E DA EXPRESSÃO TEMPORAL DA VEGF E DOS SEUS RECEPTORES VEGFR-1/FLT-1 E VEGFR-2/FLK-1 DURANTE O REPARO ÓSSEO ALVEOLAR NORMAL E COM USO TERAPÊUTICO DE UM ANTIINFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL SELETIVO PARA A COX-2 EM RATOS*, informamos a aprovação *ad referendum* desta Comissão, considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rumio Taga

Docente do Departamento de Ciências Biológicas