

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO PDGF-BB E  
IGF-I, CARREADOS POR MEIO DE LIPOSSOMAS, NO REPARO ÓSSEO DE  
ALVÉOLOS DENTÁRIOS EM RATOS**

Fernando Antônio Mauad de Abreu

Belo Horizonte  
2013

Fernando Antônio Mauad de Abreu

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO PDGF-BB E IGF-I, CARREADOS POR MEIO DE LIPOSSOMAS, NO REPARO ÓSSEO DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular

Orientador: Prof. Doutor José Bento Alves  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Doutora Gerluza Aparecida Borges Silva

Belo Horizonte  
2013

Abreu, Fernando Antônio Mauad de  
Avaliação dos efeitos dos fatores de crescimento PDGF-BB e IGF-I,  
carreados por meio de lipossomas, no reparo ósseo de alvéolos dentários em  
ratos. [manuscrito] / Fernando Antônio Mauad de Abreu. – 2013.  
105 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: José Bento Alves. Coorientadora: Gerluza Aparecida Borges  
Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas.

1. Substâncias de crescimento – Teses. 2. Somatomedina – Teses. 3.  
Biologia celular – Teses. 4. Lipossomos – Teses. 5. Histologia oral – Teses.  
6. Fator de crescimento derivado de plaquetas. 7. Reparo ósseo. 8. Alvéolo  
dental. I. Alves, José Bento. II. Silva, Gerluza Aparecida Borges. III.  
Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV.  
Título.

CDU: 611.314-018

*Ao meu amor e companheira de vida: Vânia Cristina;  
às minhas filhas: Mariana e Ana Luiza;  
aos meus pais: Onofre e Marina;  
ao meu irmão, esposa e sobrinhos: Thiago, Monaliza, Matheus e Maria Clara;  
aos pais de Vânia Cristina: Onofre e Maria José;  
ao meu coirmão, esposa e sobrinha: Giovanni, Jaqueline e Giovanna.*

*Dedico a conquista dessa etapa à minha família.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte da energia maior.

À Vânia Cristina, meu amor e companheira. Esse doutorado só foi possível porque você estava ao meu lado, sempre transmitindo a força e a segurança necessária para continuar.

Às minhas filhas, Mariana e Ana Luiza. Mariana, nosso anjo da guarda, e Ana Luiza, nosso encanto diário. Obrigado por estarem comigo todos os dias de minha vida.

Aos meus pais Onofre e Marina, sempre presentes com seu amor, sempre apoiando os filhos em suas empreitadas. Desejo ser para minha filha o que vocês sempre foram para mim.

Ao meu irmão, amigo e companheiro, Thiago Elias, sua esposa Monaliza e meus sobrinhos Matheus e Maria Clara. Vocês são a extensão das virtudes e valores do senhor Onofre e da dona Marina.

A toda minha família e em especial ao meu avô Elias Mansur Mauad e minha querida tia Terezinha Mauad, seres agregadores que partiram para mais perto de Deus. Sinto muito a falta de estar com vocês, mas tenho certeza que essa separação não será eterna.

À família de Vânia: senhor Onofre, senhora Maria José, Giovanni com sua companheira Jaqueline e futura filha Giovanna; pelo apoio, grande amizade, respeito por minha pessoa, carinho e dedicação com Vânia e Ana. E a Carol, pelo amor e paciência aos cuidados com nossa menininha. Todos fazem parte de minha família e agradeço sempre a Deus por isso.

Ao meu orientador Prof. José Bento, pela segurança na orientação, pelo enorme conhecimento e sabedoria que muito incentivou e contribuiu para com a minha formação científica. Muito obrigado pela amizade, dedicação e pelo trabalho desenvolvido durante nosso convívio. Faço minhas as palavras da colega Cynthia: “... *impossível aqui, exprimir todo carinho, respeito, reconhecimento e gratidão.*”

À Profa. Gerluzza, minha querida coorientadora. Sempre presente, sem medir esforços para ajudar. Pessoa mais humana que já conheci. Seus valores contagiam a todos. Sou eternamente agradecido a Deus por me oferecer a

oportunidade de conviver com você. Gerluza é muito mais que tudo aqui descrito, por isso minha família sente-se honrada em tê-la, junto com o “grande amigo e atleticano eterno”, Luiz; como madrinha e padrinho do que tenho de mais precioso em minha vida, minha filha Ana Luiza Mauad.

À minha duplinha Cynthia. Coleguinha não somente do doutorado, mas de vida. Itaúna novamente presente. Cynthia e Frank, além de pais dos futuros campeões mundiais de Tennis, são pessoas formidáveis; carregadas de bons valores e virtudes. Obrigado pela amizade. Obrigado pelo compromisso. Obrigado pelo apoio. Contem sempre comigo.

A senhora Marlene, esposa do prof. José Bento, pelo carinho, simpatia e alegria em nos receber em sua casa.

Ao meu grande amigo, irmão camarada, o atleticano Luiz Bertoldo; verdadeiro nos valores. A afinidade de nossa amizade vem da energia positiva de sua alma. Aprendo muito com você. Obrigado por tudo colega.

Aos colegas do Departamento de Morfologia da UFMG, o tempo de convívio e a amizade construída com cada um me faz ter a certeza de ter valido a pena. Valeu moçada! Contem comigo no que puder ajudar.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento. Existe nesse laboratório de pesquisa algo mágico, fruto dos valores pessoais das professoras coordenadoras, Gerluza e Érika, que souberam agregar, num mesmo espaço, pessoas do bem. Durante meu crescimento profissional, passei por várias instituições e nunca vivi algo assim. Somos uma equipe, não competimos uns com os outros e sim colaboramos! Ficamos felizes com o sucesso de cada um e apoiamos uns aos outros nos momentos difíceis. Nesse laboratório, sabe-se agregar os bons e não deixar os maus interferirem nos valores fundamentais do grupo. Profa. Gerluza, profa. Érika, Ígor Reis, Luiz Bertoldo, Matheus Henrique, Juliano Albergaria, Íria Dias dos Santos, Cris Sousa, Cris Toledo, Cynthia Lopes Ferreira, Júlia Meireles Nogueira, Rayan Silva de Paula, Aline Fagundes Martins, Aline Copola, Samira Santos, Bruno Bertassoli, Manu Silva, Carolina Pinhol, Wenderson Junior, Sérgio Antonucci, Guilherme Leandro Loureiro e Chico, somos uma irmandade com elos fortes em sabedoria e inteligência.

Ao técnico dos técnicos: Chico! Sempre presente com sua alegria contagiante. Companheiro pra todas as horas. Valeu camarada!

Aos professores. Todos contribuíram de alguma forma. Agradeço especialmente aos professores mais presentes na minha formação de cientista, que, em alguns momentos, com intelecto, sabedoria e principalmente o lado humano, construíram esse processo. José Bento Alves, Gerluza A. Borges Silva, Alfredo Goes, Hélio Chiarini-Garcia, José Carlos Nogueira, Gregory Thomas Kitten, Aristóbolo Mendes da Silva, Annamaria Ravara Vago, Érika Cristina Jorge, Fernanda Radicchi, Luiz Renato de França, José Dias Correa, Gleydes Gambogi Parreira, Karin Birgit Böttger, Cleida Aparecida de Oliveira, Denise Carmona Machado, Gustavo Menezes, Luciana Andrade, Cláudia Rocha Carvalho, Walderez Ornelas Dutra e Ângelo Machado, eternamente agradecido a todos.

Ao diretor Tomaz Aroldo da Mota Santos e funcionários do ICB.UFMG, especialmente a secretária Sibebe, aos coordenadores do departamento de Morfologia e ao pró-reitor Ricardo Santiago Gomes, pelo apoio institucional.

Aos coautores da Universidade de Uberaba, pela disponibilidade e colaboração nesse trabalho, meu muito obrigado.

Aos professores da banca de qualificação: José Dias Correa, Peterson A. de Oliveira Dutra e Frank Ferreira Silveira, pelo tempo desprendido e massa intelectual, no esforço de lapidar esse trabalho.

Aos colegas professores e alunos dos cursos de especialização em Periodontia da PUCMinas e do CEO-IPSEMG, sempre com o apoio e estímulo fundamental, no prosseguir.

Aos pacientes do dia a dia. A convicção de estar procurando sempre as melhores alternativas de tratamento, frente a todas nossas limitações humanas, é um dos pilares pela busca do conhecimento. A ciência aqui relatada, antes de tudo, é para os outros seres humanos que precisam e procuram-nos por ajuda.

Ao Clube Atletico Mineiro, pela alegria nas vitórias. Não pelo futebol em si, mas por sua energia sinergista que credibilita fé na esperança futura. Eu acredito! Galo forte! Campeão da Copa Libertadores da América em 2013.

Aos amigos de vida, cúmplices em todas as etapas e processos da vida. E a todos que se fizeram presentes, em algum momento nesta caminhada.

Muito obrigado!

*“A partir de uma gota de água, um pensador lógico poderá inferir a possibilidade de um Atlântico ou de um Niágara, sem ter jamais visto um ou outro ou, sequer, ouvido falar a respeito. Assim, a vida é uma grande cadeia, cuja natureza pode ser depreendida a partir do simples confronto com um de seus elos....”.*

Arthur Conan Doyle

*"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."*

Louis Pasteur



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1. Biologia do processo de reparo ósseo-alveolar.....	21
2.2. Fatores de crescimento (GF).....	23
2.2.1. <i>Fator de Crescimento Semelhante a Insulina (IGF)</i> .....	25
2.2.2. <i>Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF)</i> .....	26
2.2.3. <i>Associação de fatores de crescimento</i> .....	28
2.3. Moléculas indicadoras de reparo ósseo.....	29
2.3.1. <i>Osteocalcina</i> .....	29
2.3.2. <i>Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)</i> .....	30
2.4. Sistemas carreadores de moléculas biologicamente ativas.....	33
2.4.1. <i>Lipossomas</i> .....	34
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. OBJETIVOS.....	40
4.1. Objetivo geral.....	40
4.2. Objetivos específicos.....	40
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.1. Preparação de IGF-I e PDGF-BB em lipossomas.....	41
5.2. Animais.....	42
5.3. Procedimentos cirúrgicos e grupos experimentais.....	42
5.4. Métodos histológicos.....	45
5.5. Métodos morfométricos .....	46
5.5.1. <i>Avaliação do preenchimento ósseo</i> .....	46

5.5.2. Avaliação dos vasos sanguíneos.....	46
5.6. Método imunoistoquímico.....	47
5.6.1. Quantificação da expressão imunoistoquímica.....	49
5.7. Análise estatística.....	49
6. RESULTADOS.....	50
6.1. Análises histológicas e morfométricas.....	50
6.2. Análise imunoistoquímica.....	56
7. DISCUSSÃO.....	60
8. CONCLUSÕES.....	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXO I PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (2009)	83
ANEXO II ARTIGO PUBLICADO NA BRAZILIAN DENTAL JOURNAL (2013)	85
ANEXO III PEDIDO DE PATENTE: MESA CIRÚRGICA PARA PEQUENOS ANIMAIS (2011).	93
ANEXO VI ARTIGO PUBLICADO NO VII CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHERIA MECÂNICA (2012)	96

## Lista de Ilustrações

- Figura 01 Desenho esquemático e simplificado do método de preparação de lipossomas.
- Figura 02 Mesa cirúrgica e acesso ao campo operatório.
- Figura 03 Seringa HAMILTON COMPANY®
- Figura 04 Análise de formação óssea.
- Figura 05 Contagem de vasos sanguíneos.
- Figura 06 Imagem panorâmica de alvéolo da raiz distal do segundo molar superior. Regiões apical, média e cervical. HE. Barra = 200  $\mu\text{m}$ .
- Figura 7a Amostra representativa dos alvéolos dos grupos BC, L, P, IP e PDP, 3 dias após procedimento cirúrgico. HE. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- Figura 7b Amostra representativa dos grupos IL, PDL e PDIL, 3 dias após procedimento cirúrgico. HE. Barra = 150  $\mu\text{m}$
- Figura 8a Amostra representativa dos alvéolos dos grupos BC, L, P, IP e PDP, 7 dias após procedimento cirúrgico. HE. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .
- Figura 8b Amostra representativa dos alvéolos dos grupos PDL, IL e PDIL, 7 dias após procedimento cirúrgico. HE. Barra = 80  $\mu\text{m}$ .
- Figura 9a Amostra representativa dos alvéolos dos grupos BC, L, P, PDP e IP aos 14 dias. HE. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- Figura 9b Amostra representativa dos alvéolos dos grupos BC, L, P, PDP e IP aos 14 dias. HE. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- Figura 10a Amostra representativa da imunoreatividade do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo (BC), tratados com L, P, IP e PDP aos 7 dias após procedimento cirúrgico. Barra = 80  $\mu\text{m}$ .
- Figura 10b Amostra representativa da imunoreatividade do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo (BC), tratados com IL, PDL e PDIL, aos 7 dias após procedimento cirúrgico. Barra = 80  $\mu\text{m}$ .
- Figura 11 Amostra representativa do controle negativo para imunohistoquímica. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- Figura 12a Amostra representativa da imunoreatividade para a osteocalcina

em alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo (BC), tratados com L, P, IP, aos 7 dias após procedimento cirúrgico, em osteoblastos e fibroblastos. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

Figura 12b Amostra representativa da imunoreatividade para a osteocalcina em alvéolos tratados com IL, PDL e PDIL, aos 7 dias após procedimento cirúrgico, em osteoblastos e fibroblastos. Barra = 80  $\mu\text{m}$ .

### **Lista de Tabelas**

- |           |  |
|-----------|--|
| Tabela I  | Distribuição dos Grupos Experimentais.       |
| Tabela II | Níveis de marcação para VEGF e Osteocalcina. |

### **Lista de Gráficos**

- |             |   |
|-------------|---|
| Gráfico I   | Porcentagem de trabéculas ósseas formadas aos 7 dias  |
| Gráfico II  | Porcentagem de trabéculas ósseas formadas aos 14 dias |
| Gráfico III | Porcentagem de trabéculas ósseas formadas aos 21 dias |
| Gráfico IV  | Número de vasos sanguíneos formadas aos 7 dias.       |

## Lista de Abreviaturas

Ang	Angiopietinas
BC	Coágulo sanguíneo (Blood Clot)
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
BSA	Albumina de soro bovino
CEBIO	Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas
CETEA	Comitê Ética em Experimentação Animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPC	Dipalmitoil fosfatidil colina
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - Ácido etileno diamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> - teste imunoenzimático.
FGF	Fator de Crescimento Fibroblasto
FN	Fibronectina
FNT10%	Formalina neutra tamponada a 10%
GFs	<i>Growth factors</i> - Fatores de Crescimento
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina-eosina
HIF	Fator de transcrição hipóxia-induzida
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL	Grupo experimental: IGF-I + lipossoma
IP	Grupo experimental: IGF-I + PBS
L	Lipossoma
LPC	Lisofosfatidil colina
MEC	Matriz extracelular
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MSCs	Células mesenquimais
OC	Osteocalcina
P	PBS - <i>Phosphate buffered saline</i> - Solução salina

	tamponada
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> - Solução salina tamponada
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDIL	Grupo experimental: PDGF-BB + IGF-I + lipossoma
PL	Células do ligamento periodontal
PDL	Grupo experimental: PDGF-BB + lipossoma
PDP	Grupo experimental: PDGF-BB + PBS
PRP	Plasma rico em plaquetas
RTG	Regeneração tecidual guiada
rhVEGF	VEGF recombinante humano
TBS	Tris-hcl
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformador - beta
TPN-470	Inibidor angiogênico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR-1 (Flt-1)	Receptor-1 de superfície de células endoteliais
VEGFR-2 (KDR/Flk-1),	Receptor-2 de superfície de células endoteliais

## RESUMO

Os fatores de crescimento, IGF e PDGF, apresentam funções biológicas importantes no metabolismo ósseo, com ação direta, tanto no crescimento, como na diferenciação celular. Dados da literatura revelam que a enxertia dessas moléculas exógenas, *in vivo*, é capaz de acelerar o processo do reparo ósseo. A utilização dos lipossomas, com suas propriedades carreadoras e de liberação gradual de moléculas, pode aumentar o tempo de exposição dos fatores de crescimento nos sítios enxertados. Este trabalho avaliou o potencial de formação óssea do fator de crescimento derivado de plaquetas na isoforma BB (PDGF-BB), fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), e a mistura PDGF-BB/IGF-I administrada em lipossomas comparando com tampão fosfato salino (PBS), no processo de cicatrização de alvéolos dentários de ratos. 112 ratos Wistar foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos de 16 animais cada e foram avaliados aos 3, 7, 14 e 21 dias após a extração dos segundos molares maxilares. Os alvéolos esquerdos foram tratados com PBS (P), lipossomas vazios (L), IGF-I em PBS (IP), IGF-I em lipossomas (IL), PDGF-BB em PBS (PDP), PDGF-BB em lipossomas (PDL) e ambos os fatores de crescimento (GFs) em associação dentro de lipossomas (PDIL). Os alvéolos direitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo (BC). As análises histomorfométrica e histológica foram utilizadas para avaliar a formação de novo osso e vasos sanguíneos. Imunoistoquímica foi realizada para avaliar a expressão de osteocalcina e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) durante o reparo ósseo. Os dados foram testados estatisticamente utilizando o teste de Tukey em acordo com análise de Dunn e o teste Mann-Whitney U seguido pela análise de um passo de Kruskal-Wallis. Os

resultados foram considerados significantes quando  $p < 0.05$ . Uma percentagem altamente significativa de osso trabecular e alto número de vasos sanguíneos foram observados nos grupos IL, PDL e PDIL ( $p < 0,05$ ). Todavia, esses grupos lipossoma-GF tiveram resultados similares estatisticamente. Ensaio de imunistoquímica inicialmente detectaram a expressão de osteocalcina e VEGF aos 3 dias, seguida por um pico aos 7 dias. Níveis mais baixos de imunorreatividade foram observados em BC, L, P, PI e PDP quando comparados com os grupos IL, PDL e PDIL ( $p < 0,05$ ). Os resultados sugerem que GFs carregados por lipossomas, na forma isolada ou em combinação, aceleram o processo de cicatrização em alvéolos dentários de rato. A expressão diferencial, dos marcadores osteogênicos VEGF e osteocalcina nas fases iniciais de cicatrização óssea, confirma esses achados.

**Palavras-chave:** fator de crescimento; PDGF; IGF; lipossoma, reparo ósseo.



## ABSTRACT

Growth Factors, IGF and PDGF, showed important biological functions on metabolism osseous, with direct action, both on the growth, how on the differentiation of the cells. Data from literature showed that the graft of these molecules exogenous, *in vivo*, is able to enhance the bone repair process. The utilization of the liposome, with its proprieties of the carrier and gradual liberation of molecules, can increase the time of the exposition of growth factors on grafts places. This work evaluated the bone-forming potential of the platelet-derived growth factor isoform BB (PDGF-BB), insulin-like growth factor I (IGF-I), and mixed PDGF-BB/IGF-I delivered in liposomes compared with phosphate buffered saline (PBS), in the healing process of rat tooth sockets. One hundred and twelve Wistar rats were randomized into 7 groups of 16 animals each and were evaluated at 3, 7, 14 and 21 days after extraction of the maxillary second molars. The left sockets were treated with PBS (P), empty liposome (L), IGF-I in PBS (IP), IGF-I in liposome (IL), PDGF-BB in PBS (PDP), PDGF-BB in liposome (PDL) and both growth factors (GFs) together within liposomes (PDIL). The right sockets were filled with blood clot (BC). Histological and histomorphometric analyses were used to evaluate the formation of new bone and blood vessels. Immunohistochemistry was performed to evaluate the expression of osteocalcin and vascular endothelial growth factor (VEGF) during bone repair. Data were tested statistically using a Tukey's test according to a Dunn's analysis and Mann-Whitney U test followed by Kruskal-Wallis one-way analysis. Results were considered significant when  $p < 0.05$ . A significantly higher percentage of bone trabeculae and a higher number of blood vessels were observed in the IL, PDL and PDIL groups ( $p < 0.05$ ).

However, these GF-liposome groups had statistically similar results. Immunohistochemical assays first detected osteocalcin and VEGF expression at 3 days followed by a peak at 7 days. Lower immunoreactivity levels were observed in the BC, L, P, IP and PDP groups compared with the IL, PDL and PDIL groups ( $p < 0.05$ ). The results suggest that GFs carried by liposomes, either in isolated or mixed forms, enhanced the healing process in rat tooth sockets. The differential expression of the osteogenic markers VEGF and osteocalcin in the early phases of bone healing support these findings.

**Key Words:** growth factor, PDGF, IGF, liposome, bone repair.

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal, o trauma de face, patologias de origem endodôntica, tumores benignos ou malignos e a ausência do dente por um período prolongado podem acarretar um processo de reabsorção óssea, de moderada a severa, dos ossos maxilares. A recuperação da estrutura óssea perdida pode demandar a necessidade da realização de cirurgias de enxertia óssea (AROSARENA & COLLINS, 2005; BODIC *et al.*, 2005; IZUKA *et al.*, 2005; HALLMAN & THOR, 2008). Há tempos, o tecido ósseo de origem autógena, com suas propriedades osteoindutivas e osteocondutivas, vem sendo considerado o material “*gold standart*” (padrão ouro) de enxertia nas cirurgias ósseas reconstrutivas (BURCHARDT, 1983). Todavia, sua escolha apresenta como desvantagens a viabilidade da área doadora, morbidade e imprevisibilidade no processo de reabsorção do enxerto (JOHANSSON *et al.*, 2001a, 2001b; NKENKE *et al.*, 2001; SPRINGER *et al.*, 2004). Recentes avanços em biotecnologia têm promovido à clínica cirúrgico-odontológica o acesso a uma diversidade de substitutos ósseos, o que vem viabilizando, em alguns casos, a inserção precoce de implantes bucais. Contudo, o biomaterial ideal para enxertia óssea ainda não foi identificado. Carreadores de fatores de crescimento são considerados biomateriais promissores à aceleração do reparo ósseo, porém existem obstáculos como o alto custo de produção, além dos resultados pouco explorados de seu uso (ESPOSITO *et al.*, 2006; HALLMAN & THOR, 2008; CHEN, ZHANG & WU, 2010).

O tecido ósseo apresenta-se em constante remodelação. Alguns agentes importantes para o metabolismo celular-ósseo têm sido identificados, tais como: o hormônio tireoidiano, calcitonina, testosterona, esteroides, prostaglandinas,

endotoxinas, fatores ativadores de osteoclastos, fatores de crescimento e uma variedade de drogas que interagem com o transporte de mineral, enzimas, ou na síntese de proteínas (DAVIDOVITCH, 1979; HILL, 1998).

Os fatores críticos para a ossificação incluem a presença de colágeno, fosfato e a regulação de inibidores de nucleação. Essa regulação pode ocorrer pela via da remoção enzimática de pirofosfato, ou modulação de outros inibidores. Tecidos que contêm a combinação desses três fatores apresentam capacidade de mineralização da MEC (matriz extracelular), todavia tecidos que apresentam apenas duas combinações, por exemplo, produzem tecidos moles, onde fibroblastos produzem colágeno, observando assim, falha na mineralização. No entanto, o processo de ossificação, também, inclui a estimulação por fatores de crescimento e a modulação de antagonistas e outros componentes da MEC (ALLORI *et al.*, 2008).

Os fatores de crescimento podem ativar ou regular uma grande variedade de funções celulares. Eles estimulam diferenciação, proliferação, migração, adesão celular e expressão de genes. Possuem efeitos sobre as células da mesma classe (fatores autócrinos) ou sobre as células de outra classe dentro do tecido (fatores parácrinos), e estão presentes na circulação, podendo agir como reguladores sistêmicos do metabolismo esquelético ou localmente. (LUGINBUEHL *et al.*, 2004; KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006).

No tecido ósseo, as terapias com os GFs têm sido aplicadas na indução da formação óssea em defeitos e fraturas e, também, em implantes metálicos (BESSHO *et al.*, 1999; RAMOSHEBI *et al.*, 2002; SCHLIEPHAKE 2002; KLOEN *et al.*, 2003; MCKAY, PECKHAM & BADURA 2007).

Considerando que, no osso, as células são expostas a diversos GFs, de modo simultâneo; de modo ideal qualquer terapia deveria envolver uma mistura dessas proteínas, simulando o processo de cicatrização do tecido ósseo (CHEIFETZ *et al.*, 1996; ROETHY *et al.*, 2001; RAICHE & PULEO 2004; AROSARENA & PULEO 2007). Fatores de crescimento estão inseridos na via central da transferência de informação entre células e a matriz extracelular (CHEN, ZHANG & WU, 2010).

Uma indução celular efetiva depende de diferentes parâmetros: (a) concentração dos fatores de crescimento no meio extracelular; (b) tempo e duração da exposição; (c) tipo de célula alvo e seu estado de diferenciação; (d) expressão de receptores específicos e (e) a presença de outros Fatores de Crescimento que podem promover efeito sinergista ou antagonista (GIANNOBILE *et al.*, 1997; SCHMIDMAIER *et al.*, 2003; CHAUDHARY *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005).

A disponibilização local de fatores de crescimento no defeito ósseo pode interferir o reparo ósseo. A utilização de um sistema capaz de liberar o composto terapêutico de forma gradual e constante pode favorecer o processo de cicatrização ósseo-alveolar. Os lipossomos têm sido os carreadores de escolha como veículo de distribuição para compostos biologicamente ativos. São partículas esférico-microscópicas, cujas membranas, desenvolvidas com uma ou mais bicamadas lipídicas, encapsulam uma fração de solvente que ficam suspensos em seu interior. Em comparação com outros carreadores, os lipossomos têm algumas vantagens, como degradabilidade biológica e segurança toxicológica e imunológica (LASIC, 1993, 1998; ALVES *et al.* 2009).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Biologia do reparo ósseo-alveolar

Após os procedimentos de exodontia, ou seja, remoção dos elementos dentários, as cavidades ósseas remanescentes, alvéolos dentários, são naturalmente preenchidas pelo coágulo sanguíneo. O reparo tecidual inicia-se com a hemostasia, responsável por bloquear a perda de sangue através de vasos rompidos (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000).

Este é o primeiro passo de uma cascata de eventos celulares que devem culminar na reposição tecidual, com preenchimento dos alvéolos com osso neoformado. (YUGOSHI *et al.*, 2002). A formação da rede de fibrina auxilia inicialmente o influxo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, característicos da resposta inflamatória aguda (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000), bem como possibilita a invasão de fibroblastos e células endoteliais, presentes no ligamento periodontal remanescente (YUGOSHI *et al.*, 2002). O ligamento periodontal contém uma mistura de populações celulares incluindo progenitores para osteoblastos (DEVLIN & SLOAN, 2002), cementoblastos e fibroblastos, essenciais para remodelação e formação óssea inicial em processos de cicatrização alveolar (LEKIC *et al.*, 1997). Células osteoprogenitoras podem ser derivadas também da medula óssea (DEVLIN & SLOAN, 2002) e periósteo (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000; RASUBALA *et al.*, 2004).

Macrófagos e fibroblastos imaturos parecem ser atraídos para áreas com baixa concentração de oxigênio e altos níveis de lactato, presentes na ferida alveolar em consequência do metabolismo das células inflamatórias (LALANI *et al.*, 2005). Macrófagos liberam um fator de crescimento chamado fator

angiogênico dependente de macrófago, quimiotático para células endoteliais. Estas secretam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que apresenta importantes funções na angiogênese e vasculogênese, essenciais nos processos de cicatrização de feridas (LALANI *et al.*, 2005). Novos fibroblastos, produzidos por diferenciação de células mesenquimais e mitoses de fibroblastos pré-existentes, sintetizam uma delicada matriz de colágeno que, junto com os capilares neoformados, caracterizam o tecido de granulação (YUGOSHI *et al.*, 2002). O coágulo é progressivamente reabsorvido quando é invadido por fibroblastos derivados do ligamento periodontal, que proliferam ativamente e migram em direção a ele, formando um tecido conjuntivo imaturo. Posteriormente, diferenciam-se em osteoblastos responsáveis por produzir novo tecido ósseo durante a cicatrização alveolar (TEÓFILO *et al.*, 2001). As fibras colágenas, inicialmente depositadas, formam uma trama preliminar na qual ocorre a deposição de osso neoformado.

A diferenciação de células precursoras mesenquimais, diretamente em osteoblastos, como observado no desenvolvimento dos ossos faciais, representa o processo de ossificação intramembranosa; enquanto o processo de ossificação sobre um modelo de cartilagem intermediária, presente no desenvolvimento de ossos longos, caracteriza o processo de ossificação endocondral (STREET *et al.*, 2002; KANYAMA *et al.*, 2003). No alvéolo dentário, observa-se apenas ossificação intramembranosa (KANYAMA *et al.*, 2003), sem formação de cartilagem ou presença de condrócitos (SHYNG *et al.*, 1999).

A cicatrização normal do osso, após injúrias, é caracterizada por ações integradas de diferentes células e pode ser dividida em fases sequenciais: de inflamação, migração, diferenciação e proliferação de células osteogênicas

(SASAKI & WATANABE, 1995; SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000), síntese de matriz extracelular (MEC), mineralização do osteoide, maturação e remodelação óssea (LALANI *et al.*, 2005).

Osteoclastos atuam na remodelação óssea das margens do alvéolo e dos septos inter-radiculares remanescentes, presentes após a extração de dentes multiradiculares, em humanos (LINDHE, 2005). Por fim, os eventos de cicatrização alveolar culminam no preenchimento do alvéolo com tecido ósseo trabecular (DEVLIN & SLOAN, 2002). O preenchimento do alvéolo com trabéculas ósseas espessas e bem definidas, vinte e quatro dias após a extração, praticamente definia o estágio final do processo de cicatrização, em ratos (ZIED *et al.*, 2005). Apesar de estar completamente preenchida por trabéculas ósseas, a densidade óssea alveolar máxima foi alcançada aparentemente no trigésimo dia pós-operatório, em ratos (LAMANO CARVALHO *et al.*, 1997).

A osteogênese pode promover a formação de osso: “woven” (WB) ou lamelar. A regulação molecular, desses dois processos, é pouco conhecida. (MCKENZIE & SILVA, 2011). No esqueleto pós-natal, WB é formado sobre condições que requerem rápida deposição mineral como uma distração osteogênica ou reparo de fratura por trauma. Histologicamente, WB é caracterizado por uma pobre organização, baixa densidade mineral e alta celularidade (JOHNSON *et al.*, 1963; TAMI *et al.*, 2003), indicativa de reparo (MCKENZIE & SILVA, 2011).

## **2.2. Fatores de crescimento**

Fatores de crescimento são proteínas que servem como agentes de sinalização para as células e influenciam funções como divisão celular, síntese de



matriz e diferenciação tecidual. Podem, portanto, desempenhar importante papel na formação óssea e de cartilagem, cicatrização de fraturas e reparo de tecidos músculo-esqueléticos (LIEBERMAN *et al.*, 2002). Alguns fatores de crescimento, tais como fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), proteína morfogenética óssea (BMP), e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são expressos de modo temporal nos processos de cicatrização tecidual e, provavelmente, devem estar envolvidos na sinalização, controle e indução durante o processo de reparo ósseo (STREET *et al.*, 2002; ALLORI *et al.*, 2008; DEVESCOVI *et al.*, 2008).

Os Fatores de Crescimento (GF) são uma classe de proteínas sinalizadoras que, apesar de estarem presentes em baixas concentrações no plasma e na matriz óssea, apresentam funções biológicas importantes no metabolismo celular-ósseo, com ação direta, tanto no crescimento como na diferenciação, em determinadas linhagens celulares. Essas proteínas se ligam a receptores moleculares, de células de mamíferos, e induzem uma “*cascata orquestrada*” de reações citoplasmáticas, culminando no aumento da transcrição de mRNA e liberação protéica extra e intracelular (TRIPPEL, 1997; KOHNO *et al.*, 2003; HALLMAN & THOR, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008; DEVESCOVI *et al.*, 2008).

Moléculas sinalizadoras, para o reparo ósseo, incluem hormônios, citocinas e Fatores de Crescimento. Secretadas endogenamente, por células locais, ou absorvidas, podem agir de forma autócrina, parácrina e endócrina. Essas moléculas são dose/tempo dependentes e por meio de uma variedade de

mecanismos, permitem serem estimuladas, inibidas, ou mesmo, uma mistura de atividades (ALLORI *et al.*, 2008).

Dentre os fatores de crescimento presentes no processo biológico do reparo ósseo, para nosso estudo, foram selecionados IGF-I e PDGF-BB.

### **2.2.1 Fator de Crescimento semelhante à insulina (IGF)**

O Fator de Crescimento semelhante à Insulina (IGF) é um polipeptídeo de cadeia-simples aminoácida produzido predominantemente no fígado, mas também, em outros tecidos como, por exemplo, muscular e ósseo (ALLORI *et al.* 2008).

IGF-I e IGF-II são codificados por dois diferentes genes e expressos diferencialmente em tecidos diversos. A estrutura de ambos IGFs é homóloga para a pró-insulina humana. IGF é constitutivamente produzido em muitos tecidos, principalmente no fígado; e, também, no rim, no coração, pulmão, tecidos adiposo e glandulares. IGF-I é também produzido por condroblasto, fibroblastos e osteoblastos. Os IGFs demonstram alguma afinidade por receptores insulínicos. Sua bioatividade no tecido ósseo é modulada pelas proteínas de ligação para IGF, o qual é regulado pelo hormônio do crescimento e outros. Além disso, IGF-I estimula a formação óssea, por induzir a proliferação celular, diferenciação e biossíntese de colágeno tipo I. Sugere-se que IGF-I seja mais mitogênico que IGF-II (HOCK *et al.*, 1988; OHLSSON *et al.*, 1998). Em pesquisas periodontais, foi demonstrado que o IGF-I é quimiotático e mitogênico para células do ligamento periodontal (PDL) (MATSUDA *et al.*, 1992). Spencer, Liu, Si e Howard (1991) demonstraram, *in vivo*, que o IGF-I estimula ou facilita a mitose e diferenciação de

células osteoprogenitoras, aumentando o número de osteoblastos maduros de ratos.

Os níveis circulantes de IGF-I são predominantemente determinados pelo Hormônio do crescimento, pela secreção local de osteoblastos estimulados pelo estrógeno, paratormônio, cortisol, estímulos mecânicos, e outros fatores (LEAN *et al.*, 1995; OHLSSON *et al.*, 1998). O IGF apresenta ação parácrina e autócrina com alta ligação ao receptor para IGF-I (IGFR), uma tirosina-kinase ativada, sinalizando a proliferação e crescimento celular. Existem poucos estudos na literatura a respeito da administração terapêutica sobre IGFs. A administração sistêmica de IGF-I tem mostrado restaurar o crescimento ósseo em pacientes com deficiência do hormônio do crescimento (LARON *et al.*, 1992; RANKE *et al.*, 1995). ALLORI *et al.* (2008) relataram que o IGF-I apresenta-se um interessante papel na formação óssea, todavia sua dose ideal e método de aplicação/distribuição permanecem desconhecidos, sendo necessários maiores investigações.

### **2.2.2 Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF)**

O Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) é um potente mitógeno de células mesenquimais vindas da camada periosteal. PDGF é sintetizado por plaquetas, monócitos, macrófagos, células endoteliais e osteoblastos. O PDGF é composto por duas cadeias polipeptídicas (A e B), e essas cadeias formam um heterodímero ou homodímero. Dos três fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGFs: AA, BB ou AB), o PDGF BB é biologicamente mais potente (LIEBERMAN *et al.*, 2002).

PDGF funciona como fator de crescimento local autócrino e parácrino. PDGF liga em receptores altamente específicos expressados nas superfícies de vários tipos celulares (HELDIN *et al*, 1981), incluindo fibroblastos, células da glia, células vasculares do músculo liso. PDGF é um poderoso promotor de migração e proliferação celular. Tem sido mostrado que todas as suas isoformas induzem à proliferação de células do ligamento periodontal (PL) *in vitro* (DENNISON *et al*, 1994). PDGF é também quimiotático para células do PL e estimula a síntese de colágeno e hialuronato (MATSUDA *et al*, 1992; BARTOLD, 1993). É também relatado que PDGF promove síntese de DNA e quimiotaxia em cultura óssea orgânica (GRAVES *et al*, 1989; HOCK & CANALIS, 1994), mas tem baixa modulação nas atividades da fosfatase alcalina e da osteopontina, em células como osteoblastos, *in vitro* (GIANNOBILE *et al.*, 1994b).

PDGF é atualmente utilizado em sua forma recombinante para o tratamento de defeitos ósseos periodontais (GEM21STM; Biomimetic Therapeutics, Franklin, TN) e estudos pré-clínicos têm demonstrado que ele apresenta efeitos mitogênicos em células osteoprogenitoras, promovendo angiogêneses e estimulando cicatrização de fraturas e regeneração óssea (HOLLINGER *et al.*, 2008). O PDGF é expresso durante uma cicatrização de uma fratura em pacientes saudáveis, todavia sua deficiência é demonstrada na cicatrização de pacientes diabéticos (GRAHAM *et al.*, 2009).

Estudos clínicos preliminares de PDGF para a regeneração óssea têm demonstrado resultados promissores e avanços nas provas clínicas (HOLLINGER *et al.*, 2008). Apesar do PDGF apresentar resultados pré-clínicos positivos, há uma carência de evidências clínicas para o seu uso na regeneração óssea (NAUTH *et al.*, 2011).

### 2.2.3 Associações de fatores de crescimento

No tecido ósseo, as células são expostas a diversos GFs de modo simultâneo. Idealmente, qualquer terapia deveria envolver uma mistura dessas proteínas, com similaridades no processo de cicatrização do tecido ósseo (CHEIFETZ *et al.*, 1996; CHEN, ZHANG & WU, 2010).

Schliephake, em 2002, numa revisão de literatura de 231 artigos científicos, relatou que a combinação dos fatores de crescimento IGF-I + PDGF foi efetiva na promoção da regeneração óssea, em defeitos alveolares, ao redor de implantes bucais, após a perda óssea por Doença Perimplantar.

Tem sido mostrado que aplicações tópicas da combinação de PDGF associado ao IGF-I ou PDGF associado ao dexametasona promoveram regeneração de tecido periodontal em primatas. (RUTHERFORD *et al.*, 1992; GIANNOBILE *et al.*, 1994a, 1996). Resultados expressivos vêm sendo demonstrados utilizando a combinação de VEGF e BMP (ALLORI *et al.* 2008).

Bernstein, Mayr & Hube (2010) avaliaram a associação dos fatores de crescimento TGF- $\beta$  e IGF-I, carreados por uma membrana de ácido polilático, na distração osteogênica, de 28 carneiros Merinos. Concluíram que a aplicação local desses fatores de crescimento carreados por uma membrana degradável acelera a cicatrização óssea, resultando em tecido ósseo.

Lamberg *et al.* (2009) compararam o efeito da administração local da associação de TGF $\beta$  -1 e IGF-I, carreados por uma membrana biodegradável de ácido polilático, com o enxerto de hidroxiapatita pura, no recobrimento de implantes osseointegráveis, em 10 cães. O tempo de sacrifício foi de 4 semanas, e os implantes avaliados pela resistência mecânica e histomorfometria. Os

resultados não mostraram diferença no teste mecânico, porém uma neoformação óssea maior no grupo tratado com os fatores de crescimento.

Levi *et al.* (2010) pesquisaram a hipótese de que somente em associação, os fatores de crescimento IGF e PDGF poderiam estimular a osteogênese. Os experimentos foram realizados em culturas de células-tronco derivadas do estroma de adipócitos. Concluíram que, dentro da metodologia aplicada, a associação dessas duas biomoléculas foi essencial para o estímulo da formação óssea.

### **2.3. Moléculas indicadoras do reparo ósseo**

Além dos fatores de crescimento, a expressão de algumas macromoléculas da MEC como colágeno, fibronectina, osteopontina, osteocalcina, osteonectina, têm sido referenciadas como aspecto indicativo do processo de reparo ósseo (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000; MENDES *et al.*, 2008). Dentre esses, o VEGF e a osteocalcina têm sido bastante referenciados (ALLORI *et al.*, 2008; CHEN, ZHANG & WU, 2010)

#### **2.3.1. Osteocalcina**

A Osteocalcina (OC) é a proteína não colágena mais abundante no osso e dentina, constituindo 15% das proteínas da matriz óssea não-colágena (PRICE *et al.* 1980). Possui 49 aminoácidos e, embora sua função específica não seja conhecida, sabe-se que é sintetizada predominantemente pelos osteoblastos diferenciados, incorporada à matriz óssea extracelular e relacionada à mineralização da matriz osteoide. Seu gene, codificado no cromossoma 1 (1q25-q31) sofre influência direta da 1,25 dihidroxivitamina D, que estimula sua síntese.

A Vitamina K1 é um cofator essencial para que ocorra g-carboxilação pós-traducional do resíduo glutamyl, originando os resíduos g-carboxiglutamyl. Possui em sua estrutura três ácidos glutâmicos que lhe conferem a capacidade de ligar-se ao cálcio (LEE, HODGES & EASTELL, 2000) e isto pode ser importante no processo de mineralização da matriz óssea já formada.

Uma fração (10 a 40%) da OC intacta recém sintetizada é liberada na circulação, possuindo uma meia-vida curta, pois é rapidamente hidrolisada no fígado e rim por metaloproteases.

ELISA e outros ensaios de imunohistoquímica podem ser utilizados para detecção da osteocalcina (CREMERS & GARNERO, 2006). No soro, a osteocalcina é rapidamente degradada, resultando em fragmentos que podem ser detectados por ensaios baseados em anticorpos. (RIGGS, TSAI & MANN, 1986; GARNERO *et al.*, 1994). A osteocalcina é considerada um excelente marcador para a formação óssea (CIVITELLI, VILLAREAL & NAPOLI, 2009).

### **2.3.2. Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)**

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) está envolvido na angiogênese, relacionado ao aumento da extensão de vasos pré-existentes e na sua neoformação. Sua estrutura e função estão bem caracterizadas e revisadas pela literatura (ALLORI *et al.*, 2008). A família VEGF consiste de homodímeros glicosilados, com 121 a 206 aminoácidos cada, produzidos de um ligamento alternativo de um simples gene *Vegf* no cromossomo 6 humano (ERIKSSON & ALITALO, 1999).

Sua ligação ocorre em dois receptores de superfície de células endoteliais: VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR/Flk-1), ambos tirosina kinase. Seu

mecanismo de ação é mediado com a ligação do VEGFR-1 ao VEGFR-2 (SHIBUYA, 2006).

VEGF aumenta a quimiotaxia e mitogênese de células endoteliais e células progenitoras endoteliais, promovendo neoformação vascular. Esta também relacionada ao aumento da vasodilatação e permeabilidade vascular, aumentando o fluxo sanguíneo e permitindo a distribuição de vários fatores de crescimento, células do sistema imune e células-tronco circulantes. No tecido ósseo, osteoblastos secretam VEGF e expressam seus receptores (DECKERS *et al.*, 2000). Todavia, osteoclastos também expressam receptores para VEGF, sendo que o VEGF recruta quimiotaticamente osteoclastos para as zonas de remodelamento (TOMBRAN-TINK & BARNSTABLE, 2004). Embora o VEGF não esteja relacionado diretamente ao efeito osteogênico, ele apresenta capacidade de promover a diferenciação osteoblástica, além de complementar e potencializar a função osteogênica de diferentes fatores de crescimento (ECKARDT *et al.*, 2005). Muitos fatores de crescimento, como por exemplo, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), exercem sua ativação vasculogênica via produção derivada de VEGF de osteoblastos (DECKERS *et al.*, 2002).

Angiogênese e vasculogênese são processos biológicos dependentes de um complexo esquema regulatório, ainda pouco conhecido. Angiopietinas (Ang) são proteínas angiogênicas relacionadas estruturalmente de aproximadamente 70 kD em tamanho. As Ang-1 são conhecidas em ativar o VEGF e promover a maturação vascular. Já a Ang-2 apresenta o papel de desestabilizar a membrana endotelial e favorecer a neovascularização (ASAHARA *et al.*, 1998).



VEGF é produzido por uma variedade de células como: células endoteliais, fibroblastos, condrócitos e osteoblastos. Inicialmente, em resposta à hipóxia pela via do fator de transcrição hipóxia-induzida (HIF) apresentando uma alta regulação (DERY, MICHAUD & RICHARD, 2005). Numa fratura ou osteotomia, o rompimento vascular de nutrientes libera enzimas lisossomais de partes ósseas e tecidos moles necróticos. Adicionalmente, ocorre uma vasoconstrição do periósteo e das artérias medulares resultando na formação de uma zona interfragmentada de injúria (GRUNDES & REIKERAS, 1992). Esse estímulo catalisa a formação de novos vasos sanguíneos e aumenta a permeabilidade vascular. VEGF mediando a angiogênese foi demonstrada como um requerimento essencial na indução óssea durante distração osteogênica mandibular. Animais *knock-outs* demonstram falha na formação óssea durante a embriogênese, (HAIGH *et al.*, 2000) e animais adultos tratados com um inibidor angiogênico, TPN-470, resultaram numa cicatrização óssea ineficaz ( ECKARDT *et al.*, 2003).

A literatura relata que a expressão de mRNA para VEGF pelos osteoblastos e células endoteliais, no espaço interfragmental de uma distração osteogênica, foi aumentada do 5º para o 7º dia, após a injúria (LEVY *et al.*, 1995). Cetrulo *et al.* (2005) demonstraram que uma relativa isquemia durante a ativação e consolidação das fases atrai células precursoras endoteliais. Terapeuticamente, a aplicação local do VEGF recombinante humano (VEGF<sub>rh</sub>) demonstrou um aumento de vasos sanguíneos na zona de fratura, com aumento da união óssea. (ECKARDT *et al.*, 2005). Estudos nas ciências básicas têm demonstrado que o VEGF é uma potente molécula angiogênica e osteogênica, crítica no processo de regeneração óssea. Devido ao fato que essa proteína é

frágil e de vida curta, *in vivo*, estudos pré-clínicos têm aplicado a terapia gênica por meio da aplicação terapêutica de VEGF para a regeneração óssea (ALLORI *et al.*, 2008).

#### **2.4. Sistemas carreadores de Moléculas Biologicamente Ativas**

A utilização de alguns compostos terapêuticos tem sido limitada por vários fatores, tais como: impossibilidade do aumento da sua dosagem, retenção, controle de degradação, baixa solubilidade e/ou efeitos colaterais perniciosos. Tais dificuldades têm conduzido os pesquisadores ao estudo de novos sistemas capazes de transportar um composto terapêutico até um alvo específico, aumentando seu potencial terapêutico, impedindo que este se perca durante o trajeto (SANTOS & CASTANHO, 2002; ZHANG *et al.*, 2005).

Vários tipos de carreadores têm sido utilizados; porém, poucos autores têm relatado um longo período de sustentabilidade na liberação dos Fatores de Crescimento, normalmente carreados por polímeros absorvíveis. Até o momento, todos os carreadores utilizados não preenchem as características ideais desejadas, sendo que uma indução inicial da cascata morfológica de formação óssea, seguida de rápido declínio dos sinais dos Fatores de Crescimento utilizados, pode ser, ou não, suficiente para promover a quantidade e qualidade de regeneração óssea satisfatória, nos diversos tipos de defeitos (SCHMIDMAIER *et al.*, 2001; RASCHKE *et al.*, 2002; HALLMAN & THOR, 2008)

Algumas proteínas/peptídeos têm sido utilizadas em conjunto com diversos sistemas carreadores, numa série de estratégias, para promoverem a cicatrização tecidual. (ROSE *et al.* 2004; LEE & SHIN, 2007). Atualmente, o

*design* dos biomateriais tem focado na incorporação de moléculas biomoduladoras em sua matriz (MIESZAWSKA & KAPLAN, 2010).

Ao longo da evolução científica dos polímeros bioabsorvíveis, sintéticos ou naturais, o controle de suas propriedades materiais estimula o interesse de sua associação com moléculas bioativas, como os fatores de crescimento. A natureza de um biomaterial é um aspecto importante para um sistema distribuidor de fatores de crescimento. Destacam-se algumas características fundamentais esperadas: (i) material constituinte não citotóxico e biodegradável, (ii) método de produção reprodutível e que não afete a bioatividade da proteína, (iii) interação física que proteja a proteína de degradações físicas ou químicas, (iv) eficiência e controle de liberação da proteína, (v) habilidade de carrear os fatores de crescimento para o sítio desejado de ação, (vi) flexibilidade e predicabilidade carreadora e (vii) idealmente mimetizar o espaço temporal do processo de cicatrização *in vivo*. Dessa forma, o biomaterial ideal deve apresentar suficiente elasticidade para conformar o tamanho, a forma e suporte mecânico temporário, provisionar algum nível de bioatividade para estímulo celular, não ser imunogênico, promover a bioabsorção após a completa regeneração tecidual e apresentar um custo-benefício efetivo (CHEN, ZHANG & WU, 2010).

#### **2.4.1 Lipossomas**

Em 1965, com a publicação de Bangham e colaboradores, caracterizou-se um sistema de vesículas fosfolipídicas, ao qual foi dado o nome de lipossomas, termo atribuído a Weissman; *lipossoma* (do grego lipos = gordura + soma = corpo) (PRISTA *et al.*, 1996). Lipossomas são pequenas vesículas, com diâmetro variando de alguns nanômetros a poucos micrômetros (sempre maior que 25 nm),

que se formam naturalmente ou são sintetizadas artificialmente, sendo capazes de levar medicamentos para o interior das células (LASIC, 1993; LASIC 1998; PRISTA *et al.*, 1996).

Os componentes básicos dos lipossomas são fosfolipídios, naturais ou sintéticos, um esteroide e, eventualmente um produto iônico que permite a obtenção de vesículas carregadas, positiva ou negativamente. Esta ligação é feita por esterificação. A molécula fosfolipídica apresenta um polo negativo e um polo positivo, sendo chamada anfiprotica, e que coexiste com uma porção hidrófila e uma porção lipófila (PRISTA *et al.*, 1996).

Quando se dispersam fosfolipídios em um meio aquoso, formam-se espontaneamente vesículas, na maioria das vezes ovaladas, constituídas por estruturas tubulares. Os fosfolipídios orientam seus grupos polares para o meio aquoso, originando compartimentos isolados entre si, e, também, do meio aquoso externo, ou seja, as cadeias carbonadas hidrófobas que associam entre si, criando um ambiente lipófilo interno, enquanto os grupos polares se orientam para o exterior aquoso (PRISTA *et al.*, 1996).

Como partículas esféricas microscópicas, com membranas constituídas de uma ou mais bicamadas lipídicas, os lipossomas encapsulam uma fração de solvente que ficam suspensos em seu interior. O aspecto dos lipossomas assemelha-se a uma membrana celular em sua estrutura e composição. Eles são tipicamente feitos de moléculas lipídicas naturais, biodegradáveis, de baixa toxicidade e não-imunogênica, e podem encapsular ou se ligar a uma variedade de drogas moleculares, que podem permanecer livres em seu interior ou vinculadas às suas membranas (LASIC, 1993).

Uma das principais vantagens da utilização dos lipossomas, como transportadores, é a facilidade de incorporação de um fármaco, independente de sua carga ou massa molecular. Além disso, podemos citar como vantagens a biodegradabilidade, a baixa toxicidade, a possibilidade de dissolver substâncias lipofílicas (nas bicamadas lipídicas) ou hidrofílicas (na fase aquosa de seu interior) e a possibilidade de direcionar o local ou de controlar a liberação de uma determinada droga (PRISTA *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2005). Os lipossomas apresentam-se como materiais bioativos para enxertia, de proporção nanométrica e atuação biomolecular.

### 3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Vivemos o século da biotecnologia. As estimativas indicam que o impacto comercial dos produtos biotecnológicos se equipara ao PIB de um país do Terceiro Mundo. A assistência à saúde é, isoladamente, o maior setor econômico do planeta, chegando a representar de 12% a 14% do PIB em grandes mercados. Nos EUA, o porte das indústrias ligadas à biotecnologia oscila entre US\$ 400 bilhões para produtos químicos, US\$ 800 bilhões para o setor alimentício e mais de US\$ 1 trilhão para biomateriais (SIMON & KOTLER, 2004).

A busca por biomateriais, inicialmente, decorreu do fato de que à medida que os seres vivos envelhecem, há o desgaste fisiológico natural, o processo de envelhecimento. Embora muitos fatores responsáveis pelo envelhecimento não sejam compreendidos, as consequências são bastante claras (ORÉFICE, PEREIRA & MANSUR; 2006). Em acréscimo, a expectativa de vida da população mundial cresce consideravelmente. Uma das consequências desse fenômeno tem sido o aumento de injúrias e doenças em pessoas senis, que apresentam uma capacidade de cicatrização diminuída. Defeitos nos tecidos orais e craniofaciais, resultantes de trauma, tumores, infecções, mau desenvolvimento ósseo ou doenças de deformação progressiva demonstram a necessidade de restauração desses tecidos como objetivo clínico, onde se concentram os conhecimentos das bases das ciências biomédicas e das engenharias. De todas as áreas do conhecimento médico, a que sugere apresentar maiores perspectivas para a humanidade é a da regeneração. O conhecimento e a aplicação dos princípios das técnicas de Regeneração Tecidual Guiada (RTG) realizam o princípio hipocrático da arte e ciência de curar (SANCHES, 2010).

O uso de fatores de crescimento acelera e melhora a qualidade do reparo ósseo em diversos modelos, estimulando a diferenciação e promovendo a maturação de osteoblastos (LYNCH *et al.*, 1989; RUTHERFORD *et al.*, 1992; GIANNOBILE *et al.*, 1994a, 1996; CHEIFETZ *et al.*, 1996; SCHMIDMAIER *et al.*, 2001; ROETHY *et al.*, 2001; RASCHKE *et al.*, 2002; RAICHE & PULEO, 2004; ROSE *et al.* 2004; ANITUA *et al.* 2007a; AROSARENA & PULEO, 2007; LEE & SHIN, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008; ALVES *et al.* 2009; CHEN, ZHANG & WU, 2010). Trabalhos anteriores revelaram a eficiência das vesículas de lipossomas como carreadores do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) (SADDI *et al.*, 2007 e ALVES *et al.*, 2009). O fator de crescimento administrado foi mantido no microambiente experimental por 14 dias, sendo liberados gradualmente. Esses resultados sugerem a avaliação dos lipossomas como carreadores para fatores de crescimento, numa possibilidade de tratamento das sequelas ósseas causadas por diversas etiopatogenias.

A compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos nos processos de interação do biomaterial ao organismo e do processo de reparo ósseo é essencial para subsidiar os protocolos de tratamento, tanto para patologias como para outros procedimentos que envolvam a regeneração do tecido ósseo. No atual mundo globalizado, as descobertas científicas são rapidamente introduzidas e absorvidas pela prática clínica. Na odontologia, novos produtos são lançados diariamente e grande parte corresponde a materiais empregados pelo cirurgião-dentista. Esses produtos são usados em contato direto com tecidos vivos, como a dentina, a polpa, osso alveolar e tecido periodontal; algumas vezes, permanecendo em sua intimidade por prolongados períodos (JUNIOR & GARRAFA, 2007). O desenvolvimento dos biomateriais acompanha a evolução da

nossa compreensão do funcionamento biológico-tecidual. Os primeiros biomateriais procuravam essencialmente propor um reparo mecânico de lesões teciduais, providenciando suportes não tóxicos, inertes e bem tolerados. A implantação das próteses ortopédicas representa, ainda, um exemplo amplamente utilizado destes procedimentos. A extensão de tal modelo de terapia envolveu materiais que estimulam a integração do implante com os tecidos adjacentes, provocando a mobilização e ativação celular, bem como a subsequente produção da matriz extracelular intimamente associada com o material implantado. A experiência de várias décadas de implantes ortopédicos, cardiológicos, dentários aponta para a principal dificuldade no desenvolvimento destes procedimentos. Os tecidos vivos renovam continuamente as matrizes estruturais e respondem a demandas específicas, adaptando-se às novas condições com a produção de matrizes reestruturadas e modificadas (remodelação tecidual). Os biomateriais implantados não degradáveis (titânio, ouro, cerâmicas) e suas interfaces com o tecido vivo não acompanham estas modificações e sofrem o desgaste que geralmente requer uma cirurgia complementar ou corretiva. Os biomateriais biodegradáveis procuram responder a esse desafio. Implantes de polímeros orgânicos ou de materiais mineralizados absorvíveis permitem um reparo permanente, mobilizando as células que normalmente participam na renovação da mesma estrutura. (NIMNI,1997; HUBBELL 1999; MIRANDA *et al.*, 2011).

A hipótese desse trabalho constituiu em avaliar o reparo ósseo alveolar quando submetido à exposição gradual e constante de dois fatores de crescimento, IGF e PDGF, isolados e em associação, veiculados por meio de lipossomas.



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos dos Fatores de Crescimento, PDGF-BB e IGF-I, veiculados com vesículas de lipossomas, em associação ou isoladamente, no processo de reparo ósseo-alveolar dentário, após a exodontia do segundo molar superior de ratos.

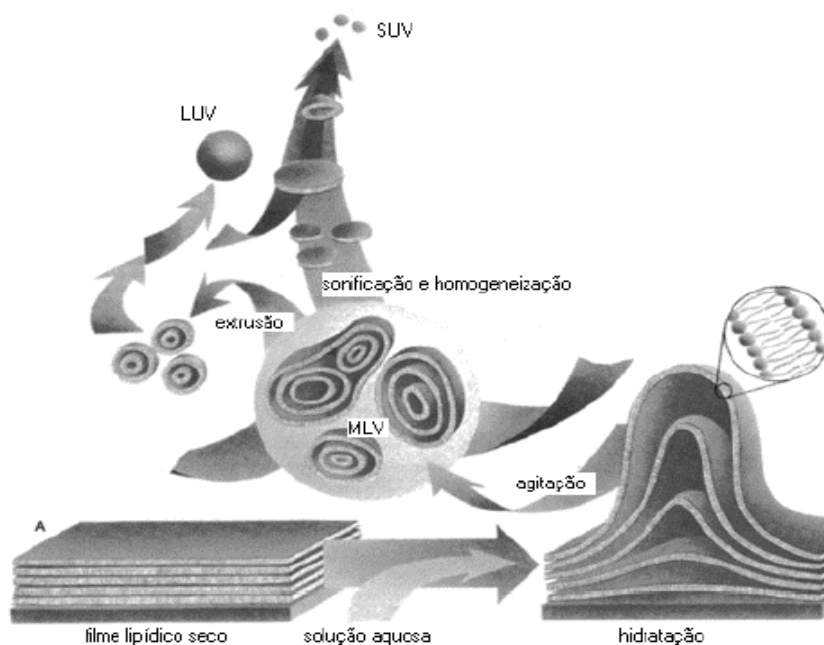
### **4.2. Objetivos específicos**

- Avaliar histologicamente, por meio de análise morfométrica, o número de vasos sanguíneos nos alvéolos: controle (BC) e tratados (P, L, PDP, PDL, IP, IL, PDIL), após 07 dias de cicatrização.
- Avaliar, por meio de técnicas de imunistoquímica, a expressão do fator de crescimento endotelial vascular e da proteína osteocalcina, aos 03 e 07 dias de cicatrização.
- Avaliar histologicamente, por meio de análise morfométricas, o percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos: controle (BC) e tratados (P, L, PDP, PDL, IP, IL, PDIL), após 07, 14 e 21 dias de cicatrização.
- Avaliar a eficácia dos lipossomas como carreadores dos fatores de crescimento por meio da correlação entre os dados da histologia, histometria e imunistoquímica.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Preparação de IGF-I e PDGF-BB em lipossomas

Os lipossomas com IGF-I e PDGF-BB foram preparados pelo laboratório de Biopatologia e Biologia Molecular da Universidade de Uberaba/MG, em supervisão do professor doutor José Bento Alves, de acordo com Alves *et al.* 2009, como se segue: IGF-I, PDGF-BB foram dissolvidos em 1ml de 10mM de ácido acético contendo 0.1% (w/v) de albumina de soro bovino (BSA) em 0.2 µg/ml de concentração final e armazenados a -20 °C. Os lipossomas foram obtidos por sonificação utilizando uma solução de 12 mg/ml de dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) e 1.2 mg/ml de lisofosfatidil colina (LPC) dissolvidos em 4ml de clorofórmio, produzindo vesículas unilamelares contendo 0.5 ng/µL dos fatores de crescimento, PDGF-BB, IGF-I com aproximadamente 100 nm de diâmetro.



**Figura 01. Desenho esquemático e simplificado do método de preparação de lipossomas. Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV). Adaptado de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com) em SANTOS & CASTANHO (2002).**

## **5.2. Animais**

Este estudo utilizou 112 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos e com peso corporal variando de 250 a 300g provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em biotério apropriado, acondicionados em gaiolas plásticas contendo um número máximo de 04 (quatro) animais, sob temperatura ambiente e controle de luz automática (07 às 19h). Os animais receberam ração para animais de laboratório e água *ad libitum*.

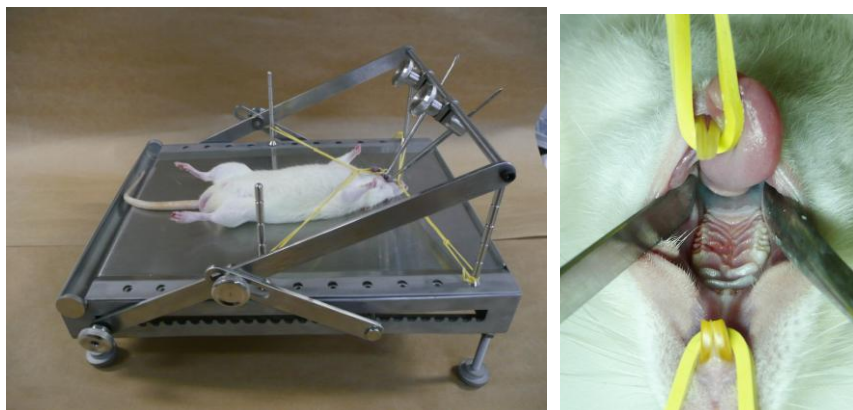
Todos os procedimentos seguiram as Diretrizes em Experimentação Animal de Faculdade Brasileira, tendo sido o projeto previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob nº 207/2009.

## **5.3. Procedimentos cirúrgicos e grupos experimentais**

Durante a realização de tais procedimentos, percebemos a necessidade de criar estratégias para melhorar a visualização do campo cirúrgico (cavidades bucais de ratos) e que permitissem uma maior padronização dos pontos de administração das drogas. Nesse sentido, uma mesa cirúrgica para procedimentos intrabucais, em animais de pequeno porte, foi idealizada, no decorrer desse projeto. Além dos objetivos citados, o equipamento visava também à utilização dos instrumentos odontológicos com mais segurança. Com a utilização da mesa cirúrgica, a demanda de mãos auxiliares, normalmente requeridas nesses procedimentos foi reduzida. Tal equipamento, portanto, configura-se também como importante produto do nosso estudo. Seu caráter inovador, diante do estado da técnica, permitiu a aprovação do depósito de patente dessa invenção junto ao Instituto Nacional

da Propriedade Intelectual. O depósito da invenção nomeada “Mesa cirúrgica para animais de pequeno porte” foi realizado junto ao INPI em 04/08/2011 (ANEXO III). Seu número definitivo é **PI-1103967-1**. O projeto contou com o apoio técnico de profissionais da Engenharia Mecânica, os quais demonstraram grande interesse pela divulgação do produto. Por essa razão, como fruto desse projeto, publicamos o artigo completo, com as possíveis aplicações da mesa cirúrgica, em Odontologia, na Revista do VII Congresso de Engenharia Mecânica/ 2012 (ANEXO IV).

Dessa forma, após a anestesia intramuscular com a associação ketamina-xilazina (10mg/100g), os animais (n=112) foram posicionados na mesa operatória e submetidos aos procedimentos cirúrgicos. Utilizando-se um instrumento de Hollembach para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação, os segundos molares superiores direitos e esquerdos foram extraídos. Os alvéolos direitos foram utilizados como controle do processo de reparo ósseo, sendo naturalmente preenchidos com coágulo (Grupo BC – *blood clot*). No lado esquerdo, os alvéolos foram preenchidos de acordo com os grupos experimentais descritos na tabela 1. Os fatores de crescimento associados ou não aos lipossomas foram administrados com uma seringa de precisão, graduada em microlitros da marca HAMILTON COMPANY® (Figura 03). As microinjeções foram aplicadas dentro do coágulo, com volume de 1µL, com a seringa posicionada verticalmente, paralela ao primeiro e terceiros molares. Os animais (n=4 por grupo/por período) foram sacrificados após 3, 7, 14 e 21 dias dos procedimentos.



**Figura 02 – Mesa cirúrgica e acesso ao campo operatório**



**Figura 03 – Seringa HAMILTON COMPANY®**

**Tabela 1 – Grupos experimentais**

Grupo	Descrição	Número de amostras /período de sacrifício			
		3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
P	20ng/μL PBS	4	4	4	4
L	1μl de lipossomas vazios	4	4	4	4
IP	20ng/μl de IGF-I em PBS	4	4	4	4
IL	20ng/μl de IGF-I em lipossomas	4	4	4	4
PDP	20ng/μl de PDGF-BB em PBS	4	4	4	4
PDL	20ng/μl de PDGF-BB em lipossomas	4	4	4	4
PDIL	20ng/ μl de IGF-I + 20ng/μl de PDGF-BB associados em Lipossomas	4	4	4	4
<b>TOTAL ( n ) = 112 ANIMAIS</b>					

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 5.4. Métodos histológicos

Após o sacrifício por superdosagem anestésica, *overdose*, os animais foram decapitados, e os maxilares dissecados. As maxilas foram fixadas por 48 horas à temperatura ambiente em solução de formalina neutra tamponada a 10% (FNT10%).

Após a fixação, as maxilas foram desmineralizadas em solução tamponada de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 10%, (pH entre 7,2) à temperatura ambiente, durante um período de 40 dias, com substituição a cada 2 dias. Após a desmineralização, as maxilas foram lavadas em água corrente por uma noite e separadas em metades: direita (lado controle) e esquerda (lado experimental). Os fragmentos foram, então, processados para análise histológica e imunoistoquímica, conforme protocolo a seguir:

- 1) Desidratação: série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II, absoluto III), com um tempo de 30 minutos em cada banho;
- 2) Diafanização: três banhos de xilol, durante 30 minutos em cada banho;
- 3) Infiltração: três banhos em parafina a 58°C, durante 90 minutos cada, seguindo-se a inclusão.

Os blocos de parafina foram cortados no plano sagital, obtendo-se cortes seriados de seis micrômetros de espessura. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro, secos em estufa a 37 graus durante um dia e corados com hematoxilina-eosina (HE) para análises histológicas e morfométricas. A avaliação histológica foi fundamentada nos padrões de organização e maturação de tecido conjuntivo que preencheu o alvéolo, a presença de células ósseas (osteoclastos, osteoblastos), tecido ósseo e vasos sanguíneos neoformados e detecção de reação inflamatória.

## 5.5. Métodos morfométricos

### 5.5.1. Avaliação do preenchimento ósseo

Pelo menos três cortes escolhidos aleatoriamente foram avaliados para cada grupo. Com o auxílio do software AxioVision Release 4.8 (Carl Zeiss), a área trabecular de cada secção foi determinada e contornada (figura 4). A área total de cada alvéolo foi também registrada. O percentual de área óssea trabecular de cada campo capturado foi obtido dividindo a área trabecular pela área total do alvéolo.

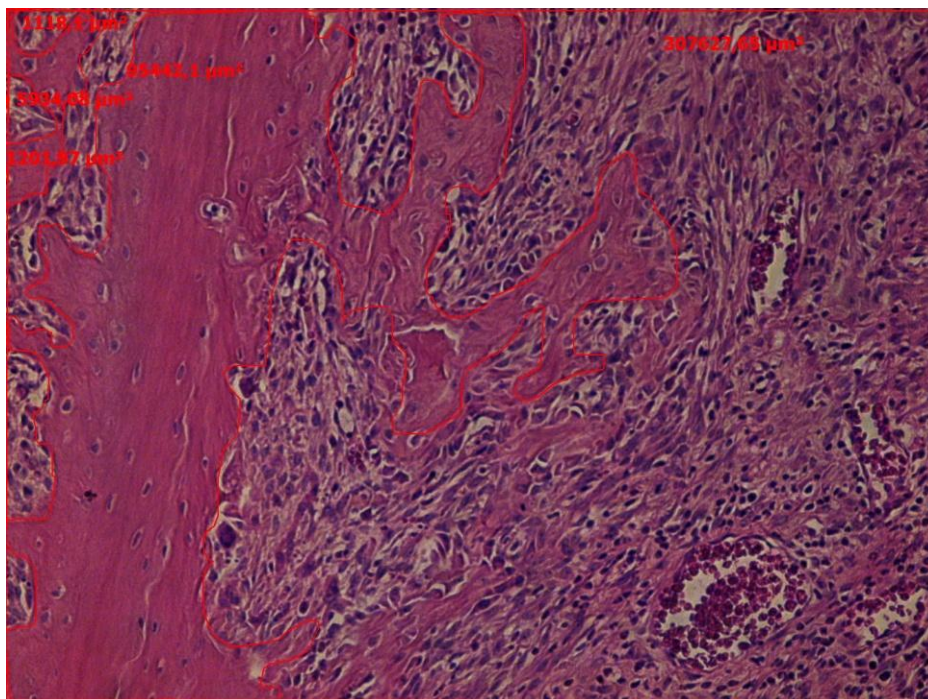
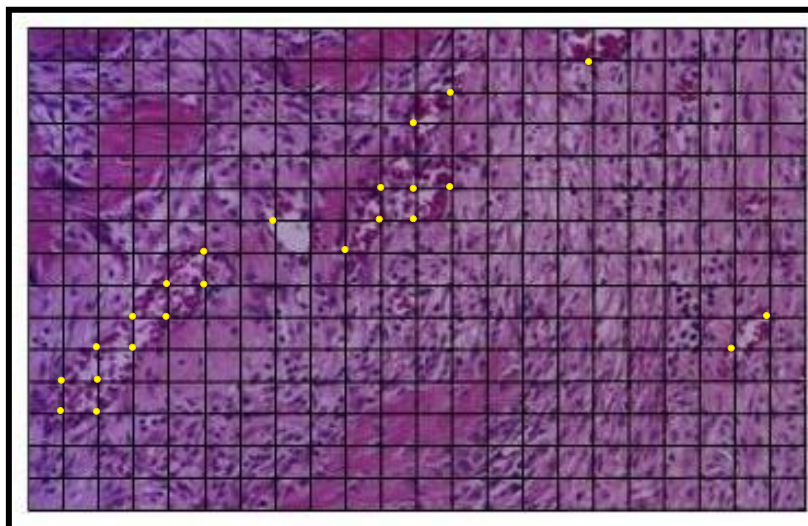


Figura 4 – Avaliação do preenchimento ósseo. Observar contorno do tecido ósseo (linhas vermelhas). HE.

### 5.5.2. Avaliação dos vasos sanguíneos

O número de vasos sanguíneos foi obtido como descrito previamente (ALVES *et al.* 2009), utilizando-se uma grade histométrica, colocada sobre as fotomicrografias com auxílio do *Confocal Assistant* (Chapel Hill, NC). Os vasos

sanguíneos localizados nas interseções das linhas da grade (figura 5) foram contados por uma pessoa calibrada como descrito por Reis-Filho *et al.* (2011).



**Figura 5 – Contagem de vasos sanguíneos. Grade histométrica utilizada para a contagem do número de pontos (interseções aqui indicadas em amarelo) ocupados pelos vasos sanguíneos. HE.**

## **5.6. Método Imunoistoquímico**

A expressão de osteocalcina e VEGF foi avaliada por imunoperoxidase, aos 3 e 7 dias após os procedimentos cirúrgicos. Para tanto, as secções foram coletados em lâminas de vidro previamente silanizadas e submetidos ao seguinte protocolo:

- 1) Desparafinização:
  - i. Xilol I – 1 hora/ temperatura ambiente.
  - ii. Xilol II – 15 minutos/ temperatura ambiente.
- 2) Hidratação:
  - i. Etanol 100% I – 5 minutos.
  - ii. Etanol 100% II – 5 minutos.
  - iii. Etanol 95% – 5 minutos.
  - iv. Etanol 80% – 5 minutos.



- v. 5 banhos em água deionizada.
- 3) Recuperação antigênica:
  - i. Ácido cítrico 10 mM (pH 6,0), 20 minutos, em panela de pressão digital (Mantra) regulada em 8 libras de pressão.
  - ii. Lavagem em água deionizada.
- 4) Bloqueio da Peroxidase Endógena:
  - i. Peróxido de Hidrogênio 10 volumes - 2 banhos de 15 minutos cada.
  - ii. Lavagem em água deionizada.
- 5) Lavagem em tampão TBS (Tris-HCl 20mM , pH 7,4):
  - i. 3 banhos – 5 minutos cada temperatura ambiente.
- 6) Bloqueio de ligações inespecíficas:
  - i. BSA 2% + Tween 20 0,1% - 1h em câmara úmida à temperatura ambiente.
- 7) Incubação com anticorpos primários por 1h em câmara úmida escura, à temperatura ambiente:
  - ✓ Anti-osteocalcina / marca (ABCAM) – diluição 1:100.
  - ✓ Anti-VEGF / marca (Santa Cruz) – diluição 1:100.
  - i. Anticorpos foram diluídos em solução DAKO (2012-07 S3022 /Antibody diluent with background reducing component).
  - ii. Como controle negativo, foram omitidos os anticorpos primários em secções subseqüentes.
- 8) Lavagem com banhos Tris-HCl – 3 banhos de 5 minutos cada.
- 9) Incubação com Anticorpo Secundário/ kit LSAB/Dako.
- 10) Lavagem com banhos Tris-HCl – 3 banhos de 5 minutos cada.
- 11) Revelação com diaminobenzidina:
  - i. 350 µM 3,3'- diaminobenzidine (Sigma Chemical Co.) e 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em Tris-HCl.
  - ii. Bloqueio da revelação com Tris-HCl.
- 12) Contra-Coloração:

- i. Hematoxilina de Harris diluída – 1 minuto.
- 13) Desidratação:
- i. Etanol 70% I – 5 minutos.
  - ii. Etanol 70% II – 5 minutos.
  - iii. Etanol 90% – 5 minutos.
  - iv. Etanol 100% I – 5 minutos.
  - v. Etanol 100% III – 10 minutos.
- 14) Diafanização:
- i. Xilol I – 5 minutos.
  - ii. Xilol II – 10 minutos.
- 15) Montagem da lâmina com Entelan.

#### **5.6.1. Quantificação da expressão imunoistoquímica**

Imagens dos cortes com aumento de 400X foram obtidas usando uma placa de captura e um microscópio Zeiss Axiostar Plus interligados a um computador com o software AxioVision Release 4.8 (Carl Zeiss). As células imunocoradas e a imunoexpressão nas áreas de matriz extracelular foram contadas utilizando o mesmo método de grade histométrica para a quantificação vascular, conforme Fernandes *et al.* (2008).

#### **5.7. Análise estatística**

Os dados coletados foram estatisticamente testados utilizando o teste de Tukey em concordância para análises de Dunn, e o teste de Mann-Whitney U não paramétrico em concordância pelo Kruskal-Wallis. Todos os grupos foram avaliados três vezes e foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Análise histológica e morfométrica

O processo de reparo alveolar, com a formação de novas trabéculas ósseas, se inicia pelas células marginais dos alvéolos. Durante esse processo observamos seus eventos clássicos, como: a formação e maturação do coágulo, sua infiltração por fibroblastos e o estabelecimento de uma matriz provisional.

Nossa avaliação histológica foi realizada em varredura vertical, a partir da região apical (mais profunda do alvéolo) para a região cervical (área do alvéolo mais próxima ao meio externo na cavidade bucal). Sua área total foi dividida em três terços (figura 6). A análise histológica e morfológica considerou o terço apical e o médio dos alvéolos da raiz distal, dos segundos molares extraídos.

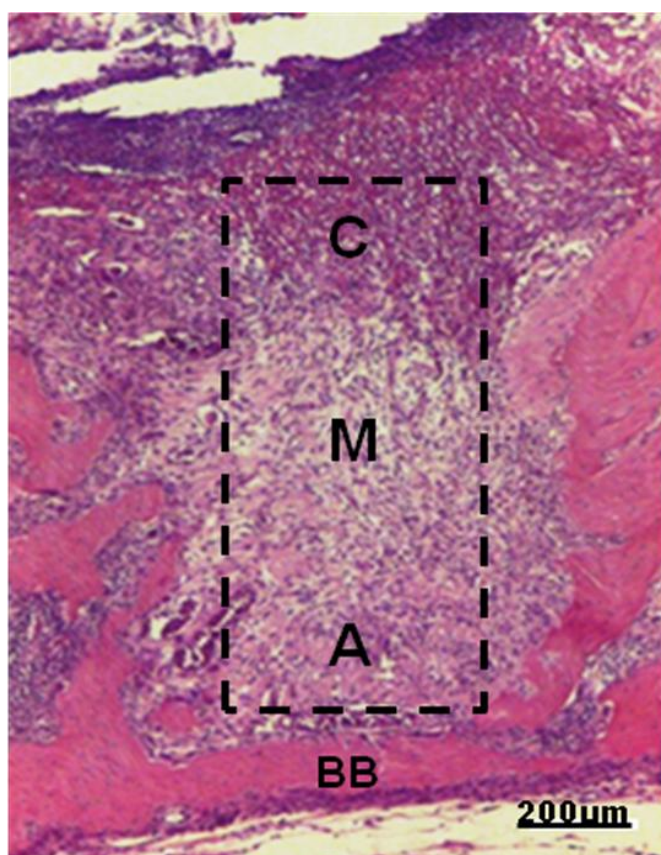


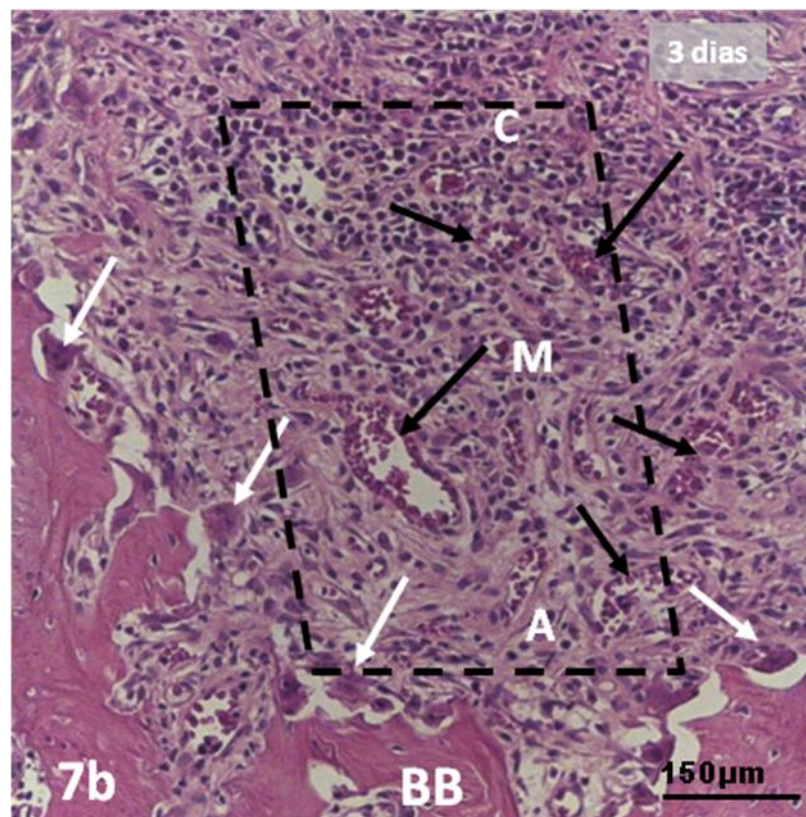
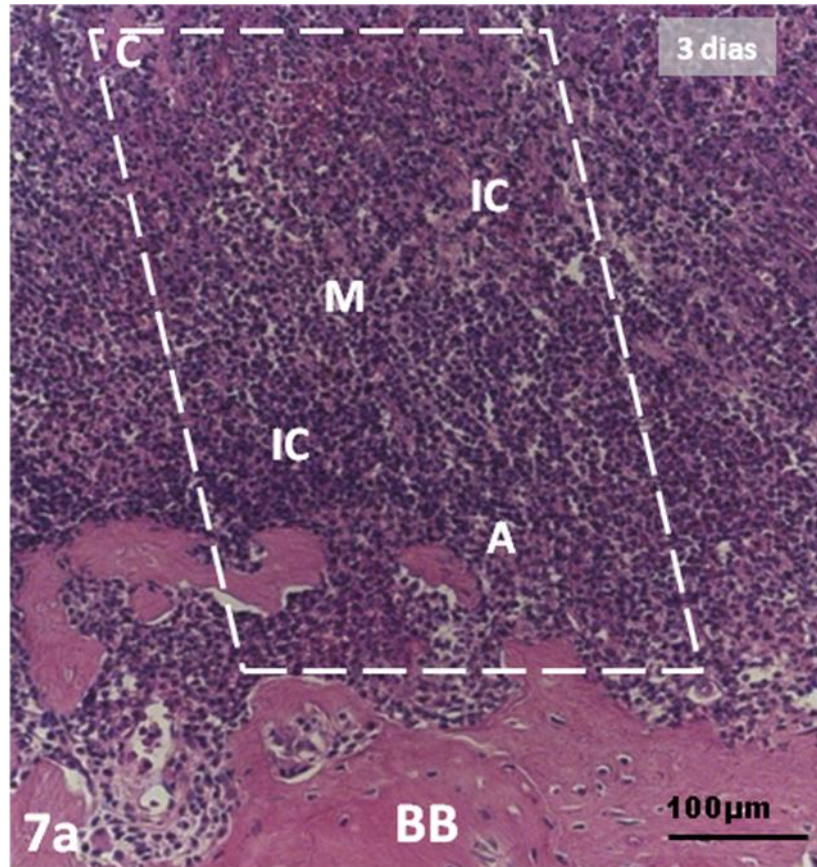
Figura 6 – Imagem panorâmica de alvéolo da raiz distal do segundo molar superior. HE. Barra = 200 µm. A = Terço apical; M = Terço médio; C =Terço cervical e BB = osso basal.

Nos animais sacrificados aos 3 dias, os alvéolos BC, L, P, PDP e IP estavam preenchidos com coágulo ocupando todo os terços: apical, médio e cervical (figura 7a). Os alvéolos dos animais tratados com PDL, IL e PDIL exibiam características histológicas compatíveis com avanço no processo de reparo. O coágulo inicial foi, em grande parte, substituído por uma matriz provisional com vasos sanguíneos, células mesenquimais e fibras colágenas (figura 7b).

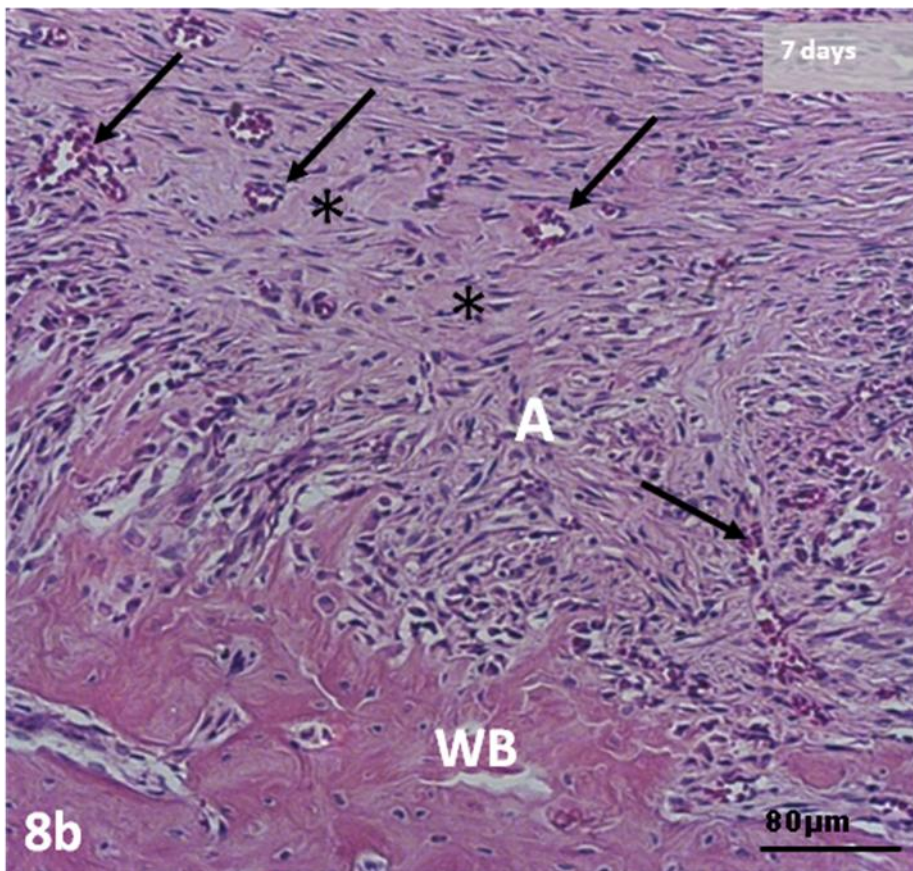
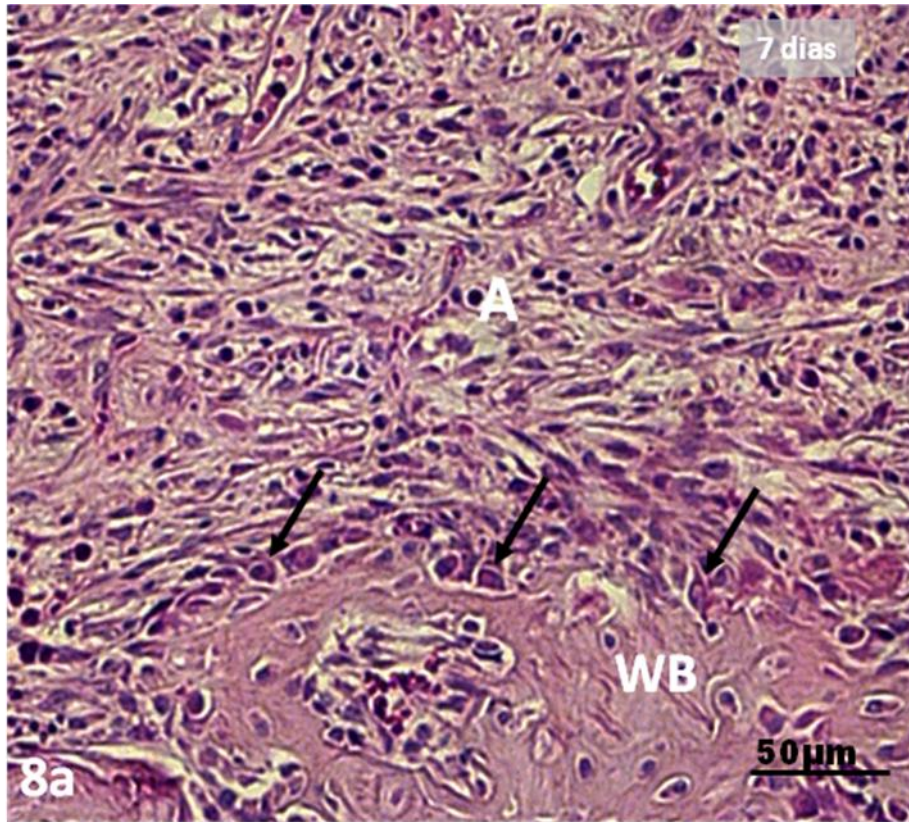
Aos 7 dias, nos alvéolos tratados com PDL, IL e PDIL foi observado que o processo de reparo está mais avançado, com trabéculas ósseas organizadas em íntimo contato com vaso sanguíneos dilatados e ocupando maior área do alvéolo (Fig. 8a), quando comparados aos grupos BC, L, P, PDP e IP (figura 8b) .

Aos 14 dias, os alvéolos BC, L, P, PDP e IP exibiam acentuado processo de formação, com tecido ósseo primário preenchendo porção apical e média do alvéolo (figuras 9a). Nos alvéolos PDL, IL e PDIL o processo de formação óssea encontrava-se em fase mais avançada de desenvolvimento, exibindo trabéculas ósseas maduras, com osteônios e espaços medulares (figura 9b).

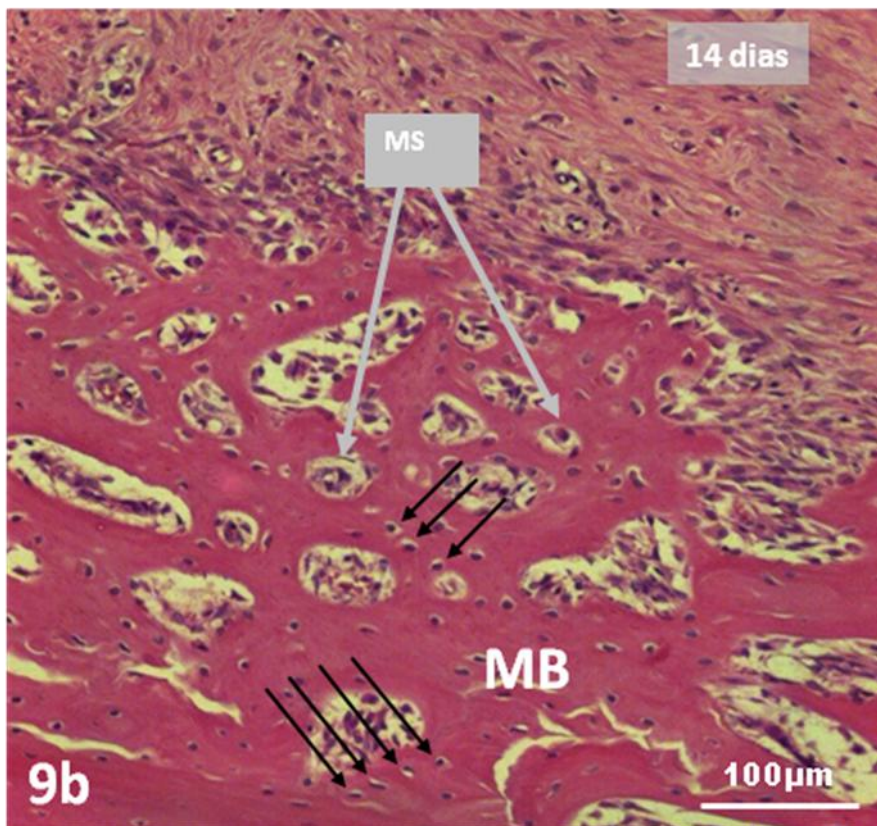
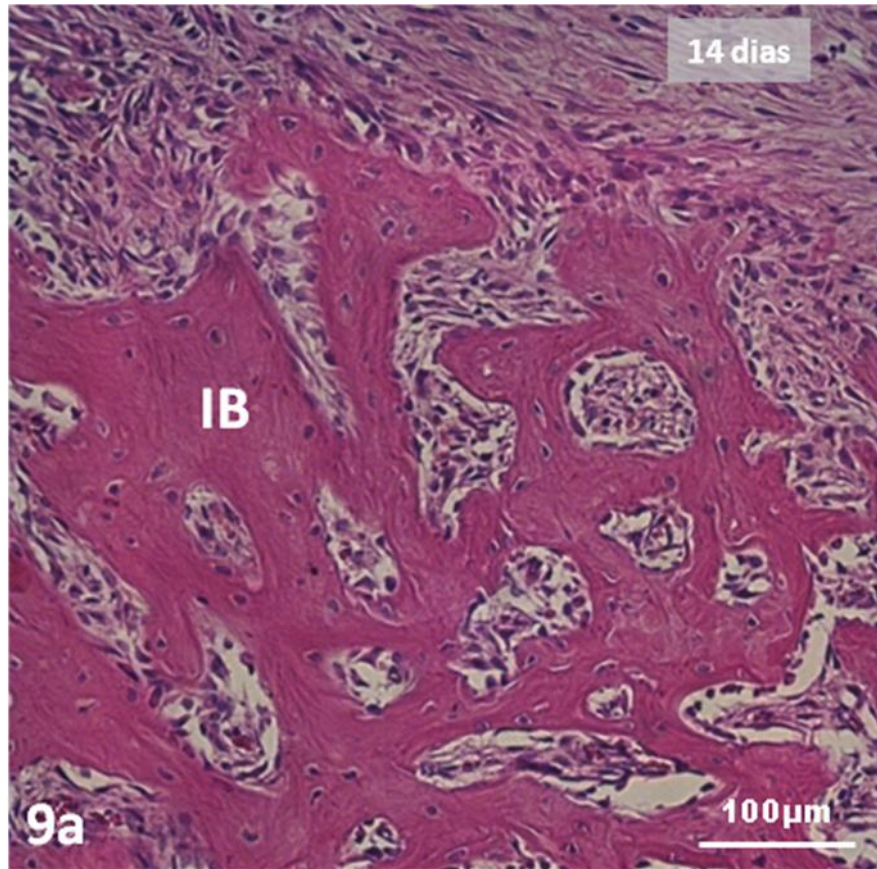
Aos 21 dias o processo de reparo ósseo nos alvéolos BC, L, P, PDP e IP bem como naqueles tratados com fatores de crescimento em lipossomos (PDL, IL e PDIL) estavam parcialmente preenchido com novo tecido ósseo. Contudo, nos alvéolos tratados com PDL, IL e PDIL, o processo de reparo estava sempre em estágio mais avançado de desenvolvimento.



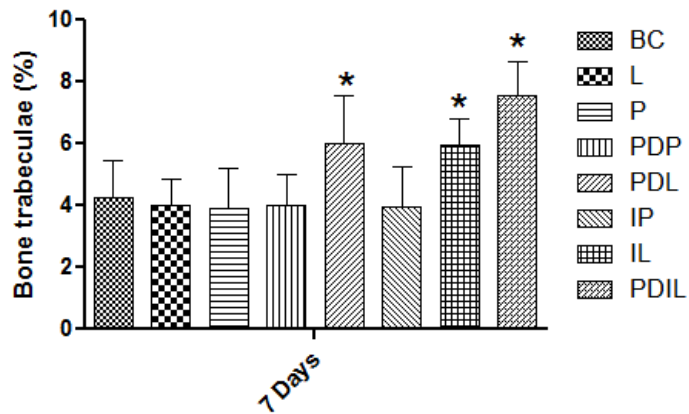




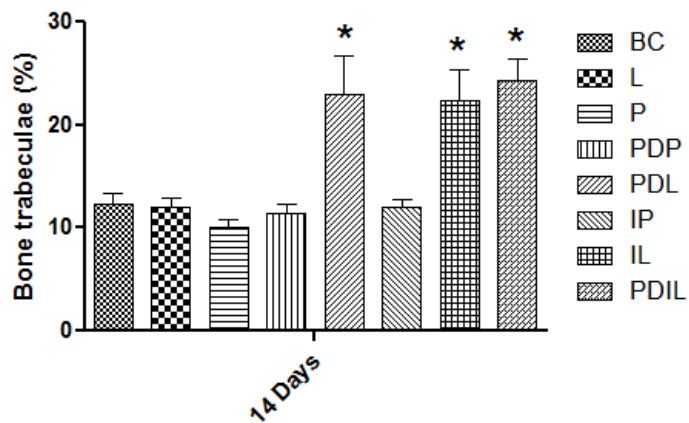




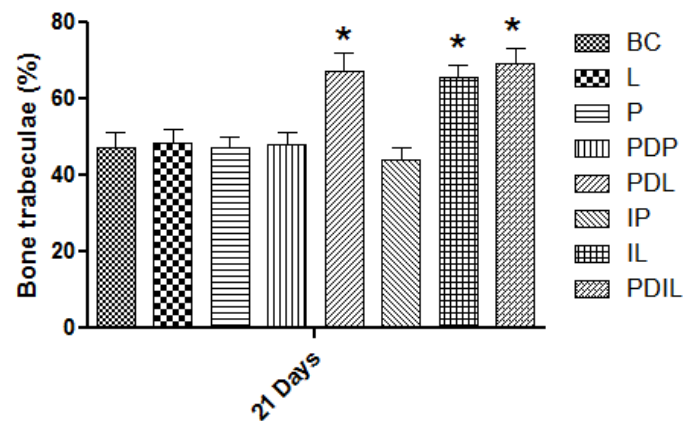
Nos gráficos I, II e III, podemos verificar que a porcentagem de trabéculas ósseas neoformadas foi estatisticamente ( $p < 0.05$ ) maior nos alvéolos tratados com PDL, IL e PDIL do que nos alvéolos BC, L, P, PDP e LP, aos 7, 14 e 21 dias após os procedimentos cirúrgicos.



**Gráfico I – Porcentagem de trabéculas ósseas formadas aos 7 dias.**



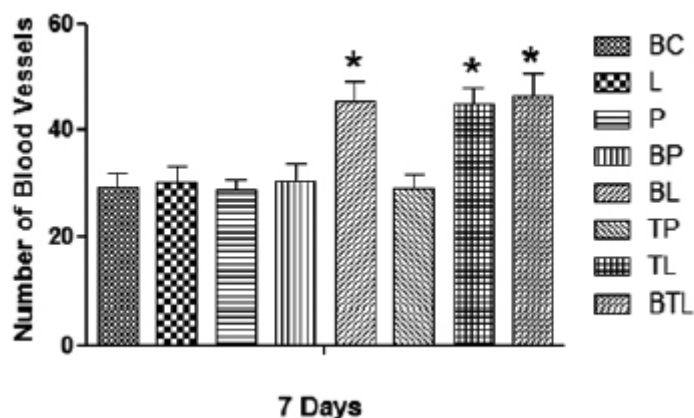
**Gráfico II – Porcentagem de trabéculas ósseas formadas aos 14 dias.**



**Gráfico III – Porcentagem de trabéculas ósseas formadas aos 21 dias.**



Similarmente à porcentagem de trabéculas ósseas neoformadas, o número de vasos sanguíneos foi estatisticamente ( $p < 0.5$ ) maior nos alvéolos tratados com PDL, IL e PDIL do que nos alvéolos BC, L, P, PDP e LP, aos 7 dias após os procedimentos cirúrgicos.



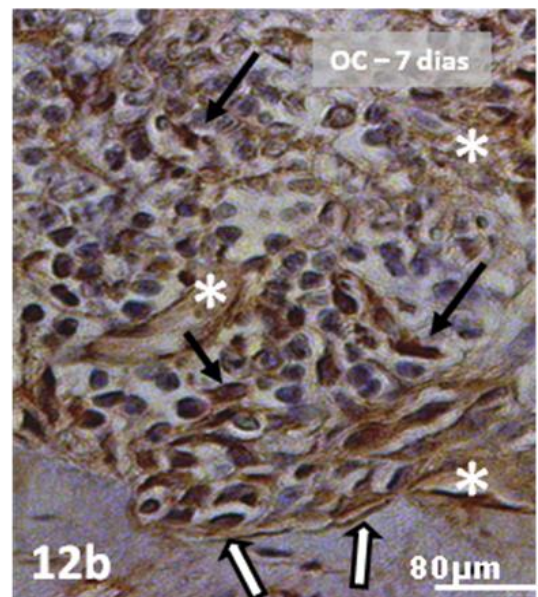
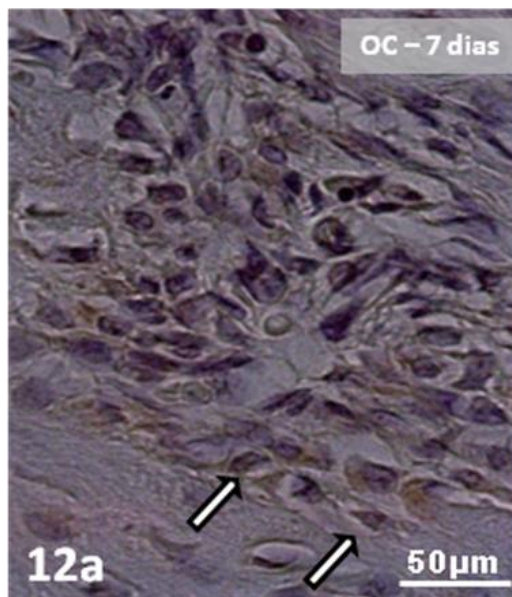
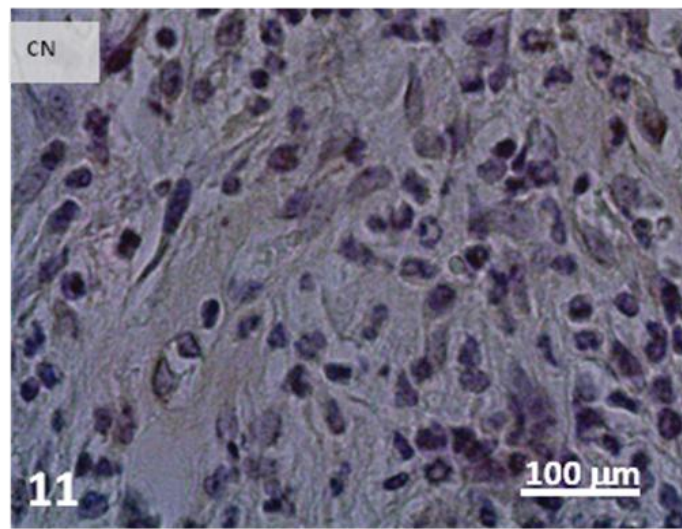
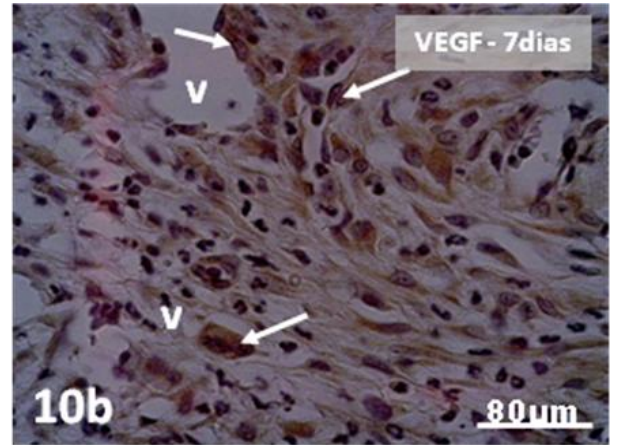
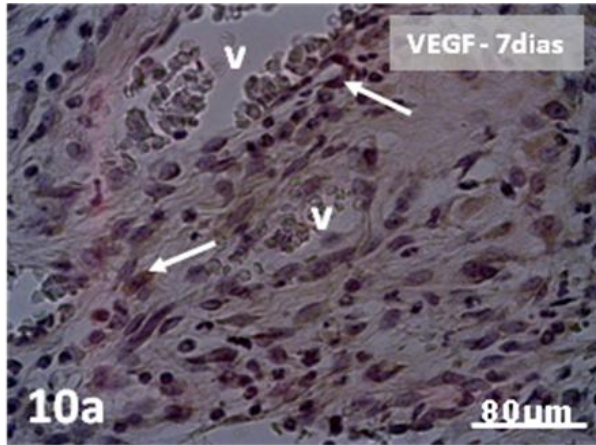
**Gráfico IV – Número de vasos sanguíneos formados aos 7 dias.**

Nos períodos estudados, verificamos os eventos clássicos do processo de cicatrização tanto nos alvéolos BC, L, P, PDP e IP quanto naqueles tratados com PDL, IL e PDIL. Contudo, nos alvéolos tratados com PDL, IL e PDIL, o processo de reparo estava sempre num estágio mais avançado de desenvolvimento.

## 6.2. Análise Imunoistoquímica

A expressão temporal e espacial de duas moléculas associadas ao reparo ósseo, a osteocalcina e o VEGF, foi monitorada nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias e avaliados por meio da imunoistoquímica. Verificamos que nos alvéolos tratados com fatores de crescimento em lipossomos, isolados ou associados, houve maior expressão de VEGF tanto nas células como na matriz extracelular, quando comparados aos demais grupos estudados nas fases iniciais do processo de reparo (Figura 10a e 10b), com pico ao sétimo dia.

Com relação à osteocalcina, os resultados revelaram uma expressão preferencial pelos osteoblastos associados à superfície do osso neoformado. A imunomarcção foi sempre mais forte nos alvéolos dos animais tratados com os fatores de crescimento em lipossomos, isolados ou associados (Figura 12a e 12b), também apresentando pico ao sétimo dia.



Os dados histoquantitativos confirmam as análises histológicas, apresentando diferença significativa ( $p < 0.05$ ) na expressão para VEGF e osteocalcina, com pico aos 7 dias, nos alvéolos tratados com PDL, IL e PDIL (tabela II).

	<b>VEGF</b>	<b>OSTEOCALCINA</b>
	<b>Celulas endoteliais</b>	<b>Osteoblastos/Fibroblastos</b>
BC	0.23±0.03 <sup>a</sup>	0.42±0.08 <sup>a</sup>
L	0.19±0.06 <sup>a</sup>	0.26±0.04 <sup>a</sup>
P	0.17±0.05 <sup>a</sup>	0.22±0.04 <sup>a</sup>
PDP	0.18±0.09 <sup>a</sup>	0.26±0.07 <sup>a</sup>
IP	0.17±0.02 <sup>a</sup>	0.27±0.05 <sup>a</sup>
<b>PDL</b>	<b>2.1±0.8<sup>b</sup></b>	<b>2.3±0.7<sup>b</sup></b>
<b>IL</b>	<b>2.7±0.35<sup>b</sup></b>	<b>2.6±0.45<sup>b</sup></b>
<b>PDIL</b>	<b>2.9±0.75<sup>b</sup></b>	<b>2.8±0.56<sup>b</sup></b>

Dados são apresentados como mediana e desvio padrão da media da marcação de todas as sessões analisadas por área.

a, b = análise intra grupo. Diferentes letras, diferença estatística ( $P < 0.05$ ).

**Tabela II** - Níveis de marcação para VEGF e Osteocalcina.

## 7. DISCUSSÃO

Os eventos fisiológicos que acompanham “a cascata biomolecular da cicatrização” apresentam a integração de uma alta variedade de biomoléculas conhecidas como fatores de crescimento (GFs), que têm a incumbência de recapitular e mimetizar os micromeios naturais, na formação de tecidos, no reparo biológico. A fisiologia do osso alveolar é mantida por uma complexa “orquestra” de fatores de crescimento e outras biomoléculas da matriz, (e.g, osteopontina, osteocalcina), imunomediadores e citocinas (Lin *et al.*, 2011).

O controle da entrega de biomoléculas exógenas, como objeto a ser atingido, tem-se mostrado eficiente quando realizado em associação com carreadores biológicos, que permitem amparar o estímulo biológico, otimizando o processo de cicatrização (Matsuo *et al.*, 2003; Samad *et al.*, 2007; Basmanav *et al.*, 2008; Saddi *et al.*, 2008; Tayalia and Mooney, 2009; Chen *et al.*, 2010; Caplan and Correa, 2011). Essa promissora estratégia conduz os GFs a agir como agentes especiais no reparo ósseo. Sua bioatividade é preservada quando protegidas contra a degradação e disseminação, *in situ*, de forma precoce (Chen *et al.*, 2010). O desempenho de um GF depende tanto da concentração, como do tempo de exposição no sitio alvo.

Lipossomas se apresentam como uma versátil ferramenta em biologia, bioquímica e na medicina atual, uma vez que eles são agentes carreadores para diferentes tipos de moléculas, como pequenos compósitos, proteínas, nucleotídeos e plasmídios (Samad *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2009). Esses nano-veículos são biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade quando comparado a outros agentes de fácil manipulação e se incorporam na membrana celular da

célula alvo. Assim a entrega da droga pode ser guiada e controlada de forma precisa (Balazs and Godbey, 2011; Liu *et al.*, 2011).

Baseado em achados prévios (Saddi *et al.*, 2008) e presentes (Ferreira *et al.*, 2013), podemos hipotetizar que o lipossoma promova a regulação de GFs em alvéolos dentários de ratos, em sua concentração e de seu gradiente, espaço-temporal. O lipossoma, na matriz extracelular, consente a ação dos GFs no lugar e pelo tempo pretendido por uma terapia. A retenção de GFs, nos sítios de tratamento e por um determinado tempo, permite uma migração celular para esses sítios, sua proliferação e diferenciação. O sistema de entrega da biomolécula, pelo carreador lipossoma, pode bioativar a terapia, utilizando como agentes os GFs, sendo uma técnica mais vantajosa, poderosa e menos invasível. Todavia, a frequência e a marcação da administração devem ser otimizadas, no sentido de minimizar uma overdose, sendo mais objetiva a sua estimulação de forma localizada (Chen *et al.*, 2010).

Os resultados histológicos e histoquantitativos, do presente trabalho, identificaram uma aceleração no processo de reparo durante os períodos avaliados, aos quais sendo sempre mais pronunciado nos grupos teste, com lipossomas carreando GFs, isolados ou em associação, quando comparados com outros grupos (BC, L, P, PDP and IP).

Aos sete dias do procedimento cirúrgico, o progresso do reparo ósseo-alveolar, nos grupos que receberam os GFs carreados pelos lipossomas, foi caracterizado por um completo preenchimento de coágulo e apresentava uma avançada organização das trabéculas ósseas iniciais, nas porções: apical e media do alvéolo, enquanto nos outros grupos ainda permanecia uma matriz provisional

e um pouco de trabeculado, esse identificado somente na porção apical do alvéolo dentário.

Dessa maneira, é racional postular que os fatores de crescimento exógenos foram prontamente liberados, seguindo o requerimento destes bioagentes, para ajudar a recrutar células mesenquimais e a se diferenciar, recompondo o tecido ósseo no alvéolo.

A presença de múltiplos GFs é indispensável à maioria dos processos de regeneração tecidual (Chen *et al.*, 2010) e, em acordo com a literatura, combinações de diferentes GFs seriam interessantes fórmulas para melhorar as etapas da cicatrização. Contudo, é crucial decifrar qual GF deve ser utilizado e quais combinações seriam administradas, para obter otimização dos processos de sinalização celular ao do reparo, bem como o entendimento de que como esses agentes biológicos exógenos iriam ser controlados e introduzidos no tecido alvo, considerando a natureza das interações dos GFs. A melhor formulação com adequada concentração necessária, seguida de uma distribuição local com controle espaço-temporal, favoreceriam a bioatividade dos GFs, na reconstituição tecidual (Schilephake, 2002; Uebersax *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010).

Com o objetivo de estudar o potencial de determinados fatores de crescimento exógenos, PDGF-BB e IGF-I, isolados ou combinados, este trabalho avaliou seus efeitos no reparo tecidual ósseo. PDGF é um mediador essencial, que produz enorme efeito quimiotático em osteoblastos e células-tronco precursoras, induzindo sua proliferação e o remodelamento tecidual durante o trauma ou infecção e, ao mesmo tempo, ativa osteoblastos, fibroblastos e células endoteliais (Schilephake, 2002; Allori *et al.*, 2008). Em tempo, há limitada evidência para as funções do PDGF em condição fisiológica normal, sendo

improvável que esse GF promova propriedades osteogênicas por si próprio (Schilephake, 2002; Andrae *et al.*, 2008). Tem sido hipotetizado que o PDGF-BB pode ser um conector central, entre angiogêneses e osteogêneses, podendo ser utilizado como potente agente terapêutico no reparo ósseo, pela mobilização e estimulação das células tronco-mesenquimais periféricas, em se organizar e multiplicar no local da injúria (Caplan and Correa, 2011).

Já o IGF-I estimula a mitose em células osteoprogenitoras e sua diferenciação, matando o crescimento geral, com aumento do número de osteoblastos maduros. Esse efeito numa administração local não demonstra claramente o real potencial para esse fator de crescimento, nas concentrações já testadas (Schilephake, 2002; Chen *et al.*, 2010).

A combinação de IGF-I com PDGF tem sido utilizada por alguns pesquisadores, na cicatrização do tecido epitelial (Wagner and Wehrmann, 2007), cartilagem (Schmidt *et al.*, 2006), tecido ocular (Etheredge *et al.*, 2009) e reparo ósseo (Pfeilschifter *et al.*, 1990; Canalis *et al.*, 1991; Becker *et al.*, 1992; Tanaka and Liang, 1995; Giannobile *et al.*, 1996; Howell *et al.*, 1997), confirmando o potencial promissor dessa combinação, na aplicação da promoção do reparo em defeitos ósseo-alveolares. Tanaka e colaboradores (2002) indicaram o IGF como o melhor estimulador para a expressão de marcadores para osteoblastos, em tecido ósseo maduro, sendo que o PDGF demonstrou pouco desse efeito. A associação entre PDGF-BB e IGF-I tem sido demonstrada na cicatrização óssea em modelos, animal e humano (Lynch *et al.* 1991a; 1991b).

Nesse estudo, foi observado que PDGF-BB, IGF-I e a associação desses dois fatores de crescimento, carregados por lipossomas, permitiram um efeito significativo, na capacidade reparadora do osso, quando comparada com sua



forma livre (sem lipossoma). Não houve diferença significativa, quando observado o desempenho entre os grupos tratados com os GFs carregados pelos lipossomas. Os presentes achados estão baseados no modelo *in vivo*, o qual representa critérios potenciais dentro dos fundamentos básicos do reparo ósseo e também suportaria a identificação de fatores estimulantes desse processo, numa aplicação terapêutica. Mais além, a evidência indica que o lipossoma poderia ser um dos potenciais fatores benéficos e um interessante nanobiomaterial, para a entrega de fatores de crescimento, na ciência da engenharia tecidual óssea.

De fato, foi observado que o reparo do osso alveolar ocorre mais rapidamente nos sítios tratados com a entrega de GFs, por meio de lipossomas, e conseqüentemente induziram altos níveis na expressão de moléculas reparativas, como: o VEGF e a osteocalcina essenciais para a promoção do reparo tecidual ósseo. Nesse contexto, esses dois agentes foram utilizados como marcadores de progresso do reparo, visto que o VEGF está diretamente relacionado ao processo da angiogênese, pelo seu papel na atração de novas células endoteliais, dentro do sítio injuriado para formar vasos sanguíneos e a osteocalcina, uma proteína chave secretada por osteoblastos, depositada na matriz extracelular, participando na regulação da função dos osteoblastos e no estágio de mineralização tecidual óssea. Desse modo, como mais osteoblastos foram formados no alvéolo, mais osteocalcina estava presente, bem como o aumento do número de vasos sanguíneos, na matriz, indicado pela presença de VEGF e sua atividade no tecido alvo.

Houve uma diferença significativa do número de células sanguíneas e o aumento da percentagem de osso alveolar, verificado após a comparação dos grupos dos GFs carregados pelos lipossomas com os outros grupos. Aos sete dias

após o procedimento cirúrgico, a análise imunoistoquímica identificou um significativo aumento na expressão de VEGF e osteocalcina, nos grupos tratados com PDGF-BB e IGF-I em lipossomas, associado ou sem associação, quando comparado aos outros grupos. Nos períodos remanescentes, não houve diferença estatística na expressão desses dois marcadores.

Osteocalcina é um dos indícios na interação entre cálcio e o metabolismo da glicose (Fernandez-Real and Ricart, 2011). Lin *et al.* (2011) executaram uma microdissecação laser (*laser capture microdissection* - LCM) para analisar uma expressão do perfil de genes, associados com a cicatrização de alvéolos dentários, após exodontia em ratos. Durante o processo de cicatrização, a expressão de osteocalcina foi lentamente aumentada e alcançou o pico de expressão, no dia 10. Os resultados imunoistoquímicos do presente trabalho, para a expressão de osteocalcina, concordam com isso, sendo que o pico foi observado aos 7 dias, no grupo dos GFs carregados pelos lipossomas.

Referente ao sistema de entrega (*delivery system*) utilizado, o presente trabalho indica o lipossoma como um carreador de sucesso, para a entrega controlada, proteção dos GFs da absorção inicial e de sua degradação pelas proteases. Isso está em acordo com os achados de Saddi *et al.* (2008), Alves *et al.* (2009) e Ferreira *et al.* (2013). Todavia, em tempo, deve-se observar que grande parte dos modelos de entrega estudada realiza a administração de GF tanto em injeção direta ou utilizando carreadores diferentes dos lipossomas, os quais mostram resultados insatisfatórios para a concentração espaço-temporal de GFs, porque devido à absorção direta, altas dosagens de GF não são seguras nos consequentes efeitos, no sítio em uma terapia (Schmidmaier *et al.*, 2002). Em

adição, há poucos estudos *in vivo* e o micromeio bucal, conhecidamente contaminado, é um desafio para o sucesso desse procedimento.

O presente trabalho foi executado com uma injeção experimental utilizando uma baixa concentração de GFs. Quando comparado com a administração direta, essa baixa concentração pode ser considerada uma vantagem terapêutica. A utilização de pequenas concentrações de GFs, administrados sem ou em associação, carregados por lipossomas, apresentam uma estratégia potencial. Os próximos parâmetros seriam incluir, em testes futuros, uma exata dosagem necessária, a interação, ou não, entre GFs e a viabilidade de receptores endógenos para proporcionar a ativação de GFs exógenos. Adicionais estudos devem ser realizados na ordem de clarear a exata função e dinâmica de interação do GF, em cada estágio da regeneração tecidual, incluindo: inflamação, formação do tecido de granulação, diferenciação celular, formação da matriz e remodelação.

Finalmente, faz-se importante destacar que, apesar de verificado um aumento significativo na porcentagem trabecular óssea, nos grupos onde os GFs foram carregados pelos lipossomas, o efeito sinergista entre IGF-I e PDGF-BB não foi observado. Como o PDGF-BB é envolvido na angiogênese e o IGF-I se apresenta como um estimulador osteogênico, pode ser possível que esses dois GFs participem em processos biológicos não simultâneos ou não consecutivos no reparo tecidual, assim, como não compartilham receptores, na competição de uma ativação bioquímica, podem não cooperar sinergicamente quando apresentadas em conjunto. Futuras pesquisas podem revelar as circunstâncias da completa função de cada um e suas interações. Atualmente, nosso conhecimento

humano é insuficiente sobre a completa e correta sequência da “cascata natural”, que conduz a cicatrização tecidual.

## **8. CONCLUSÕES**

- 1) A liberação local, constante e gradual, dos fatores de crescimento estudados (IGF-I e PDGF-BB), associados ou não, promovida pelos lipossomas acelerou o reparo ósseo alveolar em ratos.
- 2) Entretanto quando associados não foi observado o efeito sinergista, entre esses fatores de crescimento.
- 3) A expressão diferencial de marcadores osteogênicos, VEGF e Osteocalcina, em fases iniciais desse processo, suporta esses achados.
- 4) Essa metodologia representa uma estratégia terapêutica promissora à aceleração do reparo ósseo, em Odontologia e Medicina.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Allori AC, Sillon AM & Warren SM. (2008) Biological basis of bone formation, remodeling and repair – part I: biochemical signaling molecules. *Tissue Engineering*. 14(3): 259-273.
2. Alves JB, Ferreira CL, Martins AF, Silva GAB, Alves GD, Paulino TP, Ciancaglini P, Thedei Jr G & Napimoga MH. (2009) Local delivery of EGF–liposome mediated bone modeling in orthodontic tooth movement by increasing RANKL expression. *Life Sciences* 85: 693–699.
3. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Gene & Development* 22: 1276-1312.
4. Anitua E, Sanchez M, Orive G & Andia I. (2007) Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*. 29: 37-41.
5. Arosarena AO & Collins WL. (2005) Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngology: Head and Neck Surgery*. 132: 592-597.
6. Arosarena OA & Puleo D. (2007). In vitro effects of combined and sequential bone morphogenetic protein administration. *Arch Facial Plast Surg*. 9: 242–247.
7. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD & Isner JM. (1998) Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res*. 83(3): 233-240.
8. Balazs DA, Godbey WT. (2011) Liposomes for Use in Gene Delivery. *Journal of Drug Delivery* 2011: 326497.
9. Bartold PM. (1993) Plated-derived growth factor stimulates hyaluronate but not proteoglycan synthesis by human gingival fibroblast in vitro. *J Dent Res* 72: 1473-1480.

10. Basmanav FB, Kose GT & Hasirci V. (2008) Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials* 29: 4195-4204.
11. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K & Sanchez R. (1992) A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J. Periodontol.* 63: 929-940.
12. Bernstein A, Mayr HO & Hube R. (2010) Can Bone Healing in Distraction Osteogenesis Be Accelerated by Local Application of IGF-1 and TGF- $\beta$ 1? *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 92B: 215–225.
13. Bessho K, Carnes DL, Cavin R, Chen HY & Ong JL. (1999) BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. *Clin Oral Implants Res.* 10: 212–218.
14. Bodic F, Hamel L, Lerouxel E, Basle MF & Chappard D. (2005) Bone loss and teeth. *Join Bone Spine.* 72(3): 215-221.
15. Burchardt H. (1983) The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res.* 174: 28-42.
16. Canalis E., McCarthy TL & Centrella M. (1991) Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Annual Review of Medicine* 42: 17–24.
17. Caplan AI & Correa D. (2011) PDGF in Bone Formation and Regeneration: New Insights into a Novel Mechanism Involving MSCs. *Journal Orthopedic Research* 1: 1-9.
18. Cetrulo CL Jr, Knox KR, Brown DJ, Ashinoff RL, Dobryansky M, Ceradini DJ, Capla JM, Chang EI, Bhatt KA, McCarthy JG & Gurtner GC. (2005) Stem cells and distraction osteogenesis: endothelial progenitor cells home to the ischemic generate in activation and consolidation. *Plast Reconstr Surg.* 116(4): 1053-1064.

19. Chaudhary LR, Hofmeister AM & Hruska KA. (2004) Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone*. 34: 402–411.
20. Cheifetz S, Li IW, McCulloch CA, Sampath K & Sodek J. (1996) Influence of osteogenic protein-1 (OP-1;BMP-7) and transforming growth factor- $\beta$  1 on bone formation in vitro. *Connect Tissue Res*. 35: 71–78.
21. Chen FM, Zhang M & Wu ZF. (2010) Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. Review. *Biomaterials* 31: 6279-6308.
22. Civitelli R, Villareal A & Napoli N. (2009) Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteop Int* 20(6): 843-851.
23. Cremers S & Garnero P. (2006) Biochemical markers of bone turnover in the clinical development of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease: potential uses and pitfalls. *Drugs* 66:2031–2058.
24. Davidovitch Z. (1979) Bone Metabolism Associated with Tooth Eruption and Orthodontic Tooth Movement. *J Periodontol*. 50(4): 22-29.
25. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE & Lowik CW. (2000) Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 141:1667–1674.
26. Deckers MM, van Bezooijen RL, van Der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE & Löwik CW. (2002) Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor. *A Endocrinology* 143:1545-1553.
27. Dennison DK, Vallore DR, Pinero GJ, Rittman B & Caffesse RG. (1994) Differential effect of TGF- $\beta$ 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblast. *J Periodontol*. 65: 641-648.

28. Déry MA, Michaud MD & Richard DE. (2005) Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(3): 535-540.
29. Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G & Cenni E. (2008) Growth factors in bone repair. *Chi Organi Mov.* 92(3): 161-168.
30. Devlin H & Sloan P. (2002) Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxill Surg.* 31: 641-645.
31. Dimitriou R, Tsiridis E & Giannoudis PV. (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury. Int. J. Care Injured.* 36: 1392-1404.
32. Eckardt H, Bundgaard KG, Christensen KS, Lind M, Hansen ES & Hvid I. (2003) Effects of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 21: 335- 340.
33. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS & Hvid I (2005) Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model *J Bone Joint Surg* 87-B: 1434-1438
34. Eriksson U & Alitalo K. (1999) Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237: 41-57.
35. Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P & Worthington HV. (2006) The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 21: 696–710.
36. Etheredge L, Kane BP, Hassell JR. (2009). The effect of growth factor signaling on keratocytes in vitro and its relationship to the phases of stromal wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 3128–3136.
37. Fernandes, A.M., Silva, G.A.B., Lopes Junior, N., Napimoga, M.H., Benatti, B.B. & Alves, J.B. (2008) Direct capping of human pulps with a dentin bonding



system and calcium hydroxide: an immunohistochemical analysis. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics* **105**: 385-90.

38. Fernandez-Real JM, Ricart W. (2011) Osteocalcin: a new link between bone and energy metabolism. Some evolutionary clues. *Curr Opin Clin Nutr Meta Care* 14, 360–366.

39. Ferreira CL, Abreu FAM, Silva GAB, Silveira FF, Barreto LBA, Paulino TP, Miziara MN & Alves JB. (2013) TGF- $\beta$ 1 and BMP-4 carried by liposomes enhance the healing process in alveolar bone. *Arch Oral Biol.* 58(6): 646-656.

40. Garnero P, Grimaux M, Seguin P & Delmas PD. (1994) Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 9: 255–264.

41. Giannobile WV, Finkelman RD & Lynch SE. (1994a) Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J. Periodontal Res.* 65: 1158-1168.

42. Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiristy CP & D'Andrea M. (1996) Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB, insulin-like growth factor-I alone and in combination on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontol Res.* 31: 301-312.

43. Giannobile WV, Whitson SW & Lynch SE. (1994b) Synergistic effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) with other growth factors on bone formation in vitro (abstract). *J Dent Res.* 73 (Spec Iss): 205.

44. Giannobile WV, Whitson SW & Lynch SE. (1997) Non-coordinate control of bone formation displayed by growth factor combinations with IGF-I. *J Dent Res* 76: 1569-1578.

45. Graham S, Leonidou A, Lester M, Heliotis M, Mantalaris A & Tsiridis E. (2009) Investigating the role of PDGF as a potential drug therapy in bone formation and fracture healing. *Expert Opin Invest Drugs* 18: 1633–1654.

46. Graves DT, Valentin-Opran A, Delgado R, Valente AJ, Mundy G & Pinche J. (1989) The potential role of platelet-derived growth factor as an autocrine and paracrine factor for bone cells. *Connect Tissue Res.* 23: 209-218.
47. Grundes O & Reikeras O. (1992) Blood flow and mechanical properties of healing bone. Femoral osteotomies studied in rats. *Acta Orthop Scand* 63:487–491.
48. Haigh JJ, Gerber HP, Ferrara N & Wagner EF. (2000) Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development* 127: 1445-1453.
49. Hallman M & Thor A. (2008) Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol 2000.* 47: 172-192.
50. Heldin CH, Westermark B & Wasteson A. (1981) Specific receptors for platelet-derived growth factor on cells derived from connective tissue and glia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78: 3663-3668.
51. Hill PA. (1998) Orth M. Bone Remodeling. *Brit J Orthod.* 25(2): 101-107.
52. Hock JM & Canalis E. (1994) Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication but not differentiated function of osteoblast. *Endocrinol* 134: 1423-1428.
53. Hock JM, Centrella M & Canalis E. (1998) Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology.* 122(11): 254-260.
54. Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S & Friedlaender GE (2008). Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 90 (Suppl. 1):48–54.
55. Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV & Lynch SE. (1997). A phase/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human

insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J. Periodontol.* 68: 1186-1193.

56. Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH & Mooney DJ. (2005) Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Miner Res.* 20: 848–857.

57. Hubbell, JA. (1999) Bioactive biomaterials. *Current Opinion in Biotechnology* 10:123-129.

58. Izuka T, Häfliger J, Seto I, Rahal A, Mericske-Stern R & Smolka K. (2005) Oral rehabilitation after mandibular reconstruction using an osteocutaneous fibula free flap with endosseous implants - factors affecting the functional outcome in patients with oral cancer. *Clinical of Oral Implants Research.* 16(1): 69-79.

59. Johansson B, Grepe A, Wannfors K & Hirsch JM. (2001b) A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofac Radiol.* 30: 157–161.

60. Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Aberg P & Hirsch JM. (2001a) Volumetry of simulated bone grafts in the edentulous maxilla by computed tomography: an experimental study. *Dentomaxillofac Radiol.* 30: 153–156.

61. Johnson LC, Stradford HT, Geis RW, Dineen JR & Kerley E. (1963) Histogenesis of stress fractures. *J BoneJoint Surg* 45A: 1542.

62. Junior, JGB & Garrafa, V. (2007) Bioética e biosegurança: uso de biomateriais na prática odontológica. *Rev. Saúde Públ.* 41(2): 223-228.

63. Kanyama M, Kuboki T, Akiyama K, Nawachi K, Miyauchi FM, Yatani H, Kubota S, Nakanishi T & Takigawa M. (2003) Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Arch Oral Biol.* 48: 723-730.

64. Kloen P, Di Paola M, Borens O, Richmond J, Perino G, Helfet DL & Goumans MJ. (2003) BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone.* 33: 362–371.

65. Kohno S, Kaku M, Tsutsui K, Motokawa M, Ohtani J, Tenjo K, Tohma Y, Tokimasa C, Fujita T, Kawata T & Tanne K. (2003) Expression of Vascular

Endothelial Growth Factor and the Effects on bone Remodeling during Experimental Tooth Movement. *J Dent Res.* 82(3):177-182.

66. Krishnan V & Davidovitch Z. (2006) Cellular, Molecular and tissue – level reactions to orthodontic force. *Am J. Orthod Dent Orthop.* 129: 469e.1-460e.32.

67. Lalani Z, Wong M, Brey EM, Mikos AG, Duke PJ, Miller MJ, Johnston C & Montufar-Solis D. (2005) Spatial and temporal localization of FGF-2 and VEGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *J Oral Maxill Surg.* 63: 1500-1508.

68. Lamano Carvalho TL, Bombonato KF & Brentegani LG. (1997) Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Braz Dentl J.* 8(1): 9-12.

69. Lamberg A, Bechtold JE, Baas J, Søballe K & Elmengaard B. (2009) Effect of local TGF- $\beta$ 1 and IGF-1 release on implant fixation: comparison with hydroxyapatite coating A paired study in dogs. *Acta Orthopaedica* 80 (4): 499–504.

70. Laron Z, Anin S, Klipper-Aurbach Y & Klinger B. (1992) Effects of insulin-like growth factor on linear growth, head circumference, and body fat in patients with Laron-type dwarfism. *Lancet.* 339: 125-128.

71. Lasic DD. (1998) Novel Applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* 16(7): 307-321.

72. Lasic, DD. Liposomes: from physics to applications, Elsevier. Amsterdam. 580 p., 1993.

73. Lean JM, Jagger CJ, Chambers TJ & Chow JW. (1995) Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am J Physiol.* 268: E318.

74. Lee AJ, Hodges JS & Eastell R. (2000) Measurement of osteocalcin. *Am Clin Biochem.* 37:432-46.

75. Lee SH & Shin H. (2007). Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 59: 339–359.
76. Lekic P, Rubbino I, Krasnoshtein F, Cheifetz S, McCulloch CAG & Tenenbaum H. (1997). Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. *Anat Rec.* 247; 329-340.
77. Levi B, James AW, Wan DC, Glotzbach JP, Commons GW & Longaker MT. (2010) Regulation of Human Adipose-Derived Stromal Cell Osteogenic Differentiation by Insulin-Like Growth Factor-1 and Platelet-Derived Growth Factor- alfa. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 126 (1): 40-52.
78. Levy A, Levy N, Wegner S & Goldberg M. (1995) Transcriptional regulation of the rat VEGF gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 270, 13333-13340.
79. Lieberman JR, Daluiski A & Einhorn TA. (2002) The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 84(A): 1032–1044.
80. Lin Z, Rios HF, Volk SL, Sugai JV, Jin Q & Giannobile WV (2011). Gene Expression Dynamics During Bone Healing and Osseointegration. *J Periodontol* 82, 1007-1017.
81. Lindhe J, karring T & Lang NP. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro: 4. ed., 720 p., 2005.
82. Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP & Gander B.(2004) Localized delivery of growth factors of bone repair. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 58: 197-208.
83. Lynch, S.E., de Castilla, G.R., Williams, R.C., Kiritsy, C.P., Howell, T.H., Reddy, M.S., Antoniades, H.N. 1991a. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J. Periodontol.* 62, 458-467.
84. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH & Williams RC. (1991b). Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-

I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J. Periodontol.* 62: 710-716.

85. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howel TH, Reddy MS & Zappa UE. (1989) A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol.* 16: 545-548.

86. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI & Genco RJ. (1992) Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol.* 63: 515-525.

87. Matsuo T, Sugita T, Kubo T, Yasunaga Y, Ochi M & Murakami T. (2003) Injectable magnetic liposomes as a novel carrier of recombinant human BMP-2 for bone formation in a rat bone-defect model. *J. Biomed. Mater. Res.* 66(A): 747-754.

88. McKay WF, Peckham SM & Badura JM. (2007) A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE® Bone Graft) *International Orthopaedics (SICOT)* 31:729–734.

89. McKenzie JA & Silva MJ. (2011) Comparing histological, vascular and molecular responses associated with woven and lamellar bone formation induced by mechanical loading in the rat ulna. *Bone* 48: 250–258.

90. Mendes RM, Silva GAB, Lima MF, Calliari MV, Almeida AP, Alves JB & Ferreira AJ. (2008). Sodium hyaluronate accelerates the healing process intooth sockets of rats. *Archives of Oral Biology.* doi:10.1016/j.archoralbio.2008.07.001.

91. Mieszawska & Kaplan. (2010) Smart biomaterials - regulating cell behavior through signaling molecules *BMC Biology* . 8: 59-65.

92. Miranda SCCC; Silva GAB; Hell RCR; Martins MD; Alves JB & Goes AM. (2011) Three-dimensional culture of rat BMMSCs in porous chitosan-gelatin scaffold: a promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. *Arc. Oral Biol.*; 56: 1-15.

93. Nauth A, Ristevski B, Li R & Schemitsch EH. (2011) Growth factors and bone regeneration: How much bone can we expect? *Injury, Int. J. Care Injured* 42: 574–579.

94. Nimni ME. (1997) Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials* 18(8): 1201-1225.
95. Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Kloss F & Neukam FW. (2001) Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 12: 495-502.
96. Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT & Słootweg MC. (1998) Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 19: 55-63.
97. Oliveira PT, Oliva MA, Maximiano WMA, Sebastião KEV, Crippa GE, Ciancaglini P, Beloti MM, Nanci A & Rosa AL. (2008) Effects of a Mixture of Growth Factors and Proteins on the Development of the Osteogenic Phenotype in Human Alveolar Bone Cell Cultures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 56(7): 629–638.
98. Oréface, RL, Pereira, MM & Mansur, HS. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Editora Cultura Médica, Rio de Janeiro, 538p., 2006.
99. Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A, Gronwald RG, Minne HW & Ziegler R. (1990) Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: A comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor beta. *Endocrinology* 127: 69–75.
100. Piche JE, Carnes DL & Graves DT. (1989) Initial characterization of cells derived from the human Periodontia. *J Dent Res.* 68: 761-767.
101. Price PA, Parthemore JG & Deftos LJ. (1980) New biochemical marker for bone metabolism. *J Clin Invest.* 66: 878-883.
102. Prista LN, Alves AC & Morgado RMR. *Técnica farmacêutica e farmácia Galênica*. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.3 1934p., 1996
103. Raiche AT & Puleo DA. (2004) In vitro effects of combined and sequential delivery of two bone growth factors. *Biomaterials.* 25: 677–685.
104. Ramoshebi LN, Matsaba TN, Teare J, Renton L, Patton J, Ripamonti U. (2002) Tissue engineering: TGF- $\beta$  superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Expert Rev Mol Med.* 4: 1–11.

105. Ranke MB, Savage MO, Chatelain PG, Preece MA, Rosenfeld RG, Blum WF & Wilton P. (1995) Insulin-like growth factor I improves height in growth hormone insensitivity: two years' results. *Horm Res* 44: 253.
106. Raschke M, Wildemann B, Inden P, Bail H, Flyvbjerg A, Hoffmann J, Hass NP & Schmidmaier G. (2002) Insulin-like Growth Factor-1 and Transforming Growth Factor-1 Accelerates Osteotomy Healing Using Polylactide-coated Implants as a Delivery System: A Biomechanical and Histological Study in Minipigs. *Bone* 30:144 –151.
107. Rasubala L, Yoshikawa H, Islam AAS, Nagata K, Lijima T & Ohishi A. (2004) Comparison of the healing process in plated and non-plated fractures of the mandible in rats. *Brit J Oral Maxill Surg.* 42: 315-322.
108. Reis-Filho CR, Silva ER, Martins, AB, Pessoa FF, Gomes PV, Araújo MS, Miziara MN & Alves JB. (2011) Demineralised human dentine matrix stimulates the expression of VEGF and accelerates the bone repair in tooth sockets of rats . *Archives of Oral Biology, 31:* 350-358.
109. Riggs BL, Tsai KS & Mann KG. (1986) Effect of acute increases in bone matrix degradation on circulating levels of bone-Gla protein. *J Bone Miner Res* 1:539–542.
110. Roethy W, Fiehn E, Suehiro K, Gu A, Yi GH, Shimizu J & Wang J. (2001) A growth factor mixture that significantly enhances angiogenesis in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 299: 494–500.
111. Rose FR, Hou Q & Oreffo RO. (2004) Delivery systems for bone growth factors: the new players in skeletal regeneration. *J Pharm Pharmacol.* 56: 415–427.
112. Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE & Charette MF. (1992) Platelet-derived growth factor stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodontol Res.* 27: 285-290.



113. Saddi KR, Alves GD, Paulino TP, Ciancaglini P & Alves JB. (2008) Epidermal growth factor in liposomes may enhance osteoclast recruitment during tooth movement in rats. *Angle Orthodontics* 78:604–609.
114. Samad A, Sultana Y & Aqil M.(2007) Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. *Current Drug Delivery* 4: 297-305.
115. Sanches MJP, Glindon ER, Gil ML; Guirado JLC & Sanches CP. (2010) Biomaterials for bone regeneration. *Med.Oral.Patol.Cir.Bucal*; 15(3): 517-522.
116. Santos NC & Castanho MARB. (2002) Liposomes: has the magic bullet hit the target? *Quím. Nova*. 25(6B): 1181-1185.
117. Sasaki T & Watanabe C. (1995) Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*. 16(1): 9-15.
118. Schliephake H. (2002) Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 31: 469–484.
119. Schmidmaier G, Wildemann B, Heeger J, Gäbelein T, Flyvbjerg A, Bail, HJ, Raschke M. (2002). Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- $\beta$ 1. *Bone* 31, 165-172.
120. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Fuchs T, Stemberger A, Flyvbjerg A, Haas NP & Raschke M. (2001) Local Application of Growth Factors (Insulin-Like Growth Factor-1 and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1) From a Biodegradable Poly (D,L-lactide) Coating of Osteosynthetic Implants Accelerates Fracture Healing in Rats. *Bone*. 28:341–350.
121. Schmidmaier G, Wildemann B, Lubberstedt M, Haas NP & Raschke M. (2003) IGF-I and TGF- $\beta$ 1 incorporated in a poly (D,L-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture. *J Biomed Mater Res* 65B:157–162.
122. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. (2006). A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 403–412

123. Shibuya M. (2006) Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39 (5): 469-478.
124. Shing YC, Devlin H, Riccardi D & Sloan P. (1999). Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. *Arch Oral Biol*. 44: 751-757.
125. Simon, F & Kotler, P. A construção de biomarcas globais: levando a biotecnologia ao mercado. Artmed Editora SA, São Paulo, 300p. 2004.
126. Siqueira Jr JF & Dantas CJS. Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação. Ed. Medsi, Rio de Janeiro, 238 p., 2000.
127. Spencer EM, Liu CC, Si EC & Howard GA. (1991) In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats. *Bone*. 12; 21-35.
128. Springer IN, Terheyden H, Geiss S, Harle F, Hedderich J & Acil Y. (2004) Particulated bone grafts—effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res*. 15: 205-212.
129. Street J, Bao M, Deguzman L, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, Bruggen NV, Redmond HP, Carano RAD & Filvaroff EH. (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Nat Acad Sci USA*. 99(15): 9656-9661.
130. Tami AE, Nasser P, Schaffler MB & Knothe Tate ML. (2003) Noninvasive fatigue fracture model of the rat ulna. *J Orthop Res*. 21(6): 1018–1024.
131. Tanaka H, Liang CT. (1995) Effect of platelet-derived growth factor on DNA synthesis and gene expression in bone marrow stromal cells derived from adult and old rats. *Journal of Cellular Physiology* 164, 367–375.
132. Tayalia P, Mooney DJ. (2009) Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Advanced Materials* 21, 3269-3285.

133. Teófilo JM, Brentegani LG & Lamano Carvalho TL. (2001) A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipine on bone healing after tooth extraction. *Arch Oral Biol.* 46: 375-379.
134. Tombran-Tink J & Barnstable CJ. (2004) Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 316(2): 573-579.
135. Trippel SB. (1997) Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect.* 46: 473–476.
136. Uebersax L, Merkle HP, Meinel L. (2009) Biopolymer-based growth factor delivery for tissue repair: from natural concepts to engineered systems. *Tissue Engineering* 15: 263-289.
137. Wagner W & Wehrmann M. (2007) Differential cytokine activity and morphology during wound healing in the neonatal and adult rat skin. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11: 1342–1351.
138. Yugoshi LI, Sala MA, Brentegani LG & Lamano Carvalho TL. (2002). Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Braz Dent J.* 13(2): 92-96.
139. Zhang N, Ping QN, Huang GH & Xu WF. (2005) Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carries for oral administration. *Int. J. Pharm.* 294: 247-259.
140. Zied IC, Milanezi LA, Okamoto T & Okamoto R. (2005) Estudo histológico do processo de reparo alveolar em ratos após exodontia e pressão com compressa de gaze embebida em solução de peróxido de hidrogênio. *Revista Odontológica de Araçatuba.* 26(1): 9-13.

## ANEXO I



### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CETEA -

#### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 207/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Fatores de crescimento e o reparo ósseo alveolar em ratos**", que tem como responsável(is) **José Bento Alves**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 08/2010**.

Este certificado expira-se em **11/ 08/ 2015**.

#### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 207/2009**, related to the project entitled "**Growth factors and alveolar bone repair in rats**", under the supervisors of **José Bento Alves**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 11, 2010**.

This certificate expires in **August 11, 2015**.

Belo Horizonte, 13 de Agosto de 2010.

**Prof<sup>a</sup>. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)

## Effect of PDGF-BB, IGF-I Growth Factors and their Combination Carried by Liposomes in Tooth Socket Healing

Fernando Antônio Mauad de Abreu<sup>1</sup>, Cynthia Lopes Ferreira<sup>1</sup>, Gerluza Aparecida Borges Silva<sup>1</sup>, Camila de Oliveira Paulo<sup>2</sup>, Melissa Nunes Miziara<sup>2</sup>, Frank Ferreira Silveira<sup>3</sup>, José Bento Alves<sup>1,2</sup>

This work evaluated the bone-forming potential of the platelet-derived growth factor isoform BB (PDGF-BB), insulin-like growth factor I (IGF-I), and mixed PDGF-BB/IGF-I delivered in liposomes compared with phosphate buffered saline (PBS), in the healing process of rat tooth sockets. One hundred and twelve Wistar rats were randomized into 7 groups of 16 animals each and were evaluated at 3, 7, 14 and 21 days after extraction of the maxillary second molars. The left sockets were treated with PBS (P), empty liposome (L), IGF-I in PBS (IP), IGF-I in liposome (IL), PDGF-BB in PBS (PDP), PDGF-BB in liposome (PDL) and both growth factors (GFs) together within liposomes (PDIL). The right sockets were filled with blood clot (BC). Histological and histomorphometric analyses were used to evaluate the formation of new bone and blood vessels. Immunohistochemistry was performed to evaluate the expression of osteocalcin and vascular endothelial growth factor (VEGF) during bone repair. Data were tested statistically using a Tukey's test according to a Dunn's analysis and Mann-Whitney U test followed by Kruskal-Wallis one-way analysis. Results were considered significant when  $p < 0.05$ . A significantly higher percentage of bone trabeculae and a higher number of blood vessels were observed in the IL, PDL and PDIL groups ( $p < 0.05$ ). However, these GF-liposome groups had statistically similar results. Immunohistochemical assays first detected osteocalcin and VEGF expression at 3 days followed by a peak at 7 days. Lower immunoreactivity levels were observed in the BC, L, P, IP and PDP groups compared with the IL, PDL and PDIL groups ( $p < 0.05$ ). The results suggest that GFs carried by liposomes, either in isolated or mixed forms, enhanced the healing process in rat tooth sockets. The differential expression of the osteogenic markers VEGF and osteocalcin in the early phases of bone healing support these findings.

### Introduction

After tooth extraction, alveolar bone resorption is followed by size and shape remodeling (1) and leads to progressive and irreversible reduction in the height and width of the alveolar ridge, which can cause problems for dental implant placement. Regenerative bone techniques with autografts, allografts and xenografts have been used as alternatives to diminish alveolar bone resorption (2,3).

Growth factors (GFs) are proteins responsible for regulating the cellular stages of tissue regeneration (4,5). During the bone healing process several GFs, such as platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF), transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), bone morphogenetic protein (BMP) and fibroblast growth factor (FGF), are released and act as mitogenic and angiogenic signals during the initial steps of bone regeneration (6).

IGF is an important factor for tissue regeneration. IGF plays an essential role in the general growth and maintenance of the body bone frame, by promoting local differentiation of bone cells and stimulating osteogenesis by the activation of the osteocalcin promoter, a protein

secreted by osteoblasts that plays a role in mineralization, as well as it works as a negative regulator of bone formation. Specifically, IGF-I has been shown to promote the differentiation of bone cells in autocrine and paracrine fashions (4,7).

PDGF is known to have a role in angiogenesis because it is an effective activator of osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. This glycoprotein exists in five different isoforms and is naturally abundant inside the bone matrix (8). PDGF is highly mitogenic and has been used to heal bone defects, alone or in association with different biomaterials (9). The PDGF isoform BB (PDGF-BB), considered the universal PDGF because of its ability to bind to all known receptor isotypes (5), works as a central connector between the pathways, and could thus be used as a powerful therapeutic agent for controlling osteogenesis during bone regeneration (10). Because IGFs may be used as adjuvant factors to enhance bone repair, and considering that the application of cytokines is similar to the natural pattern of GFs released during bone healing, combining IGF-I with PDGF may be a promising strategy to promote

<sup>1</sup>Laboratory of Oral and Development Biology, Department of Morphology, Biological Sciences Institute, UFMG - Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Biopathology and Molecular Biology, UNIUBE - University of Uberaba, Uberaba, MG, Brazil

<sup>3</sup>Laboratory of Oral Biology, Department of Dentistry, PUCMG - Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence: Dr. Frank Ferreira Silveira, Avenida Dom José Gaspar, 500, Coração Eucarístico, 30535-901 Belo Horizonte, MG, Brasil. Tel: +55-031-3319-4444. e-mail: frankfou@uol.com.br

Key Words: growth factor, PDGF, IGF, liposome, bone repair.



bone regeneration in bone defects around implants or after periodontal bone loss (4).

The tissue-engineering field focused on a search for efficient GF delivery systems, because the current strategies using tissue scaffolds provided limited results, and demands are increasing for treatments that reduce damage to the patient (11). Liposomes are versatile small spherical vesicles used to carry small drug molecules, proteins, nucleotides or plasmids in Biology, Biochemistry and Medicine (12). These small spherical vesicles can be produced from cholesterol, nontoxic surfactants, sphingolipids, glycolipids, long chain fatty acids and even membrane proteins (13), and they present advantageous properties, such as biodegradation, integration with lipophilic and hydrophilic molecules and the possibility of directing and controlling drug delivery (11). Our research group has recently, demonstrated that epidermal growth factor (EGF) carried by liposomes enhanced osteoclast recruitment and increased orthodontic tooth movement, until fourteen days (12-14).

At present, no data are available regarding the actions of PDGF-BB, IGF-I and the combination of these two GFs with liposome on alveolar bone tissue after tooth extraction. The objective of this study was to evaluate the bone-forming potential of PDGF-BB, IGF-I and mixed PDGF-BB/IGF-I, associated with liposome or phosphate buffer saline (PBS) and the efficacy of liposome for growth factor delivery in healing tooth sockets of rats after extraction of the maxillary second molar, by histological and morphometric analyses. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and osteocalcin expression were also evaluated, considering their potential to indicate bone repair.

## Materials and Methods

### *PDGF-BB and IGF-I Liposome Preparation*

PDGF-BB and IGF-I liposomes were prepared according to Alves et al. (13), as follows. The GFs were dissolved in 1 mL of 10 mM acetic acid containing 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) at a final concentration of 0.2 µg/mL and stored at -20°C. The liposomes were obtained by sonication, using a solution of 12.0 mg/mL dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) and 1.2 mg/mL lysophosphatidyl choline (LPC) dissolved in 4 mL of chloroform and 10 µL of PDGF-BB or IGF-I solution, to produce homogeneous unilamellar vesicles with an approximately 100 nm diameter.

### *Animal Sampling and Surgical Protocol*

One hundred and twelve male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 250-300 g were included in this study. Concerning the limitation of the animal model compared with human, the rat alveolar bone has often been used as an ideal tissue for studying bone remodeling because this bone balances resorption and bone formation, maintains

similar spatial orientation of these activities and has a high bone turnover rate.

The animals were maintained in plastic cages with access to food and water *ad libitum*. Prior to the surgical procedures, they were allowed to acclimatize to the laboratory environment. All animal handling procedures followed the Brazilian College of Animal Experimentation Guidelines and the study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Federal University of Minas Gerais (Protocol #207/2009). Rats were anesthetized with a mixture of 10% ketamine and 2% xylazine (1:1, 0.1 mL/100g body weight, i.m.) and subjected to maxillary second molar (right and left) extraction.

### *Study Design*

The animals were randomly chosen and divided into 7 groups of 16 animals each as follows: P: administration of 1 µL of PBS alone; L: administration of empty liposomes in 1 µL of PBS solution; PDP: administration of 20 ng of PDGF-BB in 1 µL of PBS solution; IP: 20 ng of IGF-I in 1 µL of PBS solution; PDL: 20 ng of PDGF-BB + liposomes in 1 µL of PBS solution; IL: 20 ng of IGF-I + liposomes in 1 µL of PBS solution; and PDIL: 20 ng of IGF-I + 20 ng of PDGF-BB + liposomes in 1 µL of PBS solution. Each solution was injected into the left sockets using a micro-syringe (Hamilton, Bonaduz, Switzerland). To avoid interfering with the delicate healing site, suture was not used after the surgical procedure and the rats were maintained immobilized in the supine position for approximately 4 h, the duration of anesthesia and time for clot formation and stabilization. In addition, the animals received pasty chow for 2 days after surgery (14) to prevent displacement and/or disjunction of the blood clot. The right sockets from all animals were used as a control (blood clot - BC), without drug administration.

At days 3, 7, 14 and 21 after drug administration, four animals from each group were sacrificed by decapitation under anesthesia with 10% ketamine hydrochloride (Dopalen®; Vetbrands, São Paulo, SP, Brazil) and 2% xylazine hydrochloride (Ronpum®; Bayer, São Paulo, SP, Brazil) both drugs were 0.1 mL/100g body weight, delivered intramuscularly. The animals were used for histological, morphometric and immunohistochemical analyses.

### *Tissue Processing*

After fixation, the maxillars were decalcified in a decalcifying solution of 10% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; Sigma-Aldrich, Munich, Germany) for 3 months. After that time, the tissues were briefly washed in running tap water, dehydrated and embedded in paraffin. Each sample was serially sliced into 5 µm sections along the sagittal plane. Sections were mounted on glass slides and stained with hematoxylin eosin (HE) for

histological and morphometric analyses or processed for immunohistochemistry. The sections were first observed on a light microscope (Axiostar Plus; Carl Zeiss, Jena, Germany) and analyzed by considering, for both control and experimental sockets, the patterns of organization and maturation of the connective tissue that fills the alveoli, presence of bone cells (osteoblasts, osteoclasts), newly formed bone tissue and blood vessels, and detection of inflammatory reactions. Usually, maxillary second molars present 4 roots: two distal and two medial. According to Mendes et al. (15), each socket was anatomically divided into apical, middle and cervical thirds (Fig. 1).

#### *Histomorphometric Analysis*

The morphometric analysis was performed according to previous works (13,16), as follows. At least 3 randomly chosen sections were evaluated for each group. The images were obtained from apical (bottom), middle and cervical (upper) thirds of the distal root of the sockets (Fig. 1). Afterwards, the total area of each sample was measured and the trabecular area was determined. The percentage of trabecular bone area of each captured field was obtained by dividing the trabecular area by the total area using the AxioVision release 4.8 software (Carl Zeiss). The number of blood vessels was counted as previously described (13), using a grid with vertical and horizontal lines placed on the photomicrograph, with the aid of a confocal assistant 4.02 software (Chapel Hill, NC, USA). Vessels located on the grid line intersections were counted by a trained person as described by Reis-Filho et al. (16). The histological evaluation was performed several times by the examiner and the experienced researcher confirmed the results. The examiner was considered a trained counter only after his evaluation of the results reached 90% similarity.

#### *Immunohistochemistry Analysis*

Additional sections were mounted on glass slides and processed for immunohistochemistry, as previously described (13), to evaluate VEGF and osteocalcin expression. Briefly, slides were pretreated with 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich) immersed for 3 min in xylene to eliminate the paraffin, dehydrated in absolute alcohol and rehydrated with Tris-buffered saline (TBS) (Sigma-Aldrich). The sections were then rinsed in TBS and immersed in 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min and incubated for 30 min at 90 °C for antigen detection. Slides were incubated in 2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature to reduce non-specific binding. The slides were then incubated with anti-VEGF ([C-1] sc-7269; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) or anti-osteocalcin antibodies (Mouse monoclonal [OC4-30] ab-13418; ABCAM Cambridge, UK) for 2h at 37 °C and

then rinsed with TBS three times for 3 min each. Sections were incubated with the appropriate secondary biotinylated antibody from Link System (Universal LSAB™+ Kit/HRP, Rb/ Mo/Goat K0690-1; Dako A/S, Glostrup, Denmark) for 30 min at 37 °C. After washing, the sections were incubated with peroxidase-conjugated streptavidin for 30 min at room temperature. Next, the slides were treated with a solution containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.05%) and 1mg/mL DAB (1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitoldiaminobenzidine; Sigma-Aldrich) for 30 min, and then rinsed in Tris-HCl buffer (pH=7.4). Slides were counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated and mounted. Staining specificity was tested by omission of the primary antibody. To determine the amount of immunostained cells, randomly chosen sections were measured for both experimental and control sides. The slide images were obtained using a capture plate and a microscope (Axiostar Plus, Carl Zeiss) interfaced with a personal computer and AxioVision release 4.8 software (Carl Zeiss).

The intensity of immunostaining was assessed individually in a blind fashion by 2 trained examiners (kappa index 0.91) (17). The immunostaining reaction was classified according to the relative staining intensity as no immunoreactivity (zero), weak but visible staining intensity [1], moderate staining intensity [2] or strong staining intensity [3].

#### *Statistical Analysis*

The collected data were statistically tested using a Tukey's test according to a Dunn's analysis and Mann-Whitney U non-parametric test followed by Kruskal-Wallis one-way analysis. All groups were evaluated three times, and results were considered significant when  $p < 0.05$ .

## **Results**

Following the criteria recommended for reliability of biological analysis of bone repair, a histological evaluation of the healing process was performed at portions of the distal root, by scanning the central part of the injured sockets, including the apical (bottom), middle and cervical (upper) thirds. Bone formation at the remaining periodontal ligament was not considered (Fig. 1).

During the wound healing process, classic typical tissue repair events were observed, such as blood clot rising and maturation, infiltration of the coagulum by fibroblasts, and establishment of a provisional matrix. In the 3-day rat sockets, the alveoli from the BC, L, P, PDP and IP groups were filled with a blood clot on the apical, middle and cervical thirds (Fig. 2A). When compared with those groups, the alveoli from the PDL, IL and PDIL groups exhibited histological traits compatible to advanced bone repair, which included the replacement of most of the blood clot



with a provisional matrix consisting of dilated blood vessels, mesenchymal cells, fibers and scattered inflammatory cells (Fig. 2B). No pattern differentiation among the groups treated with GF-liposome was observed.

At day 7 the formation of trabeculae in the BC, L, P, PDP and IP groups (Fig. 3A) was verified rising from the alveoli base and the presence of cellular connective tissue including small vessels and intertwined fine collagen fibers. However, the progress of alveoli repair in the groups

receiving GFs in liposomes was characterized by complete replacement of the blood clot, with connective tissue exhibiting homogenous matrix, and presented advanced organization of the first primary trabeculae at the apical and middle thirds of the alveoli (Fig. 3B).

At 14 days after surgery, the BC, L, P, PDP and IP groups had alveoli in a pronounced process of bone formation, where the primary osseous tissue filled the apical and middle alveoli (Fig. 4A), while the PDL, IL and PDIL groups were found to be more advanced, showing mature bone trabeculae in the osteon and medullar spaces (Fig. 4B).

New bone tissue partially filled all alveoli groups at 21 days after extraction. Therefore, the GF-liposome treated groups (PDL, IL and PDIL) always showed a more enhanced stage of development. The histometric studies showed a statistically higher percentage ( $p < 0.05$ ) of newly formed bone trabeculae in alveoli (Fig. 5) at 7, 14 and 21 days after the surgical procedure, as well as an enhanced number of vessels (Fig. 6) ( $p < 0.05$ ) at 7 days after the surgical procedure in sockets from the PDL, IL and PDIL groups compared with the BC, L, P, IP and PDP groups.

The spatial and temporal expressions of osteocalcin and VEGF, two important molecules involved in wound repair, were also evaluated in alveoli from all tested groups. A stronger expression of VEGF at 7 days in groups treated with GF-liposome (isolated or in combination) compared with the remaining assessed groups was identified (Figs. 7A and 7B and Table 1). Then decrease was observed in the next stages (14 and 21 days). Histoquantitative data confirmed the histological analysis and indicated a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in VEGF expression at the

F.A.M. de Abreu et al.

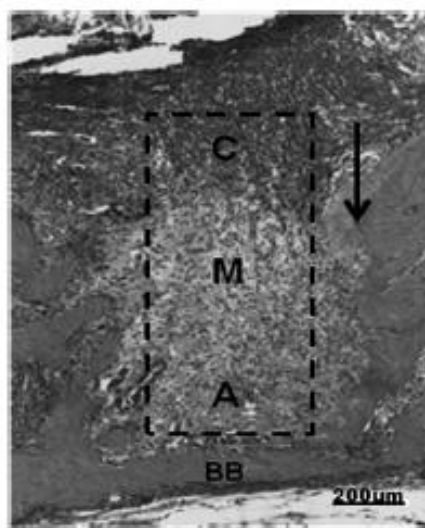


Figure 1. Histological section of a rat socket showing the delimited area assessed in this study. A: apical third; M: middle third; and C: cervical third of alveoli. BB: basal bone. The black arrow indicates a portion of the periodontal ligament, which was not included in the analysis. Bar = 200 μm.

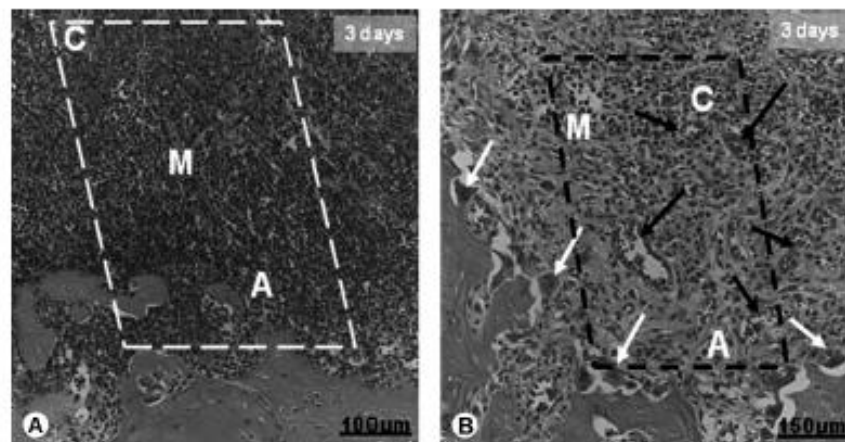


Figure 2. Representative HE-stained photomicrographs of groups at 3 days after the surgical procedure. (A) BC, L, P, IP, PDP groups. The apical, medium and cervical thirds of the alveoli are filled with a blood clot and intense inflammatory infiltrate. Bar = 100 μm. (B) IL and PDL groups showing the medium and apical thirds of the alveoli, a connective tissue with a fine fiber network and dilated blood vessels (black arrows) among fibroblastoid cells, which characterize the provisional matrix. The cervical third maintains the acute inflammatory infiltrate. Bar = 150 μm. The white-delimited area represents the extracted socket from all treatment groups and for each observation period, to allow a comparative evaluation of the treatment outcome. A: apical third; M: middle third; and C: cervical third of alveoli. Black arrows: vessels. White arrows: osteoclasts.



7-day stage. Osteocalcin expression in the alveoli from the PDL, IL and PDIL groups peaked at 7 days in connective tissue cells filling the alveoli, and the labeling remained in the osteogenic cells and osteoblasts during the next stages, as shown in Figures 8A and 8B, and Table 1.

### Discussion

The physiological events that follow the "wound healing cascade" led to the integration of a wide variety of GFs to recapitulate and mimic the natural microenvironments of tissue formation and repair. Because the physiology of

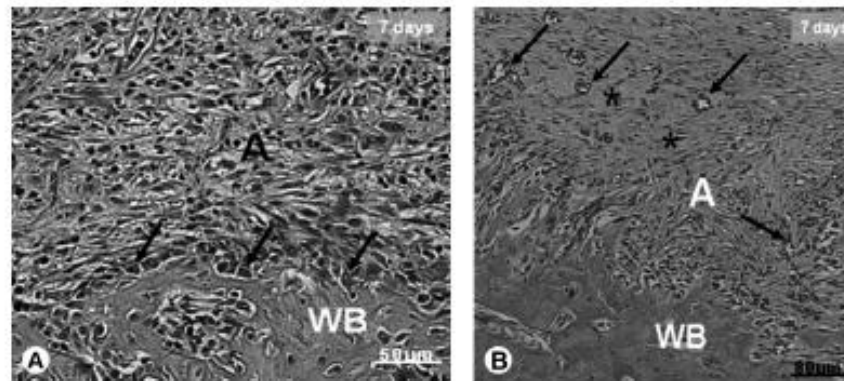


Figure 3. Representative HE-stained photomicrographs of groups at 7 days after the surgical procedure. (A) BC, L, P, IP and PDP groups showing the deposition of immature osseous matrix, characterizing the primary trabeculae of woven bone (WB); the arrows indicate osteoblasts near to the trabeculae. Bar = 50 µm; (B) PDL, IL and PDIL groups demonstrating the organization and thickening of bone trabeculae; abundant blood vessels (arrows) and intercellular matrix enriched with collagen fibers are shown (\*). A: apical third. Bar = 80 µm.

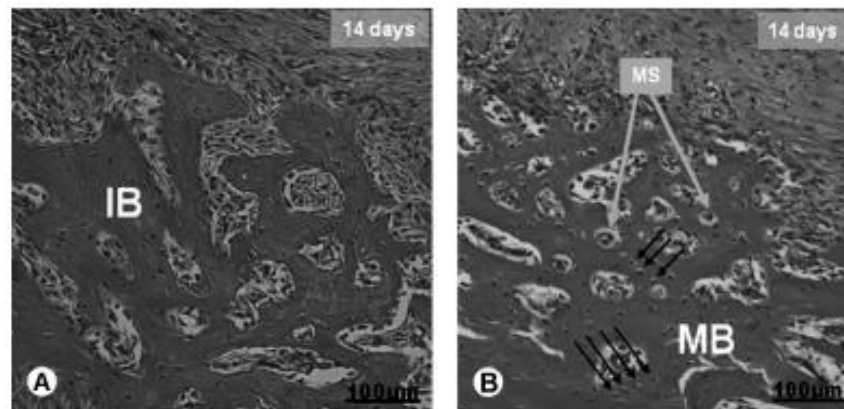


Figure 4. Representative HE-stained photomicrographs of groups at 14 days after the surgical procedure. (A) BC, L, P, PDP and IP groups showing the presence of bone trabeculae in the apical third and part of the middle third. Histological features of the immature bone (IB) are demonstrated. (B) PDL, IL and PDIL groups showing the presence of dense bone trabeculae with histological aspects suggesting osseous maturation, such as small medullar spaces (MS), and osteocytes organization (arrows). MB: Mature bone. Bar = 100 µm.

Table 1. Staining levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and osteocalcin at 7 days in the investigated areas.

	BC	L	P	PDP	IP	PDL	IL	PDIL
VEGF								
Endothelial cells	0.23±0.03 <sup>a</sup>	0.19±0.06 <sup>a</sup>	0.17±0.05 <sup>a</sup>	0.18±0.09 <sup>a</sup>	0.17±0.02 <sup>a</sup>	2.1±0.8 <sup>b</sup>	2.7±0.35 <sup>b</sup>	2.9±0.75 <sup>b</sup>
Osteocalcin								
Osteoblasts/fibroblasts	0.42±0.08 <sup>a</sup>	0.26±0.04 <sup>a</sup>	0.22±0.04 <sup>a</sup>	0.26±0.07 <sup>a</sup>	0.27±0.05 <sup>a</sup>	2.3±0.7 <sup>b</sup>	2.6±0.45 <sup>b</sup>	2.8±0.56 <sup>b</sup>

Data are presented as mean and standard deviation of the mean from all sections analyzed per area. a,b letters represent intra-group analysis. Different letters differ statistically (p>0.05).

alveolar bone is maintained by a complex orchestration of GF matrix molecules (e.g., osteopontin, and osteocalcin), immunologic mediators and cytokines, the controlled delivery of exogenous GFs to targets has shown to be efficient when performed in combination with biological carriers that allow the GFs to properly induce and enhance the healing process (4,6,10,12,14,18).

Based on previous (6,13,14) and present findings, was raised the hypothesis that liposomes promote the regulation of the concentration and spatiotemporal gradient of factors in rat tooth sockets. This hypothesis considers that the liposome matrix allows GFs to act at the place and time required by the therapy by increasing the retention of GFs at the treatment sites for sufficient time to allow cells to migrate to the injured area, proliferate and differentiate. Consequently, if the liposome drug delivery system improves GF bioavailability, therapy using these agents would become more advantageous, powerful and less invasive, whereas

the frequency and target of administration could be optimized in a manner to minimize overdosing and allow more objective and localized stimulation (4).

The histological and histoquantitative results of the current work identified an accelerated repair process during the evaluated periods. The repair process was more pronounced in the groups treated with isolated or combined GFs within liposomes, when compared with the other groups (BC, L, P, PDP and IP).

Therefore, it was postulated that the exogenous GFs were released properly and constantly following the wound requirement for those bioagents to assist the enrolment of mesenchymal cells to differentiate and reframe the alveoli.

The presence of multiple GFs is believed to be essential for most tissue regeneration processes (4), and according to the literature, combinations of different GFs may reveal interesting formulas to improve wound healing. Nevertheless, which GFs should be used and which combinations could be suitably administered to obtain enhanced repair signaling is crucial to decipher. In addition, an understanding of how these exogenous biological agents should be controlled and delivered to the injured tissue needs to be achieved. The nature of GF interactions, the best formulations that allow release with spatiotemporal control, the adequate GF concentration required, the most precise location of GFs and the length of GFs activity around the recovering tissue need to be considered (4).

With the aim of evaluating the potential of isolated or combined exogenous GFs on bone regeneration, this work assessed the effects of exogenous PDGF-BB and IGF-I on bone tissue repair. PDGF-BB is hypothesized to be a central connector between angiogenesis and osteogenesis, and could thus be used as a powerful therapeutic agent for bone regeneration and repair, by mobilizing and stimulating pericytes (mesenchymal stem cells) to organize and reproduce inside the wound (10).

In addition, IGF-I stimulates osteoprogenitor cell mitosis

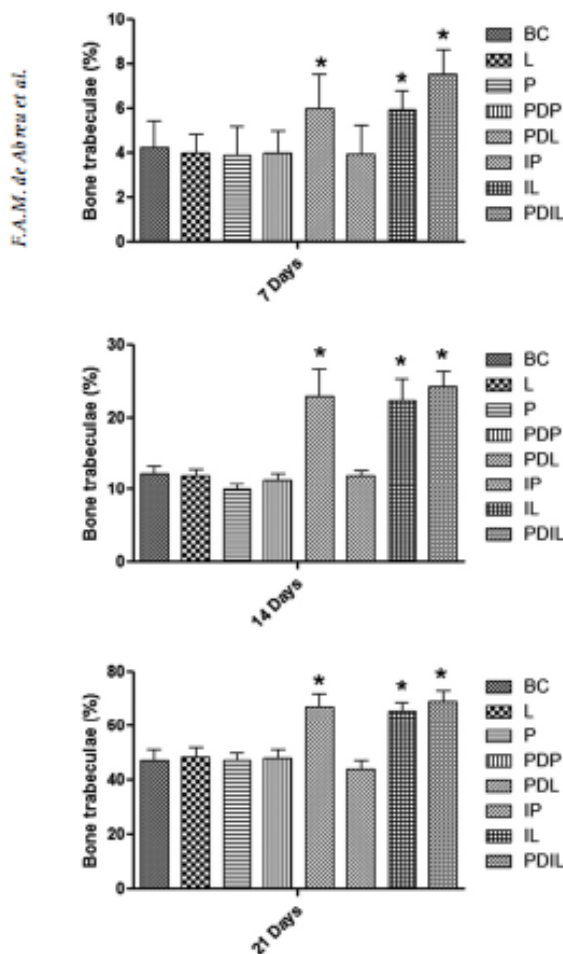


Figure 5. Quantification of bone trabeculae in tooth sockets at 7, 14 and 21 days after surgical procedures. Data are shown as mean  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$ .

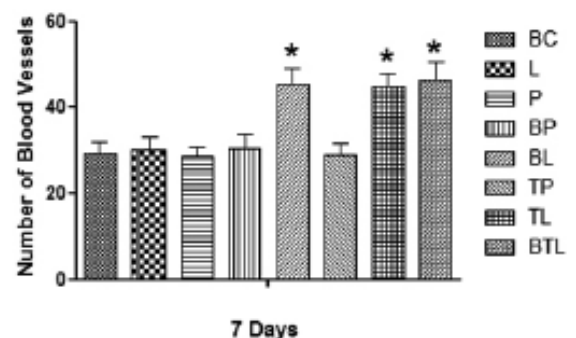


Figure 6. Quantification of blood vessels in tooth sockets at 7 days after surgical procedure. Data are shown as mean  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$ .



and differentiation for maintaining general growth, which increases the number of mature osteoblasts. However, the effects of IGF-I local administration did not clearly reveal the actual potential of this GF for enhancing tissue regeneration for the already tested concentrations (4). Prior researchers studied the occurrence of IGF system members in the periodontium and alveolar bone of rat (7) and showed that the PDL acts as a reservoir of IGF components and that these GFs are involved in resorption processes, clastic activities, cementum homeostasis, odontoblast biology, fibrosis and pulp formation.

The combination of IGF-I with PDGF was effectively used by some researchers to heal soft tissues (19,20) and bone (21-23), confirming the promising potential of this combined application for promoting bone regeneration

in alveolar bone defects around implants or even after periodontal bone loss. Tanaka et al. (24) indicated IGF as a better stimulator of osteoblast marker expression in old bone and that PDGF slightly improves this effect. The PDGF-BB/IGF-I combination has an important role as a bone healing enhancer in both animal and human models (21).

In this study, it was found that PDGF-BB, IGF-I and the combination of these two GFs carried by liposomes may have a significant effect on bone repair capacity when compared with its free form (no liposomes). No significant differences were observed between the performances of the GF-liposome groups. The current findings are based on an *in vivo* model, which has the potential to permit further insight into the underlying mechanisms of bone repair and could support the identification of factors that stimulate

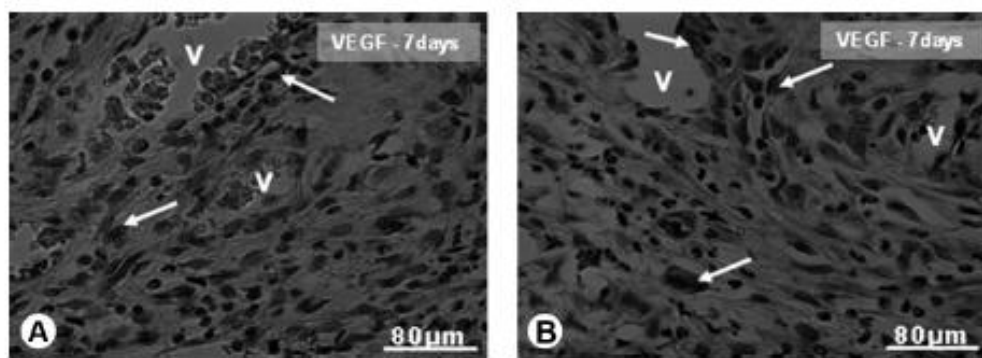


Figure 7. Representative photomicrographs of VEGF immunoreactivity in sockets at 7 days after the surgical procedure. (A) Sockets filled with a blood clot (BC) are indicated, and the BC, L, P, PDP, IP groups show weak reactivity (arrows). (B) Strong immunoreactivity is found in the PDL, IL and PDIL groups (arrows) V: Vessels. Bar = 80 μm.

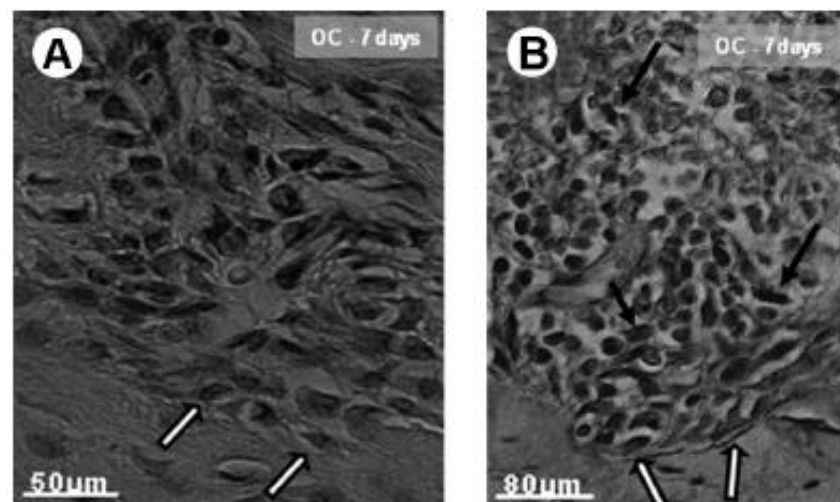


Figure 8. Representative photomicrographs of osteocalcin (OC) immunoreactivity in sockets at 7 days after the surgical procedure. (A) Sockets filled with blood clot (BC) are shown, and BC, L, P, PDP, IP groups show weak reactivity in osteoblasts (arrows). Bar = 50 μm. (B) Strong immunoreactivity in osteoblasts (white arrows) and fibroblasts (black arrows) is observed in the PDL, IL and PDIL groups. V: Vessels. Bar = 80 μm.

the process in therapeutic approaches. Further evidence indicated that liposomes could be potential beneficial factors and an interesting biomaterial for delivering GFs in bone tissue engineering.

In fact, it was observed that alveolar bone repair occurs quicker in sites treated with GFs delivered within liposomes and consequently induces higher expression levels of reparative molecules such as VEGF and osteocalcin, which are essential to promote bone tissue repair. These two agents were indicative (markers) of the repair progress because VEGF is directly related to angiogenesis, by its role in the attraction of new endothelial cells into the injured site to form blood vessel. Osteocalcin, a key protein secreted by osteoblasts and settled in the extracellular matrix participates in the regulation of osteoblast function and the bone tissue mineralization stage. Thus, as more osteoblasts are formed in the alveoli, more osteocalcin will be present in the wound. In addition, the increasing number of blood vessels in the matrix indicates VEGF activity in the injured tissue.

In addition to the significant difference in the number of blood cells and the increase in trabecular bone in the GF-liposome groups at seven days after the surgical procedure, the conducted immunohistochemical analyses identified a significant increase in VEGF and osteocalcin expression in the groups treated with PDGF-BB and IGF-I in liposomes, alone or in combination, when compared with the other groups. At the remaining periods, no significant differences in the expression pattern of these two markers were observed when comparing the GF-liposome groups with the BC, L, P, PDP and IP groups that received no GFs or had the GFs directly inserted without the carrier.

Concerning the used delivery system, the present work indicates liposomes as successful carriers for the controlled release and preservation of GF biological activity by protecting the GF from early absorption and degradation by proteases. This result agrees with those of other studies (6,12-14). However, most of the currently studied delivering models used GF administration either through direct insertion or non-liposome carriers. These studies showed unsatisfactory results for spatiotemporal GF concentration and exposure time within the targeted site, especially because of direct absorption, unsafe levels of GFs and the consequent side effects of this type of therapy (25). In addition, few *in vivo* studies have been performed, and the alveolar microenvironment, a contaminated area, is a challenge for the success of the procedure.

In the present work, the insert experiment was performed using low concentrations of GFs when compared with direct administration. This procedure could be considered an advantageous therapy because of the diminished side effects that exogenous GF dosages could cause to patients.

This type of treatment using small concentrations of GFs administered alone or combined in liposomes became a potential strategy in the last few years. Therefore, the parameters to be studied in future tests include the exact GF needed dosage, the interaction or non-interaction between combined GFs, and the availability of endogenous GF receptors for properly activating the exogenous GF dosages. In addition, further studies should be performed to clarify the exact function and interaction dynamics of each GF at each stage of tissue regeneration, including inflammation, formation of granulation tissue, cell differentiation, matrix formation and remodeling.

Importantly, an increased percentage of trabecular bone was verified in GF-liposome groups, but no synergistic effect between IGF-I and PDGF-BB was observed. As PDGF-BB is involved in angiogenesis and IGF-I is an osteogenic stimulator, these two GFs may participate in non-simultaneous or non-consecutive steps of repair because these GFs do not share receptors competing for biochemical activation and may not cooperate synergistically when together. Future research may reveal the circumstances in which these GFs juxtapose or complete each other's functions. Currently, the knowledge of the complete and correct sequence of the natural signaling cascade that leads a tissue to heal is insufficient.

In conclusion, the study data suggest that GFs carried by liposomes, in either isolated or combined forms, enhanced the healing process in rat tooth sockets. The differential expression of the osteogenic markers VEGF and osteocalcin in the early phases of bone healing support these findings.

## Resumo

Este trabalho avaliou o potencial de formação óssea do fator de crescimento derivado de plaquetas na isoforma BB (PDGF-BB), fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), e a mistura PDGF-BB/IGF-I administrada em lipossomas comparando com tampão fosfato salino (PBS), no processo de cicatrização de alvéolos dentários de ratos. Cento e doze ratos Wistar foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos de 16 animais cada e foram avaliados aos 3, 7, 14 e 21 dias após a extração dos segundos molares maxilares. Os alvéolos esquerdos foram tratados com PBS (P), lipossomas vazios (L), IGF-I em PBS (IP), IGF-I em lipossomas (IL), PDGF-BB em PBS (PDP), PDGF-BB em lipossomas (PDL) e ambos os fatores de crescimento (GFs) em associação dentro de lipossomas (PDIL). Os alvéolos direitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo (BC). As análises histomorfométrica e histológica foram utilizadas para avaliar a formação de novo osso e vasos sanguíneos. Imunohistoquímica foi realizada para avaliar a expressão de osteocalcina e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) durante o reparo ósseo. Os dados foram testados estatisticamente utilizando o teste de Tukey em acordo com análise de Dunn e o teste Mann-Whitney U seguido pela análise de um passo de Kruskal-Wallis. Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Uma percentagem altamente significativa de osso trabecular e alto número de vasos sanguíneos foram observados nos grupos IL, PDL e PDIL ( $p < 0,05$ ). Todavia, esses grupos lipossoma-GF tiveram resultados similares estatisticamente. Ensaios de imunohistoquímica inicialmente detectaram a expressão de osteocalcina e VEGF aos 3 dias, seguida por um pico aos 7 dias. Níveis mais baixos de imunoreatividade foram observados em BC, L, P, PI e PDP quando comparados com os grupos IL, PDL e PDIL.



( $p < 0,05$ ). Os resultados sugerem que GFs carregados por lipossomas, na forma isolada ou em combinação, aceleram o processo de cicatrização em alvéolos dentários de rato. A expressão diferencial dos marcadores osteogênicos VEGF e osteocalcina, nas fases iniciais de cicatrização óssea, confirma esses achados.

## Acknowledgements

This study was supported in part by PAPE-PRPq (Pró-Reitoria de Pesquisa - UNIUBE) and FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais).

## References

- Araújo MG, Lindhe J. Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation: An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:545-549.
- Pelegrine AA, Costa CES, Correa MEP, Marques Junior JFC. Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:535-542.
- Fernandes PG, Novaes Junior AB, Queiroz AC, Souza SLS, Taba Junior M, Palioto DB, et al. Ridge preservation with acellular dermal matrix and anorganic bone matrix cell-binding peptide P-15 after tooth extraction in humans. *J Periodontol* 2011;82:72-79.
- Chen FM, Zhang M, Wu ZF. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Review. Biomaterials* 2010;31:6279-6308.
- Javed F, Al-Askar M, Al-Rasheed A, Al-Hezaimi K. Significance of the platelet-derived growth factor in periodontal tissue regeneration. *Arch Oral Biol* 2011;56:1476-1484.
- Ferreira CL, Abreu FAM, Silva GAB, Silveira FE, Barreto LBA, Paulino TP, et al. TGF- $\beta$ 1 and BMP-4 carried by liposomes enhance the healing process in alveolar bone. *Arch Oral Biol* 2013;58:646-656.
- Götz W, Kunert D, Zhang D, Kowarizadeh A, Lossdörfer S, Jäger A. Insulin-like growth factor system components in the periodontium during tooth root resorption and early repair processes in the rat. *Eur J Oral Sci* 2006;114:318-327.
- Allori AC, Sallou AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair - Part I: Biochemical signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14: 275-283.
- Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehrani A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: A preliminary report. *J Cran Maxil Faci Surg* 2011;40:2-7.
- Caplan AL, Correa D. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *J Orthop Res* 2011;29:1795-1803.
- Liu J, Xu L, Li Y, Ma J. Temporally controlled multiple-gene delivery in scaffolds: A promising strategy to enhance bone regeneration. *Med Hypotheses* 2011;76:173-175.
- Saddi KR, Alves GD, Paulino TP, Ciancaglini P, Alves JB. Epidermal growth factor in liposomes may enhance osteoclast recruitment during tooth movement in rats. *Angle Ortho* 2008;78:604-609.
- Alves JB, Ferreira CL, Martins AF, Silva GAB, Alves GD, Paulino TP, et al. Local delivery of EGF-liposome mediated bone modeling in orthodontic tooth movement by increasing RANKL expression. *Life Sci* 2009;85:693-699.
- Marquez L, de Abreu FA, Ferreira CL, Alves GD, Mizziara MN, Alves JB. Enhanced bone healing of rat tooth sockets after administration of epidermal growth factor (EGF) carried by liposome. *Injury* 2012;44:558-564.
- Mendes RM, Silva GAB, Lima MF, Caliarí MV, Almeida AP, Alves JB, et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol* 2008;53:1155-1162.
- Reis-Filho CR, Silva ER, Martins AB, Pessoa FF, Gomes PV, Araújo MS, et al. Demineralised human dentine matrix stimulates the expression of VEGF and accelerates the bone repair in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol* 2011;31:350-358.
- Fernandes AM, Silva GAB, Lopes Junior N, Napimoga MH, Benatti BB, Alves JB. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium hydroxide: an immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:385-390.
- Tayalia P, Mooney DJ. Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Adv Mater* 2009;21:3269-3285.
- Wagner W, Wehrmann M. Differential cytokine activity and morphology during wound healing in the neonatal and adult rat skin. *J Cell Mol Med* 2007;11:1342-1351.
- Etheredge L, Kane BP, Hassell JR. The effect of growth factor signaling on keratocytes in vitro and its relationship to the phases of stromal wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3128-3136.
- Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol* 1991;62:710-716.
- Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K, et al. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol* 1992;63:929-940.
- Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontol Res* 1996;31:301-312.
- Tanaka H, Wakisaka A, Ogasa H, Kawai S, Liang CT. Effect of IGF-I and PDGF administered in vivo on the expression of osteoblast-related genes in old rats. *J Endocrinol* 2002;174:63-70.
- Schmidmaier G, Wildemann B, Heeger J, Göttsche T, Flyvbjerg A, Bail HJ, et al. Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- $\beta$ 1. *Bone* 2002;31:165-172.

Received April 29, 2013

Accepted July 13, 2013



**7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

**8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial:** (Período de Graça):  
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

**9. Procurador (74)**

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

**10. Listagem de seqüências Biológicas** (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).  
 Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.  
 Listagem de seqüências em formato impresso: fls.  
 Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

**11. Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):  
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	20 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	3 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	14 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Anexo dos Inventores, Anexo de depositantes, Portaria nº 042 Declarações				7 fls.

**12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11):** 46 fls.

**13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.**

Belo Horizonte, 01/08/2011

Local e Data



Assinatura e Carimbo

Prof. Renato de Lima Santos  
Pró-Reitor de Pesquisa / UFMG  
Delegação de Competência  
Portaria nº 042 / 2010

## ANEXO DE DEPOSITANTES

**Título: MESA CIRÚRGICA PARA ANIMAIS DE PEQUENO PORTE**

Página 1

---

Nome: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG  
Qualificação: Fundação  
CNPJ / CPF / Número INPI: 213949888000183  
Endereço Completo: Rua Raul Pompéia, 101, 11º andar, Bairro São Pedro - Belo Horizonte - MG  
CEP: 30330-080  
Telefone: (31) 3409-4774  
FAX: (31) 3409-6430  
E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

---

## ANEXO DE INVENTORES

**Título: MESA CIRÚRGICA PARA ANIMAIS DE PEQUENO PORTE**

Página 1

---

Nome: Fernando Antônio Mauad de Abreu  
Qualificação: Pesquisador  
CPF: 02687629618  
Endereço Completo: Rua São Julião, 440, Apto 602, Bairro Nova Floresta, Belo Horizonte - MG  
CEP: 31140-230  
Telefone: (31) 3409-4774  
FAX: (31) 3409-6430  
E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

---

Nome: Luiz Bertoldo da Costa Filho  
Qualificação: Pesquisador  
CPF: 300587326-91  
Endereço Completo: Rua Castelo Belmonte, 370, Apto 101, Bairro Castelo - Belo Horizonte - MG  
CEP: 31330-080  
Telefone: (31) 3409-4774  
FAX: (31) 3409-6430  
E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

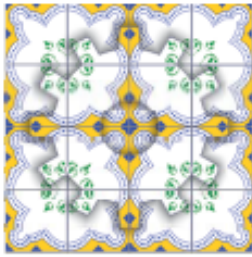
---

Nome: José Bento Alves  
Qualificação: Professor  
CPF: 076858406-00  
Endereço Completo: Rua Custódio de Melo, 39, Bairro Liberdade - Belo Horizonte - MG  
CEP: 31270-790  
Telefone: (31) 3409-4774  
FAX: (31) 3409-6430  
E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

---

Número de patente aprovado: **PI 1103967-1**





## DEVELOPMENT OF A SURGICAL TABLE FOR GENERAL AND ODONTOLOGICAL SURGERIES IN SMALL ANIMALS

Luiz Bertoldo Costa Filho, [luizbcfilho@ibest.com.br](mailto:luizbcfilho@ibest.com.br)<sup>1</sup>  
Gerluza Aparecida Borges Silva, [gerluza@terra.com.br](mailto:gerluza@terra.com.br)<sup>2</sup>  
Fernando Antonio Mauad Abreu, [fmauadabreu@yahoo.com.br](mailto:fmauadabreu@yahoo.com.br)<sup>2</sup>  
Matheus Henrique Santos Assis, [matheushenriquesantos@hotmail.com](mailto:matheushenriquesantos@hotmail.com)<sup>3</sup>  
Igor Daniel Garcia Reis, [igorbiomedicina@hotmail.com](mailto:igorbiomedicina@hotmail.com)<sup>2</sup>  
Antônio Eustáquio de Melo Pertence, [pertence@demec.ufmg.br](mailto:pertence@demec.ufmg.br)<sup>4</sup>  
Peterson Antônio Dutra, [peterstonperio@gmail.com](mailto:peterstonperio@gmail.com)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program of Master Degree in Implantology, PUCMG. Av. Dom José Gaspar, 500, 30535-610. BH, MG, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Oral and Development Biology, Department of Morphology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte Av. Antônio Carlos, 6627, 31 270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>3</sup>José do Rosário Vellano University, Unifenas, Rua Boaventura, 50, 31270-020, BH, MG, Brazil

<sup>4</sup>Laboratory of Machine Design, Department of Mechanical Engineering, University of Minas Gerais, Belo Horizonte Av. Antônio Carlos, 6627, 31 270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil

**Abstract:** Research to looking for bone repair accelerate in Odontology have been considerably valorized. The bone tissue is fundamental to re-establishing of masticatory function of the patients, with prostheses backing or implants. The vast majority of studies utilize intra-buccal bone defects developed in dogs or primates, which are adequate by facility of intraoral surgical access. But, the use of these animals is difficult by ethics questions, costs and necessity of specific vivarium. Intra-buccal surgeries in small animals as mice, rats and rabbits, are limited by little opening of maxillary; difficult on visualization of surgical field and limited space for irrigate and aspirate systems, fundamental items to utilization of dentistry motors. Moreover, the necessity of protection of tongue, lips, cheeks, require auxiliary hands, to making the visual field even more limited. This study shows the development of the surgical table with specific resources for intraoral proceeding in small animals, improving its realization on safe form, standardized and in minor time, eliminating the need for assistant operator. The model presents a platform removable and sterilized, with possibility of heating; height regulation and different inclinations by means of screw adjustable feet, mechanism atraumatic to fixation of the animals; intelligent support for surgical instruments, dental tool and/or intraoral retractors, allowing several rotation, height positions and different angulations. Odontology researches and mechanics engineering professionals contributed for the development of the project, with the financial support of Fapemig. The deposition of the patent request on National Institute of Industrial propriety was accomplished by Technological Transfer and Innovation, CITT/UFMG. The equipment represents a methodological advance and opens perspectives for numerous studies in the oral cavity or outside, in animal models of low cost and easy availability.

**Keywords:** Bioengineering; Surgical Table; Small Animals; Bone Defect; Odontology



CONEM 2012 «Engenharia em destaque»  
VII Congresso Nacional de Engenharia Mecânica  
São Luís - Maranhão - Brasil  
31 de julho a 03 de agosto  
www.abcm.org.br/conem2012

## DESENVOLVIMENTO DE UMA MESA CIRÚRGICA PARA CIRURGIAS GERAIS E ODONTOLÓGICAS EM ANIMAIS DE PEQUENO PORTE

Luiz Bertoldo Costa Filho, luizbcfilho@ibest.com.br<sup>1</sup>  
Gerluza Aparecida Borges Silva, gerluza@terra.com.br<sup>2</sup>  
Fernando Antonio Mauad Abreu, fmauadabreu@yahoo.com.br<sup>2</sup>  
Matheus Henrique Santos Assis, matheushenriquesantos@hotmail.com<sup>3</sup>  
Igor Daniel Garcia Reis, igorbiomedicina@hotmail.com<sup>2</sup>  
Antônio Eustáquio de Melo Pertence, pertence@demec.ufmg.br<sup>4</sup>  
Peterson Antônio Dutra, petersonperio@gmail.com<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Mestrado em Implantodontia, PUCMG. Av. Dom José Gaspar, 500, 30535-610. BH, MG, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento; Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, 31 270-901. Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>3</sup>Universidade José do Rosário Vellano, Unifenas, Rua Boaventura, 50, 31270-020, BH, MG, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Projetos Mecânicos, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31 270-901. Belo Horizonte, MG, Brasil

**Resumo:** Pesquisas visando a aceleração do reparo ósseo em Odontologia têm sido extremamente valorizadas. O tecido ósseo é de fundamental para o restabelecimento da função mastigatória dos pacientes, como apoto para próteses ou implantes. A maioria dos estudos utilizam modelos de defeitos ósseos intra-bucats desenvolvidos em cães ou primatas, adequados pela facilidade de acesso cirúrgico intraoral. Mas, a utilização desses animais é dificultada por questões éticas, pelo custo e necessidade de biótipos específicos. Cirurgias intrabucats em pequenos animais como camundongos, ratos e coelhos são limitadas pela pequena abertura dos maxilares; difícil visualização do campo cirúrgico e espaço limitado para o sistema de irrigação e de aspiração, fundamentais quando da utilização de motores odontológicos. Além disso, a necessidade de proteção dos tecidos moles- língua, lábios, bochechas, demanda mãos auxiliares, tornando o campo visual ainda mais restrito. O presente estudo apresenta o desenvolvimento de uma mesa cirúrgica com recursos específicos para procedimentos intra-orais em animais de pequeno porte, aperfeiçoando sua realização de forma segura, padronizada e em menor tempo, dispensando-se a necessidade de operadores auxiliares. O modelo conta com uma plataforma (leito cirúrgico) removível e esterilizável, com possibilidade de aquecimento e controle da temperatura; regulagem de altura e diferentes inclinações por meio de pés rosqueáveis; mecanismo de sustentação e fixação atraumática dos animais; suporte inteligente para instrumentais cirúrgicos e/ou afastadores intraorais permitindo inúmeros giros, posições de altura e diferentes angulações dos mesmos. Pesquisadores odontólogos e profissionais da engenharia mecânica contribuíram para o desenvolvimento do projeto, com apoto financeiro da Fapemig. O depósito de pedido de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial foi realizado por meio do CTIT/UFMG. A matéria tratada representa um avanço metodológico e abre perspectivas promissoras para inúmeros estudos em cavidade oral ou fora dela, em animais de pequeno porte, modelos de baixo custo e fácil disponibilidade.

**Palavras-chave:** Bioengenharia; Mesa cirúrgica; Pequenos animais; Defeitos ósseos; Odontologia.

### 1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios para a Odontologia é a reposição do tecido ósseo, essencial para o restabelecimento da função mastigatória dos pacientes, seja por próteses ou por implantes dentários. Nesse sentido, as pesquisas que tratam de alternativas para a aceleração da cicatrização óssea ou da reposição do tecido ósseo, como a avaliação de diferentes tipos de enxertos, biomateriais, células tronco e osteogênicas para bioengenharia tecidual óssea, têm sido extremamente valorizadas (Healy e Guldberg, 2007; Matsuno et al, 2010, Szpalski et al., 2010) A validação científica do uso de biomateriais como substitutos ósseos requer a avaliação do seu comportamento biológico em modelos animais. Alguns defeitos ósseos têm sido experimentalmente desenvolvidos in vivo para fins de pesquisa sobre a regeneração óssea. Entretanto, é importante considerar nos estudos de reparo/enxertos ósseos, os sítios cirúrgicos envolvidos; ou seja, as áreas doadoras e receptoras criadas nos modelos animais. Preferencialmente, os sítios receptores devem ter a mesma origem embrionária das áreas doadoras. Em se tratando dos defeitos ósseos crânio-faciais e maxilares, considera-se como condição ideal trabalhar com modelos ósseos de mesma origem embrionária; ou seja, de origem



intramembranosa. Esta condição justifica-se pelo tipo de neoformação de osso alveolar, tecido ósseo que suporta os dentes nos maxilares, o que ocorre por ossificação intramembranosa. Por meio desse processo de ossificação, ocorre um padrão direto de deposição óssea a partir do mesênquima (Brugnam et al., 2010). Os modelos de defeitos ósseos mais usualmente empregados em pesquisas, incluindo os estudos sobre a aplicabilidade dos biomateriais ou dos enxertos em odontologia, são criados em tíbias, em fêmures e em calota craniana de ratos e de coelhos. Desses, somente a calvária possui a desejável origem intramembranosa (Berghlund et al., 2003). O processo de cicatrização óssea nos ossos fêmur e tibia progride por ossificação endocondral, diferente do que ocorre nos maxilares.

Além da importância da origem embrionária dos sítios de reparo ósseo, outros fatores diretamente relacionados ao sítio cirúrgico, como as características do meio bucal podem influenciar na evolução do processo cicatricial e interferir na interpretação dos resultados. Defeitos ósseos criados em tíbias, fêmures e calvárias constituem sítios cirúrgicos extra-orais, portanto, livre de fatores como bactérias, fluxo salivar, alterações de pH e de forças mastigatórias, o que inviabiliza a extrapolação direta dos resultados para clínica odontológica.

Alguns estudos que simulam os defeitos ósseos, como exemplo, as fraturas de mandíbula, os múltiplos implantes ou os enxertos ósseos em bloco têm utilizado modelos de defeitos ósseos criados nos maxilares de cães ou maxilares de primatas (Lynch et al., 1991; Kim et al., 2005). Tais animais constituem modelos adequados para cirurgias intraorais, devido ao amplo campo visual, com acesso cirúrgico direto e com a utilização dos recursos técnicos similares aos disponibilizados na clínica odontológica (Elsalanty et al., 2009; Barone et al., 2011; Giannobile et al., 1994; Zhou et al., 2010). Entretanto, não representam uma realidade acessível à maioria dos laboratórios de pesquisa científica, tanto por questões éticas, quanto pelo custo e pelas condições específicas de manejo e espaço para manutenção desses animais em biotério. Poucos estudos intra-orais têm sido realizados em animais de pequeno porte, ratos e camundongos, modelos de baixo custo e mais acessíveis aos laboratórios de pesquisa na área da Odontologia. Possivelmente, uma das razões para a deficiência de estudos em defeitos ósseos intraorais nesses modelos experimentais decorre da dificuldade técnica para a realização dos procedimentos intraorais em animais de pequeno porte. De fato, o acesso intraoral aos maxilares de ratos, camundongos, coelhos, especialmente quando o procedimento cirúrgico exige o corte por instrumentos rotatórios elétricos sob irrigação, é limitado por alguns fatores, tais como:

- Limitada abertura dos maxilares, com difícil visualização do campo cirúrgico intraoral;
- Necessidade de um sistema de irrigação e de aspiração contínua com soro ou solução salina simultaneamente à utilização dos motores cirúrgicos utilizados na criação de defeitos ósseos;
- Necessidade de afastamento e de proteção dos tecidos moles, para evitar acidentes iatrogênicos como a dilaceração tecidual de tecidos periodontais, língua e mucosa labial e jugal (bochechas); e,
- Necessidade de suporte, apoio ou fixação da cabeça do animal a fim de permitir o acesso intraoral de instrumentos cortantes (mecânicos ou elétricos) com segurança.

A necessidade de muitos aparatos e de mãos auxiliares para sustentar os aparelhos e os instrumentais indispensáveis aos procedimentos como fonte de luz, irrigação, sucção, afastadores de tecidos, dificultam a realização de cirurgias intraorais em pequenos animais. Cirurgias que demandam a utilização de equipamentos odontológicos elétricos, micromotores giratórios como contra-ângulos e canetas de alta rotação, são ainda mais críticas. O campo visual para o acesso às estruturas ósseas intraorais fica extremamente limitado, prejudicando o trabalho padronizado e seguro para os animais. Atualmente, com a regulamentação dos Comitês de Ética em Pesquisa Experimental, os pesquisadores precisam estar atentos não somente aos procedimentos cirúrgicos, mas também ao conforto e segurança dos animais, evitando a manipulação excessiva dos mesmos. Tem sido recomendado que as técnicas cirúrgicas em qualquer modelo animal experimental, incluindo roedores, sejam realizadas com o máximo de agilidade, segurança para os animais e em condições assépticas (Committee on Infectious Diseases of Laboratory Rats and Mice, I.L.A.R., 1992). Obviamente, experimentos sem perspectiva de resposta, mal planejados ou que determinem o sofrimento, a mutilação e a morte desnecessária de animais, devem ser condenados (Marques et al., 2005). Ao contrário, a utilização de instrumentos, equipamentos, recursos técnicos que viabilizem procedimentos cirúrgicos de modo eficiente e seguro para os animais tem sido estimulada. Nesse sentido, alguns modelos de mesas ou de plataformas cirúrgicas vêm sendo propostos e disponibilizados comercialmente, conferindo uma série de benefícios e recursos facilitadores que visam minimizar o tempo cirúrgico, propiciando conforto e segurança para ambos, operador e animal experimental. Alguns modelos de mesas cirúrgicas, com diferentes indicações, aplicações e formatos já foram patenteadas. Como exemplo, a patente US 6467112, intitulada "*Operating Table for Animal*", apresenta uma mesa com uma grade destacável, composta por furos circulares de diâmetros variados, por onde as excretas e fluidos corporais atravessam e são coletados por uma câmara interna, como uma pia inferior, ligada a rede de esgoto. Ao redor dessa grade encontram-se acoplados um microscópio ou lupas e um sistema de exaustão para coletar o ar de dentro da câmara coletora. A mesa possui pés reguláveis e pode ter, opcionalmente, conexões para entrada de água e fonte de luz. A patente RU 2 246 283 C2 (Federação Russa), intitulada "*Surgical Table for Operating on Small Animals*", refere-se a uma mesa portátil que permite a montagem e regulagem em alturas e inclinações diferentes. Apresenta como vantagem sua compactação para ser guardada e transportada sem ocupar muito volume. A patente US2009/126113, intitulada "*Rotatable Surgery Table*", descreve uma mesa auxiliar, conectada a uma mesa cirúrgica tradicional. O modelo apresenta formato de "cama" de dupla base desmontável, que permite seu movimento/deslocamento por meio de colunas e membros de apoio, de forma horizontal ou vertical. O modelo é indicado para procedimentos em animais de pequeno e médio porte e também para crianças. Apresenta como vantagem rotatividade do leito cirúrgico, evitando o deslocamento do operador ao redor do paciente



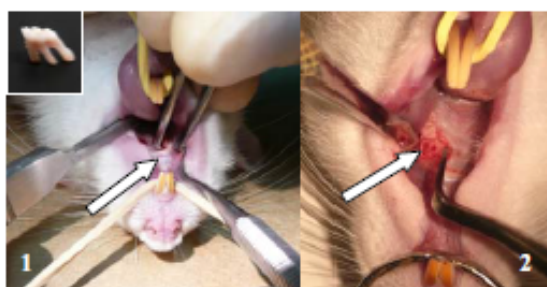
durante o ato cirúrgico. Além das patentes supracitadas, alguns produtos têm sido comercialmente disponibilizados no mercado internacional, trazendo cada fornecedor, sua lista de benefícios ou vantagens para a manipulação cirúrgica de pequenos animais. Dentre eles estão os fabricantes: *Harvard Apparatus*. “Small Animal Operating Tables” (Disponível em [www.harvardapparatus.com](http://www.harvardapparatus.com); Acessado em 29/03/2012), *Letica Scientific Instruments*, Panlab s.l./Barcelona-Espanha. “Surgery tables” (Disponível em [www.panlab.com/panlabWeb/Hardware/php/displayHard](http://www.panlab.com/panlabWeb/Hardware/php/displayHard); Acessado em 29/03/2012), *Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus*, “HSE-Small Operating Table” (Disponível em [www.hugo-sachs.de](http://www.hugo-sachs.de); Acessado em 23/03/2012), *TSE-system*, “Operating Table” (Disponível em <http://www.tse-systems.com/products/other-products/surgery-handling/small-animal-operating-tables.htm>; Acessado em 29/03/2012) e *Bloseb – In Vivo Research Instruments*. “Small Animal Surgery System” (Disponível em [www.bioseb.com](http://www.bioseb.com); Acessado em 29/03/2012).

O presente estudo, valendo-se dos princípios básicos da engenharia mecânica, apresenta um modelo de mesa cirúrgica inédito pela somatória de recursos e aplicações voltadas para cirurgias gerais e odontológicas em animais de pequeno porte. O modelo é indicado para qualquer tipo de intervenção intra ou extra-oral, para procedimentos dos mais simples como tomadas fotográficas, dissecações anatômicas ou simples coletas de sangue aos procedimentos cirúrgicos mais complexos onde a precisão e a reprodutibilidade são fundamentais para a pesquisa. O presente estudo apresenta o desenvolvimento de uma mesa cirúrgica com recursos específicos para a realização de procedimentos anatômicos, clínicos ou cirúrgicos em animais de pequeno porte. Especificamente, o dispositivo compreende uma mesa cirúrgica para procedimentos intraorais em animais de pequeno porte, aperfeiçoando sua realização de forma padronizada, em menor tempo, dispensando-se a necessidade de operadores auxiliares.

## 2. APLICAÇÃO DA MESA CIRÚRGICA PARA ANIMAIS DE PEQUENO PORTE

Diversos estudos e pesquisas envolvendo cirurgias em cavidade oral de animais de pequeno porte têm sido realizados pelos pesquisadores/inventores utilizando a mesa cirúrgica. Dados publicados demonstram algumas das indicações e aplicabilidade da mesa cirúrgica. Exodontias de molares de ratos seguida da inserção de biomateriais nos alvéolos dentários, para avaliação do processo cicatricial e subsequente reparo ósseo é um exemplo de sua aplicabilidade (Mendes et al., 2008). No estudo indicado, imediatamente após anestesia e posicionamento de ratos na mesa cirúrgica, os animais foram submetidos à extração dos primeiros molares superiores. Em seguida, os alvéolos dentários direitos foram tratados com gel de hialuronato de sódio a 1%, enquanto os alvéolos esquerdos foram usados como controles. Os animais foram sacrificados após 2, 7 e 21 dias, quando as amostras dos maxilares foram processadas para análise histológica e imunohistoquímica.

Na mesma linha de pesquisa, Mendes et al., 2010 avaliaram o efeito da inserção de nanotubos de carbono isolados ou funcionalizados com hialuronato de sódio na cicatrização óssea em alvéolos dentários de ratos. O objetivo do estudo foi avaliar se a funcionalização dos nanotubos de carbono (NTC) com hialuronato de sódio (HY) produziria um gel mais reforçado, com a manutenção das propriedades do hialuronato de sódio isolado (previamente avaliado), o qual apresenta fraca estabilidade. Como no estudo anterior (Mendes et al., 2008), os animais foram anestesiados e posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica para a exodontia dos primeiros molares. Em seguida, os alvéolos foram tratados com nanotubos de carbono, com gel de hialuronato de sódio 1% ou com nanotubos funcionalizados com hialuronato de sódio. A Figura (1) ilustra o exposto acima.



**Figura 1. Procedimentos intra-buciais em ratos viabilizados pela mesa cirúrgica para animais de pequeno porte. 1 - Extração do 1º molar superior (seta) mostrado no canto superior esquerdo, após exodontia, 2 - Acesso aos alvéolos dentários -cavidades ósseas após a remoção dos dentes.**

Ainda na linha de pesquisa de avaliação de biomateriais no modelo intrabucal de alvéolos dentários, Miranda et al. (2011) avaliaram o reparo ósseo, seguido do implante de esponjas de quitosana nas cavidades alveolares após a exodontia dos primeiros molares superiores de ratos. Após a avaliação *in vitro* do comportamento de células tronco mesenquimais (de medula óssea de ratos) cultivadas sobre o biomaterial de quitosana associada à gelatina, os pesquisadores inseriram o biomaterial em alvéolos dentários a fim de avaliar sua biocompatibilidade e biodegradação *in vivo*. Os animais foram sacrificados após 5, 21 e 35 dias.

Os recursos da mesa cirúrgica para procedimentos intra-buciais têm sido também utilizados em pesquisas sobre o tracionamento ortodôntico. O tracionamento ortodôntico é geralmente um procedimento moroso e de alto custo.

Pesquisadores têm buscado estratégias para aceleração do processo de movimentação dentária, a partir da ativação dos mecanismos de reabsorção e formação óssea. Uma das estratégias em estudo consiste na administração local de fatores de crescimento relacionados ao metabolismo ósseo. Buscando esclarecer o possível papel regulador do EGF (fator de crescimento epidermal) na remodelação óssea, Saddi et al. (2008) e Alves et. al. (2009) avaliaram o efeito desse dessa molécula no tracionamento ortodôntico induzido em ratos. Os autores utilizaram lipossomas como veículos para a administração do EGF. Lipossomas são pequenas vesículas esféricas produzidas a partir de colesterol, esfingolípides, glicolípides e proteínas de membrana, utilizadas como veículos no transporte de produtos biologicamente ativos. Essas vesículas têm sido utilizadas como carreadores para uma grande variedade de moléculas, como drogas, proteínas, nucleotídeos, uma vez que permitem a liberação lenta e gradual dos produtos que transportam. O uso de lipossomas associados ao EGF no tracionamento ortodôntico visava a permanência da molécula bioativa por um período mais longo, sem a necessidade de administrações diárias ou periódicas do EGF. Os animais foram posicionados na mesa cirúrgica para a viabilização dos procedimentos intrabucais de adaptação das molas e elásticos ortodônticos entre os dentes los molares e incisivos superiores. A abertura da boca e a visualização do campo cirúrgico intrabucal são etapas importantes para ambos, a colocação dos aparelhos de tração e para a administração das drogas, realizadas com uma microseringa, paralela à mucosa, adjacente aos dentes tracionados. A Figura (2) ilustra o exposto acima.

Os animais foram sacrificados após 5, 10, 14 e 21 dias da colocação dos aparelhos ortodônticos, quando foram realizadas medidas de deslocamento (movimentação dentária) e análises histológicas e imunohistoquímicas. No primeiro estudo (Saddi et al., 2008) o objetivo foi avaliar a eficácia dos lipossomas como veículo para a entrega de EGF. No segundo estudo, em continuidade às avaliações de Saddi et al (2008), Alves et al., 2009 avaliaram o papel da administração desse fator de crescimento no tracionamento ortodôntico. Os resultados revelaram que a administração do EGF exógeno associado à vesículas de lipossomas promove um efeito adicional no nível de osteoclastos recrutados, em comparação à administração do EGF solúvel, produzindo uma reabsorção óssea e consequente movimentação dentária mais rápidas.



**Figura 2. Procedimentos intra-bucais em ratos viabilizados pela mesa cirúrgica para animais de pequeno porte. 1 - Colocação de aparelho ortodôntico entre os incisivos e molares de ratos (seta), 2 - Administração de drogas via intra-oral.**

A manutenção do tecido ósseo dos maxilares é de fundamental importância em Odontologia, pois o sucesso das próteses e implantes dentários utilizados no restabelecimento da função mastigatória de pacientes desdentados, depende do volume de tecido ósseo remanescente. Nesse sentido, inúmeras pesquisas têm sido realizadas no intuito de compensar perdas ósseas e otimizar o processo de reparo ósseo após cirurgias intra-bucais. Entretanto, a maioria dos estudos em bioengenharia tecidual óssea tem avaliado biomateriais osteocondutores e/ou osteoindutores em modelos de defeitos ósseos extra-bucais, possivelmente pelas dificuldades técnicas encontradas no trabalho em boca de animais. A maioria dos estudos sobre reparo ósseo utiliza defeitos ósseos criados em tíbias, fêmures e calota craniana de ratos e coelhos. Tais modelos estão livres de fatores bucais que invariavelmente podem comprometer a interpretação dos resultados. A fim de contribuir também nessa linha de pesquisa, um estudo piloto tem sido desenvolvido com o auxílio da mesa cirúrgica aqui apresentada (Costa-filho et al., 2011).

Nesse estudo, um defeito ósseo padronizado foi obtido cirurgicamente no maxilar superior de ratos, por via intra-oral, com a preservação da mucosa periodontal e dos tecidos moles adjacentes. O defeito foi criado na área das raízes distais e mediais dos 1os molares superiores. Após a exodontia desses dentes, o defeito é criado com broca diamantada, adaptada a um micromotor odontológico como indica a Fig. (3), sob irrigação com soro fisiológico estéril. O procedimento é realizado com sucção à vácuo das soluções irrigadoras e com o auxílio de afastadores intrabucais de aço inox, para proteção dos tecidos moles. A cavidade padrão obtida de 2,5 mm de profundidade e 2,5 mm de diâmetro permite que biomateriais de dimensões padronizadas, sejam inseridos na loja óssea e contidos por meio de suturas como mostra a Fig. (4).

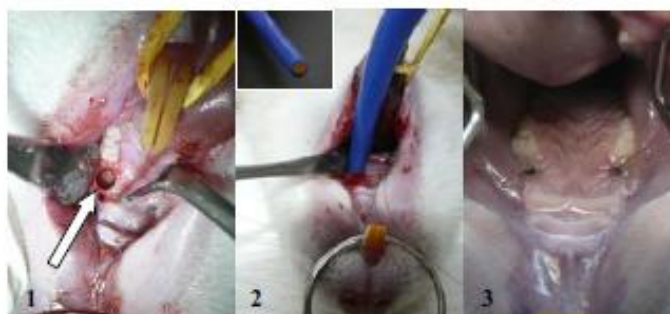
Além dos procedimentos cirúrgicos, a avaliação clínica do processo de cicatrização, ou seja, o nível de fechamento das feridas observadas durante a fase pós-operatória é um aspecto muito importante nas pesquisas odontológicas. Nesse sentido, a mesa cirúrgica permite também a padronização de tomadas fotográficas para o controle clínico da área intrabucal operada ao longo do período de avaliação pós-operatória pretendido.

O modelo de defeito ósseo proposto possui um aspecto inovador, tanto pela via de acesso e localização, quanto pela padronização de suas dimensões. Sua implementação abre perspectivas promissoras para avaliação do reparo ósseo de biomateriais enxertados *in vivo*, em animais de baixo custo e pronta disponibilidade.





**Figura 3. Utilização da mesa cirúrgica para criação de defeito ósseo intra-bucal em ratos. 1 e 2 - Criação do defeito ósseo intra-bucal com motor odontológico.**



**Figuras 4. Utilização da mesa cirúrgica para criação de defeito ósseo intra-bucal em ratos. 1 - Imagem panorâmica do defeito ósseo criado (seta), 2 - Aplicação de um biomaterial de preenchimento 3 - Biomaterial contido por meio de sutura.**

### 3. DESENVOLVIMENTO DA MESA CIRÚRGICA PARA ANIMAIS DE PEQUENO PORTE

A mesa cirúrgica para pequenos animais foi desenvolvida por pesquisadores odontólogos e profissionais da Engenharia Mecânica contribuíram para o projeto, com apoio financeiro da Fapemig. O depósito de pedido de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial foi realizado por meio da Coordenadoria de Transferência de Inovação Tecnológica (CTIT) da UFMG, sob nº. 014110002397.

As Figuras (5) e (6) ilustram o projeto conceitual da mesa cirúrgica inicialmente desenvolvida onde é possível indicar as várias partes e suas funções.

A mesa cirúrgica compreende uma base (2), apoiada em quatro pés reguláveis (1) conectados na parte inferior da mesma. Na base há dois rasgos laterais (3), sendo um rasgo para cada lado da base, e uma depressão (7) na parte superior próxima e paralela à face frontal (50). A base (2) serve de suporte para uma plataforma removível esterilizável (24) que serve de local de apoio para os animais.

Duas hastes (16) podem correr dentro de tubos (4) em um movimento de deslizamento para cima e para baixo, sendo que o tubo (4) possui um suporte de fixação (26) para uma trava lateral (25), além um orifício (34) para conectar a trava (25), já as hastes (16) possuem orifícios (15), por onde passam a trava (25). O conjunto compreendido pelo tubo (4) e haste (16) e a barra superior (20) formam um aparato similar a uma trave articulada retrátil. O deslizamento das hastes (16) nos tubos (4) permite o ajuste de altura da barra horizontal (20) utilizando as travas laterais (25) que bloqueiam o movimento ao penetrar nos orifícios (34) e (15).

O tubo (4) também pode se deslocar ao longo dos rasgos (3) e sobre o eixo (5) do conector (6) formando um ângulo variando de 0 a 180 graus com a superfície de apoio. A posição final (altura) da barra horizontal (20) é definida pelas travas laterais (25). O travamento é mecânico, propiciado pelo movimento deslocamento/giro limitado a 90 graus, da trava (25) dentro do suporte de fixação (26), guiando o encaixe da extremidade superior da trava (25) no orifício (34) do tubo (4) em correspondência com orifício/guia (15) criado na haste (16) das hastes laterais.

O objetivo do aparato compreendido pelos tubos (4), hastes (16) e barra superior (20), anexo à mesa, é permitir a conexão da haste instrumental (11) a ser utilizada como afastador intraoral e/ou outras funções de apoio à cirurgia. A haste instrumental (11) é presa por um pivô (22) giratório, conectado a uma peça cilíndrica (18) que permite o movimento lateral do pivô (22), deslizando de um lado para outro (direito-esquerda) na barra horizontal (20). A posição desejada do pivô (22) ao longo da barra horizontal (20) é conectada preferencialmente pelo travamento de uma borboleta (19) anexa ao cilindro (18). O conjunto de tubos (4) e hastes (16) e da barra superior (20) podem ser deslocados em sentidos ântero-posteriores sobre a mesa, pelo deslizamento desse sistema em rasgos laterais (3). A posição desejada por esse deslocamento das travas pode ser estabelecida, valendo-se das guias (56) ou marcações equidistantes nos rasgos laterais (3) para reprodução ou padronização em outras cirurgias/procedimentos de cunho similar. Dessa maneira, a possibilidade de alteração de altura e de posição do pivô (22), assim como da haste instrumental (11), permite a utilização de instrumentos mais longos, mais curtos ou angulados. O pivô (22) compreende



também uma borboleta lateral (33) para prender os instrumentais, permitindo definir a melhor altura (movimento de subida / descida) desses instrumentos ali adaptados. A borboleta frontal (21) conecta a melhor posição do pivô (22), em relação ao movimento em torno desse conector (giro para direita x esquerda). A haste (11) pode, opcionalmente, comportar um dispositivo (9) contendo um orifício (10) para adaptação de um instrumental paralelo a critério do operador, como por exemplo, para cirurgias intraorais, uma ponta sugadora de fluidos.

O suporte (17) pode ser removível e é conectado por rosca podendo a uma das extremidades de uma peça em “U” (38) que corre pelo rasgo (30), na outra extremidade da peça em “U” (38) recebe um conector (29) para travamento do suporte (17) na posição desejada. Esse suporte (17) é utilizado para melhor fixação e estabilização da cabeça do animal, no caso de cirurgias em que movimentos mínimos da cabeça do animal podem prejudicar o procedimento, tais como no caso das exodontias ou acessos intracranianos.

As hastes (13) são compreendidas por, pelo menos, um anel (12) circunscrito à haste que serve de bloqueio para o posicionamento dos elásticos em diferentes alturas. Cada haste (13) conecta os dispositivos elásticos que passam pelos incisivos do maxilar inferior (mandíbula) mantendo aberta a boca do animal, esse posicionado em decúbito dorsal. A haste (13) pode ser rosqueada em pelo menos um orifício da mesa (8), permitindo diferentes níveis de tração dos maxilares, de acordo com a posição dos elásticos nos anéis de bloqueio (12) das hastes (13) e de acordo com a extensão (força de tração) do dispositivo elástico utilizado. O anel (12) da haste (13) permite o posicionamento do mesmo em diferentes alturas. O posicionamento ou a altura dos elásticos nesses anéis (12) deve ser definido de acordo com o tamanho e altura dos maxilares dos animais.

Os pés reguláveis (1) podem deslocar a base (2) permitindo a inclinação da mesa, que pode trabalhar em posição plano-horizontal (0 graus); bem como com a inclinação original de 3,7 graus (pés totalmente rosqueados), ou até inclinação de 10 graus, quando os pés anteriores, próximos à face frontal da mesa (50) estão rosqueados e os posteriores, próximos à face traseira da mesa (51) levantam ao máximo a base em relação à superfície de apoio

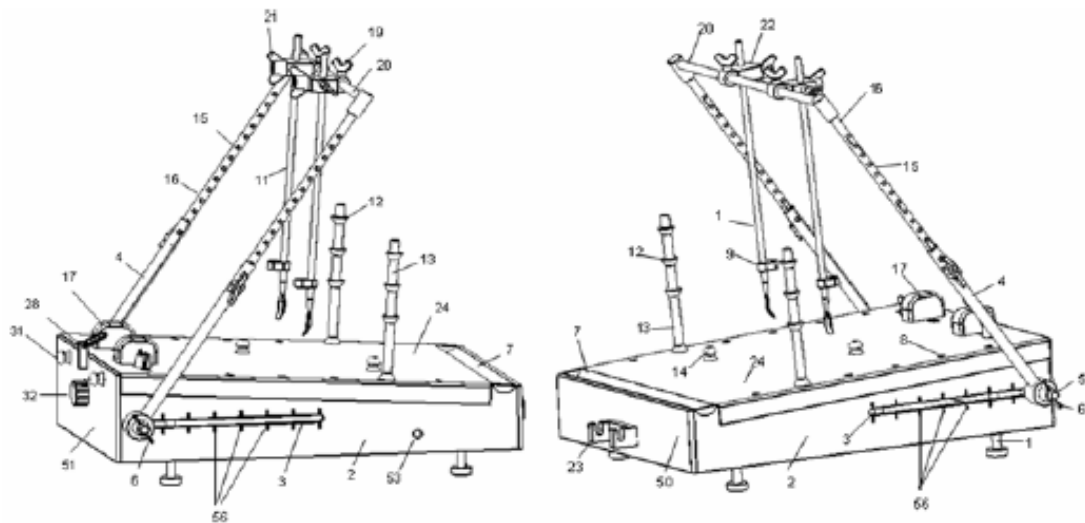
A posição ideal de trabalho será ajustada pelo operador de acordo com a finalidade cirúrgica, sendo que a inclinação padrão da base com os pés totalmente rosqueados, favorece a coleta de resíduos, que compreendem dejetos sólidos e/ou líquidos orgânicos, soluções salinas e fixadoras, tampões ou outros, gerados durante o ato cirúrgico; os quais são depositados na depressão (7) da plataforma (24), que funciona como uma calha coletora de resíduos.

A argola (27) deve segurar o maxilar superior do animal, travando-o pelos dentes incisivos superiores. Alternativamente à utilização da argola (27), o maxilar superior dos animais pode ser apreendido para abertura da boca por meio de um dispositivo elástico conectado a um pino (31) conectado na parte posterior (51) da mesa.

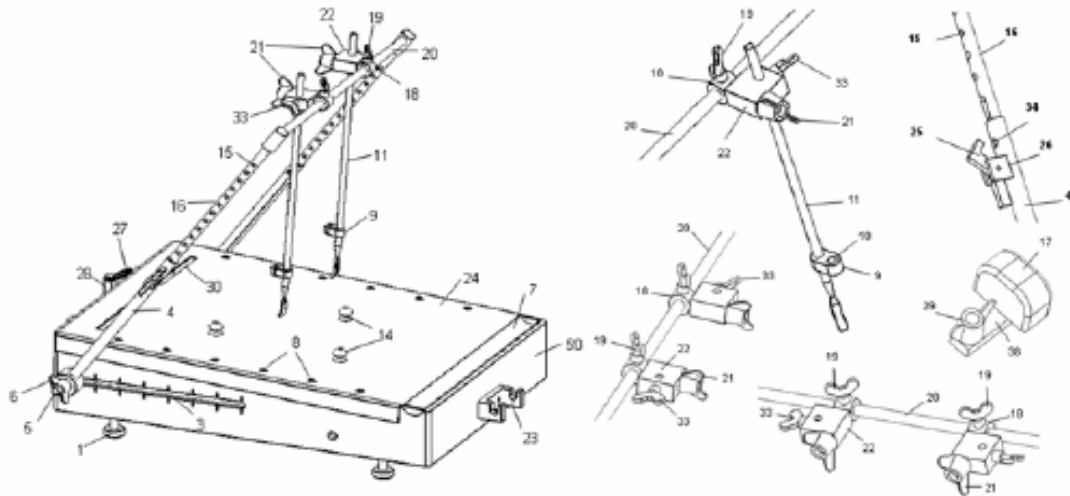
Os dispositivos fixadores móveis (14) possuem um sulco horizontal, uma fissura para adaptação de dispositivo elástico e também podem ser posicionados em qualquer posição na plataforma removível esterilizável (24). Esses fixadores (14) funcionam como auxiliares para a fixação dos membros superiores e inferiores do animal durante a cirurgia. Alternativamente, os dispositivos fixadores móveis (14) podem atuar como afastadores de tecidos ou auxiliar no posicionamento do animal em posições diferentes do decúbito dorsal, para outras cirurgias que não intraorais.

O sistema de aquecimento é ligado a um controlador de temperatura (32), podendo para variar a temperatura entre 35 a 40 graus e pode ser ligado em uma tomada convencional nas tensões 127/220 V. Isso garante a manutenção da temperatura basal do animal, condição indispensável para cirurgias de mais longa duração.

Opcionalmente, a mesa pode ser utilizada apenas como plataforma, inclinada ou não, para apoio dos animais, livre das hastes. Nesse caso, as traves devem ser estendidas e giradas totalmente para a posição frontal, onde terminam em zero grau, no momento em que a barra superior (20) encaixa no apoio frontal (23), localizado na parte frontal da mesa (50) caracterizando a “posição fechada” ou “compacta” da mesa, posição adequada para o transporte da mesma.



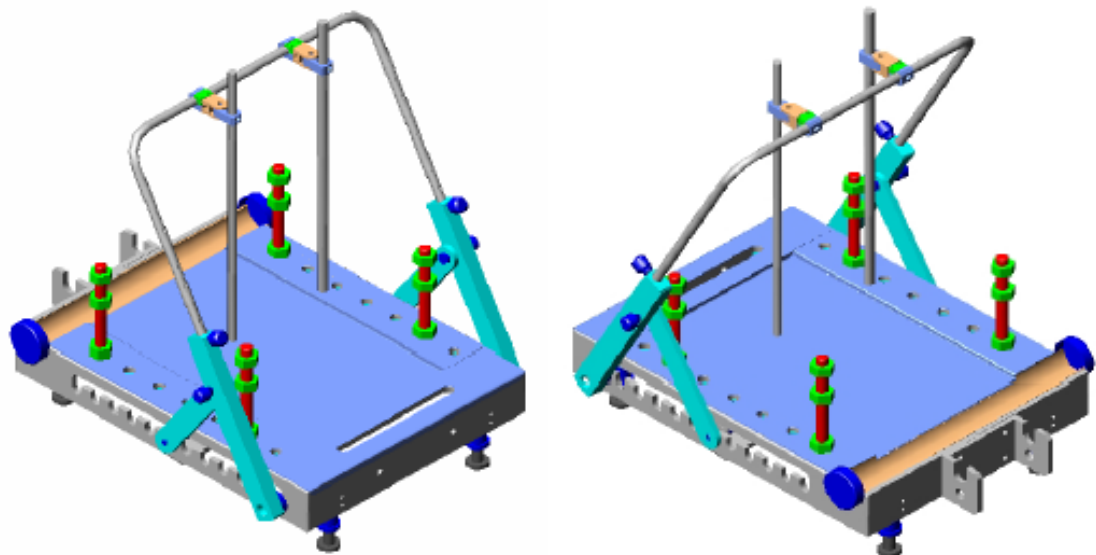
Figuras 5. Mesa cirúrgica para animais de pequeno porte.  
Visão lateral em perspectiva



**Figuras 6. Mesa cirúrgica para animais de pequeno porte.  
Visão lateral em perspectiva e partes.**

A base (2) e a plataforma removível esterilizável (24) devem ser fabricadas feitas em materiais passíveis de desinfecção ou esterilização em autoclave, em casos de procedimentos cirúrgicos críticos, tais como, o aço inoxidável e o alumínio. As outras partes podem ser submetidas à desinfecção química, podendo ser empregados materiais poliméricos, tais como o polipropileno (PP), polietileno (PE), policloreto de vinila (PVC), polimetacrilato de metila (PMMA), policarbonato (PC), copolímero acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS), resinas fenólicas, epóxi, poliéster, poliuretano; silicones rígidos; elastômeros termoplásticos.

Visando aprimorar o projeto conceitual inicialmente desenvolvido, encontra-se atualmente numa fase do projeto, onde as várias partes da mesa cirúrgica vem sendo redesenhadas em sua forma final. Para tanto, estão sendo escolhidos os materiais mais adequados para cada parte, considerando os elementos padronizados encontrados no comércio e a definição dos processos de fabricação convencionais mais adequados e de baixo custo. A Figura (7) ilustra o exposto acima.



**Figuras 7. Mesa cirúrgica para animais de pequeno porte.  
Desenvolvimento do projeto final.**

#### 4. COMPARAÇÃO DA MESA CIRÚRGICA DESENVOLVIDA COM OUTROS EQUIPAMENTOS

Comparando a mesa cirúrgica desenvolvida com outros equipamentos, percebe-se que as mesas encontradas no mercado variam em sua complexidade, variando de modelos simples, contando apenas com uma plataforma de apoio para os animais com a possibilidade de inclinação, até modelos mais complexos e inteligentes, especialmente relacionados ao controle da temperatura durante os procedimentos cirúrgicos.



O equipamento desenvolvido apresenta alguns pontos comuns com os produtos do mercado, como: possibilidade de aquecimento da plataforma; regulagem de altura por meio de pés rosqueáveis, permitindo diferentes inclinações da mesa; mecanismo de sustentação atraumática dos animais, com a utilização de peças imantadas para suporte de elásticos ou cintas afastadoras em substituição às fitas adesivas, garras ou cintos de plástico. Entretanto, a mesa cirúrgica aqui desenvolvida reúne características importantes, algumas das quais, foram encontradas em diferentes produtos conhecidos no Estado da Técnica, mas não simultaneamente.

Ao contrário da maioria das mesas que são oferecidas em tamanhos diferenciados para camundongos, ratos, coelhos, porquinhos da índia, a mesa cirúrgica desenvolvida apresenta regulagem de altura das hastes laterais (suporte de instrumentais cirúrgicos) o que viabiliza a utilização da mesma plataforma para todos os animais de pequeno porte, dispensando a aquisição de versões específicas de mesa para cada modelo animal.

Além disso, um diferencial específico em relação às demais mesas cirúrgicas do mercado é a sua aplicabilidade, não exclusiva, mas precisamente indicada, para os procedimentos intraorais em pequenos animais. Para tanto, o sistema conta com hastes laterais articuladas e deslizáveis sobre a plataforma, presas entre si por uma barra horizontal superior. Essa barra horizontal visa servir de apoio para instrumentais e para afastadores intraorais. Tal mecanismo de suporte de instrumentos foi delineado com base na experiência de pesquisadores odontólogos. O sistema permite inúmeras posições de altura e de angulação dos instrumentos adaptados na barra horizontal, permitindo o livre acesso dos operadores à plataforma. Para procedimentos intrabucais, os componentes e os acessórios da mesa foram planejados para que os operadores se coloquem em posição ergonômica de meio dia (12 horas); ou seja, em posição voltada para face posterior da mesa, atrás da cabeça do animal, à semelhança do que ocorre na maioria dos procedimentos clínicos intrabucais em humanos.

A mesa cirúrgica possui tamanho adequado para operações em animais de pequeno porte, tais como os roedores, coelhos, gatos, gambás de laboratório medindo de 10 cm a 30 cm de comprimento, em média, excluindo-se o comprimento da cauda; a largura dos animais, supracitados, varia de 5 cm a 20 cm no sentido látero-lateral.

## 5. CONCLUSÃO

A matéria tratada representa um avanço metodológico e abre perspectivas promissoras para inúmeros estudos em cavidade oral ou fora dela, em animais de pequeno porte, modelos de baixo custo e fácil disponibilidade.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Fundação do Desenvolvimento da Pesquisa (FUNDEP) pelo apoio recebido para o desenvolvimento deste projeto.

## 7. REFERÊNCIAS

- Alves, J.B., Ferreira, C.L., Martins, A.F., Silva, G.A., Alves, G.D., Paulino, T.P., Ciancaglini, P., Thedei, G.Jr., Napimoga, M.H., 2009, "Local delivery of EGF-liposome mediated bone modeling in orthodontic tooth movement by increasing RANKL expression", *Life Sciences*, vol.85, pp.693-99.
- Barone, A., Ricci, M., Calvo-Guirado J.L., Covani, U., 2011, "Bone remodelling after regenerative procedures around implants placed in fresh extraction sockets: an experimental study in Beagle dogs", *Clinical Oral Implants Research*.
- Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P., Lindhe, J., 2003, "De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants", *Clinical Oral Implants Research*, vol.14, pp.251-62.
- Brugnami, F., Caiazzo, A., Leone, C., 2010, "Review of Intraoral Harvesting for Bone Augmentation: Selection Criteria, Alternative Sites, and Case Report", *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, vol.31, Issue 7.
- Committee on Infectious Diseases of Laboratory Rats and Mice, I.L.A.R., 1992, Washington, D.C., Government Printing Office.
- Costa Filho, L.B., Silva, G.A.B., Abreu, F.A.M., Assis, M.H.S., Miranda, S.C.C.C., Santos, I.G.D., Goes, A.M., Oliveira, P.A.D., 2011, "Defeito ósseo intra-bucal em ratos: etapas cirúrgicas e recursos técnicos para viabilização do modelo de estudo em pesquisas osontológicas", *Brazilian Oral Research*, vol. 25 (Suppl.1), pp. 255, Proceedings of the 28th SBPqO Annual Meeting.
- Elsalanty, M.E., Zakhary, I., Akeel, S., Benson, B., Mulone, T., Triplett, G.R., Opperman, L.A., 2009, "Reconstruction of canine mandibular bone defects using a bone transport reconstruction plate", *Annals of Plastic Surgery*, vol.63, pp.441-48.
- Giannobile, W.V., Finkelman R.D., Lynch, S.E., 1994, "Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I", *Journal of Periodontology*, vol.65, pp.1158-68.
- Healy, K.E., Guldberg, R.E. 2007, "Bone tissue engineering", *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*, vol.7, pp.328-30.
- Kim, C.S., Choi, S.H., Cho, K.S., Chai, J.K., Wikesjo, U.M.E., Kim, C.K., 2005, "Periodontal healing in one-wall intra-bony defects in dogs following implantation of autogenous bone or a coral derived biomaterial", *Journal of Clinical Periodontology*, vol.32, pp.583-89.

- Lynch, S.E., Buser, D., Hernandez, R.A., Weber, H.P., Stich, H., Fox, C.H., Williams, R.C., 1991, "Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs", *Journal of Periodontology*, vol.62, pp.710-16.
- Marques, R.G., Miranda, M.L., Caetano, C.E.R., Biondo-Simões, M.L.P., 2005, "Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil", *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol.20, pp.262-67.
- Matsuno, T., Omata, K., Hashimoto, Y., Tabata, Y., Satoh, T. 2010, "Alveolar bone tissue engineering using composite scaffolds for drug delivery", *Japanese Dental Science Review*, vol.46, pp.188-92.
- Mendes, R.M., Silva, G.A., Calliari, M.V., Silva, E.E., Ladeira, L.O., Ferreira, A.J., 2010, "Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair", *Life Sciences*, vol.87, pp.215-22.
- Mendes, R.M., Silva, G.A., Lima, M.F., Calliari, M.V., Almeida, A.P., Alves, J.B., Ferreira, A.J., 2008, "Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats". *Archives of Oral Biology*, vol.53, pp.1155-62.
- Miranda, S.C., Silva, G.A., Hell, R.C., Martins, M.D., Alves, J.B., Goes A.M., 2011, "Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction", *Archives of Oral Biology*, vol.56, pp.1-15.
- Saddi, K.R., Alves, G.D., Paulino, T.P., Ciancaglini, P., Alves, J.B., 2008, "Epidermal growth factor in liposomes may enhance osteoclast recruitment during tooth movement in rats", *Angle Orthodontics*, vol.78, pp.604-09.
- Szpalski, C., Barr, B.A.J., Wetterau, M., Saadeh, P.B., Warren, S.M., 2010, "Cranial bone defects: current and future strategies", *Neurosurgical Focus*, vol.29, n.6:E8.
- Zhou, M., Peng, X., Mao, C., Xu, F., Hu, M., Yu, G.Y., 2010, "Primate mandibular reconstruction with prefabricated, vascularized tissue-engineered bone flaps and recombinant human bone morphogenetic protein-2 implanted in situ", *Biomaterials*, vol.31, pp.4935-43.

## 8. DIREITOS AUTORAIS

Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo do material impresso incluído no seu trabalho.