

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

Cynthia Lopes Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO TGF- β 1 E
BMP-4, CARREADOS POR MEIO DE LIPOSSOMAS, NO REPARO ÓSSEO DE
ALVÉOLOS DENTÁRIOS EM RATOS**

Belo Horizonte
2012

Cynthia Lopes Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO TGF- β 1 E
BMP-4, 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 Doutora em Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. José Bento Alves
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Gerluza
Aparecida Borges Silva

Belo Horizonte
2012

*Ao meu marido, Frank,
aos meus filhos, João Pedro e Paulo Henrique,
aos meus pais, Selma e Camilo,
aos meus irmãos Kátia, Sandra, e Camilinho.
Dedico esta conquista ao que tenho de melhor: minha família.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde e sabedoria para o cumprimento desta jornada. À Nossa Senhora das Graças, sempre presente em todos os momentos de minha vida, abençoando e guiando meus caminhos!

Ao Frank, que me acompanhou desde o princípio, meu amor e companheiro. Sem sua compreensão, tolerância, incentivo, carinho e amizade, esta conquista não seria possível. Portanto, o mérito deste trabalho também é seu!

Aos meus queridos filhos, João Pedro e Paulo Henrique, meus amores, souberam entender e superar minhas horas de estudo e ausência. Vocês são a razão de minha vida!

Ao meu pai Camilo, que nunca mediu esforços para minha educação, exemplo de pai, homem honesto e temente a Deus e a minha querida mãe Selma, mulher dotada de uma grande fé, exemplo de força, luta e amor incondicional pela vida e pela nossa família!

Aos meus irmãos Kátia, Sandra e Camilinho, aos meus cunhados Sérgio e Gleison, a minha querida cunhada Cristina, pelo apoio e grande amizade, aos meus sobrinhos Lucas, Bernardo, Gabriela, Marina e Rafael, por fazerem parte da minha história! Pela dedicação e grande carinho, transmitidos aos meus filhos na minha ausência; serei eternamente grata! Agradeço sempre a Deus pela família que tenho! Amo vocês!

A minha querida tia Zezé e ao meu querido tio Geraldo, pelas constantes orações e apoio. Tia Zezé, sem palavras para agradecer seu carinho e disponibilidade para com minha mãe. Deus lhe pague por tudo.

Ao meu querido primo-irmão Juninho, um “anjo da guarda” que Deus enviou para cuidar de nossa família. Obrigada por permanecer do meu lado, não apenas como médico, mas como um ser humano iluminado, sinônimo de doação e gratuidade, que tantas vezes nesse doutorado, foi acionado e carinhosamente me transmitiu a força e a segurança para continuar.

À minha sogra D. Zizita, mulher humilde, dotada de um grande coração! Obrigado por suas orações.

Ao Prof. Dr. José Bento, pela orientação segura, amiga, que muito contribuiu para minha formação científica. Obrigada pela amizade, durante nosso convívio, onde o exemplo de bondade, dedicação e trabalho é um estímulo constante em nossa vida. Prof. José Bento, impossível aqui, exprimir todo meu carinho, reconhecimento e gratidão

À Profa. Dra. Gerluzza, querida co-orientadora, grande amiga-irmã, quem sempre esteve ao meu lado, sem medir esforços para que eu chegasse até aqui. Sua fé, vibração e dedicação contagia a todos que têm a oportunidade de convivência. Gê, gostaria de plagiar o poeta mineiro: “ Amigo é coisa pra se guardar....”

Ao amigo Fernando, minha dupla “lipossomal”. A você, que tolerou dia a dia, nesses 4 anos, a minha ansiedade, meus questionamentos, minhas dúvidas, meus receios, que não foram poucos diante desse projeto, meu eterno agradecimento. Não sobreviveria às pressões se não pudesse dividi-las com você. Esse trabalho não é meu, é nosso!

A D. Marlene, esposa do prof. José Bento, pelo carinho e alegria que sempre nos recebeu em sua casa.

Aos colegas do Departamento de Morfologia, pelo ótimo convívio e pela amizade que existirá para sempre.

Aos amigos do laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento, agradeço o carinho de todos, principalmente ao funcionário Chico, que com sua alegria e disposição, contagia nosso laboratório, transformando nosso dia-dia uma tarefa agradável!

As amigas Íria e Cris, pela ajuda valiosa durante a fase de imunohistoquímica de meu trabalho.

À Prof. Dra. Cleida, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, sempre muito atenciosa; obrigada por ter me recebido com grande carinho!

À Diana pela atenção dispensada sempre que precisei. Obrigada.

Aos demais professores das disciplinas do curso, minha gratidão pela contribuição. Agradeço especialmente aos profs Hélio e Fernanda, que acompanharam meus passos com tanto carinho e colocaram o LABER à nossa disposição.

A Melissa e Luana pela colaboração e dedicação neste trabalho, meu muito obrigado.

Aos funcionários da Universidade de Uberaba, pela disponibilidade na execução de parte do processamento histológico das amostras.

Ao Magnífico Reitor da Universidade de Itaúna, Dr. Façal David Freire Chequer, pela confiança e oportunidade.

RESUMO

O processo de reparo ósseo dos maxilares é mediado por uma cascata de eventos moleculares, da qual participam diversos fatores de crescimento e seus receptores. O conhecimento das moléculas sinalizadoras durante a dinâmica da cicatrização alveolar e remodelação dos tecidos periodontais, pode tornar o tratamento mais rápido e permitir, por meio da modulação biológica, o alcance dos objetivos clínicos, estéticos e funcionais, com maior qualidade e menor comprometimento dos tecidos envolvidos. Neste trabalho nós avaliamos o potencial de indução de formação óssea das moléculas BMP-4 e TGF- β 1 carregados por lipossomas, sozinhos e associados, durante processo de reparo alveolar após extração do segundo molar superior de ratos. Foram utilizados 112 animais machos Wistar com peso corporal entre 250-300g. Análises histológicas e histomorfométricas foram utilizadas para avaliar a formação de vasos sanguíneos e a neoformação óssea. Os resultados revelaram um maior proliferação vascular e maior percentual de trabéculas ósseas em alvéolos tratados com BMP-4 ou TGF- β 1, carregados por lipossomas, administrados isolados ou em associação quando comparados com aqueles alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo ou tratados com L (lipossoma vazio), P (PBS), BP (BMP-4 carregados em PBS) e TP(TGF- β 1 carregados em PBS). Além disso, a expressão de dois indicadores de reparo ósseo, a fibronectina e colágeno tipo III foi avaliada nas fases iniciais da cicatrização alveolar, através da técnica de imunohistoquímica. Observou-se um aumento na expressão de ambas as moléculas detectada aos 3 dias, seguido por um pico de expressão aos 7 dias. Níveis mais baixos de imunoreatividade foram observados nos alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo, e tratados com L, P, BP e TP quando comparados com alvéolos dos grupos tratados com BL(BMP-4/lipossoma), TL(TGF- β 1/lipossoma) e BTL(BMP-4 e TGF- β 1 em lipossoma administrados no mesmo alvéolo). Em conclusão, o presente estudo revelou a eficácia dos fatores de crescimento TGF- β 1 e BMP-4 como aceleradores no processo de reparo ósseo alveolar, quando administrados por meio de lipossomas.

Palavras chaves: Reparo ósseo. Fatores de crescimento. BMP-4. TGF- β 1. Lipossomas. Alvéolos dentários.

ABSTRACT

The process of bone repair is mediated by a cascade of molecular events, attended several growth factors and their receptors. Knowledge of signaling molecules during the dynamic healing and remodeling of periodontal tissues, can make treatment faster and allow, through the biological modulation, the scope of clinical, aesthetic and functional objectives, with higher quality and lower tissue involved damage. In this work we evaluate BMP-4 and TGF- β 1 potential induction bone formation adduced by liposomes molecules alone or associates during alveolar repair process followed extraction of second molar maxillary rats. 112 male Wistar animals weighing between 250-300g were used. Histomorphometric and histological analyzes evaluated blood vessels and bone formation during alveolar bone repair. The results revealed a higher vascular proliferation and an increase percentage of trabecular bone in sockets treated with BMP-4 or TGF- β 1, adduced by liposomes, administered isolated or in association when compared with those filled with blood clot or treated with L-(empty liposome), P (PBS), BP (BMP-4 adduced in PBS) and TP (TGF- β 1 adduced in PBS). Furthermore, the expression of two indicators of bone repair, fibronectin and type III collagen, was evaluated in the early stages of healing alveolar by immunohistochemistry. An increase in expression of both molecules detected at 3 days was observed, followed by a peak expression at 7 days. Lower levels of immunoreactivity were observed in cavities filled with blood clot and treated with L, P, BP and TP when compared to sockets treated with BL (BMP 4/liposome), TL (TGF- β 1/liposome) and BTL (BMP-4 and TGF- β 1 in liposome administered in the same well). In conclusion, the present study showed the efficacy of growth factors TGF- β 1 and BMP-4 as accelerators in the process of tooth socket bone healing when administered via liposomes.

Keywords: Bone repair. Growth factors. BMP-4. TGF- β 1. Liposomes. Tooth socket.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Estrutura Unilamelar do Lipossoma -----	36
FIGURA 2	Mesa cirúrgica e acesso ao campo operatório -----	43
FIGURA 3	Seringa HAMILTON COMPANY®-----	43
FIGURA 4	Imagem panorâmica de alvéolo da raiz distal do segundo molar Superior.-----	46
FIGURA 5	Avaliação do preenchimento ósseo -----	47
FIGURA 6	Grade histométrica -----	48
FIGURA 7	Amostra representativa dos alvéolos dos grupos BC, L, P, BP e TP, 3 dias – HE -----	53
FIGURA 8	Amostra representativa dos grupos BL e TL, 3 dias – HE -----	53
FIGURA 9	Amostra representativa do grupo BTL, 3 dias – HE -----	53
FIGURA 10	Amostra representativa dos alvéolos dos grupos BC, L, P, BP e TP, 7 dias – HE -----	54
FIGURA 11	Amostra representativa dos grupos BL and TL, 7 dias - HE-----	54
FIGURA 12	Amostra representativa do grupo BTL, 7 dias - HE-----	54
FIGURA 13	Gráficos representando a quantificação de trabéculas ósseas nos alvéolos dentários aos 7, 14 e 21 dias - HE-----	55
FIGURA 14	Gráfico representando a quantificação de vasos sanguíneos nos alvéolos dentários aos 7 dias -----	56
FIGURA 15	Amostra representativa dos alvéolos dos grupos L, P, BP e TP, 14 dias – He-----	57
FIGURA 16	Amostra representativa dos alvéolos dos grupos BL eTL, 14 dias - HE -----	57
FIGURA 17	Amostra representativa dos alvéolos do grupo BTL,14 dias – HE-----	57
FIGURA 18	Amostra representativa da imunoreatividade da fibronectina (FN) nos grupos BC, L, P, BP e TP, 7 dias -----	59
FIGURA 19	Amostra representativa da imunoreatividade da fibronectina (FN) nos grupos BL, TL e BTL, 7 dias -----	59

FIGURA 20	Amostra representativa do controle negativo (CN) da imunoreatividade-----	59
FIGURA 21	Amostra representativa da imunoreatividade do Colágeno tipo III (COL III) nos grupos BC, L, P, BP e TP, 7 dias -----	59
FIGURA 22	Amostra representativa da imunoreatividade do Colágeno tipo III (COL III) nos grupos BL, TL e BTL, 7 dias -----	59

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Distribuição dos Grupos Experimentais -----	44
QUADRO 2	Níveis de imunoreatividade da fibronectina e colágeno tipo III----	60

LISTA DE ABREVIATURAS

BC	Coágulo sanguíneo (Blood Clot)
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
BMP-2	Proteína morfogenética do osso-2
BMP-4	Proteína morfogenética do osso-4
BMP-7	Proteína morfogenética do osso-7
BMP-9	Proteína morfogenética do osso-9
BSA	Albumina de soro bovino
CEBIO	Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DPPC	Dipalmitoil fosfatidil colina
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF	Fator de crescimento derivado de fibroblasto
FN	Fibronectina
GFs	Fatores de crescimento
HE	Hematoxilina-eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IGF	Fator de crescimento semelhante insulina
L	Lipossoma
LP	Ligamento periodontal
LPC	Lisofosfatidil colina
MEC	Matriz extracelular
OC	Osteocalcina
OP-1	Proteína osteogênica 1
P	PBS (Phosphate buffered saline)
PBS	Phosphate buffered saline - Solução salina tamponada
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
rh BMP2	BMP recombinante humana – 2
rh BMP4	BMP recombinante humana – 4

rh BMP7	BMP recombinante humana – 7
SEM	standard error of the mean - erro padrão da média
TGF- β	Fator de crescimento transformador - beta
TBS	Tris-buffered saline
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Tecido ósseo, remodelação óssea e cicatrização alveolar	15
1.2. Estratégias para aceleração do reparo ósseo.....	18
1.2.1. <i>Citocinas e fatores de crescimento</i>	19
1.2.1.1. <u>Fator de crescimento transformador-β</u>	22
1.2.1.2. <u>Proteínas morfogenéticas do osso (BMPs)</u>	24
1.3. Moléculas indicadoras de reparo ósseo.....	27
1.3.1. <i>Colágeno</i>	28
1.3.2. <i>Fibronectina (FN)</i>	31
1.4. Sistemas carreadores de moléculas biologicamente ativas- lipossomas.....	33
2. JUSTIFICATIVA	38
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo Geral.....	41
3.2. Objetivos Específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Preparação de BMP-4 e TGF- β em lipossomas.....	42
4.2. Animais.....	42
4.3. Procedimentos cirúrgicos e grupos experimentais.....	42
4.4. Métodos histológicos.....	45
4.5. Métodos morfométricos	46
4.5.1. <i>Avaliação do preenchimento ósseo</i>	46
4.5.2. <i>Avaliação dos vasos sanguíneos</i>	47
4.6. Método imunohistoquímico.....	48
4.6.1. <i>Quantificação da expressão imunohistoquímica</i>	50
4.7. Análise estatística.....	50
5. RESULTADOS	51
5.1. Análises histológicas e morfométricas.....	51
5.2. Análise imunohistoquímica.....	58
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO I - Parecer Comitê Ética em Experimentação Animal	88
ANEXO II - Comprovante do aceite do artigo	89
ANEXO III - Artigo aceito	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tecido ósseo, remodelação óssea e reparo alveolar

A remodelação óssea ocorre durante toda a vida para manutenção da massa e integridade óssea, e envolve uma dinâmica de dois processos opostos: reabsorção por osteoclastos e deposição por osteoblastos (HADJIDAKIS e ANDROULAKIS, 2006; KHOSLA et al., 2008; RAISZ, 2005; ZAIDI, 2007).

A remodelação óssea requer interações reguladas entre sinais locais e sistêmicos, mediados por hormônios, fatores de crescimento, citocinas, e programas hierárquicos de fatores de transcrição ósseo - específicos definidos geneticamente (RAISZ, 2005; ZAIDI, 2007).

No geral, existem duas vias através das quais o corpo forma osso, endocondral e intramembranosa (SHAPIRO, 2008). O primeiro processo envolve a diferenciação local de células progenitoras em condrócitos que sintetizam uma matriz cartilaginosa. A cartilagem é então substituída por osso através do processo conhecido por ossificação endocondral, durante o qual a matriz cartilaginosa é degradada, vasos sanguíneos invadem a cartilagem e condrócitos são substituídos por osteoblastos. A formação intramembranosa do osso envolve a diferenciação de células progenitoras diretamente em osteoblastos sem o intermédio cartilaginoso. Ambas as vias endocondral e intramembranosa levam a formação de osso imaturo, "woven bone" que sofre remodelação em osso maduro, lamelar (SHAPIRO, 2008). Estudos sobre osteogênese têm identificado um número de fatores de crescimento com capacidade de estimular um ou mais passos envolvidos na formação óssea endocondral e intramembranosa (SIMPSON et al., 2006; LIEBERMAN et al., 2002). No alvéolo dentário, cavidade óssea formada após exodontias, observa-se apenas ossificação intramembranosa (KANYAMA et al., 2003), sem formação de cartilagem ou presença de condrócitos (SHYNG et al., 1999).

O processo de regeneração e reparo ósseos do osso, após injúrias, é caracterizado por ações integradas de diferentes células e pode ser dividido em fases seqüenciais de inflamação, migração, diferenciação e proliferação de células osteogênicas (SASAKI e WATANABE, 1995; SIQUEIRA JR. e DANTAS,

2000), síntese de matriz extracelular (MEC), mineralização do osteóide, maturação e remodelação óssea (LALANI et al., 2005).

O reparo alveolar seguido da exodontia foi estudado em diferentes modelos animais (SCHRAM, 1929; CLAFLIN, 1936; SIMPSON, 1960; KUBOKI et al. 1988; LIN et al., 1994; LEKIC et al., 2001; CARDAROPOLI et al., 2003; KANAYAMA et al., 2003; SATO E TAKEDA, 2007; MENDES et al., 2008, 2010). Vários experimentos demonstraram que o processo de reparo passa por uma série de eventos, tais como (i) formação e maturação do coágulo sanguíneo, (ii) infiltração de fibroblastos substituindo o coágulo, e eventualmente (iii) estabelecimento de uma matriz provisional que permite a formação de tecido ósseo (CARDAROPOLI et al., 2003).

Um componente essencial ao reparo ósseo normal depois da extração dental é um adequado suprimento sanguíneo. Durante as fases iniciais de reparo do ferimento, o brotamento de capilares angiogênicos invade o coágulo e dentro de poucos dias se organizam em uma rede microvascular formando parte do tecido de granulação (AGUIRRE et al., 2010).

O processo de reparo do alvéolo dental parece ser histologicamente similar àquele observado em outros sítios do esqueleto. Entretanto, o meio ambiente oral difere de outros sítios esqueléticos porque ele é banhado pela saliva e abriga espécies microbianas. O reparo do osso em um ambiente contaminado com microrganismos patogênicos apresenta um cenário diferente daquele encontrado em outros sítios ósseos (ZAHID et al, 2003) .

O reparo tecidual inicia-se com a hemostasia, responsável por bloquear a perda de sangue através de vasos rompidos (SIQUEIRA JR. e DANTAS, 2000). Após a extração de um dente, a formação de um coágulo sanguíneo no alvéolo dentário é um passo fundamental para as fases subseqüentes do reparo (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. e DANTAS, 2000), bem como possibilita a invasão de fibroblastos e células endoteliais, presentes no ligamento periodontal (LP) remanescente (YUGOSHI et al., 2002). O LP contém uma mistura de populações celulares incluindo progenitores para osteoblastos (DEVLIN e SLOAN, 2002), cementoblastos e fibroblastos, essenciais para remodelação e

formação óssea inicial no processo de reparo alveolar (LEKIC et al., 1997). Células osteoprogenitoras podem ser derivadas também da medula óssea (SHYNG et al., 1999; DEVLIN e SLOAN, 2002) e periósteo (SIQUEIRA JR. e 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, por sua vez, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que apresenta importantes funções na angiogênese e vasculogênese (LALANI et al., 2005), essenciais nos processos de cicatrização de feridas (SAVANI et al., 2001). 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, caracteriza o tecido de granulação (YUGOSHI et al., 2002). O coágulo é progressivamente reabsorvido quando é invadido por fibroblastos derivados do LP, 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 o reparo alveolar (TEÓFILO et al., 2001). As fibras colágenas inicialmente depositadas formam uma trama preliminar na qual ocorre a deposição de osso neoformado (SHYNG et al., 1999). Osteoclastos atuam na remodelação óssea das margens do alvéolo e dos septos inter-radiculares remanescentes, presentes após a extração de dentes multiradiculares (LINDHE, 1999). Por fim, os eventos de reparo alveolar culminam no preenchimento do alvéolo com tecido ósseo trabecular (DEVLIN e SLOAN, 2002).

Em ratos, dez dias após a exodontia, o alvéolo exibe grande quantidade de trabéculas ósseas e após quatorze dias de reparo, apresenta-se quase completamente preenchido por tecido ósseo que sofreu remodelação (KANYAMA et al., 2003) e maturação quase idêntica ao tecido ósseo pré-existente (KURIHASHI et al., 2002). Outros autores relataram que o alvéolo encontra-se, neste período, igualmente ocupado por tecido conjuntivo e trabéculas ósseas (TEÓFILO et al., 2001). Após quinze dias de reparo, a ferida apresenta-se

recoberta com epitélio da mucosa gengival (BOECK et al., 1999; PINTO et al., 2001) e a crista óssea está completamente remodelada (ZIED et al., 2005). Ao final da terceira semana de reparo, o alvéolo é preenchido por uma rede de trabéculas ósseas espessas, circundando espaços medulares contendo tecido conjuntivo frouxo (TEÓFILO et al., 2001). O preenchimento do alvéolo com trabéculas ósseas espessas e bem definidas, vinte e quatro dias após a extração, praticamente define o estágio final do processo de reparo (ZIED et al., 2005). Apesar de estar completamente preenchido por trabéculas ósseas, a densidade óssea alveolar máxima em ratos é alcançada aparentemente no trigésimo dia pós-operatório (LAMANO CARVALHO et al., 1997).

1.2. Estratégias para aceleração do reparo ósseo

O osso alveolar se forma durante a erupção dental (SCHROEDER, 1986) e sofre atrofia depois da perda de um único ou múltiplos dentes (PIETROKOVSKI E MASSLER, 1967; JOHNSON, 1969; SCHROPP et al., 2003; PIETROKOVSKI et al., 2007). A perda prematura de dentes e doença periodontal provocam um processo de reabsorção óssea dos maxilares, os quais demandam cirurgias ósseas e/ou enxertos de biomateriais para reabilitação de pacientes (AROSARENA e COLLINS, 2005; IZUKA et al., 2005). O processo de reabsorção óssea é extremamente prejudicial à reconstituição funcional e à reabilitação do sistema estomatognático.

As pesquisas utilizadas correntemente para o tratamento de defeitos e perdas ósseas incluem o uso de osso substituto e enxertos (LAURENCIN et al., 1999; MEYER et al., 2004). Entretanto, certas desvantagens, tais como, morbidade do sítio doador, disponibilidade limitada de tecido doador para autoenxertos, risco de transmissão patogênica do doador, e rejeição devido a resposta imunogênica têm levado os cientistas a focar no campo interdisciplinar de biomateriais e engenharia tecidual como uma alternativa de tratamento. A regeneração tecidual é um complexo processo biológico que requer interações intrincadamente reguladas entre células, fatores de crescimento locais e

sistêmicos e componentes da matriz extracelular onde essas interações são efetuadas (LEE et al., 2011; POWELL et al., 2009).

Pesquisas biológicas baseadas nos princípios da engenharia tecidual têm revelado alternativas interessantes para o reparo e regeneração da perda óssea ou do periodonto (RIPAMONTI, 2007; SCHELLER et al., 2009). Tais pesquisas têm incluído terapias baseadas em proteínas, em células e genes, além de *scaffolds* biocompatíveis contendo fatores de crescimento específicos (TABBA et al., 2005; YU et al., 2008). Várias abordagens biológicas têm sido feitas para promoção do reparo do tecido periodontal, incluindo o osso alveolar. Estas incluem o uso de fatores de crescimento (GFs) e aplicação de proteínas da matriz extracelular (JAVED et al., 2011).

1.2.1. Citocinas e fatores de crescimento

Muitos eventos biológicos são rigorosamente regulados por interações celulares mediadas por citocinas. Citocinas são pequenas proteínas solúveis produzidas por uma célula que altera localmente ou sistemicamente o comportamento ou propriedades de outra célula. Incluídas no grupo de moléculas citocinas estão as interleucinas, interferons, fatores de crescimento, fatores citotóxicos, fatores ativadores ou inibidores, fatores estimuladores de colônia e integrinas. Citocinas tem um papel importante em numerosas atividades biológicas, incluindo proliferação, desenvolvimento, diferenciação, homeostase, regeneração, reparo, e inflamação (OKADA e MURAKAMI, 1998).

Fator de crescimento é um termo geral utilizado para denotar a classe de proteínas que funcionam para promover mitogênese (proliferação celular) e atividade metabólica de células (LYNCH, 1994). Fatores de crescimento constituem um grupo de polipeptídeos de aproximadamente 45 KD, os quais estão envolvidos na proliferação celular, diferenciação e morfogênese de tecidos e órgãos durante embriogênese, crescimento pós-natal e na vida adulta. Podem agir como mitogênicos que aumentam a proliferação de certos tipos celulares. 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 produzidos localmente.

Muitos fatores de crescimento são depositados na matriz extracelular, onde são liberados e agem como parte da rede complexa de sinalização com efeitos durante remodelação e reparo tecidual. Juntos com outros fatores de transcrição eles ativam um grupo de genes, os quais então exercem funções específicas na atividade celular ou fenótipo (SCHLIEPHAKE, 2002). Numerosos fatores de crescimento têm sido identificados e caracterizados. Assim, a expressão desses vários fatores de crescimento e diferenciação celular em consequência à lesão de tecido ósseo e mole pode regular o processo de reparo e ou regeneração (RAJA et al., 2009). Fatores de crescimento regulam atividades celulares *in vivo* e suas aplicações como agentes externos bioativos têm sido relatadas induzindo a reparação óssea (LEE et al., 2002; EDLUN et al., 2008), controlando crescimento e diferenciação celular (ZIEGLER et al., 2008) e estimulando angiogênese (SHEN et al., 2008). Estudos de osteogênese têm identificado um número de fatores de crescimento com capacidade de estimular um ou mais passos envolvidos na formação óssea endocondral e intramembranosa (SIMPSON et al., 2006; LIEBERMAN et al., 2002).

Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento semelhante insulina (IGF), fator de crescimento derivado de fibroblasto (FGF) (e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) funcionam em conjunto durante formação óssea e processo de reparação de fraturas (LEE e SHINL, 2007).

Fatores de crescimento podem desempenhar importante papel na formação óssea e de cartilagem, reparação de fraturas e de tecidos músculo-esqueléticos (LIEBERMAN et al., 2002). Alguns fatores de crescimento, tais como fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento derivado de fibroblasto (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) 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). O PDGF pode estimular a proliferação de fibroblastos periodontais e sua migração em direção ao coágulo em estágios iniciais do reparo alveolar (TEÓFILO et al., 2001), enquanto TGF- β parece ter um papel importante

na diferenciação dos fibroblastos em osteoblastos (SASAKI e WATANABE, 1995). De fato, um dos modelos já testados, aplicados na terapia de GFs em defeitos ósseos foi a utilização de um concentrado de plaquetas no plasma conhecido como Plasma Rico em Plaquetas (PRP) (MARX et al., 1998; DUGRILON et al., 2002; ANITUA et al., 2007). Essas plaquetas liberam Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e o Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β) (GRUBER et al., 2003; LUCARELLI et al., 2003; GRAZIANI et al., 2006; VAN DER DOLDER et al., 2006). Contudo, resultados de estudos clínicos mostraram que o PRP não foi capaz de promover nova formação óssea (FERREIRA et al., 2005; HOKUGO et al., 2005; GERARD et al., 2006; MOOREN et al., 2007; RANLY et al., 2007; ROUSSY et al., 2007). Essa divergência tem sido atribuída às variações intra e inter-espécimes na relativa proporção dos componentes do PRP (LACOSTE et al., 2003; VAN DEN DOLDER et al., 2006).

Vários outros fatores de crescimento produzidos por células osteogênicas, plaquetas e células inflamatórias participam do reparo ósseo, incluindo IGF-1 e -2, TGF- β 1, PDGF e FGF-2 (SYKARAS e OPPERMAN, 2003). A matriz óssea serve como um reservatório para esses fatores de crescimento e BMPs, e são ativados durante reabsorção de matriz pelas metaloproteinases (BAYLINK et al., 1993, JANSEN et al., 2005). Adicionalmente, o meio ambiente ácido durante o processo inflamatório conduz ativação de fatores de crescimento latentes (LINKHART et al., 1996), os quais ajudam na quimiotaxia, migração, proliferação e diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos ou condroblastos (LINKHART et al., 1996).

Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) mostra ser um potente fator angiogênico, essencial para ambas formações ósseas intramembranosa (STREET et al., 2002) e endocondral (STREET et al., 2002; GERBER et al., 1999) e no reparo ósseo (DECKERS et al., 2000; PUFE et al., 2002). A neoformação vascular acarreta um aumento da população de células mesenquimais (WONG e RABIE, 2005) e de precursores de osteoblastos e osteoclastos para a região de dano tecidual (GIAVARESI et al., 2005).

Durante a maturação de vasos, os quais são necessariamente exigidos para um longo e estável sistema vascular sanguíneo, vários fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras orquestram passos individuais de

proliferação vascular e recrutamento de células murais (HELLSTROM et al., 2001; GAENGEL et al., 2009). A vascularização é um processo crucial durante o crescimento e desenvolvimento do osso (TOWLER, 2008). A vascularização permanece como um dos principais obstáculos para melhores resultados na reconstrução de grandes defeitos ósseos (MOON e WEST, 2008). Uma das limitações correntes para a engenharia tecidual óssea é a incapacidade de suficiente suprimento sanguíneo nas fases iniciais.

Assim, uma vez que o suporte sanguíneo seja restabelecido, a diferenciação endotelial é interrompida e o processo osteogênico é iniciado (PACICCA et al., 2003).

Administração de fatores de crescimento para promover formação óssea e reparo tem alcançado resultados promissores em uma variedade de modelos clínicos e pré clínicos (FRIEDLAENDER et al., 2001; SETO et al., 2002).

1.2.1.1. Fator de crescimento transformador – β 1 (TGF- β 1)

TGF- β está entre as citocinas mais difundidas e versáteis e tem um papel importante na formação e desenvolvimento de muitos tipos de tecidos (GAO et al., 2002). O nome fator de crescimento transformador é derivado do fato de que TGF- β pertence ao grupo de reguladores de crescimento, que foram originalmente detectados em extratos tumorais e acredita-se que induz ou mantém tipos celulares neoplásicos ou transformados (CENTRELLA e CANALIS, 1985).

TGF- β é uma citocina multifuncional que regula o crescimento, proliferação, adesão e apoptose de vários tipos celulares (MIYAZONO, 2000).

O fator de crescimento transformador – β (TGF- β) pertence à família de proteínas chamadas superfamília TGF- β . Esta família de proteínas inclui cinco isoformas do TGF- β (TGF- β 1 - TGF- β 5), as BMPs, fatores de crescimento de diferenciação, activinas, inibinas, e substância Müllerian (LINKHART et al., 1996 e LIU et al., 1996). TGF- β influencia a ampla cadeia de atividade celular, incluindo crescimento, diferenciação e síntese de matriz extracelular (LIEBERMAN et al., 2002). TGF- β é encontrado em muitos tecidos, mas é particularmente presente no osso, plaquetas, e cartilagem. É liberado pelas plaquetas depois que o coágulo é

formado no momento da fratura (ROBEY et al., 1987). É produzido por osteoblastos, estimula a expressão de proteínas da matriz óssea (WRANA et al., 1988) e suprime a atividade degradativa das metaloproteinases e outras enzimas (OVERALL et al., 1989). TGF- β também induz a diferenciação ou proliferação de células osteoblásticas enquanto inibe a formação de precursores de osteoclastos e, em concentrações maiores, pode exercer um efeito inibitório em osteoclastos maduros (BONEWALD E MUNDY, 1990).

O efeito da aplicação sistêmica de TGF- β 1 regula diferentes tipos de células (condrócitos, osteoblastos, osteoclastos, e células mesenquimais), as quais estão diretamente envolvidas no reparo de fraturas e remodelação óssea por influenciar positivamente a formação de matriz (SCHMIDMAIER et al., 2002; LOSER et al., 2003).

A capacidade de TGF- β exibir efeito profundo e prolongado no reparo ósseo é indubitavelmente um reflexo de seu efeito mitogênico em osteoblastos (PATIL et al., 2011). Entretanto, TGF- β estimula a síntese dos componentes de matriz extracelular, tais como colágeno (FINE e GOLDSTEIN, 1987), fibronectina (VARGA et al., 1987), proteoglicana (CHEN et al., 1987), glicosaminoglicana (WESTERGREN – THORSSON et al., 1990), osteonectina (PFEILSCHIFTER et al., 1990) e osteopontina em muitos tipos celulares, incluindo células do ligamento periodontal (MATSUDA et al., 1992). Além disso, inibe a degradação de matriz protéica pela inibição da síntese de metaloproteinases, tais como colagenase (LAIHO e KESKI-O JA, 1989; OVERALL et al., 1991) e pelo aumento da síntese de inibidores de proteinase (EDWARDS et al., 1987; OVERALL et al., 1989). TGF- β tem efeito significativo na formação óssea, embora seu efeito seja dependente da fonte celular óssea, dose aplicada e meio ambiente local (SCHLIEPHAKE, 2002).

Assim, todas ações de TGF- β são altamente relevantes para controlar inflamação do sítio lesionado e promover reparo tecidual em resposta à injúria (SPORN et al., 1987; BLUMENFEL et al., 1997; REINHOLZ et al., 2009).

1.2.1.2. Proteínas morfogenéticas do osso – (BMPs)

A hipótese da existência de uma substância no osso capaz de induzir nova formação óssea, foi reconhecida por Marschall R. Urist em 1965 quando ele observou que um novo ossículo tinha formado depois da implantação de matriz óssea desmineralizada em músculos de ratos (URIST, 1965). Ele denominou este fenômeno de princípio de indução óssea e mais tarde identificou a proteína responsável por este efeito, a qual deu o nome de proteína morfogenética óssea.

Proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) são membros da superfamília de TGF- β , tendo sido descritos, até o momento, trinta subtipos desta molécula (LIEBERMAN et al., 2002), altamente conservada entre as espécies (AROSARENA e COLLINS, 2005). São os mais potentes fatores de crescimento ósseo conhecidos (AROSARENA e COLLINS, 2005) e apresentam propriedades mitogênicas e morfogenéticas (LIEBERMAN et al., 2002). Este efeito, em fibroblastos e osteoblastos, induz a síntese de componentes da MEC como colágeno e fibras elásticas, além de proteínas da matriz óssea (SCHULTZE-MOSGAU et al., 2005). As BMPs apresentam papel crítico no crescimento celular e formação óssea (SCHIMITT et al., 1999).

Entre várias de suas funções, BMPs induz a formação de ambos osso e cartilagem por estimulação de eventos celulares de células progenitoras celulares. Entretanto, somente alguns subtipos de BMPs, mais notavelmente BMP-2, -4, -7 e -9, tem atividade osteoindutiva, uma propriedade de induzir formação óssea *de novo* por eles mesmos. (CHENG et al., 2003). As BMPs são estruturalmente e funcionalmente descritas juntas. Entretanto, cada uma tem um papel único, tão bem definido quanto o padrão de expressão temporal durante o processo de reparo de fraturas. Estudos do papel das BMPs no reparo de fraturas em camundongos e ratos tem mostrado uma variedade de efeitos osteogênicos, expressão temporal e capacidade mitogênica (BOSTROM, 1998; BOSTROM et al., 1995; CHO et al., 2002). Podem também estimular a síntese e secreção de outros fatores de crescimento ósseo e angiogênico, tais como fator de crescimento semelhante-insulina (IGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), respectivamente (DECKERS et al., 2002).

As proteínas morfogenéticas ósseas podem agir como fatores de crescimento e diferenciação, e como agentes quimiotáticos. Elas estimulam a angiogênese, a migração, proliferação e diferenciação de células tronco vindas de tecidos mesenquimais circundantes da cartilagem formando osso em áreas de injúrias (HUANG YI-HAO et al., 2008). As BMPs têm um papel crítico na regulação do crescimento, diferenciação e apoptose de vários tipos celulares, incluindo osteoblastos, condroblastos, células neurais, e células epiteliais (SAKOU, 1998).

A matriz extracelular compreende a fonte principal de BMPs, sendo produzidas por células osteoprogenitoras, células mesenquimais, osteoblastos e condroblastos. BMPs induzem uma cascata seqüencial de eventos para condroosteogênese, incluindo quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras, angiogênese, e síntese controlada de matriz extracelular (REDDI, 2001 e SAKOU, 1998). Seu efeito regulatório depende do tipo de célula – alvo, seu estágio de diferenciação, o local de concentração do ligante, bem como a interação com outros fatores de crescimento (GROENEVELD e BURGER, 2000).

As primeiras BMPs foram originalmente isoladas pela sua capacidade de induzir osso ectópico e formação de cartilagem in vivo em tecido muscular ou sítios subcutâneos de roedores (URIST, 1965). Esta atividade ósseo-indutiva indica que BMPs proporciona os sinais primordiais para osteodiferenciação (REDDI, 1994). BMPs são moléculas osteo-indutivas que medeiam a transformação de células mesenquimais indiferenciadas ou células precursoras da medula estromal em osteoblastos produzindo osso (CHEN et al., 1987; GORI et al., 1999).

A ação de BMPs na formação de tecido mineralizado sugere que podem ser bons candidatos para o uso na estimulação de regeneração periodontal. Isto é suportado por estudos animais indicando que BMPs podem ter considerável potencial clínico para o uso em tratamentos de regeneração periodontal (GIANNOBILE et al., 1998; RIPAMONT et al., 1994; SIGURDSSON et al., 1995).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) tem se revelado bastante promissoras na promoção de reparação de feridas, por sua capacidade de induzir

neoformação óssea em grandes defeitos ósseos (COOK et al., 1994; WANG, 1993).

Na maioria de estudos experimentais, as BMPs recombinantes humanas como rhBMP-2, rhBMP-4 e rhBMP-7 induziram formação óssea ectópica e ortotópica em sítios de administração dose dependente. BMPs, particularmente BMP-2, BMP-4 e BMP-7, parecem ser os fatores mais confiáveis de todos os fatores de crescimento correntemente discutidos com relação ao reparo ósseo em reconstrução do esqueleto facial (BOSTROM et al., 1995 e BOTTNER et al., 2000).

BMP-4 é um fator de crescimento osteogênico capaz de promover fenótipo osteogênico in vitro e também expresso durante formação óssea endocondral em reparação de fraturas (CHO et al., 2002 e NAKASE et al., 1994). Está envolvido na formação de calo ósseo nos estágios iniciais no processo de reparo e estimula a migração de monócitos sangüíneos humanos (REDDI, 2001).

Osteoblastos sintetizam BMP-4 da família BMP, estimulando a ativação de fosfatase alcalina e a expressão de osteocalcina (STEIN e LIAN, 1993). BMP-4 é conhecida por estimular a síntese de osteocalcina, um biomarcador para o processo de formação óssea (STEIN e LIAN, 1993; KOZAWA et al., 2002). Estudos prévios têm demonstrado que BMP-4 é um dos principais fatores de contribuição local na formação do calo ósseo nas fases iniciais da reparação de fraturas (NAKASE et al., 1994). BMP-4 é encontrada em células condrocíticas e mesenquimais primitivas, na camada de periósteo, na cavidade medular, e nos músculos adjacentes ao sítio fraturado (YAOITA et al., 2000). Isto indica que BMP-4 tem um papel único nas fases iniciais de reparo de fratura (LIN et al., 2009).

BMP-2, BMP-4, e proteína osteogênica (OP-1) também chamada de BMP-7, são proteínas glicosiladas de 32-36 KDa com estruturas diméricas. BMP-2 e 4 são altamente similares em suas estruturas (92% da seqüência de aminoácidos idênticas), e estão mais distantemente relacionadas com a OP-1 (58-60% de identidade da seqüência de aminoácidos) (DIJKE et al., 1994).

Além de mostrarem formação de osso ectópico as BMP-2 e BMP-4 (WANG et al., 1990; HAMMONDS et al., 1991), também demonstraram efetivo potencial

terapêutico em sítios clínicos para reparo de fraturas não-unidas (RILEY et al., 1996).

BMP-2 e 4 recombinante humana mostraram efeitos similares no reparo ósseo em defeitos mandibulares em ratos, com doses equivalentes.

1.3. Moléculas indicadoras de reparo ósseo

Os fatores de crescimento, bem como a expressão de algumas macromoléculas da matriz extracelular (MEC) como colágeno, fibronectina, osteopontina (OPN), osteocalcina (OC), VEGF, dentre outras, têm sido referenciadas como moléculas indicativas do processo de reparo ósseo (SIQUEIRA JR. E DANTAS, 2000).

Proteínas não-colagenosas da matriz representam a segunda principal classe de componentes da MEC do tecido ósseo e incluem osteonectina, osteocalcina e osteopontina (BOULETREAU et al., 2002). Após a extração dentária, células progenitoras presentes no alvéolo passam por vários estágios de maturação expressando sequencialmente osteonectina, osteopontina e osteocalcina (DEVLIN e SLOAN, 2002). Tais proteínas compõem a matriz orgânica do tecido ósseo (SHYNG et al., 1999) e parecem induzir a maturação dos componentes da MEC, por meio da mineralização da matriz óssea (SCHULTZE-MOSGAU et al., 2005). Osteopontina é observada em fibroblastos, pré-osteoblastos, osteoblastos, osteócitos (PERRIEN et al., 2002) e osteoclastos (SIQUEIRA JR. e DANTAS, 2000). Após o início da formação da matriz óssea, a osteopontina é produzida e secretada por osteoblastos, portanto, sua expressão coincide com a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas durante a formação óssea (PERRIEN et al., 2002), sendo considerada um marcador de maturação de células tronco osteogênicas (SHYNG et al., 1999). Acredita-se que promova adesão e quimiotaxia para osteoblastos (BOULETREAU et al., 2002) e osteoclastos (SIQUEIRA JR. e DANTAS, 2000; PERRIEN et al., 2002). Sua expressão no processo de reparo alveolar em ratos foi demonstrada aos três dias de reparo, com forte evidência após quatro e cinco dias de reparo, simultaneamente com a neoformação óssea, o que pode indicar um papel regulatório na mineralização. O modelo de marcação foi similar em seis e sete

dias, mas observou-se pouca marcação no oitavo dia e quase nenhuma após dez dias de reparo (SHYNG et al., 1999).

Osteocalcina é uma proteína não colágena mais abundante no osso e dentina, possui 49aa 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 do tecido osteóide. 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 co-fator essencial para que ocorra a formação de γ -carboxiglutamil (Gla). Possui em sua estrutura três ácidos glutâmicos que lhe conferem a capacidade de ligar-se ao cálcio (LEE et al., 2000) e isto pode ser importante no processo de mineralização da matriz óssea já formada.

Vários estudos tem mostrado que osteogênese é precedida por angiogênese em modelos de fraturas ósseas (GERBER et al., 1999; SOJO et al., 2005). O osso é um tecido altamente vascularizado e a angiogênese é crucial para a regeneração óssea (GLOWACKI, 1998). O suplemento sanguíneo é o principal problema na reconstrução do defeito ósseo (SANTOS e REIS, 2010). Por essa razão, a expressão do VEGF tem sido um indicativo de sucesso nos processos de reparo ósseo. Embora o VEGF seja um regulador essencial na angiogênese fisiológica, ele também tem um papel significante no crescimento (ZELZER et al., 2002; GERBER et al., 1999; HAIGH et al., 2000; RYAN et al., 1999) e reparo (STREET et al., 2002; CHU et al., 2002; PENG et al., 2002) do esqueleto. A entrega localizada do VEGF parece ser benéfica para a regeneração óssea em numerosos modelos animais pela promoção de neovascularização, *turnover* ósseo, migração de osteoblastos e mineralização (KENT et al., 2006). A produção de VEGF parece ser o principal mecanismo no qual a angiogênese e osteogênese estão fortemente relacionadas durante reparo ósseo (CARANO et al., 2003).

1.3.1. Colágeno

Representando as proteínas mais abundantes dos mamíferos, os colágenos formam uma família de macromoléculas fibrosas, secretadas por inúmeros tipos celulares. Já evidenciada em todos os animais multicelulares, a

molécula de colágeno típica apresenta uma estrutura longa, rígida, formada por uma fita tripla-helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno, chamadas cadeias α , são enroladas umas às outras formando um tipo de corda supertorcida. Cada cadeia α contém cerca de 1.000 aminoácidos, sendo até o momento identificado 25 tipos de cadeias α de colágeno. Apesar de, a princípio serem possíveis mais de 10.000 tipos de combinações das 25 cadeias, formando fitas triplas de moléculas, apenas 15 tipos de moléculas de colágenos foram encontradas. Nos tecidos conjuntivos, estão presentes, principalmente os colágenos tipo I, II, III, V e XI. Estes são os chamados colágenos fibrilares, que apresentam a estrutura típica de corda retorcida, e que se agrupam em polímeros chamados fibrilas colágenas, claramente visualizadas em micrografias eletrônicas (TAKITA et al., 1987; MARTINEZ et al., 2000).

A matriz extracelular do osso maduro é composta por 90% de proteínas colagênicas (97% colágeno tipo I e 3% colágeno tipo V) e 10% de proteínas não colágenas (osteocalcina, osteonectina, proteoglicanos, fibronectina, fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas, e outros). Todas essas proteínas são sintetizadas por osteoblastos e muitas estão envolvidas na adesão. Colágeno tipo I, III e V têm sido encontrados em ossos do crânio (CHUNG et al., 1976; HONG et al., 1979) e, também, em outros ossos (RHODES e MILLER, 1978).

A produção de componentes da MEC tem sido amplamente investigada durante a cicatrização de fraturas e desenvolvimento de ossos longos. Os colágenos são seus principais componentes e parecem desempenhar papel crítico durante a cicatrização óssea por facilitar a formação de espículas ósseas iniciais (BOULETREAU et al., 2002). Os colágenos tipo I, II, IV, IX e X são expressos na fase de proliferação como componentes essenciais da matriz óssea (SCHULTZE-MOSGAU et al., 2005). Durante os processos de reparo, fibroblastos secretam uma matriz rica em colágeno tipo I, que juntamente com outras proteínas como osteopontina, osteocalcina, osteonectina e fibronectina compõem a matriz orgânica do tecido ósseo (SIQUEIRA JR. e DANTAS, 2000). Por essa razão esses componentes tem sido referenciados como marcadores e indicativos do processo de reparo ósseo.

Durante o processo de reparo ósseo, a formação de fibras colágenas é iniciada quando filamentos colágenos liberados por osteoblastos reúnem

extracelularmente dentro de fibrilas agrupadas para formar o osteóide (SODEK e MCKEE, 2000). Este tecido imaturo permite a deposição de cristais de hidroxiapatita responsáveis pela mineralização da matriz óssea (SODEK e MCKEE, 2000; BOULETREAU et al., 2002).

Estudos mostraram que a matriz orgânica do tecido ósseo consiste principalmente de colágeno tipo I (VEIS, 1984). Colágeno tipo III é mencionado brevemente e existe poucos comentários na literatura a respeito de tecidos duros, onde ele aparece transitoriamente no desenvolvimento de fraturas (PAGE, 1986) e mais constantemente em regiões de deposição de matriz óssea inicial, imatura “woven bone” em mandíbulas (BECKER et al., 1986).

CLORE e colaboradores (1979) observaram que o colágeno tipo III foi aumentado significativamente após 10 horas do início no processo de cicatrização. O colágeno tipo III, também foi observado em altas concentrações nas fases iniciais do reparo ósseo (BARNES et al., 1976).

Em um estudo de reparo alveolar após exodontia em ratos, foi mostrado que sete dias após extração do dente, ambos colágenos tipo I e III estavam expressos nos alvéolos controles e tratados. A quantidade de colágeno tipo I aumentou no osteóide enquanto a expressão de colágeno tipo III diminuía progressivamente (MENDES et al., 2010).

Colágeno tipo I e III, como principais constituintes para todos os tecidos conectivos intersticiais, são essenciais no estabelecimento da integridade estrutural e fisiológica da regeneração tecidual (IVANOVSKY et al., 2000). Tem sido previamente sugerido que colágeno tipo III tem papel na regulação da composição de matriz extracelular e também serve como marcador para células e tecidos que ainda estão em processo de modificação e/ou diferenciação (TUNG et al., 1985). Esta opinião corroborou com a observação da forte expressão de colágeno tipo III encontrada na linhagem celular recentemente diferenciada sobre o cimento e na linhagem osteoblástica do osso alveolar (SCULEAN et al., 2003).

1.3.2. Fibronectina (FN)

Fibronectina pertence a um grupo de glicoproteínas com alto peso molecular que existe nas superfícies celulares. É encontrada em tecidos conjuntivos, membranas basais e fluidos extracelulares, e tem papel na adesão célula-célula e substrato-célula (SABA et al., 1980)

A proliferação, diferenciação, e migração celular induzidos por fatores de crescimento dependem da adesão de células com a matriz extracelular (HYNES, 1986).

Comumente presentes na matriz extracelular, as chamadas proteínas adesivas contribuem amplamente para a organização do tecido, propiciando a ligação entre as células e os elementos fibrilares e moleculares. Uma das primeiras proteínas adesivas a ser caracterizada foi a fibronectina, glicoproteína presente em todos os vertebrados. Trata-se de um dímero, constituído por duas sub-unidades que se unem por pontes dissulfeto. As estruturas que tornam essa molécula protéica tão multifuncional e complexa são seus variados e múltiplos domínios, cada um com sítios específicos para outras macromoléculas da matriz e para receptores de superfície de componentes celulares. Estudos utilizando enzimas proteolíticas permitiram clivar a cadeia polipeptídica em determinados pontos e isolar cada domínio funcional. Dessa forma demonstrou-se que, enquanto um dos domínios liga-se, por exemplo, ao colágeno, outro pode se ligar ao fibroblasto e outro ainda à heparina e assim por diante, integrando e organizando os elementos da matriz entre si (ALBERTS et al., 2003; MARTINEZ et al., 2000; SCHMIDINGER et al., 2003). Fibronectina, é utilizada portanto, como um substrato para ligação celular (HYNES, 1986).

Demonstrou-se a existência de várias isoformas de fibronectina, entre elas a chamada fibronectina plasmática, solúvel e que circula no sangue e outros líquidos corporais. Todas as outras formas são altamente insolúveis e se apresentam na forma de filamentos depositados na matriz extracelular (ALBERTS et al., 2003; MARTINEZ et al., 2000; SCHMIDINGER et al., 2003).

Fibronectina é uma glicoproteína multifuncional expressa por múltiplos tipos celulares e tem papel chave em uma ampla variedade de funções celulares, tais como adesão, migração, diferenciação, entre outras (LINDE et al., 1982;

LINDE, 1985; KARJALAINEN et al., 1986; MAGLOIRE et al., 1988; VERON et al., 1990; TZIAFAS et al., 1995; FARGES et al., 1995; ZHU et al., 1998; IZUMI et al., 1998; MARTINEZ et al., 2000; SCHMIDINGER et al., 2003). Por essa razão, a fibronectina tem sido referida como uma molécula de adesão fundamental para a embriogênese, homeostase, cicatrização de ferimento, e manutenção da integridade tecidual, processos que dependem de interações entre células e matriz extracelular (HYNES, 1990).

Fibronectina é uma proteína moderadamente abundante no sangue (aproximadamente 300–400 g/ml e 580 g/ml para humanos e ratos, respectivamente). Em consequência da injúria tecidual, a fibronectina é extravasada dos vasos lesados e, junto com as plaquetas e fibrinas, formam um tampão hemostático. Este coágulo rico com fibronectina serve como uma matriz provisional para suportar a migração celular durante o processo de fechamento do ferimento. No entanto, foi sugerido que a fibronectina produzida localmente em sítio de ferimento cutâneo em ratos é suficiente para guiar o processo de reparo normal (SAKAI et al., 2001).

A primeira reação biológica na interface entre o biomaterial e o tecido depois da implantação é a adsorção de fluidos protéicos dentro da superfície, e subsequente resposta biológica é controlada por essas proteínas adsorvidas (HORBETT, 1993; PULEO et al., 1999). A seletiva adsorção de moléculas benéficas tem sido objeto de estudo para a modificação de superfícies de implantes. De fato, estudos têm revelado que a cobertura da superfície com proteínas adesivas celulares, tais como fibronectina, colágeno, e/ou laminina, melhorou a ligação inicial, difusão e atividade celular (CANNAS et al., 1988; ROEHLECKE et al., 2001). A aplicação de fibronectina na superfície do implante parece favorecer a osseointegração de implantes dentais no osso (CHEN et al., 2010; DO SERRO et al., 2000). Fibronectina é uma das proteínas de adesão celular que melhoram a atividade, ligação inicial e difusão celular, e está ativamente envolvida na reorganização do esqueleto e formação do tecido ósseo, em parte pela regulação da sobrevivência de osteoblastos (WEISS et al., 1980). Tem importante papel na osseointegração devido sua capacidade de realizar a ligação de osteoblastos com componentes da matriz extracelular (SUNGTAI et al., 2011).

1.4. Sistemas carreadores de moléculas biologicamente ativas – Lipossomas

A utilização de alguns compostos terapêuticos tem sido limitada por vários fatores, tais como: impossibilidade do aumento da sua dosagem, retenção, 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 e CASTANHO, 2002).

A eficácia de BMPs para reparo de defeitos parece ser fortemente dependente do tipo de carreador. A maioria dos estudos tem utilizado um único protocolo com administração local de BMPs. A aplicação tópica por injeção de soluções aquosas de BMPs é inviabilizada devido à rápida dissolução e degradação proteolítica. Colágenos, ácidos poli-alfa-hidroxi, fosfato de cálcio, osso bovino desproteínizado e titânio têm sido utilizados como carreadores para sustentar o nível de atividade BMP. Embora aconteça um alto efeito durante as primeiras horas, sua atuação se esgota devido à ineficácia da maioria dos carreadores utilizados. O curto período de permanência parece, entretanto, ser suficiente para uma indução inicial da cascata de formação óssea endocondral promovendo reparo ósseo em defeitos de vários modelos (SCHLIEPHAKE, 2002).

A entrega de fatores de crescimento para regeneração de tecido periodontal tem sido cogitada como futura ferramenta terapêutica na terapia periodontal, pois há evidências de que muitos deles poderiam aumentar a regeneração do aparato de suporte periodontal (GIANNOBILE, 1996; KING e HUGHES, 2001; RENVERT e PERSSON, 2004; KAIGLER et al., 2006).

A entrega controlada de certas moléculas em proporção determinada permite ação prolongada e promove proteção como agente bioativo o qual pode por outro lado, ser rapidamente metabolizado (BUKET et al., 2008).

Em geral, fatores de crescimento para aplicações ortopédicas têm sido administrados em grandes doses por uma única ou repetidas injeções, mas em tais aplicações uma considerável proporção do agente se perde através de microinfiltração e/ou baixa bioatividade (LEE e SHIN, 2007). Encapsulação de

fatores de crescimento em estruturas carreadoras, poderia ser de extrema importância na proteção da bioatividade do agente, prolongando sua presença no defeito do sítio. Várias tentativas têm sido realizadas para incorporação de fatores de crescimento em estruturas capazes de suprir a proteção necessária e atividade prolongada além de realizar o controle adequado da atividade celular nos sítios implantados (HSU et al., 2006; KESKIN et al., 2005).

Métodos de entrega incluem: administração por injeção utilizando seringa (KATO et al., 1998; VIKJAER et al., 1997); liberação de proteínas adsorvidas em superfícies de implantes, em esponjas de colágeno, ou em substratos porosos (FRIEDLAENDER et al., 2001; GOVENDER et al., 2002; LIND et al., 1996); entrega contínua via bomba osmótica (GOODMAN et al., 2000; WANG e ASPENBERG, 1996); e liberação controlada de proteínas encapsuladas em polímero biodegradável (SCHMIDMAIER et al., 2002; LEE et al., 1994; WOO et al., 2001).

Desde a formação tecidual até o reparo ocorre uma complexa cascata de eventos nos quais um complexo número de fatores de crescimento estão envolvidos, e a entrega controlada de combinações de fatores de crescimento em scaffolds parece ser a estratégia ideal em aplicações como na engenharia tecidual (BUKET et al., 2008).

Na terapia periodontal tem se buscado um suporte ou scaffold biodegradável para preenchimento de defeitos ósseos e para a liberação de células no sítio do ferimento (KAO et al., 2005). O scaffold ideal para periodonto e para engenharia tecidual óssea/cartilagem deveria ser relativamente fácil de manipular, permitir a incorporação de células, permitir livre difusão de células e fatores de crescimento, permitir o estabelecimento vascular assegurando a sobrevivência de células implantadas, induzir uma mínima resposta inflamatória e ser finalmente biodegradado (CORNELL, 1999; JIANG et al., 2006).

Os dois principais desafios na entrega de fatores de crescimento em scaffolds da engenharia tecidual são a seleção de coquetéis de fatores de crescimento adequados e controle da relação entre concentração e tempo. A melhoria do efeito osteogênico com múltiplos fatores de crescimento tem sido bem estabelecido (LUU et al., 2007).

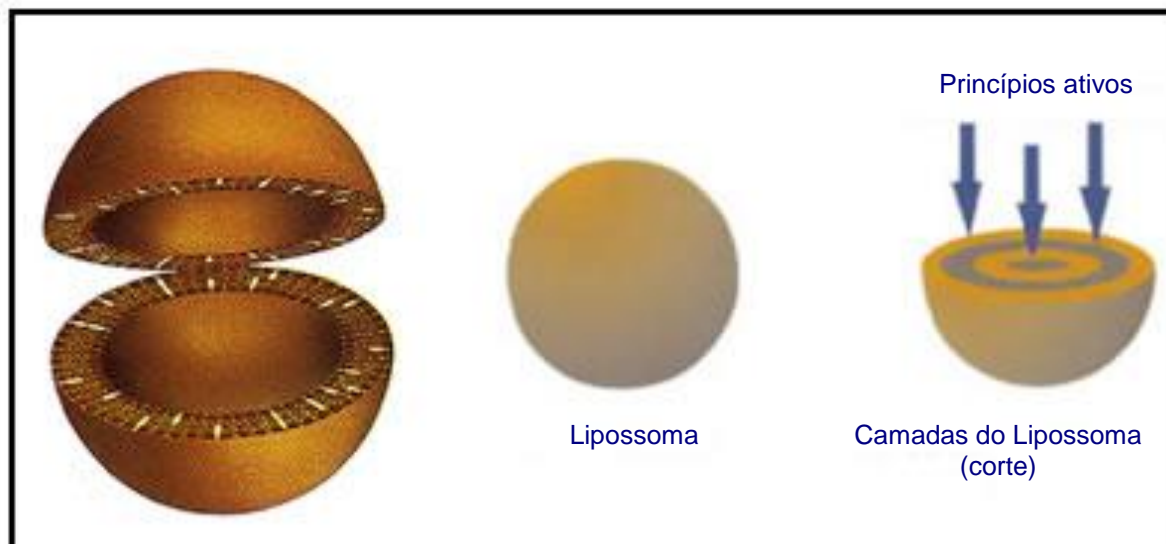
Nas estratégias da engenharia tecidual, a presença local de fatores de crescimento no sítio do defeito tecidual, desencadeia processos de reparo, sendo esta condição essencial para resultados bem sucedidos (ANITUA et al., 2007; BABENSEE et al., 2000). Os fatores de crescimento geralmente mostram um curto período de vida na circulação (GOLDEN et al., 2008; EDELMAN et al., 1993), pois sofrem rápida degradação in vivo. A administração por injeção utilizando seringa ou infusão sistêmica /local resultaria em mais baixa disponibilidade de fatores de crescimento que a exigência fisiológica para reparo tecidual (ANITUA et al., 2007). Por outro lado, repetidas administrações podem conduzir efeitos sistêmicos indesejáveis e toxicidade devido a distribuição não específica e acumulação de fatores de crescimento por todo o corpo. Além disso, fatores de crescimento mal passam através da barreira biológica, as quais são principalmente compostas por membranas lipídicas, por causa de sua pobre difusividade e baixo coeficiente divisor na fase lipídica (COUVREUR e PUISIEUX, 1993). Para um resultado clínico eficiente, um sistema de entrega para fatores de crescimento seria necessário para guiar o fator de crescimento para o sítio de ação e impedir a rápida dispersão do sítio.

Em 1965, com a publicação de Bangham e colaboradores, caracterizou-se um sistema de vesículas fosfolipídicas, denominado lipossomas (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), capazes de levar medicamentos para o interior das células, podendo diminuir seus efeitos tóxicos e aumentar sua estabilidade (PRISTA et al., 1996). Lipossomas são vesículas fechadas formadas por bicamadas de fosfolipídeos hidratados, os quais incluem um núcleo aquoso (FIG. 1) (SUFENG e HASAN, 2009).

Durante o processo de formação das vesículas lipossomas podem surgir estruturas mono ou policompartimentais. Neste último caso, as camadas duplas são concêntricas e se alternam com compartimentos aquosos, podendo, portanto, carrear fármacos hidrossolúveis ou lipossolúveis. Podem classificar-se de acordo com a sua dimensão, em vesículas unicompartimentais pequenas (SUV – Small Unilamellar Vesicles), vesículas unicompartimentais grandes (LUV - Large

Unilamellar Vesicles), ou vesículas pluricompartimentais (MLV - Multilamellar Vesicles) (PRISTA et al., 1996). (FIG.1).

FIGURA 1 – Estrutura unilamelar do lipossoma



FONTE: Adaptado de Oliveira, A. et al www.unesp.br acesso em 30/10/2004.

Uma das principais vantagens da utilização dos lipossomas como transportadores é a facilidade de incorporação de fármacos, independente de sua carga ou massa molecular. Além disso, soma-se outras vantagens, como sua biodegradabilidade, baixa toxicidade, 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 velocidade de liberação de uma determinada droga (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 (LASIC, 1993). O aspecto dos lipossomas assemelha-se a uma membrana celular em sua estrutura e composição. Eles são tipicamente feitos de moléculas lipídicas naturais, biodegradáveis, não-tóxica 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).

Os componentes básicos dos lipossomas são fosfolipídios, naturais ou sintéticos, um esterol 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 pólo negativo e um pólo positivo, sendo chamada anfiprótica, e que coexiste com uma porção hidrófila e uma porção lipófila (PRISTA et al, 1996).

O mecanismo de formação das vesículas liposômicas baseia-se na dispersão dos fosfolípidos de membrana. Quando se dispersam fosfolípidos em um meio aquoso, formam-se espontaneamente vesículas, na maioria das vezes ovaladas, constituídas por estruturas tubulares. Os fosfolípidos 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 que os grupos polares se orientam para o exterior aquoso (PRISTA et al., 1996).

A aplicação de lipossomas para a disponibilização de drogas baseia-se nas características físicoquímicas e coloidais destas vesículas, tais como composição, tamanho, carga eficiente e estabilidade, além de suas interações biológicas com as células (LASIC, 1993).

Várias vias de administração de lipossomas têm sido experimentadas, como: intravenosa, intramuscular, subcutânea, dérmica, ocular, pulmonar, nasal ou oral (SANTOS e CASTANHO, 2002).

A disponibilização local de fatores de crescimento no alvéolo do dente extraído, pode favorecer os procedimentos clínicos no reparo ósseo. Para tanto um sistema capaz de liberar o composto terapêutico de forma gradual e constante durante o processo de reparação óssea alveolar seria desejável. Os lipossomas tem sido os carreadores de escolha como veículo de distribuição para compostos biologicamente ativos.

De fato, a eficiência das vesículas de lipossomas como carreadores de fator de crescimento (EGF), foi constatada em trabalhos anteriores, realizados em nosso laboratório. O fator de crescimento foi mantido no microambiente experimental, sendo liberado gradualmente até 14 dias (SADDI et al., 2007; ALVES et al., 2009). A disponibilização da droga em solução (PBS) não foi eficaz, possivelmente pela rápida degradação e difusibilidade do fator de crescimento nos primeiros dias da cicatrização.

2. JUSTIFICATIVA

Vários fatores causam deformidade óssea, como doenças de herança congênita, traumas complexos, defeitos de crescimento, ressecção de tumores e outros fatores etiológicos (BASMNAV et al., 2008; DIMITRIOU et al., 2011; REIS-FILHO et al., 2011). A medicina atual tem tratado tais defeitos com enxertos ósseos autógenos ou alógenos, os quais representam a melhor alternativa em termos de integração e qualidade óssea. Entretanto, podem representar riscos para o doador (morbidade) tão bem como para o paciente, incluindo infecção e imunorrejeição. Além disso, a disponibilidade de tecidos para autoenxertos é baixa (LAURENCIN et al 1999; MEYER et al., 2004; BASMNAV et al., 2008). Considerando estas limitações e desafios, pesquisadores têm focado seus trabalhos nos procedimentos de engenharia tecidual e biomateriais capazes de promover o reparo ósseo de maneira mais rápida e eficiente.

Fatores de crescimento têm sido escolhidos para otimizar o processo de reparo ósseo e tem mostrado resultados adequados em modelos experimentais (FRIEDLAENDER et al., 2001; SETO et al., 2002; RAICHE e PULEO, 2004; MANNING et al., 2011; LEE et al., 2011). Procedimentos terapêuticos correntes com fatores de crescimento consistem na administração de altas doses destes mediadores, o que não é fisiologicamente seguro. Altas concentrações dessas moléculas podem levar a perda de bioatividade ou ainda, os mediadores podem ser parcialmente eliminados antes da realização do reparo (LEE e SHIN, 2007; KAIGLER et al., 2008; DIMITRIOU et al., 2011). Tem sido demonstrado que a presença de fatores de crescimento no ferimento tem efeito importante na estimulação da cicatrização (BABENSEE et al., 2000; ANITUA et al., 2008; ZHANG e ULUDAĞ, 2009). Entretanto, sua rápida degradação in vivo, desencadeada em alguns minutos, associada ao metabolismo celular tornam a injeção local ineficiente para alcançar a regeneração óssea (EDELMAN et al., 1993; ANITUA et al., 2007; GOLDEN et al., 2008; ZHANG e ULUDAĞ, 2009).

Por estas razões, a encapsulação de fatores de crescimento em sistemas de entrega tem sido a melhor estratégia para mantê-los bioativos e presentes por mais tempo dentro do ferimento. Tais sistemas viabilizam o transporte das

moléculas bioativas de modo mais eficiente para o ligante sem a rápida dispersão e metabolização (ZHANG e ULUDAĞ, 2009).

Os lipossomas têm sido utilizados como carreadores de uma variedade de moléculas, tais como proteínas, nucleotídeos, plasmídeos e drogas. A eficiência das vesículas de lipossomas como carreadores de fator de crescimento (EGF) foi constatada em trabalhos anteriores, realizados em nosso laboratório (SADDI et al., 2008; ALVES et al., 2009). No presente estudo, utilizamos lipossomas como carreador para BMP-4 e TGF- β 1 (isolados e associados). Trabalhamos com a hipótese de que tais moléculas sejam liberadas gradativamente em sítios de alvéolos de ratos após extração, podendo assim, acelerar o processo de reparo de alvéolos.

Atualmente, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são os fatores de crescimento mais osteoindutivos descritos na literatura, devido sua capacidade de induzir a diferenciação osteoblástica.

As BMPs mais osteogênicas são BMP- 2, -4, -6, -7 e -9 (ALLORI et al., 2008). BMP-4 e BMP-2 são essenciais para formação osteoblástica e osteoclástica, e são as BMPs mais fortemente expressas em reparo de fraturas mandibulares, em modelos de roedores, tanto quanto na formação de novo osso durante distração osteogênica de mandíbula (SPECTOR et al., 2001; ABE et al., 2006; MASAKI et al., 2003).

O papel proeminente do TGF- β no reparo ósseo parece ser síntese de matriz de células ósseas. Entretanto, existe um efeito aditivo de baixas doses de TGF- β em conjunção com altas doses de BMP. TGF- β pode, entretanto, ser utilizado como fator adjuvante em associação com BMPs para potencializar o efeito na formação óssea (SCHLIEPHAKE, 2002).

Considerando que, no osso, as células são expostas a diversos fatores de crescimento simultaneamente, as terapias ósseas ideais deveriam envolver uma mistura dessas proteínas, com similaridades no processo de cicatrização do tecido ósseo (CHEIFETZ et al., 1996; ROETHY et al., 2001; RAICHE e PULEO, 2004; AROSARENA e PULEO, 2007).

Nesse sentido, combinações de fatores de crescimento têm grande potencial de aumentar o reparo ósseo. Trabalhos prévios tem mostrado que “coquetéis” de fatores de crescimento podem ter efeitos aditivos e sinergistas na

proliferação, motilidade, diferenciação, e atividade de vários tipos celulares ambos *in vitro* e *in vivo* (RAICHE e PULEO, 2004). Vários fatores de crescimento têm sido testados sozinhos ou em conjunto, mas, o melhor tratamento não tem sido claramente definido (NAUTH et al., 2011).

Assim, é possível que o tratamento dos alvéolos com BMP-4 e TGF- β 1 associados em lipossomas, possa acelerar o reparo ósseo e desse modo, contribuir para a reabilitação protética, antecipando a colocação de implantes e próteses dentárias, devolvendo a função mastigatória aos pacientes, restabelecendo as áreas edêntulas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de fatores de crescimento BMP-4 e TGF- β 1, isoladamente e associados, administrados em vesículas de lipossomas, no processo de reparo de alvéolos dentários de ratos, após 03, 07, 14, e 21 dias da exodontia dos segundos molares superiores.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar por meio de análise histomorfométrica, a proliferação vascular nos alvéolos controles e submetidos a injeção de TGF- β 1 e BMP-4, em lipossomas ou em PBS.
- Avaliar, por meio de técnica imunohistoquímica a expressão das proteínas colágeno tipo III e fibronectina em alvéolos controles e submetidos a injeção de TGF- β 1 e BMP-4 em lipossomas ou em PBS.
- Avaliar por meio de análise histomorfométrica, o percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controles e submetidos a injeção de TGF- β 1 e BMP-4 em lipossomas ou em PBS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparação de BMP-4 e TGF- β 1 em lipossomas

Os lipossomas com BMP-4 e TGF- β 1 foram preparados de acordo com ALVES et al 2009, como se segue: BMP-4 ou TGF- β 1 foram dissolvidos em 1mL de 10mM de ácido acético contendo 0.1% (w/v) de albumina de soro bovino (BSA) em 0.2 μ g/ml de concentração final e armazenados a -20 °C. Os lipossomas foram obtidos por sonicação utilizando uma solução de 12 mg/mL de dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) e 1.2 mg/mL de lisofosfatidil colina (LPC) dissolvidos em 4 ml de clorofórmio e 10 μ L de solução BMP-4 ou TGF- β 1, produzindo vesículas unilamelares homogêneas com aproximadamente 100 nm de diâmetro.

4.2. Animais

Este estudo utilizou ratos (*Rattus norvegicus*), Wistar, machos, adultos, 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.

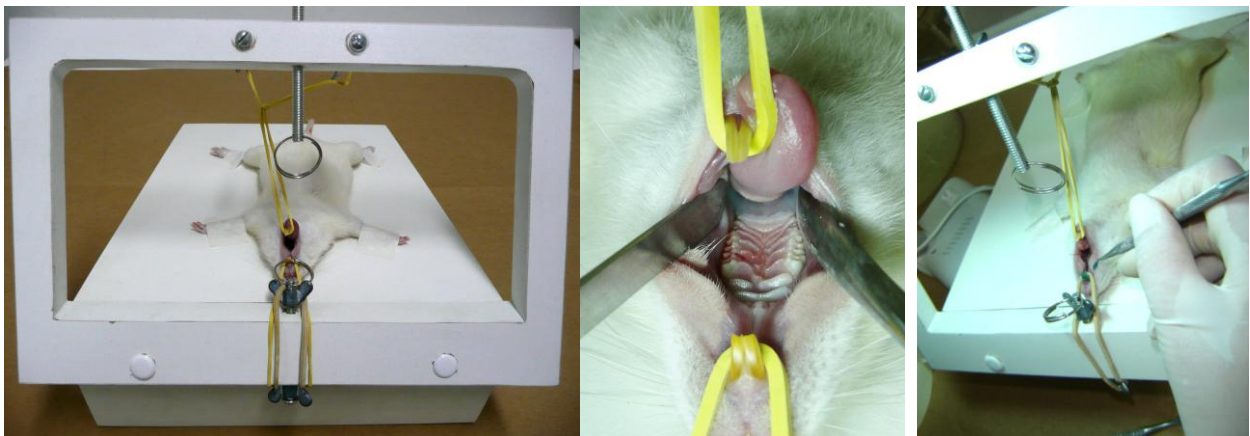
Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob nº 207/2009 (ANEXO 1) .

4.3. Procedimentos cirúrgicos e grupos experimentais

Após a anestesia intramuscular de 2% xilazina e 10% ketamina (1:1, 0,1 ml/100g de peso corporal). Os animais (n=112) foram posicionados na mesa operatória e submetidos aos procedimentos cirúrgicos. Utilizando-se um instrumento de Holleback para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação, os segundos molares superiores direitos e esquerdos foram extraídos (FIG. 2). 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 no quadro 1: o grupo L: 1 μ L de lipossomas vazios; grupo P: 1 μ L de tampão fosfato salino (PBS); grupo BP: 20 ng / μ L de BMP-4 em 1 μ L de PBS, grupo BL: 20 ng / μ L de BMP-4, em lipossomas em 1 μ L de PBS, grupo TP: 20 ng / μ L de TGF- β 1 em 1 μ L de PBS, grupo TL: 20 ng / μ L de TGF- β 1 em lipossomas em 1 μ L de PBS e grupo BTL: 20 ng / μ L de BMP-4 e 20 ng / μ L de TGF- β 1 em lipossomas em 1 μ L de PBS. Os fatores de crescimento associados ou não aos lipossomas foram administrados com uma seringa de precisão (Hamilton, Bonaduz, Switzerland), graduada em microlitros (FIG. 3). As microinjeções foram aplicadas dentro do coágulo, com volume de 1 μ L, 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 cirúrgicos, por overdose anestésica, seguida de deslocamento cervical.

FIGURA 2 – Mesa cirúrgica e acesso ao campo operatório



A)- Rato posicionado na mesa cirúrgica; B)- Visão do maxilar superior do animal, previamente às exodontias; C)- Início das fases de exodontias (afastamento dos tecidos periodontais – sindesmotomia).

Fonte: Fotos do autor

FIGURA 3 – Seringa HAMILTON COMPANY®



QUADRO 1 – Grupos experimentais

Grupo	Descrição	Número de amostras /período de sacrifício			
		3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
P	1µL PBS	4	4	4	4
L	1µl de lipossomas vazios	4	4	4	4
BP	20 ng/µl de BMP-4 em1µl de PBS	4	4	4	4
BL	20 ng/µl de BMP-4 em lipossomas em1µl de PBS	4	4	4	4
TP	20 ng/µl de TGF-β1 em em1µl de PBS	4	4	4	4
TL	20 ng/µl de TGF-β1 em lipossomas em1µl de PBS	4	4	4	4
BTL	20 ng/ µl de BMP-4 e 20 ng/µl de TGF-β1 em lipossomas em1µl de PBS	4	4	4	4
TOTAL N= 112 ANIMAIS					

Fonte: Elaborado pelo autor

4.4. Métodos histológicos

Após o sacrifício, 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%.

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 imunohistoquímica, 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 ou processados para imunohistoquímica. Os cortes foram observados pela primeira vez em um microscópio de luz (AxioVision, Carl Zeiss - Göttingen, Germany) e foram obtidas imagens da raiz distal dos alvéolos do 2º molar superior, de acordo com métodos previamente estabelecidos. A avaliação histológica do processo de reparo foi realizada analisando a parte central dos alvéolos, incluindo o terço apical (inferior), médio e cervical (superior) (FIG.4) (MENDES et al., 2010). Foram selecionados para análise somente alvéolos com limites visíveis. Para as análises histológicas, em ambos os grupos, tratados e controle, foram considerados os seguintes critérios: padrões de organização e maturação do tecido conjuntivo que preenchia os alvéolos; presença de células ósseas

(osteoclastos, osteoblastos), tecido ósseo neoformado, vasos sanguíneos, presença de reação inflamatória.

FIGURA 4 - Imagem panorâmica – alvéolo dentário

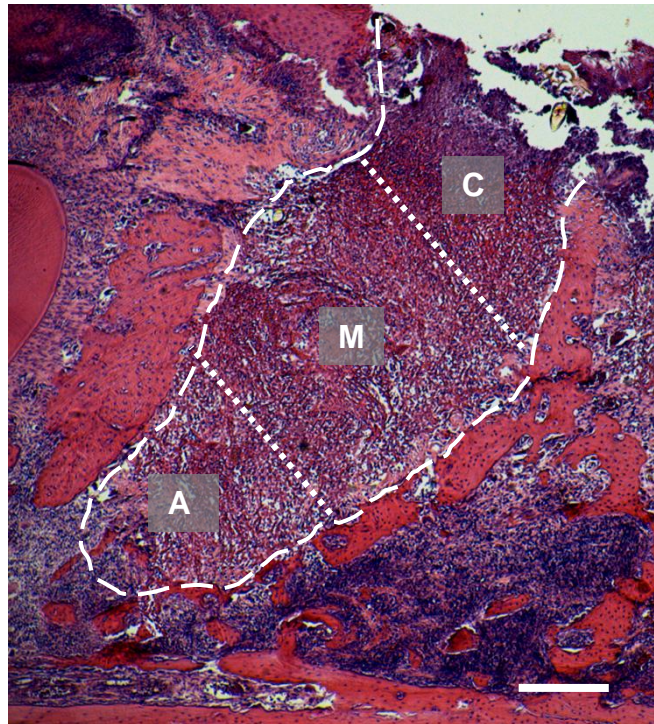


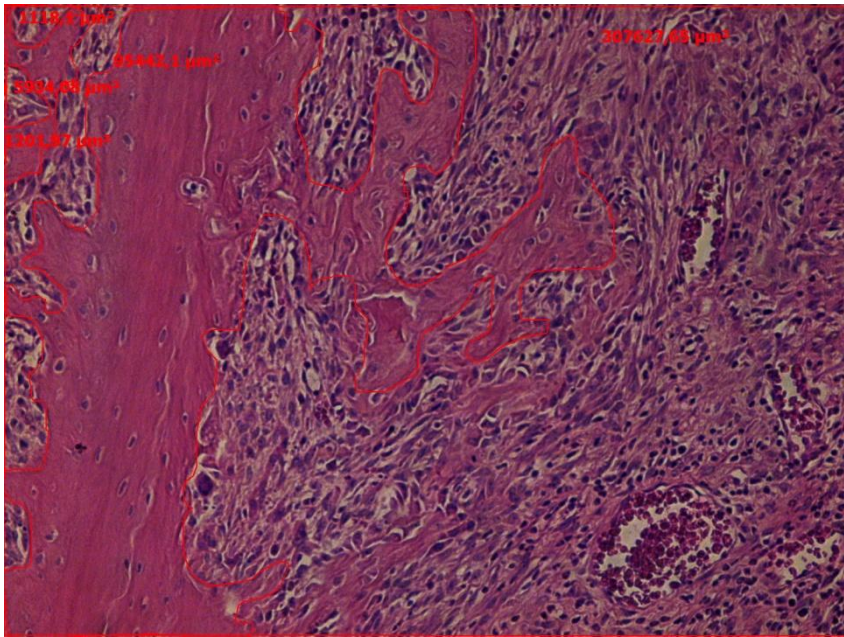
Imagem panorâmica de alvéolo da raiz distal do segundo molar superior. Regiões apical, média e cervical. HE. Barra = 300 μ m A = Terço apical; M = Terço médio; C = Terço cervical
Fonte: Fotos do autor

4.5. Métodos morfométricos

4.5.1. Avaliação do preenchimento ósseo

A análise morfométrica foi realizada de acordo com trabalhos prévios. (REIS-FILHO et al., 2012; ALVES et al., 2009). Três cortes foram aleatoriamente selecionados para cada grupo. As imagens foram obtidas a partir dos terços apical, médio e cervical da raiz distal dos alvéolos. Com o auxílio do software AxioVision Release 4.8 (Carl Zeiss), a área total de cada amostra foi determinada. Em seguida, a área trabecular de cada secção foi contornada e registrada (FIG. 5). O percentual de área óssea trabecular de cada campo foi obtido dividindo a medida da área trabecular pela área total usando os recursos do mesmo software.

FIGURA 5 – Avaliação do preenchimento ósseo

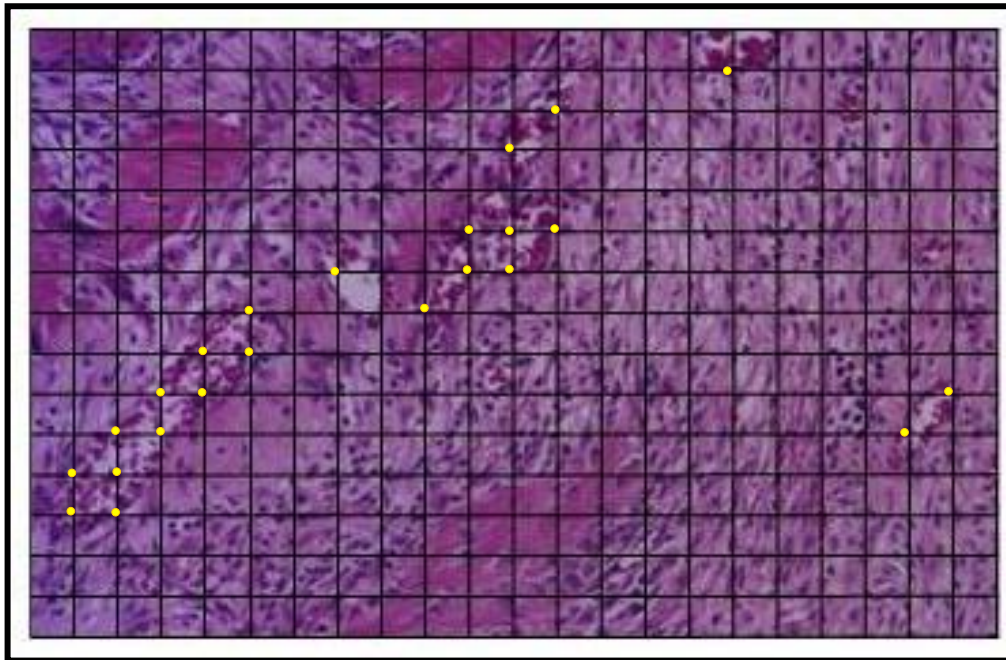


Fonte: foto do autor

4.5.2. Avaliação dos vasos sanguíneos

A proliferação de vasos sanguíneos na área de reparo foi mensurada como previamente descrito (ALVES et al., 2009), utilizando-se uma grade histométrica com linhas verticais e horizontais, colocada sobre as fotomicrografias com auxílio do Confocal Assistant (Chapel Hill, NC). Os pontos de interseções das linhas da grade posicionados nas áreas ocupadas por vasos sanguíneos (FIG. 6) foram contados por uma pessoa calibrada como descrito por REIS-FILHO et al., 2012. Todos os dados foram registrados e expressos como histogramas.

FIGURA 6 – Grade histométrica



Grade histométrica utilizada para a contagem do número de pontos (interseções aqui indicadas em amarelo) ocupados pelos vasos sanguíneos
Fonte: Foto do autor

4.6. Método Imunohistoquímico

Uma vez que a fibronectina e colágeno tipo III são expressos na fase precoce de reparo ósseo, foram avaliados por imunoperoxidase, aos 3 e 7 dias após os procedimentos cirúrgicos. Para tanto, as secções foram coletados em lâminas de vidro previamente silanizadas com 3 - aminopropiltriétoxi-silano (Sigma) e submetidos ao seguinte protocolo:

- Desparafinização

Xilol I – 1 hora/ temperatura ambiente

Xilol II – 15 minutos/ temperatura ambiente

- Hidratação

Etanol 100% I – 5 minutos

Etanol 100% II – 5 minutos

Etanol 95% – 5 minutos

Etanol 80% – 5 minutos

5 banhos em água deionizada

- Lavagem em água deionizada

- Bloqueio da Peroxidase Endógena
- Peróxido de Hidrogênio - 3% por 1 hora

Lavagem em água deionizada

- Lavagem em tampão TBS (Tris-buffered saline, pH 7,4)

3 banhos – 5 minutos cada temperatura ambiente

- Bloqueio de ligações inespecíficas

BSA 2% + Tween 20 0,1% - 1h em câmara úmida à temperatura ambiente

- Incubação com anticorpos primários por 2h em câmara úmida escura, à temperatura ambiente:

Anti-fibronectina (1:100, coelho policlonal ab23751 - Abcam, Cambridge, UK) – diluição 1:100

Anti- colágeno III (1:100, anticorpo policlonal de coelho ab7778 - Abcam, Cambridge, UK) – diluição 1:100

Anticorpos foram diluídos em solução DAKO (2012-07 S3022 /Antibody diluent with background reducing component).

Como controle negativo, foram omitidos os anticorpos primários em secções subsequentes.

- Lavagem com banhos TBS– 3 banhos de 5 minutos cada
- Incubação com Anticorpo Secundário biotinilado (Universal [™] LSAB + Kit / HRP, Rb / Mo / Cabra K0690-1 - Dako, Glostrup, Dinamarca)
- Lavagem com banhos TBS – 3 banhos de 5 minutos cada
- Revelação com diaminobenzidina:

350 µM 3,3´- diaminobenzidine (Sigma Chemical Co.) e 1% H₂O₂ em TBS.

- Bloqueio da revelação com TBS
- Contra-Coloração com Hematoxilina de Mayer – 1 minuto
- Desidratação

Etanol 70% I – 5 minutos

Etanol 70% II – 5 minutos

Etanol 90% – 5 minutos

Etanol 100% I – 5 minutos

Etanol 100% III – 10 minutos

- Diafanização

Xilol I – 5 minutos

Xilol II – 10 minutos

- Montagem com Entelan

4.6.1. Quantificação da expressão imunohistoquímica:

Imagens das secções de ambos os lados experimental e controle foram obtidas com aumento final de 400X, 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 imunoeexpressão nas áreas de matriz extracelular foram contadas utilizando o mesmo método de grade histométrica para a quantificação vascular.

4.7. Análise estatística

Os dados coletados foram estatisticamente testados utilizando o teste de Tukey em concordância para análises de Dun. Todos os grupos foram avaliados três vezes e foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Análise Histológica e histomorfométrica

Após três dias da cirurgia, os terços apical, médio e cervical dos alvéolos do grupo BC (controle) estavam preenchidos com coágulo sanguíneo e infiltrado inflamatório (FIG. 7) . Os grupos L, P, BP e TP revelaram aspectos histológicos similares ao grupo controle (BC).

No grupo tratado com fator de crescimento em lipossomas (grupos BL), o coágulo sanguíneo dos terços apical e médio foi substituído por tecido conjuntivo composto com células como fibroblastos, uma rede fina de fibras e vasos sanguíneos dilatados (matriz provisional) (FIG. 8). As amostras do grupo TL exibiram padrões histológicos similares aos observados no grupo BL.

Nos alvéolos que receberam BMP-4 e TGF- β 1 associados em lipossomas (grupo BTL), além da matriz provisional, foram identificadas células clásticas próximas à superfície óssea, diferenciação de osteoblastos e deposição de osteóide na superfície do osso basal, na região apical dos alvéolos. Na porção média, os alvéolos do grupo BTL apresentaram um moderado infiltrado inflamatório como mostrado na figura 9.

Aos sete dias, os alvéolos dos grupos BC exibiram organização histológica típica de um processo de cicatrização mais avançado que nos grupos de 03 dias. Trabéculas ósseas recém depositadas de aspecto imaturo (woven bone) foram formadas sobre a matriz provisional. A avaliação histológica revelou que, durante o processo de reparo alveolar, independente do tratamento, trabéculas recém-formadas surgem inicialmente no terço apical dos alvéolos. Alguns vasos sanguíneos estavam presentes no interstício dessa matriz provisional, próximos às trabéculas ósseas (FIG. 10). As amostras dos grupos L, P, BP e TP não mostraram diferenças na organização histológica comparada ao grupo BC.

O grupo BL revelou um processo de reparo mais avançado incluindo maior deposição de trabéculas nos terços apical e médio, em íntimo contato com vasos sanguíneos, que se revelaram mais numerosos e dilatados, ocupando a maior área do alvéolo (FIG. 11). Resultados similares foram verificados para o grupo TL.

De fato, dados da análise histoquantitativa confirmaram o aspecto histológico observado aos 7 dias. O percentual de trabéculas óssea nos alvéolos tratados com administração associada de fatores de crescimento (grupo BTL-Figura 12), foi estatisticamente superior ($p < 0.05$) ao percentual encontrado nos alvéolos submetidos aos tratamentos sem lipossomas (FIG. 13A). O suprimento isolado de fatores de crescimento (grupos BL e TL) também mostrou diferenças significantes ($p < 0.05$) no número de trabéculas (FIG. 13) em relação aos grupos controle (BC) e aos grupos que receberam os fatores de crescimento diluídos em PBS (grupos TP, BP). Do mesmo modo, alvéolos de grupos tratados com fatores de crescimento, isolados ou em associação, encapsulados em lipossomas (BL, TL and BTL) mostraram um aumento no número de vasos sanguíneos ($p < 0,05$) quando comparados com alvéolos de outros grupos (FIG. 14).

Ambas as avaliações histológica e histoquantitativa de alvéolos de 14 e 21 dias de todos os grupos experimentais revelaram aumento no percentual trabecular (FIG.13B, 13C), em concordância com a expansão do tempo de observação. O nível de organização histológica de osteócitos, bem como o espessamento de trabéculas e formação de espaços medulares nesses períodos (FIG. 15 a 17) mostraram-se de acordo com a evolução do processo de maturação óssea.

Entretanto, foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na porcentagem trabecular dos grupos tratados com fatores de crescimento encapsulados (BL, TL and BTL) quando comparados com outros grupos (FIG. 13B e 13C). A avaliação histológica dos grupos BC, L, P, BP e TP (FIG.15) revelou um tecido ósseo com características de osso imaturo, enquanto os grupos BL, TL e BTL tiveram maior organização trabecular, incluindo osteons com osteócitos tipicamente diferenciados e redução de espaços medulares (FIG. 16 e 17).

5.2. Análise Imunohistoquímica

A expressão da fibronectina e colágeno III foram similares nos períodos de 3 e 7 dias após as extrações dentárias. A expressão de ambas as moléculas foi primeiramente detectada aos 3 dias e alcançou um pico de expressão no 7º dia após os procedimentos cirúrgicos. Níveis mais baixos de imunoreatividade de fibronectina e colágeno III foram observados nos alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo (FIG. 18 e 21, respectivamente) e nas amostras tratadas com L, P, BP e TP quando comparados com alvéolos dos grupos BL, TL e BTL (FIG. 19 e 22). Os dados histoquantitativos da expressão dessas moléculas nas células e na matriz extracelular intra-alveolar (estão mostrados no QUADRO 2).

6. DISCUSSÃO

O processo de reparo de alvéolos dentários inclui uma série de eventos controlados por fatores de crescimento e citocinas, moléculas muito importantes para o sucesso da regeneração óssea. Dentre esses eventos, merecem destaque a diferenciação celular, a mineralização, e a presença de células indiferenciadas, bem como o suprimento sanguíneo, a influência mecânica e o meio ambiente tecidual. Neste contexto, a seleção das vias ou mecanismos de entrega de drogas, os chamados sistemas “drug-delivery”, para a disponibilização local dos fatores de crescimento e citocinas é crucial para uma terapia eficaz e para o alcance dos resultados pretendidos (BABENSEE et al., 2000., LALANI et al., 2005).

Em geral, as terapias com fatores de crescimento destinados aos reparos ósseos têm sido avaliadas após diferentes modos de administração; em doses únicas em grande quantidade, ou em doses múltiplas. Neste caso existe a possibilidade das moléculas serem parcialmente perdidas durante o processo de regeneração, levando a um baixo efeito terapêutico e muitos efeitos secundários indesejáveis. Por outro lado, o uso de carreadores têm permitido a liberação adequada de fatores de crescimento diretamente no local da lesão, além de protegerem a estrutura das moléculas transportadas, até que cheguem ao seu destino, onde irão desempenhar as suas funções de maneira controlada e contínua (LUGINBUEHL et al., 2004; YILGOR et al., 2009).

Alguns avanços têm sido alcançados em estudos com os sistemas de entrega controlados, como no caso da aplicação de fatores de crescimento em combinação ou pela administração sequencial de dois diferentes fatores, com o objetivo de proporcionar um terapia mais rápida e eficaz para o reparo ósseo. A BMP-2, por exemplo, tem sido utilizada juntamente com outros fatores, tais como VEGF, IGF-1, BMP-7 e TGF- β 3, em diferentes sistemas carreadores *in vitro* para melhorar o reparo ósseo, incluindo a estimulação de formação de matriz mineralizada, diferenciação osteogênica e diferenciação aumentada de matriz extracelular (BASMANAV et al., 2008; RAICHE e PUELO., 2004; SCHMIDMAIER et al., 2002; SIMMONS et al., 2004; PATEL et al., 2008). O resultado desses estudos *in vitro* têm subsidiado o desenvolvimento de estratégias para entrega de fatores de crescimento *in vivo*, como por exemplo, os carreadores criados como

encapsuladores de fatores de crescimento. Estes sistemas carreadores são capazes de entregar as drogas de modo temporal e espacialmente coordenado, permitindo o adequado suprimento dos fatores de crescimento para o tecido alvo, conforme desejado (KAIGLER et al., 2006). Constituintes do sistema de carreadores encapsuladores de drogas, os lipossomas são pequenas vesículas versáteis, esféricas, os quais têm sido utilizados como carreadores de moléculas pequenas, proteínas, nucleotídeos ou plasmídeos em diversas áreas, como biologia, bioquímica e medicina. Recentemente, nosso grupo e pesquisa (ALVES et al., 2009; SADDI et al., 2008) demonstrou que o EGF carreado por lipossomas foi capaz de aumentar o recrutamento de osteoclastos e o movimento do dente em um modelo experimental de tracionamento ortodôntico. Estes resultados foram importantes por ratificar o potencial dos lipossomas como um veículo para a administração controlada de drogas, durante os processos de cicatrização ou reparo de feridas.

No presente estudo, avaliamos o processo de reparo ósseo em alvéolos dentários de ratos tratados com os fatores de crescimento BMP-4 e TGF- β 1 administrados em lipossomas, um veículo que poderia influenciar o tempo e o progresso do reparo ósseo. Trabalhamos com a hipótese de que a liberação gradual de fatores de crescimento por lipossomas, permitiria sua atuação na sinalização celular durante todas as fases de reparo.

Nossos resultados histológicos mostraram que, aos três dias após a extração do dente, um coágulo sanguíneo se formou dentro da cavidade. Em consequência, seguindo um processo natural de reparação, observou-se a formação de um tecido de granulação e a deposição de uma matriz provisional, preenchida com vasos sanguíneos e células inflamatórias. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que também descreve esses achados histológicos como os primeiros passos do processo de reparo (CARDAROPOLI et al., 2003).

Considerando as fases iniciais de reparo ósseo, a fibronectina e colágeno tipo III foram selecionados para avaliação imunohistoquímica a fim de confirmar o papel dessas moléculas nas fases iniciais do reparo e como indicadoras do processo de regeneração tecidual. A literatura tem reportado que proteínas da matriz extracelular como fibrina, fibronectina e colágeno contribuem para a integridade estrutural da matriz durante o reparo tecidual (MIDWOOD et al.,

2004). A Fibronectina é um componente chave da matriz provisional que surge nos sítios de reparo; sua capacidade de ligação à fatores de crescimento funciona como um modulador vital da atividade biológica durante o reparo e regeneração (WELCH et al., 1990). Recentemente, foi demonstrado que a fibronectina é crítica para a sobrevivência de fibroblastos, sendo necessária para sua proliferação (LIN et al., 2011). As fibras de colágeno são produzidas por fibroblastos e formam uma rede fibrilar no início do processo de cicatrização tecidual. Este scaffold ou suporte tridimensional de fibras colágenas, o que chamamos de matriz provisional, permite a deposição de matriz óssea no alvéolo dentário (SHYNG et al., 1999; BOULETREAU et al., 2002). Em concordância com estudos prévios nossos resultados demonstraram um aumento significativo na expressão ($p < 0,05$) de fibronectina e colágeno tipo III aos 7 dias. A imunoreatividade foi mais expressiva nos grupos de alvéolos tratados com fatores de crescimento encapsulados (BL, TL e BTL) quando comparados com outros grupos. Nesta fase, trabéculas primárias surgiram na porção apical dos alvéolos, como um tecido ósseo imaturo e bastante vascularizado (woven bone). Esta condição foi também mais pronunciada nos grupos tratados com fatores de crescimento encapsulados (BL, TL e BTL).

O papel de fatores de crescimento no reparo ósseo tem sido estudado em modelos experimentais, por meio de diferentes vias de administração e dosagens. Os autores JOYCE et al. (1990) utilizaram injeções subperiosteas e LIND et al. (1993) utilizaram infusão contínua com 1 ou 10 μg de TGF- β por dia, por meio de uma mini-bomba, para a avaliação de reparo de fraturas em tíbias de coelhos. O grupo controle recebeu somente o solvente, sem TGF- β . O reparo da fratura foi avaliado por testes mecânicos, morfometria óssea e densitometria óssea. Todos os grupos que receberam TGF- β mostraram um aumento do reparo da fratura quando comparado com o grupo controle. A eficácia de duas doses diferentes de TGF- β (4 ou 40 ng), injetada por dia foi avaliada por NIELSEN et al. (1994), em reparos de fraturas de tíbia de ratos. Este estudo revelou resultados significativamente melhores, em testes mecânicos, para o grupo tratado com 40 ng em comparação com o grupo que recebeu uma dose de 4 ng e o grupo controle, que não recebeu nenhum fator de crescimento. Por outro lado, CRITCHLOW et al. (1994) avaliaram o efeito de TGF- β 2 exógeno durante o

processo de reparo de fraturas utilizando 60 ou 600 ng de TGF- β 2. Apenas os animais que receberam 600 ng mostraram abundante formação de calo ósseo. No presente estudo, nós utilizamos uma dose de 20 ng de proteína BMP-4 e TGF- β 1 carregados por lipossomas. Nosso objetivo era aumentar a absorção e regular a liberação dos fármacos incorporados, aumentando assim seus efeitos locais e diminuindo a concentração sistêmica da droga.

Nossos resultados mostraram uma expressão estatisticamente superior de fibronectina e colágeno tipo III nos alvéolos tratados com fatores de crescimento (isolados ou em associação) carregados por lipossomas aos sete dias. Estes resultados vão de encontro aos dados previamente reportados (GURKAN et al., 2010) onde altas concentrações de fatores de crescimento foram encontrados durante as etapas iniciais de reparo, quando a matriz óssea está sendo simultaneamente estruturada por colágeno tipo III, fibronectina e outros. Nos alvéolos analisados após 14 e 21 dias após a cirurgia, observou-se um aumento do número de trabéculas em todos os grupos, mas em maior extensão nos grupos tratados com TGF- β 1 e BMP-4 carregados por lipossomas, tanto administrados isoladamente quanto administrados em associação. Além disso, uma extensa rede de vasos sanguíneos foi observada aos 3 e 7 dias, nos alvéolos tratados com fatores de crescimento (isolados ou em associação), carregados por lipossomas, o que deve ter contribuído para a deposição de tecido ósseo inicial visualizada aos 7 dias. A capacidade dos fatores de crescimento de estimular a migração e proliferação de células endoteliais, pode ter contribuído para a neoformação de vasos sanguíneos, especialmente visualizada nos grupos tratados com fatores de crescimento carregados por lipossomas e, conseqüentemente, para a deposição óssea. A análise comparativa dos grupos tratados com fatores de crescimento em PBS e lipossomas (BP, TP e BL, TL) mostrou um comportamento interessante. Após três dias de cirurgia, seria de se esperar resultados morfométricos semelhantes entre esses grupos, mas nossos experimentos indicaram que a administração do BMP-4 e TGF- β 1 exógeno, veiculados em PBS produziu um efeito localizado, limitado e rápido, insuficiente para causar uma maior diferenciação ou influência na evolução desta fase para a maturação tecidual. Os dados apresentados indicam que o comportamento de BP e TP foram muito semelhantes aos grupos controles, ou seja, aos alvéolos

naturalmente preenchidos por coágulo sanguíneo, sem o tratamento com fatores de crescimento. Esses resultados sugerem que os fatores de crescimento em PBS podem ser rapidamente liberados para a circulação sanguínea, não participando das etapas subsequentes do reparo ósseo. No caso de alvéolos tratados com fatores de crescimento encapsulados, os lipossomas possivelmente retiveram os fatores de crescimento por um período suficiente para a estimulação contínua de novo osso. Devido à liberação gradual pelos lipossomas, os fatores de crescimento possivelmente alcançaram sua função, desde as etapas iniciais do reparo, incluindo os primeiros eventos de diferenciação, até a diferenciação do tecido ósseo lamelar. É importante salientar que, embora tenha ocorrido o aumento no percentual de osso trabecular nos grupos BMP-4-lipossoma e TGF- β 1-lipossoma, um efeito sinérgico entre os fatores de crescimento, quando administrados em conjunto (grupo BTL), não foi observado. Possivelmente, estes fatores de crescimento participam de etapas de reparo não simultâneas ou não consecutivas. A possível interação entre estes fatores, bem como as circunstâncias em que eles se justapõem ou complementam suas funções merece ser investigada e deve ser objeto de futuras pesquisas.

7. CONCLUSÃO

A administração local de BMP-4 e TGF- β , isolados e/ou associados, tem um papel importante no processo de reparo ósseo alveolar em ratos. Entretanto, o aumento na deposição e maturação óssea foi observado somente quando se utilizou lipossomas como carreadores, possivelmente por permitirem a liberação controlada de fatores de crescimento, a regulação de sua disponibilidade nos alvéolos e a proteção contra absorção e degradação precoces por proteases locais.

REFERÊNCIAS

Abe E. 2006. Function of BMPs and BMP antagonists in adult bone. *Ann N Y Acad Sci* 1068:41-53.

ABE, E.. Function of BMPs and BMP antagonists in adult bone. *Ann N Y Acad Sci* v. 1068, p.41-53, 2006.

Aguirre JI, Altman MK, Vanegas SM, Franz SE, Bassit ACF, Wronski TJ. 2010. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral Diseases* 16, 674–685.

Alberts LR, Phillips KO, Tu HK, Stinson WW, Friedman A. 2003. A biologic model for assessment of osseous strain patterns and plating systems in the human maxilla. *J Oral Maxillofac Surg.* 61:79-88.

Allori AC, Sailon AM, Warren SM. 2008. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev.* Sep;14(3):259-73. Review.

Alves JB, Ferreira CL, Martins AF, Silva GAB, Alves GD, Paulino TP, Ciancaglini P, Thedei G Jr, Napimoga MH. 2009. Local delivery of EGF–liposome mediated bone modeling in orthodontic tooth movement by increasing RANKL expression. *Life Sciences* 85: 693–699.

Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. 2008. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 29:37–41. doi:10.1016/j.tips.2007.10.010.

Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andia I 2007. The potencial impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 28:4551-4560.

Arosarena OA, 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.

Arosarena OA, Collins WL. 2005. Comparison of BMP-2 and BMP-4 for rat mandibular bone regeneration at various doses. *Orthod Craniofacial Res* 8: 267-276.

Arosarena OA, Puelo D. 2007. In vitro effects of combined and sequential bone morphogenetic protein administration. *Arch Facial Plast Surg* 9:242-247.

Babensee JE, McIntire LV, Mikos AG. 2000. Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharm Res* 17:497–504. doi:10.1023/ A:1007502828372.

Barnes MJ, Gordon JL, MacIntyre DE. 1976. Platelet-aggregating activity of type I and type III collagens from human aorta and chicken skin. *Biochem J.* 160:647-651.

Basmanav FB, Gamze TK, Vasif H. 2008. Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials* 29:4195–4204.

Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. 1993. Growth factors to stimulate bone formation. *J. Bone Miner. Res* 8(Suppl 2):S565–S572.

Becker J, Schuppan D, Benzian H, Bals T, Hahn EG, Cantaluppi C, *et al.* 1986. Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V, and VI and of pro collagens types I and III in human alveolar bone and dentine. *J Histochem Cytochem* 34:1417-29.

Blumenfeld I, Laufer D, Livne E. 1997. Effects of transforming growth factor-b1 and IL-1a on matrix synthesis in osteoarthritic cartilage of the temporo-mandibular joint in aged mice. *Mech Ageing Dev* 95:101–111.

Bonewald LF, Mundy GR. 1990. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res* 60:261-276.

Bostrom MP. 1998. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Res* 13:357-67.

Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, *et al.* 1995. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 13: 357-367.

Bottner M, Kriegelstein K, Unsicker K. 2000. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* 75:2227-2240.

Bouletreau PJ, Warren SM, Longaker MT. 2002. The molecular biology of distraction osteogenesis. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* 30, 1–11.

Buket BF, Gamze TK, Vasif H. 2008. Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials* 29:4195–4204

Cannas M, Denicolai F, Webb LX, Gristina AG. 1988. Bioimplant surfaces: binding of fibronectin and fibroblast adhesion. *J Orthop Res* 6:58-62.

Carano RA, Filvaroff EH. 2003. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*; 8:980–989.

Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. 2003. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 30, 809–818.

- Centrella M, Canalis E. 1985. Transforming and non transforming growth factor are present in medium conditioned by fetal rat calvariae. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7335-7339.
- Cheifetz S, Li IW, McCulloch CA, Sampath K, Sodek J. 1996. Influence of osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) and transforming growth factor- β 1 on bone formation in vitro. *Connect Tissue Res* 35:71-78.
- Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Harris SE. 1987. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB e IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* 142:295-305.
- Chen C, Lee IS, Zhang SM, Yang HC. 2010. Biomimetic apatite formation on calcium phosphate-coated titanium in Dulbecco's phosphate-buffered saline solution containing CaCl(2) with and without fibronectin. *Acta Biomater* 6:2274-81.
- Cheng H, Jiang W, Philips FM, *et al.* 2003. Osteogenic ativity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg* 85-A(8):1544-1552.
- Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. 2002. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17: 513-520.
- Chu TW, Wang ZG, Zhu PF, Jiao WC, Wen JL, Gong SG. 2002. Effect of vascular endothelial growth factor in fracture healing. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 16: 75-78.
- Chung E, Rhodes K, Miller EJ. 1976. Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 23:1167-1174.
- Clafin R S. 1936. Healing of disturbed and undisturbed extraction wounds. *Journal of American Dental Association* 23: 945–959.
- Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF. 1979. Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 161:337-340.
- Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. 1994. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop Rel Res* 302-312.
- Cornell CN 1999. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts, *Orthop. Clin. North. Am.* 30:591–598.
- Couvreur P, Puisieux F. 1993. Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 10:141–62. doi:10.1016/0169-409X(93)90046-7.

Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE. 1994. The effect of exogenous transforming growth factor beta 2 on healing fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 65:37-41.

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* 141:1667–74.

Deckers MM, van Bezooijen RL, van Der Horst G, *et al.* 2002. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* 143:1545-1553.

Devlin H, Sloan P. 2002. Early bone healing events in the human extraction socket. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 31: 641-645.

Dijke P ten, Yamashita H, Sampath TK, *et al.* 1994. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *The Journal of Biological Chemistry* 269:16985-16988.

Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. 2011. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine* 9:66.

do Serro AP, Fernandes AC, de Jesus Vieira Saramago B. 2000. Calcium phosphate deposition on titanium surfaces in the presence of fibronectin. *J Biomed Mater Res*;49:345-52.

Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. 2002. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31:615-619.

Edelman ER, Nugent MA, Karnovsky MJ. 1993. Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1513–7. doi:10.1073/pnas.90.4.1513.

Edlund U, Danmark S, Albertsson AC. 2008. A strategy for the covalent functionalization of resorbable polymers with heparin and osteoinductive growth factor. *Biomacromolecules* 9:901–5.

Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitman SE, Docherty AJP, Angel P, Heath JK 1987. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 6:1899-1904

Farges JC, Joffre A, Lesot H, Bleicher F, Magloire H. 1995. Immunocytochemical localization of fibronectin and a 165-kDa membrane protein in the odontoblast layer under initial carious lesions in man. *Arch Oral Biol.* 40:1023-1028.

Ferreira CF, Gomes MCC, Filho JS, Granjeiro JM, Simões CMO, Mangini RS. 2005. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clinical Oral Implants Res* 16:456-460.

Fine A, Goldstein RH. 1987. The effect of transforming growth factor- β on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts, *J Biol Chem* 262:3897-3902.

Friedlaender GE Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S. 2001. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Jt SurgAm* 83-A(Suppl. 1):S151–8.

Gaengel K, Genove G, Armulik A, Betsholtz C. 2009. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 630-638.

Gao J, Symons AL, Bartold PM . 2002. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in the developing periodontium of rats. *J Dent Res* 77:1708-1716.

Gao Q, Zhang S, Jian X, Zeng Q, Ren L. 2002. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in rat periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 37:294-296.

Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. 2006. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.*64(3):443-51.

Gerber HP, Ferrara N. 2000. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10:223–8.

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5:623–8.

Giannobile WV. 1996. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 19 (Supl.): 23S-37S.

Giannobile WV. 1996. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *J Periodontal* 67: 545–553.

Giannobile WV, Ryan S, Shih MS, Su DL, Kaplan PL, Chan TC. 1998. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *J Periodontol* 69:129-137.

Giavaresi G; Torricelli P; Fornasari PM; Giardino R; Barbucci R; Leon G. 2005. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. *Biomaterials* 26: 3001-3008.

Glowacki J. 1998. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop*:S82–89.

Golden JD, Jones AL, Bucholz RW, Bosse MJ, Lyon TR, Webb LX, Valentin-Opran A. 2008. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. *J Bone Joint Surg Am* 90:1168–9.

Goodman S, Song Y, Chun L, Aspenberg P, Plouhar P, Glancy T, Regula D, Smith RL. 2000. Effects of local infusion of TGF β on bone ingrowth in rabbit chambers. *J Biomed Mater Res* 53:475–9.

Gori F, Thomas T, Hicok KC, Spelsberg TC, Riggs BL. 1999. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *J Bone Miner Res* 14:1522-1535.

Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Borner MG, Chiron P, Choong P, Cinats J, Courtenay B, Feibel R, Geulette B, Gravel C, Haas N, Raschke M, Hammacher E, van der Velde D, Hardy P, Holt M, Josten C, Ketterl RL, Lindeque B, Lob G, Mathevon H, McCoy G, Marsh D, Miller R, Munting E, Oevre S, Nordsletten L, Patel A, Pohl A, Rennie W, Reynders P, Rommens PM, Rondia J, Rossouw WC, Daneel PJ, Ruff S, Ruter A, Santavirta S, Schildhauer TA, Gekle C, Schnettler R, Segal D, Seiler H, Snowdowne RB, Stapert J, Taglang G, Verdonk R, Vogels L, Weckbach A, Wentzensen A, Wisniewski T. 2002. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Jt Surg Am* 84-A: 2123–34.

Gruber R, Karreth F, Frommlet F, Fischer MB, Watzek G. 2003. Platelets are mitogenic for periosteum-derived cells. *J Orthop Res* 21:941-948.

Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonneti M, Gabriele M. 2006. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 17:212-219.

Groeneveld EHJ, Burger EH. 2000. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 142:9-21.

Gurkan UA, Gargac J, Akkus O. 2010. The sequential production profiles of growth factors and their relations to bone volume in ossifying bone marrow explants. *Tissue Eng Part A* 16(7):2295-306.

Hadjidakis D J, Androulakis I I. 2006. Bone remodeling. *Ann. NY Acad. Sci.* 1092, 385-396.

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.

Hammonds RG, Schwall R, Dudley A, *et al.* 1991. Bone inducing activity of mature BMP-2b produced from a hybrid BMP-2a/2b precursor. *Mol Endocrinol* 5:149-155.

Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C. 2001. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 153: 543-553.

Hokugo A, Ozeki M, Kawakami O, Sugimoto K, Mushimoto K, Morita S, Tabata Y. 2005. Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Eng.* 11(7-8):1224-33.

Hong BS, Davison PF, Cannon DJ. 1979. Isolation and characterization of a distinct type of collagen from bovine fetal membranes and other tissues. *Biochemistry* 18:4278-4282.

Horbett TA. 1993. Chapter 13 Principles underlying the role of adsorbed plasma proteins in blood interactions with foreign materials. *Cardiovasc Pathol* 2(3 Suppl):137-48.

Hsu HP, Zanella JM, Peckham SM, Spector M. 2006. Comparing ectopic bone growth induced by rhBMP-2 on an absorbable collagen sponge in rat and rabbit models. *J Orthop Res*;24:1660–9.

Huang YH, Polimeni G, Qahash M, Wikesjö UME. 2008. Bone morphogenetic proteins and osseointegration: current knowledge – future possibilities. *Periodontology* 2000, 47:206-223.

Hynes RO. 1986. Fibronectins. *Sci Am* 254:42-51.

Hynes RO. 1990. *Fibronectins* (1st edn). Springer-Verlag: New York.

Ivanovsky S, Daley T, Bartold PM. 2000. An immunohistochemical study of matrix molecules associated with barrier membrane-mediated periodontal wound healing. *J Periodontal Res* 35:115–126.

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* 16:69-79.

Izumi T, Yamada K, Inoue H, Watanabe K, Nishigawa Y. 1998. Fibrinogen/fibrin and fibronectin in the dentin-pulp complex after cavity preparation in rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 86:587-591.

Jansen JA, Vehof JWM, Ruhe PQ, Deutman HK, Kuboki Y, Takita H, *et al.* 2005.

Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. *J Control Release* 101:127–36.

Javed F, *et al.* 2011. Significance of the platelet-derived growth factor in periodontal tissue regeneration. *Archives of Oral Biology* , doi:10.1016/j.archoralbio.2011.06.020.

Jiang T, Abdel-Fattah WI, Laurencin CT 2006. In vitro evaluation of chitosan/poly (lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 28:4894–4903.

Johnson K. 1969. A study of the dimensional changes occurring in the maxilla following tooth extraction. *Australian Dental Journal* 14:241–244.

Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME. 1990. Transforming growth factors-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 21(1):199-209.

Kaigler D, Cirelli JA, Giannobile WV. 2006. Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering, *Expert Opin. Drug Deliv.* 3:647–662.

Kanyama M; Kuboki T; Akiyama K; Nawachi K; Miyauchi FM; Yatani H; Kubota S; Nakanish, T; Takigawa M. 2003. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Archives of Oral Biology* 48: 723-730.

Kao RT, Conte G, Nishimine D, Dault S. 2005. Tissue engineering for periodontal regeneration, *J. Calif. Dent. Assoc.* 33:205–215.

Karjalainen S, Soderling L, Pelliniemi L, Foidart JM. 1986. Immunohistochemical localization of types I and III collagen and fibronectin in the dentin of carious human teeth. *Arch Oral Biol* 31:801- 806

Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, Aoyama I, Hiyama Y, Nakamura T, Kuzutani K, Tamura M, Kurokawa T, Nakamura K. 1998. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res*:16:654–9.

Kent Leach J, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ. 2006. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 27:3249–3255.

Keskin DS, Tezcaner A, Korkusuz P, Korkusuz F, Hasirci V. 2005. Collagen–chondroitin sulfate-based PLLA–SAIB-coated rhBMP-2 delivery system for bone repair. *Biomaterials* 26:4023–34.

Khosla S, Westendorf J J, Oursler M J. 2008. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J. Clin. Invest* 118:421-428.

King GN, Hughes FJ. 2001. Bone morphogenetic protein-2 stimulates cell recruitment and cementogenesis during early wound healing, *J. Clin. Periodontol.* 28:465–475.

Kozawa O, Hatakeyama D, Tokuda H, Oiso Y, Matsuno H, Uematsu T. 2002. Sphingomyelinase amplifies BMP-4-induced osteocalcin synthesis in osteoblasts: role of ceramide, *Cell. Signal* 14: 999–1004.

Kuboki Y, Hashimoto F, Ishibashi K. 1988. Time-dependent changes of collagen crosslinks in the socket after tooth extraction in rabbits. *Journal of Dental Research* 67:944–948.

Kurihashi T, Iwata H, Nasu M. 2002. Experimental study on wound healing of alveolar bone sockets in the rat maxilla after x-ray irradiation. *Odontology* 90: 35-42.

Lacoste E, Martineau I, Gagnon G. 2003. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol.* 74(10):1498-507.

Laiho M, Keski-Oja. 1989. Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Res* 49:2533-2553.

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. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 63: 1500-1508.

Lamano Carvalho TL, Bombonato KF, Brentegani, LG. 1997. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Brazilian Dental Journal* 8: 9-12.

Lasic D. 1993. *Liposomes: From Physics to Applications*. Elsevier.

Laurencin CT, Ambrosio AMA, Borden MD, Cooper JA. 1999. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 01:19–46.

Laurencin CT, Ambrosio AMA, Borden MD, Cooper JA. 1999. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 01:19–46.

Lee AJ, Hodges JS, Eastell R. 2000. Measurement of osteocalcin. *Am Clin Biochem* 37: 432-446.

Lee JY, Nam SH, Im SY, Park YJ, Lee YM, Seol YJ, *et al.* 2002. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J Control Release* 78:187–97.

Lee JY, Nam H, Park YJ, Lee SJ, Chung CP, Han SB, *et al.* 2011. The effects of platelet-rich plasma derived from human umbilical cord blood on the osteogenic differentiation of human dental stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47:157–64.

Lee SC, Shea M, Battle MA, Kozitza K, Ron E, Turek T, Schaub RG, Hayes WC. 1994. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP-2 in PLGA matrix. *J Biomed Mater Res* 28:1149–56.

Lee SH, Shin H. 2007. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*;59:339–59.

Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CA. 2001. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *Journal of Periodontal Research* 36, 71–79.

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. *The Anatomical Record* 247: 329-340.

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. 2002. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *Journal of Bone and Joint Surgery American Volume* 84:1032-1044.

Lin F, Ren XD, Pan Z, Macri L, Zong WX, Tonnesen MG, et al. 2011. Fibronectin Growth Factor-Binding Domains Are Required for Fibroblast Survival. *J. Invest Dermatol.* 131(1):84-98.

Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. 1994. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anatological Records* 1240:492–506.

Lin L, Qi Shen, Xuelei Wei, Yu Hou, Tao Xue, Xin Fu, Xiaoning Duan, Changlong Yu. 2009. Comparison of Osteogenic Potentials of BMP4 Transduced Stem Cells from Autologous Bone Marrow and Fat Tissue in a Rabbit Model of Calvarial Defects. *Springer Science+Business Media, LLC* p.55-65.

Lind M, Overgaard S, Nguyen T, Ongpipattanakul B, Bunger C, Soballe K. 1996. Transforming growth factor- β stimulates bone growth. Hydroxyapatite-coated implants studied in dogs. *Acta Orthop Scand* 67:611–6.

Lind M, Schumacker B, Soballe K, Keller J, Melsen F, Bunger C. 1993. Transforming growth factor- β enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand* 64(5):553-6.

Linde A., Johansson S., Jonsson R., Jontell M. 1982. Localization of fibronectin during dentinogenesis in rat incisor. *Arch Oral Biol.* 27:1069-1073.

Linde A. 1985. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. *J Dent Res.* 64:523-529.

Lindhe. 1999. *Jan. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.* Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro: 3. ed., 720 p.

Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. 1996. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta e BMP. *Bone* 19 (1 suppl): 1S-12S.

Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, Harland RM, Massagua J. 1996. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature*. 381: 620-623.

Loser RF, Pacione CA, Chubinskaya S. 2003. The combination of insulin like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheumatism* 48:2188-2196.

Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, Meotti C, *et al.* 2003. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 24:3095-3100.

Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. 2004. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 58(2):197-208.

Luu HH, Song WX, Luo X, Manning D, Luo J, Deng Z, *et al.* 2007. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 25:665–77.

Lynch SE. 1994. The Role of Growth Factors in Periodontal Repair and Regeneration in Periodontal Regeneration – Current Status and Directions. Illinois, Quintessence.

Magloire H, Jofre A, Hartmann DJ. 1988. Localization and synthesis of type III collagen and fibronectin in human reparative dentine. *Histochemistry* 88: 141-149.

Manning CN, Kim HM, Sakiyama-Elbert S, Galatz LM, Havlioglu N, Thomopoulos S. 2011. Sustained Delivery of Transforming Growth Factor Beta Three Enhances Tendon-to-Bone Healing in a Rat Model. *J Orthop Res*. Jul 29(7):1099-105.

Martinez EF, Machado de Souza SO, Correa L, Cavalcanti de Araújo V. 2000. immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III collagen in human dental pulp. *J Endod* 26:708-711.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Strauss JE, Georgeff KR. 1998. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85:638-646.

Masaki Y, Kishi K, Nakajima H, Tatsuo N. 2003. Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 61: 587-592.

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.

Mendes RM, Silva GA, Lima MF, Calliari MV, Almeida AP, Alves JB, et al. 2008. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol* 53(12):1155-1162.

Mendes R M, Silva GAB, Caliari MV, Silva E E, Ladeira LO, Ferreira AJ. 2010. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sciences* 87:215–222.

Meyer U, Joos U, Wiesmann HP. 2004. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering: part I. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:325–32.

Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. 2004. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol* . 36(6):1031-37.

Miyazono K. 2000. Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *J Cell Sci* 113: 1101-1109.

Moon JJ, West JL. 2008. Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angio-genesis in biomaterials. *Curr Top Med Chem* 8:300–310.

Mooren RE, Merckx MA, Bronkhorst EM, Jansen JA, Stoeltinga PJ. 2007. The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 36(7):626-31.

Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K. 1994. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9:651–659.

Nauth A, Ristevski B, Li R, Schemitsch EH. 2011. Growth factors and bone regeneration: how much bone can we expect? *Injury*. Jun;42(6):574-9. Review.

Nielsen HM, Andreassen TT, Ledet T, Oxlund H. 1994. Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 65(1):37-41.

Okada H, Murakami S. 1998. Cytokine Expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 9 (3): 248-266.

Overall CM, Wrana JL, Sodek J. 1989. Independent regulation of collagenase, 72-KDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 264:1860-1869.

Overall CM, Wrana JL, Sodek J. 1991. Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF- β 1 and concanavalin A: regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. *J Periodont Res* 26:279-282.

Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. 2003. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone*, v. 33, p. 889-898.

Page M, Hogg J, Ashhurst DE. 1986. The effects of mechanical stability on the macromolecules of the connective tissue matrices produced during fracture healing. I. The collagens. *Histochem J.*;18:251. 65.

Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong MEK, Mikos AG. 2008. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* 43:931–40.

Patil AS, Sable RB, Kothari RM. 2011. An update on Transforming Growth Factor- β (TGF- β): sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. *Journal of Cellular Physiology* 1-42.

Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J. 2002. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 110: 751-759.

Perrien DS, Brown EC, Aronson J, Skinner RA, Montague DC, Badger TM, Lumpkin Jr, CK. 2002. Immunohistochemical study of osteopontin expression during distraction osteogenesis in the rat. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50: 567-574.

Pfeilschifter J, Oeschner M, Naumann A, Gronwald RG, Minne HW, Ziegler. 1990. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors. A comparison between insulin-like growth factor-1, platelet-derived growth factor and transforming growth factor - β . *Endodontology* 127:69-75.

Pietrokovski J, Massler M. 1967. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. *Journal of Prosthetic Dentistry* 17: 21–27.

Pietrokovski J, Starinsky R, Arensburg B, Kaffe I. 2007. Morphologic characteristics of bony edentulous jaws. *Journal of Prosthodontics* 16:141–147.

Powell CA, Bannister SR, Mackey SA, Maller SC, McDonnell HT, Deas DE. 2009. Periodontal wound healing with and without platelet-rich plasma: histologic observations and assessment of flap tensile strength. *J Periodontol* 80:985–92.

Prista LNA, Morgado AC, RMR. 1996. *Técnica farmacêutica e farmácia galênica.*, 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M, Schmidmaier G. 2002. Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell Tissue Res* 309:387–92.

- Puleo DA, Nanci A. 1999. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 20:2311-21.
- Raiche AT, Puleo DA. 2004. In vitro effects of combined and sequential delivery of two bone growth factors. *Biomaterials* 25:677–685.
- Raisz LG. 2005. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.* 115: 3318-3325.
- Raja S, Girish B, Pushpa P. 2009. Growth factors in periodontal regeneration. *Int J Dent Hygiene* 7:82–89
- Ranly DM, Lohmann CH, Andreacchio D, Boyan BD, Schwartz Z. 2007. Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. *J Bone Joint Surg Am.* 89(1):139-47.
- Rasubala L, Yoshikawa H, Islam AAS, Nagata K, Lijim, T, Ohishi A. 2004. Comparison of the healing process in plated and non-plated fractures of the mandible in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 42, p. 315-322.
- Reddi AH. 1994. Bone and cartilage differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev* 4:737-744.
- Reddi AH. 2001. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg* 83-A(suppl.1):1-6.
- Reinholz GG, Fitzsimmons JS, Casper ME, Ruesink TJ, Chung HW, Schagemann JC, O’Driscoll SW. 2009. Rejuvenation of periosteal chondrogenesis using local growth factor injection. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 723-734.
- Reis-Filho CR, Silva ER, Martins AB, Pessoa FF, Gomes PV, de Araújo MS, Miziara MN, Alves JB. 2012. Demineralised human dentine matrix stimulates the expression of VEGF and accelerates the bone repair in tooth sockets of rats . *Original Research Article Archives of Oral Biology* 57:469-476.
- Renvert S, Persson GR. 2004. Supportive periodontal therapy, *Periodontol.* 2000 36 :179–195.
- Rhodes RK, Miller EJ. 1978. Physicochemical characterization and molecular organization of the collagen A and B chains. *Biochemistry* 17:3442-3448.
- Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR. 1996. Bone morphogenetic protein-2: Biology and applications. *Clin Ortop Rel Res* 324:39-46.
- Ripamonti U, Heliotis M, van den Heever B, Reddi AH. 1994. Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in baboons (*Papio ursinus*). *J periodontal Res* 29:439-445.

Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Spom MB, Roberts AB. 1987. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) in vitro. *J Cell Biol* 105: 457-463.

Roehlecke C, Witt M, Kasper M, Schulze E, Wolf C, Hofer A, *et al.* 2001. Synergistic effect of titanium alloy and collagen type I on cell adhesion, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *Cells Tissues Organs* 168:178-87.

Roethy W, Fiehn E, Suehiro K, Gu A, Yi GH, Shimizu J, Wang J, *et al.* 2001. A growth factor mixture that significantly enhances angiogenesis in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 299:494-500.

Roussy Y *et al.* 2007. Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation. *Clin Oral Implants Res.* 18(5):639-48

Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL, Shopp GM, O'Neill CA. 1999. Preclinical safety evaluation of rhuMabVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. *Toxicol Pathol* 27: 78-86.

Saba TM, Jaffe E. 1980. Plasma fibronectin (opsonic glycoprotein): its synthesis by vascular endothelial cells and role in cardiopulmonary integrity after trauma as related to reticuloendothelial function. *Am J Med* 68:577-94.

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.

Sakai T, Johnson KJ, Murozono M, Sakai K, Magnuson MA, Wieloch T, *et al.* 2001. Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med*;7:324–330.

Sakou T. 1998. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 22:591-603.

Santos MI, Reis RL. 2010. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol. Biosci.* 10:12–27.

Santos NCaC, Miguel ARB. 2002. Liposomes: has the magic bullet hit the target? *Quim. Nova.* (online). 25:1181-1185. <<http://www.scielo.br>> acesso em 1110 de outubro de 2004.

Sasaki T, Watanabe C. 1995. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone* 16: 9-15.

Sato H, Takeda Y. 2007. Proliferative activity, apoptosis, and histogenesis in the early stages of rat tooth extraction wound healing. *Cells, Tissues, Organs* 186:104–111.

Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, Delisser HM. 2001. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 36770-36778.

Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. 2009. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil*;36:368–89.

Schliephake H. 2002. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31:469-484.

Schmidinger G, Hanselmayer G, Pieh S, Lackner B, Kaminski S, Ruhswurm I, Skorpik C. 2003. Effect of tenascin and fibronectin on the migration of human corneal fibroblasts. *J Cataract Refract Surg.* 29:354-360.

Schmidmaier G, Wildemann B, Heeger J, Gabelein 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 beta1. *Bone* 31:165–172.

Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. 1999. Bone morphogenic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 17:269-278.
Schram WR. 1929. A histologic study of repair in the maxillary bone following surgery. *Journal of American Dental Association* 16:1987–1997.

Schroeder HE. 1986. *The Periodontium*. Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo: Springer-Verlag, 12.

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. 2003. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 23: 313–323.

Schultze-Mosgau S, Lehner B, Rödel F, Wehrhan F, Amann K, Kopp J, Thorwarth M, Nkenke E, Grabenbauer G. 2005. Expression of bone morphogenic protein 2/4, transforming growth factor- β_1 , and bone matrix protein expression in healing area between vascular tibia grafts and irradiated bone-experimental model of osteonecrosis. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 61: 1189-1196.

Sculean A, Junker R, Donos N, Windisch P, Brex M, Dnker N. 2003. Immunohistochemical evaluation of matrix molecules associated with wound healing following treatment with an enamel matrix protein derivative in humans. *Clin Oral Invest* 7:167–174.

Seto I, Tachikawa N, Mori M, Hoshino S, Marukawa E, Asahina I, Enomoto S. 2002. Restoration of occlusal function usingosseointegrated implants in the canine mandible reconstructed by rhBMP-2. *Clin Oral Implants Res* 13:536–41.

Shapiro F. 2008. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *European Cells and Materials* 15, 53-76.

Shen YH, Shoichet MS, Radisic M. 2008. Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. *Acta Biomater* 4:477–89.

Shyng YC, Devlin H, Riccardi D, Sloan P. 1999. Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. *Archives of Oral Biology* 44: 751-757.

Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjo UM. 1995. Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol* 66:131-138.

Simon Y, Zarana S P, James D K, Matthew B M, Paschalia MM, Scott B, Hiroki U, Yasuhiko T D. Med.Sci. D.Pharm, John A J, Mark W, Antonios GM. 2009. Dose Effect of Dual Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein-2 on Bone Regeneration in a Rat Critical-Size Defect Model. *Tissue engineering: Part A* Volume 15, Number 9.

Simpson AH, Mills L, Noble B. 2006. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 88: 701-705

Simpson HE. 1960. Experimental investigation into the healing of extraction wounds in macacus rhesus monkeys. *Journal of Oral Surgery* 18: 391–399.

Siqueira Jr, JF, Dantas CJS. 2000. *Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação*. Rio de Janeiro: Medsi, 238 p.

Sodek J, McKee MD. 2000. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 24:99–126.

Sojo K, Sawaki Y, Hattori H, Mizutani H, Ueda M. 2005. Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2, -4 (BMP-2, -4) on lengthened rat femurs. *J Craniomaxillofac Surg*;33:238–45.

Spector JA, Lunchs JS, Mehara BJ, Greenwald JA, Smith LP, Longaker MT. 2001. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg* 107:124-134.

Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Crombrughe BD. 1987. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor –beta. *J Cell Biol* 105: 1039-1045.

Stein GS, Lian JB. 1993. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype, *Endocr. Rev.* 14:424–442.

Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff, EH. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9656.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9656-9661.

Sufeng Z, Hasan U. 2009. Nanoparticulate Systems for Growth Factor Delivery *Pharmaceutical Research*, Vol. 26, No. 7, July p 1561-1580.

Sungtae K, Woo-Chun Myung, Jung-Seok Lee, Jae-Kook Cha, Ui-Won Jung, Hyeong-Cheol Yang, In-Seop Lee, Seong-Ho Choi. 2011. The effect of fibronectin-coated implant on canine osseointegration. *J Periodontal Implant Sci* 41:242-247.

Sykaras N, Opperman LA. 2003. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J. Oral Sci* 45(2):57–73.

Taba Jr. M, Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. 2005. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res* 8:292–302.

Takita K, Oshaki Y, Nakata M, Kurisu K. 1987. Immunofluorescence localization of type I and type III collagen and fibronectin in mouse dental tissues in late development and during molar eruption. *Arch Oral Biol* 32: 273-279.

Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano Carvalho T L. 2001. A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipine on bone healing after tooth extraction. *Archives of Oral Biology*, v. 46, p. 375-379.

Towler DA. 2008. The osteogenic-angiogenic interface: novel insights into the biology of bone formation and fracture repair. *Curr Osteoporos, Rep* 6:67–71

Tung PS, Domenicucci C, Wasi S, Sodek J. 1985. Specific immunohistochemical localization of osteonectin and collagens type I and III in fetal and adult porcine dental tissues. *J Histochem Cytochem* 33:531–542.

- Tziafas D, Panagiotakopoulos N., Kommenou A. 1995. Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine or calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol* 40: 23-31.
- Urist MR . 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899
- Van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoeltinga PJ, Jansen JA. 2006. Platelet-rich plasma : quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng* 12:3067-3073.
- Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. 1987. Transforming growth factor- β (TGF- β) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem* 247:597-604.
- Veis A. 1984. Bones and teeth. From Extracellular matrix biochemistry. New York: Elsvier p. 329-74.
- Veron MH, Couble ML, Caillot G, Hartmann DJ, Magloire H. 1990. Expression of fibronectin and type I collagen by human dental pulp cells and gingiva fibroblasts grown on fibronectin substrate. *Arch Oral Biol.* 35:565-569.
- Vikjaer D, Blom S, Hjorting-Hansen E, Pinholt EM. 1997. Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur J Oral Sci* 105: 59–66.
- Wang EA. 1993. Bone morphogenetic proteins (BMPs): Therapeutic potential in healing bony defects. *Trends Biotechnol* 11:379-383.
- Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, Lapan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM. 1990. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2220-2224.
- Wang JS, Aspenberg P. Basic fibroblast growth factor infused at different times during bone graft incorporation. 1996. Titanium chamber study in rats. *Acta Orthop Scand* 67:229–36.
- Weiss RE, Reddi AH. 1980. Synthesis and localization of fibronectin during collagenous matrix-mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:2074-8.
- Welch MP, Odland GF, Clark RA. 1990. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol.* 110(1):133-45.
- Westergren-Thorsson G, Särnstrand B, Fransson L-A, Malmström A. 1990. TGF- β enhances the production of hyaluronan in human lung but not in skin fibroblast. *Exp Cell Res* 186: 192-195.

- Wong RWK, Rabie AB. 2005. M. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 43: 46-50.
- Woo BH, Fink BF, Page R, Schrier JA, Jo YW, Jiang G, DeLuca M, Vasconez HC, DeLuca PP. 2001. Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm Res* 18:1747–53.
- Wrana JL, Maeno M, Hawrylyshyn B, Yao KL, Domenicucci C, Sodek J. 1988. Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J Cell Biol* 106:915-924.
- Yaoita H, Orimo H, Shirai Y, Shimada T. 2000. Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture. *J Bone Miner Metab* 18:63–70.
- Yilgor P, Tuzlakoglu K, Reis RL, Hasirci N, Hasirci V. 2009. Incorporation of a sequential BMP- 2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 30(21):3551-9.
- Yu J, Shi J, Jin Y. 2008. Current approaches and challenges in making a bio-tooth. *Tissue Eng Part B Rev* 14:307–19.
- Yugoshi LI, Sala MA, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. 2002. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Brazilian Dental Journal* 13: 92-96.
- Zahid L, Mark W, Eric M B, MEng, Antonios G M, PJ Duke. 2003. Spatial and Temporal Localization of Transforming Growth Factor- β 1, Bone Morphogenetic Protein-2, and Platelet-Derived Growth Factor-A in Healing Tooth Extraction Sockets in a Rabbit Model. *J Oral Maxillofac Surg* 61:1061-1072.
- Zaidi M. 2007. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.* 13:791-801.
- Zelzer E, McLean W, Ng YS, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, D'Amore PA, Olsen BR. 2002. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 129: 1893-1904.
- Zhang S, Uludağ H. 2009. Nanoparticulate systems for growth factor delivery. *Pharm Res.* Jul;26(7):1561-80.
- Zhu Q, Safavi KE, Spangberg LS. 1998. The role of integrin beta 1 in human dental pulp cell adhesion on laminin and fibronectin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998. 85:314-318.
- 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: 9-13.

Ziegler J, Anger D, Krummenauer F, Breitig D, Fickert S, Guenther KP. 2008. Biological activity of recombinant human growth factors released from biocompatible bone implants. J Biomed Mater Res 86A:89–97.

ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer Comitê Ética em Experimentação Animal

ANEXO II - Comprovante do aceite do artigo

----- Forwarded message -----

From: Archives of Oral Biology <AOB@elsevier.com>

Date: 2012/11/17

Subject: Your Submission

To: progg.pr@uniube.br

Ref.: Ms. No. AOB-D-12-00231R1

TGF-<beta>1 and BMP-4 carried by liposome enhance the healing process in alveolar bone.

Archives of Oral Biology

Dear Dr. Alves,

I am pleased to inform you that your contribution has been accepted for publication in the Archives of Oral Biology. Your paper has been forwarded to the typesetter and you will have a chance to check the proofs shortly.

May we take this opportunity to thank you for your interest in the Journal, and we look forward to receiving similar high quality manuscripts from you in the future.

With kind regards

Ram Kishore

Journal Manager

Archives of Oral Biology


Reviewer #2: The authors have made the corrections according to the reviewers' comments.

I think that their revised manuscript AOB-D-12-00231R1 is suitable for publication in Archives of Oral Biology.

For the status of your accepted article and further information:

Access to information and services for authors is now available online at the Author Gateway from Elsevier Science (<http://www.elsevier.com/authors>).

Please note that the Publishers will provide a reference number on receipt of your accepted manuscript. This will enable you to track the progress of your manuscript.

 Internet



ANEXO III - Artigo aceito