

Marcos Heidy Guskuma

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DAS PROTEÍNAS VEGF, BMP2 E
CBFA1 NO ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO: ANÁLISE
HISTOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA EM CALOTAS DE
RATOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do Título de “Doutor em Odontologia” – Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

Araçatuba

2011

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Guskuma, Marcos Heidy

G982e Avaliação da presença das proteínas VEGF, BMP2 e CBFA1 no enxerto ósseo autógeno: análise histométrica e imunoistoquímica em calotas de ratos. / Marcos Heidy Guskuma

Araçatuba : [s.n.], 2011

68 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2011

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

1. Transplante ósseo 2. Imunoistoquímica 3. Proteína Morfogenética óssea 2 4. Subunidade alfa 1 de fator de ligação ao core 5. Fator A de crescimento do endotélio vascular

Black D7
CDD 617.64

Marcos Heidy Guskuma

Nascimento: 18/05/1976 – Cambará/PR

Filiação: Mário Takeo Guskuma
Júlia Kimie Guskuma

1995-1999: Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Estadual de Londrina

2006-2007: Curso de Mestrado em Odontologia
Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Dedicatória

À Minha Família

Paizão,

Minhas conquistas são igualmente suas. E a sua luta também será sempre minha. Teu exemplo foi a base para a minha formação e imprescindível para esta conquista. Sempre com muita calma, sabedoria e respeito, nos ensinou o que é verdadeiramente ser homem, ser pai. Obrigado, de coração, pela total dedicação a nós!

Minha mãezinha,

A ti, que me gerastes no ventre, dedico esta conquista. Imagino a tua felicidade, tão grande quanto a minha. Tu és a grande vencedora. Por ter lutado tanto, dentro de tantas adversidades e mesmo assim, sem nunca ter desistido, nos ensinou o sentido sublime da palavra amor. E deu-nos, com muita sabedoria, o estímulo e as condições para a nossa educação intelectual e moral. Parabéns por essa conquista!

Meus irmãos, Karen, Ricardo, Júlio e Soraya,

Irmãos tão maravilhosos como vocês não é fácil de encontrar não... Sempre torcendo, cuidando, incentivando, ensinando, aconselhando... Cada dia agradeço a Deus por tê-los ao meu lado! Obrigado por tudo.

Batian (minha avó),

Tu és a responsável por essa família maravilhosa que tenho, refletida em todos os meus tios e tias, primos e primas. Com todas as dificuldades que enfrentou durante a vida, deixou-nos a lição da seriedade, do respeito, do amor e da luta pelos objetivos. Batian, você será sempre a nossa referência e o nosso maior exemplo a seguir.

Minha amada esposa Lorennna,

Meu Amor, agradeço muito a Deus, em cada momento de minha existência, por ter uma pessoa tão maravilhosa como você ao meu lado. Você me faz muito feliz! Como sempre te digo, és o meu maior presente de Deus. Obrigado de coração pela compreensão, pelo estímulo, pelo amor.

À família que ganhei de Deus

Sr. Donizete, D. Ângela, Glauco e Guilherme,

Ter vocês em minha vida é mais uma dádiva que Deus coloca em minha existência. A presença de pessoas tão maravilhosas como vocês me faz ver o quanto sou abençoado. Obrigado pelo amor, pelo carinho e pelo acolhimento.

A todos os meus tios, tias, primos e primas

A todos vocês, meus queridos, que fizeram parte de todas as minhas conquistas, sempre dando apoio total e a sustentação necessária, principalmente nos momentos de maiores dificuldades. Obrigado de coração a todos vocês!

Aos nossos Irmãos que sofrem

Dedico este trabalho àqueles nossos Irmãos, ainda mais necessitados que nós mesmos, que passam por dificuldades de todos os gêneros. Agradeço a Deus pelas dádivas e oportunidades recebidas e peço forças para poder transformá-las em alguma forma de conforto e auxílio a esses nossos Irmãos, que muitas vezes têm fome e sede do pão e do amor.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, Professor Eduardo Hochuli Vieira, que durante o mestrado e o doutorado me direcionou pelas trilhas da ciência, sempre de forma competente e respeitosa. Os seus ensinamentos ficarão para sempre em minha mente e a sua amizade em meu coração. Muito obrigado.

À minha co-Orientadora, Professora Roberta Okamoto, que sempre com disposição e paciência admiráveis esteve ao meu lado no cumprimento das atividades científicas. A sua dedicação à ciência é um grande exemplo a todos nós. Muito obrigado.

Ao Professor Idelmo Rangel Garcia Junior, um mestre no verdadeiro sentido da palavra. Contigo aprendi muito sobre a ciência e a técnica. Mas nunca se perderá em minha mente o seu exemplo de grande respeito com que trata o ser humano, seja ele colega, aluno ou paciente. Obrigado Mestre por tudo!

Ao Professor Osvaldo Magro Filho, grande amigo e incentivador. Pessoa muito especial, que sempre transmite amor e alegria às criaturas à sua volta. Obrigado Dinho, pela sua amizade, carinho e pelos grandes momentos que proporciona a todos nós!!

Ao Professor Tetuo Okamoto, referência maior em nossa escola, que com sua simplicidade, tranquilidade e um coração enorme, colaborou de forma inestimável com seus preciosos conhecimentos para a realização deste trabalho. A ti meus eternos agradecimentos.

Ao grande amigo Michel Reis Messora, um verdadeiro irmão que conheci no primeiro dia que cheguei para a pós-graduação. Sempre acolhedor, respeitoso, preocupado com o nosso bem-estar e pronto para ajudar. Grande parceiro de momentos inesquecíveis. Sinto o quanto me consideras e saiba que para mim é uma grande honra poder tê-lo aqui nesse momento. Obrigado!

À grande amiga Thallita Pereira Queiroz, pessoa especial que com sua estrela cativa as pessoas por onde passa. Aluna dedicada que hoje é uma professora exemplar. Thallitinha, obrigado por todos os momentos de alegria, pela convivência nos plantões e laboratórios. Sua amizade estará sempre guardada em meu coração. É muito bom tê-la aqui nesse importante momento da minha vida.

Aos Professores da disciplina de Cirurgia, Dr. Michel Saad Neto, Dra. Cristiane Mara Ruiz de Sousa Fattah, Dra. Alessandra Marcondes Aranega e Dra. Daniela Ponzoni, os meus sinceros agradecimentos pela amizade e carinho.

Aos alunos de Pós-Graduação em Cirurgia, Abrahão Cavalcante, Albanir Gabriel Borrasca, André Dotto Sottovia, Camila Benez Ricieri, Carolina Chianteli Cláudio Coutinho, Cassiano Pereira, Eleonor Álvaro Garbin, Elisa Sartori, Ellen Gaetti Jardim, Flávia Priscila Pereira, Francisley Ávila Souza, Heloísa Fonseca Marão, Igor Mariotto Beneti, Jéssica Lemos Gulinelli, Jonatas Esteves, Leandro de Carvalho Cardoso, Léo Faverani, Liliane Sheidegger da Silva Zanetti, Martha Salim, Natasha Magro Érnica, Nicolas Homsí, Pâmela Letícia Santos, Paulo Esteves Faria, Pedro Ivo Silva, Rodolpho Valentini Neto, Thais da Silveira Rodrigues, Thallita Pereira Queiroz, Walter Betoni Júnior, Walter Gealh e demais alunos da

Pós-Grauação FOA UNESP, agradeço de coração pela amizade e pelos momentos inseqüecíveis que me proporcionaram.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia, Bernadete Maria Nunes Kimura, Cleide Lemes da Silva, Maria Dirce Colli Boatto, Gilmar Martins de Oliveira, Paulo Grattão, Odair Vicente, sou eternamente grato pelos serviços prestados, que foram imprescindíveis para a realização da minha pós-graduação. Pelo carinho, pela amizade sincera e por todos os momentos de convivência que ficarão para sempre em meu coração. Podem contar comigo sempre!

A todos os funcionários da FOA UNESP, sem os quais este trabalho não seria possível, meu eterno agradecimento.

A todos, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

Epígrafe

NÃO SOMENTE

Não somente agasalho que proteja o corpo, mas também o refúgio de conhecimentos superiores que fortaleçam a alma.

Não só a beleza da máscara fisionômica, mas igualmente a formosura e nobreza dos sentimentos.

Não apenas a eugenia que aprimora os músculos, mas também a educação que aperfeiçoa as maneiras.

Não somente a cirurgia que extirpa o defeito orgânico, mas igualmente o esforço próprio que anula o defeito íntimo.

Não só o domicílio confortável para a vida física, mas também a casa invisível dos princípios edificantes em que o espírito se faça útil, estimado e respeitável.

Não apenas os títulos honrosos que ilustram a personalidade transitória, mas igualmente as virtudes comprovadas, na luta objetiva, que enriqueçam a consciência eterna.

Não somente claridade para os olhos mortais, mas também luz divina para o entendimento imperecível.

Não só aspecto agradável, mas igualmente utilidade viva.

Não apenas flores, mas também frutos.

Não somente ensino continuado, mas igualmente demonstração ativa.

Não só teoria excelente, mas também prática santificante.

Não apenas nós, mas igualmente os outros.

Disse o Mestre: - "Nem só de pão vive o homem".

Apliquemos o sublime conceito ao imenso campo do mundo.

Bom gosto, harmonia e dignidade na vida exterior constituem dever, mas não nos esqueçamos da pureza, da elevação e dos recursos sublimes da vida interior, com que nos dirigimos para a Eternidade.

EMMANUEL

RESUMO

Guskuma, M. H. **Avaliação da presença das proteínas VEGF, BMP2 E CBFA1 no enxerto ósseo autógeno: análise histométrica e imunoistoquímica em calotas de ratos.** Araçatuba, 2011. 68 f. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

OBJETIVOS: A proposta deste estudo foi avaliar a expressão de proteínas que participam da fase de osteoindução (VEGF, BMP-2 e CBFA1) durante o processo de regeneração óssea de defeitos criados em calvária de ratos e preenchidos com enxerto autógeno em bloco.

MATERIAIS E MÉTODOS: Para o presente estudo foram utilizados 10 ratos adultos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) que receberam dois defeitos ósseos de 5 mm cada, em calvária. Os defeitos ósseos constituíram dois grupos experimentais (n=10): Grupo controle (CONT) (defeitos preenchidos com o próprio coágulo); Grupo enxerto (ENX) (defeitos preenchidos com osso autógeno removido do defeito contralateral). Os animais foram submetidos a eutanásia nos períodos de 7 e 30 dias pós-operatórios.

RESULTADOS: A análise quantitativa demonstrou formação óssea significativamente maior no Grupo ENX, no entanto, a presença das proteínas estudadas foi significativamente maior no Grupo CONT em ambos os períodos de observação. **CONCLUSÃO:** O enxerto ósseo autógeno cortical em bloco não expressou de forma significativa as proteínas osteoindutoras estudadas durante o processo de reparo.

Palavras- chave: Transplante ósseo, Imunoistoquímica, Proteína morfogenética óssea 2, Subunidade alfa 1 de fator de ligação ao core, Fator A de crescimento do endotélio vascular

ABSTRACT

Guskuma, M. H. **VEGF, BMP2 and CBFA1 presence evaluation in autogenous bone graft: Histometrical and immunohistochemical analysis in rats calvaria.** Araçatuba, 2011. 68 f. Thesis (Doctorate in Dentistry – Oral and Maxillo Facial Surgery) Araçatuba School of Dentistry. São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”.

AIMS: The proposal of this study was to evaluate the expression of proteins that act in osteoinduction (VEGF, BMP-2, CBFA1) phase during the bone defects regeneration created in rat calvaria and filled with autogenous bone graft in block.

METHODS: For the present study, 10 adult male rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) had two 5mm- bone defects in calvaria. Bone defects constituted two experimental groups: CONTROL Group (defects filled with blood clot); GRAFT Group (defects filled with bone graft). Animals were sacrificed at 7 and 30 days post operative. **RESULTS:** Quantitative analysis showed significantly higher bone formation in Graft Group, however, the presence of studied proteins was significantly higher in Control Group in both observation periods. **CONCLUSION:** Autogenous cortical bone graft in block did not express the studied osteoinductive proteins during bone repair.

Key-words: Bone transplantation, Immunohistochemical, Bone morphogenetic protein 2, Core binding factor alpha1, Vascular endothelial growth factor

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** - Esquema do procedimento cirúrgico. Defeitos cirúrgicos localizados bilateralmente nos ossos parietais com os respectivos tratamentos recebidos. 56
- Fig. 2** - Delimitação da AT (linha tracejada), respeitando os critérios estabelecidos, através do Programa Imagelab 2000®. No interior da AT observa-se o osso neoformado (setas). HE (original 2,5x) 56
- Fig. 3** - Análise histométrica dos defeitos do Grupo CONT aos 7 e 30 dias. 57
Observa-se a característica de formação óssea principalmente nos bordos dos defeitos em ambos os períodos (linha tracejada)
(HE. Original 2.5 X)
- Fig. 4** - Análise histométrica dos defeitos do Grupo ENX aos 7 e 30 dias. 58
Observa-se a incorporação do bloco e o fechamento total dos defeitos em ambos os períodos. (HE. Original 2.5 X)
- Fig. 5** - AON nos Grupos experimentais. ($P < 0,05$). As letras sobre as barras são comparativos entre os grupos. A presença de uma letra diferente denota significância estatística entre os resultados obtidos nos grupos comparados. ($P < 0,05$) Teste de análise de variância e de Tukey *post hoc*. 59
- Fig. 6** - Expressão da proteína VEGF aos 7 dias nos 2 Grupos experimentais. 60
(Original 160 X)

- A) As setas indicam os vasos em neoformação, imersos em áreas de intensa marcação (em marrom) em uma das bordas do defeito.
- B) Área de interface entre o enxerto e uma das bordas do defeito, evidenciando a discreta expressão da VEGF.

Fig. 7 - Expressão da proteína BMP-2 aos 7 dias nos 2 Grupos experimentais. **60**

(Original 160 X)

- A) As discretas marcações em marrom refletem a pequena quantidade de osteoblastos e matriz osteóide neste período, em uma das bordas do defeito
- B) Ausência total de imunomarcações na interface do enxerto com uma das bordas do defeito.

Fig. 8 - Expressão da proteína CBFA1 aos 7 dias nos 2 Grupos experimentais. **61**

(Original 160 X)

- A) As setas indicam as áreas de moderada expressão da CBFA1. As regiões de marrom mais escuro não são consideradas como marcações.
- B) Ausência total de imunomarcações na borda do defeito.

Fig. 9 - Expressão da proteína BMP-2 aos 30 dias nos 2 Grupos experimentais. **61**

(Original 160 X)

- A) As setas claras mostram o limite da borda do defeito. As setas escuras mostram as regiões de marrom mais escuro que são consideradas marcações inespecíficas. A grande área mais abaixo mostra a intensa marcação revelando a presença de osteoblastos e matriz osteóide.

B) A região do centro do defeito neste grupo mostra a ausência total de imunomarcações.

Fig. 10 - Expressão da proteína CBFA1 aos 30 dias nos 2 Grupos experimentais. **62**

(Original 160 X)

A) Intensas marcações por toda a área analisada. Apenas a região apontada pela seta não é considerada como marcação.

B) Marcações muito discretas no centro do defeito.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Intensidade das imunomarcações das proteínas estudadas. **55**

LISTA DE ANEXOS

Anexo A — Normas para publicação segundo o periódico **63**

“Journal of Oral & Maxillofacial Surgery”

Anexo B — Autorização da Comissão de ética na experimentação animal **68**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AON	Área de osso neoformado
AT	Área total
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2 (Proteína óssea morfogenética 2)
CBFA1	Core binding factor α 1 (Fator de ligação central α 1)
CONT	Controle
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ENX	Enxerto
HE	Hematoxilina Eosina
OA	Osso autógeno
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento vascular endotelial)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
μm	Micrometro
G	Grama
°C	Graus Celsius
X	vezes

SUMÁRIO

Introdução	23
------------	----

Materiais e métodos	25
---------------------	----

Resultados	29
------------	----

Discussão	32
-----------	----

Conclusões	38
------------	----

Referências	39
-------------	----

Anexos	63
--------	----

Manuscrito para publicação

segundo as normas do Periódico

“Journal of Oral & Maxillofacial Surgery”

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DAS PROTEÍNAS VEGF, BMP2 E CBFA1 NO ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO: ANÁLISE HISTOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA EM CALOTAS DE RATOS.

AUTORES:

Marcos Heidy Guskuma, DDS, MSc

Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, Brasil - Rua José Bonifácio, 1193 – CEP 16015-050 Araçatuba – SP

Eduardo Hochuli-Vieira, DDS, MSc, PhD

Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, Brasil - Rua José Bonifácio, 1193 – CEP 16015-050 Araçatuba – SP

Flávia Priscila Pereira, DDS, MSc

Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, Brasil - Rua José Bonifácio, 1193 – CEP 16015-050 Araçatuba – SP

Idelmo Rangel-Garcia Jr, DDS, MSc, PhD

Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, Brasil - Rua José Bonifácio, 1193 – CEP 16015-050 Araçatuba – SP

Roberta Okamoto DDS, MSc, PhD

Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, Brasil - Rua José Bonifácio, 1193 – CEP 16015-050 Araçatuba – SP

Tetuo Okamoto DDS, MSc, PhD

Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, Brasil - Rua José Bonifácio, 1193 – CEP 16015-050 Araçatuba – SP

Responsible author:

Marcos Heidy Guskuma

Address:

Rua Ibioporã, 548

Jd. Santo Antonio – Londrina – PR – CEP 86060-510

Fone: (43) 30255272 - 91013448

e-mail: mhguskuma@gmail.com

RESUMO

OBJETIVOS: A proposta deste estudo foi avaliar a expressão de proteínas que participam da fase de osteoindução (VEGF, BMP-2 e CBFA1) durante o processo de regeneração óssea de defeitos criados em calvária de ratos e preenchidos com enxerto autógeno em bloco.

MATERIAIS E MÉTODOS: Para o presente estudo foram utilizados 10 ratos adultos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) que receberam dois defeitos ósseos de 5 mm cada, em calvária. Os defeitos ósseos constituíram dois grupos experimentais (n=10): Grupo controle (CONT) (defeitos preenchidos com o próprio coágulo); Grupo enxerto (ENX) (defeitos preenchidos com osso autógeno removido do defeito contralateral). Os animais foram submetidos a eutanásia nos períodos de 7 e 30 dias pós-operatórios. **RESULTADOS:**

A análise quantitativa demonstrou formação óssea significativamente maior no Grupo ENX, no entanto, a presença das proteínas estudadas foi significativamente maior no Grupo CONT em ambos os períodos de observação. **CONCLUSÃO:** O enxerto ósseo autógeno cortical em bloco não expressou de forma significativa as proteínas osteoindutoras estudadas durante o processo de reparo.

Palavras- chave: Transplante ósseo, Imunoistoquímica, Proteína morfogenética óssea 2, Subunidade alfa 1 de fator de ligação ao core, Fator A de crescimento do endotélio vascular

INTRODUÇÃO

O osso autógeno é um material bastante conhecido e utilizado, reconhecido como padrão ouro para os procedimentos de reconstrução óssea.^{1,2,3,4,5} Apesar do grande número de pesquisas^{6,7} buscando um substituto para esse material, ainda não se conseguiu reunir todas as propriedades biológicas do osso autógeno em outro biomaterial.

Considera-se que para ser ideal, um biomaterial deve ser não-humano, osteoindutor, osteocondutor, estéril, atóxico, disponível em grandes quantidades⁸, reabsorvível, resistente mas fácil de manipular e permitir adesão, proliferação e diferenciação celular^{9,10}. Apesar de não ser ideal, o osso autógeno possui uma característica que o diferencia da maioria dos outros biomateriais: a propriedades osteoindutora². A diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos envolve vários fatores de crescimento, hormônios e vitaminas^{11,12,13,14} que agem localmente e sistemicamente em um processo complexo que pode ser alterado por fatores ambientais, nutricionais e mecânicos^{11,15}.

Os conceitos da osteoindução foram introduzidos por Urist¹⁶ em 1965, quando demonstrou a formação óssea ectópica em tecido muscular de animais após a inserção de osso descalcificado. Mais tarde, Urist e Strates¹⁷ concluíram que a responsável pela osteogênese foi uma proteína denominada bone morphogenetic protein (BMP), envolvida na quimiotaxia, mitose e diferenciação celular. Em 1988, Wozney et al.¹⁸ tornaram possível a clonagem da BMP, que começou a ser aplicada clinicamente na ortopedia. A partir de então, vários estudos^{19,20} confirmaram a capacidade osteoindutora da proteína.

Numa revisão de literatura, detectamos que apesar de a propriedade osteoindutora do osso autógeno ser reconhecida², nenhuma referência encontrada avaliou como as proteínas que participam do processo de indução se expressam nos enxertos ósseos autógenos. Dessa

forma, fica levantada a questão: o osso autógeno sempre apresenta a propriedade osteoindutora ativa durante o processo de regeneração dos enxertos?

O presente estudo tem o objetivo de avaliar a propriedade osteoindutora do osso autógeno através da análise da expressão das seguintes proteínas: a VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), um importante estimulador da angiogênese²¹; a BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein - 2), que promove a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, aumentando a formação e o reparo ósseo^{22,23,24,25,26,27}; e a CBFA1 (Core binding factor α 1), que regula a diferenciação e a expressão gênica dos osteoblastos²⁸.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Para o presente estudo foram utilizados 10 ratos adultos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com idade de 3 a 4 meses e peso corporal de 200 a 300 g. Para o procedimento cirúrgico, os animais receberam sedação pela combinação de Ketamina (0,7ml/Kg) e Xilazina (0,3ml/Kg), via intramuscular. Realizou-se uma incisão linear no sentido ântero-posterior em região mediana da calvária e o descolamento do dermoperiósteo. Dois defeitos ósseos de 5 mm de diâmetro e espessura total foram realizados com trefina em cada animal bilateralmente na região parietal. (Fig. 1)

Os defeitos ósseos constituíram dois grupos experimentais:

⇒ Grupo CONTROLE (CONT) (n=10)

– Os defeitos ósseos deste grupo foram preenchidos pelo próprio coágulo.

⇒ Grupo ENXERTO (ENX) (n=10)

– Os defeitos ósseos deste grupo foram preenchidos com osso autógeno em bloco removido do defeito contralateral no mesmo ato cirúrgico.

Após o preenchimento dos defeitos, os tecidos foram reposicionados e suturados por planos, obtendo completa cobertura dos defeitos. Os animais foram submetidos a eutanásia

nos períodos de 7 e 30 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico por via intramuscular.

As calotas foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em seqüência de álcoois e diafanizadas. As calotas foram cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando os defeitos ósseos. O defeitos foram cortados ao meio no sentido látero-lateral e as peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente. As peças receberam cortes de 6 µm de espessura e foram montadas em lâminas.

ANÁLISE HISTOMÉTRICA

As lâminas destinadas à análise quantitativa foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Para a realização da análise foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento de 2,5x acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software). Com o auxílio do programa ImageLab 2000, versão 2.4, foi calculada a extensão da área de formação óssea nos defeitos. Para tal, foram utilizados os seguintes critérios: (Fig. 2)

- Considerando que a Área Total (AT) do defeito na região analisada deve corresponder à área ocupada pelo osso da calvária na mesma região antes da confecção do defeito, a AT foi determinada da seguinte forma (Fig. 2): Estabeleceu-se a altura do

defeito, tendo como parâmetro a espessura do osso da calota nas bordas do defeito, e as bordas do defeito foram ligadas por duas linhas (superficial e profunda do defeito) separadas pela altura do defeito, seguindo a sua curvatura anatômica e delimitando a AT. O recurso “planilha de cálculos” do programa foi utilizado, obtendo o valor da AT em pixels. Os valores obtidos de cada lâmina foram somados e divididos de modo a obter uma média, que foi estabelecida como padrão para todos os defeitos, considerando que a espessura da calota era semelhante em todos os animais incluídos na amostra.

- As regiões correspondentes às áreas de osso neoformado (AON) foram delimitadas e as áreas calculadas separadamente em pixels. Para a obtenção do valor em porcentagem, consideramos a AT como 100% e usando uma regra de três, calculamos a porcentagem de AON para cada grupo. Foram obtidos 10 (dez) valores de porcentagem para cada grupo e a média destes determinou o valor final de AON em cada período analisado. Os valores foram submetidos aos Testes de Análise de Variância (Anova) e de Tukey *post hoc* para verificação de significância nas diferenças entre os grupos.

- No Grupo ENX, o osso correspondente ao enxerto foi considerado como AON, já que aos 30 dias observou-se a incorporação do mesmo.

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

As lâminas foram separadas e destinadas à análise imunoistoquímica. Realizou-se a inibição da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, a recuperação antigênica com tampão citrato a 60 °C por 20 minutos, e o bloqueio das reações inespecíficas com leite desnatado e albumina bovina durante as incubações dos anticorpos.

Foram utilizados os anticorpos primários contra CBFA1, BMP-2 e VEGF (Santa Cruz Biotechnology), anticorpo secundário biotilado (Pierce Biotechnology), o amplificador Streptavidina Biotina (Dako), e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno, que dá uma cor marrom-acastanhada às marcações. Ao término das reações, realizou-se a contra-coloração dos cortes com Hematoxilina de Harris. Foram realizados controles negativos (pela omissão dos anticorpos primários) para evitar a análise de falsos positivos. A proteína VEGF foi analisada apenas aos 7 dias, pelo fato de acreditarmos que a sua ação ocorra principalmente nos períodos iniciais do reparo.

Para a realização da análise foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento 160X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Benshein, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software). Três imagens foram obtidas de cada lâmina para análise: As duas bordas e o centro do defeito. Para efeito comparativo da intensidade das imunomarcações entre os grupos experimentais, foi criado um escore onde as imunomarcações foram classificadas em uma escala de 6 graus, que variavam de ausentes a intensas (Tab. 1). Dois avaliadores foram calibrados para a realização da análise imunoistoquímica.

RESULTADOS

ANÁLISE QUANTITATIVA (HE) (Fig.5)

7 dias

Neste período de observação, o Grupo ENX (46,44%) (Fig. 4A) obteve o maior índice de AON quando comparado ao Grupo CONT (12,48%). (Fig. 3A) (Fig.5)

30 dias

Aos 30 dias, não houve alteração significativa da AON no Grupo CONT (18,12 %) (Fig. 3B) enquanto sensível aumento da AON foi observado no Grupo ENX (58,86%). (Fig. 4B) (Fig.5)

ANÁLISE QUALITATIVA

7 dias

VEGF

O Grupo CONT foi o que apresentou maior quantidade de imunomarcações positivas para o VEGF, marcando as células endoteliais presentes no tecido conjuntivo e nos espaços medulares, tanto nas bordas como no centro do defeito (Fig. 6A). Em contraste o Grupo ENX (Fig. 6B) teve menos imunomarcações, notadamente no centro do defeito.

BMP-2

Neste período de observação, o Grupo CONT (Fig. 7A) apresentou-se com marcações bastante discretas para esta proteína, igualmente espalhadas pelo defeito, observadas principalmente em osteoblastos. No Grupo ENX (Fig. 7B), as marcações positivas para a BMP-2 estavam praticamente ausentes, especialmente no centro do defeito.

CBFA1

A quantidade de células com imunomarcações positivas para a CBFA1 aos 7 dias no Grupo CONT (Fig. 8A) foi apenas moderada, mas espalhadas por toda a extensão do defeito, representando os pré-osteoblastos presentes. No Grupo ENX (Fig. 8B) observou-se a ausência total da expressão da CBFA1.

30 dias

BMP-2

Aos 30 dias, o Grupo ENX (Fig. 9B) apresentou ausência de imunomarcações para a BMP-2, em contraste com o Grupo CONT (Fig. 9A), que apresentou intensa expressão da proteína, representando as áreas de formação da matriz óssea.

CBFA1

O Grupo CONT (Fig. 10A) apresentou-se com intensas marcações em toda a extensão do defeito, onde havia formação da matriz óssea. No Grupo ENX (Fig. 10B) a expressão da CBFA1 foi muito discreta, com maior presença nas bordas do defeito e nas superfícies do enxerto.

DISCUSSÃO

As reconstruções ósseas com enxertos são procedimentos amplamente utilizados na ortopedia e na cirurgia maxilo-facial. Desde que Urist¹⁶ (1965) descobriu o potencial osteoindutor das BMPs, o que já foi confirmado por outras pesquisas^{29,30}, a busca por um substituto ósseo com essa capacidade tem sido intensa^{31,6} e com resultados estimuladores, mas até o momento sem aplicação clínica segura³². O osso autógeno é considerado como o padrão ouro^{1,2,3,4,5} para os procedimentos de reconstrução óssea por uma combinação de características, mas o que realmente o difere dos outros biomateriais é a sua capacidade osteoindutora^{4,33,34,35}. No entanto, essa característica do osso autógeno tem sido pouco questionada e considerada como ativa em todas as situações de reparo do enxerto autógeno. Estudos mostrando como e quando os fatores osteoindutores agem durante o reparo dos enxertos autógenos cortical, medular, particulado ou em bloco, ainda faltam.

Os conceitos iniciais sobre o processo de reparo dos enxertos foram introduzidos por Barth³⁶ (1893), Axhausen³⁷ (1908) e Albrektsson³⁸ (1980). Desde aquela época os conhecimentos sobre biologia e fisiologia óssea evoluíram consideravelmente, saltando do nível celular para o nível molecular. Sabe-se que durante o processo de regeneração óssea, ocorre uma complexa interação entre células mesenquimais, hematopoiéticas, endoteliais, proteínas da matriz óssea, citocinas e fatores de crescimento, estimulando a angiogênese, migração, diferenciação e proliferação celular³⁹.

O presente trabalho mostra a incorporação de enxertos autógenos corticais em bloco em calvária de ratos. A análise histométrica reafirma por um lado a alta biocompatibilidade do osso autógeno e sua eficiência no fechamento dos defeitos (Fig. 4) e por outro lado confirma o tamanho crítico^{40,41} dos defeitos estudados (Fig. 3).

De uma forma geral, a análise imunoistoquímica (Tab. 1) revelou para todas as proteínas estudadas pouca ou nenhuma expressão das proteínas indutoras no Grupo ENX e intensa marcação no Grupo CONT, o que parece um resultado contraditório com a análise histométrica (Fig. 3 e 4). O osso autógeno, conhecido pelo seu potencial osteoindutor, não apresentou expressão de proteínas (Tab.1) reconhecidamente importantes no processo inicial da formação óssea como a VEGF^{21,42}, BMP-2^{22,23,24,25,26,27}, e CBFA1^{28,43}. No entanto, os defeitos em que foram colocados fecharam-se por completo aos 30 dias (Fig 4b), denotando um processo de reparo normal, o que foi confirmado pela análise histológica das peças. Os blocos de osso autógeno estudados atuaram como um material osteocondutor e altamente biocompatível. No entanto, as condições estruturais e celulares do leito receptor parecem ser essenciais para a integração dos biomateriais ao osso⁴⁴. Sugere-se que por algum mecanismo o organismo do animal possa reconhecer a presença do osso e inibir os sinais para liberação dos fatores osteoindutores.

A presença de fatores de crescimento nos enxertos ósseos autógenos é conhecida^{33,45}, bem como a expressão destes durante o processo de reparo na distração osteogênica^{46,47,48} e nas fraturas ósseas^{49,50,51,52}. Os princípios que regem o processo de reparo nas fraturas, nos enxertos e na distração osteogênica são os mesmos³⁸, no entanto seria razoável pensar que o osso enxertado estimule a cicatrização dos defeitos.

Um dos fatores que possivelmente contribuiu para a discreta expressão das proteínas no Grupo ENX (Tab. 1) foi a característica cortical do enxerto. Há tempos reconhece-se que o osso cortical e medular diferem em alguns aspectos que não apenas macroscópicos^{53,54}. A presença de grande quantidade de vascularização, células e fatores de crescimento no enxerto de osso medular^{55,56,33,45} favorece um reparo mais rápido, de alto metabolismo^{55,56,35} e caracterizado inicialmente por um estágio osteogênico seguido por uma fase reabsortiva^{53,54,57,58,59}. O enxerto cortical apresenta uma estrutura muito mais resistente e

densa, o que limita a quantidade de vascularização, células e fatores de crescimento^{55,56} no interior do bloco. Nestes casos, o reparo passa inicialmente por uma fase de reabsorção seguida pela fase osteogênica.

Kenzora et al.⁵⁸ sugere que o estímulo inicial para o reparo nos enxertos cortical e medular é o mesmo, mas como a densidade do osso cortical dificulta a revascularização e impede a proliferação celular, a reabsorção óssea prevalece. As áreas do enxerto cortical que revascularizam antes passam inicialmente pela fase osteogênica. Em nosso trabalho, podemos considerar a hipótese de que no Grupo ENX a fase de maior expressão da BMP-2 e da CBFA1 estaria entre os dois períodos observados, já que aos 7 dias (Fig. 7A e 8A) o osso poderia ainda estar passando pelo processo de reabsorção e aos 30 dias (Fig. 7B e 8B) observamos o osso já formado (Fig. 4B). Trabalhos com períodos de observação menos espaçados estão sendo feitos pelo nosso grupo e poderão ajudar a esclarecer essas questões.

O Grupo CONT caracterizou-se por intensa marcação das proteínas estudadas (Tab.1) e a origem dessas também é um importante fator a ser considerado. Saito et al.⁶⁰ e Ma et al.⁶¹ relataram que o periósteo apresenta propriedade osteoindutora, podendo auxiliar no processo de reparo ósseo. A dura mater também é reconhecidamente fonte de células osteogênicas e fatores osteoindutores^{62,63}. Dessa forma, concluímos que a principal fonte das proteínas estudadas em ambos os grupos foi aparentemente o periósteo e a dura-mater, já que o defeito foi de espessura total. No Grupo ENX não foi observada neoformação óssea na parte superior do bloco possivelmente devido ao contato com o dermoperiósteo (Fig. 4A e 4B) que não deixou espaço para formação de coágulo, como ocorreu com Choi et al.⁶⁴ (2004) e Choi et al.⁶⁵ (2005). Na base do bloco e nas bordas dos defeitos a camada de coágulo formada serviu como matriz para a migração de fatores da osteoindução (Fig. 4), o que está de acordo com as observações de Andrade et al.⁶⁶. Colaborando com esses achados, Alam et al.⁶⁷ demonstraram em mandíbulas de coelhos que a BMP-2 se expressa principalmente no tecido

conjuntivo formado nos gaps e na medula óssea nos limites das áreas de formação óssea dos enxertos. No Grupo CONT a característica de neoformação óssea principalmente nas bordas dos defeitos (Fig. 3) induz afirmar que os estímulos osseoindutores provêm do osso daquelas regiões. No entanto, acreditamos que essa característica de neoformação óssea ocorra devido ao colapamento do dermoperiósteo na parte profunda e central do defeito pela falta de uma estrutura osteocondutora, causando espaços para a formação de uma matriz de coágulo e migração das proteínas osteoindutoras somente nas bordas dos defeitos, como demonstramos em outros trabalhos⁶⁸.

A VEGF é uma proteína conhecida pela sua importante participação na angiogênese, através da estimulação da mitose das células endoteliais^{21,69}. No entanto, os estudos têm demonstrado a participação da VEGF na diferenciação⁷⁰, na migração dos osteoblastos, na promoção do turn-over ósseo e na mineralização^{71,72,73,21,74}. Aparentemente de maneira antagônica, esta proteína parece atuar também na regulação da reabsorção óssea⁷⁵ e da osteoclastogênese⁷⁶.

A expressão da VEGF nas bordas do defeito e a ausência de marcações no interior do bloco ósseo coincide com os resultados de Ohtsubo et al.⁴⁴, que demonstrou em metodologia parecida à nossa, a formação inicial dos capilares aos 7 dias, homogeneização no tamanho dos vasos aos 14 dias e o decréscimo na formação de novos vasos aos 21 dias de reparo dos enxertos autógenos. Neste trabalho optou-se por realizar a análise da expressão da VEGF apenas aos 7 dias, no entanto uma análise em períodos mais prolongados poderia ter demonstrado uma revascularização mais tardia do osso cortical. Albrektsson³⁸ determinou o índice de revascularização dos enxertos em coelhos e concluiu que o processo de incorporação - *creeping substitution* – (Burchardt, 1987)⁵⁵ do enxerto cortical ocorre mais lentamente. Nos ossos medulares este índice foi de 0.2-0.4 mm/dia e nos ossos corticais de

0.15-0.30 mm/dia. Considerando estes dados, acreditamos que a expressão da VEGF possa ser mais intensa nos enxertos medulares, o que não foi avaliado neste estudo.

As BMPs pertencem à superfamília das TGF- β (Transforming Growth Factor beta) sintetizadas por osteoblastos^{77,78} e compreendem o maior subgrupo com 15 genes (BMP1 a BMP15), críticos para a embriogênese e a formação óssea^{79,80}. São encontradas nas fibras colágenas ósseas, em células periosteais e mesenquimais, pré-dentina e polpa dentária⁸. As BMP-2 são as mais estudadas entre as BMPs, encontradas nos osteoblastos, na matriz óssea e nos fibroblastos. Agem ligando-se a receptores específicos da membrana das células mesenquimais indiferenciadas, ativando complexas reações intracelulares em cascata que culminam com uma sobre-regulação da expressão dos genes osteoblásticos^{19,20} causando a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos⁸¹ e consequentemente a formação óssea⁸². Tem sido demonstrado clinicamente que a BMP-2 e a BMP-7 estimula a regeneração óssea^{83,84,85,86,87}. Quando comparada a pequenos animais, a utilização de BMPs exógenos em humanos é mais crítica, já que altas doses são necessárias para que ocorra uma aceleração do processo de regeneração óssea⁸⁸. Dessa forma, efeitos colaterais como a reabsorção óssea^{89,90} e ossificações heterotrópicas^{91,92} podem ocorrer.

A presença da proteína BMP-2 foi detectada no Grupo ENX, ainda que de forma discreta, somente aos 30 dias (Fig. 9B) no interior dos canais de Havers e Volkmann do osso neoformado, com características de um processo adiantado de ossificação. Acreditamos que neste período a fase de ação da BMP-2 já tenha cessado e por isso a proteína apareceu discretamente. De acordo com Noël et al.⁹³, 6 dias de expressão são necessários para que ocorra formação óssea em ratos.

A CBFA1, também conhecida como RUNX2, é um fator de transcrição pertencente à família de genes Runt⁹⁴ encontrada nos pré-osteoblastos e osteoblastos jovens. É ativada pela ligação de proteínas da matriz extracelular, entre elas a BMP-2, à superfície dessas células⁹⁵.

Após a sua ativação ela pode agir diretamente, ligando-se a regiões específicas do DNA, ou ativar uma complexa reação em cascata, recrutando enzimas que vão catalisar a transcrição de genes osteoblásticos^{96,97,98,99,100,101,102,103,104}. Dessa forma, a CBFA1 é crítica para a formação e o desenvolvimento ósseo, regulando a diferenciação dos osteoblastos, a formação da matriz extracelular e a mineralização óssea¹⁰⁵, além de participar da manutenção (homeostasia) deste tecido^{96,106}.

O padrão de imunomarcações para a CBFA1 (Fig. 8; Fig. 10) foi muito parecido com o da BMP-2 (Tab.1), possivelmente pelo fato de atuarem em conjunto no processo de reparo. Em 2004, Isefuku et al.¹⁰⁷ verificaram que apesar da importante função da CBFA1 durante o desenvolvimento fetal, esta proteína pode ter importância muito menor nos processos de reparo ósseo como nas fraturas e na distração osteogênica. No entanto, em nosso trabalho o Grupo CONT (Tab. 1) demonstrou uma presença significativa de todas as proteínas estudadas durante o processo de reparo.

A regeneração dos enxertos ósseos autógenos ainda representa um enorme campo para pesquisas. Diversas outras proteínas envolvidas no processo de reparo dos enxertos devem ser estudadas, diferentes modelos experimentais, diferentes leitos receptores, comparações entre osso cortical e medular precisam ser extensamente analisadas para que se possa compreender profundamente as reações fisiológicas do organismo quando submetido aos processos de reparo. Esses conhecimentos são essenciais para a busca de novos substitutos ósseos.

CONCLUSÕES

A metodologia empregada permite concluir que:

- ✓ O enxerto ósseo autógeno cortical em bloco não expressou de forma significativa proteínas osteoindutoras durante o processo de reparo, não apresentando propriedade osteoindutora ativa.
- ✓ A biocompatibilidade e a osteocondutibilidade são propriedades importantes para os biomateriais.
- ✓ A presença das proteínas estudadas parece não ser crítica para os biomateriais nestes tipos de defeito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morbel N, Serhal CB, Matni G, Naaman N: Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg* 12:73–78, 2008.
2. Pape HCMD, Evans AMD, Kobbe PMD: Autologous Bone Graft: Properties and Techniques. *J Orthop Trauma* 24:S36–S40, 2010.
3. Cordaro L, Torsello F, Ribeiro CA, Liberatore M, Torresanto VMdi: Inlay–onlay grafting for three-dimensional reconstruction of the posterior atrophic maxilla with mandibular bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 39: 350–357, 2010.
4. Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Luissi A, Mettler D, Schenk RK: Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 9:137–150, 1998.
5. Prósper AA, Ferrin ML, Oltra PD, Diago PM: Bone regeneration using particulate grafts: An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 1;16 (2): e 210-4, Mar 2011.
6. Marsell R, Einhorn TA: Emerging Bone Healing Therapies. *J Orthop Trauma* 24:S4–S8, 2010.

7. Fröhlich M, Grayson¹ WL, Wan LQ, Marolt D, Drobic M, Vunjak-Novakovic G: Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance. *Curr Stem Cell Res Ther.* 3(4): 254–264, 2008.

8. Aaboe M, Pinholt EM, Hansen EH: Healing of experimentally created defects: a review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 33. 312-318, 1995.

9. Whang K, Healy KE, Elenz DR, Nam EK, Tsai DC, Thomas CH: Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Eng* 5:35–51, 1999.

10. Calvert JW, Marra KG, Cook L, Kumpta PN, DiMilla PA, Weiss LE: Characterization of osteoblast-like behaviour of cultured bone marrow stromal cells on various polymer surfaces. *J Biomed Mater Res* 52:279–284, 2000.

11. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GAM: Bone cell differentiation and growth Factors. *Science* 220: 680-686, 1983.

12. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N: Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 18: 207-212, 1987.

13. Rosen V, Wozney JM, Wang EA: Purification and molecular cloning of a novel group of BMP's and localization of BMP mRNA in developing bone. *Connect Tissue Res* 20: 313-319, 1989.

14. Triffitt JT: Initiation and enhancement of bone formation, a review. *Acta Orthop Stand* 58: 673-684, 1988.
15. Goldring MB, Goldring SR: Skeletal tissue response to cytokines. *Clin Orthop Rel Res* 258: 245-278, 1990.
16. Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Science* 150(698): 893–899, 1965.
17. Urist MR, Strates BS: Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50(6): 1392–1406, 1971.
18. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528–34, 1988.
19. Nishimura R, Hata K, Harris SE, Ikeda F, Yoneda T: Core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) induces osteoblastic differentiation of C2C12 cells without interactions with Smad1 and Smad5. *Bone* 31:303-312, 2002.
20. Derynck R, Zhang YE: Smad-dependent an Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577-584, 2003.
21. Street J, Bao M, de Guzman L, Bunting S, Peale FVJr, Ferrara N, Steitnmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH: Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9656-9661, 2002.

22. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hipp J, Schelling SH, Wang E: Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* 293:317-326, 1993.
23. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath T, Kuber T, Rueger DC, Whitecloud TS: The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 76:827-838, 1994.
24. Ripamonti U, Van den Heever B, Sampath TK, Tucker MM, Rueger DC, Reddi AH: Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7). *Growth Factors* 13:273-289, 1996.
25. Reddi AH: Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16:247-252, 1998.
26. Wozney JM, Rosen V: Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res* 346:26-37, 1998.
27. Heckman JD, Ehler W, Brooks BP, Aufdemorte TB, Lohmann CH, Morgan T, Boyan BD: Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor-beta enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg Am* 81:1717-1729, 1999.

28. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G: A *Cbfa 1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 13:1025-1036, 1999.

29. Yu YY, Lieu S, Lu C, Bone CC: Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. 47: 65–73, 2010.

30. Wikesjö UME, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Shanaman RH, Rohrer MD, Wozney JM, Hall J: Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *J Clin Periodontol* 35: 1001–1010, 2008.

31. Park KH, Kim H, Sumi M, Na K: Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrin hydrogel for bone tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering* VOL. 108 No. 6, 530–537, 2009

32. Leknes KN, Yang J, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Wikesjö UME: Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 :radiographic observations. *Clin. Oral Impl. Res.* 19:1027–1033, 2008.

33. Schmidmaier G, Herrmann S, Green J: Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. *Bone* 39:1156–1163, 2006.

34. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E: Bone substitutes: an update. *Injury*. 36:S20–S27, 2005.
35. Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS: The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*. 13:77–86, 2005.
36. Barth A: Über histologische Befunde nach Knochenimplantationen. *Arch Klin Chir* 46, 409, 1893.
37. Axhausen G: Die pathologisch-anatomischen Grundlagen der Lehre von freien Knochentransplantation beim Menschen und beim Tier. *Med Klin* 2, Beiheft, 23, 1908.
38. Albrektsson T: Repair of bone grafts. *Scand J Plast Reconstr Surg* 14: 1-12, 1980.
39. Lacerda SA, Lanzoni JFA, Prado KFB, Campos AA, Prata CA, Brentegani LG: Osteogenic Potential of Autogenous Bone Associated with Bone Marrow Osteoblastic Cells in Bony Defects: A Histomorphometric Study. *Implant Dentistry/Volume* 18, number 6, 2009.
40. Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 205:299–308, 1986.
41. Hollinger JO, Kleinschmidt JC: The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1:60–68, 1990.

42. Dai J, Rabie ABM: VEGF: an Essential Mediator of Both Angiogenesis and Endochondral Ossification. *J Dent Res* 86(10):937-950, 2007.
43. Lien CY, Lee OK, Su Y: Enhances the Osteogenic Differentiation of Both Human and Mouse Mesenchymal Stem Cells Induced by Cbfa-1 via Reducing Its Ubiquitination-Mediated Degradation. *Stem Cells* 25:1462–1468, 2007.
44. Ohtsubo S, Matsuda M, Tatekawa M: Angiogenesis after sintered bone implantation in rat parietal bone. *Histol Histopathol* 18: 153-163, 2003.
45. Takemoto RC, Fajardo M, Kirsch T, Egol KA: Quantitative Assessment of the bone morphogenetic protein expression from alternate bone graft harvesting sites. *J Orthop Trauma* 24: 564-566, 2010.
46. Yates KE, Troulis MJ, Kaban LB: TGF- β and BMP 4 are expressed during distraction osteogenesis of the pig mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31:173, 2002.
47. Bouletreau PJ, Warren SM, Longaker MT: The molecular biology of distraction osteogenesis. *J Craniomaxillofac Surg* 30:1, 2002.
48. Campisi P, Hamdy RC, Lauzier D: Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg* 111:201, 2003.
49. Bostrom MPG, Lane JM, Berberian WS: Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 13:357, 1995.

50. Rosier RN, O’Keefe RJ, Hicks DG: The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin. J Orthop Res* 355:294, 1998.
51. Croteau S, Rauch F, Silvestri A: Bone morphogenetic procedures in orthopedics: From basic science to clinical practise. *Orthopedics* 22:686, 1999.
52. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC: Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 14:1805, 1999.
53. Urist M.R, McLean FC: Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Jt Surg*, 34 A. 443, 1952.
54. Enneking WF, Morris J L: Human autologous cortical bone transplants. *Clin Orthop* 87, 28, 1972.
55. Burchardt H: Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am.* 18:187–196, 1987.
56. Day S, Ostrum R, Clinton R: Bone injury, regeneration, and repair. In: Buckwalter J, Einhorn T, Simon S, eds. *Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 388, 2000.
57. Enneking WF, Puhl JJ, Piotrowski G: Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *Bone Jt Surg* 57 A, 237, 1975.

58. Burchardt H, Enneking WF: Transplantation of bone. *Surg Clin North Am* 58, 403, 1978.
59. Kenzora JE, Steele RE, Yosipovitch ZH, Glimcher MJ: Experimental osteonecrosis of the femoral head in adult rabbits. *Clin Orth/wp* 130, 8, 1978.
60. Saito M, Shimizu H, Beppu M, Takagi M: The role of beta-tricalcium phosphate in vascularized periosteum. *J Orthop Sci.* 5(3):275-82, 2000.
61. Ma D, Yao H, Tian W, Chen F, Liu Y, Mao T, Ren L: Enhancing bone formation by transplantation of a scaffold-free tissue-engineered periosteum in a rabbit model. *Clin Oral Impl Res* (doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02091.x), 2011.
62. Wang J, Glimcher MJ: Characterization of matrix induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: II. Origins of boneforming cells. *Calcif Tissue Int.* 65:486–493, 1999.
63. Gosain AK, Santoro TD, Song LS, Capel CC, Sudhakar PV, Matloub HS: Osteogenesis in calvarial defects: Contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals. *Plast Reconstr Surg.* 112:515– 527, 2003.
64. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH: Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autologous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:56-9, 2004.

65. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH: Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34:420-4, 2005.
66. Andrade MGS, Moreira DC, Dantas DB, Sá CN, Bittencourt TCB, Sadigursky M: Pattern of osteogenesis during onlay bone graft healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110:713-719, 2010.
67. Alam S, Ueki K, Marukawa K, Ohara T, Hase T, Takazakura D, Nakagawa K: Expression of bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 during bone regeneration using different implant materials as an onlay bone graft in rabbit mandibles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103:16-26, 2007.
68. Guskuma MH, Hochuli-Vieira E, Pereira FP, Garcia Jr IR, Okamoto R, Okamoto T, Magro-Filho O: Bone regeneration in surgically created defects filled with autogenous bone: an epifluorescence microscopy analysis in rats. *Appl Oral Sci.* 18(4):346-53, 2010.
69. Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25:581-611, 2004.
70. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I: Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg* 87:1434, 2005.

71. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5:623-628, 1999.

72. Mayr-Wohlfart U, Walternberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE: Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 30:472-477, 2002.

73. Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ: Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res* 83:204-210, 2004.

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

75. Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Saito T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hareda Y: Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS. Lett* 473:161-164, 2000.

76. Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodama H: Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med* 190:293-298, 1999.

77. Gazzerro E, Gangii V, Canalis E: Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* 102:2106-2114, 1998.
78. Pereira RC, Economides AN, Canalis E: Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts. *Endocrinology* 141:4558-4563, 2000.
79. Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO: Bone morphogenetic proteins: an update on basic and clinical relevance. *J Orthop Res* 17:269-278, 1999.
80. Yoon ST, Boden SD: Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clin Orthop Relat Res* 395:33-43, 2002.
81. Yamaguchi A, Komori T, Suda T: Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs and cbfa1. *Endocr Rev* 21:393-411, 2000.
82. King GN, Cochran DL: Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol* 73:925-936, 2002.
83. Friedlaender G, Perry C, Cole J, Cook S, Cierny G, Muschler G, Zych G, Calhoun J, LaForte A, Yin S: Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions, *J. Bone Joint. Surg. Am.* 83: S151–S158, 2001.

84. Govender S, Csimma C, Genant H, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Borner M, 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: BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) Study Group. 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 Joint Surg. Am.* 84:2123–2134, 2002.
85. Hsu W, Wang J: The use of bone morphogenetic protein in spinal fusion, *Spine J.* 8: 419–425, 2008.
86. Rengachary S: Bone morphogenetic proteins: basic concepts, *Neurosurg. Focus.* 13: e2, 2002.
87. Vaibhav B, Nilesh P, Vikram S, Anshul C: Bone morphogenic protein and its application in trauma cases: A current concept update, *Injury* 38:1227–1235, 2007.
88. Nakamura T: Biomaterial osteoinduction. *J Orthop Sci* 12:111–112, 2007.

89. Giannoudis P, Kanakaris N, Einhorn T: Interaction of bone morphogenetic proteins with cells of the osteoclast lineage: review of the existing evidence. *Osteoporos. Int.* 18:1565–1581, 2007.
90. Okamoto M, Murai J, Yoshikawa H, Tsumaki N: Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development, *J. Bone Miner. Res.* 21: 1022–1033, 2006.
91. Axelrad T, Steen B, Lowenberg D, Creevy W, Einhorn T: Heterotopic ossification after the use of commercially available recombinant human bone morphogenetic proteins in four patients, *J. Bone Joint. Surg. Br.* 90:1617–1622, 2008.
92. Wysocki R, Cohen M: Ectopic ossification of the triceps muscle after application of bone morphogenetic protein-7 to the distal humerus for recalcitrant nonunion: a case report, *J. Hand Surg. Am.* 32:647–650, 2007.
93. Noël D, Gazit D, Bouquet C, Apparailly F, Bony C, Plence P, Millet V, Turgeman G, Perricaudet M, Sany J, Jorgensen C: Short-Term BMP-2 Expression Is Sufficient for In Vivo Osteochondral Differentiation of Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells* 22:74-85, 2004.
94. Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT: Role of the $\alpha 2$ -integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the *osf2* transcription factor. *J Biol Chem* 273:32988-32994, 1998.

95. Camilleri S, MacDonald F: Runx2 and dental development. *Eur J Oral Sci* 114:361-373, 2006.
96. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747-754, 1997.
97. Selvamurugan N, Chou WY, Pearman AT, Pulumati MR, Partridge NC: Parathyroid hormone regulates the rat collagenase-3 promoter in osteoblastic cells through the cooperative interaction of the activator protein-1 site and the runt domain binding sequence. *J Biol Chem* 273:10647-10657, 1998.
98. Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G: Cbfa1 contributes to the osteoblasts-specific expression of Type I collagen genes. *J Biol Chem* 276:7101-7107, 2001.
99. Schroeder TM, Kahler RA, Li X, Westendorf JJ: Histone deacetylase 3 interacts with Runx2 to repress the osteocalcin promoter and regulate osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 279:41998-42007, 2004.
100. Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN: Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119:555-566, 2004.
101. Liu C, Chang E, Yu J, Carlson CS, Prazak L, Yu XP, Ding B, Lengyel P, Di Cesare PE: The interferon inducible p204 protein acts as a transcriptional coactivator of Cbfa1 and enhances osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 280:2788-2796, 2005.

102. Ji C, Casinghino S, Chang DJ, Chen Y, Javed A, Ito Y, Hiebert SW, Lian JB, Stein GS, McCarthy TL, Centrella M.: CBFa (AML/PEBP2)- related elements in the TGF-beta type I receptor promoter and expression with osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 69:353-363, 1998.

103. Drissi H, Luc Q, Shakoori R, Chuva de Sousa Lopes S, Choi JY, Terry A, Hu M, Jones S, Neil JC, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS: Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *J Cell Physiol* 184:341-350, 2000.

104. Westendorf JJ, Zaidi SK, Cascino JE, Kahler R, van Wijnen AJ, Lian JB, Yoshida M, Stein GS, Li X: Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21CIP1/WAF1 promoter. *Mol Cell Biol* 22:7982-7992, 2002.

105. Ducy P: Cbfa1 a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219:461-471, 2000.

106. Quack I, Vondertrass B, Stock M, Aylsworth AS, Becker A, Brueton L, Lee PJ, Majewski F, Mulliken JB, Suri M, Zenker M, Mundlos S, Otto F: Mutation analysis of core binding factor A1 in patients with cleidocranial dysplasia. *Am J Hum Genet* 65:1268-1278, 1999.

107. Isefuku S, Joyner CJ, Reed AAC, Simpson AHRW: Distraction osteogenesis in the Cbfa1^{+/-} mouse. *J Orthop Res* 22:1276-1282, 2004.

TABELA

Tabela 1: Intensidade das imunomarcações das proteínas estudadas.

ESCORES:

Ausente = + / Muito discreta = ++ / Discreta: = +++
 Moderada = ++++ / Pouco intensa = +++++ / Intensa = ++++++

PROTEÍNA	GRUPO	7 DIAS	30 DIAS
VEGF	CONT	++++++	
	ENX	++	
BMP-2	CONT	+++	++++++
	ENX	+	+
CBFA-1	CONT	++++	++++++
	ENX	+	++

- VEGF = vascular endothelial growth factor
- BMP-2 = bone morphogenetic protein-2
- CBFA-1 = core binding factor alpha 1
- CONT = controle
- ENX = enxerto

FIGURAS

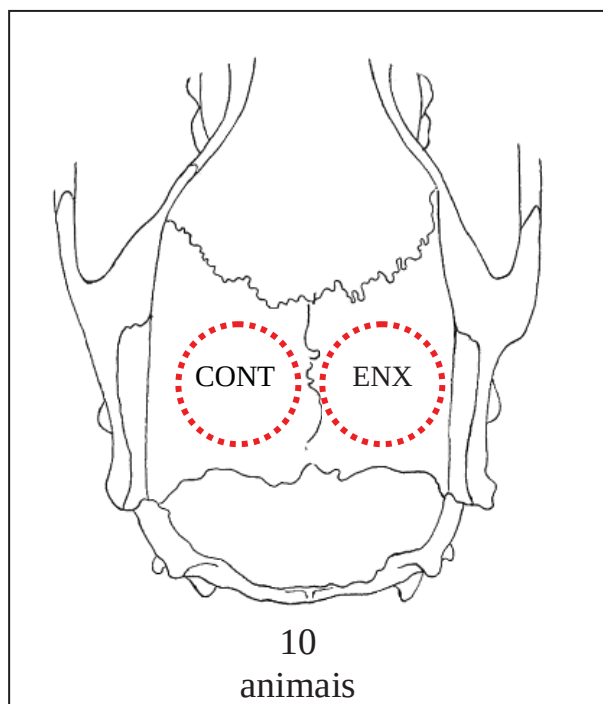


Fig. 1: Esquema dos defeitos criados. Defeitos cirúrgicos localizados bilateralmente nos ossos parietais com os respectivos tratamentos recebidos.

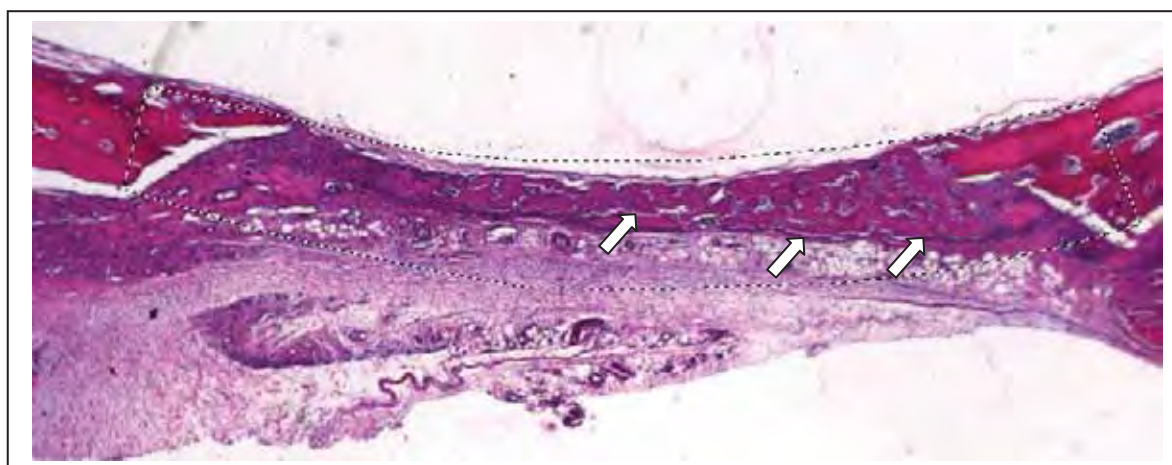


Fig. 2: Delimitação da AT (linha tracejada), respeitando os critérios estabelecidos, através do Programa Imagelab 2000®. No interior da AT observa-se o osso neoformado (setas). HE (original 2,5x)

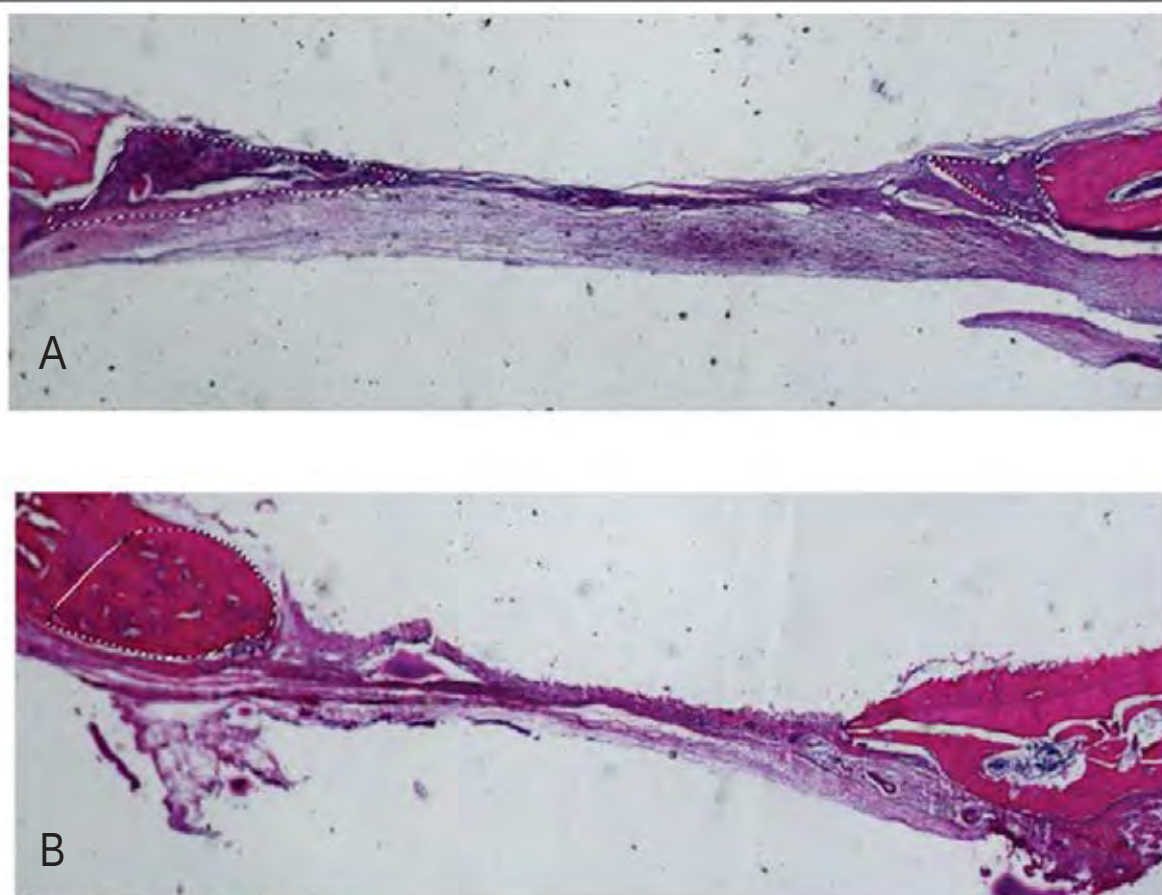


Fig.3: (HE. Original 2.5 X) Análise histométrica dos defeitos do Grupo CONT aos 7 e 30 dias. Observa-se a característica de formação óssea principalmente nos bordos dos defeitos em ambos os períodos (linha tracejada). A = Grupo CONT 7 dias / B = Grupo CONT 30 dias.

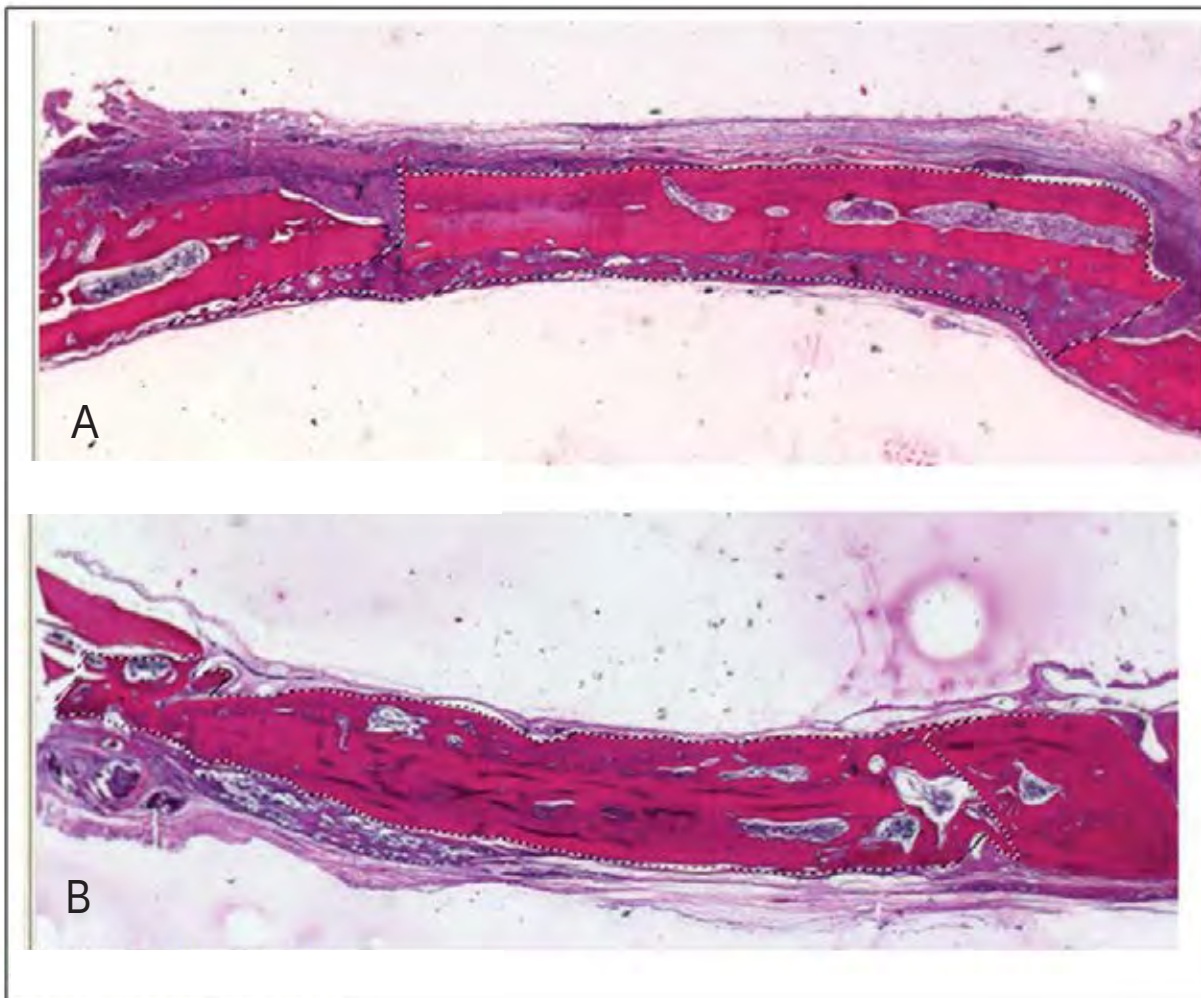


Fig.4: (Original HE. 2.5 X) Análise histométrica do Grupo ENX aos 7 e 30 dias. Observa-se a incorporação do bloco e o fechamento total dos defeitos em ambos os períodos. A = Grupo ENX 7 dias / B = Grupo ENX 30 dias.

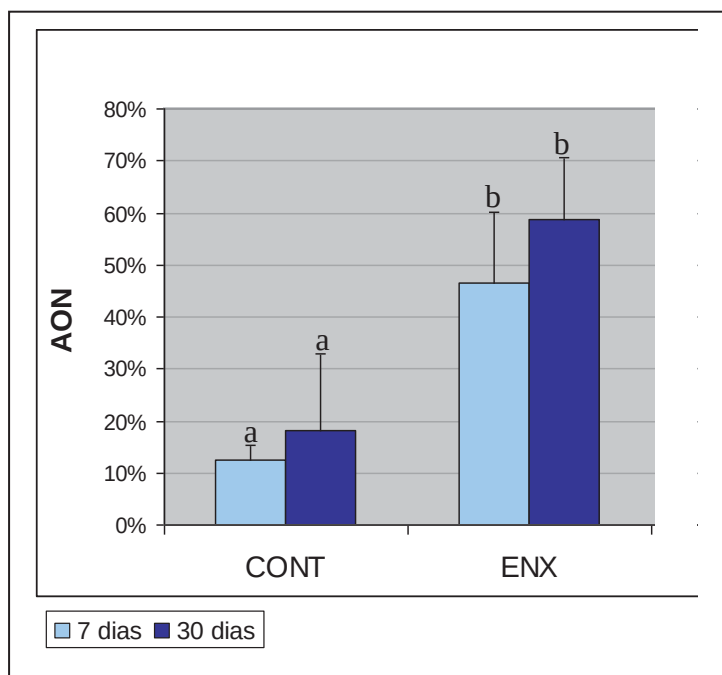


Fig 5: AON nos Grupos experimentais. As letras sobre as barras são comparativos entre os grupos. A presença de uma letra diferente denota significância estatística entre os resultados obtidos nos grupos comparados. ($P < 0,05$) Teste de análise de variância e de Tukey *post hoc*.

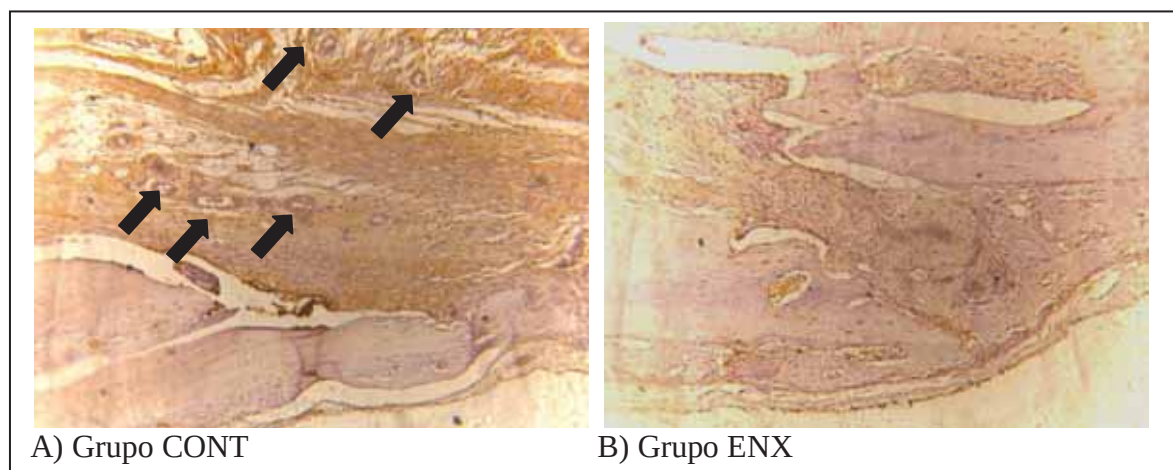


Fig. 6: Expressão da proteína VEGF aos 7 dias nos 2 Grupos experimentais.
(Original 160 X)

- A) As setas indicam os vasos em neoformação, imersos em áreas de intensa marcação (em marrom) em uma das bordas do defeito.
- B) Área de interface entre o enxerto e uma das bordas do defeito, evidenciando a discreta expressão da VEGF.

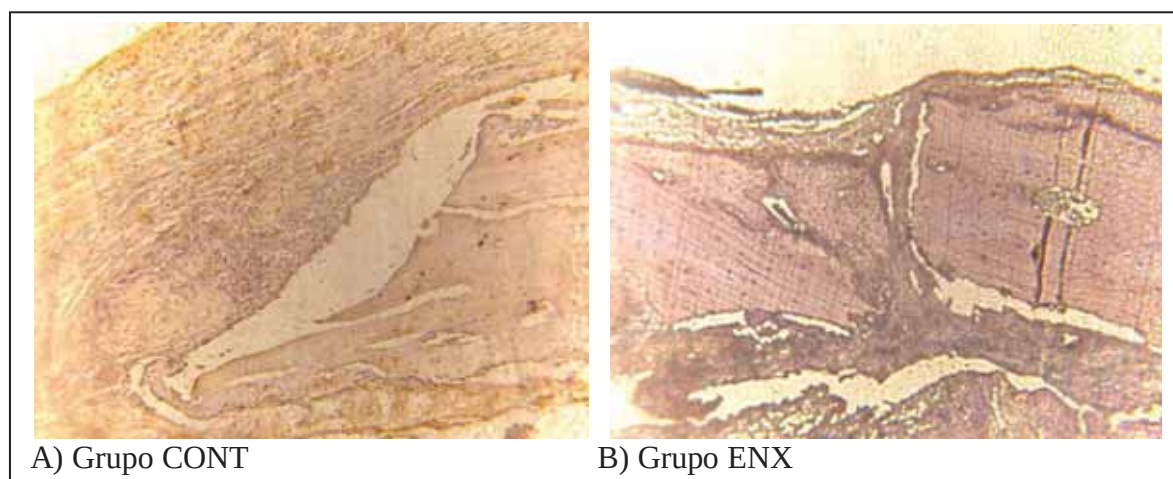


Fig. 7: Expressão da proteína BMP-2 aos 7 dias nos 2 Grupos experimentais.
(Original 160 X)

- A) As discretas marcações em marrom refletem a pequena quantidade de osteoblastos e matriz osteóide neste período, em uma das bordas do defeito
- B) Ausência total de imunomarcações na interface do enxerto com uma das bordas do defeito.

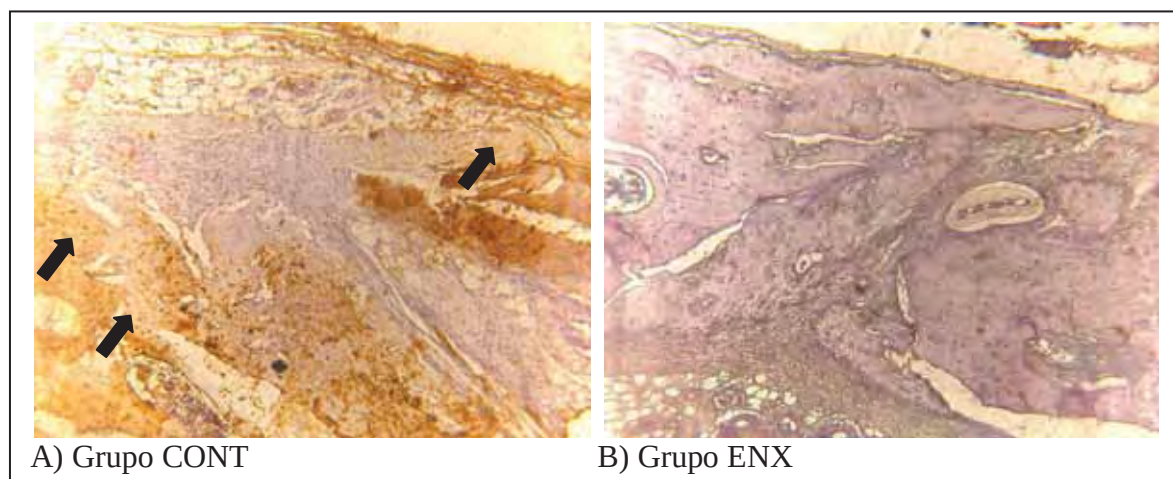


Fig. 8: Expressão da proteína CBFA1 aos 7 dias nos 2 Grupos experimentais.
(Original 160 X)

- A) As setas indicam as áreas de moderada expressão da CBFA1. As regiões de marrom mais escuro não são consideradas como marcações.
- B) Ausência total de imunomarcações na borda do defeito.

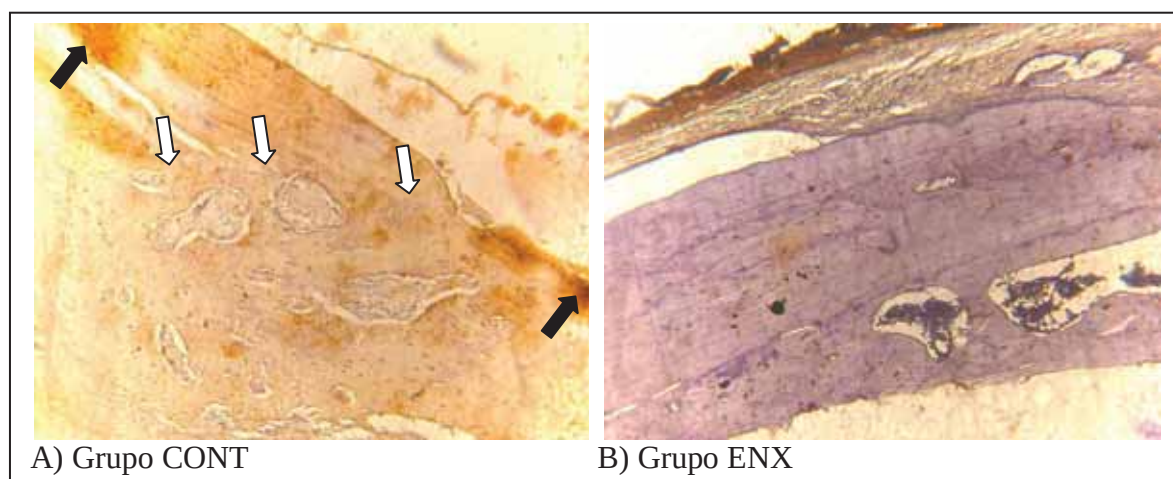


Fig. 9: Expressão da proteína BMP-2 aos 30 dias nos 2 Grupos experimentais.
(Original 160 X)

- A) As setas claras mostram o limite da borda do defeito. As setas escuras mostram as regiões de marrom mais escuro que são consideradas marcações inespecíficas. A grande área mais abaixo mostra a intensa marcação revelando a presença de osteoblastos e matriz osteóide.
- B) A região do centro do defeito neste grupo mostra a ausência total de imunomarcações.

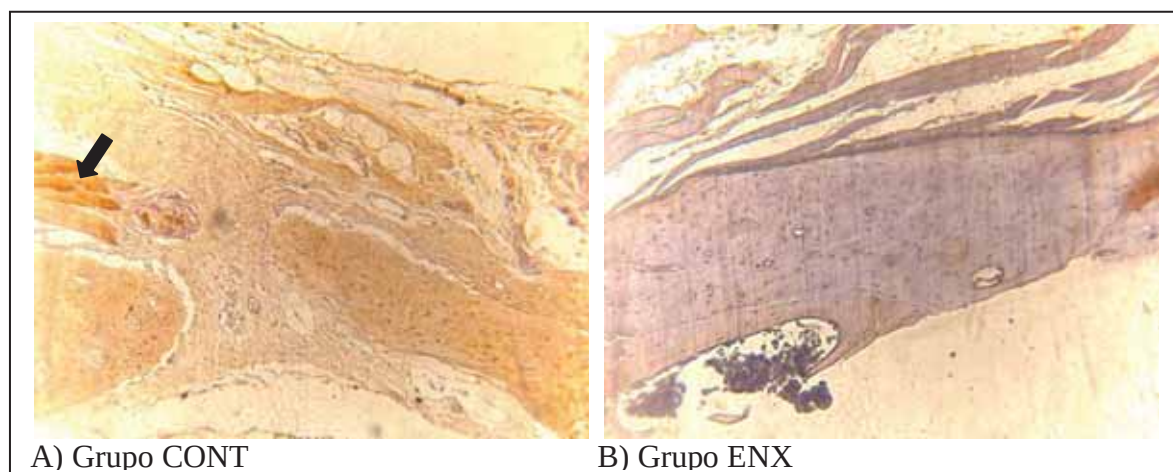


Fig. 10: Expressão da proteína CBFA1 aos 30 dias nos 2 Grupos experimentais.

(Original 160 X)

A) Intensas marcações por toda a área analisada. Apenas a região apontada pela seta não é considerada como marcação.

B) Marcações muito discretas no centro do defeito.

ANEXOS

ANEXO A

Normas para publicação segundo o Periódico “Journal of Oral & Maxillofacial Surgery”

Guide for Authors

Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

Notice to Contributors

Reprints of the notice are available from the Editor-in-Chief and are also available at www.joms.org. The JOURNAL publishes articles reflecting a wide range of opinions and techniques, provided they are original, contribute new information, and meet the standards of scientific thought, rational procedure, and literary presentation.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery uses an online, electronic submission system. By accessing the website <http://ees.elsevier.com/joms>, authors will be guided through the electronic submission process; original source files (text documents in Word, image files in TIFF or EPS) are required. The author should specify a category designation for the manuscript (original investigation, review article, letter to the editor, etc) and choose a set of classifications from the list provided online. All authors must download and fill out the AAOMS disclosure statement regarding dual commitment. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the Editorial

Office (joms@ecu.edu). All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be sent via e-mail.

All author correspondence may be directed to the Editor-in-Chief:

Dr James R. Hupp

Dean and Professor of Oral-Maxillofacial Surgery

East Carolina University-School of Dental Medicine

Lakeside Annex #7, Mail Stop 701

Greenville, NC 27834

Phone: (252) 737-7900

E-mail: huppj@ecu.edu

Original articles are considered and accepted for publication on the condition that they have not been published, or submitted for publication, elsewhere. The Editor reserves the right to edit manuscripts to fit articles within the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency. A title page should be included with each article that lists the title, the authors' names, degrees, affiliations, complete mailing address (including street number), and the telephone number, fax number, and e-mail address for the corresponding author. Titles of articles should be descriptive but as concise as possible. A structured abstract (introductory summary) of no more than 250 words should be included. It should be divided into four sections labeled Purpose, Materials (or Patients) and Methods, Results, and Conclusions.

All Contributors to JOMS should refer to the Consort statement on clinical research design and the Helsinki statement on medical protocols and ethics.

Consort statement:

☞ <http://www.consort-statement.org/>

Helsinki:

☞ <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>

References. Type with double spacing. All references given must be cited in numerical order in the text. Bibliographies and reading lists are not used. For journal references, give the author's name, article title, journal name as abbreviated in Index Medicus, volume, pagination, and year.

☞ 1. Regezi JA, Batsakis JG, Courtney RM: Granular cell tumors of the head and neck. J Oral Surg 37:402, 1979

☞ For books, give the author's name, book title, location and name of publisher, and year of publication (exact page numbers are required for direct quotations):

1. Skinner EW, Phillips RW: Science of Dental Materials (ed 5). Philadelphia, PA, Saunders, 1960, p 246

☞ Figures. All figures must be numbered and cited in the text in order.

Legends. All submitted figures require a legend. For photomicrographs, magnification and stain should be specified.

☞ Artwork: Photographs should be high-quality, sharp images. Color art and color photography submissions are encouraged. Images must be high-resolution digital illustrations (EPS or TIFF files): line artwork = minimum of 1000dpi; halftone artwork (photographic/continuous tone) = minimum of 300dpi; combination artwork (line/tone) = minimum of 500dpi; recommended dimensional size is a minimum of 5x7 inches. Powerpoint is acceptable for review purposes, but not of sufficient quality for publication. Authors may contact Elsevier for more information or should download a copy of the Specifications for Supplying Digital Artwork from ☞

<http://www.elsevier.com/artwork>, which has detailed information on file formats, artwork guidelines, and color information.

➡ Tables. Each table should be logically organized and should supplement the article.

Each table should be numbered consecutively and cited in the body of the text in order. Title and footnotes should be on the same page with the table. Do not draw vertical rules in tables.

➡ Acknowledgments. Only persons who have made significant contributions to an article can be acknowledged.

➡ Permission and Waivers. These should accompany the manuscript when it is submitted for publication. Include the following statement in the covering letter: In consideration of the Journal of Oral and Maxillofacial Surgery taking action in reviewing and editing my (our) submission, the author(s) undersigned hereby transfer(s), assign(s), or otherwise convey(s) all copyright ownership to the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons in the event that such work is published in the JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY. Permission of original author and publisher must be obtained for direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that is not your own. (Up to 100 words of prose material usually can be quoted without getting permission, provided the material quoted is not the essence of the complete work.) Authors are responsible for applying for permission for both print and electronic rights for all borrowed materials and are responsible for paying any fees related to the applications of these permissions. Waivers must be obtained for full-face photographs unless eyes are masked to prevent identification. Waiver forms are available from the Editor-in-Chief.

Financial Interests. As specified in the AAOMS disclosure statement regarding dual

commitment, any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with a submitted manuscript must be disclosed. All sources of external funds supporting the work must be indicated in a footnote, as should all corporate affiliations of the authors. A covering letter at the time of submission should inform the Editor about pertinent consultancies, stock ownership or other equity interests, or patent licensing arrangements. All information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision. If the manuscript is accepted, the Editor will discuss with the authors how best to disclose the relevant information.

ANEXO B



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"REGENERAÇÃO ÓSSEA DE CAVIDADES CIRURGICAMENTE CRIADAS E PREENCHIDAS POR IMPLANTES DE OSSO AUTÓGENO. ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA EM CALOTAS DE RATOS"** sob responsabilidade do **Prof. Ass. Dr. Eduardo Hochuli Vieira** e colaboração de **Marcos Heidy Guskuma** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 19/03/2009 de acordo com o protocolo 2008-001721.

Araçatuba, 19 de Março de 2009

Prof.ª Adjunto Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP