

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA

Júlio César Silva de Oliveira

**AVALIAÇÃO DO EFEITO OSTEOINDUTIVO DO PDGF-BB
ASSOCIADO A DIFERENTES CARREADORES NA
REGENERAÇÃO ÓSSEA EM CAVIDADES
CIRURGICAMENTE CRIADAS.**

Araçatuba – SP

2015

Júlio César Silva de Oliveira

**AVALIAÇÃO DO EFEITO OSTEOINDUTIVO DO PDGF-BB
ASSOCIADO A DIFERENTES CARREADORES NA
REGENERAÇÃO ÓSSEA EM CAVIDADES
CIRURGICAMENTE CRIADAS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do
Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de
concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-
Maxilo-Facial).

Orientador: Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Coorientação: Profa Dra. Eloá Rodrigues Luvizuto

Araçatuba – SP

2015

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48a

Oliveira, Júlio César Silva de.

Avaliação do efeito osteoindutivo do PDGF-BB associado a diferentes carreadores na regeneração óssea em cavidades cirurgicamente criadas / Júlio César Silva de Oliveira. - Araçatuba, 2014

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Idelmo Rangel Garcia Junior

Coorientadora: Eloá Rodrigues Luvizuto

1. Regeneração óssea 2. Implantes dentários 3. Fator de crescimento derivado de plaquetas 4. Materiais biocompatíveis 5. Ratos I. Título

Black D7

CDD 617.64

Dedicatória

À Deus,

O nosso Pai celestial. Ele que nunca deixa seus filhos desamparados. Toda honra e glória ao Senhor. Mesmo nos momentos mais nebulosos, difíceis, eu pude sentir Sua presença como um alicerce forte que nunca me deixou desabar. Obrigado meu Deus, meu Senhor, meu Pai, que sempre me acompanhou na jornada de vida, dando-me suporte físico, emocional, psicológico para encarar o que o mundo nos proporciona. Nunca duvidei do Seu Poder. Às vezes nas horas mais complicadas, Deus testa nossa fé, mas Ele nunca nos deixa sós. Todos os meus anseios profissionais e pessoais são Tua vontade meu Deus.

Aos meus pais, Raimundo Nonato (*in memoriam*) e Rosânia

Não existem palavras para reconhecer o que vocês são pra mim... Sim, meu pai continua muito vivo dentro do meu coração e ele se expressa no ser mais especial que possa ter, minha mãe amada! Infelizmente, pela vontade do Senhor, meu pai foi para o céu quando eu ainda tinha por volta dos dois anos de idade. Por isso, não pude contemplar por muito tempo seu amor, carinho e dedicação que tenho certeza que seria como pai assim como era como esposo da minha mãe. E ela, guerreira, forte, criou seus filhos sem nunca deixar faltar nada. Obrigado mãe, sem você não conseguiria. A senhora é meu tudo! Amo-te demais!

Aos meus irmãos, Paulo Eduardo e Flávio Augusto

Graças a Deus os tenho como irmãos, porque apesar das desavenças de outrora, como brigas ocasionais de infância, ou maneiras de ver a vida de forma diferente, tenho certeza que somos unidos, que há muito respeito e companheirismo entre nós. Eu sei que posso contar com vocês para o que der e vier e espero que saibam que o que precisarem também farei o meu máximo para fazer. Cada um vai seguindo seu caminho, mas guardo vocês e nossa mãe no meu coração. Amo vocês!

Aos meus avós maternos, Julio e Rosete

Além de avós, são os meus padrinhos de batismo. Pessoas que admiro muito e que são meus segundos pais neste mundo. Muito obrigado pelos ensinamentos que não estão presentes nos livros, mas àqueles que aprendemos com a vida. Exemplos de seres humanos, pacatos, tranquilos e serenos, que transmitem amor e carinho na medida certa. Amo vocês!

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Obrigado! Mas não somente pelos ensinamentos profissionais relacionados à cirurgia ou à pesquisa. O senhor se tornou meu amigo, mais que orientador. Sabe de todos os meus anseios, das minhas dúvidas e incertezas, e em nenhum momento deixou de estender a mão oferecendo apoio. Posso não conseguir mais nada na minha vida, mas já sou muito grato pelas oportunidades que o senhor me oferece e melhor, pela liberdade de poder escolher, dando-me livre arbítrio. Com certeza, sua presença tem uma parcela importante no meu amadurecimento que creio ainda não chegou ao fim. Espero fazer valer mais a pena ainda chefe, pois não quero decepcioná-lo!

À minha coorientadora Prof. Dra. Eloá Rodrigues Luvizuto

Assim como meu orientador, mais um presente que Deus me proporcionou em Araçatuba. Pessoa serena, calma, que transmite muita paz, excelente para se trabalhar. Verdadeiro espelho para que eu possa me guiar como pós-graduando e como pessoa. Meu muito obrigado pelas oportunidades e pela parceria. Espero continuar aprendendo mais e mais com a sua ajuda e que eu possa retribuir de alguma forma.

À Prof. Ass. Roberta Okamoto

Não conseguirei expressar em palavras o meu profundo agradecimento pelo seu acolhimento, ensinamentos, paciência, e compreensão para comigo. Grato demais pela confiança depositada em mim, por tê-la como amiga e poder me expressar de forma transparente. Desculpe-me pelas situações difíceis que lhe coloquei e obrigado pelo apoio sempre.

Ao meu amigo Prof. Adj. Eider Guimarães Bastos

Meu muitíssimo obrigado por tudo que o senhor me proporcionou em termos de aprendizado com a cirurgia e convivência. A primeira pessoa que me apresentou à CTBMF e que proferiu a seguinte frase uma vez para mim: “Amizade vale mais que dinheiro no bolso”. Nunca me esqueci. Um exemplo de pessoa, cirurgião, docente, pesquisador, enfim, alguém que serve como modelo para qualquer pessoa que aspire bons modos. Mais além que isso, pelo carinho que possui com minha família e em especial possuía com o meu pai, eu o considero como um tio. Valeu mesmo! Devo muito ao senhor.

À minha namorada, Lícia

Depois que você entrou na minha vida, tudo mudou e para melhor... Sinto que agora possuo uma companheira, amiga, alguém que posso confiar e por isso mesmo, nesse tempo todo de trabalho árduo e à distância, você demonstrou e comprovou tudo isso pra mim! Eu

já não me vejo e nem concebo construir algo na minha vida sem você ao meu lado...

Obrigado meu amor.

Aos meus amigos de infância e de vida,

Desde os primeiros passos, durante a alfabetização até hoje, graças a Deus, sempre fui rodeado de pessoas que são verdadeiros anjos os quais denominamos de amigos. **Isabela, Álvaro Bruno, Anderson, Stella, Hugo, César, Alisson, Walter, Aline, Giovana, Luís Augusto, Maxwell, Moreira, Poliana, Álvaro, Ricardo, Rodrigo, Felipe, Wilson, Alice, Saulo, Alex, Miguel, Cícero, Jacqueline, Marcelo, Carol, Beatriz, Letícia, Raphaela, Leandro, Mércia, Márcio, Laércio, Rafael, Ráysa, Rafaelle e Deynna** são algumas dessas pessoas que quando reencontro parece que não faz muito tempo que nos falamos. O tempo e a distância não influenciam. Com certeza esqueci-me de citar alguns nomes, peço desculpas, porque minha memória é falha.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) e

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP – Processo nº 2012/15181-8),

Pela possibilidade de realizar um sonho de fazer pós-graduação. Obrigado pelo incentivo e obrigado mais ainda por ter feito parte do meu crescimento como um todo.

Agradecimentos

Nunca é demais mais agradecer, ainda mais sabendo que sem o apoio e incentivo dos que estão ao seu redor, o ser humano não consegue galgar passos firmes para atingir seus objetivos. Além do mais, a vitória tem o sabor mais gostoso quando dividido com os que sempre torceram por você.

À Universidade Federal do Maranhão – UFMA, por ter me formado cirurgião-dentista com valores éticos, morais e humanos.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por ter me acolhido de forma tão prazerosa fazendo sentir-me como se estivesse em casa.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” **Profa. Adj. Maria José Hitomi Nagata**, pelo caráter, altruísmo e gentileza.

Aos professores do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, **Profa. Ass. Alessandra Marcondes Aranega, Profa. Ass. Ana Paula Farnezi Bassi, Prof. Adj. Celso Koogi Sonoda, Profa. Ass. Daniela Atili Brandini, Profa. Ass. Daniela Ponzoni, Profa. Adj. Denise Pedrini, Prof. Ass. Francisley Ávila de Sousa, Prof. Ass. Osvaldo Magro Filho, Profa. Adj. Sônia Regina Panzarini Barioni, Prof. Titular Wilson Roberto Poi**, em que pude desfrutar conversas, conselhos, conhecimentos sobre vários pontos que são pertinentes para a vida de qualquer pessoa.

Aos demais professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - **UNESP**, de outras áreas, em que pude ter contato e aprender sempre mais.

Aos funcionários do serviço técnico do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, **Renato, Paulo, Marco, Odair, Dirce, Gilmar, Cleide, Tina, Joílson e Arnaldo** e todos aqueles que tive o prazer de conhecer e conviver. Obrigado pelo suporte e carinho.

Às funcionárias do Programa de Pós-Graduação, **Valéria, Cristiane e Lilian**, pela paciência e ajuda constante e disponibilidade ágil.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelos cuidados e carinho que possuem com todos.

Aos demais funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sempre tratando a todos, e não somente a mim, com muito esmero e altruísmo.

Aos meus colegas da Pós-Graduação do Mestrado em Odontologia, Adrieli, Emily, Fabrizio, Naida, Leonardo, Liliane, Mariana, Maurício, Neliana, Régis, Rita, Márcio, Ana Bombonatti, Vanessa pela amizade durante o primeiro ano de mestrado com as disciplinas de tronco comum, mas que continua mesmo com a distância e as atividades corridas do dia a dia.

Aos meus colegas da Cirurgia e Implantodontia, Christian, Tárik, Willian Ricardo, Monica, Ana Carulina, Ana Paula, Járede, Eduardo, Julio Maciel, Julierme, Heldo, André, Sabrina, Igor Benetti, Lamis, Sabrina, Willian Moraes, Willian Caetano, Rafael Santiago, Gustavo, Bianca, Elisa, Pilar,

Juceléia, Rodrigo, Juliana, Giovanna, Fernanda pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo. Levo todos em meu coração.

Aos amigos, **Aljomar** e **Victor**, por terem me acolhido no momento mais complicado que passei em Araçatuba. Foram muitas risadas, palhaçadas, curtções e alguns episódios de estresse, absolutamente normais e que acontecem quando se vive intensamente. Vocês estão no meu coração. Podem contar comigo pra qualquer coisa.

Ao (Prof.º) **Léo**, fonte de inspiração e modelo, obrigado pelo incentivo em todos os seguimentos da vida, tenho que certeza que fiz um amigo.

Às estagiárias da profa Roberta, **Ana Cláudia, Danila, Elisa, Fernanda, Larissa, Letícia, Karen e Nayla**, pela pronta disposição e colaboração para realização deste trabalho. Meninas, muito obrigado pelo esmero e dedicação que vocês tiveram neste trabalho.

Aos **pacientes**, que confiaram no nosso trabalho, permitindo nosso aprimoramento técnico-cirúrgico, meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

“Eu imaginava que seria difícil, o caminho seria tortuoso, os obstáculos iriam testar minha fé, mas algo me dizia que conseguiria. Não chegou ao fim... isso é o bom da vida!”

Oliveira JCS. Avaliação do efeito osteoindutivo do PDGF-BB associado a diferentes carreadores na regeneração óssea em cavidades cirurgicamente criadas [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

Resumo

Objetivos Defeitos ósseos extensos em região maxilo-facial podem ser corrigidos com enxerto autólogo, no entanto as desvantagens desta modalidade terapêutica levam à pesquisa por novos substitutos ósseos. Com isso, avaliamos o comportamento biológico e osteoindutivo do PDGF-BB associado a diferentes carreadores, por meio de análise histológica, histométrica e imunoistoquímica em defeitos críticos realizados em calotas cranianas de ratos.

Materiais e método 96 defeitos críticos de 5 mm de diâmetro foram criados em calotas cranianas de ratos. Cada defeito foi aleatoriamente dividido em 8 grupos experimentais (AUT, COA, TCP, TCP+PDGF, END, END+PDGF, BIO, BIO+PDGF), avaliados aos 15 e 30 dias pós-operatórios com relação a histomorfometria e imunoistoquímica.

Resultados Os resultados mostraram que houve neoformação óssea em todos os grupos analisados, independentemente do tempo pós-operatório. Aos 30 dias, o grupo TCP só não diferiu do grupo BIO na neoformação óssea ($p = 0,1403$). Em nenhum dos grupos de biomateriais analisados, o fator de crescimento estimulou o aumento da neoformação óssea ($p > 0,05$).

Conclusão Com a metodologia utilizada, o fator de crescimento associado com os biomateriais testados não induziu neoformação óssea.

Relevância clínica Baseado nestes resultados, é necessário desvendar os mecanismos osteoblásticos nas fases iniciais da cicatrização óssea e o seu desfecho em longo prazo, para que a concentração adequada do PDGF-BB possa ser bem empregada com o arcabouço ósseo que mais o favorece para as reconstruções maxilofaciais.

Palavras chaves: regeneração óssea; implantes dentários; fator de crescimento derivado de plaquetas; materiais biocompatíveis; ratos.

Oliveira JCS. Evaluation of the osteoinductive effect of PDGF-BB associated with different carriers in bone regeneration in bone surgical defects [dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2015.

Abstract

Objectives Extensive bone defects in maxillofacial region can be corrected with autograft, however the disadvantages of this type of therapy lead to the search for new bone substitutes. Thus, we evaluated the biological behavior and osteoinductive PDGF-BB associated with different carriers, by histological analysis and immunohistochemical histometric critical defects performed in rats calvaria.

Materials and method 96 critical defects were created with 5 mm diameter calvaria of rats. Each defect was randomly divided into eight experimental groups (AUT, COA, TCP, TCP + PDGF, END, END + PDGF, BIO, BIO + PDGF), evaluated at 15 and 30 postoperative days for histomorphometry and immunohistochemistry.

Results The results showed new bone formation in all groups, independent of postoperative time. At 30 days, the TCP group just did not differ from BIO group in the new bone formation ($p = 0.1403$). In none of the groups analyzed biomaterials, growth factor stimulated increase in bone formation ($p > 0.05$).

Conclusion With the methodology used, the growth factor associated with the tested biomaterials did not induce new bone formation.

Clinical relevance Based on these results, it is necessary to unravel the osteoblastic mechanisms in the early stages of bone healing and their outcome in the long term, so that the appropriate concentration of PDGF-BB may be well employed with the bone structure that most favors for maxillofacial reconstructions.

Keywords: bone regeneration; dental implants; platelet-derived growth factor; biocompatible materials; rats.

Lista de figuras

Figura 1.....	43
Figura 2.....	44
Figura 3.....	45
Figura 4.....	46
Figura 5.....	47
Figura 6.....	48
Figura 7.....	49
Figura 8.....	49
Figura 9.....	50
Figura 10.....	50
Figura 11.....	51
Figura 12.....	51
Ilustrações da fase cirúrgica.....	55
Suplemento de imagens da análise histológica.....	58

Lista de tabelas

Tabela 1.....	42
---------------	----

Lista de Abreviaturas

ALP = fosfatase alcalina

AON/AT = área do tecido ósseo neoformado por área total do defeito

ASO/AT = área do substituto ósseo por área total do defeito

AUT = autógeno

BIO = matriz de osso bovino mineralizada

COA = coágulo

COL-1 = colágeno tipo I

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

END = matriz de cerâmica de hidroxiapatita

g = grama

h = horas

HE = hematoxilina e eosina

kg = quilograma

ml = mililitro

mm = milímetro

OC = osteocalcina

OP = osteocalcina

PDGF-BB = fator de crescimento derivado de plaquetas do tipo BB

pH = potencial hidrogeniônico

RUNX-2 = fator de transcrição

TCP = matriz de beta-tricálcio fosfato

TRAP = fosfatase ácida tartarato resistente

UI = unidade internacional

°C = graus Celsius

μm = microlitro

% = por cento

μm = micrômetro

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 MATERIAL E MÉTODO.....	22
2.1 Ética e desenho do estudo.....	22
2.2 Procedimento cirúrgico.....	22
2.3 Processamento em parafina.....	23
2.4 Análise histomorfométrica.....	24
2.5 Análise estatística.....	24
2.6 Análise imunoistoquímica.....	25
3 RESULTADOS.....	25
3.1 Análise histológica.....	25
3.2 Análise histométrica.....	28
3.3 Análise imunoistoquímica.....	29
4 DISCUSSÃO.....	31
5 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
ANEXO A.....	52
ANEXO B.....	53
ANEXO C.....	56
ANEXO D.....	58

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido mineralizado que confere múltiplas funções mecânicas e metabólicas para o esqueleto, possuindo dois tipos principais distintos de células, os osteoblastos, ou células que formam osso e os osteoclastos, ou células que reabsorvem osso [1-3]. A migração de células no intuito de formar e/ou reabsorver tecido ósseo é um evento importante que ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas [4].

Apesar do nível de esclarecimento e educacional que a população recebe sobre a importância de visitas periódicas ao cirurgião-dentista, sobre programas de prevenção de acidentes, ainda há um número significativo de perdas dentárias precoces, sejam eles provocados por traumas, doenças periodontais e cárie. A exodontia ainda é um dos procedimentos mais realizados na clínica e quando os pacientes não são reabilitados imediatamente, as consequências são negativas desarranjando o sistema estomatognático.

Quando o processo fisiológico de reabsorção óssea atinge um nível intenso, em que há maior atuação das ações dos osteoclastos frente aos osteoblastos, a simples instalação de implantes dentários torna-se inviável, necessitando de procedimentos cirúrgicos auxiliares para recompor a estrutura óssea perdida. Embora o osso autógeno seja ainda considerado o mais eficaz potenciador da cicatrização óssea [5], a incidência de complicações e o desconforto pós-operatório [6-9] fazem com que a engenharia tecidual desenvolva novas tecnologias que são promissoras para a regeneração óssea [7,10,11].

Várias proteínas têm sido mostradas que possuem resposta quimiotática para os osteoblastos, e mais recentemente, o fator de crescimento derivado de plaquetas do tipo BB (PDGF-BB) foi reportado [4,7,12,13]. Os fatores de crescimento são mediadores

biológicos que regulam a chave celular dos eventos que são parte do processo de reparo e regeneração celulares [14,15]. Originalmente, o PDGF foi identificado como constituinte do soro de sangue total que estava ausente de células livres derivadas do plasma. Subsequentemente, foi purificado a partir de plaquetas humanas, e que apesar dos grânulos α de plaquetas serem um importante local de armazenamento, estudos recentes sugerem que o PDGF pode ser sintetizado por diferentes tipos de células (monócitos, macrófagos, células endoteliais e osteoblastos) [8,16].

Na realidade, PDGF é uma família de fatores de crescimento, que inclui o PDGF-A, B, C e D. A proteína, no entanto, é biologicamente ativa apenas na forma de um dímero [8,12]. Ambos, o PDGF-A e o PDGF-B são capazes de formar homodímeros e heterodímeros, enquanto que o PDGF-C e o PDGF-D só podem existir como homodímeros [17]. Todas as combinações das moléculas de PDGF se ligam via dois receptores de superfície celular, conhecidos como PDGF- α e PDGF- β apesar de o PDGF-BB ser o único isômero que se liga a todos os receptores isotópicos do PDGF [12]. Com isso, o PDGF-BB é considerado o isoforma universal para o desenvolvimento de terapias estratégicas de regeneração óssea [8,11,18].

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento biológico e osteoindutivo do PDGF-BB associado a diferentes carreadores, por meio de análise histológica, histométrica e imunoistoquímica em defeitos críticos realizados em calotas cranianas de ratos.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 *Ética e desenho do estudo*

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual Paulista, Brasil (protocolo nº02402-2012), 96 ratos machos da raça Wistar (entre 250-350g de massa corporal) foram adquiridos no Centro de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e mantidos durante a execução da pesquisa no Biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada a uma temperatura de 22°C em um ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro com água e ração à vontade. Em cada animal foi realizado um defeito crítico na região parietal da calota craniana (5 mm de diâmetro) e cada animal foi aleatoriamente distribuído em 8 grupos experimentais com um total de 12 defeitos por grupo de tratamento (n = 12). Os grupos estudados foram: [1] coágulo, controle negativo; [2] autógeno, controle positivo; [3] matriz de beta-tricálcio fosfato (TCP) (Cerasorb®M, Curassan Ltda, Alemanha); [4] TCP mais 0,3 mg/ml de PDGF-BB (R&D Systems, Inc., USA); [5] matriz de cerâmica de hidroxiapatita (END) (Endobon®, Biomet 3i Ltda, Bélgica); [6] END associado ao PDGF-BB; [7] matriz de osso bovino mineralizada (BIO) (Bio-Oss®, Geistlich Pharma Group Ltda, Suíça) e [8] BIO acrescido de PDGF-BB.

2.2 *Procedimento cirúrgico*

Após 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (0,03 ml/100 g de peso corporal [pc] / intraperitoneal [ip]; Dopaser® Laboratórios Calier AS, Espanha) e ketamina (7 µl / kg pc / ip; Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Brasil) via intramuscular. Além disso, receberam uma infiltração de solução anestésica local contendo cloridrato de mepivacaína (0,3 ml / kg, Scandicaine

2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) para hemostasia do campo operatório. Em seguida foi realizada tricotomia e antissepsia da região da calota craniana, incisão e descolamento do retalho total para a realização dos defeitos ósseos de tamanho crítico, obtidos por meio da utilização de uma broca trefina de 5 mm de diâmetro (3i Implant Innovations, Inc., EUA). Cada defeito foi preenchido de acordo com o grupo a qual pertencia, de acordo como especificamente anteriormente e os tecidos moles devidamente reposicionados e suturados. No pós-operatório imediato, cada animal recebeu uma dose única de 24.000 UI de Penicilina G-Benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Brasil). Os animais foram sacrificados aos 15 e 30 dias pós-operatórios por meio de uma sobredosagem anestésica.

2.3 Processamento em parafina

As peças de interesse foram coletadas e fixadas em formol a 4%. Após três dias, foram colocadas em solução de EDTA a 18% para sofrerem o processo de descalcificação por aproximadamente seis semanas. Durante esta fase, as peças foram devidamente reduzidas, permanecendo apenas a região a ser analisada. Em seguida, foram desidratadas por uma sequência de álcoois e realizada a diafanização com xilol sendo incluídas em parafina posteriormente. Os blocos foram então cortados com um auxílio de micrótomo obtendo-se cortes com 5 µm de espessura e montados em lâminas. Algumas dessas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e o restante foram utilizadas para as reações de imunoistoquímica.

2.4 Análise histomorfométrica

As mensurações foram realizadas pela examinadora E. R. L. As lâminas coradas foram inspecionadas no microscópio óptico (Leica® DMLB, Suíça) e as áreas de interesse foram registradas por uma câmera de captação de imagem (Leica® DC 300F Microsystems Ltda., Suíça) acoplado ao microscópio e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas ImageLab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Canadá). A análise se restringiu ao espaço compreendido entre as duas bordas do defeito ósseo. De acordo com as imagens coloridas falsas desenhadas sobre a imagem do defeito (Adobe Photoshop, Adobe, EUA), o tecido ósseo e os substitutos ósseos foram medidos com o software apropriado, Image J (National Institutes of Health, EUA). A área de tecido ósseo neoformado por área total do defeito (AON / AT) e a área do substituto ósseo por área total do defeito (ASO / AT) foram calculados a partir das amostras histológicas.

2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de homocedasticidade, não apresentando distribuição normal, portanto foi realizado um modelo linear generalizado através do Proc Genmod do programa SAS University Edition. O nível de significância foi $p < 0,05$.

2.6 Análise imunoistoquímica

Para cada anticorpo utilizado, foi avaliada a expressão das proteínas semi-quantitativamente pela atribuição de escores de acordo com o número de células imunomarcadas na calota craniana. A imunoperoxidase foi o método de detecção utilizado. A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. As lâminas foram submetidas à fase de recuperação dos antígenos com o tampão de citrato fosfato (pH = 6,0). Os anticorpos primários foram utilizados contra runx-2, fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OP), osteocalcina (OC), colágeno tipo I (COL-1) e TRAP (Santa Cruz Biotecnologia, Brasil), que estão envolvidas nos processos de osteoindução, mineralização e reabsorção óssea. Utilizou-se o anticorpo secundário biotinilado produzido em cabra (Pierce Biotecnologia) e um kit amplificador Avidin e Biotin (Vector Laboratório). O cromógeno utilizado foi diaminobenzidina (Dako) e o fim da reação foi corado contra os cortes de coloração de hematoxilina de Harris. As análises foram realizadas utilizando um microscópio óptico (Leica® DLMB, Suíça). Os controles negativos foram realizados para avaliar a especificidade dos anticorpos.

3 RESULTADOS

3.1 Análise histológica

Grupo Coágulo

Aos 15 dias pós-operatórios, a fina camada de tecido ósseo neoformado ocupava parcialmente o defeito cirúrgico. Presença do tecido conjuntivo, mas sem diferenciação entre as células inflamatórias, com número discreto de fibroblastos, macrófagos e linfócitos.

Aos 30 dias, observou-se fina camada de tecido ósseo neoformado, ocupando toda a extensão do defeito. De um modo geral, evidenciavam-se neoformações ósseas próximas aos cotos do defeito cirúrgico, mas ainda com bastante tecido conjuntivo ao redor com predominância maior de fibroblastos em relação às células inflamatórias.

Grupo Autógeno

Aos 15 dias pós-operatórios, observou-se uma discreta presença de tecido ósseo neoformado próximo às bordas dos defeitos e circunscrevendo algumas partículas do enxerto autógeno. Apesar disso, não se notava a presença dos osteócitos o que caracteriza osso maduro.

Aos 30 dias pós-operatórios, notou-se maior quantidade de tecido ósseo neoformado presente em praticamente todo o defeito ósseo. Em geral, observou-se maior quantidade do osso utilizado como enxerto. Presença de tecido conjuntivo ainda em algumas áreas do defeito.

Grupo TCP e TCP + PDGF-BB

Em ambos, aos 15 dias pós-operatórios, a formação de osso foi observada principalmente nas bordas do defeito ósseo e entre os grânulos do biomaterial circundado por tecido conjuntivo, observado em algumas lâminas. Já aos 30 dias pós-operatórios, observou-se maturação óssea do tecido neoformado entre as partículas do biomaterial, além da presença do tecido ósseo neoformado nas extremidades do defeito (Fig. 1). A adição do PDGF-BB não demonstrou maior formação óssea em comparação ao grupo TCP sem o fator de crescimento.

Grupo END e END + PDGF-BB

Aos 15 dias pós-operatórios, observa-se pouca formação óssea, restringindo-se basicamente nas bordas do defeito óssea. Presença marcante de células inflamatórias, incluindo macrófagos e linfócitos circundando os grânulos do biomaterial. Com 30 dias pós-operatórios, notam-se pontes de formação óssea das bordas ao centro do defeito (Fig. 1). As mesmas características do grupo sozinho são observadas com a adição do PDGF-BB.

Grupo BIO e BIO + PDGF-BB

Aos 15 dias pós-operatórios, nota-se uma ligeira neoformação óssea seguindo o mesmo padrão proveniente do osso trabeculado existente nas bordas do defeito. Presença de tecido conjuntivo fibroso, com partículas do biomaterial por toda extensão do defeito.

Com 30 dias pós-operatórios, foram identificadas as partículas do biomaterial, com maior formação de tecido mineralizado se estendendo desde as bordas até o centro do defeito (Fig. 1). As características histológicas são as mesmas do grupo BIO com o fator de crescimento, comparado ao grupo BIO sozinho.

3.2 Análise histométrica

Com relação à formação de tecido ósseo, todos os grupos analisados, nos dois tempos pós-operatórios, apresentaram neoformação óssea.

Após 15 dias pós-operatórios, os grupos TCP e END apresentaram maior formação de tecido ósseo por área total do defeito (AON / AT). O grupo TCP sozinho obteve uma neoformação óssea maior quando comparamos o mesmo biomaterial adicionado com o fator de crescimento derivado de plaquetas, sendo também estatisticamente significativo aos grupos BIO+PDGF e END+PDGF ($p < 0,05$). O grupo BIO teve um desempenho um pouco melhor comparado ao grupo BIO+PDGF, mas sem diferir estatisticamente (Fig. 2). O grupo autógeno não diferiu de todos os demais grupos analisados.

No que tange à quantidade de biomaterial por área total do defeito (ASO / AT), o TCP+PDGF apresentou maior quantidade do biomaterial, estatisticamente significativo aos grupos BIO, BIO+PDGF, END e END+PDGF ($p < 0,05$), demonstrando que o fator de crescimento não estimulou a fagocitose do TCP. O biomaterial BIO+PDGF apresentou menor quantidade de biomaterial presente no defeito ósseo, inclusive diferindo dos demais grupos, exceto grupo coágulo que é desprovido de biomaterial (Fig. 3).

Aos 30 dias pós-operatórios, o grupo TCP apresentou maior quantidade de osso neoformado por área total (AON / AT), sendo estatisticamente significantes aos grupos autógeno, coágulo, BIO+PDGF, END, END+PDGF e ao próprio TCP com o fator de crescimento ($p < 0,05$) (Fig. 4). Em nenhum dos grupos de biomateriais analisados, o fator de crescimento estimulou o aumento da neoformação óssea. Já em relação à ASO / AT, o grupo TCP teve a maior quantidade de biomaterial não sendo estatisticamente significativo aos demais grupos ($p > 0,05$) (Fig. 5).

3.3 Análise imunoistoquímica

As avaliações imunoistoquímicas foram realizadas através de análise qualitativa ordinal, onde a partir da atribuição de escores (tabela 1), foi caracterizada a imunomarcção para diferentes proteínas que sinalizam o processo de formação e reabsorção óssea, bem como o fenótipo osteoblástico (Figs 6, 7, 8, 9, 10 e 11).

O grupo BIO mostrou aos 15 dias pós-operatórios, imunomarcção leve para ALP e moderada para OP, caracterizando etapa precoce para a mineralização do tecido ósseo. A proteína COL-1, que representa a principal proteína da matriz do tecido ósseo, apresentou-se de forma moderada. Já a RUNX-2 e a OC, proteínas que caracterizam o fenótipo osteoblástico, apresentaram-se com marcação moderada. A reabsorção óssea foi caracterizada pela marcação positiva para TRAP de forma leve.

Aos 30 dias, o grupo BIO apresentou escore moderado e intenso para ALP e OP, respectivamente, evidenciando que a atividade de mineralização manteve-se, de modo mais intenso. O COL-1 mostrou marcação leve, indicando pouca formação óssea em atividade. O fenótipo osteoblástico, marcado por RUNX-2 e OC mostrou-se de forma evidente, no entanto, a RUNX-2 foi moderadamente marcada e a OC marcada de forma intensa, como proteína que sinaliza a fase tardia da mineralização.

A associação BIO mais o fator de crescimento, aos 15 dias, mostrou escore intenso para ALP e moderado para OP. Já o COL-1, onde o cálcio irá precipitar para a formação de osso mostrou imunomarcção moderada. Com relação à RUNX-2 e OC, essas proteínas obtiveram escores leve e moderado, respectivamente e a proteína que sinaliza a atividade dos osteoclastos obteve marcação leve (TRAP), portanto, houve uma maior formação óssea. Aos 30 dias pós-operatórios, o BIO+PDGF-BB obtiveram

escore intenso para ALP, e leve para as proteínas OP, COL-1, RUNX-2 e OC, com atividade moderada da TRAP, sinalizando um turnover para reabsorção óssea.

Em se tratando do grupo TCP, inicialmente, observou-se imunomarcção moderada para ALP e intensa para OP, além do escore leve para o COL-1. Já com relação à RUNX-2 e OC, proteínas que representam o fenótipo osteoblástico, sendo uma etapa tardia do processo de formação óssea, houve uma marcação moderada com a TRAP obtendo uma imunomarcção leve. Com 30 dias, as proteínas ALP, OP, COL-1 e OC apresentaram escore intenso. A RUNX-2 e a TRAP obtiveram uma marcação moderada.

No grupo TCP+PDGF-BB, aos 15 dias, houve marcação moderada para ALP, COL-1 e TRAP. As proteínas que obtiveram uma imunomarcção mais intensa foram OP e RUNX-2. A OC mostrou escore leve. O turnover representado por OC versus TRAP demonstrou maior atividade de reabsorção óssea. Com 30 dias, este grupo apresentou marcação moderada para ALP, OP e TRAP; marcação leve para COL-1 e RUNX-2; e marcação intensa para OC, evidenciando maior formação de tecido ósseo.

Com 15 dias pós-operatórios, o grupo END apresentou imunomarcção moderada para ALP, COL-1, OC e RUNX-2, estas duas últimas representando o fenótipo osteoblástico; a OP e a TRAP apresentaram marcação leve. Aos 30 dias, este mesmo grupo mostrou marcação intensa para ALP e leve para OP, sinalizando o início de neoformação óssea. O COL-1 mostrou escore intenso, demonstrado pelas proteínas anteriores. OC e RUNX-2 obtiveram marcação moderada em contraposição à TRAP, que obteve marcação leve.

O biomaterial END+PDGF-BB, com 15 dias, apresentou marcação leve para ALP, COL-1 e RUNX-2 com OP mostrando escore leve. O turnover se mostrou

equilibrado, já que OC e TRAP obtiveram marcação leve. Com 30 dias, o turnover ósseo ainda se mostrou equilibrado, com a RUNX-2, proteína do fenótipo osteoblástico, obtendo um escore moderado.

O grupo controle positivo, autógeno, aos 15 dias pós-operatórios, apresentou escore moderado para ALP, OP, COL-1 e OC; escore intenso para RUNX-2 e leve para TRAP. Já aos 30 dias, mostrou marcação moderada para ALP, COL-1 e TRAP e intensa para OP, OC e RUNX-2. Portanto, nos dois tempos analisados, houve maior turnover para a neoformação óssea neste grupo.

Já no grupo controle negativo, coágulo, inicialmente os escores foram leve para COL-1, OP e TRAP; moderado para ALP e RUNX-2 e intenso para OC. Após 30 dias, a imunomarcação foi moderada para ALP, COL-1 e TRAP e intensa para OP, OC e RUNX-2.

4 DISCUSSÃO

Várias técnicas e biomateriais têm sido testados no intuito de fornecer condições para a instalação de implantes dentários em reconstruções ósseas, e para isso, modelos experimentais de estudo são largamente empregados para estudar suas aplicabilidades clínicas [19,20]. Neste estudo, avaliamos se o PDGB-BB exercia alguma influência no processo de neoformação óssea com diferentes tipos de carreadores. A partir dos nossos resultados, não notamos uma ação considerável na diferenciação osteoblástica e na formação de matriz de colágeno no processo de mineralização óssea.

Em resposta à proposição do nosso trabalho, os efeitos do PDGF-BB reportados na literatura, parecem ser mais significantes durante os períodos precoces da

cicatrização óssea, como em outros modelos animais [21-23] e em um estudo clínico [24], por isto, optamos em analisar este fator de crescimento em períodos tardios, para desvendar quais benefícios ocorrem nos períodos de tempo analisados. No que concerne à presença do biomaterial com o PDGF-BB, não houve diferença estatística entre os grupos, portanto, não existe correlação entre o fator de crescimento e os diferentes tipos de biomaterial, considerando composição química, cristalinidade, forma de apresentação e porosidade, variáveis que podem influenciar no desempenho biológico [25,26], apesar da maior quantidade por área total do TCP aos 30 dias pós-operatórios.

De um modo geral, com relação às análises histomorfométrica e imunoistoquímica, ambas em consonância, mostraram que houve um “start” inicial na cicatrização óssea com neoformação nas bordas do defeito, mas não se manteve até o final do processo como demonstrado pela dinâmica da marcação das proteínas. Nesse caso, é totalmente válido testar o PDGF-BB em várias situações de enxertia óssea e com outros biomateriais, ou até mesmo, variar as concentrações empregadas do fator de crescimento como realizado em um trabalho experimental [10], apesar de um grupo de estudo já ter observado a concentração ideal de 0,3 mg/ml a partir de alguns estudos [14,18,27].

Células osteoprogenitoras, fatores osteoindutores e arcabouços ósseos são os três elementos principais para o estudo da engenharia tecidual [10,28], empregados principalmente em defeitos críticos de calotas cranianas de ratos. O defeito de tamanho crítico [29,30], como utilizado neste trabalho, não permite a avaliação da cicatrização óssea sob condições fisiológicas / biomecânicas de carga, além da limitação na análise de quantidade de tecido disponível para histologia (por exemplo, genoma), especialmente durante os períodos precoces de cicatrização [19], além de que a integração das variáveis não pode ser cumprida em um único modelo sozinho [20].

Os autores acreditam que o modelo animal utilizado pode ter influenciado no desempenho do fator de crescimento. Uma sugestão para trabalhos futuros é avaliar o PDGF-BB em cirurgias de levantamento de seio maxilar de coelhos, uma vez que esses animais não são tão caros, são de fácil anestesia além de que a membrana do seio maxilar contém muitas glândulas serosas, sendo úteis na determinação da perfuração da membrana, caso ocorra. Isso porque o sítio perfurado na membrana regenerada possui tecido conectivo ao invés de glândulas serosas [31].

Neste estudo, avaliamos o PDGF-BB em tempos considerados tardios, avaliando quais eventos celulares poderiam acontecer, demonstrando que não houve uma resposta satisfatória em relação ao processo de neoformação óssea. Entretanto, não sabemos ainda se pode haver algum estímulo inicial no que tange à diferenciação mais intensa das células osteoblásticas ou se houve e não se manteve durante a cicatrização, sendo mais bem avaliado nos períodos iniciais, aos três e/ou sete dias, por exemplo.

Por meio do estudo imunoistoquímico realizado, independente do tempo pós-operatório, notamos que todos os grupos com o PDGF-BB tiveram uma boa sinalização para ALP, OP e OC, evidenciando que osteoblastos diferenciados sintetizam e secretam fosfatase alcalina e proteínas da matriz óssea como osteopontina e osteocalcina [32], o que nos leva a supor que o fator de crescimento apresenta alguma ação chave no estímulo e diferenciação osteoblástica corroborando com outros estudos [8,10].

O Bio-Oss® é um biomaterial constituído de osso bovino desproteinizado de baixa reabsorção, química e fisicamente idêntico ao osso humano [33], entretanto, assim como demonstrado que a proteína morfogenética óssea recombinante humana tipo 2 (rhBMP-2) possui um efeito negativo quando associado ao biomaterial Bio-Oss® [34],

no nosso trabalho, este biomaterial teve desempenho aquém do esperado aos 30 dias, quando acrescentado ao PDGB-BB, que é outro tipo de fator de crescimento.

Diferentemente do BIO, o TCP, um derivado da hidroxiapatita que é um componente inorgânico do osso [9], como publicado em outros estudos do nosso grupo de pesquisa [35,36], mais uma vez apresentou um desempenho relevante, nos dois tempos operatórios avaliados, inclusive tendo mais formação óssea que o BIO aos 30 dias. Além disso, o PDGF-BB parece não ter interferido nas características osteocondutoras do TCP, uma vez que este biomaterial ainda se apresentava com quantidade considerável na área regenerada, mantendo o volume do defeito [28], provavelmente devido à configuração tridimensional de suas macro e micropartículas que resultam em melhor osteocondução [9].

Apesar das vantagens do modelo animal empregado neste estudo como a padronização dos defeitos, fácil acesso cirúrgico, e suporte para implantação do biomaterial [19,20], este trabalho possui limitações, como qualquer outro, que podem ter influenciado na atuação do PDGB-BB. Os objetivos iniciais do estudo foram alcançados, mas é necessário ampliar o arsenal de pesquisa, no intuito de determinar o tamanho ideal da amostra e quais tipos de biomateriais a serem associados.

5 CONCLUSÃO

A associação dos biomateriais testados com o fator de crescimento PDGF-BB não contribuiu para uma maior neoformação óssea na metodologia empregada neste estudo. Como sugestão para trabalhos, a partir de outras metodologias, tentar desvendar os mecanismos osteoblásticos nas fases iniciais da cicatrização óssea e o seu desfecho

em longo prazo, para que a concentração adequada do PDGF-BB possa ser bem empregada com o arcabouço ósseo que mais o favorece.

REFERÊNCIAS

1. Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289:1501-4.
2. Yamaguchi A, Komori T, Suda T (2000) Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21:393-411.
3. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH (1986) Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev* 66:855-86.
4. Fiedler J, Etzel N, Brenner RE (2004) To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. *J Cell Biochem*. 93:990-8.
5. Triplett RG, Schow SR (1996) Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques. *J Oral Maxillofac Surg* 54:486-94.

6. Digiovanni CW, Petricek JM (2010) The evolution of rhPDGF-BB in musculoskeletal repair and its role in foot and ankle fusion surgery. *Foot Ankle Clin* 15:621-40.

7. Khojasteh A, Dashti SG, Dehghan MM, Behnia H, Abbasnia P, Morad G (2014) The osteoregenerative effects of platelet-derived growth factor BB cotransplanted with mesenchymal stem cells, loaded on freeze-dried mineral bone block: A pilot study in dog mandible. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 102:1771-8.

8. Choo T, Marino V, Bartold PM (2013) Effect of PDGF-BB and beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) on bone formation around dental implants: a pilot study in sheep. *Clin Oral Implants Res* 24:158-66.

9. Kurkcu M, Benlidayi ME, Cam B, Sertdemir Y (2012) Anorganic bovine-derived hydroxyapatite vs beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation: a comparative histomorphometric study. *J Oral Implantol* 38:519-26.

10. Xu L, Lv K, Zhang W, Zhang X, Jiang X, Zhang F (2012) The healing of critical-size calvarial bone defects in rat with rhPDGF-BB, BMSCs, and beta-TCP scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 23:1073-84.

11. Al-hezaimi K, Nevins M, Kim SW, Fateh A, Kim DM (2014) Efficacy of growth factor in promoting early osseointegration. *J Oral Implantol* 40:543-8.

12. Fujii H, Kitazawa R, Maeda S, Mizuno K, Kitazawa S (1999) Expression of platelet-derived growth factor proteins and their receptor alpha and beta mRNAs during fracture healing in the normal mouse. *Histochem Cell Biol* 112:131-8.
13. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L (1974) A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:1207-10.
14. Kaigler D, Avila G, Wisner-Lynch L, Nevins ML, Nevins M, Rasperini G et al (2011) Platelet-derived growth factor applications in periodontal and peri-implant bone regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 11:375-85.
15. Marzouk KM, Gamal AY, Al-Awady AA, Sharawy MM (2008) Platelet-derived growth factor BB treated osteoprogenitors inhibit bone regeneration. *J Oral Implantol* 34:242-7.
16. Heldin CH, Westermark B (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79:1283-316.
17. Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S, Friedlaender GE (2008) Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 90:48-54.

18. Nevins M, Kao RT, McGuire MK, McClain PK, Hinrichs JE et al (2013) Platelet-derived growth factor promotes periodontal regeneration in localized osseous defects: 36-month extension results from a randomized, controlled, double-masked clinical trial. *J Periodontol* 84:456-64.
19. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N (2014) A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res* 25:879-93.
20. Gomes PS, Fernandes MH (2011) Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim* 45:14-24.
21. Nociti Junior FH, Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Toledo S, Sallum AW (2000) Histometric evaluation of bone regeneration around immediate implants partially in contact with bone: a pilot study in dogs. *Implant Dent* 9:321-8.
22. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC (1991) Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol* 62:710-6.
23. Becker W, Becker BE, Handelsman M, Ochsenein C, Albrektsson T (1991) Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets: a study in dogs. *J Periodontol* 62:703-9.

24. Sarment DP, Cooke JW, Miller SE, Jin Q, McGuire MK, Kao RT et al (2006) Effect of rhPDGF-BB on bone turnover during periodontal repair. *J Clin Periodontol* 33:135-40.

25. Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U (2009) The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J* 28:396-400.

26. Mayfield LJ, Skoglund A, Hising P, Lang NP, Attström R (2001) Evaluation following functional loading of titanium fixtures placed in ridges augmented by deproteinized bone mineral. A human case study. *Clin Oral Implants Res* 12:508-14.

27. Nevins M, Nevins ML, Schupbach P, Kim SW, Lin Z, Kim DM (2013) A prospective, randomized controlled preclinical trial to evaluate different formulations of biphasic calcium phosphate in combination with a hydroxyapatite collagen membrane to reconstruct deficient alveolar ridges. *J Oral Implantol* 39:133-9.

28. Broggini N, Bosshardt DD, Jensen SS, Bornstein MM, Wang CC, Buser D (2014) Bone healing around nanocrystalline hydroxyapatite, deproteinized bovine bone mineral, biphasic calcium phosphate, and autogenous bone in mandibular bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 29:1-10.

29. Stetzer K, Cooper G, Gassner R, Kapucu R, Mundell R, Mooney MP (2002) Effects of fixation type and guided tissue regeneration on maxillary osteotomy healing in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 60:427-36.

30. Mundell RD, Mooney MP, Siegel MI, Losken A (1993) Osseous guided tissue regeneration using a collagen barrier membrane. *J Oral Maxillofac Surg* 51:1004-12.
31. Wada K, Niimi A, Watanabe K, Sawai T, Ueda M (2001) Maxillary sinus floor augmentation in rabbits: a comparative histologic-histomorphometric study between rhBMP-2 and autogenous bone. *Int J Periodontics Restorative Dent* 21:252-63.
32. Knabe C, Koch C, Rack A, Stiller M (2008) Effect of beta-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials* 29:2249-58.
33. Chaves MD, de Souza Nunes LS, de Oliveira RV, Holgado LA, Filho HN, Matsumoto MA, Ribeiro DA (2012) Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss®) induces osteocalcin, RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits. *J Craniomaxillofac Surg* 40:e315-e320.
34. Kao DW, Kubota A, Nevins M, Fiorellini JP (2012) The negative effect of combining rhBMP-2 and Bio-Oss on bone formation for maxillary sinus augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 32:61-7.
35. Luvizuto ER, Queiroz TP, Margonar R, Panzarini SR, Hochuli-Vieira E, Okamoto T, Okamoto R (2012) Osteoconductive properties of beta-tricalcium phosphate matrix,

polylactic and polyglycolic acid gel, and calcium phosphate cement in bone defects. J Craniofac Surg 23:e430-3.

36. Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R (2011) The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of beta-tricalcium phosphate in rat calvaria defects. Biomaterials 32:3855-61.

Tabela 1 – Escores assinalados de forma semi-quantitativa, apresentando uma variação de “-“ para nenhuma marcação, e “+”, “++” e “+++” para menos, moderada e intensa marcação, respectivamente.

	ALP	COL-1	OP	OC	RUNX-2	TRAP
15 dias						
BIO	+	++	++	+	+	+
BIO+PDGF	+++	++	++	++	+	+
TCP	++	+	+++	++	++	+
TCP+PDGF	++	++	+++	+	+++	++
END	++	++	+	++	++	+
END+PDGF	++	++	+	+	++	+
AUT	++	++	++	++	+++	+
COA	++	+	+	+++	++	+
30 dias						
BIO	++	+	+++	+++	++	++
BIO+PDGF	+++	+	+	+	+	++
TCP	+++	+++	+++	+++	++	++
TCP+PDGF	++	+	++	+++	+	++
END	+++	+++	+	++	++	+
END+PDGF	+++	++	++	+	++	+
AUT	++	++	+++	+++	+++	++
COA	++	++	+++	+++	+++	++

Abreviações: ALP, fosfatase alcalina; COL-1, colágeno tipo I; OP, osteopontina; RUNX-2, fator de transcrição; TRAP, fosfatase ácida tartarato resistente; BIO, osso bovino desmineralizado; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; TCP, beta tricálcio fosfato; END, hidroxiapatita.

Figuras:

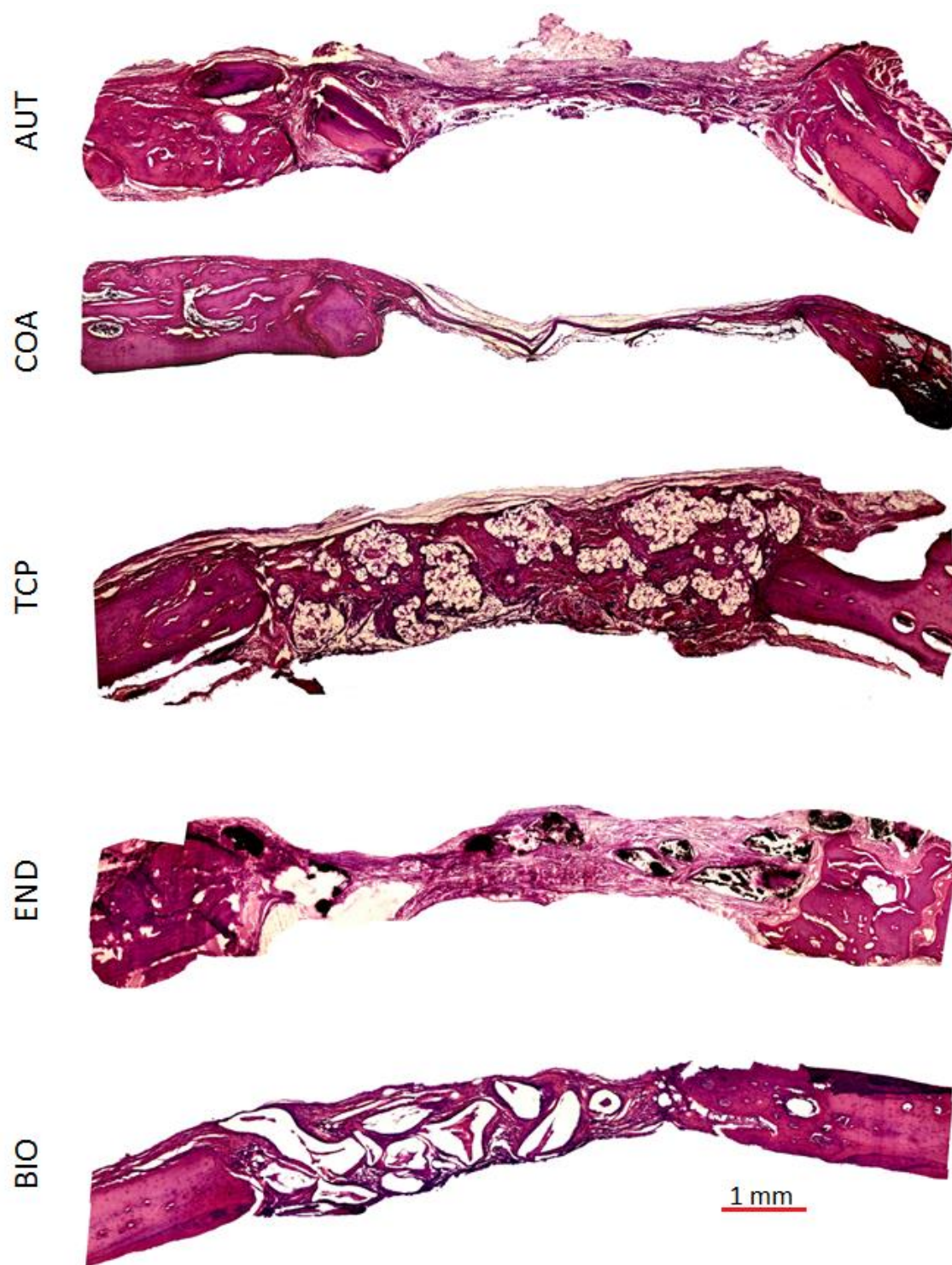


Fig. 1 Imagens histológicas dos defeitos de calotas cranianas de ratos tratados com AUT, COA, TCP, END, BIO aos 30 dias pós-operatórios. (coloração de HE, e magnificação de 125x).

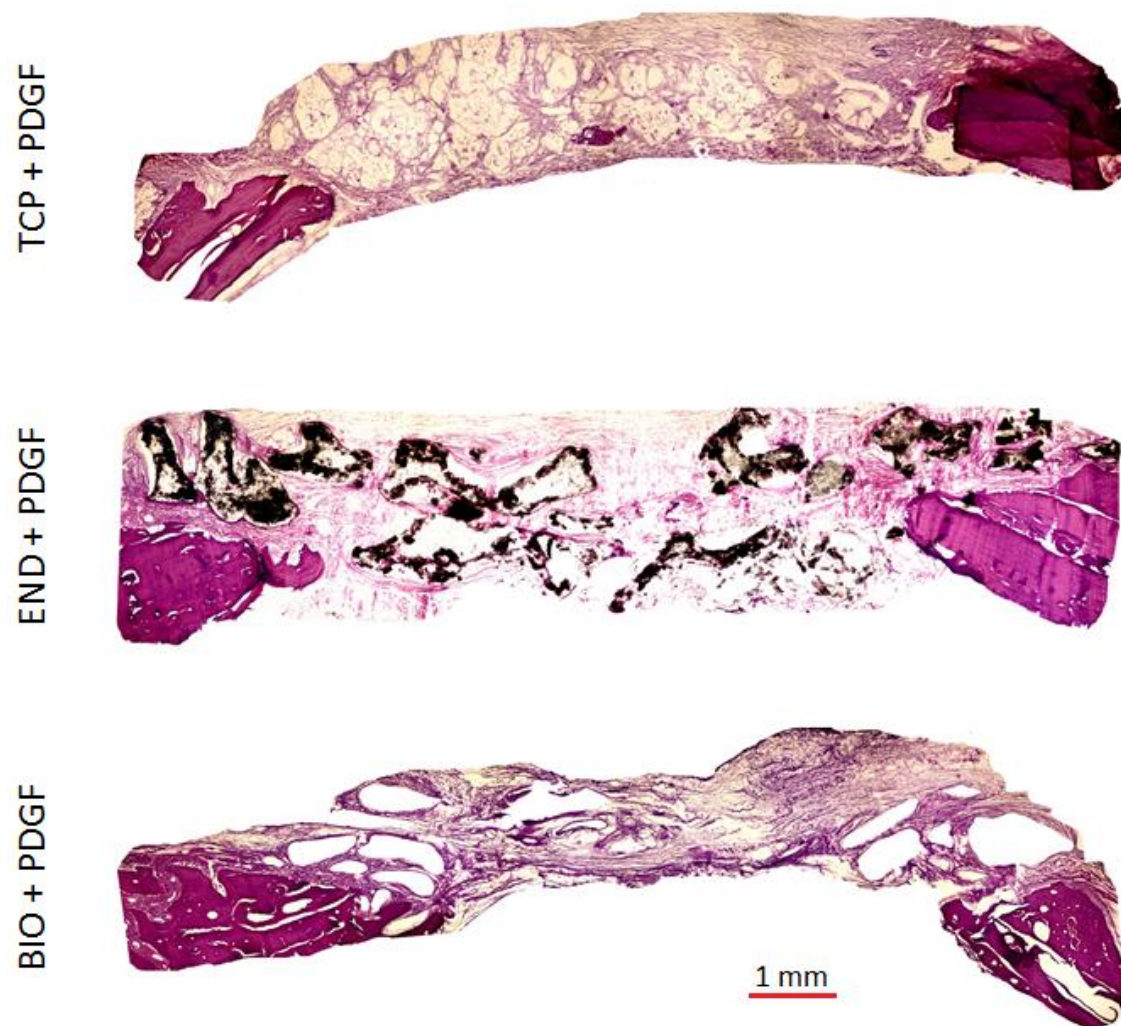


Fig. 2 Imagens histológicas dos defeitos de calotas cranianas de ratos tratados com TCP + PDGF, END + PDGF, BIO + PDGF aos 30 dias pós-operatórios, em que observamos que a adição do fator de crescimento não proporcionou aumento da formação óssea com os biomateriais testados comparado com a figura anterior. (coloração de HE, e magnificação de 125x).

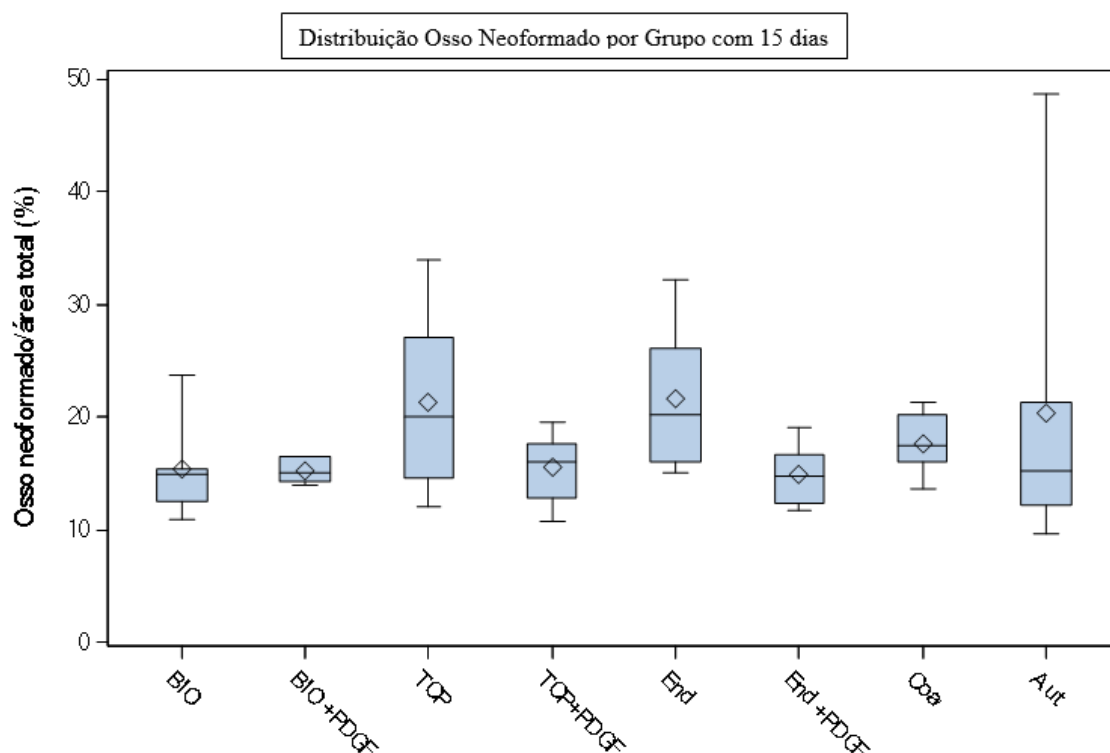


Fig. 3 Gráfico da área de osso neoformado por área total do defeito (AON / AT) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 15 dias pós-operatórios. Análise estatística indicou significância estatística de 5% entre BIO e END ($p < 0,039$); BIO+PDGF e TCP ($p < 0,007$); BIO+PDGF e COA ($p < 0,019$); BIO+PDGF e END ($p < 0,0004$); TCP e TCP+PDGF ($p < 0,035$); TCP e END+PDGF ($p < 0,014$); TCP+PDGF e END ($p < 0,010$); END e END+PDGF ($p < 0,002$). Modelo linear generalizado.

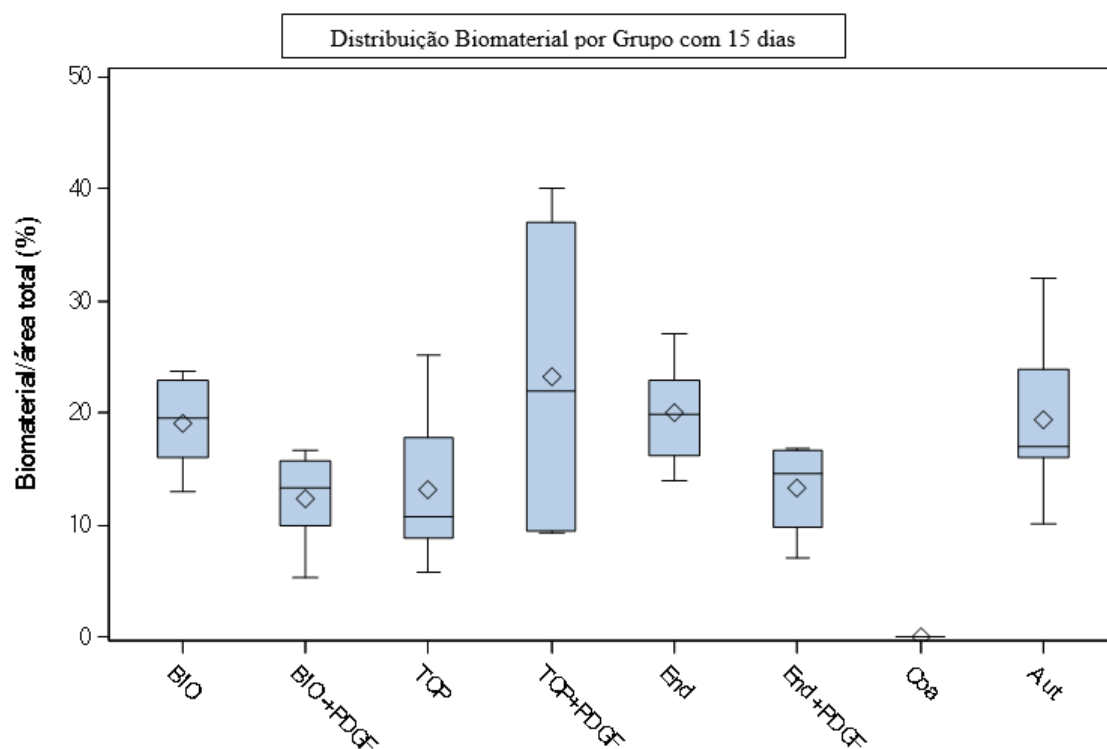


Fig. 4 Gráfico da área de biomaterial por área total do defeito (ASO / AT) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 15 dias pós-operatórios. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$). Modelo linear generalizado.

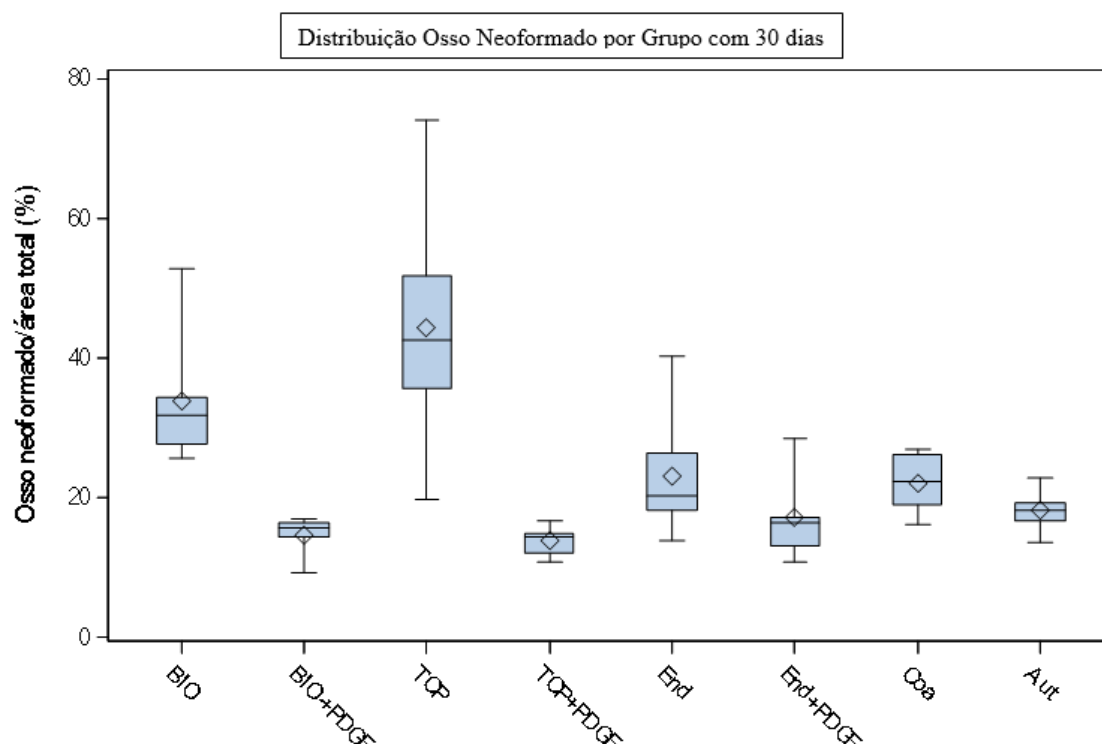


Fig. 5 Gráfico da área de osso neoformado por área total do defeito (AON / AT) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 30 dias pós-operatórios. Análise estatística indicou significância estatística de 5% entre AUT e BIO ($p < 0,0001$); AUT e BIO+PDGF ($p < 0,0033$); AUT e TCP ($p < 0,0001$); AUT e TCP+PDGF ($p < 0,0012$); AUT e COA ($p < 0,0307$); BIO e BIO+PDGF ($p < 0,0001$); BIO e TCP+PDGF ($p < 0,0001$); BIO e COA ($p < 0,0004$); BIO e END+PDGF ($p < 0,0005$); BIO+PDGF e TCP ($p < 0,0001$); BIO+PDGF e COA ($p < 0,0001$); BIO+PDGF e END ($p < 0,0021$); TCP e TCP+PDGF ($p < 0,0001$); TCP e COA ($p < 0,0001$); TCP e END ($p < 0,0048$); TCP e END+PDGF ($p < 0,0001$); TCP+PDGF e COA ($p < 0,0001$); TCP+PDGF e END ($p < 0,0001$). Modelo linear generalizado.

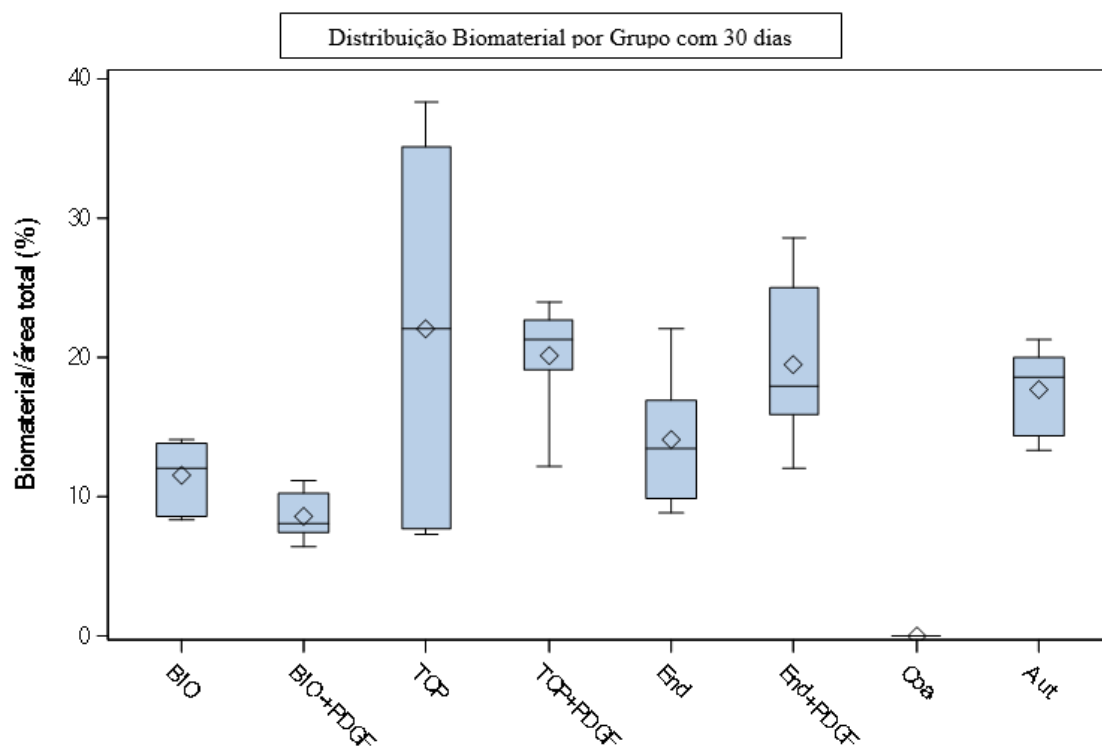


Fig. 6 Gráfico da área de biomaterial por área total do defeito (ASO / AT) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 15 dias pós-operatórios. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$). Modelo linear generalizado.

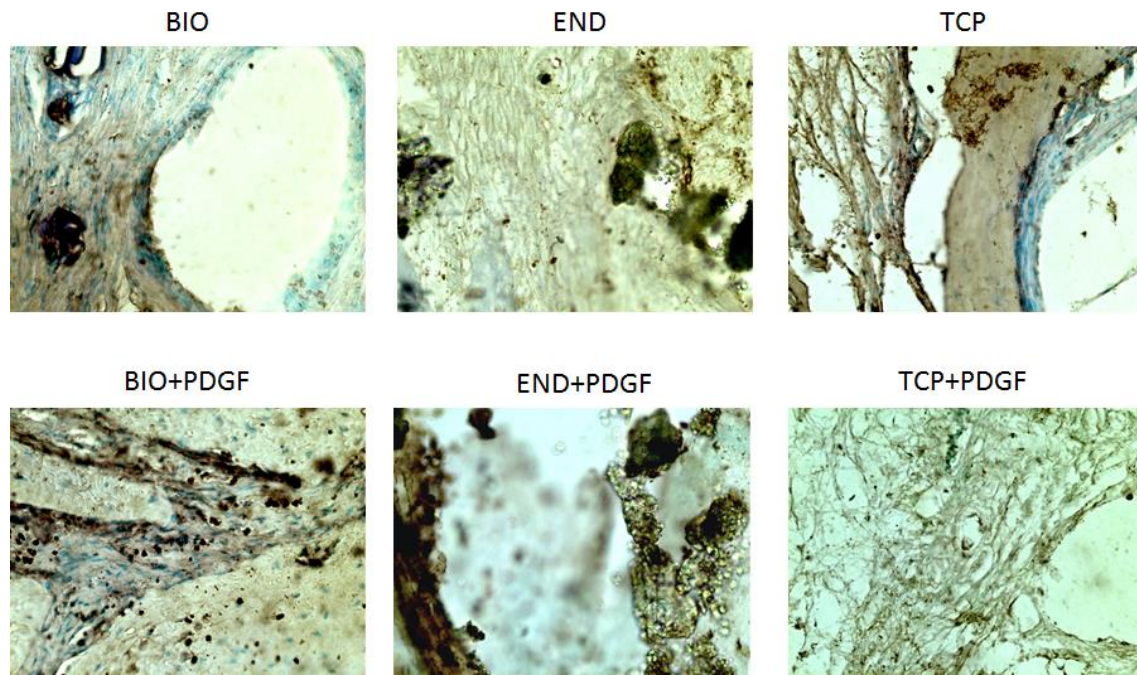


Fig. 7 Análise imunoistoquímica da fosfatase alcalina (ALP) do BIO, END e TCP sozinhos e associados ao PDGF aos 30 dias pós-operatórios. (magnificação de 400x).

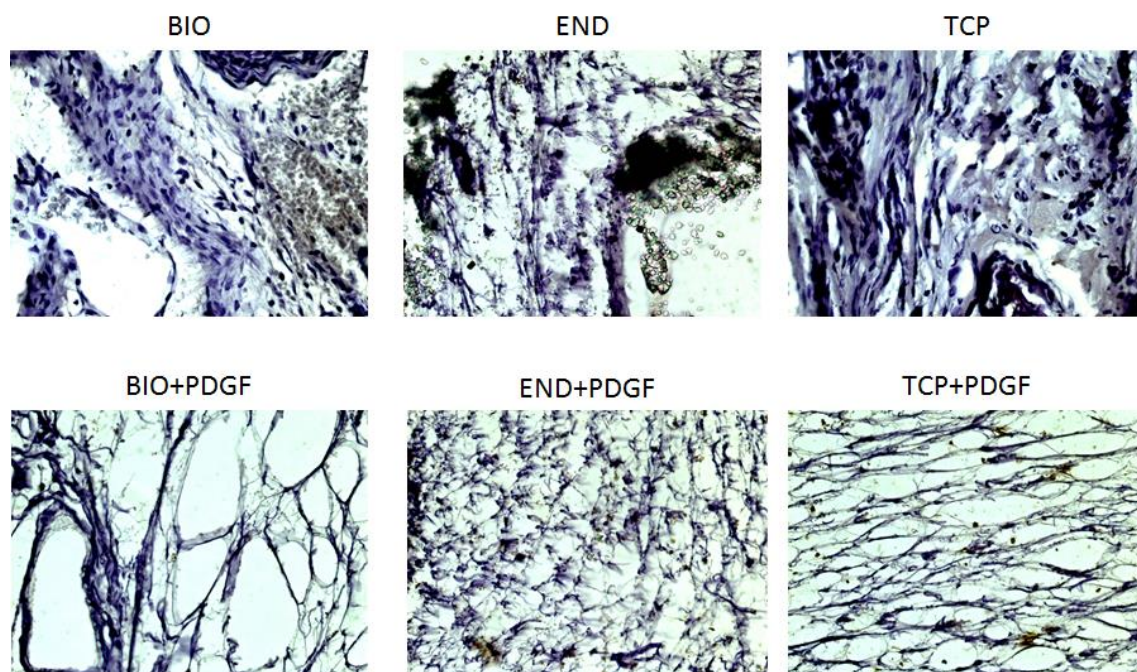


Fig. 8 Análise imunoistoquímica da osteopontina (OP) do BIO, END e TCP sozinhos e associados ao PDGF aos 30 dias pós-operatórios. (magnificação de 400x).

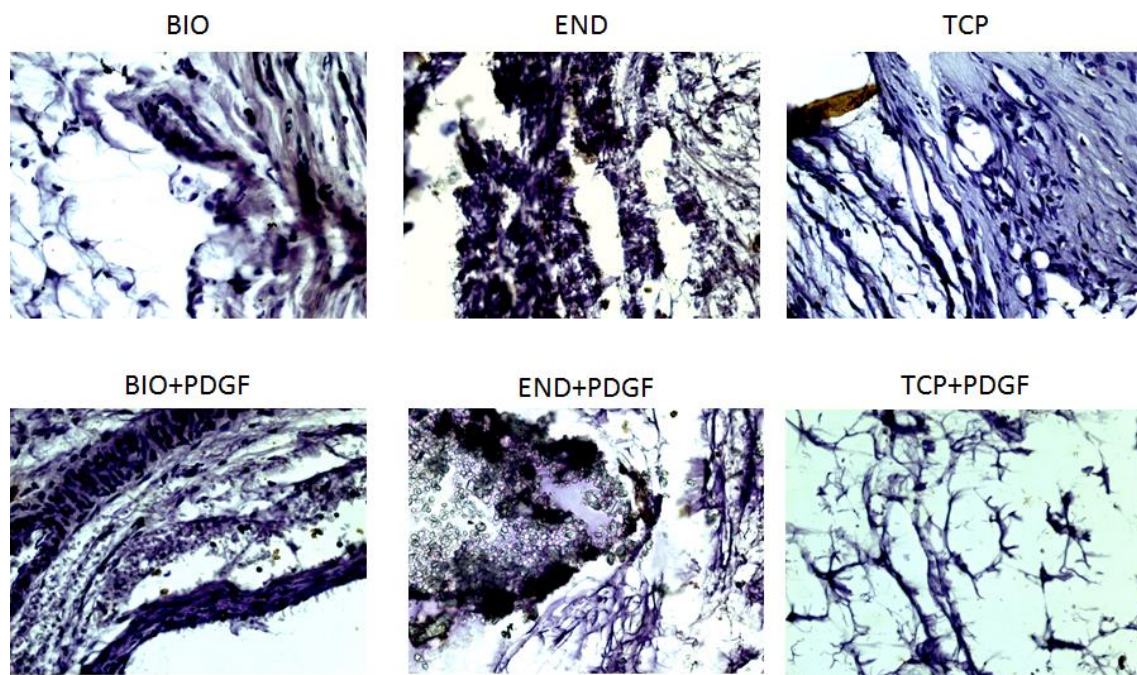


Fig. 9 Análise imunoistoquímica do colágeno tipo I (COL-1) do BIO, END e TCP sozinhos e associados ao PDGF aos 30 dias pós-operatórios. (magnificação de 400x).

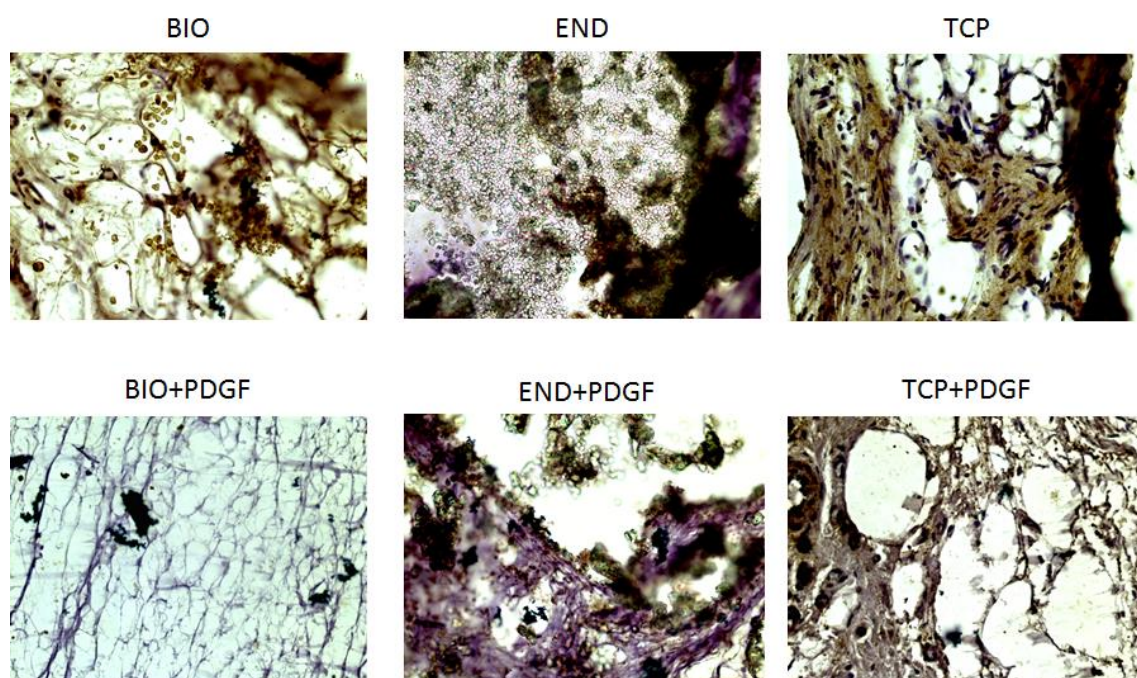


Fig. 10 Análise imunoistoquímica da osteocalcina (OC) do BIO, END e TCP sozinhos e associados ao PDGF aos 30 dias pós-operatórios. (magnificação de 400x).

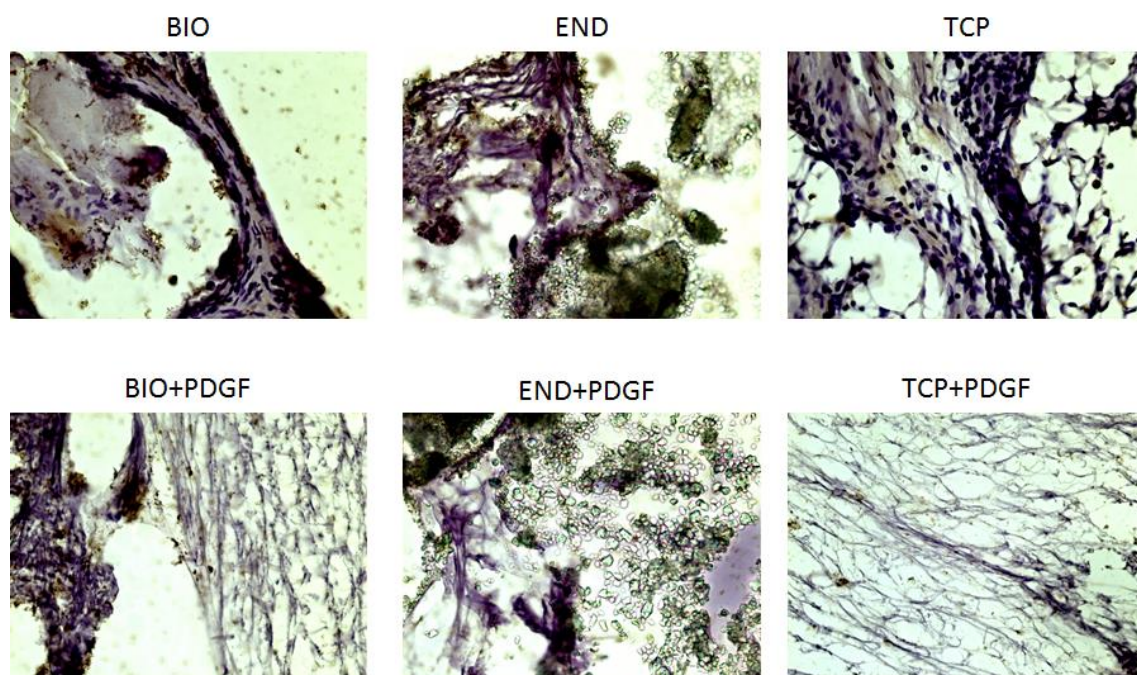


Fig. 11 Análise imunoistoquímica da RUNX-2 do BIO, END e TCP sozinhos e associados ao PDGF aos 30 dias pós-operatórios. (magnificação de 400x).

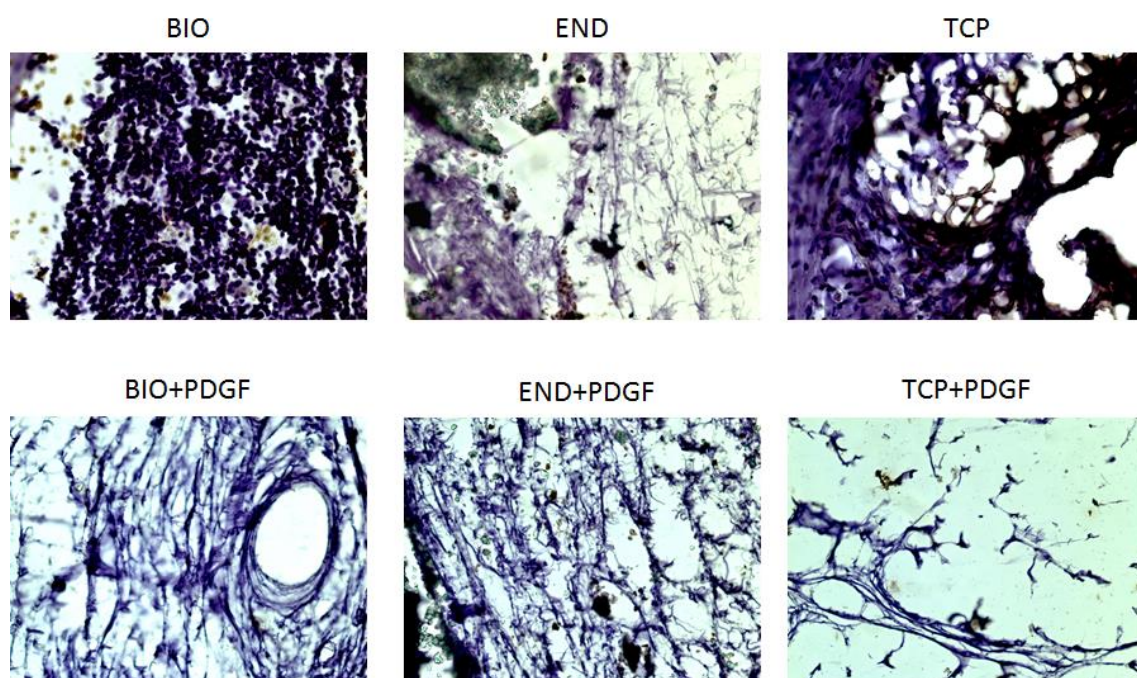


Fig. 12 Análise imunoistoquímica da TRAP do BIO, END e TCP sozinhos e associados ao PDGF aos 30 dias pós-operatórios. (magnificação de 400x).

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEa).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba

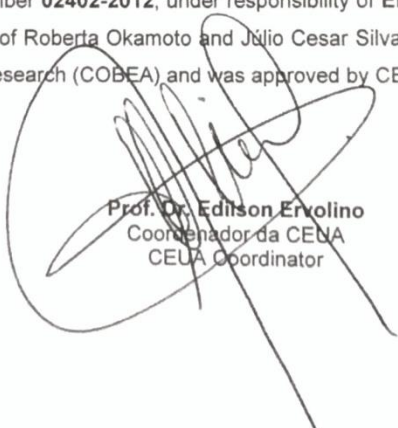
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto *"Avaliação do efeito osteoindutivo do PDGF-BB associado a diferentes carreadores na regeneração óssea em cavidades cirurgicamente criadas"* sob responsabilidade da Pesquisadora ELOÁ RODRIGUES LUVIZUTO e colaboração de Roberta Okamoto e Júlio Cesar Silva de Oliveira está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **02402-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research *"Evaluation of the osteoinductive effect of PDGF-BB associated with different carriers for bone regeneration in surgical created defects"*, process number **02402-2012**, under responsibility of ELOÁ RODRIGUES LUVIZUTO and with collaboration of Roberta Okamoto and Júlio Cesar Silva de Oliveira agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO B – Normas da revista selecionada para a publicação do artigo.



Instructions for Authors

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Objectives (stating the main purposes and research question)
- Materials and Methods
- Results
- Conclusions
- Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- ✦ Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- ✦ Use italics for emphasis.
- ✦ Use the automatic page numbering function to number the pages.
- ✦ Do not use field functions.
- ✦ Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- ✦ Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- ✦ Use the equation editor or MathType for equations.
- ✦ Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

» LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

✦ Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

⌘ Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

⌘ Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

⌘ Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230–257

⌘ Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

⌘ Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

🔗 [ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

» EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

- ⌘ All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- ⌘ Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ⌘ For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- ⌘ Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- ⌘ Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- ⌘ Supply all figures electronically.
- ⌘ Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- ⌘ For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- ⌘ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- ⌘ Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

ANEXO C – Ilustrações da fase cirúrgica.



Fig.1: Tricotomia da região da calota craniana

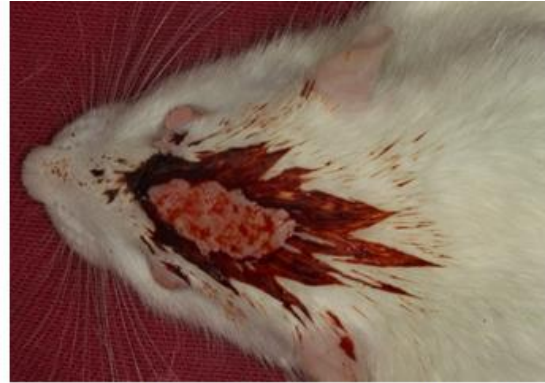


Fig.2: Antissepsia da região da calota craniana

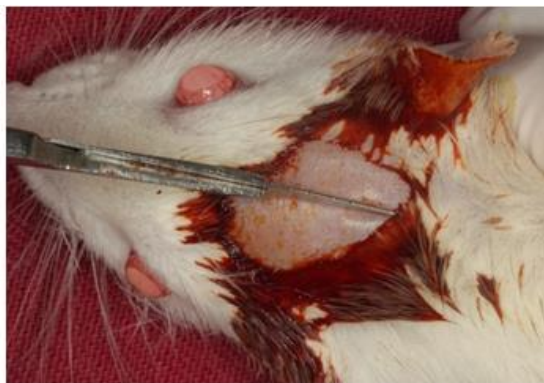


Fig.3: Lâmina de bisturi posicionada para realização da incisão

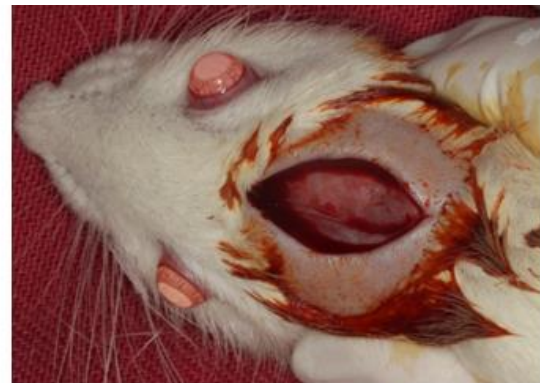


Fig.4: Incisão realizada



Fig.5: Descolamento do retalho para exposição de toda a região da calota craniana



Fig.6: Defeito ósseo realizado

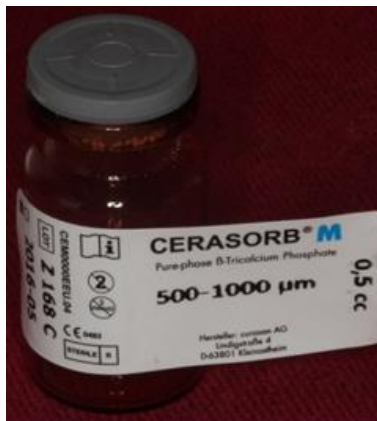


Fig.7: Frasco de Cerasorb®M

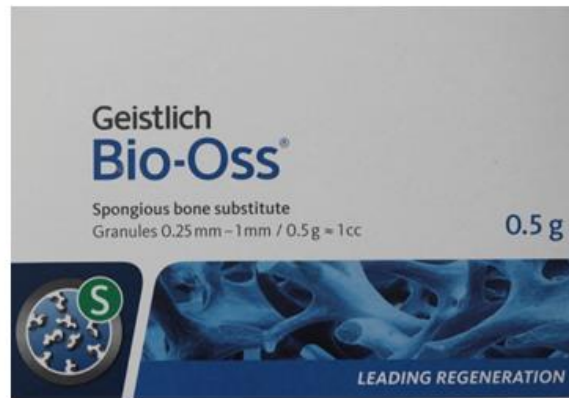


Fig.8: Embalagem do Bio-Oss®



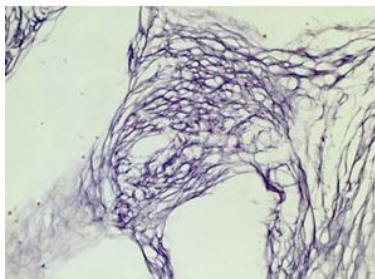
Fig.9: Consistência do Endobon®



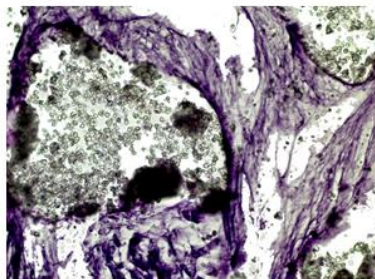
Fig.10: Embalagem do fator de crescimento derivado de plaquetas

ANEXO D – Suplemento de imagens da análise histológica - coloração HE (400x).

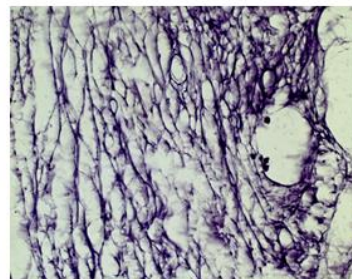
BIO 15 dias



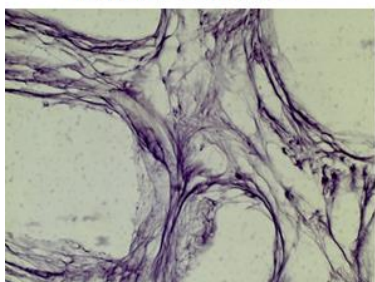
END 15 dias



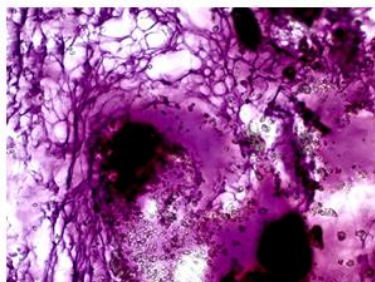
TCP 15 dias



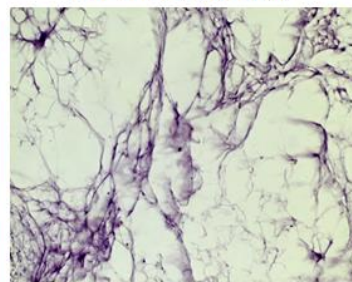
BIO+PDGF 15 dias



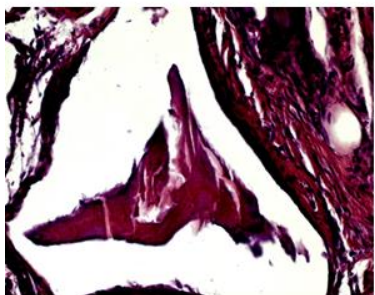
END+PDGF 15 dias



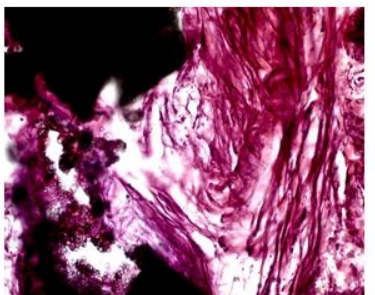
TCP+PDGF 15 dias



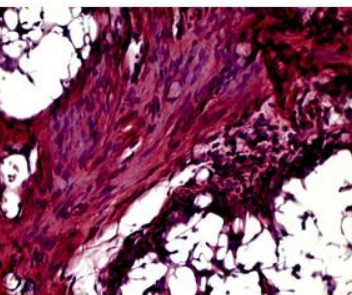
BIO 30 dias



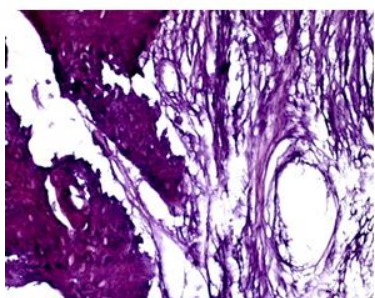
END 30 dias



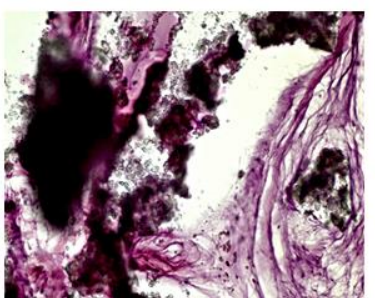
TCP 30 dias



BIO+PDGF 30 dias



END+PDGF 30 dias



TCP+PDGF 30 dias

