

Marcos Heidy Guskuma

**REPARAÇÃO ÓSSEA DE CAVIDADES
CIRURGICAMENTE CRIADAS E PREENCHIDAS COM
UMA ASSOCIAÇÃO DE VIDRO BIOATIVO E OSSO
AUTÓGENO: ANÁLISE HISTOMÉTRICA E
IMUNOISTOQUÍMICA.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da 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. Eduardo Hochuli Vieira

Araçatuba

2007

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G982r Guskuma, Marcos Heidy
Reparação óssea de cavidades cirurgicamente criadas e preenchidas com uma associação de vidro bioativo e osso autógeno : análise histométrica e imunoistoquímica / Marcos Heidy Guskuma - Araçatuba : [s.n.], 2007
84 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2007
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

1. Transplante ósseo 2. Materiais biocompatíveis 3. Imunoistoquímica

Black D7
CDD 617.64

Dados Curriculares

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

Dedicatória

À Minha Família

Ao meu pai, Mário

Meu pai, meu ídolo. Ele é daqueles que consegue ensinar sem dizer uma só palavra.

Através de gestos e atitudes e com muita paciência e respeito, ensinou-me e aos meus irmãos, o que é verdadeiramente ser homem, ser pai, ser marido, ser amigo. Obrigado meu pai, pela sua total dedicação a nós.

À Minha mãe, Júlia

Minha mãe é um exemplo de mãe e de mulher, que forma um par perfeito com meu pai. Com o seu amor imensurável e muita sabedoria, mostrou-nos os verdadeiros valores da vida. Com muito trabalho e muito sacrifício, sempre teve como prioridade em sua vida a nossa educação, intelectual e moral. Dedico este trabalho e esta conquista especialmente para você. Te amo demais mãe!

Aos meus irmãos, Karen e Júlio

Irmãos tão maravilhosos como os meus não é fácil de encontrar não... Sempre torcendo, cuidando, incentivando, ensinando, aconselhando... São frutos da educação e do amor de meus pais. Cada dia agradeço a Deus por tê-los ao meu lado! Obrigado por tudo.

À minha avó, a Batian

Esta é aquela mulher de fibra. O trabalho duro nunca a intimidou. Apesar de todas as dificuldades que enfrentou durante a vida, conseguiu formar essa família maravilhosa que tenho, refletida em todos os meus tios e tias, primos e primas. Dessa forma, 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.

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 Irmãos, que muitas vezes têm fome e sede do pão e do amor.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, **Professor Dr. Eduardo Hochuli Vieira**, pelos ensinamentos, pela atenção e pela orientação sempre segura. Agradeço de coração por me ajudar a concluir esta etapa muito importante da minha vida. Foi muito bom tê-lo como orientador.

Ao meu co-orientador, **Professor Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior**, que sempre se mostrou o Professor por excelência. Sempre calmo, respeitoso e disposto a ensinar não só teorias e técnicas, mas também o respeito para com os pacientes. Obrigado pelos valiosos ensinamentos.

À minha co-orientadora, **Professora Dra. Roberta Okamoto**, que não poupou esforços para que este trabalho pudesse ser concluído. Sempre disposta a ajudar, com paciência, calma e muita competência. Muito obrigado!

Ao **Professor Dr. Osvaldo Magro Filho**, que com sua alegria contagiante consegue levantar o astral por onde passa. Obrigado Dinho, por todas as oportunidades de aprendizado e de convivência e pela confiança em meu trabalho.

Ao **Professor Dr. Tetuo Okamoto**, pela ajuda competente, experiente, carinhosa e inestimável para a conclusão da pesquisa. O senhor será para nós sempre um grande exemplo de homem e de profissional.

Ao grande amigo e mestre **Marcos Kuabara**, pela confiança, pelas oportunidades, pelo estímulo, pelos grandes aprendizados que tive com você e por ser o mentor e orientador profissional, sempre respeitoso e competente. Espero um dia poder retribuir toda a sua ajuda. Obrigado!

À **Nathália Menezes Módena e a toda sua família**, pelo acolhimento, carinho, amor, compreensão e pela ajuda inestimável durante toda a realização da pesquisa.

À amiga **Natasha Magro-Érnica**, pessoa especial, alegre, profissional competente. Obrigado por ter aceitado prontamente o convite para ser banca em minha defesa de mestrado.

Aos Professores **Dr. Michel Saad Neto, Dra. Cristiane Mara Ruiz de Sousa Fattah e Dra. Alessandra Marcondes Aranega**, sempre dispostos a ajudar. Obrigado pela companhia agradável em todos os momentos.

Aos grandes amigos de república, **Michel Reis Messora e Luiz Gustavo Nascimento de Melo**, que desde o início me acolheram com muito carinho e respeito. Obrigado pela importante ajuda durante as pesquisas. Os momentos de alegria e descontração que passamos juntos ficarão para sempre guardados no coração!

Ao primo **Fabiano Uehara Guskuma**, que agora é também o novo companheiro de república e calouro da graduação. Obrigado por tudo e muito sucesso em sua caminhada profissional.

À minha amiga-irmã **Flávia Priscila Pereira**, que durante todo esse tempo de convivência na Pós-Graduação me ajudou demais na realização deste trabalho. Nos momentos de aperto, sempre estava por perto para ajudar, com muita seriedade, dedicação e trabalho. Você foi essencial para a conclusão deste trabalho. Obrigado de coração!

Ao grande companheiro de todos os plantões, **Albanir Gabriel Borrasca**, que se tornou um grande irmão durante todo esse tempo de pós-graduação. Toda a alegria e descontração que vivemos nessa fase de muito trabalho e estudo, vão ficar eternizados.

À **Nica e à Andréa**, pessoas especiais que cuidaram de nós, em nossa república, durante a jornada longe de nossas famílias. Pessoas em quem pudemos confiar de olhos fechados todo esse tempo e que, com todo carinho nos proporcionaram o ambiente necessário para as nossas atividades. Deus esteja sempre com vocês.

Aos **amigos do curso de Doutorado em Cirurgia**: André Dotto Sottovia, Carolina Chianteli Cláudio Coutinho, Eleonor Álvaro Garbin, Francisley Ávila Souza, Jéssica Lemos Gulinelli, Leandro de Carvalho Cardoso, Paulo Almeida Júnior, Paulo Domingos Ribeiro Júnior, Paulo Esteves Faria, Liliane Sheidegger da Silva Zanetti, Natasha Magro Érnica, Thais da Silveira Rodrigues, Thallita Pereira Queiroz e Walter Betoni Júnior pelos ensinamentos e inesquecíveis momentos de convivência.

Aos **amigos do curso de Mestrado em Cirurgia**: Abrahão Cavalcante, Albanir Gabriel Borrasca, Camila Benez Ricieri, Flávia Priscila Pereira, Rodolpho Valentini Neto. Os aprendizados foram grandes, carinho e a alegria foram enormes, mas a bonita amizade que se solidificou não tem medida nem palavras para expressar.

Aos **amigos da pós-graduação em Odontologia**: Adriana, Amílcar, Ana Kelly, Carlos, Cláudia Letícia, Bruna, Daniela, Edmar, Eloá, Érica, Érika, Flávia, Francisco (Quico), Geraldo, Leila, Lithiene, Márcia, Pedro, Rosse, Sheila, Thiago, Valentin pela agradável convivência e momentos compartilhados.

À secretária do Departamento de Cirurgia, nossa mãe de Araçatuba, **Cleide Lemes da Silva**, sempre com muita classe, calma e paciência, resolvendo os nossos problemas. Obrigado a você e a sua família pelos momentos inesquecíveis.

Aos **funcionários do Laboratório de Cirurgia**, que se tornaram grandes amigos:

Bernadete Maria Nunes Kimura, Maria Dirce Colli Boatto e Gilmar Martins de Oliveira pela ajuda em diversas etapas da dissertação, pelo carinho, paciência, compreensão e agradáveis momentos compartilhados.

Aos **amigos e estagiários da Disciplina de Cirurgia**, *Heloísa, Jonatas, Pedro, Ellen, Léo, Angélica, Pâmela, Renan, Rogério, Luis*, pelo carinho, respeito e agradável convivência.

Aos alunos do curso de Graduação e estagiários da Cirurgia **Thalyta Ribeiro Neves da Cruz (Thalytinha)** e **Alexandre Freire**, que sempre com muita dedicação e competência, me ajudaram na fase laboratorial da pesquisa.

Aos **alunos do Curso de Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela oportunidade da convivência que me trouxeram alegrias, aprendizado e novas amizades.

Aos **Docentes da Disciplina de Clínica Integrada**: Professores (as) Doutores (as) Celso, Daniela, Denise, José Carlos, Poi e Sônia Regina pelo carinho e atenção constantes.

A toda a **Equipe de Londrina**, Cátia Pires de Oliveira, Daniel Ito, Eliane Hashimoto, Elizabeth Imagawa, Emília Kobayashi, Fabiana Kay, Henrique Sato, Norma Nabut, Renata Brinholli, Sidnei Shimomura, Sueli Sumiyassu, Vitório Albieri Neto, sempre dando o suporte necessário para a minha formação científica e profissional. Obrigado pelo carinho.

Ao **Professor Dr. Anselmo Colombo de Alencar** pela ajuda no desenvolvimento do biomaterial, sempre nos ensinando e estimulando nas pesquisas.

Aos **funcionários da Biblioteca**: Cláudio, Fernando, Ivone, Izamar, Júnior, Luzia, Ana Paula, Maria Cláudia pela disponibilidade e carinho.

Aos **funcionários da Pós-graduação**: Diogo, Marina e Valéria, pela paciência, disponibilidade, alegria e admirável interesse em nos ajudar sempre.

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. **Reparação óssea de cavidades cirurgicamente criadas e preenchidas com uma associação de vidro bioativo e osso autógeno: análise histométrica e imunoistoquímica.** Araçatuba, 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.

OBJETIVOS: A proposta deste estudo foi avaliar a expressão das proteínas que participam do processo de reparo ósseo, nas fases de revascularização (VEGF), osteoindução (BMP2 e CBFA1) e mineralização (OCN), quando da utilização de uma associação do vidro bioativo e osso autógeno em proporção de 1:1 em defeitos criados em calvária de ratos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Para o presente estudo foram utilizados 40 ratos adultos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) que receberam dois defeitos ósseos de 5 mm cada, em calvária. Os defeitos ósseos constituíram quatro grupos experimentais (n=10): Grupo CONT (reparação apenas com o próprio coágulo); Grupo ENX (defeitos preenchidos com OA removido do defeito contralateral); Grupo ENX VB (defeitos preenchidos com uma associação de vidro bioativo e osso autógeno 1:1); e Grupo VB (defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo). Os animais foram submetidos a eutanásia nos períodos de 7 e 30 dias pós-operatórios. **RESULTADOS:** O VB não alterou de forma significativa as reações celulares do reparo ósseo, no entanto, a presença do osso autógeno no defeito causou uma redução importante da expressão das proteínas estudadas. O Grupo ENX foi o que obteve a maior AON e o Grupo VB a menor. **CONCLUSÕES** 1) Em defeitos de tamanho crítico em calotas, o osso autógeno em bloco continua sendo o tratamento padrão ouro; 2) Para o tratamento destes defeitos, pode-se indicar a utilização dos vidros bioativos sem a necessidade de associação ao osso autógeno.

Palavras-chave: Transplante ósseo. Materiais biocompatíveis. Imunoistoquímica.

Abstract

Guskuma, M. H. **Bone repair in surgically created cavities filled with an association of bioactive glass and autogenous bone: histometric and immunohistochemistry analyses.** Araçatuba, 2007. 84 f. Dissertation (Master in Dentistry – Oral and Maxillo Facial Surgery) Araçatuba School of Dentistry. São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”.

AIMS: The aim of this study is to evaluate the expression of the proteins that participate in the bone repair process, during the revascularization step (VEGF), osteoinduction (BMP2 and CBFA1) and mineralization (OCN), after the use of an association of bioactive glass and autogenous bone in 1:1 rate, in rats calvaria defects. **METHODS:** 40 male adult rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) received two calvarial defects created with 5mm diameter. The bone defects constituted 4 experimental groups (n=10): Control group (the defects were filled with blood clot), Graft Group (the defects were filled with autogenous bone removed from the contralateral defect), Graft and Bioactive Glass Group (the defects were filled with an association of bioactive glass and autogenous bone in 1:1 rate); and Bioactive Glass Group (the bone defects were filled with bioactive glass). The animals were sacrificed at 7 and 30 days post operative periods. **RESULTS:** The bioactive glass did not alter, in a significant way, the cellular responses of the bone repair, otherwise, the presence of autogenous bone in the defect caused an important reduction in the expression of the studied proteins. The graft group achieved the better bone neoformed area and the bioactive glass achieved the smaller. **CONCLUSIONS:** 1. In the calvaria critical-size defects, the block autogenous bone is still the gold standard treatment; 2) For this defects treatment, bioactive glasses may be indicated without the autogenous bone association.

KEY-WORDS: Bone transplantation. Biocompatible materials. Immunohistochemistry.

Lista de Figuras

Fig. 1 - Esquema do procedimento cirúrgico. Defeitos cirúrgicos localizados bilateralmente nos ossos parietais com os respectivos tratamentos recebidos nos Grupos experimentais.	70
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)	70
Fig. 3 - 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.	71
Fig. 4 - Expressão da proteína VEGF aos 7 dias nos 4 Grupos experimentais. (Original 160 X)	72
Fig. 5 - Expressão da proteína BMP2 aos 7 dias nos 4 Grupos experimentais. (Original 160 X)	73
Fig. 6 - Expressão da proteína CBFA1 aos 7 dias nos 4 Grupos experimentais. (Original 160 X)	74
Fig. 7 - Expressão da proteína OCN aos 7 dias nos 4 Grupos experimentais. (Original 160 X)	75
Fig. 8 - Expressão da proteína BMP2 aos 30 dias nos 4 Grupos experimentais. (Original 160 X)	76
Fig. 9 - Expressão da proteína CBFA1 aos 30 dias nos 4 Grupos experimentais. (Original 160 X)	77
Fig. 10 - Expressão da proteína OCN aos 30 dias nos 4 Grupos experimentais. (Original 160 X)	78

Lista de Tabelas

Tabela 1- Intensidade das imunomarcações das proteínas estudadas.

69

Lista de Anexos

Anexo A — Normas para publicação segundo o periódico 80

“The international Journal of Oral & Maxillofacial Implants”

Anexo B — Autorização da Comissão de ética na experimentação animal 84

Lista de Siglas e Abreviaturas

AON	Área de osso neoformado
AT	Área total
BMP2	Bone morphogenetic protein 2 (Proteína óssea morfogenética 2)
CBFA1	Core binding factor α 1 (Fator de ligação principal α 1)
CONT	Controle
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ENX	Enxerto
ENXVB	Enxerto e vidro bioativo
HE	Hematoxilina Eosina
OA	Osso autógeno
OCN	Osteocalcina (osteocalcin)
VB	Vidro bioativo
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	34
Materiais e métodos	37
Resultados	42
Discussão	46
Conclusões	54
Referências	55
Anexos	79

Manuscrito para publicação

segundo as normas do Periódico

“The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants”

Reparação óssea de cavidades cirurgicamente criadas e preenchidas com uma associação de vidro bioativo e osso autógeno: análise histométrica e imunoistoquímica

Marcos Heidy Guskuma

Eduardo Hochuli Vieira

Flávia Priscila Pereira

Idelmo Rangel Garcia Júnior

Roberta Okamoto

Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Universidade Estadual Paulista. Araçatuba

Resumo

OBJETIVOS: A proposta deste estudo foi avaliar a expressão das proteínas que participam do processo de reparo ósseo, nas fases de revascularização (VEGF), osteoindução (BMP2 e CBFA1) e mineralização (OCN), quando da utilização de uma associação do vidro bioativo e osso autógeno em proporção de 1:1 em defeitos criados em calvária de ratos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Para o presente estudo foram utilizados 40 ratos adultos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) que receberam dois defeitos ósseos de 5 mm cada, em calvária. Os defeitos ósseos constituíram quatro grupos experimentais (n=10): Grupo CONT (reparação apenas com o próprio coágulo); Grupo ENX (defeitos preenchidos com osso autógeno removido do defeito contralateral); Grupo ENX VB (defeitos preenchidos com uma associação de vidro bioativo e osso autógeno 1:1); e Grupo VB (defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo). Os animais foram submetidos a eutanásia nos períodos de 7 e 30 dias pós-operatórios. **RESULTADOS:** O vidro bioativo não alterou de forma significativa as reações celulares do reparo ósseo, no entanto, a presença do osso autógeno no defeito causou uma redução importante da expressão das proteínas estudadas. O Grupo ENX foi o que obteve a maior área de osso neoformado e o Grupo VB a menor. **CONCLUSÕES** 1) Em defeitos de tamanho crítico em calotas, o osso autógeno em bloco continua sendo o tratamento padrão ouro; 2) Para o tratamento destes defeitos, pode-se indicar a utilização dos vidros bioativos sem a necessidade de associação ao osso autógeno.

Palavras-chave: Transplante ósseo. Materiais biocompatíveis. Imunoistoquímica.

Introdução

A reabilitação do sistema estomatognático colabora para a recuperação estética, funcional e psicossocial dos pacientes. Entretanto, a falta de osso nos rebordos alveolares constitui um grande desafio para o sucesso das reabilitações. O osso autógeno (OA) continua sendo o biomaterial padrão ouro (Boyne e James 1980; Tatum 1986; Misch 1987) para a reconstrução dos defeitos causados por patologias e traumas (Tessier et al. 2005) e, principalmente, para a reconstrução dos rebordos possibilitando a instalação de implantes de titânio (Proussaefs e Lozada 2005, Wada et al. 2001, Esposito et al. 2006, Brånemark et al. 1975). As propriedades osteoindutoras e osteocondutoras, a biocompatibilidade e a impossibilidade de transmissão de doenças são as características diferenciais do osso autógeno que conferem um alto índice de sucesso (Triplett e Schow 1996, Hirsch e Ericsson 1991, Lundgren et al. 1996, Raghoobar et al. 1993, Wood e Moore 1988). No entanto, o seu uso pode ser limitado pelos seguintes fatores: a) morbidade da área doadora; b) quantidade limitada de enxerto que pode ser removido de regiões intra-orais, e c) a necessidade de anestesia geral para a remoção de enxertos de áreas extra-orais em casos de reconstruções mais extensas.

Muitos estudos (Constantino et al. 2002, Lang et al. 1999, Topazian et al. 1971, Norton e Wilson 2002, Hench et al. 1971, Cancian et al., 1999; Cordioli et al., 2001) têm sido realizados com o objetivo de encontrar um biomaterial para substituir o OA. Os vidros bioativos (VB) são biomateriais desenvolvidos por Hench et al. (1972) que têm sido testados experimentalmente (Wilson e Merwin 1988; Heikkilä et al. 1995a; Pajamäki et al. 1995; Suominen et al. 1996; Wheeler et al. 1998) e clinicamente (Heikkilä et al. 1995b; Furusawa e Mizunuma 1997; Cordioli et al. 2001; Tadjoeidin et al. 2000) em diferentes situações onde a

reconstrução óssea é necessária, mostrando serem biocompatíveis (Hench e Paschall 1973; Gross e Strunz 1985) e não tóxicos (Wilson et al. 1981). As propriedades do vidro bioativo aparecem controversas na literatura. Enquanto alguns o consideram bioativo (Teófilo et al. 2004; Gatti e Zaffe 1991; Nishida et al 2006), osteoestimulante (Schepers et al. 1991; Schepers et al. 1993; Hench e Polak 2002; Radin et al. 2005) e osteogênico (Radin et al 2005; Xynos et al. 2001; Ohgushi et al. 1990; Ducheyne e Qiu 1999), outros o classificam como bioinerte (Carvalho et al. 2004) ou ainda relatam um efeito inibitório na osteogênese (Moreira-Gonzales et al. 2005; Vogel et al. 2001). No entanto, a propriedade osteocondutora é consenso entre os pesquisadores (Turunen et al. 1995, Turunen et al. 1997, Schepers et al. 1991; Schepers et al. 1993). Os vidros bioativos têm ainda a capacidade de ligarem-se quimicamente ao osso, demonstrada em vários estudos (Hench e Paschall 1973; Hench e Wilson 1984; Andersson et al. 1990a). O fenômeno que promove a ligação com o osso é a reação de corrosão da superfície do vidro bioativo induzida pelos fluidos teciduais, onde a apatita do osso liga-se firmemente à superfície do vidro bioativo, rica em cálcio e fosfato (Ito et al. 1987; Andersson et al. 1990b), levando a um alto índice de ligação óssea (Hench 1988; Gatti et al. 1994).

A associação do vidro bioativo ao osso autógeno tem sido explorada (Tadjoedin et al. 2000; Tadjoedin et al. 2002; Cordioli et al. 2001; Turunen et al. 2004) e pode encontrar aplicação clínica levando-se em consideração a limitada disponibilidade do osso autógeno. Considera-se que o vidro bioativo seria um material mais atrativo se fossem usadas concentrações mais altas de suas partículas junto ao osso autógeno, tendo como ideal a completa substituição do osso autógeno pelo vidro bioativo, eliminando a cirurgia de um sítio doador.

A formação, o desenvolvimento e a manutenção do tecido ósseo são processos complexos altamente regulados (Nijweide et al. 1986). Proteínas, hormônios, fatores de

crescimento e citocinas, estão ativamente envolvidos nestes processos e exercem atividade direta sobre células com atividade osteoblástica e osteoclástica, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica (Ducy et al. 2000).

Entre as proteínas envolvidas nesse processo, podemos destacar a VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), um importante estimulador da angiogênese (Street et al. 2002); a BMP2 (Bone Morphogenetic Protein - 2), que promove a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, aumentando a formação e o reparo ósseo (Gerhart et al. 1993; Cook et al. 1994; Ripamonti et al. 1996; Reddi 1998; Wozney e Rosen 1998; Heckman et al. 1999); a CBFA1 (Core binding factor α 1), que regula a diferenciação e a expressão gênica dos osteoblastos (Ducy et al. 1999); e a Osteocalcina (OCN), que é a proteína não-colagenosa mais abundante do osso que estimula a mineralização óssea (Boskey et al. 1998).

A possibilidade de diminuir a quantidade de osso autógeno necessário nas reconstruções foi a hipótese que nos estimulou a desenvolver este trabalho. A proposição deste estudo foi avaliar o comportamento do vidro bioativo e de sua associação com o osso autógeno em proporção 1:1 na reparação de cavidades cirurgicamente criadas em calvária de ratos, através da análise da expressão das proteínas envolvidas nesse processo pela técnica da imunoistoquímica.

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 Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP.

Para o presente estudo foram utilizados 40 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 anestesia geral pela combinação de Ketamina e Xilazina, 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. Os animais foram divididos em dois grupos de 20 (Grupo 1 e Grupo 2).

Os defeitos ósseos criados nos animais do Grupo 1 foram divididos em dois grupos experimentais: (Fig. 1)

⇒ 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.

Os defeitos ósseos criados nos animais do Grupo 2 foram divididos em outros dois grupos experimentais: (Fig. 1)

⇒ Grupo VIDRO BIOATIVO (VB) (n=10)

– Os defeitos ósseos deste grupo foram preenchidos com VB.

(Composição: 45% SiO₂; 26% CaO; 6% P₂O₅; 23% Na₂O)

⇒ Grupo ENXERTO + VIDRO BIOATIVO (ENX VB) (n=10)

– Os defeitos ósseos deste grupo foram preenchidos com uma associação de osso autógeno triturado removido do defeito contralateral e vidro bioativo, na proporção de 1:1.

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.

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: 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. No Grupo ENX VB, as partículas ósseas não foram consideradas como AON, já que aos 30 dias as partículas se apresentavam da mesma forma que aos 7 dias, podendo ainda sofrer reabsorção e não formar osso naquelas regiões.

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Algumas 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, BMP2, VEGF e OCN (Santa Cruz Biotechnology), anticorpo secundário biotinilado (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.

Para a realização da análise foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento 160X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Bensheim, 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 5 graus, que variavam de ausentes a intensas (Tabela 1).

Resultados

ANÁLISE QUANTITATIVA (HE)

7 dias

Neste período de observação, os Grupos VB (2,69%) e ENX VB (3,83%), tiveram os menores índices de AON, enquanto o Grupo ENX (46,44%) obteve o maior índice de AON. O Grupo CONT (12,48%) foi intermediário. (Fig. 3)

30 dias

Aos 30 dias, não houve alteração significativa da AON no Grupo CONT (18,12 %) e VB (2,64%), enquanto sensível aumento da AON foi observado nos Grupos ENX (58,86%) e ENX VB (13,24%). (Fig. 3)

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. 4A). Em contraste o Grupo ENX (Fig. 4B) foi o que menos expressou as imunomarcações, notadamente no centro do defeito. No Grupo VB as marcações foram intensas, no entanto, somente nos espaços entre as partículas do material de implante, que ocupava um grande volume do defeito (Fig. 4C). Já no Grupo ENX VB notou-se discretas marcações nas bordas do defeito (Fig. 4D) e uma maior expressão mais ao centro.

BMP2

Neste período de observação, o Grupo CONT (Fig. 5A) apresentou-se com marcações bastante discretas para esta proteína, igualmente espalhadas pelo defeito, observadas principalmente em osteoblastos. No Grupo ENX (Fig. 5B), as marcações positivas para a BMP2 estavam praticamente ausentes, especialmente no centro do defeito. A quantidade de células com imunomarcações positivas no Grupo VB (Fig. 5C) foi semelhante ao Grupo CONT, espalhadas igualmente pelo defeito, no entanto, somente entre as partículas do vidro bioativo. O Grupo ENX VB (Fig. 5D) caracterizou-se pela pequena quantidade de osteoblastos, notadamente nas bordas do defeito.

CBFA1

A quantidade de células com imunomarcações positivas para a CBFA1 aos 7 dias no Grupo CONT (Fig. 6A) foi apenas moderada, mas espalhadas por toda a extensão do defeito, representando os pré-osteoblastos presentes. Nos Grupos ENX (Fig. 6B) e ENX VB (Fig. 6D), observou-se a ausência total da expressão da CBFA1. Já no Grupo VB (Fig. 6C), a característica foi semelhante ao Grupo CONT, com moderada quantidade de pré-osteoblastos localizados entre as partículas do vidro bioativo.

OCN

As imunomarcações do Grupo CONT (Fig. 7A) foram discretas para esta proteína, concentradas mais nas bordas do defeito, observadas em osteoblastos e osteócitos. Nos Grupos ENX (Fig. 7B) e ENX VB (Fig. 7D) observou-se ausência total da expressão da OCN. Já no Grupo VB (Fig. 7C) a presença da OCN foi discreta nas bordas, mas moderada mais ao centro da loja cirúrgica.

30 dias

BMP2

Aos 30 dias, os Grupos ENX (Fig. 8B) e ENX VB (Fig. 8D) apresentaram ausência de imunomarcações para a BMP2, em contraste com o Grupo CONT (Fig. 8A), que apresentou intensa expressão da proteína, representando as áreas de formação da matriz óssea. O Grupo VB (Fig. 8C) teve marcações um pouco mais discretas que o Grupo CONT, localizadas entre as partículas do material implantado.

CBFA1

O Grupo CONT (Fig. 9A) apresentou-se com intensas marcações em toda a extensão do defeito, onde havia formação da matriz óssea. No Grupo ENX (Fig. 9B) a expressão da CBFA1 foi muito discreta, com maior presença nas bordas do defeito e nas superfícies do enxerto. A quantidade de células com imunomarcações positivas no Grupo VB (Fig. 9C) apresentou-se pouco intensa, espalhadas por todo o defeito, entre as partículas do material. Já no Grupo ENX VB (Fig. 9D), notou-se ausência total de matriz osteóide.

OCN

No Grupo CONT (Fig. 10A) as imunomarcações foram intensas em toda a extensão do defeito, preenchido em parte por osso neoformado, caracterizando a mineralização do tecido formado. O Grupo ENX (Fig. 10B) obteve marcações muito discretas, mais evidenciadas nas bordas do defeito. Uma expressão pouco intensa da OCN foi observada no Grupo VB (Fig. 10C) em toda a extensão do defeito, mas localizadas somente entre as partículas do vidro bioativo. Já no Grupo ENX VB (Fig. 10D) não houve expressão da OCN.

Discussão

As limitações relacionadas à utilização dos enxertos ósseos autógenos estimularam a realização de vários estudos com o objetivo de encontrar um biomaterial que pudesse substituí-lo total ou parcialmente, suprimindo as suas limitações.

Os vidros bioativos têm sido testados experimentalmente e clinicamente em diferentes situações onde a reconstrução óssea é necessária. No entanto, ainda faltam trabalhos utilizando os vidros bioativos associados ao osso autógeno. Esta composição pode colaborar para a diminuição da quantidade de osso necessária para as reconstruções dos rebordos alveolares. Considera-se que se uma alta proporção de vidro bioativo puder ser utilizada com osso autógeno, mais interessante se torna o vidro bioativo. Mas o ideal seria a completa substituição do osso autógeno pelo biomaterial, eliminando a necessidade da cirurgia de um sítio doador.

Os vidros bioativos já foram testados em associação ao osso autógeno em diferentes concentrações. Tadjoeidin et al. (2000) e Turunen et al. (2004), relataram bons resultados ao utilizar uma proporção de 1:1 de VB/OA para aumentar o volume ósseo após a elevação do assoalho de seios maxilares em humanos. Moreira-Gonzales et al. (2005) ao tratar defeitos em calvária de coelhos utilizando a mesma proporção 1:1, notaram um aumento da área de ossificação em comparação com os defeitos tratados com 100% vidro bioativo.

Cordioli et al. (2001) utilizaram uma proporção de 70-80% de vidro bioativo (Biogran®) em seios maxilares com simultânea instalação de implantes de titânio em humanos e relataram volume e qualidade óssea adequados, além de estabilidade e previsibilidade de resultados para os implantes.

Furusawa e Mizununa (1997) relataram que o vidro bioativo pode ser utilizado com sucesso em concentração de 100% em seios maxilares humanos. Mais recentemente, Tadjoeidin et al. (2002) reforçaram essas observações concluindo que o uso do osso autógeno em associação com o vidro bioativo pode ser dispensado, ao testarem concentrações de 80%, 90% e 100% de vidro bioativo em seios maxilares humanos e compararem aos enxertos de 100% osso autógeno. Entretanto, no trabalho de Turunen et al. (1995a) a utilização do vidro bioativo puro em seios maxilares de carneiros não levou à formação óssea.

A pequena AON obtida no Grupo CONT, tanto aos 7 quanto aos 30 dias (Fig. 3), sugere um defeito de tamanho crítico (Busch et al. 1996, Zanchetta et al. 2003, Schmitz e Hollinger 1986, Hollinger e Kleinschmidt 1990, Bosch et al. 1998). No Grupo ENX, os resultados quantitativos obtidos já eram esperados. No entanto, para um melhor efeito comparativo, talvez a utilização de osso triturado tivesse sido a melhor opção. O Grupo VB foi o que obteve a menor AON, estando de acordo com os achados na literatura (Melo et al. 2004, Moreira-Gonzales 2005). No Grupo ENX VB observou-se um aumento estatisticamente significativo da AON quando comparado com o Grupo VB, aos 30 dias (Fig. 3), estando compatível com os resultados de Moreira-Gonzales et al. (2005). Entretanto, acredita-se que os resultados destes Grupos podem ser drasticamente afetados pelo fator tempo experimental. Talvez o período de observação de 30 dias não tenha sido suficiente para que ocorresse o fenômeno da osteotransdução (Driessens et al. 1998), no qual o biomaterial é gradativamente substituído por tecido ósseo. Em humanos, as partículas do vidro bioativo começam a ser reabsorvidas aos 4 meses pós-operatórios e aos 16 meses já não são encontrados vestígios do biomaterial (Tadjoeidin et al. 2002). Para a instalação de implantes de titânio após levantamento do assoalho de seio maxilar utilizando-se a composição 1:1 VB/OA, deve-se aguardar pelo menos 6 meses de reparo (Tadjoeidin et al. 2000), enquanto 9 meses são necessários ao se utilizar o vidro bioativo puro (Tadjoeidin et al. 2002). É

importante considerar que a finalidade da reconstrução óssea é que vai determinar o momento em que o reparo está clinicamente pronto para cumprir as suas demandas funcionais. Se para a instalação de implantes de titânio são necessários 9 meses de cicatrização, a utilização do vidro bioativo para regenerar um defeito ósseo pode devolver as funções daquele tecido em um tempo menor.

Tadjoedin et al. (2002) afirmam que o tempo de cicatrização é um fator mais importante que a proporção VB/OA utilizada. Os enxertos 100% osso autógeno em seios maxilares cicatrizam mais rápido que os implantes compostos VB/OA (Tadjoedin et al. 2000; Cordioli et al. 2001). Os trabalhos de Tadjoedin et al. (2000) e Tadjoedin et al. (2002), deixam bastante evidentes a tendência dos implantes VB/OA, indiferente das proporções utilizadas (50%, 80%, 90% ou 100% VB), de terem uma menor AON nos períodos iniciais de observação (4, 5 e 6 meses), quando comparado aos enxertos 100% osso autógeno e de se igualarem a estes aos 15 e 16 meses. Acreditamos que a mesma situação poderia ter ocorrido em nosso trabalho se os tempos de observação tivessem sido mais longos.

A VEGF é uma proteína conhecida pela sua importante participação na angiogênese, através da estimulação da mitose das células endoteliais (Street et al. 2002; Ferrara 2004). No entanto, os estudos têm demonstrado a participação da VEGF na migração dos osteoblastos, na promoção do turn-over ósseo e na mineralização (Gerber et al. 1999; Mayr-Wohlfart et al. 2002; Murphy et al. 2004; Street et al. 2002; Leach et al. 2006). Aparentemente de maneira antagônica, esta proteína parece atuar também na regulação da reabsorção óssea (Nakagawa 2000) e da osteoclastogênese (Niida et al. 1999). Neste trabalho, optou-se por realizar a análise da expressão desta proteína apenas aos 7 dias pelo fato de se conhecer a sua ação, que se concentra nos períodos iniciais do reparo.

Uma maior quantidade de imunomarcações positivas para a VEGF no Grupo CONT (Fig. 4A), refletindo a grande quantidade de células endoteliais, já era esperada devido à

tendência dos biomateriais de retardarem a organização do coágulo e o reparo. Um contraste importante foi observado no Grupo ENX (Fig. 4B), que foi o que menos expressou a proteína. Notadamente conhecido pelas suas propriedades osteoindutoras, osteocondutoras e pela sua biocompatibilidade, o enxerto autógeno pode parecer à primeira análise, ter obtido um resultado contraditório. No entanto, devemos considerar que o enxerto utilizado no estudo é cortical e em bloco, ocupando a maior parte do defeito e impedindo mecanicamente a proliferação celular.

No Grupo VB a angiogênese ocorreu de forma intensa, no entanto apenas nos pequenos espaços entre as partículas do biomaterial (Fig. 4C). No Grupo ENX VB observou-se que nas áreas circunjacentes às partículas do osso autógeno as marcações foram muito discretas (Fig. 4D), enquanto nas regiões onde só haviam partículas do vidro bioativo a expressão da VEGF foi maior. Essas observações, comparadas aos Grupos VB e ENX, indicam que o osso autógeno proporcionou um atraso no processo de revascularização do defeito, além de que o efeito osteoestimulatório do vidro bioativo (Schepers et al. 1991; Leach et al. 2006) pode ter contribuído para uma maior expressão da VEGF.

As BMPs foram originalmente identificadas por Urist (1965) como componentes orgânicos da matriz óssea capazes de induzir formação óssea ectópica. Pertencem à superfamília das TGF- β (Transforming Growth Factor beta) sintetizadas por osteoblastos (Gazzerro et al. 1998; Pereira et al. 2000) e compreendem o maior subgrupo com 15 genes (BMP1 a BMP15), críticos para a embriogênese e a formação óssea (Schmitt et al. 1999; Yoon e Boden 2002). As BMP2 são as mais estudadas entre as BMPs. Elas são encontradas nos osteoblastos, na matriz óssea e nos fibroblastos e 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 (Nishimura et al.

2002; Derynck e Zhang 2003) causando a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos (Yamaguchi et al. 2000) e conseqüentemente a formação óssea (King e Cochran, 2002)

As imunomarcações positivas para BMP2 no Grupo CONT variaram de discretas (7 dias) (Fig. 5A) a intensas (30 dias) (Fig. 8A), mostrando no último período a fase de produção de matriz osteóide pelos osteoblastos. Os Grupos ENX (Fig. 5B; Fig. 8B) e ENX VB (Fig. 5D; Fig. 8D) se caracterizaram pela ausência de marcações, tanto aos 7 quanto aos 30 dias, reforçando a idéia de que o osso autógeno possa estar causando um atraso no reparo. O Grupo VB comportou-se de maneira parecida com o Grupo CONT (Fig. 5C), no entanto, aos 30 dias (Fig. 8C) as imunomarcações positivas foram apenas moderadas, contrastando com a intensa marcação no Grupo CONT. Dessa forma, mesmo se considerarmos um efeito estimulatório do vidro bioativo à produção óssea, quando comparamos os resultados dos Grupos CONT e VB, fica evidente o menor número de osteoblastos no Grupo VB, confirmando o atraso no reparo causado por esse biomaterial. Entretanto, se compararmos os Grupos ENX e ENX VB com o Grupo VB, encontramos resultados diferentes dos de Bergman e Litkowski (1995), que observaram uma proliferação de osteoblastos semelhante entre os grupos.

A CBFA1, também conhecida como RUNX2, é um fator de transcrição pertencente à família de genes Runt (Xiao et al. 1998a) encontrada nos pré-osteoblastos e osteoblastos jovens. É ativada pela ligação de proteínas da matriz extracelular, entre elas a BMP2, à superfície dessas células (Camileri e Macdonald 2006). Após a sua ativação ela pode agir diretamente, ligando-se a regiões específicas do DNA (onde encontra-se a seqüência Core Pu CC Pu CA), ou ativar uma complexa reação em cascata, recrutando enzimas que vão catalisar a transcrição de genes osteoblásticos (Ducy et al. 1997, Selvamurugan et al. 1998; Kern et al. 2001; Schroeder et al. 2004; Vega et al. 2004; Liu et al. 2005; Ji et al. 1998; Drissi et al. 2000; Westerndorf et al. 2002). 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 óssea (Ducy 2000), além de participar da manutenção (homeostasia) deste tecido (Ducy et al. 1997; Quack et al. 1999). O padrão de imunomarcações para a CBFA1 (Fig. 6; Fig. 9) de todos os grupos experimentais foi muito parecido com as expressões da BMP2, o que se deve ao fato de elas atuarem em conjunto no processo de diferenciação dos osteoblastos (Tabela 1).

A OCN é uma proteína produzida pelos osteoblastos que participa da maturação da parte mineral do osso (Boskey 1998), sendo expressada somente após os osteoblastos terem cessado a atividade proliferativa (Malaval et al. 1992), estabelecendo um estado diferenciado e maduro dessas células (Hauschka et al. 1983). O gene promotor da OCN é sobre-regulado pela ligação de diversos fatores de transcrição, entre eles a CBFA1 (Owen et al. 1990; Mclarren et al. 2000; Gutierrez et al. 2002). Alguns trabalhos têm demonstrado a participação da OCN na estimulação da diferenciação (Chenu et al. 1994; Liggett et al. 1994) e no recrutamento (Glowacki et al. 1991; Chenu et al. 1994; Liggett et al. 1994) dos osteoclastos, colaborando para a regulação da homeostasia do tecido ósseo, através da inibição da sua formação (Ducy et al. 1996).

No Grupo CONT, as imunomarcações positivas para a OCN seguiram o padrão esperado, com uma discreta marcação aos 7 dias (Fig. 7A) e uma expressão intensa aos 30 dias (Fig. 10A), revelando uma maior maturação do tecido neste período. Os Grupos ENX (Fig. 7B; Fig. 10B) e ENX VB (Fig. 7D; Fig. 10D) comportaram-se de maneira coerente com a expressão das outras proteínas, já que se estes grupos não expressaram a BMP2 e a CBFA1 aos 30 dias, já se esperava a ausência de imunomarcações para a OCN no mesmo período. O Grupo VB (Fig. 7C; Fig. 10C) seguiu o mesmo padrão de imunomarcações obtidas para as proteínas BMP2 e CBFA1, muito parecido com o Grupo CONT, no entanto, sempre com um grau de expressão um pouco inferior (Tabela 1). Este resultado indica que existe um tecido

ósseo já maduro entre as partículas do vidro bioativo aos 30 dias, o que pode estar relacionado com a propriedade osteoestimuladora deste biomaterial.

Considerando a expressão de todas as proteínas estudadas, observamos que o Grupo CONT foi o que teve um reparo mais rápido (Fig. 10). No entanto, as análises histométricas mostram uma quantidade de osso formado insuficiente para o fechamento dos defeitos (Fig. 3). Numa situação oposta, o Grupo ENX obteve fechamento total dos defeitos aos 30 dias (Fig. 3), apesar da discreta atividade das células endoteliais e dos osteoblastos (Fig. 8; Fig. 9). Tal fato se deve à presença do osso autógeno em bloco no defeito, que causa um atraso no reparo e impede mecanicamente a migração de células para o local, explicando a ausência de imunomarcações. Deve-se considerar também que nestes casos, o fechamento do defeito ocorre por um processo de incorporação chamado “*creeping substitution*” (Burchardt 1983), pelo qual o osso enxertado é progressivamente substituído por osso neoformado.

Tomando como base o Grupo CONT, observamos que o Grupo VB teve um padrão de imunomarcações muito parecido, mas com um grau de expressão um pouco inferior a este grupo (Tabela 1), não alterando significativamente as reações celulares do reparo ósseo. No entanto, o preenchimento dos defeitos utilizando uma composição de OA/VB em proporção 1:1 (Grupo ENX VB), resultou em ausência total de imunomarcações (exceto para a VEGF que teve discreta expressão) sugerindo um atraso importante no reparo, mas o motivo pelo qual houve uma expressão tão discreta de todas as proteínas não ficou esclarecido. Uma análise quantitativa desses Grupos (VB e ENX VB) aos 30 dias, fornecem resultados que parecem confrontar a análise imunoistoquímica, mas encontram-se de acordo com o trabalho de Moreira-Gonzales et al. (2005). Os dados sugerem uma formação óssea mais rápida no Grupo ENX VB, o que pode ocorrer pelo fato de haver menor quantidade de partículas do vidro bioativo a serem reabsorvidas. Porém, o curto período de observação pós-operatória

estabelecido neste trabalho impede uma afirmação neste sentido. De acordo com Tadjoeidin et al. (2000), em um período de observação mais longo os dois grupos tendem a se igualar em AON, o que pode evidenciar a propriedade osteocondutora do vidro bioativo (Turunen et al. 1995 e Turunen et al. 1997).

Sugerimos trabalhos utilizando a metodologia da imunoistoquímica em tecido ósseo com um maior tempo de acompanhamento pós-operatório e menores intervalos de eutanásia, para uma melhor observação dos processos de osteotransdução e reparo, quando da utilização do vidro bioativo.

Conclusões

A metodologia empregada permite concluir que:

- Em defeitos de tamanho crítico em calotas, o osso autógeno em bloco continua sendo o tratamento padrão ouro;
- Para o tratamento destes defeitos, pode-se indicar a utilização dos vidros bioativos sem a necessidade de associação ao osso autógeno.

Referências

1. Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg* 1980; 38:613-616.
2. Tatum HJr. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am* 1986; 30:207-229.
3. Misch CE. Maxillary sinus augmentation for endosteal implants: organized alternative treatment plans. *Int J Oral Implantol* 1987; 4:49-58.
4. Tessier P, Kawamoto H, Matthews D, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, Wolfe SA. Autogenous bone grafts and bone substitutes-tools and techniques: I A 20,000 case experience in maxillofacial and craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg* 2005; 116(5 Suppl):6S-24S; discussion 92S-94S.
5. Proussaefs P, Lozada J. The use of intraorally harvested autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation: a human study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005; 25:351-363.
6. Wada K, Niimi A, Watanabe K, Sawai T, Ueda M. Maxillary sinus floors augmentation in rabbits: a comparative histomorphometric study between rhBMP-2 and autogenous bone. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21:252-263.
7. Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21:696-710.
8. Brånemark PI, Lindstrom J, Hallen O, Breine U, Jeppson PH, Ohman A. Reconstruction of the defective mandible. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1975; 9:116-128. .

9. Triplett RG, Schow SR. Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54:486-494.
10. Hirsch JM, Ericsson I. Maxillary sinus augmentation using mandibular bone grafts and simultaneous installation of implants. A surgical technique. *Clin Oral Implants Res* 1991; 2:91-96.
11. Lundgren S, Moy P, Johansson C, Nilsson H. Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: a histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11:760-766.
12. Raghoobar GM, Brouwer TJ, Reintsema H, Van Oort RP. Augmentation of the maxillary sinus floor with autogenous bone for the placement of endosseous implants: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1993; 51:1198-1203.
13. Wood RM, Moore, DL. Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988; 3:209-214.
14. Constantino PD, Hiltzik D, Govindaraj S, Moche J. Bone healing and bone substitutes. *Facial Plast Surg* 2002; 18:13-26.
15. Lang NP, Becker W, Karring T. Formação do osso alveolar. In: Lindhe J. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999:665-689.
16. Topazian RG, Hammer HB, Boucher LJ, Hulbert SF. Use of alloplastics for ridge augmentation. *J Oral Surg* 1971; 29:792-798.
17. Norton MR, Wilson J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:249-257.
18. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res* 1972; 2:117-141.

19. Cancian DC, Hochuli-Vieira E, Marcantonio RA, Marcantonio E Jr, Use of Biogran and calcitite in bone defects: histologic study in monkeys (*Cebus apella*). *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:859-864.
20. Cordioli GP, Mazzocco C, Schepers E, Brugnolo E, Majzoub Z. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. *Clin Oral Impl Res* 2001; 12:270-278.
21. Wilson J, Mervwin GE. Biomaterials for facial bone augmentation: comparative studies. *J Biomed Mater Res* 1988; 22:159-177.
22. Heikkilä JT, Aho HJ, Yli-Urpo A, Happonen RP, Aho AJ. Bone formation in rabbit cancellous bone defects filled with bioactive glass granules. *Acta Orthop Scand* 1995a; 66:463-467.
23. Pajamäki J, Lindholm S, Andersson Ö, Karlsson K, Yli-Urpo A, Happonen RP. Glass-ceramic-coated titanium hip endoprosthesis. Experimental study in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* 1995; 114:119-122.
24. Suominen EA, Kinnunen J. Bioactive glass granules and plates in the reconstruction of defects of the facial bones. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1996; 30:281-289.
25. Wheeler DL, Stokes KE, Hoellrich RG, Chamberland DL, MacLoughlin SW. Effect of bioactive particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *J Biomed Mater Res* 1998; 41:527-533.
26. Heikkilä JT, Marttila KT, Andersson ÖH, Yli-Urpo A, Aho AJ. Behavior of bioactive glass in human bone. In: Hench LL, Wilson J. (eds) *Bioceramics*. Oxford:Elsevier Science 1995b:35-40.
27. Furusuwa T, Mizunuma K. Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone-grafting material. *Implant Dent* 1997; 6:93-101.

28. Cordioli G, Mazzocco C, Schepers E, Brugnolo E, Majzoub Z. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. *Clin Oral Implants Res* 2001;12: 270-278.
29. Tadjoeidin ES, de Lange GL, Holzmann PJ, Kuliper L, Burger EH. Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:334-344.
30. Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res* 1973;7:25-42.
31. Gross U, Strunz V. The interface of various glasses and glass ceramics with bony implantation bed. *J Biomed Mater Res* 1985;19:251-271.
32. Wilson J, Pigott GH, Schoen FJ, Hench LL. Toxicology and biocompatibility of bio-glasses. *J Biomed Mater Res* 1981;15:805-817.
33. Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Arch Oral Biol* 2004;49:755-762.
34. Gatti AM, Zaffe D. Short-term behaviour of two similar active glasses used as granules in the bone defects. *Biomaterials* 1991;12:497-504.
35. Nishida T, Yamada Y, Murai M, Shimizu Y, Oshikawa M, Ito K. Effects of bioactive glass on bone augmentation within a titanium cap in rabbit parietal bone. *J Periodontol* 2006;77:983-989.
36. Schepers E, De Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabil* 1991;18:439-452.
37. Schepers EJ, Ducheyne P, Barbier L, Schepers S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implant Dent* 1993;2:151-156.

38. Hench LL, Polak JM. Third generation biomedical materials. *Science* 2002; 295:1014-1017.
39. Radin S, Reilly G, Bhargava G, Leboy PS, Ducheyne P. Osteogenetic effects of bioactive glass on bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* 2005;73:21-29.
40. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Gene expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic dissolution products of Bioglass® 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001;55:151-157.
41. Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Shors EC, Caplan AI. Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res* 1990;24: 1563-1570.
42. Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 1999;20:2287-2303.
43. Carvalho PSP, Bassi APF, Pereira LAVD. Revision and nomenclature proposal for the biomaterials. *Implant News* 2004;1:255-260.
44. Moreira-Gonzalez A, Loboeki C, Barakat K, Andrus L, Bradford M, Gilsdorf M, Jackson IT. Evaluation of 45S5 bioactive glass combined as a bone substitute in the reconstruction of critical size calvarial defects in rabbits. *J Craniofac Surg* 2005;16:63-70.
45. Vogel M, Voigt C, Gross UM, Muller-Mai CM. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials* 2001;22:357-362.
46. Turunen T, Peltola J, Kangasniemi I, Jussila J, Uusipikka E, Yli-Urpo A, Happonen RP. Augmentation of the maxillary sinus wall using bioactive glass an autologous bone. In: Wilson J, Hench LL, Greenspan D. (eds) *Bioceramics*. Oxford:Elsevier Science 1995:259-264.

47. Turunen T, Peltola J, Helenius H, Yli-Urpo A, Happonen RP. Bioactive glass and calcium carbonate granules as filler material around titanium and bioactive glass implants in the medullar space of the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:96-102.
48. Hench LL, Wilson J. Surface active biomaterials. *Science* 1984;226:630-636.
49. Andersson ÖH, Liu G, Karlsson KH, Niemi L, Miettinen J, Juhanaja J. In vivo behaviour of glasses in the SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅-Al₂O₃-B₂O₃ system. *J Mater Sci: Mater Med* 1990a; 1:219-227.
50. Ito G, Matsuda T, Inoue N, Kamegai T. A histological comparison of the tissue interface of bioglass and silica glass. *J Biomed Materials Res* 1987;21:485-497.
51. Andersson ÖH, Karlsson KH, Kangasniemi K. Calcium phosphate formation at the surface of bioactive glass in vivo. *J Non-Cryst Solids* 1990b;119:290-296.
52. Hench LL. Bioactive ceramics. *Ann NY Acad of Sci* 1988;523:54-71.
53. Gatti AM, Valdre G, Andersson ÖH. Analysis of the in vivo reactions of a bioactive glass in soft and hard tissue. *Biomaterials* 1994;15:208-212.
54. Tadjoeidin ES, De Lange GL, Lyaruu DM, Kuiper L, Bruger EH. High concentrations of bioactive glass material (BioGran) vs. autogenous bone for sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:428-436.
55. Turunen T, Peltola J, Yli-Urpo A, Harpponen RP. Bioactive glass granules as a bone adjunctive material in maxillary sinus floor augmentation. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:135-141.
56. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH. Cells of bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation. *Physiol Rev* 1986;66: 855-886.
57. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289:1501-1504.

58. 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* 2002;99:9656-9661.
59. 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* 1993;293:317-326.
60. 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* 1994;76:827-838.
61. 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* 1996;13:273-289.
62. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998;16:247-252.
63. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998;346:26-37.
64. 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* 1999; 81:1717-1729.
65. 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* 1999;13:1025-1036.

66. Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducky P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bone of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 1998;23:187-196.
67. Busch O. Guided tissue regeneration and local delivery of insulinlike growth factor I by bioerodible polyorthoester membranes in rat calvarial defects. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:498-505.
68. Zanchetta P, Lagarde N, Guezennec J. Systemic effects on bone healing of a new hyaluronic acid-like bacterial exopolysaccharide. *Calcif Tissue Int* 2003;73:232-236.
69. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986;205:299-308.
70. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model, to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990; 1:60-68.
71. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regeneration materials. *J Craniofac Surg* 1998; 9:310-316.
72. Melo LG, Nagata MJ, Bosco AF, Ribeiro LL, Leite CM. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:683-691.
73. Drissens FC, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP. Osteotransductive bone cements. *Proc Inst Mech Eng [H]* 1998;212:427-435.
74. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611.
75. 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* 1999;5:623-628.

76. Mayr-Wohlfart U, Walternberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotatic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 2002;30:472-477.
77. Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ. Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res* 2004;83:204-210.
78. Leach JK, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ. Coating of VEGF- releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 2006;27:3249-3255.
79. 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* 2000;473:161-164.
80. 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* 1999;190:293-298.
81. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
82. Gaggero E, Gangji V, Canalis E. Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* 1998;102:2106-2114.
83. Pereira RC, Economides AN, Canalis E. Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts. *Endocrinology* 2000;141:4558-4563.
84. Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins: an update on basic and clinical relevance. *J Orthop Res* 1999;17:269-278.

85. Yoon ST, Boden SD. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clin Orthop Relat Res* 2002;395:33-43.
86. 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* 2002;31:303-312.
87. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003;425:577-584.
88. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs and cbfa1. *Endocr Rev* 2000;21:393-411.
89. King GN, Cochran DL. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol* 2002;73:925-936.
90. Bergman SA, Litkowski LJ. Bone in fill of non-healing calvarial defects using particulate bio-glass and autogenous bone. In: Wilson J, Hench LL, Greenspan DC. *Proc 8th Int Symp Ceramics Med: Bioceramics*. Oxford, London: Pergamon/Elsevier Science, 1995:17-21.
91. Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT. Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the osf2 transcription factor. *J Biol Chem* 1998a;273:32988-32994.
92. Camilleri S, MacDonald F. Runx2 and dental development. *Eur J Oral Sci* 2006;114:361-373.
93. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-754.
94. 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* 1998;273:10647-10657.
95. Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G. Cbfa1 contributes to the osteoblasts-specific expression of Type I collagen genes. *J Biol Chem* 2001;276:7101-7107.
 96. 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* 2004;279:41998-42007.
 97. 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* 2004;119:555-566.
 98. 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* 2005;280:2788-2796.
 99. 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* 1998;69:353-363.
 100. 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* 2000;184:341-350.
 101. 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* 2002;22:7982-7992.
 102. Ducy P. Cbfa1 a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 2000;219:461-471.

103. 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* 1999;65:1268-1278.
104. Malaval L, Liu F, Roche P, Raynal C, Fleisch H. In: Cohn DV, Gennari C, Tashjan AH (eds). *Calcium regulating hormones and bone metabolism*. Amsterdam: Elsevier, 1992:203-205.
105. Hauschka PV, Frenkel J, De Muth R, Gundberg CM. Presence of osteocalcin and related higher molecular weight 4-carboxyglutamic acid-containing proteins in developing bone. *J Biol Chem* 1983;258:176-182.
106. Owen TA, Bortell R, Yocum SA, Smock SL, Zhang M, Abate C, Shalhoub V, Aronin N, Wright KL, van Wijnen AJ, Stein JL, Curran T, Lian JB, Stein GS. Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by fos-jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9990-9994.
107. McLaren KW, Lo R, Grbavec D, Thirunavukkarasu K, Karsenty G, Stifani S. The mammalian basic helix loop helix protein HES-1 binds to and modulates the transactivating function of the runt-related factor Cbfa1. *J Biol Chem* 2000;275:530-538.
108. Gutierrez S, Javed A, Tennant DK, Van Rees M, Montecino M, Stein GS, Stein JL, Lian JB. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *J Biol Chem* 2002;277:1316-1323.
109. Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zamboni G, Baldini N, Vergnaud P, Delmas PD, Zallone AZ. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of

matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* 1994;127:1149-1158.

110. Liggett WHJr, Lian JB, Greenberger JS, Glowacki J. Osteocalcin promotes differentiation of osteoclast progenitors from murine long-term bone marrow cultures. *J Cell Biochem* 1994;55:190-199.
111. Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 1991;45:292-302.
112. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteoclastin-deficient mice. *Nature* 1996;382:448-452.
113. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res* 1983;174:28-42.

Figuras

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	++	-
	VB	++++++	-
	ENX VB	+++	-
BMP2	CONT	+++	++++++
	ENX	+	+
	VB	+++	++++
	ENX VB	+	+
CBFA1	CONT	++++	++++++
	ENX	+	++
	VB	++++	++++++
	ENX VB	+	+
OCN	CONT	+++	++++++
	ENX	+	+
	VB	+++	++++++
	ENX VB	+	+

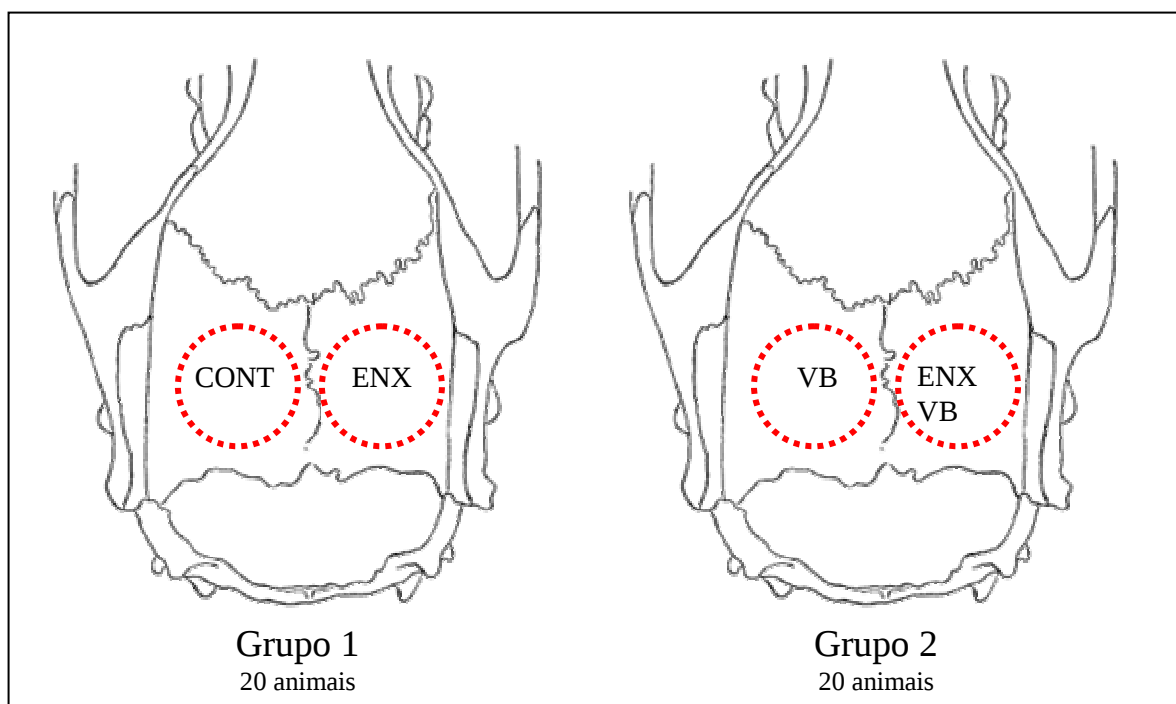


Fig 1 Esquema do procedimento cirúrgico. Defeitos cirúrgicos localizados bilateralmente nos ossos parietais com os respectivos tratamentos recebidos nos Grupos experimentais.

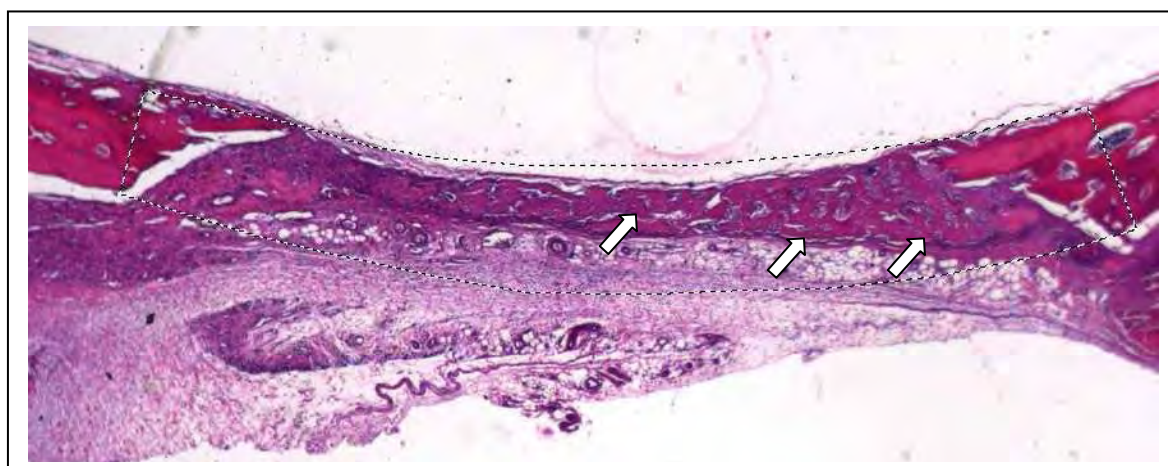


Fig 2 Delimitação da AT (linha tracejada), respeitando os critérios estabelecidos, através do Programa Imagelab 2000[®]. No interior da AT observa-se o osso neoformado (setas). HE (original 2,5x)

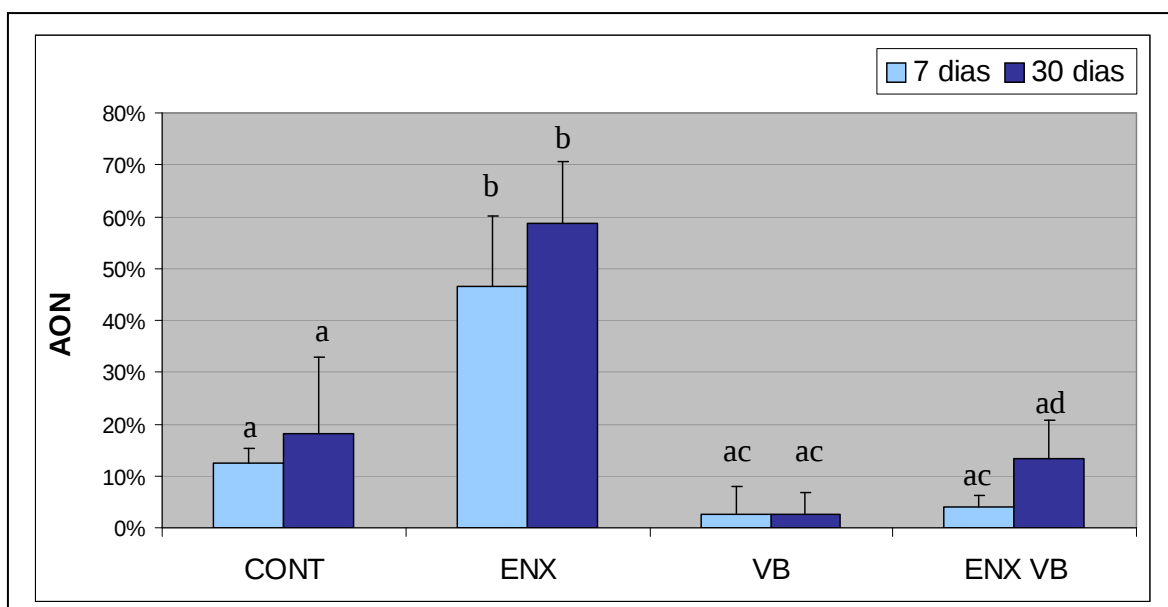


Fig 3 AON nos Grupos experimentais. As letras sobre as barras são comparativos entre os grupos. A presença de uma letra diferente denota significância estatística entre os resultados obtidos nos grupos comparados. ($P < 0,05$) Teste de análise de variância e de Tukey *post hoc*.

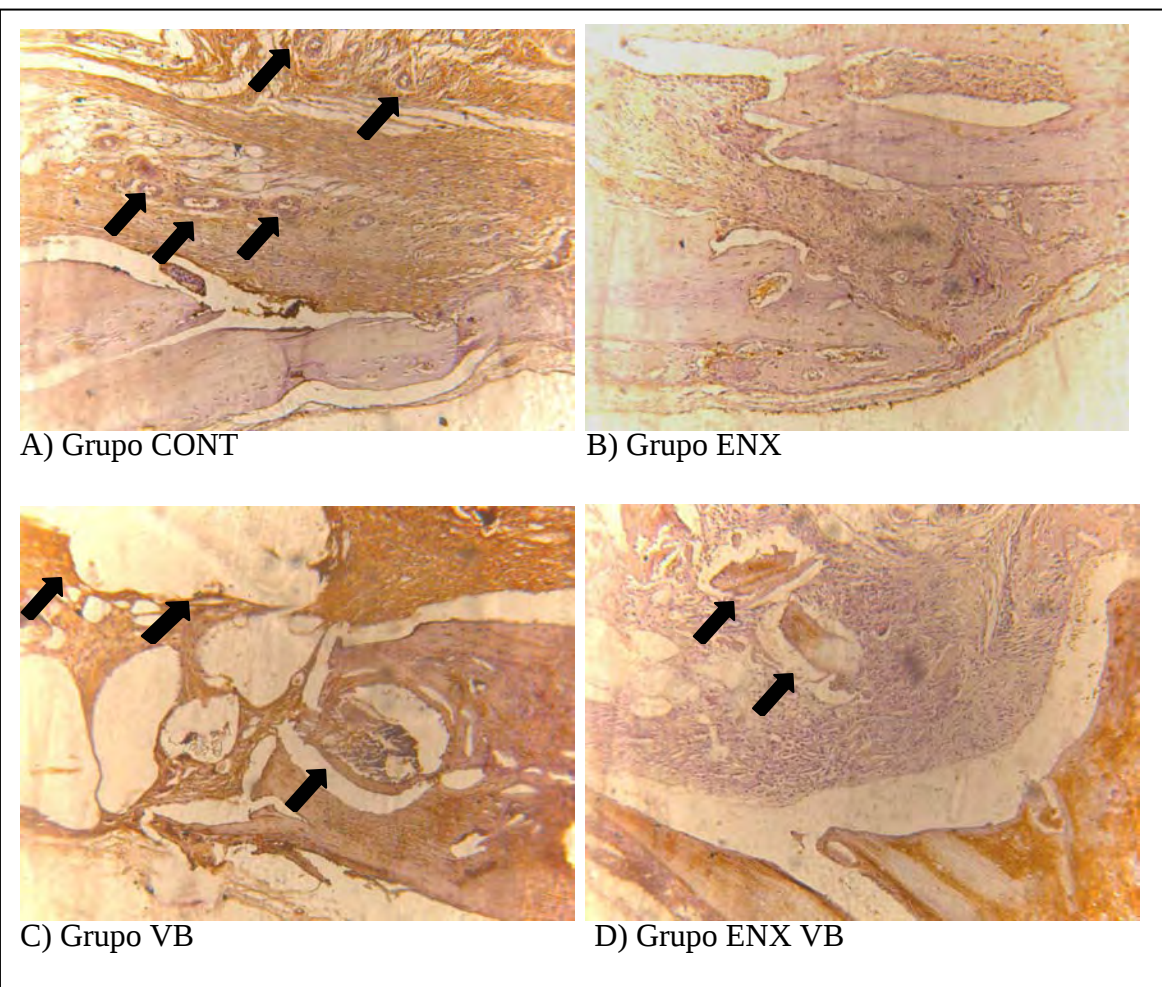


Fig 4 Expressão da proteína VEGF aos 7 dias nos 4 Grupos experimentais.
(Original 160 X)

- 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.
- C) As áreas em marrom representam a intensa marcação da proteína em uma das bordas do defeito, circundando as partículas do VB (setas).
- D) As partículas de osso autógeno (setas) aparecem imersas em áreas sem expressão da VEGF, em uma das bordas do defeito.

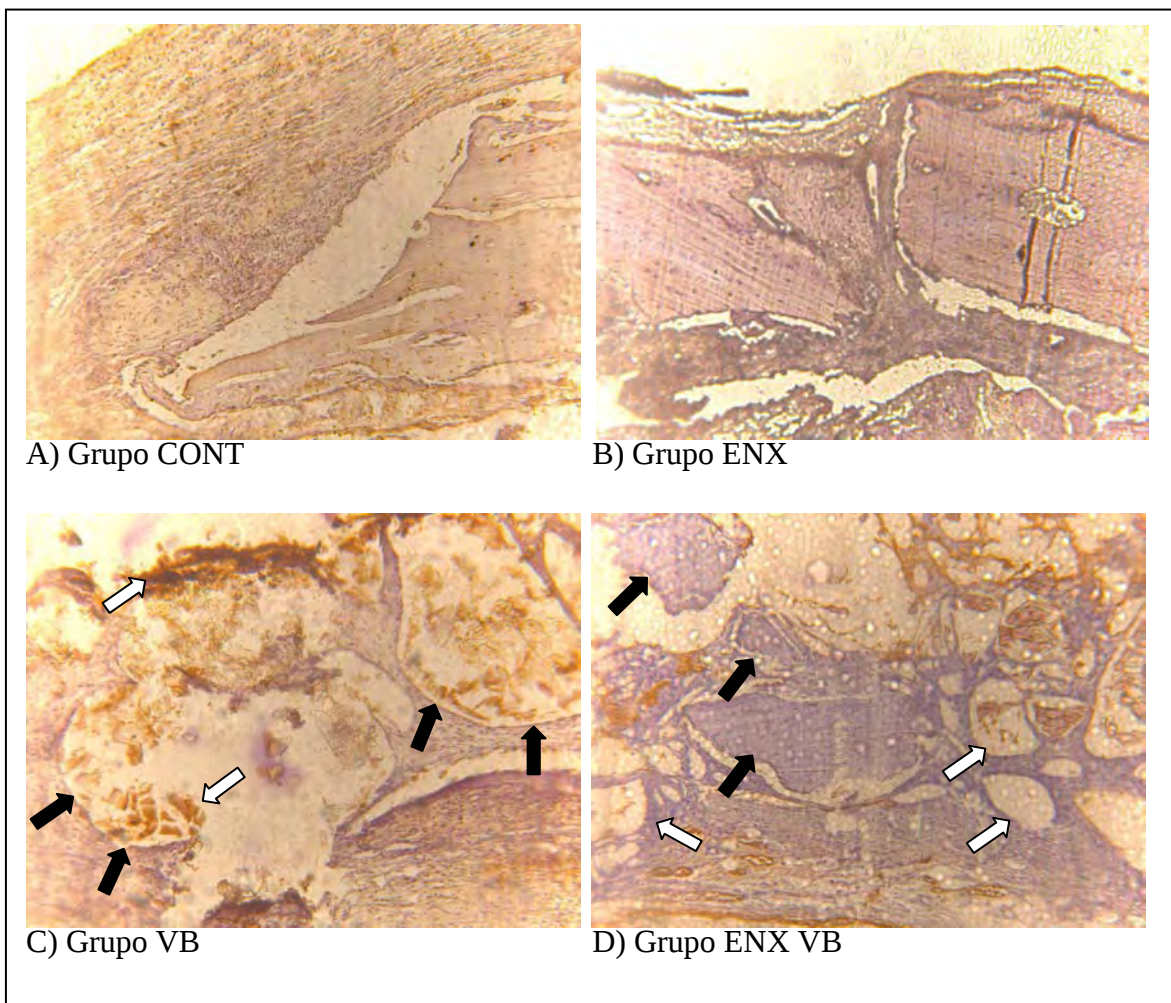


Fig 5 Expressão da proteína BMP2 aos 7 dias nos 4 Grupos experimentais.
(Original 160 X)

- 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.
- C) Os pequenos espaços entre as partículas do VB (setas escuras) aparecem com discreta expressão da BMP2. As regiões marcadas com um marrom mais escuro (setas claras) aparentemente dentro dos grânulos do VB são consideradas como marcações inespecíficas, não representando presença da proteína.
- D) Partículas do osso autógeno (setas escuras) entremeadas com partículas do VB (setas claras), imersas em áreas ausentes de marcações. As regiões marcadas com um marrom mais escuro são consideradas como marcações inespecíficas, não representando presença da proteína.

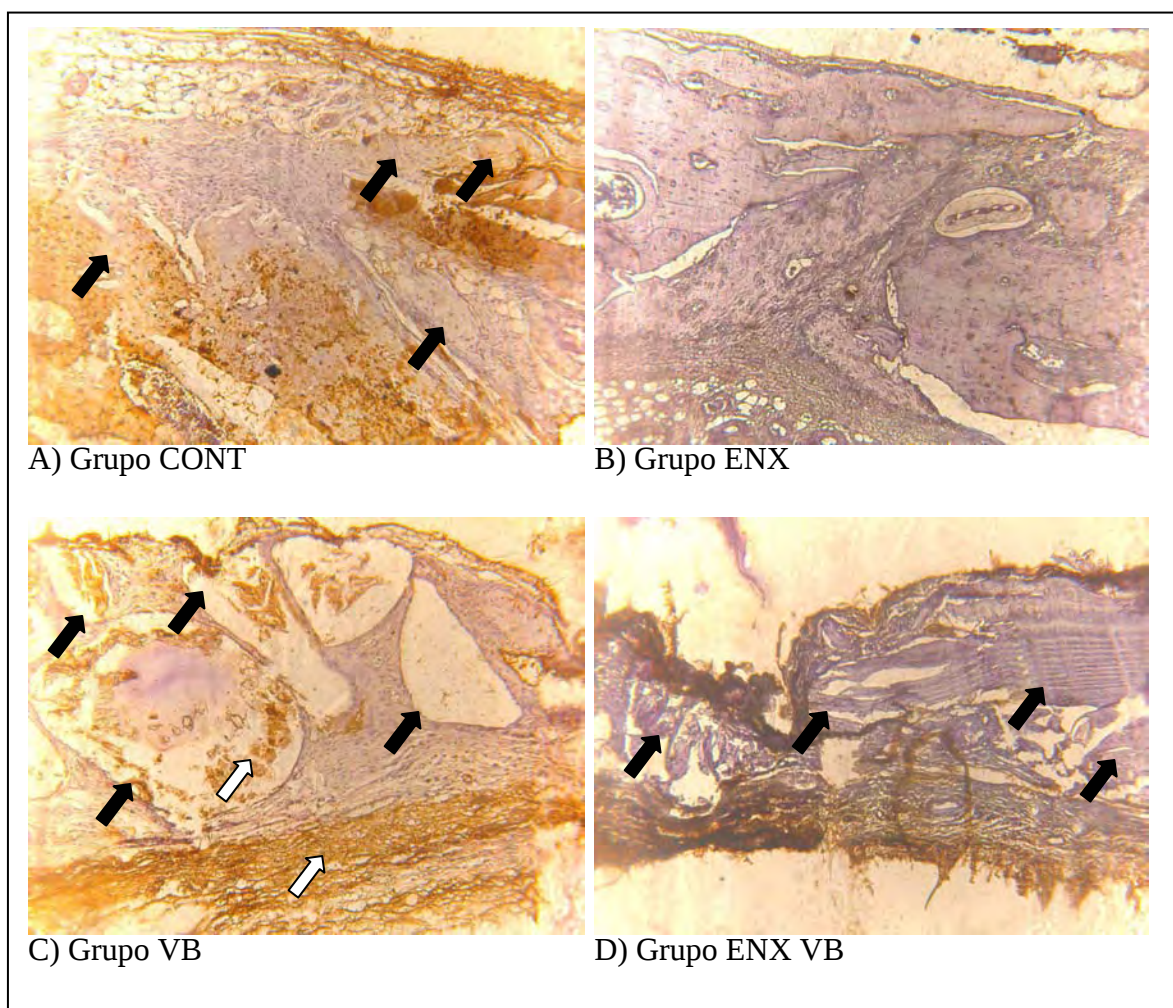


Fig 6 Expressão da proteína CBFA1 aos 7 dias nos 4 Grupos experimentais.
(Original 160 X)

- 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.
- C) Partículas do vidro bioativo (setas escuras) imersas em área de moderada expressão da proteína. As regiões de marrom mais escuro (setas claras) não são consideradas como marcações.
- D) Regiões do centro do defeito onde a presença do osso autógeno (setas) causou a supressão das marcações.

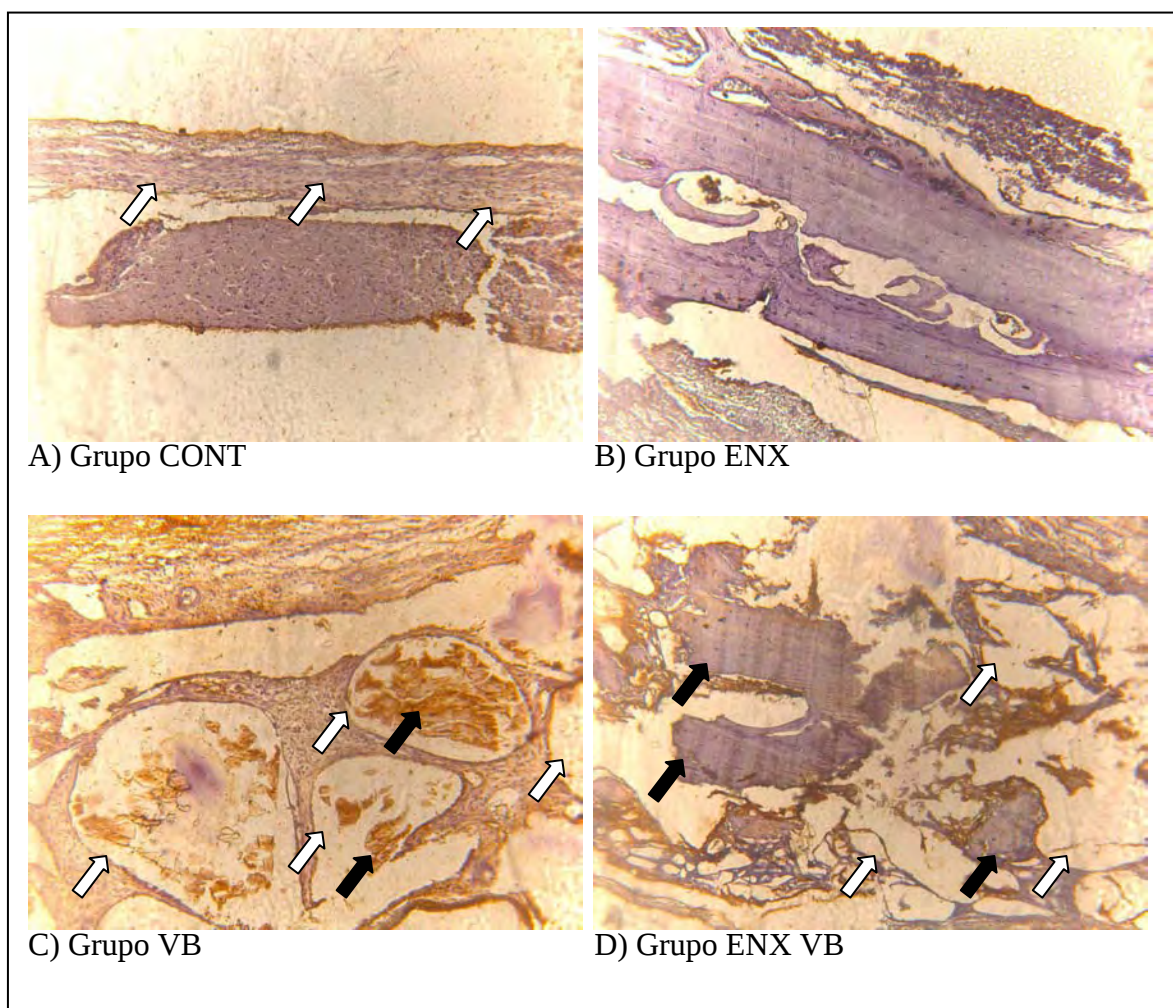


Fig 7 Expressão da proteína OCN aos 7 dias nos 4 Grupos experimentais.
(Original 160 X)

- A) Discretas marcações da OCN na região central do defeito (setas).
- B) Ausência total de marcações.
- C) Partículas do vidro bioativo (setas claras) imersas em área de discreta expressão da proteína. As regiões de marrom mais escuro (setas escuras) são consideradas marcações inespecíficas
- D) Partículas do vidro bioativo (setas claras) entremeadas às partículas de osso autógeno (setas escuras) em áreas sem expressão da proteína.

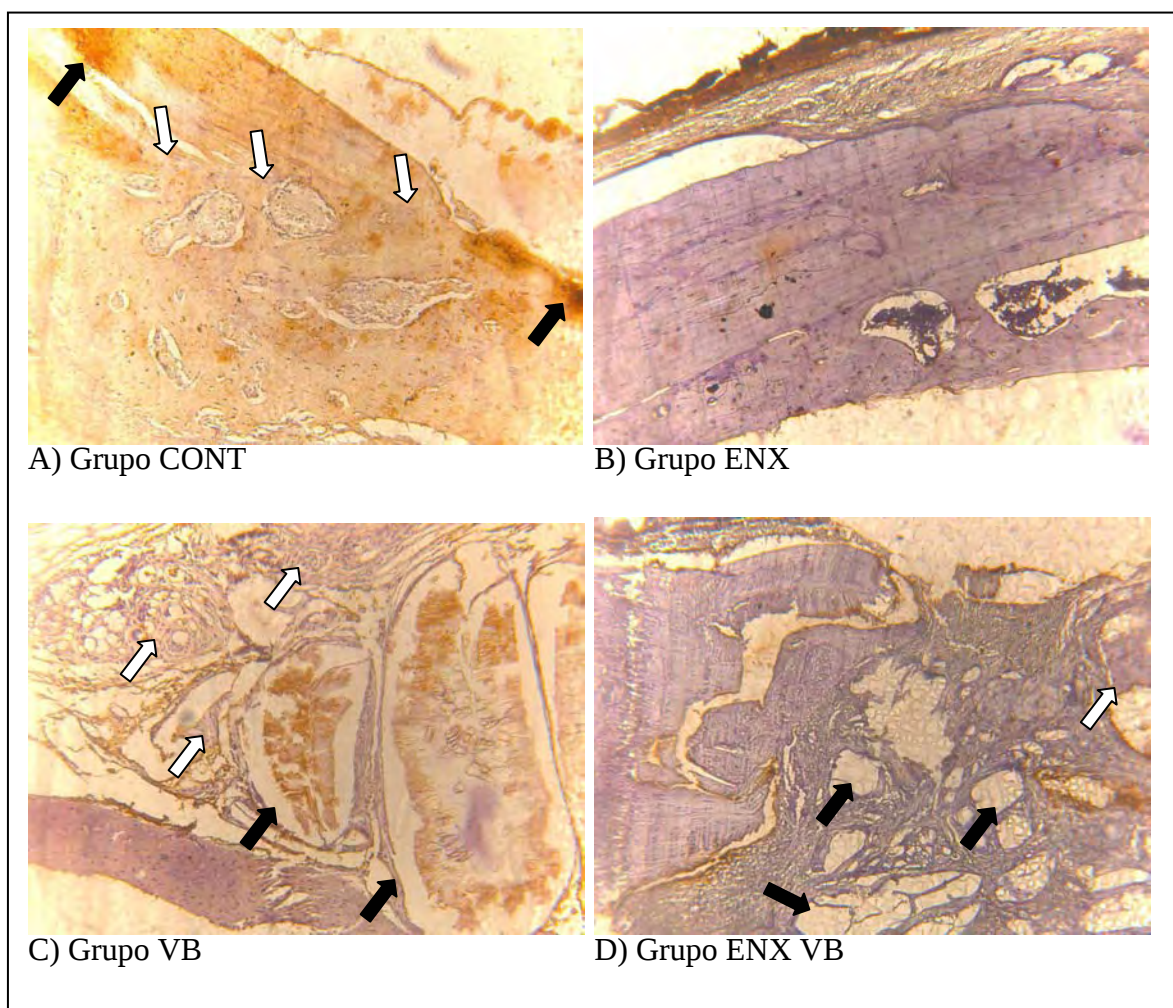


Fig 8 Expressão da proteína BMP2 aos 30 dias nos 4 Grupos experimentais.
(Original 160 X)

- 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.
- C) A moderada expressão da proteína (setas claras) apresenta-se entremeadas pelas partículas do vidro bioativo (setas escuras). As regiões de marrom mais escuro no interior dos grânulos de vidro bioativo são consideradas marcações inespecíficas.
- D) Ausência de expressão da BMP2. Em uma das bordas do defeito, as partículas do vidro bioativo (setas escuras) encontram-se entremeadas às partículas do osso autógeno (seta clara).

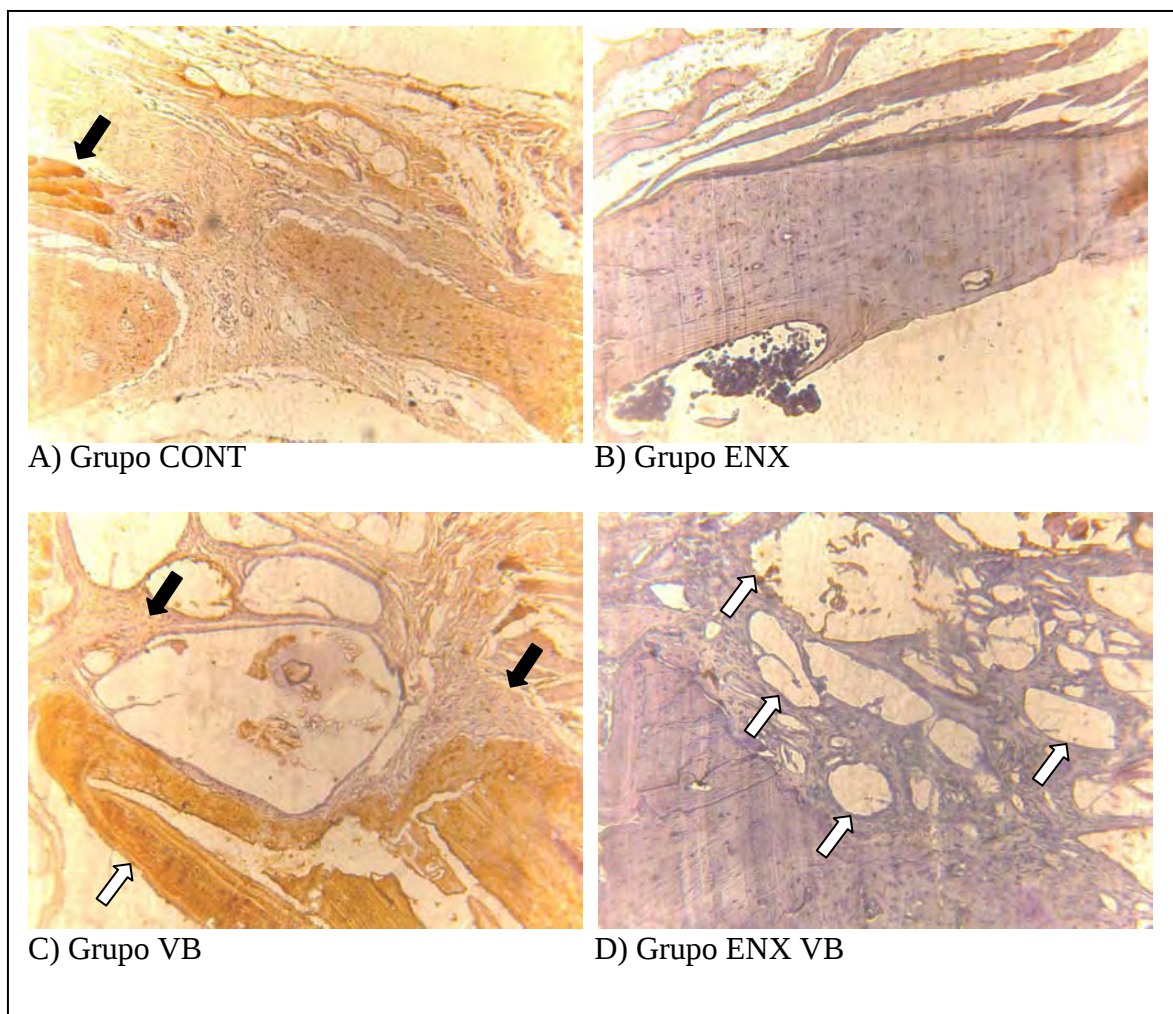


Fig 9 Expressão da proteína CBFA1 aos 30 dias nos 4 Grupos experimentais.
(Original 160 X)

- 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.
- C) As áreas apontadas pelas setas escuras representam as intensas marcações localizadas entre as partículas do vidro bioativo. A seta clara mostra uma das bordas do defeito.
- D) Os grânulos do vidro bioativo (setas) encontram-se entremeados por pequenas áreas sem expressão da proteína em uma das bordas do defeito.

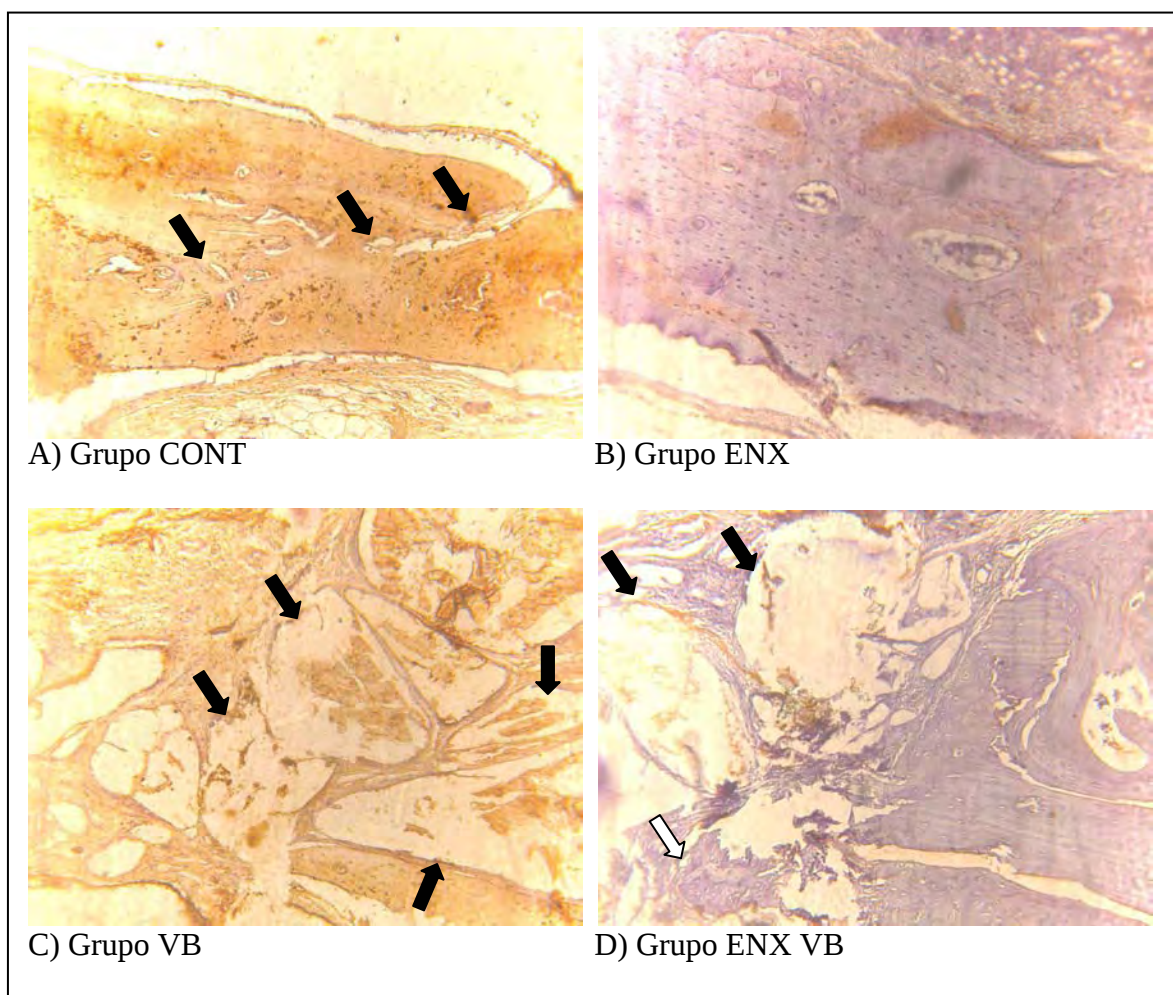


Fig 10 Expressão da proteína OCN aos 30 dias nos 4 Grupos experimentais.
(Original 160 X)

- A) As áreas intensamente marcadas revelam a presença de osso neoformado maduro. As setas mostram os limites de uma das bordas do defeito e, logo abaixo, o osso formado.
- B) Ausência total de imunomarcações no centro do defeito.
- C) Os grânulos do vidro bioativo (setas) estão entremeados em uma área de marcações pouco intensas.
- D) Ausência total de marcações em uma área onde as partículas do vidro bioativo (setas escuras) estão misturadas às do osso autógeno (setas claras). Pelo lado direito, nota-se uma das bordas do defeito.

Anexos

Anexo A

Normas para publicação segundo o Periódico

“The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants”

Author Guidelines

Submit manuscripts via JOMI's online submission service:

www.manuscriptmanager.com/jomi

Manuscripts should be uploaded as a PC Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document. *No paper version is required.*

Acceptable material.

Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles concerned with reports of basic or clinical research, clinical applications of implant research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant field are invited.

Number of authors.

Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial chairman.)

Review/editing of manuscripts.

Manuscripts will be reviewed by the editorial chairman and will be subjected to blind review by the appropriate section editor and editorial staff consultants with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

Adherence to guidelines.

Manuscripts that are not prepared according to these guidelines will be returned to the author before review.

MANUSCRIPT PREPARATION

- The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36–47). See www.icmje.org.

Anexo A

-
- **Manuscripts** should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.
 - **Title page.** Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.
 - **Abstract/key words.** Page 2 of the manuscript should include the article title, a maximum of 300-word abstract, and a list of key words not to exceed 6. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following sections: (1) Purpose, (2) Materials and Methods, (3) Results, and (4) Conclusions. Abstracts for all other types of articles (ie, literature reviews, clinical reports, technologies, and case reports) should not exceed 250 words and need not be structured.
 - **Introduction.** Summarize the rationale and purpose of the study, giving only pertinent references. Clearly state the working hypothesis.
 - **Materials and Methods.** Present materials and methods in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.
 - **Results.** Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize only important observations.
 - **Discussion.** Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Relate observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations.
 - **Conclusions.** Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not adequately supported by the data. In particular, authors should avoid making statements on economic benefits and costs unless their manuscript includes the appropriate economic data and analyses. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such.
 - **Acknowledgments.** Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
 - **Abbreviations.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
 - **Trade names.** Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name, city, state, and country should be included parenthetically at first mention.

REFERENCES

- All references must be cited in the text, numbered in order of appearance.
- The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.
- Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
- Avoid using abstracts as references.

- Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

Journal reference style:

1. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: A 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987;2:69-75.

Book reference style:

1. Skalak R. Aspects of biomechanical considerations. In: Brånemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T (eds). *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence, 1985:117-128.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

- All illustrations must be numbered and cited in the text in order of appearance.
- Illustrations and tables should be embedded in a PC Word document.
- All illustrations and tables should be grouped at the end of the text.
- Original slides or high-resolution images must be sent to the Publisher's office upon acceptance of the article.
- *Note that article acceptance is pending the receipt of acceptable original art.*

Black & white—Submit three sets of high-quality glossy prints. Should the quality prove inadequate, negatives will be requested as well. Photographs should be unmounted and untrimmed.

Radiographs—Submit the original radiograph as well as two sets of prints.

Color—Color is used at the discretion of the publisher. No charge is made for such illustrations. Original slides (35-mm transparencies) must be submitted, plus two sets of prints made from them. When a series of clinical images is submitted, tonal values must be uniform. When instruments and appliances are photographed, a neutral background is best.

Drawings—Figures, charts, and graphs should be professionally drawn and lettered large enough to be read after reduction. High-resolution (at least 300 dpi) laser-printed art is acceptable (no photocopies, please); also provide electronic file if possible.

Electronic Files—May be accepted if original figures (as specified above) are unavailable. Resolution must be at least 300 dpi; files saved in .tiff or .eps format are preferred.

Legends—Figure legends should be grouped on a separate sheet and typed double-spaced.

MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (published in issues 1 and 4 and accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and faxed to the JOMI Manuscript Editor (630 736 3634)

PERMISSIONS AND WAIVERS

- [Permission of author and publisher](#) must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons. When such waivers are not supplied, faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Manuscript Editor (630 736 3634).

REPRINTS

If reprints are desired, they may be ordered from the publisher. Authors receive a discount of 40% on quantities of 100 or 200 reprints.

Anexo B

Autorização do Comissão de Ética na experimentação animal (CEEa)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEa)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE CAVIDADES PREENCHIDAS COM VIDRO BIOATIVO E UMA ASSOCIAÇÃO DE VIDRO BIOATIVO E OSSO AUTÓGENO: ANÁLISES HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA EM RATOS" sob responsabilidade de MARCOS HEIDY GUSKUMA, EDUARDO HOCHULI VIEIRA, IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR e ROBERTA OKAMOTO está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEa em reunião ordinária de 22 de junho de 2006, de acordo com o protocolo nº 30/06.

Araçatuba, 22 de junho de 2006.

Prof.^a Ass. Dr.^a Maria Gisela Laranjeira
Presidente