

RICARDO DE OLIVEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA FIBRONECTINA NA
REPARAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS NA CALVÁRIA DE RATOS UTILIZANDO
MEMBRANA DE ALLUMINA®**

CAMPINAS
2009

RICARDO DE OLIVEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA FIBRONECTINA NA
REPARAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS NA CALVÁRIA DE RATOS UTILIZANDO
MEMBRANA DE ALLUMINA®**

Dissertação apresentada ao Centro de Pós-Graduação / C.P.O. São Leopoldo Mandic, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Thomaz Wassall.

CAMPINAS
2009

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"

Si586a Silva, Ricardo de Oliveira.
Avaliação histológica e imunoistoquímica da fibronectina na reparação óssea de defeitos na calvária de ratos utilizando membrana de Alumina[®] / Ricardo de Oliveira Silva. – Campinas: [s.n.], 2009.
49f.: il.

Orientador: Thomaz Wassall.
Dissertação (Mestrado em Implantodontia) – C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação.

1. Imunoistoquímica. 2. Fibronectinas. 3. Óxido de alumínio. 4. Implante dentário. I. Wassall, Thomaz. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação. III. Título.

**C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS
SÃO LEOPOLDO MANDIC**

Folha de Aprovação

PARA: Ricardo de Oliveira Silva

Curso: Mestrado em Odontologia - área de concentração Implantodontia

Título da Dissertação: "AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA FIBRONECTINA NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS NA CALVÁRIA DE RATOS UTILIZANDO MEMBRANA DE ALLUMINA®"

Data defesa: 15 de junho de 2009

Informamos que aquela dissertação acima apontada foi apresentada por seu titular ao Centro de Pós-Graduação, perante a Comissão Examinadora abaixo nominada, e cumpriu todas as exigências feitas por aquela Comissão tendo sido aprovada recebido a competente liberação sob a supervisão da docência da orientação.

Campinas, 15 de junho de 2009

Prof. Dr. Thomaz Wassall.

Prof. Dr.
Membro

Profa. Dra.
Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Olício e Francisca, que com toda sua grandeza e humildade, conseguiram educar seus dez, filhos tornando-os homens e mulheres, espelhados neles, aptos para as batalhas da vida e com alegria para comemorar as conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por colocar em meu caminho grandes pessoas que me fizeram engrandecer.

Ao meu orientador prof. Dr. Thomaz Wassall, por acreditar em minha capacidade profissional, pela paciência, compreensão e ajuda.

Meus mestres: prof. Breno Carnevalli, Lúcio Sales Cândido e José Roberto Sales Cândido pela amizade, por terem me colocado nesta área tão bonita que é a Implantodontia e por terem me dado a primeira oportunidade de lecionar.

Ao prof. Dr. Ronaldo Mariano que, com sua extrema bondade e dedicação, me abriu a mente e auxiliou nos meus trabalhos científicos.

Ao meu amigo Prof. Fabiano Capato Brito pelo companheirismo e ajuda

Ao meu amigo Tarcísio Donizeti de Oliveira pelo apoio em todos estes anos.

À Profa. Dra. Cristiane Furuse que com sua experiência e dedicação, não mediu esforços para que este trabalho conseguisse êxito na sua parte laboratorial.

À acadêmica Sabrina Ferreira pela grande ajuda na parte experimental deste trabalho.

Aos meus irmãos, pelo amor e suporte sempre nas horas precisas,

Aos meus sobrinhos, pela alegria.

À Maura, pela paciência, compreensão e carinho.

A todos vocês minha profunda gratidão.

Agradeço também o Centro de Pesquisas e Faculdade São Leopoldo Mandic por me proporcionar esta graduação.

"Erros são, no final das contas, fundamentos da verdade. Se um homem não sabe o que uma coisa é, já é um avanço do conhecimento saber o que ela não é."

Carl Gustav Jung

RESUMO

A Fibronectina é uma glicoproteína presente na superfície celular e com influência na osteogênese. Este estudo objetivou avaliar a fibronectina na reparação óssea de defeitos na calvária de ratos, utilizando a membrana de Allumina por meio de análises histológica e imunoistoquímica. Para essa avaliação, foram utilizadas coloração HE para a análise histológica e reação imunoistoquímica para a marcação da fibronectina. Vinte e quatro ratos foram divididos em dois grupos de 12 animais e eutanasiados aos 30 e 60 dias. Foram realizados dois defeitos de 2mm de diâmetro na calvária de cada animal (lado controle e lado experimental). No lado experimental, a membrana foi adaptada sobre o defeito; no lado controle, apenas o preenchimento do defeito com coágulo sanguíneo. Foram observados biocompatibilidade da Allumina®, maior maturação óssea no grupo experimental em relação ao controle. No grupo experimental, a presença da membrana aumentou a expressão de fibronectina; o grupo de 30 dias apresentou maior expressão de fibronectina; houve neoformação óssea além do envelope esquelético em alguns casos do grupo experimental, e o defeito de 2 mm, bicortical, mostrou ser um defeito crítico.

ABSTRACT

Fibronectin is a glycoprotein found at cell surface, which takes part in Osteogenesis. The aim of the present study was to evaluate fibronectin in healing patterns of rat calvarial bone defects using Allumina membrane. Histologic (hematoxylin-eosin) and imunohistochemical analyses for fibronectin targeting were performed. Twenty four rats were divided into two groups of twelve and were euthanized at 30 or 60 days. Bilateral calvaria defects with 2mm of diameter were produced in each animal (experimental and control side). At the experimental side, the Allumina membrane was adapted over the defect; at the control side, the defects were filled only with blood clots. Biocompatibility of Allumina Membranes was noted, as well as improved bone maturation at the experimental side. Fibronectin expression was enhanced by the presence of the membrane (experimental group); higher fibronectin expression was observed for the 30-day group. Bone neoformation beyond the esqueletal flap was seen in some cases of the experimental group and the 2 mm defect, biocortical, has shown to be critical.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	- Unidade de medida equivalente a 10^{-6} m
Al_2O_3	- Alumina
BC	- Defeito bicortical
FN	- Fibronectina
HE	- hematoxilina e eosina
LC	- Lado controle
LE	- Lado Experimental
MC	- Defeito monocortical
MEC	- Matriz extracelular
mm	- Unidade de medida equivalente a 10^{-3} m
PTFE	- Politetrafluoretileno
PTFE-e ou e-PTFE	- Politetrafluoretileno expandido
ROG	- Regeneração óssea guiada
RTG	- Regeneração tecidual guiada
SLA	- (<i>sandblasted large particles + acid attack</i>) Jateamento com partículas grandes mais ataque ácido

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ato cirúrgico	26
Figura 2 - Ato Cirúrgico	27
Figura 3 - Espécimes 30 dias HE	32
Figura 4 - Avaliação histológica descritiva Hematoxilina Eosina.....	34
Figura 5 - Espécimes 30 dias imunistoquímica	36
Figura 6 - Espécimes 60 dias Imunistoquímica.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 A Regeneração Óssea Guiada	13
2.2 As proteínas de adesão	19
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Avaliação histológica descritiva	31
5.2 Trinta dias	31
5.3 Sessenta dias	33
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS	49

1 INTRODUÇÃO

Na Implantodontia, assim como em outras áreas da Odontologia, considera-se a quantidade e qualidade óssea adequadas para a reabilitação do paciente. Quando há deficiência óssea, recorre-se à aplicação de técnicas para aumento desse tecido, entre estas, a regeneração tecidual guiada (RTG) e a regeneração óssea guiada (ROG).

A partir dos trabalhos de Nyman et al. (1982) e Dahlin et al. (1989), foram definidos os termos RTG, para tratamentos de defeitos periodontais e, ROG, para defeitos ósseos não periodontais.

O princípio da ROG é melhorar as condições para a instalação dos implantes, favorecendo a estética e o aumento dos rebordos alveolares. Os pioneiros dessa técnica, Campbell & Basset, em 1956, descreveram a aplicação clínica de barreiras físicas por meio do uso de filtros laboratoriais (Millipore Filter) no tratamento cirúrgico de lesões em nervos periféricos, isolando as extremidades lesadas e formando um túnel para se evitar a formação de neuromas.

Além das regenerações, foram iniciados, nos últimos anos, vários estudos sobre os componentes da matriz extracelular e seu comportamento na fisiologia dos tecidos. Os componentes da matriz extracelular são muito importantes na regulação do comportamento celular durante o desenvolvimento embriológico dos tecidos, bem como na manutenção das funções normais e na patologia.

No osso, a importância da matriz extracelular na regulação das células foi durante muito tempo ofuscada pelo fato de que o seu conteúdo mineral cumpre a principal função do órgão, isto é, proporcionar um rígido suporte para os tecidos

moles.

Como vários estudos já demonstraram que a Allumina® é biocompatível, utilizamos esta para a verificação da neoformação óssea e a marcação da glicoproteína fibronectina em defeitos ósseos na calvária de ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Regeneração Óssea Guiada

O principal obstáculo para a regeneração dos tecidos mineralizados é a formação mais rápida de tecido conjuntivo, quando comparada à osteogênese.

Melcher & Dreyer, em 1962, publicaram a importância da preservação do coágulo para a regeneração tecidual, utilizando uma barreira limitante durante o processo de cicatrização para proteção. Com isso, descreveram as vantagens de utilizar as membranas artificiais para proteção, conformação e estabilização do coágulo e contra a invasão de células indesejáveis.

Gottlow et al. em 1984, obtiveram, em um estudo realizado em macacos, nova inserção periodontal com formação de cemento e ligamento periodontal sobre raízes previamente expostas, desnudadas e sujeitas ao biofilme dental. As raízes foram preparadas e a cicatrização controlada por intermédio do isolamento com membranas de acetato de celulose (Millipore Filter, type GS: Millipore SA, 67 Monshein, France) ou polifluortetraetileno expandido (PTF-E Gore-Tex. W.L. Gore & Ass. Inc., Flagstaff, Arizona, USA).

Em 1988, Dahlin et al. relataram um estudo em ratos, no qual foi produzido um defeito ósseo bilateral na mandíbula. No lado controle, nada foi feito a não ser a reposição do retalho. No lado teste, foi realizada a cobertura do defeito com membrana PTF-E (Gore-Tex). Os resultados obtidos pelas análises microscópicas e histomorfométricas mostraram que nos defeitos protegidos ocorreu osteogênese completa após seis semanas, enquanto no grupo controle houve

invasão de tecido conjuntivo fibroso e, em alguns, apenas pequeno crescimento ósseo nas margens do defeito, diminuindo seu diâmetro.

Devido às diferenças de velocidade de divisão e de diferenciação celular dos diferentes tecidos, o tecido conjuntivo frouxo e o tecido epitelial competem com vantagem com o osso ou com outros tecidos, como o ligamento periodontal, por exemplo, e impedem a regeneração destes últimos (Campbell, Basset, 1956; Melcher, Dryer, 1962; Boyne, 1964, 1969; Nyman et al., 1982; Lang et al., 1997).

Sabe-se, por meio de experimento *in vitro*, que os fibroblastos, além de ocuparem o espaço da célula óssea, produzem um ou mais fatores inibitórios da osteogênese e da diferenciação celular óssea (Ogiso et al., 1991).

A exclusão de tecidos indesejáveis da região onde se deseja formar um tecido específico é o princípio básico da regeneração guiada. O objetivo é permitir que apenas células com capacidade regenerativa tenham acesso à região (Lang et al., 1997).

No caso do tecido ósseo, essa exclusão é feita naturalmente pelo periósteo (Walter et al., 1995) ou, artificialmente, por barreiras intencionalmente aplicadas.

Schimtz et al. (1990) analisaram, por microscopia de luz e eletrônica de transmissão, o reparo de defeitos ósseos na calvária de ratos com diâmetros de 3, 4, e 8 mm. Os autores relataram que apenas os defeitos de 3 e 4 mm regeneraram, apresentando maior formação óssea. No defeito de 8 mm, observou-se apenas a formação óssea, na periferia da lesão, enquanto na região central formou-se uma união não óssea de tecido conjuntivo fibroso.

A técnica da Renegeração Óssea Guiada (ROG) baseia-se no princípio de que os diferentes componentes celulares do tecido tenham índices variados de migração durante o reparo ósseo. Por intermédio da colocação de uma barreira física sobre o defeito, células indesejáveis são excluídas do local a sofrer reparo, com a proliferação das células osteoprogenitoras favorecida. A associação das barreiras físicas aos materiais de preenchimento parece favorecer os resultados da ROG e os efeitos dos materiais de preenchimento (Linde et al., 1993).

O processo regenerativo do tecido ósseo pode ainda ser conduzido além das fronteiras do osso, isto é, além da sua forma original; basta que se criem condições fisiológicas para tal (Kostopoulos, Karring, 1994; Lundgren et al., 1995; Lioubavina et al., 1999).

Lundgren et al. (1995) utilizaram uma barreira de titânio oclusiva (cúpula) para saber se a regeneração óssea poderia ser observada fora das estruturas esqueléticas naturais de coelhos. A barreira oclusiva foi posicionada na calota craniana, abaixo do periósteo de três coelhos. Dessa maneira, foi criado um espaço fechado que se limitava somente com o tecido ósseo adjacente. Após a fase de cicatrização de três meses, as amostras foram sacrificadas e a região teste foi para avaliação histológica. Os resultados mostravam um preenchimento do espaço deixado pela barreira (cúpula) sem interferência de outros tipos de tecidos. Este estudo mostrou que a utilização de uma barreira oclusiva, firme e estável, levava a uma regeneração óssea confiável até mesmo em locais onde nunca existiu osso.

Para Buser et al. (1993), a membrana PTFE-e é do tipo não absorvível. A estrutura dessa membrana não permite a penetração de células pela membrana, que é um fator importante para o seu sucesso como barreira física. Inúmeros estudos experimentais em animais demonstraram que o material da membrana é

bioinerte e permite a integração tecidual sem complicação, uma vez que se pode obter a cicatrização submersa sem o contato direto com a cavidade oral. Para indicações periodontais, o uso de membranas absorvíveis pode ter a vantagem de se evitar um segundo procedimento cirúrgico para a sua remoção. Entretanto, para os autores, o uso de membranas absorvíveis para indicações implantares não oferece essa vantagem, uma vez que os sítios cirúrgicos precisam ser reabertos de qualquer forma, tanto para a conexão do *abutment* (abordagem simultânea) quanto para colocação do implante (abordagem em etapas). Portanto há dúvidas sobre a vantagem das membranas absorvíveis sobre as não absorvíveis.

Kawahara et al. (1980) usaram a alumina cristalina simples (Al_2O_3), que tem boa resistência mecânica. Ficou comprovado por meio de teste de cultura de tecidos, em experiências com animais e observações clínicas, que a alumina é um excelente material biocompatível.

Ling (1998) afirmou que a RTG com uma membrana não reabsorvível poderia ser usada para o tratamento de várias lesões tendo um papel importante na implantodontia e estética.

Em 1993, Cruz et al. desenvolveram a membrana de óxido de alumínio (Allumina®) como barreira física, não reabsorvível, para RTG e ROG. Essa membrana apresenta características de biocompatibilidade, histofilia, inocuidade, passividade, isolamento, rigidez, resistência. Os autores ainda concluíram que não obtiveram resultados negativos nos procedimentos clínicos utilizando a membrana. Essas membranas são utilizadas em 3 espessuras diferentes: 0,030 mm, 0,060 mm e 0,10 mm, denominadas fina, média e grossa, com têmpera zero. O tratamento de superfície é do tipo SLA (*sandblasted large particles + acid attack*), isto é,

jateamento com partículas grandes mais ataque ácido, usando veículo para o jateamento, o óxido de alumínio em uma granulação de 125 µm.

O óxido de alumínio é produzido industrialmente por meio da calcinação do hidróxido de alumínio, obtido a partir da purificação da bauxita. Por se tratar de um material sintético, o óxido de alumínio apresenta elevada consistência química e granulométrica, particularmente quando comparado com as fontes naturais de óxido de alumínio. Segundo o mesmo autor, a Allumina® compõe-se de um núcleo de alumínio comercialmente puro (99,35% mínimo) e da superfície de Al_2O_3 com 99,48% de composição mínima. É um material cerâmico com características físico-químicas de biocompatibilidade semelhantes ao óxido de titânio e ao óxido de tântalo. Esses materiais, ao serem obtidos, formam espontânea e rapidamente uma espessura de óxido que varia de 3 a 5 µm à temperatura ambiente. Babbush et al. (1987) e Jaef et al. (1987) descreveram que esses óxidos, como compostos cerâmicos, possuem propriedades como inércia química à corrosão, constante elétrica alta, capacidade de adsorção de biomoléculas, diferença de potencial elétrico baixa e atividade catalisadora, que compõem um conjunto necessário à biocompatibilidade.

Albrektsson et al. (1986) e Branemark et al. (1985) comprovaram a biocompatibilidade da alumina em crescimento ósseo, crescimento de tecidos epiteliais como epitélio juncional, implantes, câmaras implantadas, etc.

Germain et al. (2003) descreveram que as partículas de alumina, clinicamente relevantes, não reduziram a viabilidade dos fibroblastos. Os resultados sugeriram que as partículas nanométricas da alumina pudessem ser citotóxicas se os suficientes volumes incorporassem nas células, possivelmente devido à liberação

do íon. Porém a alumina está normalmente em um estado de partículas grandes e o material é estável.

A citotoxicidade da alumina foi avaliada também por Epure et al. (2007). Os produtos da degradação eram menos tóxicos em baixas concentrações do extrato (10, 50%) do que na concentração 100%. A viabilidade da célula foi influenciada pelo tamanho da partícula de óxido. Oliveira et al. (1999) avaliando a RTG, utilizaram a barreira física de óxido de alumínio para observar a eficácia da mesma no tratamento de lesões de furca do tipo classe II em molares inferiores de humanos. Por meio desse estudo, pôde-se concluir que a membrana de óxido de alumínio mostrou-se eficaz no tratamento de lesões de furca do tipo classe II em molares inferiores.

Majluf et al. (2001) investigaram o comportamento da membrana de óxido de alumínio (Allumina®), ao ser inserida por um período de seis meses, após a exodontia dos terceiros molares inferiores, em sete pacientes. Foram realizadas radiografias de análise digitais de imagens (morfometria) com a finalidade de se medir a densidade óssea. Concluíram que a Allumina® cumpriu as funções de barreira artificial, biocompatibilidade e promoveram uma significativa melhora no rebordo alveolar.

Diotto (2007) constatou que a membrana de Allumina® cria condições favoráveis para ROG, não causando reações imunofisiológicas de corpo estranho aos tecidos, evidenciando boa biocompatibilidade. O atual trabalho segue alguns métodos deste último, porém avalia, além da ROG utilizando membrana de alumina, a marcação de fibronectina em reação imunoistoquímica.

2.2 As proteínas de adesão

A habilidade de contato intercelular constitui um marco na evolução de organismos multicelulares. Proteínas da superfície celular proporcionam interações entre células similares, possibilitando que populações celulares formem diferentes tecidos e órgãos.

O principal componente da matriz orgânica dos tecidos mineralizados de origem mesodérmica é o colágeno, que no osso representa aproximadamente 90% da matriz orgânica (Noda, 1993).

Assim, acredita-se que as proteínas não colágenas sejam as principais responsáveis pelas propriedades exclusivas que distinguem os vários tecidos mineralizados entre si (Sommer et al., 1996).

Elas parecem também ter um papel importante na diferenciação e na atividade das células ósseas (Nefussi et al., 1997), além de participarem no processo de mineralização (Boskey, 1998).

As proteínas não colágenas do tecido ósseo têm sido cada vez mais estudadas, com o objetivo de conhecer os minuciosos detalhes da biologia do osso e, assim, entender os mecanismos envolvidos nas suas patologias.

A existência de componentes não-colágenos foi primeiramente postulada por Herring na década de 1960 e, desde então, eles têm sido vastamente pesquisados (Robey, 1999). Essas moléculas não colágenas formam os restantes dos 10% da matriz orgânica óssea e são representados pelas fosfoproteínas (Noda, 1993; Aubin, 1998; Katchburian, Arana, 1999).

As proteínas mais abundantes da matriz orgânica, depois do colágeno I, são a osteonectina, a osteopontina, a sialoproteína óssea e a osteocalcina (Noda,

1993; Sommer et al., 1996; Nefussi et al., 1997; Sasano et al., 2000). Elas aparecem em diferentes estágios da osteogênese e se relacionam com a diferenciação osteoblástica, com a regulação do processo de mineralização e mesmo com a reabsorção óssea. Algumas dessas proteínas, tipicamente a osteocalcina e a sialoproteína óssea são, em essência, exclusivas dos tecidos mineralizados, enquanto outras, como a osteonectina e a osteopontina, têm uma distribuição mais geral (Sodek, Mickee, 2000).

A fibronectina e a tenascina são também importantes durante a embriogênese do tecido ósseo e o processo de reparo, participando da regulação desses dois eventos. Além de promoverem agregação celular, essas moléculas proteicas elaboram junções especializadas que estabilizam as ligações intercelulares, facilitando a comunicação entre células adjacentes.

As células animais ainda secretam uma malha complexa de glicoproteínas - a matriz extracelular - que possui função de suporte e funciona como importante reservatório de informações que influenciam no comportamento celular (Lodish et al., 1978).

As interações entre células e matriz extracelular (MEC) participam diretamente do controle da diferenciação celular, morfogênese, proliferação, migração e, dessa forma, exercem impacto nos processos de embriogênese, cicatrização e inflamação (Jones, Walker, 1999; Salvoni, 2006). Essa integração é parcialmente mediada por moléculas de adesão da família das integrinas (Hynes, 1992).

As integrinas foram originariamente caracterizadas como moléculas de adesão responsáveis pela ancoragem de células à matriz extracelular, porém sabe-

se hoje que essas moléculas também estão envolvidas na dinâmica de processos fisiológicos e patológicos como na transdução de sinais que altera o “status” fenotípico e comportamental das células (Hynes, 1992).

As interações adesivas entre célula e matriz extracelular são mediadas por receptores específicos da membrana celular e as integrinas representam ser o receptor de maior importância destas interações (Hynes, 1992; Crivelini et al., 1997).

A fibronectina é uma glicoproteína de alto peso molecular presente na superfície celular da matriz do conjuntivo e no plasma. É uma das moléculas adesivas mais conhecidas e tem a capacidade de ligar-se ao colágeno, ao fibrinogênio, à actina, as diversas glicosaminoglicanas, estafilococos e células eucarióticas (Ruoslahti, 1981).

A fibronectina e sua inter-relação com receptores de integrinas parecem ter papel importante em processos fisiológicos e patológicos.

Na cicatrização, a fibronectina e suas interações com integrinas exercem papel ímpar na adesão de plaquetas à matriz danificada de colágeno, além de facilitar a migração e a adesão de fagócitos e viabilizar a matriz para a proliferação celular.

A fibronectina ainda parece estar relacionada ao aumento da aderência e da quimiotaxia, auxiliando na manutenção da estrutura do citoesqueleto. É importante na neovascularização, estimulando a migração de células endoteliais e servindo de guia para o movimento de células epiteliais através do tecido de granulação.

A fibronectina também tem sua importância nos processos de embriogênese, de regeneração de fibras nervosas e de migração de células (Mohri, 1996).

A ligação de fibronectina e da tenascina às moléculas de colágeno I e III é muito importante na biologia óssea, uma vez que essas moléculas não colágenas parecem desempenhar um papel na coordenação da migração, interação e diferenciação dos precursores osteoblásticos in vivo e in vitro (Mackie et al., 1987).

As fibronectinas compreendem uma família de glicoproteínas diméricas multifuncionais envolvidas na adesão célula-célula e de célula-matriz extracelular, de migração celular, de manutenção da morfologia celular normal, de organização do citoesqueleto, de diferenciação e transformação celular (Koukoulis et al., 1993). A integrina $\alpha 5\beta 1$ é o receptor específico da fibronectina na maioria dos tipos celulares. As interações da fibronectina com esta integrina mediam respostas celulares de migração, recrutamento do citoesqueleto e da matriz extracelular (Akiyama et al., 1995). Suas funções adesivas não se resumem à manutenção da ancoragem celular à matriz.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi analisar, histologicamente, a reparação óssea e a expressão imunohistoquímica da glicoproteína fibronectina em defeitos na calvária de ratos associados à ROG com membrana de Alumina®.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic, tendo sido aprovado sob protocolo nº07/222 (Anexo A).

Foram utilizados 24 ratos machos adultos da linhagem *Wistar, Rattus Norvegicus Albinus*, procedentes do Biotério da UNIFAL (Universidade Federal de Alfenas - MG), entre 400 e 500 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas, sendo quatro por gaiola, tratados com água filtrada, autoclavada e clorada, com ração industrial, sem complemento ou dieta específica.

Os ratos foram divididos em dois grupos de 12 animais para 30 e 60 dias. No grupo de 30 dias houve óbito de um animal no período experimental.

Foram realizadas duas perfurações, uma em cada lado da calvária e um sorteio para definir o lado de cada animal: o controle (LC) e o lado experimental, ou seja, com a membrana (LE) (figuras 1b e 1d).

Os experimentos foram realizados com os animais em jejum de 12 horas e restrição hídrica de duas horas antes do procedimento cirúrgico.

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de quetamina a 5% (Dopalen[®] Vetbrands, Jacareí - SP, Brasil) e cloridrato de xilazina a 2% (Rompun[®] Bayer, São Paulo - SP, Brasil), via injeção intramuscular, sem imobilização. Os animais tiveram seus pesos aferidos em balança digital para adequação das doses anestésicas com base nos seguintes cálculos:

- a) cloridrato de xilazina a 2% (anestésico e analgésico): 6 mg/kg de peso;

b) cloridrato de quetamina a 5% (anestésico): 70 mg/kg de peso;

Os animais receberam, por injeção intramuscular, Pentabiótico® (Bayer, São Paulo, SP, Brasil), na dose de 0,01 ml por animal.

As incisões lineares, na linha média da calvária dos animais (figura 1a), foram realizadas com lâmina 15 C (Swann Morton-Sheffield, Inglaterra) em cabo de bisturi nº 3 (Schwert, Tuttlingen, Alemanha). Com auxílio de pinça Dietrich (Schwert), os tecidos foram afastados. Após a confirmação da incisão com o Dissector (Schwert), foi utilizada cureta de Molt (Schwert), para expor os ossos da calvária. Para a criação do defeito ósseo, foram utilizadas trefinas de 2 mm de diâmetro (Dentoflex- São Paulo-SP, Brasil) a 500 rpm e irrigação abundante com soro fisiológico à 0,9% (figura 1b). A porção óssea externa do defeito circular foi removida com o auxílio de curetas de dentina (Hu-Friedy, Chicago, EUA) (figuras 1c e 1d). Em seguida e após preenchimento do defeito com coágulo, foi inserida no LM uma membrana de Allumina® (Maxtron, Juiz de Fora, MG, Brasil) de espessura média (0,060 mm), com 5 mm de diâmetro e adaptada com auxílio de Brunidor (Golgran, São Paulo, SP, Brasil) (figuras 2a e 2b). O lado controle (LC) não recebeu cobertura sobre o defeito, mantendo apenas o coágulo sanguíneo em posição. O fechamento do defeito se deu em dois planos, com Fio Vicryl 5.0. (Somerville, NJ, EUA), no perióstio (figura 2c) e Fio de Nylon 5.0 (Techsuture, Bauru, SP, Brasil), superficialmente (figura 2d).

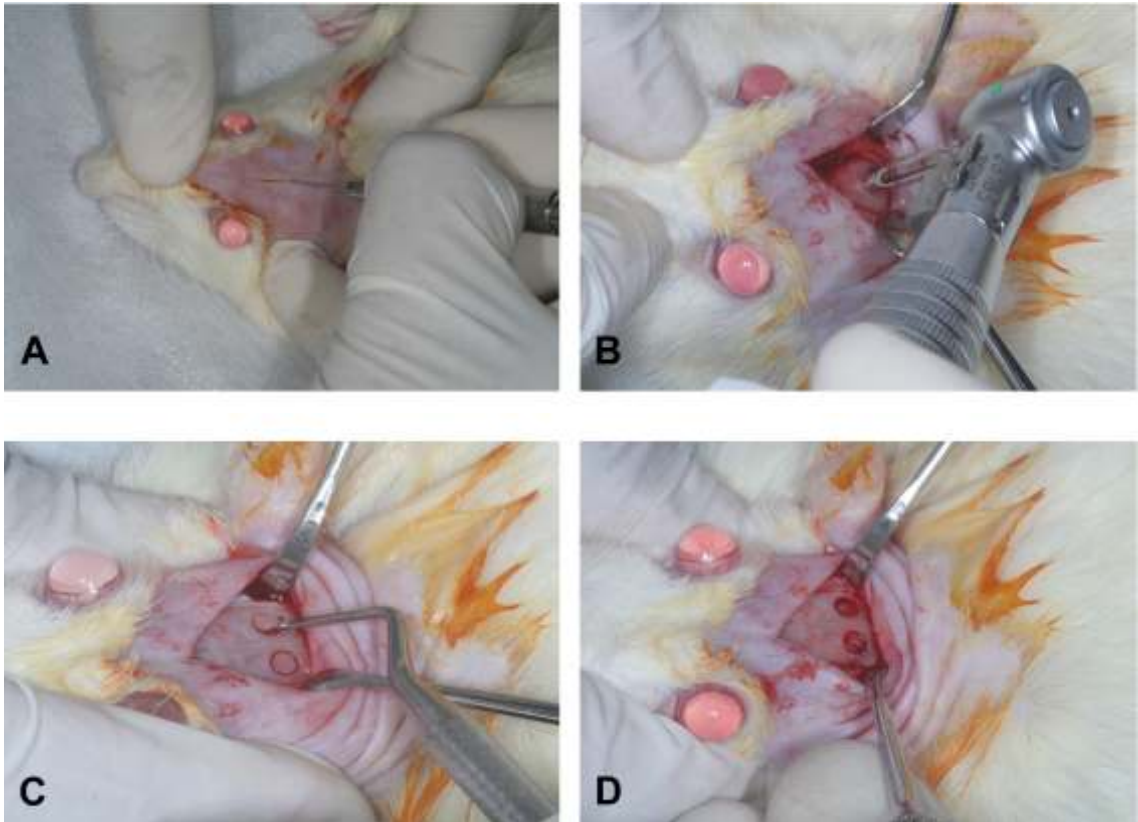


Figura 1 - Ato cirúrgico

- a) incisão linear em calvária tricotomizada;
- b) afastamento dos tecidos e criação do defeito com trefina de 2mm;
- c) remoção das corticais;
- d) defeitos ósseos (lado controle e lado experimental)

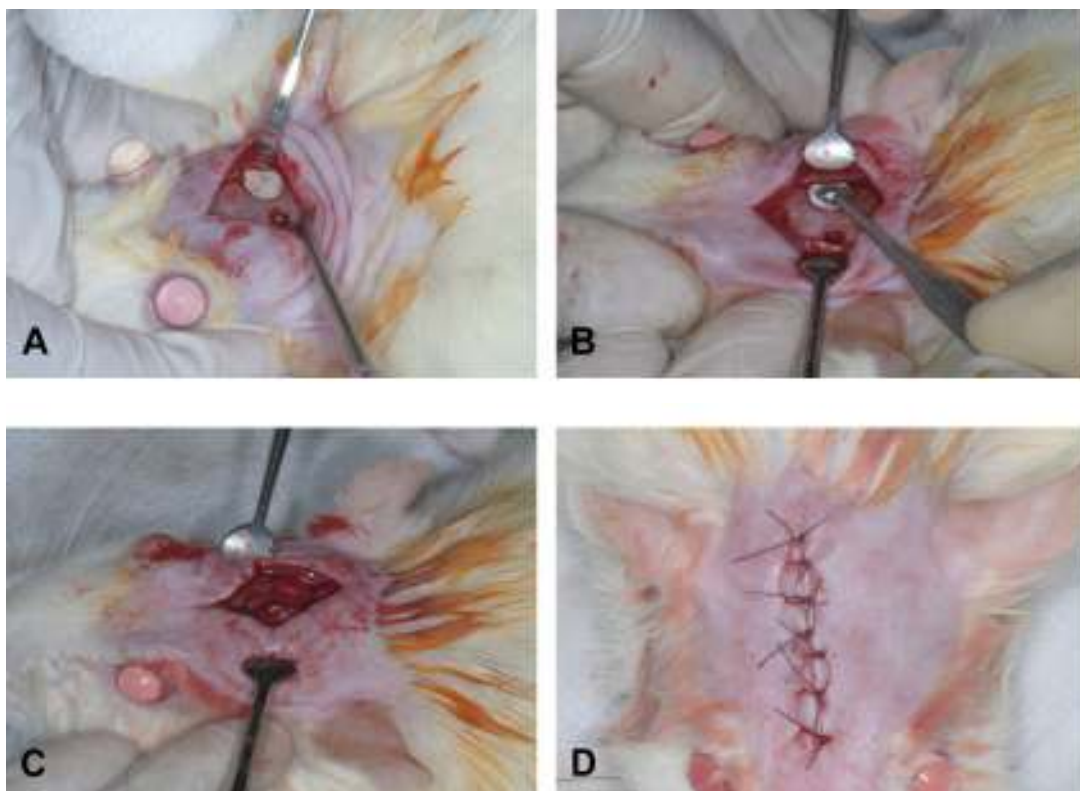


Figura 2 - Ato Cirúrgico

- a) colocação da membrana;
- b) adaptação da membrana com brunimento;
- c) sutura do periósteo e tecidos suprajacentes com fio Vicryl 5.0 (somerville);
- d) sutura superficial com pontos interrompidos simples com fio de nylon 5-0 (Techsuture).

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos individualmente em gaiola e com restrição alimentar por 2 horas. Após isso, foram alimentados com ração sólida industrial e água destilada por todo o período experimental.

Os animais sofreram eutanásia em câmara de CO₂, com fluxo de 60 kg/cm², aos 30 e 60 dias, e as calvárias foram removidas e imediatamente fixadas

com formol a 10%, para processamento laboratorial

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia do Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic, onde foram inicialmente desmineralizadas em ácido fórmico 20% por aproximadamente sete dias. Todas as amostras foram desidratadas em alcoóis em concentrações crescentes (70% - 100%) por uma hora cada, diafanizadas em dois banhos de xilol de uma hora cada e parafinizadas em parafina a 60°C por uma hora. Foi feita a inclusão dos espécimes em parafina, corte de 7 µm de espessura e coloração com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação morfológica.

Em seguida, cortes de 6 µm de espessura foram realizados para as reações imunoistoquímicas, segundo protocolo estabelecido pelo Laboratório de Imunoistoquímica da mesma Instituição:

- a) desparafinização: dois banhos de xilol, sendo o primeiro por 30 minutos a 60°C, e, o segundo, por 20 minutos à temperatura ambiente com secagem em papel filtro;
- b) hidratação: três banhos de 3 minutos, um, em álcool absoluto; um banho em álcool a 95% e, um, em álcool 85%;
- c) lavagem em água corrente por cinco minutos;
- d) três passagens em água destilada;
- e) recuperação dos sítios antigênicos: pepsina 0,5%, pH 1,8, por 10 minutos em estufa a 60°C e, 30 minutos, em estufa a 37°C;
- f) lavagem em água corrente por 10 minutos;
- g) três passagens em água destilada;

- h) bloqueio da peroxidase endógena tecidual: imersão em solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol na proporção 1:1, em três banhos de cinco minutos cada;
- i) lavagem em água corrente por 10 minutos e passagem em água destilada;
- j) dois banhos de solução tampão de TRIS 0,05 M pH 7,4, por cinco minutos cada.

A partir dessa etapa, as reações foram realizadas na Dako Autostainer (Dako, Carpinteria, CA, USA);

- a) incubação do anticorpo primário: o anticorpo primário foi diluído em BSA 1%, na titulação 1: 1700 por 40 minutos;
- b) dois banhos de solução tampão de TRIS 0,05 M pH 7,4, por cinco minutos cada;
- c) incubação do anticorpo secundário: LSAB (DAKO), conforme recomendações do fabricante;
- d) dois banhos de solução tampão de TRIS 0,05 M pH 7,4, por cinco minutos cada;
- e) incubação do anticorpo terciário: LSAB (DAKO), conforme recomendações do fabricante;
- f) dois banhos de solução tampão de TRIS 0,05 M pH 7,4, por 5 minutos cada;
- g) revelação da reação: com diaminobenzidina (DAB) (DAKO), um cromógeno de coloração acastanhada, segundo recomendações do

fabricante;

- h) passagem rápida por solução tampão de TRIS 0,05 M pH 7,4;
- i) lavagem em água corrente por 10 minutos e passagem em água destilada;
- j) contra-coloração: imersão em hematoxilina de Mayer por cinco a 10 minutos;
- k) lavagem em água corrente por cinco minutos;
- l) passagem em água destilada;
- m) passagem rápida em água amoniacal.

Os passos seguintes foram realizados manualmente:

- a) desidratação e diafanização: banhos de três minutos cada numa série de etanol em concentrações crescentes (80%, 95% e 100%) e em xilol;
- b) montagem em Permount;
- c) análise em microscopia de luz.

5 RESULTADOS

Os resultados mostraram dois tipos de profundidades de perfurações:

- I. casos com defeitos ósseos incompletos, isto é, com preservação da cortical interna: defeitos monocorticais;
- II. casos com defeitos ósseos completos, estendendo-se da cortical externa até a interna: defeitos bicorticais.

5.1 Avaliação histológica descritiva

Os cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE) mostraram, tanto no grupo controle como no experimental (com membrana de Allumina®), casos com defeitos ósseos mono e bicorticais.

Nos defeitos bicorticais com a membrana de Allumina®, houve uma maior neoformação óssea nas margens do defeito que nos casos sem a utilização da membrana.

Também foi observada uma maior maturação óssea no grupo experimental em relação ao grupo controle.

Em nenhum dos espécimes foi observados sinais de inflamação.

5.2 Trinta dias

Com 30 dias de pós-operatório, no grupo controle, os defeitos ósseos monocorticais mostraram-se quase totalmente preenchidos por tecido ósseo

imaturo, formando trabéculas e, raramente, áreas compactas contendo tecido conjuntivo denso nos pequenos espaços medulares (figura 3a).

Na maioria dos espécimes do grupo controle em que os defeitos ósseos mostraram-se bicorticais, a neoformação óssea era discreta, restringindo-se apenas às margens do defeito (figura 3b).

No grupo experimental, o defeito monocortical mostrou-se quase totalmente preenchido por osso imaturo (figura 3c).

Os defeitos bicorticais mostraram formação de tecido ósseo imaturo somente nas margens do defeito (figura 3d).

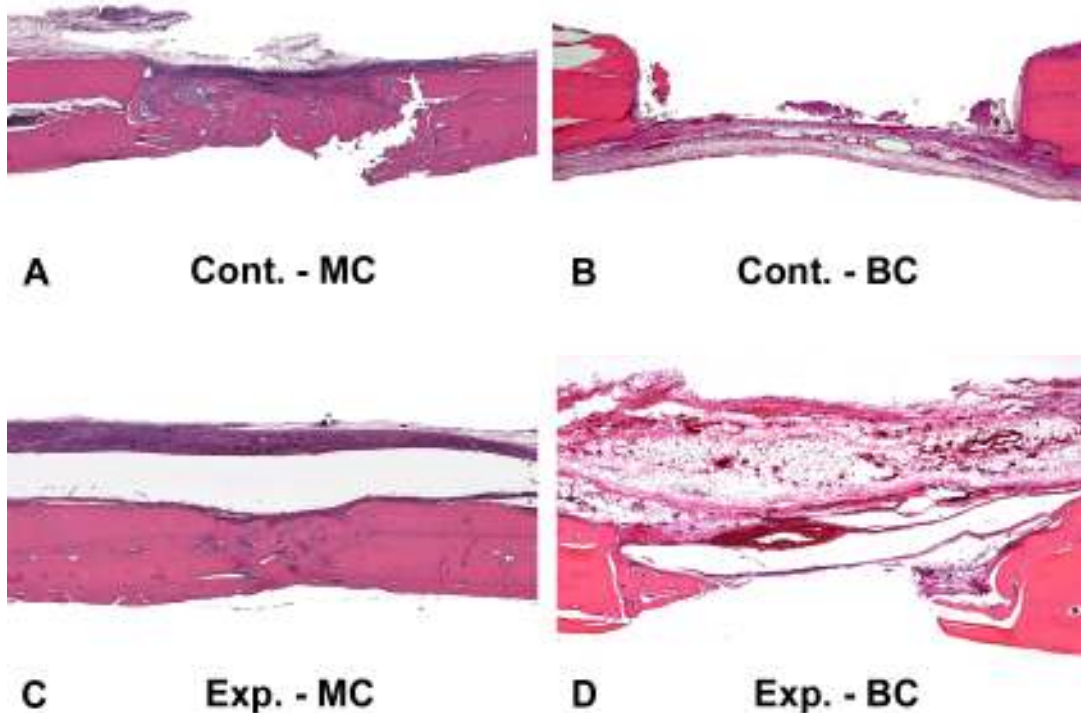


Figura 3 - Espécimes 30 dias HE

- a) espécime controle 30 dias com defeito monocortical, mostrando preenchimento total do defeito ósseo neoformado (40x);
- b) espécime controle 30 dias com defeito bicortical, quase não mostrando neoformação óssea no defeito (40x);

- c) espécime experimental 30 dias com defeito monocortical, mostrando a membrana obliterando o defeito, preenchimento total do defeito com tecido ósseo neoformado, e o local da membrana de Allumina® (40x);
- d) espécime experimental 30 dias com defeito bicortical, mostrando neoformação óssea nas margens do defeito e a membrana um pouco colada (40x).

5.3 Sessenta dias

Nos espécimes controles, com defeitos monocorticais, observou-se preenchimento total do defeito com osso maduro neoformado (figura 4a), mas com discreta diferença entre a espessura da margem do defeito e a espessura do osso neoformado (figura 4a - detalhe).

Nos espécimes controles com defeitos bicorticais, encontrou-se pouca neoformação óssea, limitando-se apenas às margens do defeito (figura 4b).

Nos animais do grupo experimental, com defeitos monocorticais, observou-se o total preenchimento do defeito com tecido ósseo compacto (figura 4c).

Um espécime evidenciou espessamento do periósteo, chegando a envolver parte da extremidade da membrana (figura 4d).

Nesse grupo de 60 dias, não houve espécimes com defeitos bicorticais.

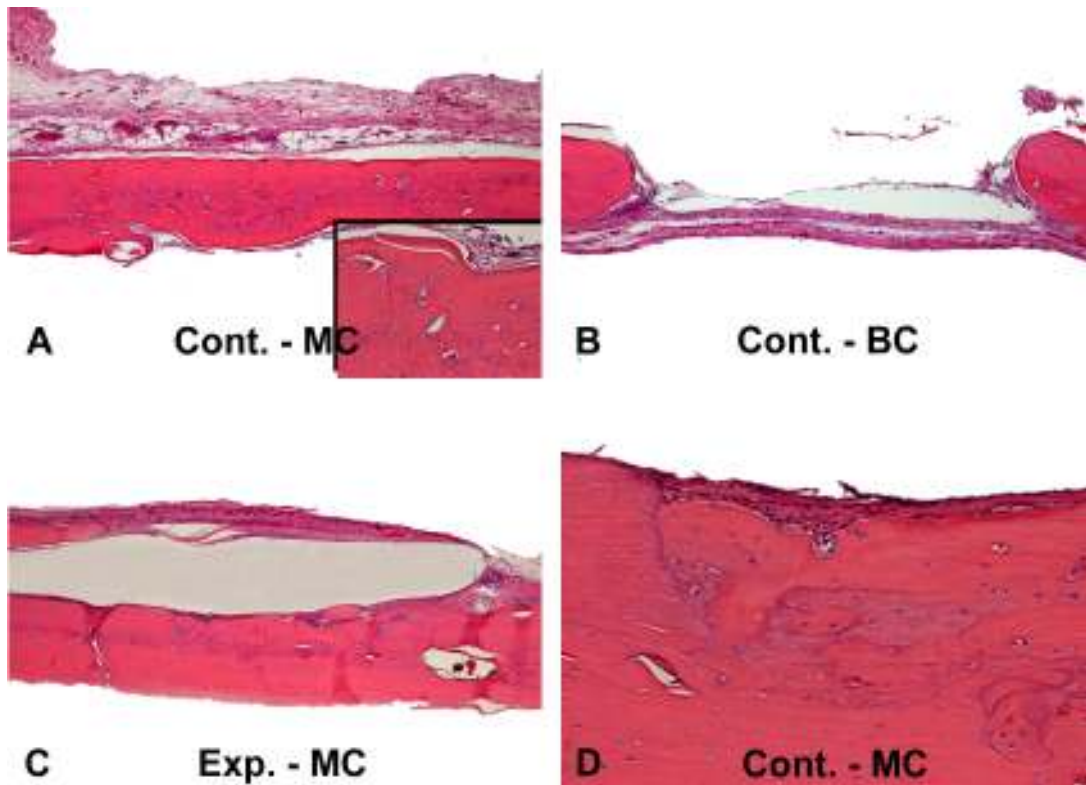


Figura 4 - Avaliação histológica descritiva Hematoxilina Eosina.

- a) controle 60 dias com defeito monocortical, e este sendo totalmente preenchido por tecido ósseo (40x); no detalhe, o mesmo espécime, em maior aumento (400x);
- b) controle 60 dias com defeito bicortical, mostrando pouca neoformação óssea somente nas margens do defeito (40x);
- c) experimental 60 dias com defeito monocortical, mostrando espessamento do periósteo, chegando a envolver parte da extremidade da membrana (400x);
- d) experimental 60 dias com defeito monocortical, mostrando preenchimento total do defeito com tecido ósseo neoformado (400x).

Imunoistoquímica

30 dias

Nas reações imunoistoquímicas utilizando anticorpo primário anti-fibronectina, foi observada, no tecido ósseo normal adjacente ao defeito ósseo, a

presença de fibronectina em uma fina linha no perióstio e mais tênue no endóstio, assim como discreta expressão nos espaços medulares nos grupos controle e experimental.

Em espécime com defeitos monocorticais, houve marcação mais acentuada de fibronectina na região do perióstio sobre o tecido ósseo neoformado e foi possível observar, em alguns casos, defeitos preenchidos por trabéculas de tecido ósseo imaturo, permeado por intensidade moderada de fibronectina (figura 5a e 5a detalhe).

Nos espécimes controles com defeitos bicorticais, observou-se neoformação óssea nas margens do defeito, estendendo-se para o centro com forte marcação da fibronectina envolvendo todo o defeito (figura 5b).

Em espécimes do grupo experimental com defeitos monocorticais, houve migração do perióstio para baixo da membrana e marcação intensa de fibronectina no perióstio e nos pequenos espaços medulares (figura 5c).

Nos espécimes do grupo experimental com defeitos bicorticais, foi observada uma marcação intensa de fibronectina envolvendo a membrana e também entre as poucas trabéculas ósseas neoformadas no tecido conjuntivo (figura 5d).

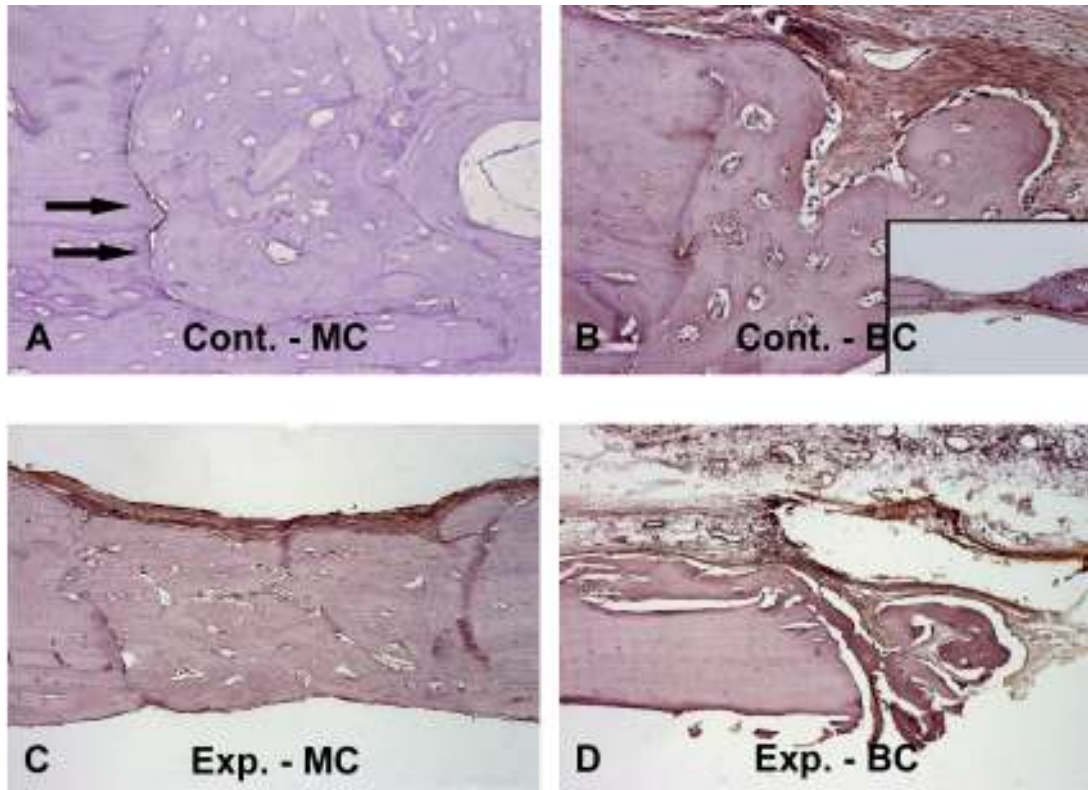


Figura 5 - Espécimes 30 dias imunohistoquímica

- a) espécime controle 30 dias com defeito monocortical, mostrando marcação mais acentuada de fibronectina envolvendo o defeito (400x) e, no detalhe, tecido ósseo imaturo permeado por moderada marcação de fibronectina (40x);
- b) espécime controle 30 dias bicortical com forte marcação da fibronectina, envolvendo a região no periósteo sobre o tecido ósseo e entre as trabéculas (400x) e, no detalhe, forte marcação de FN no tecido conjuntivo no centro do defeito (40x);
- c) espécime experimental monocortical 30 dias migração do periósteo para baixo da membrana e marcação intensa de fibronectina no periósteo e nos pequenos espaços medulares (40x);
- d) espécime experimental bicortical 30 dias, mostrando marcação intensa de fibronectina envolvendo a membrana e também entre as poucas trabéculas ósseas neoformadas nas margens do defeito (400x).

60 Dias

Com 60 dias pós-operatórios, os espécimes com defeitos monocorticais, tanto o grupo controle quanto experimental, apresentaram-se totalmente preenchidos por tecido ósseo compacto imaturo e pouca marcação de fibronectina.

Nos espécimes do grupo controle com defeitos monocorticais, houve preenchimento total do defeito com osso compacto neoformado e uma linha tênue de marcação da fibronectina entre o tecido ósseo neoformado e o tecido ósseo da margem do defeito (figura 6a).

Nos espécimes controles com defeitos bicorticais, ocorreu pouca formação óssea, somente nas margens do defeito assim, como nos espécimes de 30 dias. Foi observada escassa marcação de fibronectina somente no tecido conjuntivo que preenche o defeito (figura 6b).

No grupo experimental com defeitos monocorticais, foi constatado o total preenchimento do defeito com tecido ósseo compacto, apresentando linha tênue e discreta de fibronectina entre o osso neoformado e a margem do defeito (figura 6c). Já no tecido conjuntivo que permeava a trabécula óssea neoformada, ocorreu intensa marcação de fibronectina, especialmente adjacente ao tecido osteóide (figura 6c detalhe).

Em alguns espécimes do grupo experimental com defeito monocortical, houve neoformação óssea além do envelope esquelético, conforme visto na figura 6d.

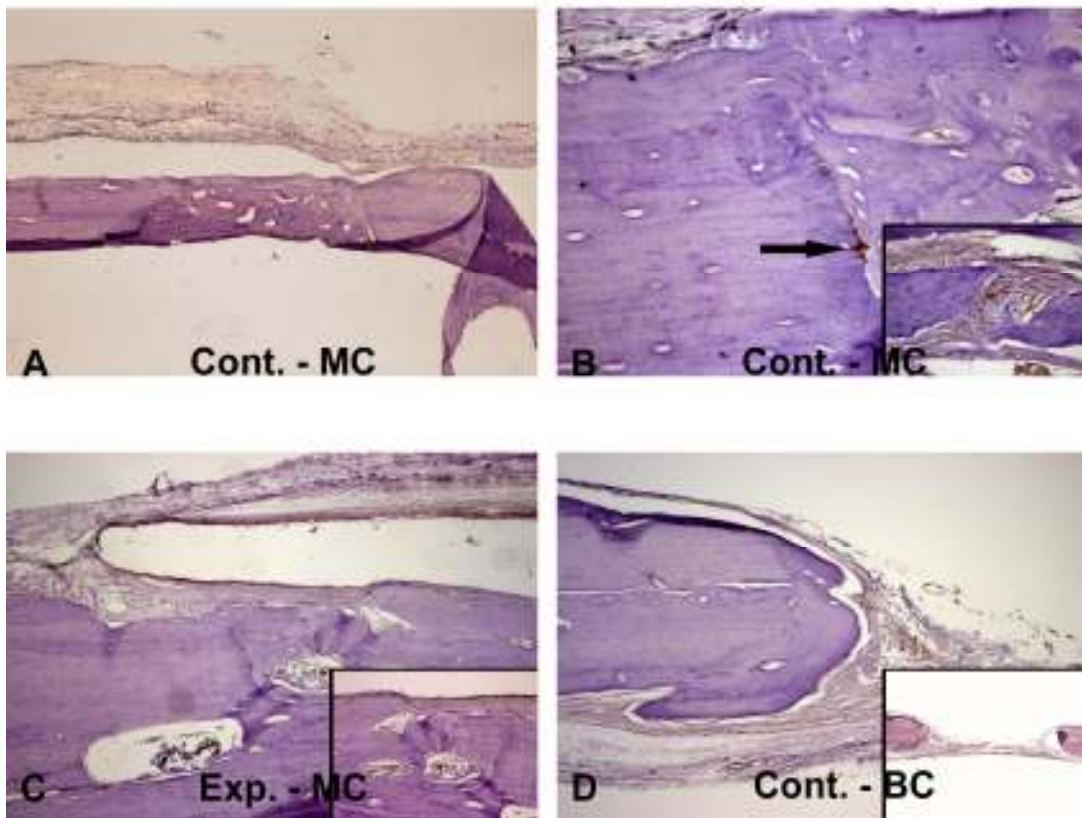


Figura 6 - Espécimes 60 dias Imunoistoquímica

- a) espécime controle 60 dias monocortical, mostrando uma linha tênue de marcação da fibronectina entre o tecido ósseo neoformado e o tecido ósseo da margem do defeito (40x);
- b) espécime controle bicortical 60 dias, mostrando uma linha tênue na margem do defeito (seta 400x) em marcação de fibronectina tecido conjuntivo que preenche o defeito no detalhe (400x);
- c) espécime experimental 60 dias, mostrando marcação de FN envolvendo toda a membrana e, nas trabéculas, tecido osteóide;
- d) espécime controle 60 dias bicortical sem nenhuma marcação de fibronectina entre o defeito e o osso neoformado e forte marcação de FN no tecido conjuntivo do defeito (400x), no detalhe o defeito total (40x).

6 DISCUSSÃO

Nos espécimes de 30 dias, houve a aparência, nas lâminas examinadas, de maior expressão de Fibronectina que nos de 60 dias, fato que pode ser justificado por uma maior atividade osteogênica do primeiro grupo

A membrana de Allumina[®] não provoca reação tecidual indesejável. Esse fato foi comprovado tanto clínica como histologicamente. Essa constatação está de acordo com trabalhos de Cruz et al. (1993), Majluf (2001) e Diotto (2007).

Nos defeitos bicorticais, houve pequena quantidade de formação óssea junto às margens do defeito ósseo e esparsas trabéculas em regiões mais centralizadas do defeito.

Durante o ato cirúrgico, não houve problema com a adaptação da membrana de Allumina[®] ao osso. Na adaptação, apenas foi realizado um brunimento não precisando de qualquer tipo de fixação extra. No exame histológico, foi observado pouco deslocamento da membrana, em apenas um espécime. Durante o período de cicatrização até o sacrifício, clinicamente, não houve exposição da membrana em nenhum dos animais, fatos mostrados também nos trabalhos Cruz et al. (1993), Majluf (2001) e Diotto (2007).

A presença da membrana de Allumina[®] permitiu observar maior evidência de Fibronectina. Havia tecido ósseo neoformado em todos os espécimes. Não havia diferença entre a altura do preenchimento do defeito entre os grupos Experimental e Controle tanto em 30 quanto em 60 dias.

Não foi possível observar diferenças significantes no grau de preenchimento do tecido ósseo nem na quantidade de fibronectina presente no

defeito entre o lado controle e o experimental.

Entretanto, foi evidente o aumento de expressão de fibronectina no periósteo envolvendo a membrana quando comparado ao periósteo sobre o defeito sem a membrana.

O lado externo da membrana, que foi brunido e estava em contato com o periósteo, teve maior expressão de fibronectina.

A neoformação óssea encontrada além do envelope esquelético, em alguns espécimes do grupo experimental com defeitos monocorticais do presente estudo, foi discreta, mas reporta os achados de Lundgren et al. (1995). Esses autores relatam que o ganho em altura de osso intramembranoso esquelético foi possível em áreas em que não existia osso antes, quando se usou barreira oclusiva de titânio.

Linde et al. (1993) conseguiram ganhar alturas ósseas variáveis além do envelope esquelético, dependendo do tamanho dos poros e da rigidez da membrana de PTFE-e usada em seu estudo. No presente trabalho, com a membrana de Alumina®, em alguns casos, houve pouco ganho em altura óssea além do envelope esquelético.

Schimtz et al. (1990) observaram que os defeitos ósseos de 3 e 4 mm na calvária de ratos apresentaram maior formação óssea que defeitos de 8 mm de diâmetro. Concluíram, então, que defeitos, menores que 4 mm de diâmetro seriam considerados defeitos não críticos, por repararem sem a necessidade de nenhum tipo de regeneração. No presente estudo, de maneira diferente dos autores acima citados, os defeitos bicorticais de 2 mm não repararam espontaneamente. Isso evidenciou que, em calvária de ratos, quando se removem as corticais interna e

externa para a produção de defeitos de 2 mm, a formação óssea se restringiu apenas à margem do defeito, caracterizando-se como um defeito de tamanho crítico. Do ponto de vista de considerar o rato como modelo experimental para a criação de defeitos ósseos críticos, observa-se que, mesmo sendo um animal de pequeno porte, é possível utilizá-lo para estudos comparativos, pois o tamanho da calvária de animais com 400 a 500 gramas de peso permite a realização de dois defeitos em cada animal, mesmo considerando a idade do animal. Com isso, se tem a redução do número de animais por experimento, bem como o emprego de feridas controle no próprio animal que contém a ferida experimental.

7 CONCLUSÃO

Este estudo analisou histologicamente a reparação óssea e a expressão imunohistoquímica da glicoproteína fibronectina em defeitos na calvária de ratos associados à ROG com membrana de Allumina® e revelou que:

- a) a membrana é totalmente oclusiva, biocompatível e evidenciou resultados melhores para a formação óssea no grupo experimental com defeitos bicorticais, nos espécimes de 30 dias;
- b) no Grupo experimental, a presença da membrana aumentou, aparentemente, comparando visualmente por meio de microscopia de luz, a expressão de fibronectina com relação ao Grupo controle, porém isso não foi relevante, pois não houve diferenças na formação óssea entre os grupos estudados;
- c) aos 30 dias, a análise histológica mostrou menor maturação óssea nos grupos controle e experimental que aos 60 dias;
- d) os resultados do grupo de 30 dias tanto nos lados controles quanto nos experimentais apresentaram maior expressão de Fibronectina que nos de 60 dias;
- e) houve neoformação óssea além do envelope esquelético em alguns casos do grupo experimental;
- f) o defeito de 2 mm, bicortical, mostrou ser um defeito crítico;
- g) Houve relação direta entre a expressão da fibronectina com a neoformação óssea.

REFERÊNCIAS¹

Akiyama SK, Olden K, Yamada KM. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1995;14(3):173-89.

Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981;52(2):155-70.

Albrektsson T, Zarb G. The long-term efficacy of currently used dental implant: a review and proposed criteria of success. *J Oral Maxillofac Implants.* 1986;1(1):11-24.

Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.* 1998;76(6):899-910.

Babbush CA, Kirsch A. Intramobile cylinder (IMZ) two stage osseointegrated implant system with the intramobile element (IME). *J Oral Maxillofac Implants.* 1987;10(2):203-215.

Bartee BK, Carr JA. Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. *J Oral Implantol.* 1995;21(2):88-95.

Boskey AL. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem Suppl.* 1998;30-31:83-91.

Boskey AL. Matrix proteins and mineralization: an overview. *Connect Tissue Res.* 1996;35(1-4):357-63.

Boyne PJ. Restoration of osseous defects in maxillofacial casualties. *J Am Dent Assoc.* 1969 Apr;78(4):767-76.

Boyne PJ. Transplantation, implantation, and grafts. *Dent Clin North Am.* 1971 Apr;15(2):433-53.

Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Tissue-integrated prostheses-osseointegration in clinical dentistry. Germany: Quintessence Publishing; 1985.

Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol.* 2001 Feb;72(2):215-29.

Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence; 1994.

Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restor Dent.* 1993;13(1):29-45.

¹ De acordo com o Manual de Normatização para Dissertações e Teses do Centro de Pós-Graduação CPO São Leopoldo Mandic, baseado no modelo Vancouver de 2007, e abreviaturas dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996 Apr;54(4):420-32.

Buser D, Dula K, Lang NP, Nyman S. Long-term stability of osseointegrated implants in bone regenerated with the membrane technique. 5 year results of a prospective study with 12 implants. *Clin Oral Implants Res.* 1996 June;7(2):175-83.

Buser D, Ruskin J, Higginbottom F, Hardwick R, Dahlin C, Schenk RK. Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane - protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995 Nov-Dec;10(6):666-81.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1991 July;25(7):889-902.

Campbell JB., Basset CAL. The surgical application of monomolecular filters (Millipore) to bridge gaps in peripheral nerves and to prevent neuroma formation. *Surg Forum.* 1957;7:570-4.

Casati MZ, Sallum EA, Caffesse RG, Nociti Junior FH, Sallum AW, Pereira SL. Guided tissue regeneration with a bioabsorbable polylactic acid membrane in gingival recessions. A histometric study in dogs. *J Periodontol.* 2000 Feb;71(2):238-48.

Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human intrabony defects with bioresorbable membranes. A controlled clinical trial. *J Periodontol.* 1996 Mar;67(3):217-23.

Crivelini MM, Souza SOM, Araújo VC. Immunohistochemical study of acinic cell carcinoma of minor salivary gland. *Oral Oncol Eur J Cancer.* 1997;33(3):204-8.

Cruz M, Ivanov M. Regeneração guiada tecidual. São Paulo: Artmed; 2006.

Cruz M, Reis CC, Silva VC. Utilização da Alumina (Al₂O₃) como na regeneração guiada dos tecidos. *Odontol Mod.* 1993;20(6):6-13.

Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1990;24(1):13-9.

Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988 May;81(5):672-6.

Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1989 Spring;4(1):19-25.

Diotto MA. Avaliação da reação tecidual à membrana Alumina[®]: um estudo histológico e morfométrico na calvária de ratos [dissertação]. Campinas: Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic; 2007.

Epure LM, Dimitrievska S, Merhi Y, Yahia L. The effect of varying Al₂O₃ percentage in hydroxyapatite/Al₂O₃ composite materials: morphological, chemical and cytotoxic evaluation. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Dec;83(4):1009-23.

Farso Nielsen F, Karring T, Gogolewski S. Biodegradable guide for bone regeneration. Polyurethane membranes tested in rabbit radius defects. *Acta Orthop Scand*. 1992 Feb;63(1):66-9.

Germain MA, Hatton A, Williams S, Matthews JB, Stone MH, Fisher J et al. Comparison of the cytotoxicity of clinically relevant cobalt-chromium and alumina ceramic wear particles in vitro. *Biomaterials*. 2003 Feb;24(3):469-79.

Gottlow J, Laurell L, Lundgren D, Mathisen T, Nyman S, Rylander H et al. Periodontal tissue response to a new bioresorbable guided tissue regeneration device: a longitudinal study in monkeys. *Int J Periodontics Restor Dent*. 1994 Oct;14(5):436-49.

Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennström J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol*. 1986 July;13(6):604-16.

Hynes RO. Fibronectins. *Sci Am*. 1986 June;254(6):42-51.

Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 1987 Feb 27;48(4):549-54.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69(1):11-25.

Jones JL, Walker RA. Integrins: a role as cell signaling molecules. *Mol Pathol* 1999;52(4):208-13.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica*. 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. cap.12. p.112-23.

Katchburian E, Arana-Chavez VE, Baratella L. Apoptosis in the early involuting stellate reticulum of rat molar tooth germs. *Anat Embriol*. 1999 July;200(1):49-54.

Katchburian E, Baratella L, Arana-Chavez VE. Apoptosis in the early involuting stellate reticulum of rat molar tooth germs. *Anat Embryol*. 1999 July;200(1):49-54.

Kawahara H, Hirabayashi M, Shikita T. Single crystal Allumina® for dental implants and bone screws. *J Biomed Mater Res*. 1980 Sept;14(5):597-605.

Kostopoulos L, Karring T. Augmentation of the rat mandible using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 1994 June;5(2):75-82.

Kostopoulos L, Karring T. Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer. *Clin Oral Implants Res*. 1994 June;5(2):66-74.

Koukoulis GK, Howedy M, Korhonen I, Virtanen I, Gould VE. Distribution of tenascin, cellular fibronectins and integrins in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1993;25(2):285-95.

Koukoulis GK, Shen J, Virtanen I, Gould VE. Vitronectin in the cirrhotic liver: An immunomarker of mature fibrosis. *Hum Pathol*. 2001 Dec;32(12):1356-13.

Lang NP, Mombelli A, Tonetti MS, Brägger U, Hämmerle CH. Clinical trials on therapies for peri-implant infections. *Ann Periodontol*. 1997 Mar;2(1):343-56.

Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurström K, Sundin Y. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol*. 1993 Nov;64(11 Suppl):1116-28.

Ling LJ. Current concept of guided tissue regeneration with non-absorbable membrane. *J N Z Soc Periodontol*. 1998;(83):32-7.

Linghorne WJ. The sequence of events in osteogenesis as studied in polyethylene tubes. *Ann N Y Acad Sci*. 1960 Mar;85:445-60.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular cell biology*. 3rd ed. New York: Scientific American; 1995.

Lodish HF, Katz FN, Rothman JE, Knipe DM. Membrane assembly: Synthesis and intracellular processing of the vesicular stomatitis viral glycoprotein. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1978;14(2):155-75.

Lundgren D, Lundgren AK, Sennerby L, Nyman S. Augmentation of intramembraneous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 1995 June;6(2):67-72.

Mackie EJ, Thesleff I, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J Cell Biol*. 1987 Dec;105(6 Pt 1):2569-79.

Mackie EJ, Tucker RP. Tenascin in bone morphogenesis: expression by osteoblasts and cell type-specific expression of splice variants. *J Cell Sci*. 1992 Nov;103(Pt 3):765-71.

Majluf IM, Zátare GM, Ortiz NB. Uso de la membrana Allumina[®] en la preservación del reborde alveolar post = extracción/Use of the membrane Allumina[®] in the preservation of the post-extraction alveolar ridge. *Mag Int Coll Dent*. 2001;8/9(1):61-68.

Malik MA, Puleo DA, Bizios R, Doremus RH. Osteoblasts on hydroxyapatite, Allumina[®] and bone surfaces in vitro: morphology during the first 2 h of attachment. *Biomaterials*. 1992;13(2):123-8.

Melcher AH, Dreyer CJ. The experimental use of polytetrafluorethylene as an implant material. *S Afr J Med Sci*. 1961 Dec;26:125-8.

Melcher AH. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. *Arch Oral Biol*. 1969 Sept;14(9):1101-9.

Melcher AH. Wound healing in monkey (*Macaca irus*) mandible: effect of elevating periosteum on formation of subperiosteal callus. *Arch Oral Biol*. 1971 Apr;16(4):461-4.

Milella E, Ramires PA, Brescia E, La Sala G, Di Paola L, Bruno V. Physicochemical, mechanical, and biological properties of commercial membranes for GTR. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(4):427-35.

- Mohri H. Fibronectin and integrin interaction. *J Invest Med*. 1996;44(8):429-41.
- Nefussi JR, Baron R. PGE2 stimulates both resorption and formation of bone in vitro: Differential responses of the periosteum and the endosteum in fetal rat long bone cultures. *Anat Rec*. 1985;211:9-16.
- Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol*. 1982 May;9(3):257-65.
- Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982 July;9(4):290-6.
- Ogiso B, Hughes FJ, Davies JE, McCulloch CA. Fibroblastic regulation of osteoblast function by prostaglandins. *Cell Signal*. 1992 Nov;4(6):627-39.
- Ogiso B, Hughes FJ, Melcher AH, McCulloch CA. Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Cell Physiol*. 1991 Mar;146(3):442-50.
- Oliveira PAD, Dutra MAS, Badeia M. Avaliação clínica da técnica de regeneração tecidual guiada utilizando uma barreira de óxido de alumínio no tratamento de lesões de furca classe II em humanos: relato de 12 casos. *Rev CROMG*. 1995 jan-abr;(1):18-30.
- Paolantonio M, D'Archivio D, Di Placido G, Tumini V, Di Peppe G, Del Giglio Matarazzo A et al. Expanded polytetrafluoroethylene and dental rubber dam barrier membranes in the treatment of periodontal intrabony defects. A comparative clinical trial. *J Clin Periodontol*. 1998 Nov;25(11Pt 1):920-8.
- Reis CC, Cruz M. Ensaio com diferentes materiais de membrana, silicone, titânio e alumínio, laminados e texturizados (relatório). Juiz de Fora: Centro Clínico de Pesquisa em Estomatologia - Clinest; 1988.
- Robey PG, Boskey AL. The biochemistry of bone. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J (eds). *Osteoporosis*. San Diego: Academic; 1996. p. 95-183.
- Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect Tissue Res*. 1996b;35(1-4):131-6.
- Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest*. 1991 Jan;87(1):1-5.
- Salvoni AD. Análise da expressão de integrinas em células OsA-CL cultivadas sobre implantes de titânio tratado a laser [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.
- Sasano Y, Zhu JX, Kamakura S, Kusunoki S, Mizoguchi I, Kagayama M. Expression of major bone extracellular matrix proteins during embryonic osteogenesis in rat mandibles. *Anat Embryol*. 2000 July;202(1):31-7.
- Schlegel KA, Sindet- Pedersen S, Hoepffner HJ. Clinical and histological findings in guided bone chips using a new resorbable membrane. *J Biomed Mater Res*. 2000;53(4):392-9.

Schliephake H, Dard M, Planck H, Hierlemann H, Jakob A. Guided bone regeneration around endosseous implants using a resorbable membrane vs a PTFE membrane. *Clin Oral Implants Res.* 2000 June;11(3):230-41.

Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat.* 1990;138(3):185-92.

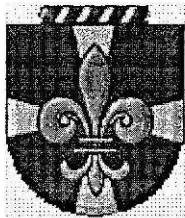
Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):279-303.

Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000.* 2000;24:99-126.

Steiman HR, Cullen CL, Geist JR. Bilateral mandibular regional odontodysplasia with vascular nevus. *Pediatr Dent.* 1991 Sept-Oct;13(5):303-6.

Walter E, Staiger C, de Vries J, Zimmermann R, Weber E. Induction of drug metabolizing enzymes by sulfinpyrazone. *Eur J Clin Pharmacol.* 1981;19(5):353-8.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS



São Leopoldo Mandic
Faculdade de Odontologia
Centro de Pesquisas Odontológicas
Certificado de Cumprimento de Princípios Éticos

CERTIFICO que, após analisar o projeto de pesquisa

Título: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE FIBRONECTINA NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS NA CALVÁRIA DE RATOS UTILIZANDO MEMBRANA DE ALLUMINA®. ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO.

Pesquisador principal: Ricardo de Oliveira Silva

Orientador: Thomaz Wassall

o Comitê de Ética e Experimentação Animal(CEEA) da Faculdade de Odontologia e Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic considerou que o projeto está de acordo com as diretrizes para a proteção do sujeito de pesquisa, estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde.

Campinas, SP, Brazil, quarta-feira, 16 de abril de 2008

CERTIFICATION OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES

I hereby, certify that upon analysis of the Research Project,

Title: Quantitative Evaluation of Fibronectin in the Bone Repairing of Defects in the Calvarium of Rats Using Alluminar® Membrane. Immunohistochemical Study.

Main Researcher(Author): Ricardo de Oliveira Silva

Advisor: Thomaz Wassall

the Committee of Ethics for Animals Research of São Leopoldo Mandic School of Dentistry and Research Center, has considered the mentioned project to be in accordance to the guidelines of protection to the subject of the research, established by the National Health Council of the Brazilian Health Ministry.

Prof. Dr. Thomaz Wassall
Coordenador de Pós-Graduação