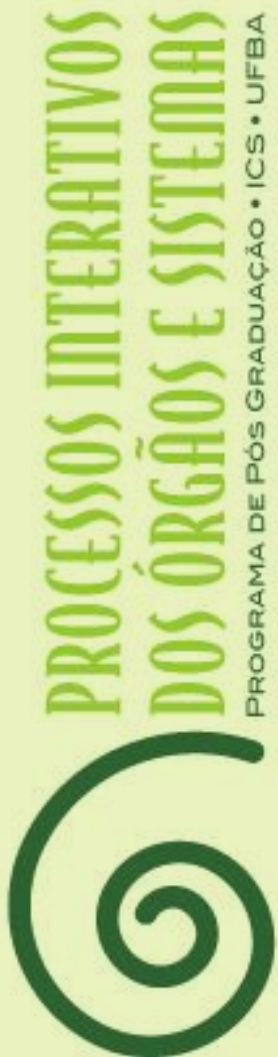


Mady Crusóe de Souza



**Avaliação do reparo ósseo em mandíbulas de ratas ovariectomizadas e submetidas à distração osteogênica**

Salvador  
2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DE**  
**ÓRGÃOS E SISTEMAS**

**MADY CRUSOÉ DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM MANDÍBULAS**  
**DE RATAS OVARIECTOMIZADAS E SUBMETIDAS À**  
**DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA.**

Salvador

2011

**MADY CRUSOÉ DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM MANDÍBULAS  
DE RATAS OVARIECTOMIZADAS E SUBMETIDAS À  
DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA.**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção de grau de Doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento  
Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Cajazeira Aguiar

Salvador

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de  
Saúde, SIBI - UFBA.

S729 Souza, Mady Crusoé de

Avaliação do reparo ósseo em mandíbulas de ratas  
ovariectomizadas e submetidas à distração osteogênica / Mady  
Crusoé de Souza. – Salvador, 2011.

100 f.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Co-orientador: Márcio Cajazeira Aguiar

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde, 2011.

1. Mandíbula. 2. Ossos - Doenças. 3. Ratos. I. Nascimento,  
Roberto José Meyer. II. Aguiar, Márcio Cajazeira. III.  
Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU: 616-089.843

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos quinze dias do mês de dezembro de dois mil e onze, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a Defesa Pública da Tese da Pós-graduanda **Mady Crusoé de Souza**, através da Comissão Julgadora composta pelos Professores **Roberto José Meyer Nascimento**, **Soraya Castro Trindade**, **Áureo Tatsumi Yamada**, **Carlos Marcelo da Silva Figueredo** e **Carlos Augusto Galvão Barboza**. O título da Tese apresentado foi **AVALIAÇÃO DE REPARO ÓSSEO EM MANDÍBULAS DE RATAS OVARIETOMIZADAS E SUBMETIDAS À DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA**. Ao final dos trabalhos os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento Aprovada  
Prof. Dra. Soraya Castro Trindade Aprovada  
Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada Aprovada  
Prof. Dr. Carlos Marcelo da Silva Figueredo Aprovada  
Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza Aprovada

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos. Salvador, 15 de dezembro de 2011

Prof. Dr. [Signature]  
Prof. Dra. [Signature]  
Prof. Dr. [Signature]  
Prof. Dr. [Signature]  
Prof. Dr. [Signature]

Aos meus pais, Dijalma e Maria Aparecida, meu alicerce.

Ao meu marido Alexandre e minha filha Elis, dádivas na minha vida.

Ao meu irmão Igor, minha eterna família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela existência, saúde e capacidade de pensar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento, pela credibilidade.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Márcio Cajazeira Aguiar, pelo incentivo, paciência, dedicação e credibilidade.

Aos meus pais, Dijalma e Maria Aparecida, pelo exemplo de integridade, honestidade, pelo amor, empenho, educação, oportunidades, sacrifícios e incentivo ilimitados.

A Alexandre, pelo amor, apoio, compreensão, sacrifícios, cumplicidade e por acreditar sempre na minha capacidade.

Aos meus avós (*in memoriam*), pelos exemplos de vida, de amor, de família, de união e carinho.

Ao meu irmão, Igor, pelo carinho, cumplicidade e apoio.

Aos meus tios, tias, primos e primas pelo carinho e respeito e em particular a Lêda, pelo incentivo, atenção, inspiração e contribuições acadêmicas.

Às minhas sobrinhas Giovanna e Mariana, minhas cunhadas, Luisa e Marilha, meu cunhado, Antônio e minha sogra, Lucilene, pelo carinho.

A Prof<sup>a</sup>. Deise Vilas Boas, pelas valiosas contribuições, dedicação, incentivo, amizade, carinho, cuidados e preocupação.

Ao Prof. Marcos Ribeiro e a estimada colega Luciana Oliveira, pelas contribuições e disponibilidade.

A Karina Carmel, pelo companheirismo, amizade, carinho, disponibilidade, incentivo e auxílio, sem você certamente este projeto não seria realizado.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josmara Bartolomei Fregoneze pelo auxílio, confiança e gentileza.

Ao Prof. Dr. Alexandre Espírito Santo, Prof. Dr. Abrahão Baptista, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Deboraci Prates, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Machado dos Santos, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria José Ramalho, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Rodriguez, pela contribuição e disponibilidade.

A Rodrigo (Coordenador do Laboratório de Histologia do Hospital das Clínicas) e aos técnicos de laboratório Nilda Oliveira da Silva (Laboratório de Histotecnologia do ICS-UFBA), José de Souza (Laboratório de Neurociências do ICS-UFBA), Maria de Lourdes (Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFBA), Chica

(Laboratório de Imunologia ICS-UFBA) e Camila Souza pela colaboração nas atividades laboratoriais.

Ao Instituto de Ciências da Saúde e aos docentes do Departamento de Biomorfologia (Laboratório de Histotecnologia), do Departamento de Neurociências, do Departamento de Biointeração (Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular) por permitirem a realização deste trabalho nas dependências da referida instituição.

A faculdade de Odontologia da UFBA por permitirem a realização parcial deste trabalho nas dependências da referida faculdade.

A Fiocruz-BA, aos responsáveis pelo Serviço de Microscopia Eletrônica, Adriana Lanfredi Rangel, Cláudio Pereira Figueira e Maria Lúcia Vieira Moreno por permitirem a realização parcial deste trabalho nas dependências da referida instituição e a Elisângela pela orientação.

Ao colega Dr. José Carlos Franco pela gentileza.

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo, pelo apoio e incentivo.

Ao secretário, Marcelo pela atenção dispensada.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, pelo companheirismo.

A todos os meus amigos pela torcida e pelo carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo auxílio financeiro.

Àqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a elaboração deste trabalho.



*Todo o conhecimento humano começou com intuições, passou daí aos conceitos e terminou com idéias.*

Immanuel Kant

CRUSOÉ-SOUZA, Mady. *Avaliação do reparo ósseo em mandíbulas de ratas ovariectomizadas e submetidas à distração osteogênica*. Salvador 2011. 100f., il. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

## RESUMO

Ainda que os mecanismos de osteogênese na reparação da matriz óssea sejam entendidos, pouco se sabe sobre a influência da deficiência de estrógeno promovida pela ovariectomia neste reparo. A distração osteogênica mandibular, técnica empregada nas correções de deformidades maxilares, constitui um modelo para estudo da reparação óssea. Sabe-se que a angiogênese está relacionada à osteogênese no reparo e que seus fatores locais, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), podem também estar relacionados diretamente com a osteogênese. **Objetivo:** o propósito deste estudo foi avaliar o reparo ósseo de mandíbulas de ratas ovariectomizadas submetidas à distração osteogênica mandibular, utilizando análise morfológica, histomorfométrica, radiográfica e imunohistoquímica. **Metodologia:** trinta ratas *Wistar* de três meses de idade foram submetidas à distração osteogênica mandibular. Metade destes animais foi previamente submetida à ovariectomia. Decorridos 7, 14 e 28 dias, os animais foram sacrificados e suas hemimandíbulas foram removidas e radiografadas. Em seguida, os fragmentos foram descalcificados e processados para inclusão em parafina. Alguns cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), para análise morfológica e histomorfométrica, outros corados com *alcian blue*-eosina para confirmação histológica de áreas de cartilagem e outros ainda submetidos ao método imunohistoquímico para VEGF e seu receptor FLT-1. **Resultados:** A análise morfológica da distração mostrou uma região de tecido conjuntivo fibrocelular envolvido por matriz de cartilagem que gradualmente foi substituída por tecido ósseo. A fusão completa das extremidades ósseas foi observada apenas nos animais não ovariectomizados. A avaliação radiográfica digital não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos e períodos avaliados. O volume ósseo é significativamente maior nos animais não ovariectomizados quando comparados aos animais ovariectomizados no período de 28 dias ( $p \leq 0,05$ ) e maior no período de 28 dias comparado com o de 7 dias entre os animais não ovariectomizados ( $p \leq 0,01$ ). Osteoblastos, osteoclastos e células conjuntivas exibiram imunomarcagem para VEGF e seu receptor FLT-1. **Conclusões:** A osteogênese induzida pela distração osteogênica mandibular em ratas ovariectomizadas foi mais lenta, sugerindo a influência do estrógeno no reparo. A avaliação radiográfica digital não apresentou sensibilidade para detecção de densidade de matriz óssea no reparo ao longo dos períodos. As células imunomarcadas pelo VEGF e seu receptor sugerem que estas moléculas possam estar envolvidas diretamente no reparo ósseo.

**Palavras-chave:** Osteogênese; Estrógeno; Distração osteogênica; Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

CRUSOÉ-SOUZA, Mady. *Evaluation of bone healing in mandibles of ovariectomized rats and subjected to distraction osteogenesis*. Salvador 2011. 100f., il. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

### ABSTRACT

Although the main mechanisms of osteogenesis in the repair of bone matrix are understood, little is known about the influence of estrogen deficiency promoted by ovariectomy in this tissue repair. Mandibular osteogenic distraction, a technique used in the correction of jaw deformities, is a model to study the bone matrix repair. It is known that the osteogenesis process is closely related to that of angiogenesis and that its local factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) can also be directly related to osteogenesis. **Objective:** the purpose of this study was to evaluate the bone repair in the jaws of female ovariectomized rats submitted to mandibular osteogenic distraction, using morphologic, histomorphometric, radiographic and immuno-histochemistry analysis. **Methodology:** thirty female *Wistar* rats three months old were submitted to mandibular osteogenic distraction. Half of those animals had been previously submitted to ovariectomy. 7, 14 and 28 days past after the first day of the mandibular osteogenic distractor activation, the animals were perfused and their right mandibles were removed and radiographed. Then, the sections were decalcified, dehydrated, diaphanized and embedded in paraffin. Some sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E), for morphological and histomorphometrical analysis, others stained with alcian blue-eosin for histological confirmation of cartilage areas and some others submitted to immuno-histochemical method for VEGF and its receptor FLT-1. **Results:** Morphological analysis of distraction showed a fibrocellular conjunctive tissue region involved by cartilage matrix that was gradually replaced by bone tissue. The complete fusion of the bone ends was observed only in non-ovariectomized animals. The digital radiographic evaluation showed no statistical differences between the evaluated groups and periods. Bone volume is significantly larger in non-ovariectomized animals when compared with ovariectomized ones within 28 days period ( $p \leq 0,05$ ) and larger in 28 days period as compared to that of 7 days within non-ovariectomized animals ( $p \leq 0,01$ ). Osteoblasts, osteoclasts and conjunctive cells exhibited immuno-labeling for VEGF and its receptor FLT-1. **Conclusions:** Osteogenesis induced by mandibular osteogenic distraction in ovariectomized female rats was slower, suggesting the influence of estrogen in bone repair. Digital radiographic did not present sensitivity for bone matrix density detection in the repair over the periods. Immuno-labeled cells by VEGF and its receptor suggest that these molecules may be directly involved in bone repair.

**Key words:** Osteogenesis; Estrogen; Distraction osteogenesis; Vascular endothelial growth factor (VEGF).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho Esquemático da Distração Osteogênica	23
Figura 2 – Imagens do Procedimento Cirúrgico	50
Figura 3 – Imagem da Ativação do Distrator	51
Figura 4 – Imagem da Mensuração dos Parafusos	52
Figura 5 – Imagem dos Úteros atrofiados	52
Figura 6 – Imagem do Posicionador de Acrílico	53
Figura 7 – Imagem da Tomada Radiográfica	53
Figura 8 – Imagens Radiográficas Digitais	54
Figura 9 – Desenho Esquemático das Áreas de Análise Histomorfométrica	55
Figura 10 – Fotomicrografias do Grupo Controle 7 dias	63
Figura 11 – Fotomicrografias do Grupo Experimental 7 dias	64
Figura 12 – Fotomicrografias do Grupo Controle 14 dias	65
Figura 13 – Fotomicrografias do Grupo Experimental 14 dias	66
Figura 14 – Fotomicrografias do Grupo Controle 28 dias	67
Figura 15 – Fotomicrografias do Grupo Controle 28 dias	68
Figura 16 – Fotomicrografias do Grupo Controle 28 dias	69
Figura 17 – Fotomicrografias do Grupo Experimental 28 dias	70
Figura 18 – Fotomicrografias coradas com <i>Alcian blue</i> -Eosina	71
Figura 19 – Fotomicrografias do Método Imuno-histoquímico VEGF	72
Figura 20 – Fotomicrografias do Método Imuno-histoquímico FLT-1	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de Densidade Óssea	74
Tabela 2 – Análise Histomorfométrica	75

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultados Radiográficos	74
Gráfico 2 – Resultados Histomorfométricos	75

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Reparo Ósseo	19
2.2 Distração Osteogênica	21
2.3 Angiogênese	27
2.4 Estrógeno	32
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 Seleção da População	40
4.2 Coleta de Dados	40
4.2.1 Procedimento Cirúrgico - Ovariectomia	40
4.2.2 Procedimento Cirúrgico para Implantação do Distrator Osteogênico	41
4.3 Obtenção da Amostra	42
4.4 Tomadas Radiográficas	42
4.5 Processamento para Microscopia de Luz	43
4.5.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) e <i>Alcian Blue</i> -Eosina	44
4.5.2 Reações Imuno-histoquímicas para VEGF e VEGFR-1 (FLT-1)	44
4.6 Análise dos Resultados	45
4.6.1 Análise Radiográfica - Densidade Óssea em mmAl	45
4.6.2 Análise Morfológica	47

4.6.3 Análise Histomorfométrica – Quantidade de volume ósseo/volume tecidual (%)	47
4.6.4 Análises Estatísticas	48
4.6.4.1 Densidade Óssea em mmAl	48
4.6.4.1 Quantidade de Volume Ósseo/Volume Tecidual %	48
5 RESULTADOS	56
5.1 Achados Clínicos	57
5.2 Resultados Morfológicos	57
5.3 Resultados Imuno-histoquímicos para VEGF e VEGFR-1 (FLT-1)	60
5.4 Resultados Radiográficos - Densidade Óssea em mmAl	60
5.5 Resultados Histomorfométricos - Quantidade de volume ósseo/volume tecidual (%)	61
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÕES	85
8 REFERÊNCIAS	87
9 ANEXO	99
9.1 Parecer do Comitê de Ética Institucional	100



## **1 INTRODUÇÃO**

O osso é um tecido conjuntivo cuja matriz mineralizada está em constante remodelação (ROBLING et al., 2006). Este evento biológico é responsável pela homeostase do tecido e participa do processo de ossificação durante desenvolvimento embrionário (VÄÄNÄNEN, 2005). A remodelação e a ossificação também estão envolvidas nos processos de reparo cicatricial do osso em resposta à injúria, como ocorre nas fraturas ósseas (DIMITRIOU et al., 2011). Os fenômenos biológicos relacionados com o osso que ocorrem durante o desenvolvimento pré-natal e nas fraturas são semelhantes aos que ocorrem nas fases do tratamento de distração osteogênica mandibular (AMIR et al., 2006). Fatores locais e sistêmicos regulam o processo de remodelação óssea, agindo, portanto, também sobre os processos de reparo. Dentre esses fatores, o estrógeno é um hormônio esteróide amplamente utilizado para inibir a reabsorção óssea, principalmente em mulheres na menopausa (RICKARD et al., 1999; NAKAMURA et al., 2007).

A deficiência de estrógeno no organismo, observada frequentemente as mulheres pós-menopausa, promove um desequilíbrio entre os eventos envolvidos na remodelação, gerando condições para o desenvolvimento da osteoporose (OURSLER et al., 1993; NAKAMURA et al., 2007). Na osteoporose, o indivíduo perde progressivamente massa óssea levando a um aumento do risco de fratura (LELOVAS et al., 2008; MCNAMARA, 2010; MARCU et al., 2011). Com o aumento da expectativa de vida, a osteoporose pós-menopausa tornou-se mais prevalente na população mundial (PINHEIRO, EIS, 2010; GIRO et al., 2011), exigindo, portanto, dos profissionais de saúde mais entendimento das condições ósseas que ocorrem nesta doença. O modelo de animal ovariectomizado é comumente adotado para induzir a osteoporose pós-menopausa (KODAMA et al., 2004). Devido ao procedimento de ovariectomia, remoção dos ovários, ocorre deficiência de estrógeno no organismo do animal e consequente desequilíbrio no processo de remodelação óssea (KODAMA et al., 2004; LELOVAS et al. 2008; GIRO et al., 2011).

Além da osteoporose, alterações de desenvolvimento, neoplasias e atrofia ósseas também produzem deformidades na maxila e na mandíbula, causando problemas funcionais e estéticos para os seus portadores. Algumas dessas alterações podem ser corrigidas pela distração osteogênica, indicada nas situações em que o comprimento do rebordo alveolar é insuficiente para a colocação de implante dentário, procedimento bastante comum nas reabilitações orais (SAULACIC et al., 2008). Na distração osteogênica, o osso é seccionado, tendo-se o cuidado de

preservar o seu suprimento sanguíneo e o periósteo, e separado num processo gradual e controlado por aparelhos ortopédicos (distratores), que induzem a formação de matriz entre as extremidades ósseas e o conseqüente crescimento de todo o bloco ósseo (GLOWACKI et al., 2007). A osteogênese presente durante o tratamento da distração óssea, assim como em outros processos de reparo ósseo, cujos eventos biológicos incluem a ossificação e remodelação óssea, portanto, deve ser regulada pelo estrógeno.

Em outras situações de reparo ósseo, como nas fraturas, sabe-se que a osteogênese e a angiogênese são processos intimamente associados (DAI; RABIE, 2007). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator relacionado com a angiogênese, parece estar envolvido também na osteogênese durante a distração osteogênica. Além disso, o VEGF parece ter algum efeito biológico na ossificação endocondral (GERBER et al., 1999), na ossificação intramembranosa (STREET et al., 2002), no crescimento do côndilo mandibular e na formação de ossos longos (DAI; RABIE, 2007). Um estudo examinando a expressão de VEGF em um modelo de distração osteogênica observou um aumento desta expressão nos osteoblastos, o que sugere um efeito sobre as células ósseas (BYUN et al., 2007). Foi sugerida em estudo a participação direta do VEGF na formação e atividade das células ósseas (STREET et al., 2002), já que tem sido observada a presença de alguns receptores para VEGF em osteoblastos, sendo a expressão de FLT-1 mais intensa quando comparada com as de dois outros receptores (BYUN et al., 2007). O envolvimento desses receptores na regulação dos osteoblastos é reforçado pela evidência de camundongos exibindo menor volume ósseo, em condições de deficiência na sinalização por FLT-1 (OTOMO et al., 2007). Embora alguns trabalhos tenham apresentado a expressão de receptores para VEGF em osteoblastos de vários modelos de reparo ósseo, são necessárias maiores investigações da presença destes receptores nas células ósseas que participam da osteogênese durante a distração osteogênica.

Com o propósito de investigar a osteogênese no reparo ósseo de animais ovariectomizados, pretende-se avaliar, por meio de avaliações morfológicas, histomorfométrica, radiográfica e imuno-histoquímica para VEGF e seu receptor FLT-1 a distração óssea mandibular de ratas ovariectomizadas em períodos de tempo determinados. Dessa forma, este estudo pretende contribuir com informações sobre a seqüência de eventos biológicos relacionados com a osteogênese durante

distração osteogênica mandibular em condições normais e permitirá uma análise sobre o impacto da ovariectomia no organismo sobre esses eventos.



## 2.1 REPARO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo caracterizado por uma matriz extracelular mineralizada que lhe confere rigidez e plasticidade (ROBLING et al., 2006). Durante o desenvolvimento embrionário (RAISZ, 1999) e após o nascimento, o tecido está em constante remodelação (LERNER, 2006), processo pelo qual o osso é substituído por um novo tecido ósseo (MANOLAGAS; KOUSTENI; JILKA, 2002; NOTELOVITZ, 2002; KHOSLA; WESTENDORF; MODER, 2010). Essa remodelação óssea ocorre por dois processos opostos: a reabsorção óssea, realizada pelos osteoclastos, e formação óssea, realizada pelos osteoblastos (PHAN; XU; ZHENG, 2004; LERNER, 2006; KHOSLA; WESTENDORF; MODER, 2010). Tais processos são necessários para manutenção da morfologia óssea durante o crescimento, para manutenção da integridade estrutural (QUINN; GILLESPIE, 2005; VÄÄNÄNEN, 2005), para o metabolismo do tecido ósseo (RAISZ, 1999) e são regulados por fatores locais (prostaglandinas e proteínas) e sistêmicos (hormônios como estrógeno e hormônio da paratireóide) (ROBLING et al., 2006).

Inicialmente, células precursoras de osteoclastos se diferenciam e iniciam a reabsorção de uma área da superfície de matriz óssea. Em seguida, pré-osteoblastos são ativados, proliferam-se, diferenciam-se e começam a formar matriz óssea na área previamente reabsorvida (BARON, 2002). O osso é um tecido capaz de formar novo tecido ósseo no reparo tecidual em resposta à injúria, devido ao processo de remodelação. A forma clínica mais comum de reparo ósseo é o processo de cicatrização de fraturas ósseas. Nele, os eventos que ocorrem são semelhantes ao processo contínuo de remodelação que acontece durante toda a vida do indivíduo, assim como durante o desenvolvimento ósseo embrionário (DIMITRIOU et al., 2011; MARSELL; EINHORN, 2011).

A regeneração ou reparo do tecido ósseo envolve uma série de eventos biológicos de recrutamento, proliferação e diferenciação celular induzidos por moléculas mediadoras, sinalizadoras e fatores de crescimento (DIMITRIOU et al., 2011; GIANNOUDIS; JONES; EINHORN, 2011). Após o trauma, quando ocorre ruptura do periósteo e endósteo, destruição da matriz, morte celular e deslocamento de fragmentos ósseos (SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011), vasos sanguíneos são rompidos, promovendo uma hemorragia local, que preenche a zona de fratura e forma um coágulo (MARSELL; EINHORN, 2011). O coágulo funciona como

arcabouço para o desenvolvimento de um calo ósseo cicatricial (GERSTENFELD et al., 2003) e um processo inflamatório, necessário para a evolução do processo de cicatrização, iniciado em resposta à injúria (GERSTENFELD et al., 2003; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011).

Nesse estágio, células fagocitárias removem o tecido necrótico local e surgem novos vasos sanguíneos para o fornecimento de nutrientes e células para o local da fratura, iniciando a cascata de cicatrização (KHOSLA; WESTENDORF; MODER, 2010; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011). Células e moléculas inflamatórias recrutadas para o local promovem angiogênese, estimulando a produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (YANG et al., 2007), produção primária de calo cartilaginoso (SFEIR et al., 2005) e osteogênese (MARSELL; EINHORN, 2011).

Após a formação do coágulo, um tecido de granulação, rico em fibrina, é formado (RAHN, 2002). Dentro deste tecido, inicia-se a ossificação endocondral (DIMITRIOU et al., 2005) e, simultaneamente, a ossificação intramembranosa ocorre na área subjacente ao periósteo, gerando assim um calo ósseo (GERSTENFELD et al., 2006). A formação deste calo ósseo, portanto, depende do recrutamento, proliferação e diferenciação de células mesenquimais em células osteogênicas (MARSELL; EINHORN, 2011; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011).

Tais células podem ser derivadas do periósteo no local da fratura, dos vasos sanguíneos por quimiotaxia, ou do sangue extravasado pelo coágulo (SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011). Além disso, um bom suprimento sanguíneo e a revascularização são essenciais para o sucesso do reparo ósseo, e este processo de revascularização durante a regeneração óssea possui um importante fator de regulação, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Esse fator promove angiogênese (YANG et al., 2007) e a invasão de vasos sanguíneos, proporcionando condições para substituição da matriz cartilaginosa avascular em matriz óssea vascularizada (KERAMARIS; CALORI; NIKOLAOU, 2008). Este é o evento final da ossificação endocondral no crescimento e desenvolvimento ósseo (GERBER et al., 1999; DAI; RABIE, 2007), no qual o tecido cartilaginoso apresenta uma zona de proliferação, hipertrofia e apoptose de condrócitos, enquanto é substituído por osso (GERBER et al., 1999).

Com a invasão de vasos sanguíneos, a hipertrofia e a apoptose dos condrócitos, células especializadas alcançam a matriz extracelular agora mineralizada (GERBER et al., 1999). Foi sugerido, neste estágio, que osteoblastos e

células osteoprogenitoras desenvolvem-se concomitantemente com células endoteliais nas regiões onde novo osso está sendo formado (DECKERS et al., 2000), indicando o envolvimento da angiogênese com a osteogênese e que, possivelmente, estes processos compartilham de mediadores comuns (DAI; RABIE, 2007).

Na formação óssea durante o desenvolvimento, ou nos processos de cicatrização de fraturas ou tumores ósseos, é depositada uma matriz desorganizada rica em fibras colágenas. Esse tecido ósseo formado rapidamente é chamado de osso imaturo, osso primário, ou não lamelar. Este osso, por sua vez, é progressivamente substituído por osso maduro em decorrência do processo característico do tecido, a remodelação óssea (BARON, 2002). Com essa progressão, o calo ósseo torna-se cada vez mais sólido e mecanicamente rígido (GERSTENFELD et al., 2006; MARSELL; EINHORN, 2011).

## 2.2 DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA

A distração osteogênica é um tratamento que utiliza propriedades biomecânicas do tecido ósseo para induzir a formação de matriz óssea dentro de uma fenda criada por osteotomia, seguida da separação gradual dos dois segmentos ósseos estabelecidos por ela (OKAFUJI; LIU; KING, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2008; SAULACIC et al., 2008; ZHENG et al., 2009; VANNUCCI et al., 2011). Tal alongamento progressivo dos fragmentos ósseos forma uma zona de tensão gradual que constitui o princípio da distração óssea, responsável por estimular a expansão tecidual (OKAFUJI; LIU; KING, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2008; SAULACIC et al., 2008; KHANAL et al., 2008).

Inicialmente, a distração osteogênica foi empregada na ortopedia médica para o tratamento de deficiências dos ossos longos (QI et al., 2006; SAULACIC et al., 2008; ALI et al., 2009). Em 1956, Ilizarov demonstrou que a técnica de distração poderia ser aplicada à reconstrução de ossos longos sem maiores repercussões para a saúde do paciente. Em 1972, usando modelo de cão, foi realizada a primeira distração osteogênica craniofacial e, em 1989, McCarthy realizou a primeira distração osteogênica mandibular em humano (ISSA et al., 2009).



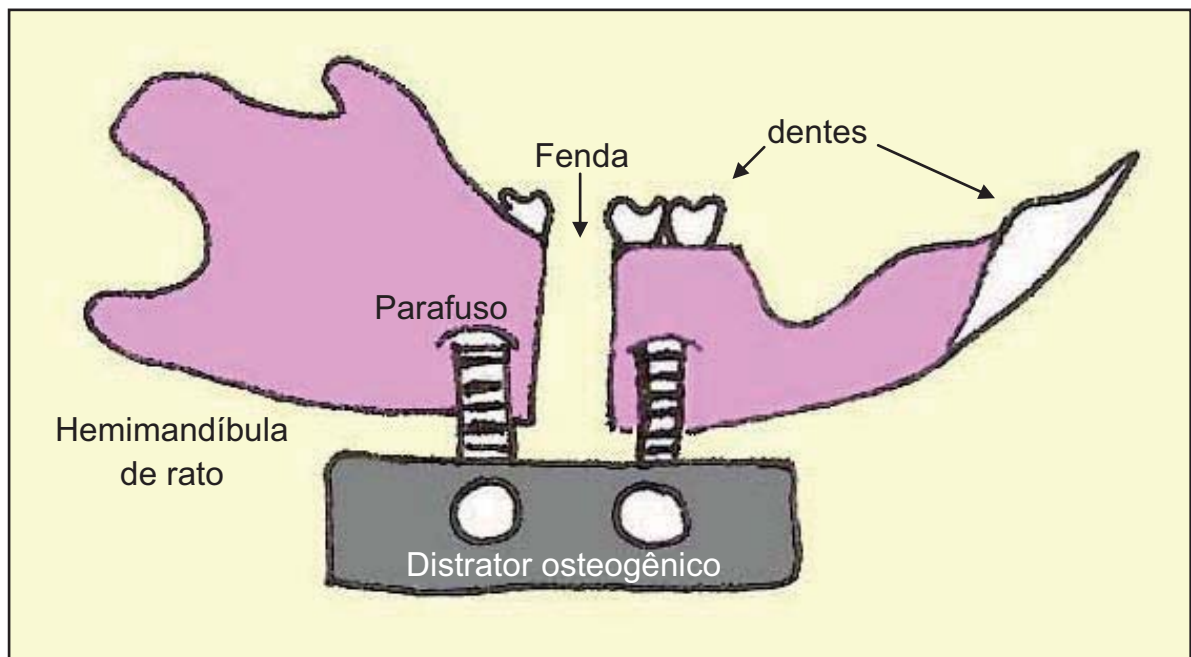
Desde então, a técnica tornou-se importante instrumento para cirurgias craniofaciais (WAN et al., 2006; SAULACIC et al., 2008; ISSA et al., 2009). Além de ser utilizada em diversos tratamentos de casos que demandam neoformação óssea (MOFID et al., 2001; BYUN et al., 2007), a distração osteogênica passou a ser uma alternativa para o tratamento de algumas deformidades craniofaciais, tais como nas retrognatias mandibulares e assimetria óssea (BOULETREAU; WARREN; LONGAKER, 2002; KING et al., 2003; SAULACIC et al., 2008), assim como nos rebordos alveolares com espessura insuficiente para colocação de implantes dentários (OKAFUJI; LIU; KING, 2006; SAULACIC et al., 2008; ALI et al., 2009), nos maxilares para deficiência vertical do rebordo ósseo alveolar, no avanço anterior de maxila hipoplásica e no fechamento horizontal de fendas alveolares (SAULACIC et al., 2008).

A técnica também se tornou uma importante alternativa para os métodos tradicionais de reabilitação protética com implantes, tais como enxerto ósseo e regeneração óssea guiada (SAULACIC et al., 2008; ISSA et al., 2009). Um estudo demonstrou um aumento médio de 10 a 12,5% de formação óssea durante a distração osteogênica mandibular comparada à formação óssea durante regeneração óssea guiada, tratamento este também utilizado nas cirurgias craniofaciais com o mesmo objetivo de osteogênese (LOBOA et al., 2004). A distração osteogênica é, portanto, considerada uma técnica bem estabelecida, comumente usada na cirurgia maxilofacial, capaz de promover uma regeneração óssea estável (KNABE et al., 2005).

A técnica de distração osteogênica mandibular consiste de uma primeira etapa cirúrgica quando, então, é realizada a fixação do distrator e a osteotomia no sentido perpendicular ao plano oclusal dos dentes posteriores da mandíbula. O distrator, um aparelho com parafusos de titânio, é instalado diretamente na superfície externa da mandíbula, nos dois segmentos ósseos constituídos pela osteotomia. Este dispositivo é adaptado paralelamente ao plano oclusal e é posicionado entre os limites superior e inferior da mandíbula (GLOWACKI et al., 2007) (Fig. 1).

Numa segunda etapa, o tratamento consiste de três períodos: o período de latência, o período de alongamento e o período de consolidação da distração (CARVALHO et al., 2004; SOJO et al., 2005). O período de latência é aquele período de tempo entre a primeira etapa cirúrgica e o início da distração, necessário para

integração dos parafusos de titânio ao osso (SOJO et al., 2005; TATUM; LOSQUADRO, 2008). Em seguida, no período de alongamento ósseo, o distrator é ativado diariamente para promover o afastamento gradual dos fragmentos ósseos (SAULACIC et al., 2008) criando, dessa maneira, uma fenda que será progressivamente preenchida por novo osso formado (TATUM; LOSQUADRO, 2008). Por fim, é necessário um período para consolidação da distração após alongamento ósseo (SOJO et al., 2005), no qual o indivíduo é mantido com a fixação externa rígida sem ativação para amadurecimento do tecido formado (BOULETREAU et al., 2002; CARVALHO et al., 2004). Os períodos desta segunda etapa da distração são importantes para o sucesso do tratamento (AMIR et al., 2006).



**Figura 1:** Desenho esquemático de uma hemimandíbula de rato vista lateralmente com parafusos unidos por uma placa (distrator osteogênico) e inseridos na mandíbula. O espaço observado entre as duas extremidades osteotomizadas da mandíbula corresponde a uma fenda de abertura promovida pelo tratamento da distração osteogênica.

Uma pesquisa demonstrou que o alongamento do tecido ósseo por uma distração gradual resulta em um efeito chamado “estresse de tensão” e que é este efeito que promove a ativação metabólica, angiogênese e neoformação óssea

(KNABE et al., 2005). Esta força gradual que é exercida sobre o osso durante a etapa de alongamento ósseo tem sido considerada apropriada para promover a formação de adequada matriz óssea *in vivo*, suficiente para proporcionar estabilidade na colocação de implantes e para a demanda de carga recebida pelos implantes em função (WAN et al., 2006; CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009).

Em nível celular, esta força tem também sido considerada adequada para promover a ativação das células ósseas (KNABE et al., 2005; WAN et al., 2006), evidenciadas pela presença de osteoblastos e osteoclastos na superfície da matriz óssea neoformada (ISSA et al., 2009), diferenciação das células progenitoras mesenquimais pluripotentes no tecido ósseo, no tecido cartilaginoso e no conjuntivo propriamente dito (VAN der MEULEN; HUISKES, 2002; OKAFUJI; LIU; KING, 2006).

Contudo, ainda não foi completamente elucidado como esta força tensional durante a distração contribui para que as células ósseas respondam aos sinais físicos promovidos por ela para desencadear a cascata biomolecular de ativação da formação óssea (WAN et al., 2004; KNABE et al., 2005). Para tentar esclarecer como as células podem ser ativadas durante a distração osteogênica, alguns autores estabelecem que as forças podem agir diretamente nas células do tecido através de canais iônicos mecano-sensíveis, ou através da maquinaria integrinas-citoesqueleto, ou ainda de receptores sensíveis à carga (WAN et al., 2006; FENG et al., 2008), principalmente nos osteoblastos (OKAFUJI; LIU; KING, 2006).

Tal ativação parece acontecer de forma cooperativa com fatores de crescimento tais como fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator básico de crescimento fibroblástico (FGF) (KNABE et al., 2005; BYUN et al., 2007), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e VEGF. Este está envolvido com a osteogênese induzida pela distração, demonstrado pela sua expressão durante as fases do tratamento. Uma vez liberado no tecido ósseo, o VEGF regula o processo de remodelação, assim como o processo de cicatrização. Contudo, esta relação entre o processo de distração osteogênica e os fatores de crescimento ainda não é completamente entendida (KNABE et al., 2005).

Os fenômenos biológicos que ocorrem nas fases do tratamento são semelhantes aos que ocorrem durante a cicatrização de fraturas (AMIR et al., 2006). O período de latência, por exemplo, é caracterizado pelo rompimento de vasos

sanguíneos e formação de coágulos, pela morte celular e infiltrado inflamatório ao redor da região osteotomizada (BOULETREAU et al., 2002; AMIR et al., 2006).

No final desta fase, no entanto, ocorre aumento da expressão TGF- $\beta$ , que é uma proteína que regula o crescimento e diferenciação de células, que promove a produção e mineralização da matriz do tecido ósseo e que inibe a atividade osteoclástica. A expressão das BMP-2, -4 e -7, por sua vez, neste mesmo momento, promove quimiotaxia e proliferação celular em baixas concentrações e a diferenciação celular e formação óssea em altas concentrações. A osteopontina, proteína não-colágena da matriz que promove a adesão dos osteoblastos à superfície da matriz e sua consequente ativação, também estão presentes no final deste período, assim como o VEGF, que é responsável pela formação e crescimento de novos vasos a partir de vasos preexistentes (BOULETREAU et al., 2002). O tecido de granulação, que consiste de tecido conjuntivo, neutrófilos e invasão de capilares, toma o lugar do coágulo depois de alguns dias, e esse tecido, subsequentemente, será transformado em um calo ósseo (AMIR et al., 2006).

Durante o período de distração, além do aumento da expressão de TGF- $\beta$ , das BMP, VEGF e osteopontina, aumentam também a expressão de IGF, que ativam osteoblastos maduros, e de FGF, que modulam a angiogênese, o reparo e o desenvolvimento ósseo (BOULETREAU et al., 2002). Nesta fase, uma rede de fibras colágenas orientadas na direção da tração é depositada na fenda promovida pelo afastamento dos fragmentos ósseos. A formação de tecido ósseo, portanto, acompanha este arcabouço de colágeno recém-depositado (AMIR et al., 2006). Por fim, no período de consolidação, ocorre um declínio dos níveis de TGF- $\beta$  e IGF (BOULETREAU et al., 2002), período necessário para maturação da matriz óssea após distração (AMIR et al., 2006).

A osteogênese parece ser um processo dependente da vascularização local (HU et al., 2003; KNABE et al., 2005; ISSA et al., 2009). Por isso, a distração osteogênica é considerada um bom modelo experimental para estudar a relação entre estímulo mecânico, angiogênese e regeneração óssea (BYUN et al., 2007; ZHENG et al., 2009). Acredita-se que o estímulo mecânico da força gradual exercida sobre o osso durante a distração possa promover nos componentes celulares do tecido ósseo um efeito autócrino de induzir a expressão do receptor de VEGF (VEGFR), assim como o VEGF (BYUN et al., 2007). Consequentemente, tais fatores

vasculares ganham importância para os mecanismos celulares e moleculares de neoformação óssea (KNABE et al., 2005).

Apesar da aplicabilidade da distração osteogênica e de um aumento cada vez maior de sua utilização em diversos tratamentos (CARVALHO et al., 2004; CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009), pouco se sabe sobre os fenômenos biológicos do reparo e regeneração óssea induzida pela distração (CARVALHO et al., 2004), e os profissionais que realizam este procedimento ainda enfrentam complicações (CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009; DIMITRIOU et al., 2011). Algumas das mais comuns que foram reportadas são: infecções relacionadas ao tecido mole, osteomielite (WAN et al., 2006; ISSA et al., 2009; CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009), união fibrosa do parafuso ao osso (QI et al., 2006; WAN et al., 2006), rejeição imunológica dos parafusos, injúria permanente do nervo alveolar inferior, desconforto do paciente, perda da fixação do dispositivo durante a manipulação diária (WAN et al., 2006; VANNUCCI et al., 2011) e alterações no côndilo mandibular (LIU; KING; HERRING, 2006).

Para alguns autores, o tratamento possui limitações técnicas como o procedimento cirúrgico em si, a qualidade dos distratores ósseos (SAULACIC et al., 2008) e o longo período com a fixação externa requerido pelo tratamento (QI et al., 2006; ISSA et al., 2009; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011). Contudo, cerca de 86% dos pacientes obtêm sucesso com o tratamento, indicando, portanto, resultados aceitáveis (MCCARTHY et al., 1995). Este sucesso está relacionado com a estabilidade da fixação do distrator ao osso, do grau de distração diária (BOULETREAU et al., 2002; CATAGNI; GUERRESCHI; LOVESETTI, 2011), da preservação do tecido mole e do suprimento vascular local (BOULETREAU et al., 2002).

Muitos modelos animais têm sido tradicionalmente usados para estas investigações como as espécies de caninos, ovinos e lobos (GLOWACKI et al., 2008; ZHENG et al., 2009). No entanto, a utilização destes modelos tem sido frustrante para os estudos, pelo alto custo (WAN et al., 2006; GLOWACKI et al., 2008), grande porte dos animais, escassez de reagentes moleculares avaliáveis (QI et al., 2006; WAN et al., 2006) e pelo pequeno número de animais utilizados para uma amostra estatisticamente comparável (QI et al., 2006).

Os estudos com modelo canino refinaram os princípios técnicos da distração, mas os mecanismos moleculares do processo permaneceram desconhecidos até a

utilização de modelos de ratos (BOULETREAU et al., 2002). Recentemente, os estudos têm utilizado roedores como modelo animal de escolha para pesquisas com distração osteogênica (FANG et al., 2004; 2005; KIM; LI; SENG, 2006; KHANAL et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2008), demonstrando ser um modelo viável (QI et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2008; ISSA et al., 2009). Isso facilita as investigações para análises de reagentes moleculares (WAN et al., 2006; ZHENG et al., 2009), análises com *microarrays*, bioluminescência, tomografia computadorizada e, sobretudo, favorece no custo e flexibilidade do estudo em detalhar as investigações para definir os mecanismos envolvidos no sucesso da osteogênese ocorrida na distração osteogênica (WAN et al., 2006).

Além disso, avaliações de exames radiográficos e histológicos da distração em ratos indicaram que as características ósseas do procedimento foram similares às daquelas em animais de grande porte (QI et al., 2006). As pesquisas com a técnica em roedores permitem diversas avaliações com parâmetros variados, proporcionando conhecimentos que podem melhorar o tratamento de pacientes com restrições sistêmicas como diabetes (GLOWACKI et al., 2008), osteoporose pós-menopausa (ARSLAN et al., 2003).

Embora os eventos biológicos relacionados ao reparo nas fraturas ósseas e na distração osteogênica pareçam semelhantes (AMIR et al., 2006; LEE et al., 2008), os estudos sobre os efeitos da osteoporose pós-menopausa sobre a união óssea associada à fratura e reparação do tecido não podem ser empregados da mesma forma para a compreensão do reparo ósseo num modelo de distração osteogênica na ausência de estrógeno (KUBO et al., 1999; ARSLAN et al., 2003).

### 2.3 ANGIOGÊNESE

O processo de indução óssea natural na distração osteogênica tem sido considerado um modelo importante no estudo do processo de angiogênese e regeneração óssea (FANG et al., 2005). A osteogênese e a angiogênese são processos intimamente associados durante a formação de reparos ósseos (DAI; RABIE, 2007; KANCZLER; OREFFO, 2008).

A angiogênese, também chamada de neovascularização, é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede de vasos pré-existentes, como uma contínua expansão de um ramo vascular, em resposta ao aumento da massa



tecidual (CARMELIET, 2005; DAI; RABIE, 2007), ou em resposta a trauma do tecido local, como ocorre nos reparos ósseos (HUANG et al., 2005). A angiogênese é importante para o reparo, porque permite o transporte de oxigênio, nutrientes, fatores solúveis e numerosos tipos celulares para os tecidos relacionados (KANCZLER; OREFFO, 2008; SHIBUYA, 2009), garantindo adequado metabolismo e a sobrevivência dos tecidos (DAI; RABIE, 2007).

As paredes de capilares (pequenos vasos sanguíneos) são revestidas por células endoteliais, enquanto que as paredes dos vasos de calibre maior são revestidos por células endoteliais, pericitos e células musculares lisas (nos vasos de grande calibre) (CARMELIET, 2003; JAIN, 2003). Durante o desenvolvimento do embrião, os vasos sanguíneos desenvolvem-se a partir de precursores endoteliais, por um processo chamado vasculogênese, e promovem a morfogênese dos órgãos e podem crescer em vários sentidos (CARMELIET, 2003, 2005). A angiogênese também participa do desenvolvimento embrionário da vasculatura, proporcionando o brotamento e a formação de rede de vasos a partir dos vasos formados pela vasculogênese (JAIN, 2003; SHIBUYA, 2009).

Durante a vida adulta, no entanto, a maioria das células dos vasos sanguíneos são quiescentes, com exceção dos vasos sanguíneos envolvidos em resposta aos processos fisiológicos, tais como a cicatrização de feridas, remodelação tecidual, ovulação e crescimento placentário (DAI; RABIE, 2007; CAPP et al., 2009). Contudo, as células endoteliais não perdem a capacidade de se dividirem rapidamente em resposta a estímulos fisiológicos tais como hipóxia dos vasos sanguíneos e inflamação dos vasos linfáticos (CARMELIET, 2005).

Entretanto, além do envolvimento nos processos fisiológicos, a angiogênese pode também estar envolvida em processos patológicos. Esta angiogênese patológica pode se caracterizar pela formação excessiva e desregulada de vasos sanguíneos ou pela formação insuficiente ou regressão dos vasos sanguíneos. Quando se caracteriza pela formação excessiva de vasos causa um impacto significativo na saúde e contribui para a evolução e desencadeamento de várias doenças (CAPP et al., 2009; SHIBUYA, 2009), tais como a expansão tumoral e metástase, artrite reumatóide, retinopatia diabética, inflamação, psoríase, obesidade (DAI; RABIE, 2007; CAPP et al., 2009), asma, cirrose, endometriose, esclerose múltipla, Aids, infecções bacteriológicas e doenças autoimunes (CARMELIET, 2005). E, ao se caracterizar pela formação insuficiente ou regressão dos vasos sanguíneos,

contribui para o progresso de algumas doenças como aterosclerose (formação de ateromas nos vasos sanguíneos levando à obstrução dos vasos), isquemia, osteoporose (DAI; RABIE, 2007), hipertensão e pré-eclâmpsia (CARMELIET, 2005; DAI, RABIE, 2007).

Alguns dos eventos moleculares que ocorrem na vasculogênese se repetem no processo de angiogênese (OETTGEN, 2001). Tais eventos incluem o aumento da permeabilidade vascular, o desarranjo da parede vascular, a remoção dos pericitos (KANCZLER; OREFFO, 2008), a fragmentação da membrana basal e da matriz extracelular por proteases (colagenase tipo IV e estromelisinase) (JAIN, 2003; KANCZLER; OREFFO, 2008), a migração das células endoteliais que revestem a parede dos vasos através da matriz extracelular remodelada, a proliferação da célula endotelial e formação de brotos (OETTGEN, 2001; KANCZLER; OREFFO, 2008), a reconstituição da membrana basal, a maturação dos complexos juncionais, a construção da parede vascular e o estabelecimento de fluxo sanguíneo no novo vaso (KANCZLER; OREFFO, 2008).

Os fatores e eventos que controlam o desenvolvimento embriogênico da vasculatura também participam das situações de neoangiogênese no adulto (CARMELIET, 2003; KANCZLER; OREFFO, 2008). Fatores endógenos estimuladores (angiogênicos) e fatores inibidores (antiangiogênicos) fazem parte deste sistema de controle. Dentre eles, podem ser citados como fatores angiogênicos: o VEGF, o fator de crescimento tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a angiogenina, FGF, o fator de angiogênese derivado do macrófago, heparina, PDGF, TGF- $\beta$  (DAI; RABIE, 2007; KANCZLER; OREFFO, 2008), fator de crescimento e transformação alfa (TGF- $\alpha$ ) (DAI; RABIE, 2007). E como componentes antiangiogênicos, ou angiostáticos, podem ser citados: endostatina, fragmentos de colágeno tipo XVIII e IV, trombospondina (DAI; RABIE, 2007; KANCZLER; OREFFO, 2008).

O fator angiogênico VEGF é uma proteína hemodímera de 34 a 42 kDa, que se constitui um agente regulador fundamental para angiogênese normal e anormal (DAI; RABIE, 2007; SHIBUYA, 2009). Ele foi primeiramente identificado por Ferrara e Henzel em 1989 como um fator de crescimento endotelial específico de células foliculares pituitárias de bovinos (SENGER, 2010). O VEGF é essencial para a diferenciação de células em alguns tecidos (DAI; RABIE, 2007) e, principalmente, bem caracterizado durante a formação e crescimento dos vasos (HELOTERA; ALITALO, 2007).



O VEGF participa de uma família de fatores na qual estão incluídos o VEGF-A (DAI; RABIE, 2007; SHIBUYA, 2009), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F. Eles compartilham de uma mesma estrutura de 8 resíduos de cisteínas situadas em um domínio homólogo. O VEGF-A foi o primeiro membro da família a ser descoberto. Ele possui um efeito quimiotático nos monócitos, aumentando o acúmulo local de macrófagos e promove o aumento dos níveis de VEGF na angiogênese. Ele é um mediador fundamental para a angiogênese fisiológica e patológica e também pode ser chamado de fator de permeabilidade vascular (VPF). É produzido pelas células musculares lisas dos vasos e, em condições de baixa oxigenação, também podem ser produzidos por condrócitos (DAI; RABIE, 2007), além das células tumorais (FOLKMAN, 2000). A angiogênese promovida pelo VEGF-A contribui para o desenvolvimento dos ossos longos, altera permeabilidade dos vasos sanguíneos (DAI; RABIE, 2007; SENGER, 2010), estimula a osteoclastogênese durante a erupção dentária (DAI; RABIE, 2007) e induz a proliferação das células endoteliais vasculares (FOLKMAN, 2000).

O VEGF-B, também chamado de fator relacionado a VEGF (VRF), é abundante no coração, músculos esqueléticos e pâncreas. O VEGF-C, ou também conhecido como proteína relacionada ao VEGF (VRP), pode estimular a migração e proliferação das células endoteliais, mas é menos potente do que o VEGF-A. O VEGF-D que pode ser chamado de fator de crescimento indutor de c-fos (FIGF), possui potente poder angiogênico e pode ser encontrado em muitos tecidos como fígado, coração e pulmão. O VEGF-E é um forte estimulador angiogênico que pode induzir a proliferação e migração de células endoteliais. O VEGF-F bloqueia a atividade de VEGF-A ao se ligar ao seu receptor, o VEGFR-2 (DAI; RABIE, 2007).

O VEGF é produzido por muitos tipos celulares, dentre eles os fibroblastos, células do músculo liso, condrócitos hipertróficos e osteoblastos (DAI; RABIE, 2007). Células tumorais também sintetizam VEGF para estimular a angiogênese ao redor do tumor (KINDT et al., 2008). O crescimento tumoral é um processo dependente da angiogênese (FOLKMAN, 2000). Sem a formação de novos vasos sanguíneos, as células tumorais não sobrevivem. Bem irrigadas pelos novos vasos, as células tumorais, então, podem se destacar da massa tumoral e alcançar a corrente sanguínea. Conseqüentemente, outros tecidos também podem ser alcançados por estas células tumorais, gerando assim a metástase (KINDT et al., 2008). Considerando, então, a importância do VEGF para a angiogênese na progressão

tumoral, várias abordagens terapêuticas direcionadas para este fenômeno têm sido estudadas no intuito de oferecer melhor controle da doença (STREET et al., 2002).

Nos processos de ossificação endocondral (GERBER et al., 1999), na ossificação intramembranosa (STREET et al., 2002), no crescimento do côndilo mandibular e na formação de ossos longos (DAI; RABIE, 2007), o VEGF possui efeitos biológicos. Uma alta expressão desta molécula foi encontrada nos condrócitos hipertróficos e pouca expressão nos condrócitos em proliferação durante o processo de ossificação endocondral (GERBER et al., 1999). Esta expressão também foi detectada em condroblastos, condrócitos e osteoblastos na região de calo ósseo formado durante processo de cicatrização de fraturas (TATSUYAMA et al., 2000; PUFÉ et al., 2001), assim como foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que o VEGF pode recrutar osteoclastos (NIIDA et al., 1999; ENGSIG et al., 2000).

Estudos examinando a expressão de VEGF em um modelo de distração osteogênica em mandíbula observaram um aumento da expressão de VEGF nos osteoblastos (HU et al., 2003; BYUN et al., 2007), indicando que a relação do VEGF com a osteogênese não se resume apenas ao estímulo da angiogênese por este fator, mas também por uma ação direta sobre a formação e atividade das células ósseas (STREET et al., 2002). Tem sido observada a presença de alguns receptores para VEGF em osteoblastos, sendo a expressão de FLT-1 mais intensa quando comparada com as de outros receptores (BYUN et al., 2007). O envolvimento desses receptores na regulação dos osteoblastos é reforçado pela evidência de camundongos exibindo menor volume ósseo, em condições de deficiência na sinalização por FLT-1 (OTOMO et al., 2007). Além disso, foi observado que o bloqueio de receptores para VEGF em áreas de fraturas femurais resulta na redução da angiogênese e da formação óssea (STREET et al., 2002).

Os receptores para VEGF são receptores tirosino-cinase transmembrana com alta afinidade para VEGF, presente principalmente nas células endoteliais (CAO, 2009). Portanto, a sinalização para angiogênese ocorre diretamente sobre as células endoteliais, via receptor de VEGF. Assim como existem cinco glicoproteínas estruturalmente semelhantes que participam da mesma família de fatores de crescimento VEGF, também existem três receptores com diferentes domínios de ligação transmembrana para o VEGF, o VEGFR-1 [FLT-1 (*Fms-like tyrosine kinase*)-1], VEGFR-2 [FLK-1 (*fetal liver kinase*)-1] (NIIDA et al., 2005; CAO, 2009; SHIBUYA, 2009) e VEGFR-3 (CAO, 2009). O VEGF-A tem afinidade pelo VEGFR-1 e VEGFR-

2, mas não se liga ao VEGFR-3 (SHIBUYA, 2009). Porém, a ação do VEGF também depende de sinalização parácrina, a qual inclui PDGF e angiopoietinas (Ang), que estão relacionados à estabilização da vasculatura e proteção da sobrevivência do endotélio (GERBER et al., 1999; HELOTERA; ALITALO, 2007).

Muitos tipos celulares não endoteliais expressam FLT-1; dentre eles podem ser citados os monócitos, células da linhagem de macrófagos (NIIDA et al., 2005; CAO, 2009), incluindo os osteoclastos (GERBER et al., 1999; AOYAMA et al., 2004; SHIBUYA, 2006), osteoblastos (GERBER et al., 1999; UCHIDA et al., 2003), condrócitos hipertróficos (GERBER et al., 1999), células progenitoras da medula óssea e várias células tumorais (SHIBUYA, 2006). A atividade do FLT-1 é aproximadamente um décimo daquela do VEGFR-2, e sua capacidade de estimular a proliferação de células endoteliais é mais fraca do que o VEGFR-2. A expressão de FLT-1 em células da linhagem de macrófagos indica que a sua sinalização é importante para quimiotaxia destas células e para estimular a resposta inflamatória (SHIBUYA, 2009). Considerando-se que a ativação do FLT-1 regula a ativação e quimiotaxia das células tumorais (NIIDA et al., 2005), acredita-se que esta sinalização permita a diferenciação de células endoteliais e que possa interferir nos estágios tardios da vasculogênese, proporcionando a formação de vasos com diâmetro e tamanho normais (FOLKMAN; D'AMORE, 1996).

Embora alguns trabalhos tenham mostrado a presença de receptores para VEGF em osteoblastos em vários modelos de reparo ósseo, faz-se necessário um aprofundamento do estudo sobre a presença de destes receptores nas células da matriz óssea, particularmente no reparo ósseo induzido pela distração osteogênica.

## 2.4 ESTRÓGENO

O osso é um tecido dinâmico e que se remodela por toda a vida do indivíduo (SIMON, 2005; LELOVAS et al., 2008). A remodelação óssea é caracterizada pelo equilíbrio entre os processos de reabsorção da matriz óssea e de formação de nova matriz (SIMON, 2005; NAKAMURA et al., 2007). O metabolismo ósseo de um indivíduo adulto está relacionado ao processo de remodelação, e o desequilíbrio entre os eventos envolvidos na remodelação gera condições para o desenvolvimento de quadros patológicos, como o da osteoporose (OURSLEER et al., 1993; NAKAMURA et al., 2007). A osteoporose é caracterizada por progressiva

perda de massa óssea e aumento do risco de fratura (LELOVAS et al., 2008; MCNAMARA, 2010; MARCU et al., 2011). Embora a doença também possa atingir indivíduos mais jovens, decorrente de um rápido período de crescimento e dieta com baixos níveis de cálcio, usualmente são os indivíduos em idades mais avançadas os mais acometidos pela doença, e a idade é o maior fator de risco para seu desenvolvimento (LELOVAS et al., 2008; MARCU et al., 2011). Com o aumento da expectativa de vida, a osteoporose tornou-se mais prevalente na população mundial. Conseqüentemente, devido a sua morbidade e mortalidade, a doença tem se tornado um problema grave de saúde pública (PINHEIRO; EIS, 2010; GIRO et al., 2011).

A osteoporose pode ser classificada clinicamente como primária e secundária (LELOVAS et al., 2008; SIPOS et al., 2009; RIGGS, 2002). A osteoporose primária refere-se à doença desenvolvida nas mulheres pós-menopausa (tipo I) ou desenvolvida em consequência do normal envelhecimento do indivíduo (tipo II). A osteoporose secundária é a perda óssea desenvolvida em decorrência de outras complicações ou de tratamentos medicamentosos (RIGGS, 2002), como os glicocorticóides (CRUSOÉ-SOUZA et al., 2010).

A forma mais comum da doença é a osteoporose pós-menopausa (primária tipo I) que acomete o organismo feminino adulto na sua fase não reprodutiva. Nesta fase, em consequência da interrupção do ciclo menstrual (BALASCH, 2003), ocorre uma deficiência hormonal de estrógeno no organismo (RIGGS, 2000; MANOLAGAS; KOUSTENI; JILKA, 2002; QUINN; GILLESPIE, 2005; LIANG et al., 2008), tornando-se este, portanto, o principal fator patogênico da osteoporose (LELOVAS et al., 2008).

A osteoporose pós-menopausa, causada pela deficiência de estrógeno, diminui a qualidade de vida destes indivíduos, promovendo maior risco de fratura, deformidade postural por fragilidade óssea (EJIRI et al., 2006) e incapacidade física. Além disso, devido a complicações decorrentes das fraturas, tais como infecções, trombozes e condições cardiovasculares associadas, têm crescido as taxas de mortalidade nestes indivíduos, causando um impacto sobre o sistema de saúde (PINHEIRO; EIS, 2010).

Com o aumento da prevalência da osteoporose pós-menopausa, em decorrência do aumento da expectativa de vida da população mundial, os profissionais de saúde, assim como os cirurgiões-dentistas, têm tratado destes

indivíduos com mais frequência. Portanto, faz-se necessário o entendimento das condições ósseas dos maxilares em pacientes portadores de osteoporose (EJIRI et al., 2006).

O estrógeno é um dos hormônios mais importantes para a manutenção da homeostase óssea (RICKARD et al., 1999; NAKAMURA et al., 2007), embora sua ação no tecido ósseo ainda não seja completamente entendida (SORENSEN et al., 2007). Sabe-se que o estrógeno promove múltiplos efeitos sobre as células ósseas e medulares, proporcionando equilíbrio no processo de remodelação da matriz mineralizada (PIVA et al., 2006; FALONI et al., 2007). Estudo *in vivo* demonstrou aumento de volume de matriz óssea em ratas tratadas com estradiol, sugerindo que a formação óssea pode ser estimulada pelo estrógeno (CHOW et al., 1992).

A diminuição da massa óssea que acomete indivíduos com osteoporose é resultado do desequilíbrio no processo de remodelação, com o aumento da reabsorção óssea em relação à formação de nova matriz, afetando a qualidade do osso. As trabéculas ósseas tornam-se mais delgadas, perdem a continuidade, apresentam microfissuras e irregularidades, e os espaços medulares apresentam-se maiores (MARCU et al., 2011).

O estrógeno tem efeitos anti-apoptóticos (MANOLAGAS et al., 2000) sobre os osteoblastos e desencadeia a diferenciação e ativação destas células (MICHAEL et al., 2005). Portanto, a sobrevivência e ativação das células responsáveis pela formação da matriz óssea são comprometidas pela deficiência do estrógeno. Além disso, este hormônio controla a produção de citocinas como interleucina-1(IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) (RIGGS, 2000) e interleucina-11 (IL-11) (RICKARD et al., 1999), que estimulam a proliferação, diferenciação e ativação de osteoclastos. Dessa maneira, o estrógeno também age indiretamente sobre a osteoclastogênese, e a sua deficiência promove o aumento de osteoclastos no tecido (PACIFICI, 1998).

Outro efeito da deficiência de estrógeno sobre a remodelação óssea é sua participação no sistema receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK)/ligante do RANK (RANKL)/osteoprotegerina (OPG). Os osteoclastos expressam RANK, enquanto os osteoblastos expressam RANKL. RANK e RANKL ligam-se entre si com altíssima afinidade (MANOLAGAS, 2000; LIANG et al., 2008). Esta interação induz a diferenciação de células precursoras em osteoclastos (LIANG et al., 2008), além de

ativar a reabsorção óssea pelos osteoclastos maduros e aumentar sua sobrevivência (RIGGS, 2000; MIYAZAKI et al., 2004).

Entretanto, o RANKL pode ser bloqueado pela OPG, produzida pelos osteoblastos, inibindo a formação e a atividade dos osteoclastos (AUBIN; BONNELYE, 2000; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; LIANG et al., 2008). Ao ligar-se ao RANKL, a OPG funciona como um “*decoy receptor*” para RANKL, bloqueando a interação RANK-RANKL, inibindo assim a osteoclastogênese (MANOLAGAS, 2000; QUINN; GILLESPIE, 2005; LIANG et al., 2008). Na deficiência de estrógeno, parece haver inibição da produção de OPG pelos osteoblastos, favorecendo a reabsorção óssea (RIGGS et al., 2000).

Os osteoclastos também são controlados diretamente pelo estrógeno. Estas células possuem receptores de estrógeno na sua superfície e, dessa forma, o hormônio regula a diferenciação, atividade e apoptose destas células (CRUSOÉ-SOUZA; SASSO-CERRI; CERRI, 2009; MCNAMARA, 2010). Embora muitas pesquisas tenham evidenciado as complexas alterações moleculares, celulares, na composição, integridade e arquitetura tecidual da osteoporose, os múltiplos efeitos da deficiência de estrógeno no tecido ósseo e a sequência de eventos que promove a perda óssea nesta condição patológica ainda não são completamente esclarecidas (MCNAMARA, 2010).

A ovariectomia em modelos animais é um método mais comumente empregado em pesquisas para induzir a osteoporose pós-menopausa. Após a remoção dos ovários, ocorre deficiência de estrógeno no organismo do animal e consequente estímulo à formação e ativação de osteoclastos (KODAMA et al., 2004; LELOVAS et al. 2008; GIRO et al., 2011). As fêmeas de ratos e camundongos ovariectomizadas exibem uma diminuição na densidade óssea e aumento na taxa de reabsorção óssea semelhantes ao observado nas mulheres. Por isso, pesquisas têm utilizado estes animais como modelo experimental para estudo da osteoporose consequente à deficiência estrogênica (TENÓRIO et al., 2002).

Estudos mostraram que animais ovariectomizados exibem aumento da expressão de VEGF, indicando uma relação entre a deficiência de estrógeno, VEGF e a reabsorção óssea (KODAMA et al., 2004; PUFÉ et al., 2007). A possível relação entre o estrógeno e o VEGF sugere que a deficiência deste hormônio induzida pela ovariectomia pode modificar a quantidade deste fator liberado durante reparo ósseo,

influenciando assim, a matriz óssea formada durante a distração osteogênica, possivelmente por sua ação sobre o osteoblasto e a angiogênese.

Sendo assim, o estudo do reparo ósseo após trauma induzido pela distração osteogênica em mandíbulas de ratas ovariectomizadas em tempos determinados permitirá perspectivas para a aceleração da cicatrização do tecido e diminuição do tempo de tratamento nas distrações osteogênicas e na correção de anormalidades ósseas, particularmente nas mulheres em menopausa.

### **3 OBJETIVOS**



### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o reparo ósseo de mandíbulas de ratas ovariectomizadas e submetidas à distração osteogênica.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar e comparar, por meio de análise histológica, a osteogênese em mandíbulas submetidas à distração osteogênica de ratas não ovariectomizadas e ovariectomizadas ao longo de períodos diferentes;
- Analisar, por meio de estudo histomorfométrico, o volume de osso formado após distração osteogênica em mandíbulas de ratas não ovariectomizadas e ovariectomizadas;
- Avaliar radiograficamente a densidade do osso formado entre as extremidades ósseas osteotomizadas e distraídas em mandíbulas de ratas dos grupos controle e experimental;
- Investigar, por meio de estudo imuno-histoquímico, a presença e distribuição do VEGF e seu receptor (FLT-1) nas células relacionadas com a matriz óssea formada após distração osteogênica mandibular em ratas.

## **4 METODOLOGIA**

## 4.1 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO

Nesta pesquisa, foram utilizadas trinta ratas (*Ratus norvegicus, Albinus*) da linhagem *Wistar*, com três meses de idade, mantidas sob regime hídrico e alimentar “*ad libitum*” e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, em ambiente com temperatura controlada (22-25°C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (Protocolo nº 1409). As ratas foram aleatoriamente divididas em dois grupos, conforme descrito abaixo:

1. Grupo de ratas ovariectomizadas (GO) – animais que foram submetidos à ovariectomia antes da distração osteogênica mandibular;
2. Grupo de ratas controle (GC) – animais que não foram submetidos à ovariectomia antes da distração osteogênica mandibular;

A distração osteogênica mandibular foi realizada em todos os animais (GO e GC) somente na hemimandíbula direita, enquanto que a hemimandíbula esquerda foi utilizada como controle do experimento radiográfico.

## 4.2 COLETA DE DADOS

### 4.2.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: OVARIECTOMIA

Após uma semana de adaptação, os animais do GO foram submetidos à cirurgia para remoção dos ovários (ovariectomia) que foi executada por um médico veterinário. Antes da anestesia, foi administrada para cada animal 1 gota via oral de dipirona sódica (EMS®, São Paulo), 500mg. Os animais foram anestesiados com solução aquosa a 2% de cloridrato de xilasina (Anasedan®) 5mg/kg diluído em cloridrato de quetamina (Francotar®) 50mg/kg, via intramuscular. Após tricotomia e assepsia, foi executada uma incisão reta transversal na fossa ilíaca de aproximadamente dois centímetros na pele e tecido celular subcutâneo a cerca de um centímetro da linha mediana. A parede muscular foi divulsionada até ter acesso à cavidade abdominal, localizando-se o ovário em meio a uma massa gordurosa. A retirada do ovário foi efetuada após ligadura da extremidade da tuba uterina, seccionando-se entre a ligadura e o ovário. A ferida cirúrgica foi fechada por planos,

e todo o procedimento foi repetido do outro lado para a retirada do outro ovário. Concluído o procedimento cirúrgico, pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (3ml de 240.000 UI de Penicilinas e 100 mg de Estreptomicina e Diidroestreptomicina por ml) foi injetado via intramuscular (0,1ml) e os animais foram colocados em suas gaiolas individuais para a recuperação anestésica. A descrição detalhada do procedimento de ovariectomia já foi publicada previamente (ORRICO et al., 2005).

#### 4.2.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA IMPLANTAÇÃO DO DISTRATOR OSTEOGÊNICO

Transcorridos 7 dias da ovariectomia dos animais do GO, os animais dos dois grupos (GO e GC) foram anestesiados com solução aquosa a 2% de cloridrato de xilasina (Anasedan®) diluído em cloridrato de quetamina (Francotar®), via intramuscular. Antes da anestesia foi administrado para cada animal 1 gota via oral de dipirona sódica (EMS®, São Paulo) 500mg. Após assepsia e tricotomia, foi executada uma incisão transversa ao longo do bordo inferior da hemimandíbula direita. O músculo masseter foi seccionado e deslocado, com o propósito de expor o ângulo e corpo mandibular (Fig. 2A). Usando um disco diamantado (diâmetro de 0.5 mm, Axis Dental Co. Irving, TX) em baixa rotação e abundante irrigação com soro fisiológico, a mandíbula foi parcialmente osteotomizada (Fig. 2B). Em seguida, dois parafusos de titânio (0,8 mm, Neodent, São Paulo, Brasil) foram posicionados a 2 mm das bordas da secção óssea, na superfície externa da mandíbula (Fig. 2C), e ancorados a um expansor ortodôntico (expansor bilateral pequeno, Dentaurum, Alemanha) por resina acrílica (*Duralay*, Brasil). Após estabilização, a osteotomia foi completada com auxílio de uma alavanca reta adaptada e modificada artesanalmente e o dispositivo foi funcionalmente aplicado como um distrator osteogênico mandibular (Fig. 2D). A área, então, foi suturada em camadas e Pentabiótico de pequeno porte ® (penicilina + streptomicina) foi injetado via intramuscular. Todas as ratas foram nutridas com ração sólida moída (Ração peletizada 20 Kg – Nuvital Agropecuária Ltda) nas primeiras vinte e quatro horas após a cirurgia, e hidratados “*ad libitum*”. Descrição detalhada do procedimento de distração e cuidados pós-operatórios já foi publicada em outros trabalhos (KING et

al., 2003; LIU et al., 2005; OKAFUJI; LIU; KING, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2008).

Decorridos 7 dias da cirurgia (período de latência), os dispositivos acoplados às hemimandíbulas direitas dos animais foram ativados 0,5 mm por dia (Fig. 3), durante 5 dias, alcançando um total de 2,5 mm de comprimento entre as bordas da mandíbula no final da distração óssea mandibular (ALBUQUERQUE et al., 2008).

#### 4.3 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Após período de 7, 14 e 28 dias do primeiro dia de ativação do distrator osteogênico mandibular, cinco animais do GO e cinco animais do GC foram sacrificados, sendo perfundidos com solução de 4% de paraformaldeído tamponado em fosfato de sódio 0,1M (pH ajustado para 7,2), após aplicação de solução anestésica a 2% de cloridrato de xilasina (Anasedan®) diluído em cloridrato de quetamina (Francotar®), via intramuscular. Após perfusão de cada animal, as peças cirúrgicas foram obtidas mediante dissecação da mandíbula de forma a obter as hemimandíbulas direita e esquerda, as quais foram imersas nas mesmas soluções fixadoras utilizadas na perfusão por mais 24 horas.

A eficácia da distração osteogênica foi confirmada após avaliação da distância entre os parafusos por meio de uma régua milimetrada (Fig. 4). A privação de estrógeno pela ovariectomia foi confirmada pela observação clínica da atrofia do útero após eutanásia dos animais (WRONSKI et al., 1985) (Fig. 5).

#### 4.4 TOMADAS RADIOGRÁFICAS

Foram realizadas tomadas radiográficas das hemimandíbulas direita e esquerda de cada animal logo após imersão das peças no fixador. As exposições foram realizadas utilizando-se o aparelho Expert DC (Gendex Dental System, Itália) de quilovoltagem e miliamperagem fixas em 65kVp e 7mA, respectivamente, a uma distância foco-receptor de 34cm, garantida por um suporte de acrílico (Fig. 6). Cada espécime foi radiografado pelo método digital (DenOptix® – Dentsply International/Gendex® Dental X-ray Division, Illinois, EUA), utilizando o tempo de exposição de 0,160s. As hemimandíbulas foram fixadas em uma única cera utilidade, para garantir reprodutibilidade e posições semelhantes nas diversas

exposições. A cera foi fixada perto do suporte do filme, no posicionador de acrílico (Fig. 7). Além de garantir uma padronização das imagens, esse suporte de acrílico possui uma placa de 1,2 cm de espessura em acrílico, para reproduzir o tecido mole.

Uma escala de alumínio foi posicionada na cera, perto das hemimandíbulas (Fig. 6 e 7), em todas as tomadas radiográficas. Além de garantir uma padronização da imagem radiográfica, a escala possibilitou o cálculo da radiopacidade no interior do defeito ósseo. Foram adicionados também dois marcadores de guta-percha (material radiopaco) nas margens do defeito ósseo (Fig. 8), nos mesmos locais onde estavam fixados os parafusos de titânio, para facilitar as análises subsequentes.

Para obtenção das imagens, foi selecionada uma única placa de armazenamento de fósforo (DenOptix®) de dimensão 30mm x 40mm. Imediatamente após sua sensibilização pela radiação X, esta placa de armazenamento de fósforo foi escaneada no *scanner* do DenOptix®. Os arquivos foram exportados do *software* do fabricante e salvos em formato TIFF (*Tagged Image File Format*). Esta placa de armazenamento de fósforo foi colocada em um negatoscópio por dois minutos, para garantir que a imagem fosse completamente apagada.

#### 4.5 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Após fixação, as peças foram imersas em solução aquosa de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 4,13%, pH 7,2 (WARSHAWSKY; MOORE, 1967), sob agitação constante, durante 3 meses, com finalidade de desmineralizá-las. Em seguida, os fragmentos mandibulares foram desidratados com concentrações crescentes de etanol diluído em água destilada até chegar ao etanol absoluto. Após a diafanização em xilol, procedeu-se à infiltração com parafina líquida (58-60°C) e, finalmente, à inclusão em parafina. Os blocos de parafina contendo os fragmentos da mandíbula foram cortados com auxílio de um micrótomo modelo 820 (American Optical Ltda), com espessura de 5 µm e aderidos a lâminas de vidro. Secções representativas de cada grupo foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e *alcian blue*-eosina e outras foram aderidas a lâminas silanizadas (3-aminopropylthoxyzylane – Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) ou lâminas *immunoSlide* (EasyPath divisão saúde) para realização da reação imuno-histoquímica para VEGF e FLT-1.

#### 4.5.1 COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA (H&E) E *ALCIAN BLUE-EOSINA*

Cortes representativos foram desparafinizados em xilol, submetidos a banhos de etanol e hidratados. Em seguida, foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison e montados em meio resinoso (Bálsamo do Canadá) para seleção das regiões de interesse, análise morfológica e histomorfométrica. Cortes representativos de cada grupo foram corados com *Alcian Blue-Eosina* para confirmação histológica de áreas de cartilagem no sítio de reparo ósseo.

#### 4.5.2 REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS PARA VEGF E VEGFR-1 (FLT-1)

Decorridas 12 horas de estocagem em estufa a 30°C, as secções histológicas com os fragmentos mandibulares aderidos a lâminas de vidro silanizadas ou lâminas *immunoSlide (Easypath)* foram desparafinizadas em banhos sucessivos de xilol e hidratadas em banhos crescentes de etanol (100%, 95% e 70%), seguidos de água destilada. A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se panela de pressão (5 min) com as secções imersas em tampão citrato (solução ácido cítrico 0,1M diluída 1:100 pH 6,0) para o FLT-1 e imersas em tampão tris-EDTA para o VEGF. Após resfriamento em temperatura ambiente, os cortes foram lavados em tampão fosfato salina (*phosphate buffered saline-PBS*, pH 7,2-7,5) e, em seguida, tratados durante 20 min com uma solução composta por peróxido de hidrogênio 3% e metanol (álcool metílico) para inibição da peroxidase endógena. Após duas novas lavagens em *PBS* por 5 min cada, as secções foram incubadas em solução 0,25% de caseína em *PBS*, contendo proteína estabilizadora e 0,015 mol/L de ázida sódica (*Protein Block Serum free, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA*) durante 1 hora para bloqueio dos sítios inespecíficos. Subsequentemente, os anticorpos primários anti-VEGF (Santa Cruz *Biotechnology*, California, USA, C-1 sc-7269 *monoclonal mouse*) e anti-FLT-1 (Santa Cruz *Biotechnology*, California, USA, C-17 sc-316 *polyclonal rabbit*), diluídos respectivamente 1:50 e 1:250 em *Antibody Diluent, Background Reducing (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA)* foram incubados em temperatura ambiente, seguidos de manutenção *overnight* em geladeira (2-8°C).

No dia seguinte, após lavagem com tampão *PBS-Tween-20* (0,25% de detergente *Tween-20* em solução *PBS*), os cortes foram incubados com o sistema de amplificação streptavidina-biotina (*Labelled Streptavidin Biotin*, LSAB System – *DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA, K0690*) durante 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram novamente lavados em banho com tampão *PBS-Tween-20* durante 5 min. Os sítios com reação antígeno-anticorpo foram revelados pela incubação com diaminobenzidina (*DAB Plus/ DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA*) por no máximo 15 min. Após interrupção em água destilada e lavagem com *PBS-Tween-20* durante 5 min, seguida de nova lavagem em água destilada por 5min, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de *Harris* diluída em água destilada (1:3) durante 3 min e azulados em água corrente. Ao final, após rápida diferenciação em álcool ácido (solução composta por etanol e ácido clorídrico), as secções foram lavadas em água de torneira, desidratadas em três banhos crescentes de etanol (70%, 95% e 100%), diafanizadas em três banhos de xilol durando 10 min cada e, finalmente, montadas com *Entellan® (Merck/Darmstadt, Germany)*.

Como controle negativo das imuno-marcações, algumas amostras do grupo experimental e do grupo controle foram incubadas omitindo-se o anticorpo primário e para o controle positivo, foram usadas amostras de endométrio humano e placenta. Áreas de matriz óssea do ramo mandibular não submetidas à osteotomia e à distração osteogênica foram analisadas por imuno-histoquímica para os anticorpos propostos.

## 4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 4.6.1 ANÁLISE RADIOGRÁFICA: DENSIDADE ÓSSEA EM mmAI

Na avaliação das imagens, foi utilizado o programa de domínio público *Image J 1.43u (National Institute of Health, EUA)*. Ferramentas de obtenção da média de valores de *pixel* do programa foram empregadas para cada imagem radiográfica. Para a realização dessa medida, foi selecionado previamente um ROI (Região de Interesse) retangular na região de base da hemimandíbula, com cerca de 0,023mm<sup>2</sup> de área. Essa marcação envolvia o centro do defeito ósseo promovido pela distração osteogênica e as bordas da superfície de osso (Fig. 8A). Em seguida, selecionou-se



a ferramenta histograma do programa *Image J*, para obter o valor médio do *pixel*. Cada imagem foi avaliada três vezes, para garantir uma reprodutibilidade entre as medições.

Foi utilizado como padrão para essa análise a média de valores de *pixel* obtida das hemimandíbulas esquerdas dos respectivos animais, o que possibilita distinguir e observar a existência de alteração nos valores do *pixel* do osso neoformado em cada grupo avaliado, assim como entre eles e o osso normal (hemimandíbulas esquerdas).

A escala de alumínio foi utilizada para garantir uma padronização dos resultados. Desse modo, os valores médios de cinza obtidos no centro do defeito ósseo foram convertidos para valores equivalentes em milímetros de alumínio (mmAl).

Para essa análise, foi selecionado o ROI retangular do *Image J* e a sua demarcação deveria ocupar a maior área de cada degrau (Fig. 8B). Em seguida, foi obtida a média dos valores de *pixel* de cada degrau da escala de alumínio. Esse procedimento foi repetido para cada imagem radiográfica.

Os valores obtidos foram transferidos para o programa *Microsoft Office Excel*® 2007, onde foi possível gerar curvas de radiopacidade da escala de alumínio e equações matemáticas que permitiram calcular a radiopacidade do defeito ósseo em valores equivalentes de mmAl.

Inicialmente, foi calculada, no programa Excel, a Densidade Óptica Líquida (DOL), que corresponde ao valor do branco (padronizado em 255) menos o valor médio do *pixel*. Esse valor foi obtido tanto a partir das medições realizadas em cada degrau da escala de alumínio, como nos defeitos ósseos. Com o DOL obtido de cada degrau, foi gerado um gráfico. A partir deste gráfico, selecionou-se, então, a função Linhas de Tendência, pela qual foi possível obter a equação matemática de conversão mais adequada para transformação dos valores de *pixel* em mmAl. Foi selecionada, assim, a equação polinomial de quarto grau, já que, nessa situação, a curva gráfica passava pelo maior número de pontos. Foi escolhido o valor de um ponto no gráfico que mais se aproximou de 1, sendo, dessa forma, mais fidedigna à equação selecionada. Esta metodologia foi previamente padronizada por Oliveira (2011).

Em seguida, o DOL do defeito ósseo foi aplicado na equação pela função Teste de Hipóteses do programa *Excel* e, assim, obteve-se seu valor equivalente em

mmAl. Para cada imagem radiográfica foi obtida uma equação matemática diferente, para se realizar a conversão dos valores de pixel em valores equivalentes em mmAl.

#### 4.6.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As secções coradas com H&E, com *alcian blue* e aquelas destinadas ao estudo imuno-histoquímico foram analisadas por um único observador e capturadas com auxílio de uma câmera digital (DP71, Olympus, Japão), acoplada a um microscópio de luz (modelo BX-51, Olympus, Japão), processado por um computador de mesa Pentium IV e auxílio do programa Image-Pro Plus® (Versão 6.2 – *Media Cybernetics*, USA). No estudo morfológico de todas as secções, foram avaliadas apenas as áreas de base do ramo mandibular direito sob efeito da distração osteogênica. Os resultados foram descritos em função do aspecto morfológico da matriz óssea interposta entre as extremidades ósseas nesta região, nos dois grupos de animais durante os períodos estudados e da presença e distribuição do VEGF e FLT-1 nestes tecidos.

#### 4.6.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA: QUANTIDADE DE VOLUME ÓSSEO/VOLUME TECIDUAL (%)

A estimativa da quantidade de volume de matriz óssea neoformada na região de base mandibular dentro da fenda produzida pela distração osteogênica foi obtida a partir dos cortes corados em H&E. Esta mensuração foi realizada em dois cortes não seriados (com intervalo mínimo de 60µm) do mesmo animal. Cinco imagens de cada secção histológica foram capturadas com auxílio de uma câmera digital (DP71, Olympus, Japão) acoplada a um microscópio de luz (modelo BX-51, Olympus, Japão) na objetiva de 20x. Estas imagens foram capturadas para quantificação cega de neoformação óssea no defeito criado pela distração osteogênica ao longo da base do ramo mandibular. Dentre elas havia uma imagem da região central da fenda e mais 2 imagens sucessivas para direita e para esquerda desta região central (Fig. 9). Com ajuda do programa de análise de imagem *Image-Pro Plus*® (Versão 6.2 – *Media Cybernetics*, USA), estas imagens foram tratadas e, após seleção das regiões de matriz óssea, foi mensurada a quantidade em *pixel* de volume ósseo (*BV – bone volume*). O volume tecidual (*TV – tissue volume*) total de cada imagem foi de

1.224.324 *pixels*. A partir da razão entre a média de *BV* de cada animal e o *TV*, foi obtido o percentual de volume ósseo. Estes valores percentuais, então, foram usados para análise estatística. A nomenclatura e os cálculos utilizados estão de acordo com a *American Society of Bone and Mineral Research Histomorphometry Nomenclature Committee* (PARFITT et al., 1987).

#### 4.6.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

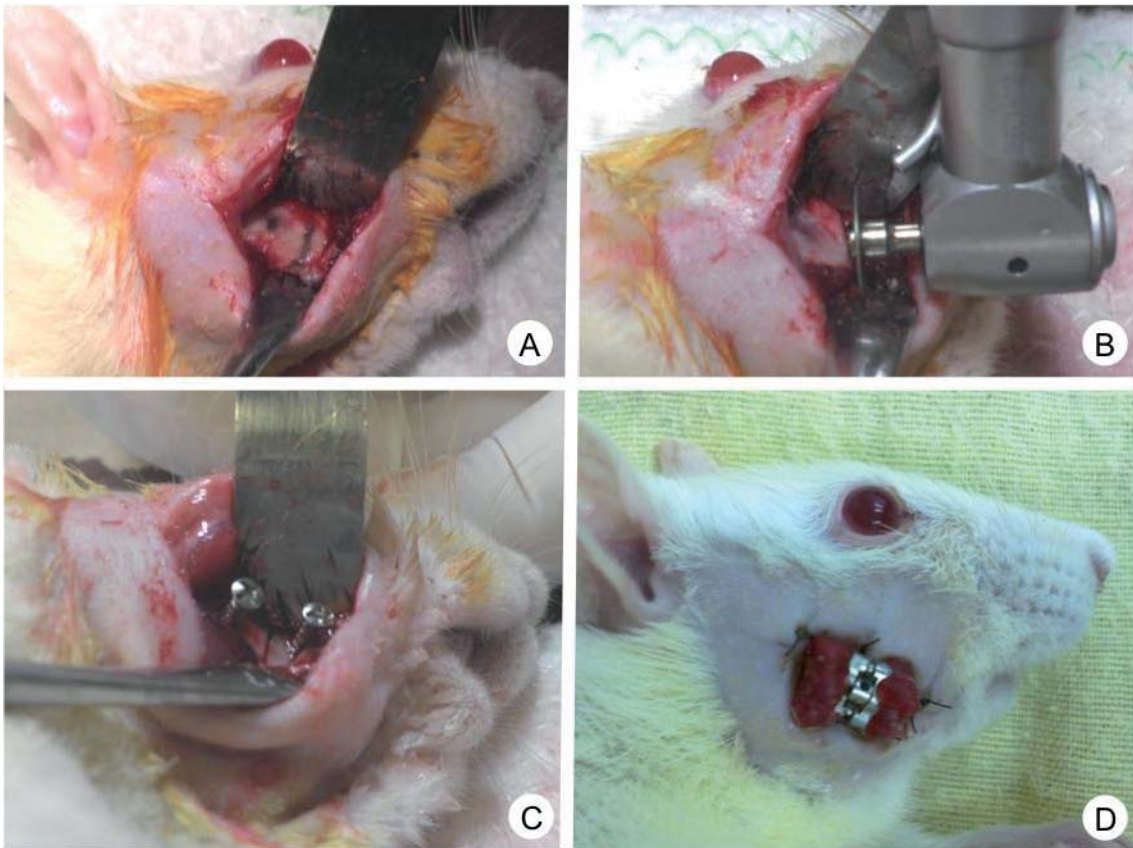
##### 4.6.4.1 DENSIDADE ÓSSEA EM mmAI

As médias obtidas pelas análises dos valores de densidade óssea equivalentes em mmAI nas radiografias foram analisadas utilizando o sistema SAS (SAS Institute Inc. *The SAS System, release 9.2. Cary:NC, 2008*). Foi aplicada a técnica de variância com modelo linear generalizado apropriado para experimentos inteiramente casualizados com três fatores (deficiência ou não de estrógeno; distração osteogênica e tempos biológicos) e interações entre eles. O uso de modelos lineares generalizados se justifica à medida em que este permite a adoção de métodos apropriados para dados com distribuições diversas, as quais foram testadas e o critério *AIC* (*Akaike Criterion Information*) foi usado como parâmetro para definir a distribuição mais apropriada. As variáveis foram inicialmente submetidas ao teste de qui-quadrado para hipótese de igualdade de proporções. De acordo com a necessidade demonstrada pela análise de variância, as variáveis foram apresentadas como médias  $\pm$  desvio padrão (DP) e foi estabelecido o uso do teste de *Tukey* para as comparações múltiplas de médias. Neste estudo, foi definido como significativo valores de  $p \leq 0,05$ .

##### 4.6.4.2 QUANTIDADE DE VOLUME ÓSSEO/VOLUME TECIDUAL (%)

A análise estatística foi realizada usando o programa *GraphPad Prism* versão 5.00 para *Windows* (*GraphPad Software, San Diego, California, USA*). As variáveis selecionadas para análise estatística foram inicialmente submetidas aos testes de normalidade de *Shapiro-Wilk* e de *D'Agostino*, os quais verificaram a suposição de distribuição assimétrica das mesmas. Todas as variáveis de distribuição assimétrica foram apresentadas como mediana e intervalos interquartis e valores mínimo e

máximo. O teste estatístico de *Kruskal-Wallis* foi usado para determinar a significância entre as variáveis assimétricas. Todas as análises usaram testes bicaudais com nível de significância mínima de 5%. O pós-teste de comparação múltipla de *Dunn* foi usado para avaliar a associação entre as variáveis de distribuição assimétrica.



**Figura 2** - Imagens do procedimento cirúrgico para implantação do dispositivo para distração osteogênica na hemimandíbula direita. **(A)** Execução da incisão transversa ao longo do bordo inferior da hemimandíbula direita e a delimitação da região onde foi colocado o parafuso e realizada a osteotomia. **(B)** Realização da osteotomia parcial, usando um disco diamantado em baixa rotação e abundante irrigação com soro fisiológico. **(C)** Dois parafusos de titânio instalados na superfície externa da mandíbula, posicionados aproximadamente a 2 mm das bordas das extremidades osteotomizadas. **(D)** Expansor ortodôntico ancorado aos parafusos de titânio por resina acrílica Duralay.



**Figura 3-** Imagem da distração osteogênica mandibular, por meio da ativação diária do dispositivo durante 5 dias.

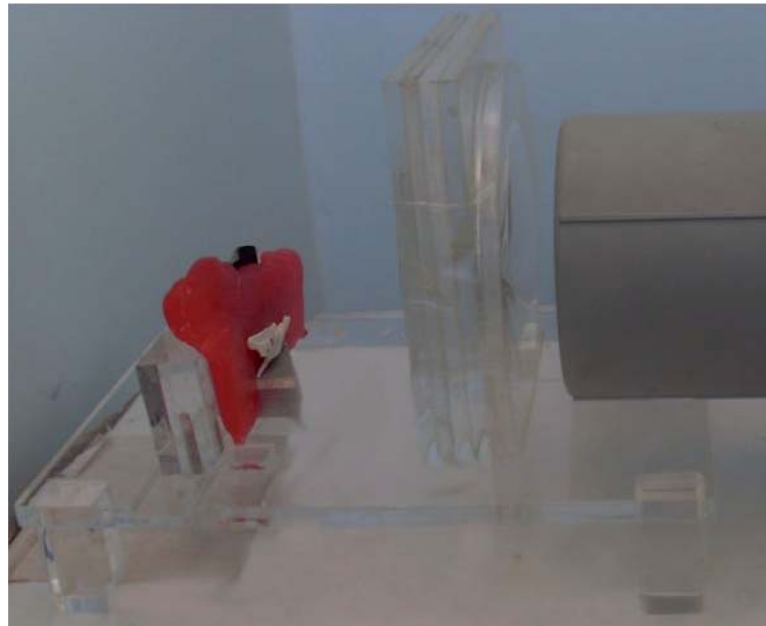




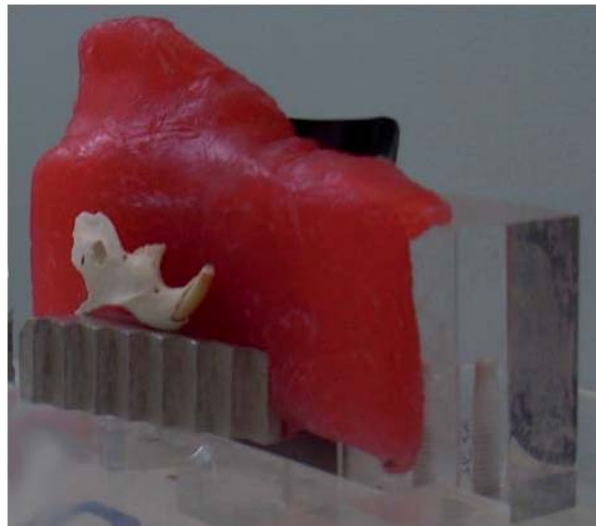
**Figura 4** - Imagem da mensuração entre os parafusos de titânio fixos numa hemimandíbula direita de um animal do grupo controle (GC) após eutanásia.



**Figura 5** - Imagem de dois úteros dos animais eutanasiados, um do grupo controle (GC) e outro do grupo ovariectomizado (GO). Notar a atrofia do útero do animal do grupo experimental, provocada pela ovariectomia.

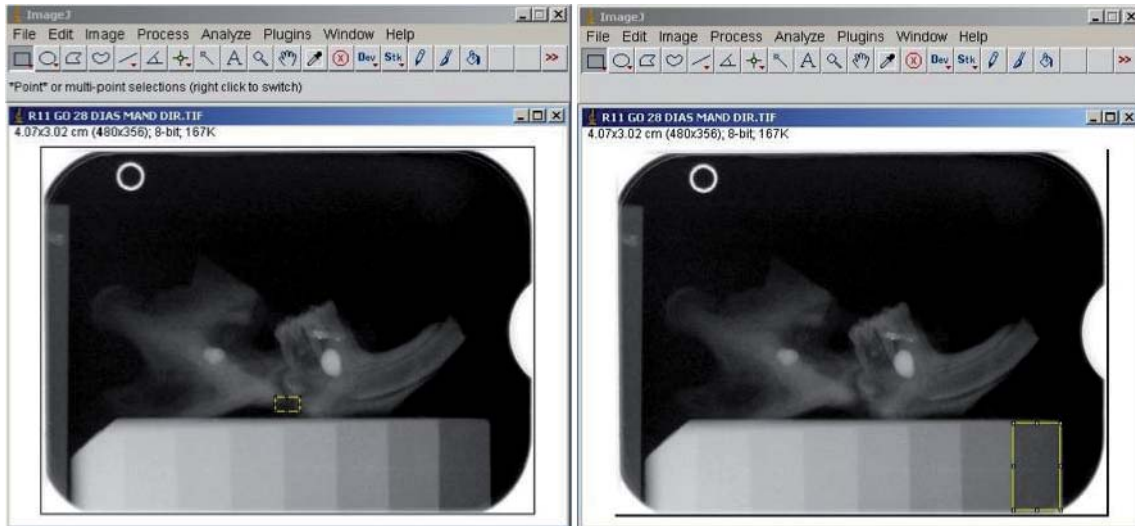


**Figura 6** - Imagem do posicionador de acrílico para realização das tomadas radiográficas. P, Placa de acrílico; E, Escala de alumínio; M, Hemimandíbula; C, Cera utilidade; R, Aparelho de Rx.

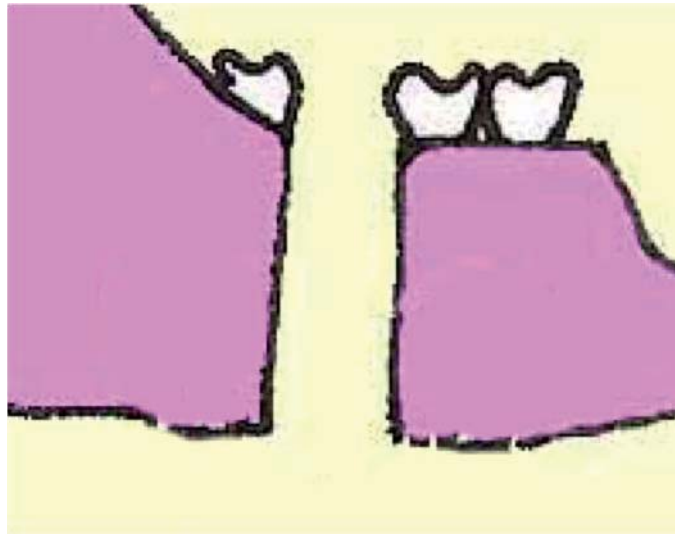


**Figura 7** - Imagem da hemimandíbula (M) posicionada na cera utilidade (C) para realização das tomadas radiográficas. E, Escala de alumínio; F, Placa de armazenamento de fósforo (DenOptix®) .





**Figura 8** - Imagens radiográficas digitais abertas pelo programa *Image J* da hemimandíbula direita de um animal submetido a distração osteogênica. Observar fenda (seta) criada pela osteotomia e distração osteogênica e os marcadores de guta percha (cabeças de seta) nas margens do defeito ósseo. E, Escala de alumínio. **(A)** Seleção do ROI (região de interesse) retangular envolvendo o centro do defeito ósseo na região de base da hemimandíbula (retângulo amarelo). **(B)** Seleção do ROI retangular demarcando a maior área de um degrau da escala de alumínio (retângulo amarelo).



**Figura 9** - Desenho esquemático mostrando as cinco áreas, destacadas em vermelho, da região de base da hemimandíbula direita (M), submetida a distração osteogênica, capturadas com auxílio de uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz (objetiva de 20x) e submetidas a análise histomorfométrica. F, fenda criada pela distração osteogênica.



## 5.1 ACHADOS CLÍNICOS

Os animais submetidos à ovariectomia demonstraram dificuldade de locomoção durante as primeiras 24 horas pós-operatórias, porém isso não interferiu na boa recuperação dos animais. Dentre os 30 animais da amostra, apenas um do GO, no período de 14 dias, morreu durante a fase de consolidação da distração. Nesta fase, após completa ativação do distrator, foi observado um desvio de linha média do incisivo inferior direito nos animais, provocado pelo alongamento da hemimandíbula direita em decorrência da distração.

Em consequência disso, esta unidade dentária encontrava-se fora de oclusão em relação ao incisivo inferior esquerdo, levando os animais a apresentarem dificuldade para se alimentar. Com isso, este incisivo, cujo comprimento é mantido em decorrência do hábito roedor destes animais (constante atrito com alimentos sólidos e superfícies rígidas), apresentava um crescimento excessivo, dificultando ainda mais a alimentação e hidratação do animal.

Foi necessária, em algumas ratas, a intervenção para realização de fratura destas unidades dentárias com intuito de alinhar o comprimento destes dentes e restabelecer a oclusão destes animais. Devido à dificuldade de estabilização dos parafusos de titânio, a fragilidade da mandíbula do animal e o hábito de limpeza dos animais (*grooming*), 8 animais (3 animais do GO 28 dias, 2 do GO 14 dias, 2 do GC 28 dias e 1 do GC 14 dias) removeram o dispositivo da hemimandíbula neste mesmo período de consolidação da distração. Porém, estes não foram excluídos do estudo. O peso dos animais foi averiguado durante todo o experimento e nenhum deles apresentou perda de peso.

## 5.2 RESULTADOS MORFOLÓGICOS

As análises histológicas dos animais do GC do período de 7 dias mostraram o espaço amplo entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos, preenchido por um tecido conjuntivo bastante celularizado e zonas de cartilagem subjacentes a uma rede de trabéculas ósseas delgadas alinhadas ao longo do sentido da força de tração exercida nas superfícies internas dos segmentos ósseos (Fig. 10). Foi possível observar nestes animais uma continuidade entre a matriz óssea recém-

formada e a superfície de matriz óssea original (Fig. 10C). Além disso, foram notadas células clásticas na superfície de matriz cartilaginosa (Fig. 10F).

Nos animais do GO do período de 7 dias, as análises mostraram características semelhantes aos animais do GC do mesmo período. O espaço entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos também se apresenta amplo, preenchido por um tecido conjuntivo celularizado e zonas de cartilagem subjacentes a uma rede de trabéculas ósseas delgadas alinhadas ao longo do sentido da força de tração exercida nas superfícies internas dos segmentos ósseos (Fig. 11). Estes animais exibiam regiões mostrando uma interface entre a matriz óssea recém-formada e a superfície de matriz óssea original (Fig. 11C).

No período de 14 dias o espaço entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos dos animais do GC apresenta-se delgado, preenchido por trabéculas ósseas neoformadas e uma delgada zona de cartilagem interposta às superfícies trabeculares do tecido ósseo formado. Em alguns animais, pode ser encontrado vestígio de uma delgada camada de tecido conjuntivo bastante celularizado entre zonas de cartilagem subjacentes às superfícies internas dos segmentos ósseos (Fig. 12).

Foi observada também uma continuidade entre a matriz óssea recém-formada, caracterizada por uma rede de trabéculas ósseas mais delgadas, e a superfície de matriz óssea depositada ao longo do período de distração, caracterizada por uma matriz com poucos espaços medulares e uma acidofilia, aparentemente, mais intensa (Fig. 12B). Além disso, células osteoclásticas e osteoblásticas são encontradas em abundância nas superfícies das trabéculas ósseas subjacentes à zona de cartilagem (Fig. 12E e 12F) e células clásticas na superfície de matriz cartilaginosa. Neste mesmo período, o espaço entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos dos animais do GO apresenta-se mais delgado quando comparado ao dos animais do período de 7 dias, porém mais amplo quando comparado com os animais do GC deste mesmo período. Este espaço encontra-se preenchido por uma camada de tecido conjuntivo e zonas de cartilagem subjacentes às trabéculas ósseas neoformadas nas superfícies internas dos segmentos ósseos criados pela distração (Fig. 13).

Nota-se, em alguns animais, um espaço mais amplo entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos (Fig. 13A), e em outros um espaço com aspecto semelhante ao encontrado em alguns animais do GC de mesmo período (Fig. 13C e

13D). Foi possível visualizar, no tecido conjuntivo que preenche este espaço, fibras orientadas no sentido da força de tração exercida nas superfícies internas dos segmentos ósseos (Fig. 13D) e a presença de muitos vasos sanguíneos (Fig. 13E). Também pôde ser encontrada região mostrando células condroblásticas em diferenciação (Fig. 13F).

Na maioria dos animais do GC do período de 28 dias, a fusão óssea pode ser claramente visualizada entre as superfícies ósseas neoformadas. Em alguns animais deste mesmo grupo, observou-se uma estreita zona de cartilagem e/ou tecido conjuntivo interposto às superfícies trabeculares do tecido ósseo formado (Fig. 14, 15, 16). Pôde ser notada a presença de vasos sanguíneos próximos às zonas de cartilagem vestigiais (Fig. 14B) e regiões mostrando células condroblásticas em diferenciação (Fig. 14E).

Ao longo da extensão de matriz óssea neoformada pela distração osteogênica, foram encontradas zonas de cartilagem e zonas de células conjuntivas subjacentes ao tecido ósseo (Fig. 14D), da mesma forma que foram observadas zonas de cartilagem e cartilagem hipertrófica subjacentes ao tecido ósseo (Fig. 14F). Além disso, células clásticas foram notadas na superfície de matriz cartilaginosa (Fig. 15C) e na superfície de matriz óssea, assim como, osteoblastos (Fig. 15D). Fibras do tecido conjuntivo paralelas e dispostas no sentido da força de tração exercida nas superfícies internas dos segmentos ósseos também foram observadas (Fig. 16A e B), aspecto este semelhante à disposição da matriz óssea neoformada (Fig. 16C).

Em algumas áreas de matriz óssea, nota-se uma interface entre a matriz óssea recém-formada e a superfície de matriz óssea madura (Fig. 16D). Na periferia da matriz cartilaginosa residual foram encontradas regiões de ossificação intramembranosa, onde podem ser visualizadas trabéculas de matriz óssea circundadas por osteoblastos na sua superfície, associados à presença de vários vasos sanguíneos próximos da região (Fig. 16E e F).

Nos animais do GO do período de 28 dias, o espaço entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos apresentou-se preenchido por uma delgada camada de tecido conjuntivo fibrocelular e zonas de cartilagem subjacentes aos segmentos ósseos (Fig. 17). Foram observadas células conjuntivas orientadas paralelamente à superfície de cartilagem (Fig. 17C) e osteoclastos na superfície de matriz óssea subjacente à zona de cartilagem (Fig. 17D). Nota-se também uma

interface entre a matriz óssea recém-formada, onde é possível observar espaços medulares mais amplos, e a superfície de matriz óssea madura com espaços medulares menores. (Fig. 17E e F).

Cortes representativos de cada grupo que foram corados com *Alcian Blue-Eosina* apresentaram áreas de matriz cartilaginosa basófila no sítio de reparo ósseo (Fig. 18). Foi possível notar áreas de matriz cartilaginosa amorfa acidófila e basófila (Fig. 18D).

### 5.2.1 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS PARA VEGF E VEGFR-1 (FLT-1)

As análises imuno-histoquímicas foram realizadas em alguns cortes histológicos de hemimandíbulas direitas submetidas à distração osteogênica de ratas do GC do período de 28 dias. Os cortes submetidos à reação imuno-histoquímica para VEGF e os submetidos à reação imuno-histoquímica para FLT-1 apresentaram osteoblastos, osteoclastos e células conjuntivas exibindo citoplasma imunopositivos às reações (Fig. 19 e 20).

Os cortes de endométrio humano, utilizados como controle positivo da reação imuno-histoquímica para VEGF, exibiram células glandulares imunopositivas (Fig. 19E). Em contraposição, cortes sagitais da região da base da hemimandíbula direita submetida à distração osteogênica de animal do GC do período de 28 dias, incubados sem o anticorpo primário para VEGF (controle negativo), não exibiram estruturas imunopositivas (Fig. 19F). Os cortes de placenta humana, utilizados como controle positivo da reação imuno-histoquímica para FLT-1, exibiram células epiteliais de revestimento imunopositivas (Fig. 20E). Por outro lado, cortes sagitais da região da base da hemimandíbula direita submetida à distração osteogênica de animal do GC do período de 28 dias, incubados sem o anticorpo primário para FLT-1 (controle negativo), não exibiram estruturas imunopositivas (Fig. 20F).

### 5.3 RESULTADOS RADIOGRÁFICOS: DENSIDADE ÓSSEA EM mmAl

Nas hemimandíbulas direitas submetidas à distração osteogênica dos animais do GC, observou-se um aumento nos valores médios de densidade óssea equivalentes em mmAl em relação aos períodos de 7 dias (0,51 mmAl), 14 dias (0,70 mmAl) e 28 dias (0,78 mmAl). O mesmo não foi observado nas hemimandíbulas

direitas submetidas à distração osteogênica dos animais do GO, os valores médios de densidade óssea equivalentes em mmAl do tempo de 7 dias (0,60 mmAl) diminuiu somente em relação ao período de 14 dias (0,47 mmAl), porém em relação ao período de 28 dias (0,59 mmAl) não houve alteração. Nos dois grupos, estes valores para as hemimandíbulas esquerdas dos mesmos animais foram maiores quando comparados aos obtidos das hemimandíbulas direitas.

Ao comparar os animais dos grupos GO e GC em relação aos períodos (7, 14 e 28 dias), observou-se que os valores médios de densidade óssea equivalentes em mmAl das hemimandíbulas direitas no tempo de 7 dias foram maiores no GO (0,60 mmAl) em relação ao GC (0,51 mmAl) e os valores das hemimandíbulas esquerdas foram semelhantes no GO (1,03 mmAl) e no GC (1,04 mmAl).

Para esta mesma comparação no tempo de 14 dias, os maiores valores foram observados no GC, tanto para as hemimandíbulas direitas (0,70 mmAl), quanto para as esquerdas (0,92 mmAl) em relação ao GO (hemimandíbulas direitas= 0,47 mmAl; hemimandíbulas esquerdas= 0,85 mmAl). E no tempo de 28 dias também foram observados valores maiores para as hemimandíbulas direitas no GC (0,78 mmAl) em comparação ao GO (0,60 mmAl); entretanto, os valores obtidos para as hemimandíbulas esquerdas foram semelhantes entre os dois grupos (GO=0,93 mmAl e GC=0,92 mmAl). Os valores relacionados aos corpos mandibulares direitos estão representados em uma tabela (1) e ilustrados em um gráfico (1).

A análise estatística (teste de *Tukey*) destes achados demonstrou que os valores de densidade óssea equivalentes em mmAl das imagens radiográficas das hemimandíbulas não têm diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos GO e GC e entre os períodos (7, 14 e 28 dias).

## 5.6 RESULTADOS HISTOMORFOMÉTRICOS: QUANTIDADE DE VOLUME ÓSSEO/VOLUME TECIDUAL (%)

No estudo histomorfométrico foi possível observar diferenças na relação *BV/TV* em função dos períodos estudados e dos grupos. Nas amostras de hemimandíbulas direitas submetidas à distração osteogênica dos animais do GC, foi observada uma tendência para um aumento gradual da relação *BV/TV* nos períodos de 7 dias ( $25,29 \pm 9,24\%$ ), 14 dias ( $41,99 \pm 4,427\%$ ) e 28 dias ( $63,85 \pm 4,582\%$ ). O volume de matriz óssea foi inferior nos espécimes do grupo de 7 dias, quando

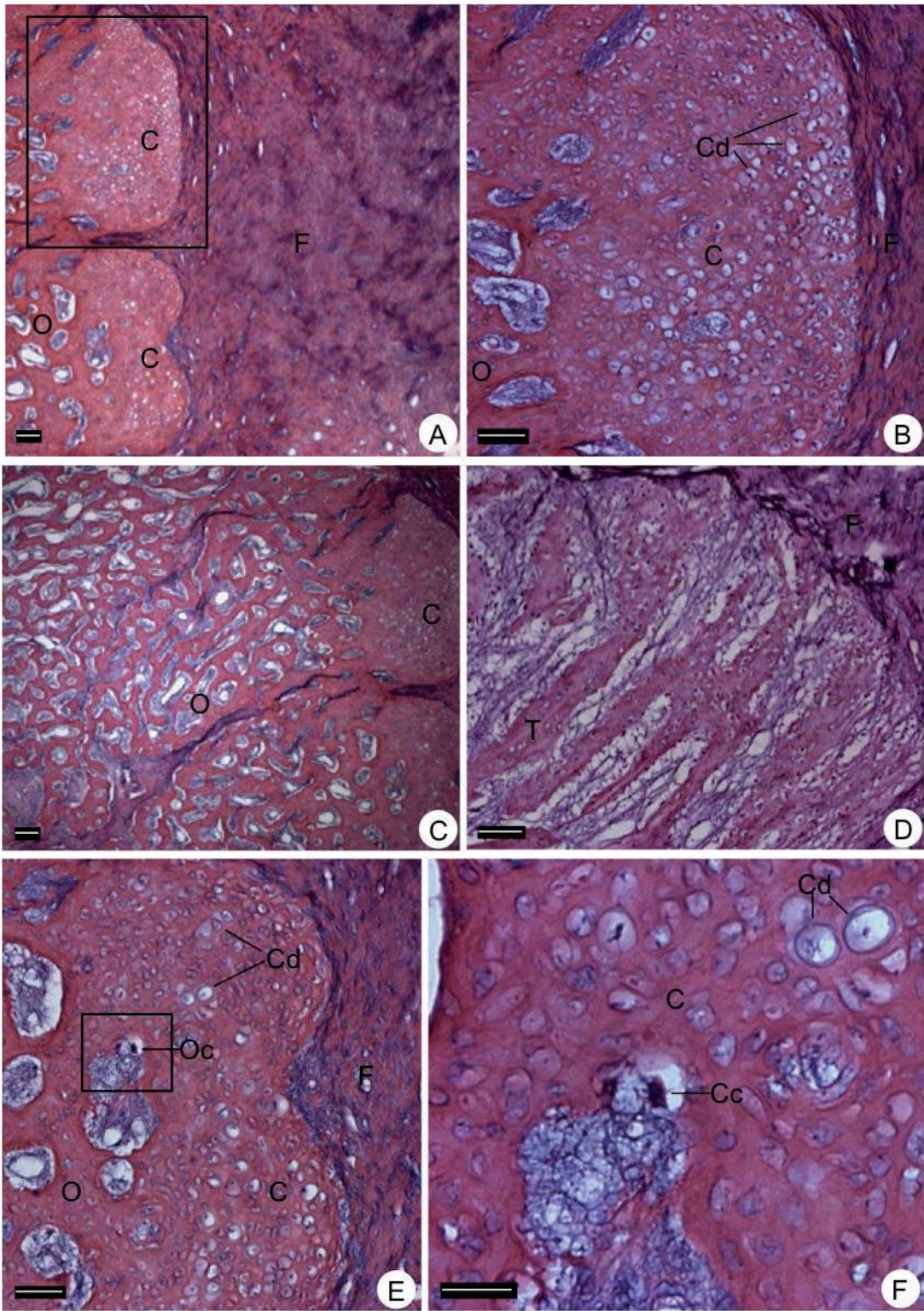


comparado com aquele dos espécimes de 28 dias, apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ).

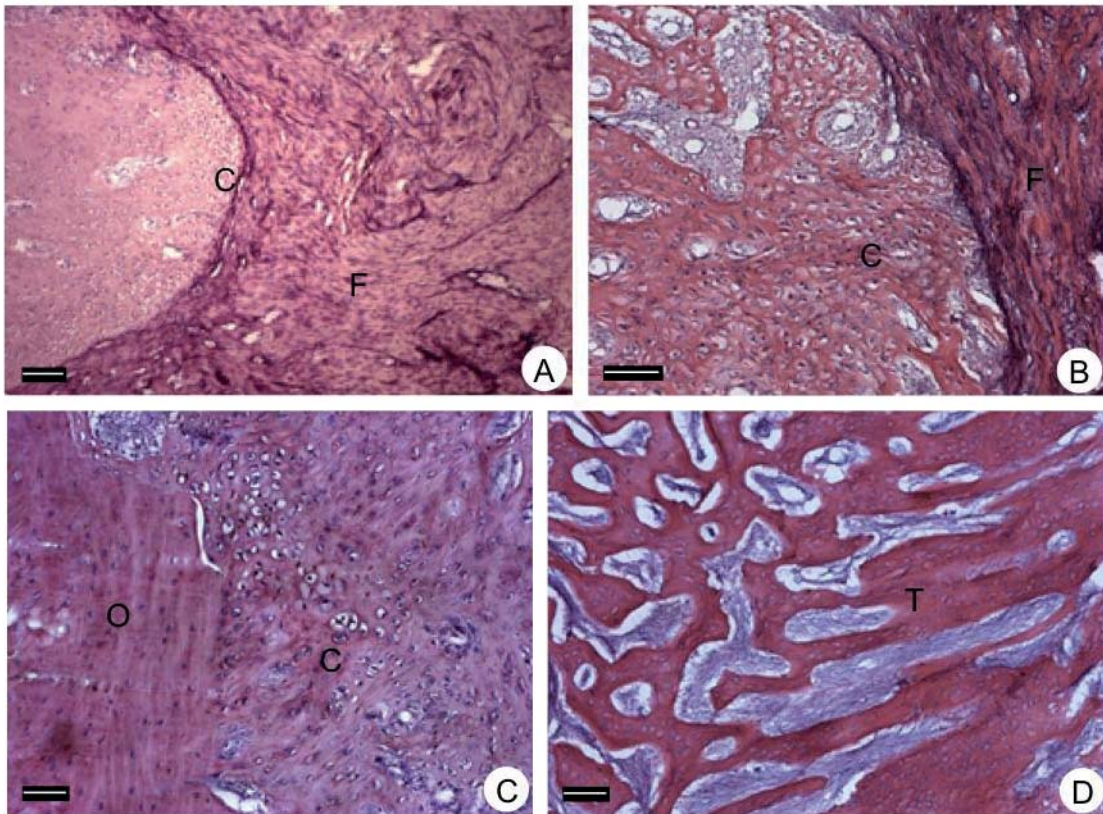
Nas hemimandíbulas direitas submetidas à distração osteogênica dos animais do GO, foi notado um aumento dos percentuais de matriz óssea quando comparado o período de 7 dias ( $9,59 \pm 7,007\%$ ) aos demais períodos de 14 dias ( $42,3 \pm 4,106\%$ ) e 28 dias ( $35,35 \pm 4,324\%$ ). Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos.

Ao comparar os percentuais de *BV/TV* das hemimandíbulas direitas entre os grupos (GC e GO) em relação aos tempos biológicos analisados, foi observada uma tendência para um menor percentual de matriz óssea nos animais privados de estrógeno, particularmente nos períodos de 7 e 28 dias. No período de 28 dias, os percentuais de matriz óssea entre os espécimes dos grupos GC ( $63,85 \pm 4,582\%$ ) e GO ( $35,35 \pm 4,324\%$ ) foram diferentes estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ). Os valores relacionados à análise histomorfométrica estão representados na tabela 2 e ilustrados em um gráfico (2).

**Figura 10** - Fotomicrografias de cortes sagitais das hemimandíbulas direitas submetidas a distração osteogênica dos animais do GC do período de 7 dias. **(A)** Região da fenda (F) ampla, preenchida por tecido conjuntivo fibroso e zonas de cartilagem (C) espessas subjacentes a matriz óssea (O). Escala=150 $\mu$ m. **(B)** Aumento da região de interface de cartilagem (C) delimitada na fotomicrografia A. O, Osso; F, Fenda; Cd, Condrócito. **(C)** Região mostrando matriz óssea (O) recém formada exibindo osso esponjoso e espaços medulares amplos. **(D)** Trabéculas ósseas (T) delgadas alinhadas ao longo do sentido da força de tração exercida pelo distrator osteogênico. F, Fenda. **(E)** Interface osso (O)-cartilagem (C) em uma extremidade óssea da fenda (F). Escalas **(B), (C), (D), (E)**=100 $\mu$ m. **(F)** Aumento da área de interface delimitada na fotomicrografia E. Notar a presença de células clásticas (Cc) na superfície da matriz de cartilagem (C). Cd, condrócitos. Escala=50 $\mu$ m. H&E.



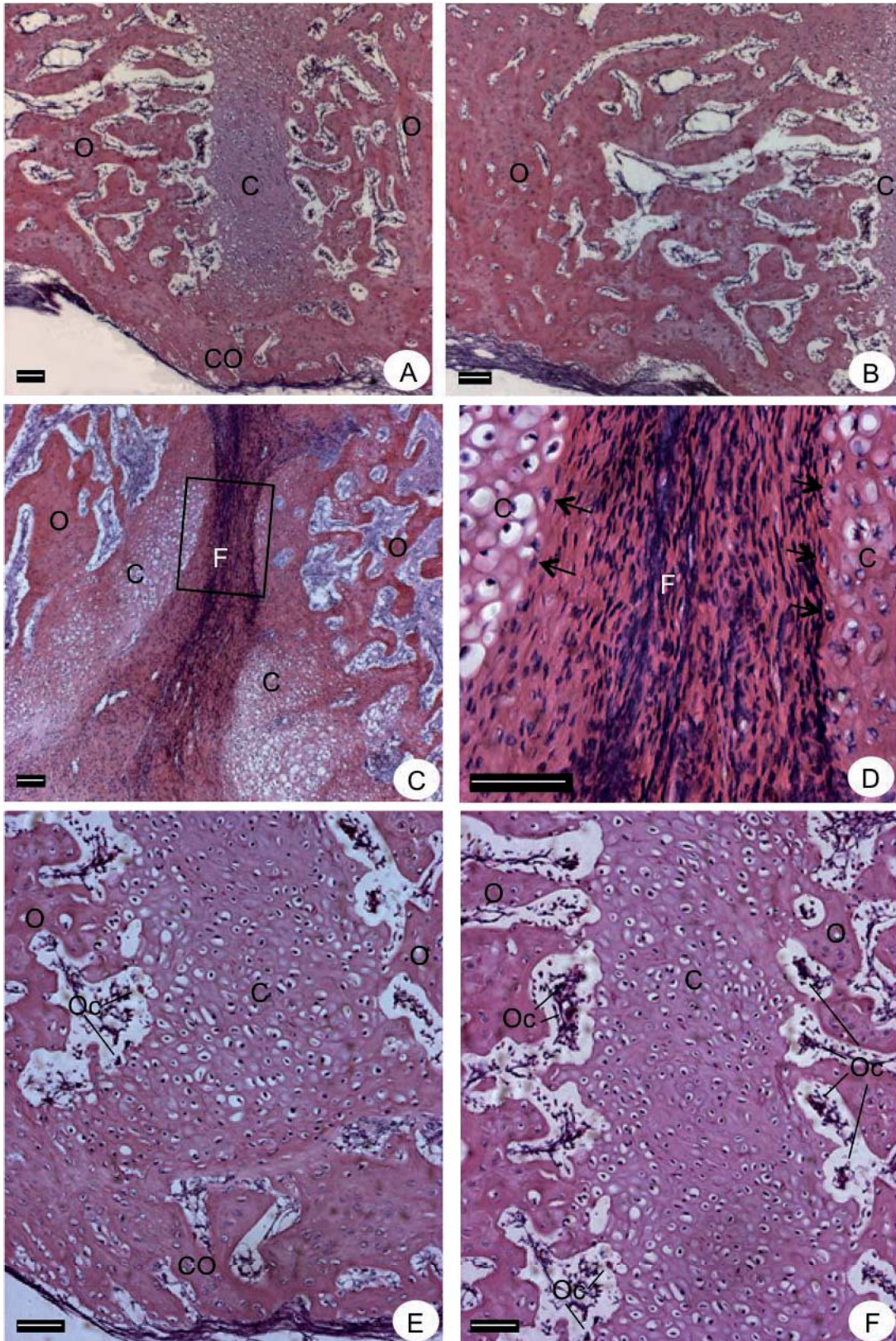




**Figura 11** - Fotomicrografias de cortes sagitais das hemimandíbulas direitas submetidas a distração osteogênica dos animais do GO do período de 7 dias. **(A)** Região da fenda (F) ampla, preenchida por tecido conjuntivo fibroso e zonas de cartilagem (C) subjacentes a matriz óssea (O). Escala=150 $\mu$ m. **(B)** Região de matriz óssea (O) e cartilagem (C) depositada na extremidade osteotomizada. F, Fenda. **(C)** Região mostrando uma interface entre a matriz óssea recém formada e a superfície de matriz óssea original. O, Osso; C, cartilagem. **(D)** Rede de trabéculas ósseas (T) delgadas alinhadas ao longo do sentido da força de tração exercida pelo aparelho distrator. Escalas **(B)**, **(C)**, **(D)**=100 $\mu$ m. H&E.

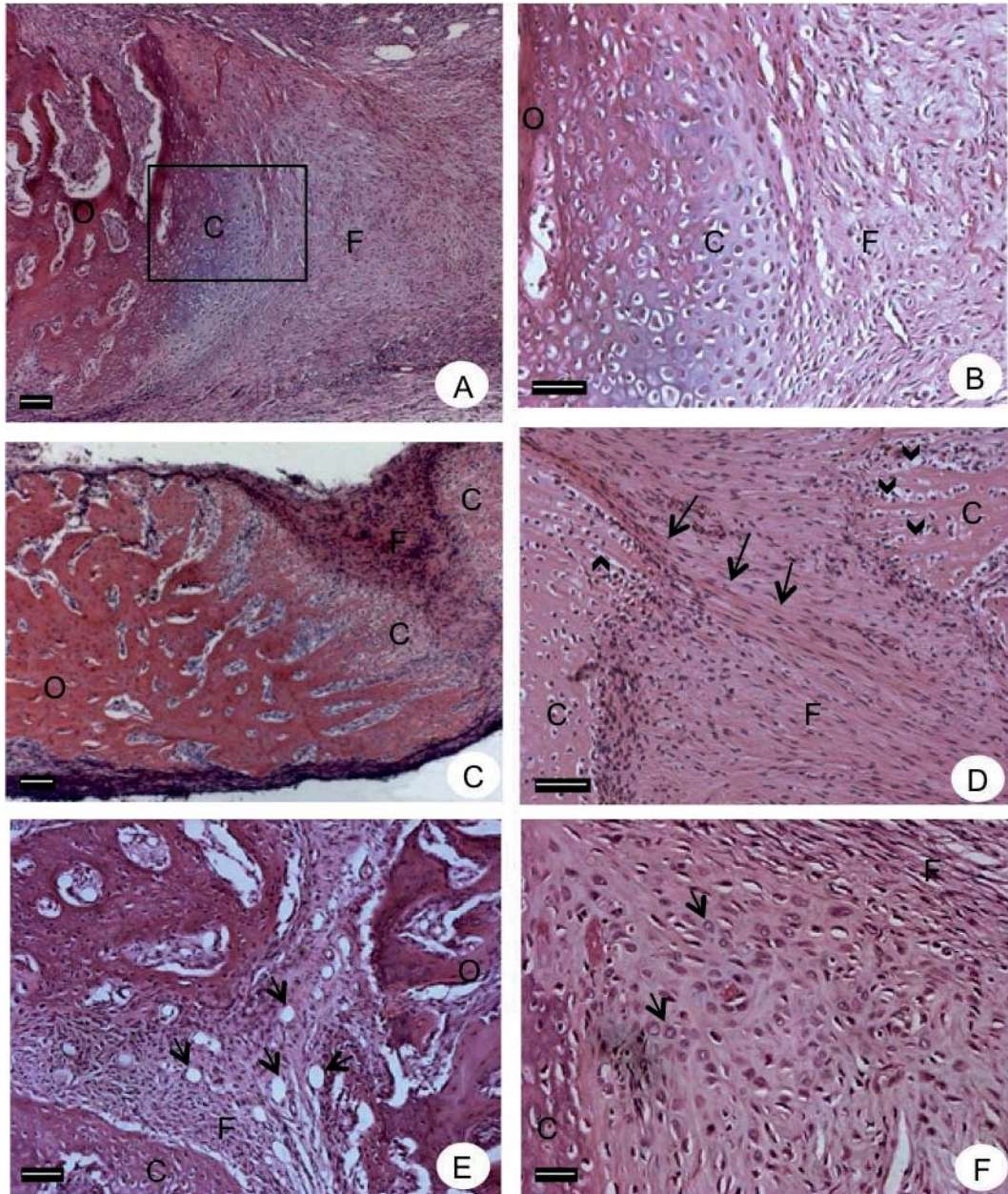
**Figura 12** - Fotomicrografias de cortes sagitais das hemimandíbulas direitas submetidas a distração osteogênica dos animais do GC do período de 14 dias. **(A)** Fusão completa das extremidades ósseas (O) osteotomizadas com interposição de matriz cartilaginosa (C). Notar abaulamento formado por matriz óssea na periferia, caracterizando um calo ósseo (CO). **(B)** Área de matriz óssea (O) depositada distalmente à área de fusão. Observar diminuição dos espaços medulares no osso neoformado situado distalmente. C, Cartilagem. **(C)** Estreita camada de tecido conjuntivo fibroso da fenda (F), bastante celularizado, entre duas zonas de cartilagem (C). O, osso. Escalas **(A)**, **(B)**, **(C)**=150µm. **(D)** Aumento da região de tecido conjuntivo fibroso intensamente celularizado (F) entre zonas de cartilagem (C) delimitada na fotomicrografia C. Notar células conjuntivas na periferia da cartilagem sendo incorporadas a matriz cartilaginosa (setas). Escala=50µm. **(E)** Delgada zona de cartilagem (C), envolvida e interposta por trabéculas ósseas neoformadas (O) subjacente ao calo ósseo (CO). **(F)** Mesma região exibindo osteoclastos (Oc) nas duas superfícies de matriz cartilaginosa (C). O, Osso. Escalas **(E)**, **(F)** =100µm. H&E.





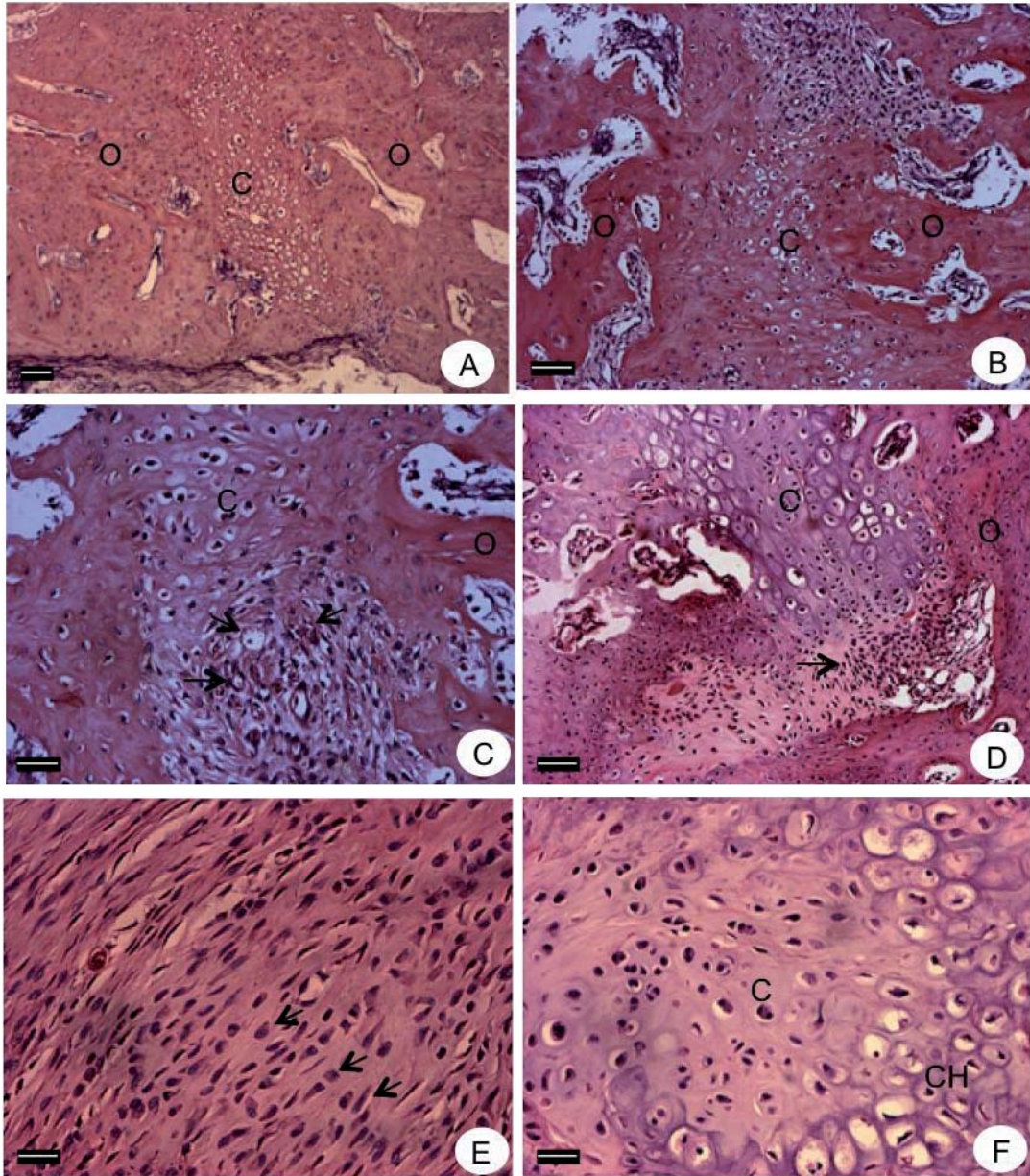
**Figura 13** - Fotomicrografias de cortes sagitais das hemimandíbulas direitas submetidas a distração osteogênica dos animais do GO do período de 14 dias. **(A)** Fenda (F) ampla preenchida por tecido conjuntivo fibrocelular e zona de cartilagem (C) subjacente a superfície óssea (O). Escala=150µm. **(B)** Aumento da região delimitada na fotomicrografia A mostrando área de transição entre matriz cartilaginosa (C) e a matriz óssea (O). Escala=100µm. **(C)** Área de extremidade óssea mostrando a diferença de trabeculado entre a matriz óssea (O) justaposta à cartilagem (C) e àquela situada distalmente. F, Fenda. Escala=150µm. **(D)** Região de tecido conjuntivo que preenche a fenda (F) com células (setas) e fibras (cabeças de setas) orientadas no sentido da força de tração exercida sobre superfícies osteotomizadas. C, Zona de cartilagem. **(E)** Fenda (F) preenchida por tecido conjuntivo fibrocelular. Observar presença de diversos vasos sanguíneos (setas) associados à área de deposição óssea (O). C, Cartilagem. **(F)** Região mostrando células condroblásticas em diferenciação (setas) a partir do tecido conjuntivo presente na fenda (F). C, Cartilagem. Escalas **(D)**, **(E)**, **(F)**=100µm. H&E.



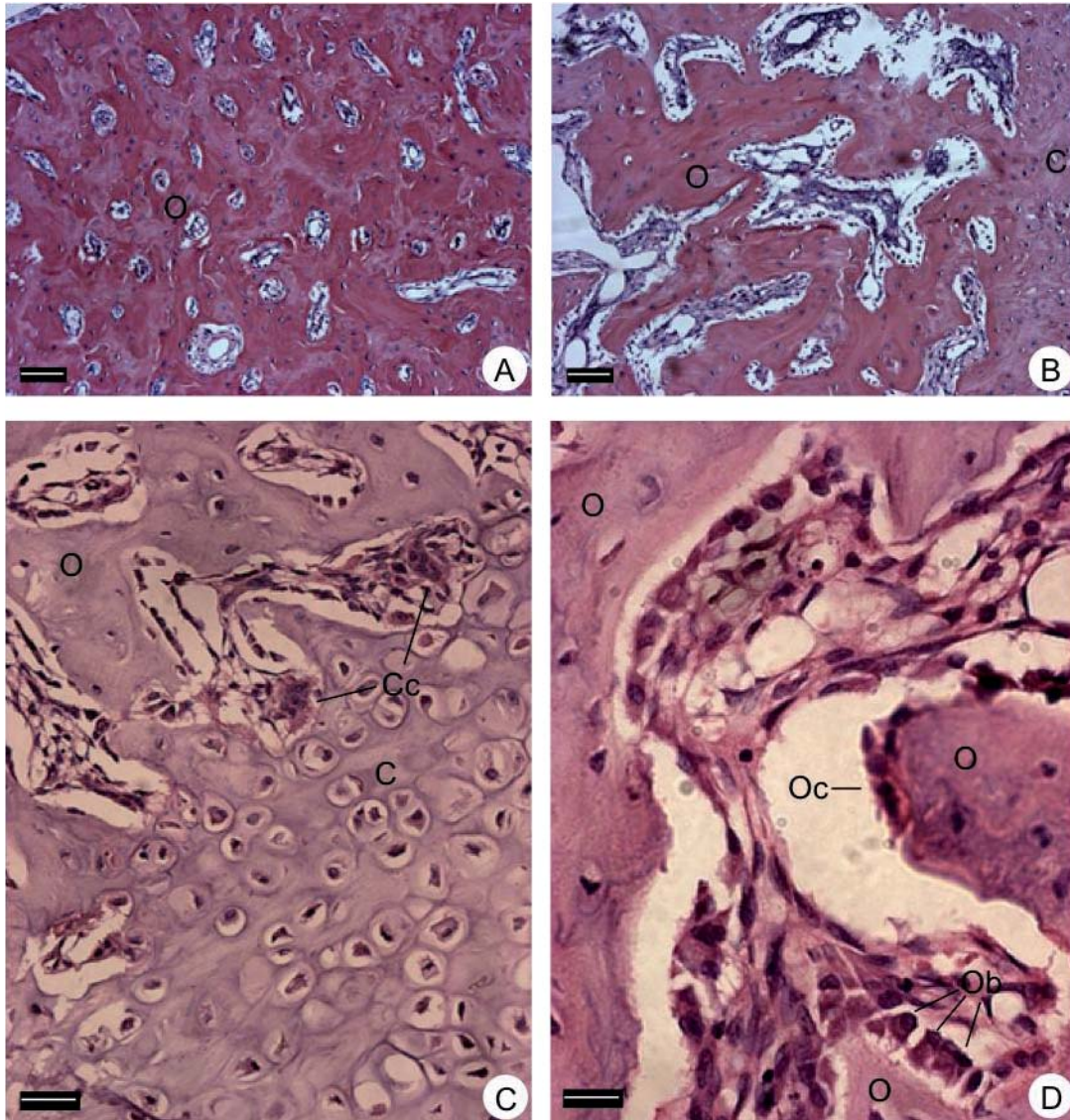




**Figura 14** - Fotomicrografias de cortes sagitais das hemimandíbulas direitas submetidas a distração osteogênica dos animais do GC do período de 28 dias. **(A)** Fusão óssea entre as superfícies de osso (O) neoformadas, com delgada zona de cartilagem (C) interposta. Escala=150µm. **(B)** Interface entre a matriz cartilaginosa (C) e a matriz óssea (O). **(C)** Notar vários vasos sanguíneos (setas) associados à cartilagem (C) remanescente na interface entre a matriz cartilaginosa (C) e matriz óssea (O). O, osso. **(D)** Região de matriz de cartilagem (C) e osso (O) associada a uma área com grande concentração celular (seta). Observar muitos vasos sanguíneos associados à área celularizada. **(E)** Vestígios de conjuntivo fibrocelular nas proximidades da matriz de cartilagem hialina. Notar modificação da morfologia celular e da matriz adjacente em algumas células (setas). **(F)** Presença de zonas de cartilagem (C) e cartilagem hipertrófica (CH) contínuas ao tecido ósseo (O). Escalas **(B), (C), (D), (E), (F)** =100µm. H&E.



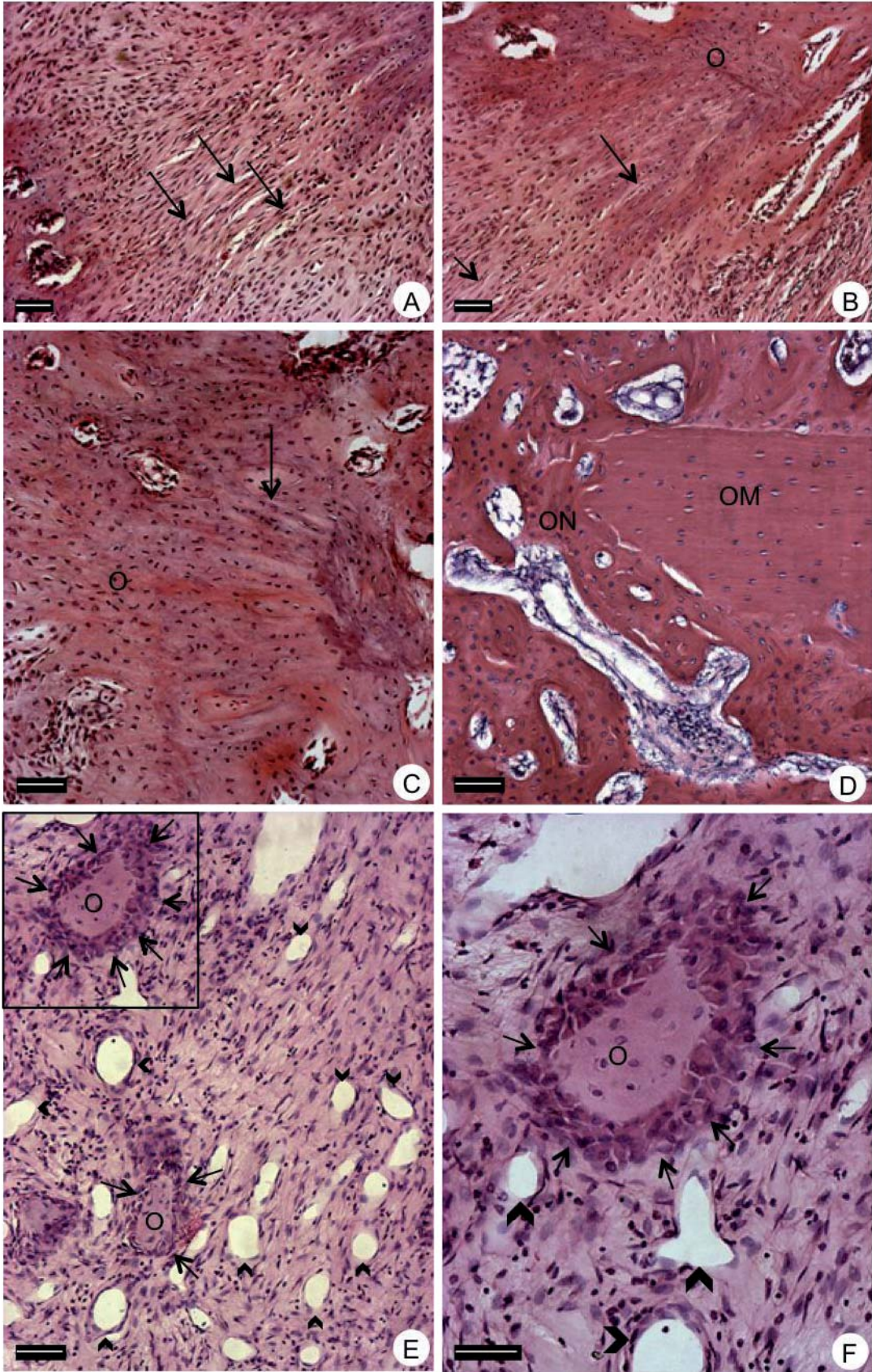




**Figura 15** - Fotomicrografias de cortes sagitais das hemimandíbulas direitas submetidas a distração osteogênica dos animais do GC do período de 28 dias. **(A)** Matriz óssea neoformada (O) situada distalmente à extremidade osteotomizada. **(B)** Matriz óssea (O) neoformada relacionada a matriz de cartilagem residual (C). Observar diferença de trabeculado entre matriz óssea na fotomicrografia A e B. **(C)** Células clásticas (Cc) presentes na superfície de matriz cartilaginosa (C). O, osso. Escalas **(A), (B), (C)**=100 $\mu$ m. **(D)** Osteoclasto (Oc) e osteoblastos (Ob) presentes na superfície de matriz óssea (O). Escala=25 $\mu$ m. H&E.

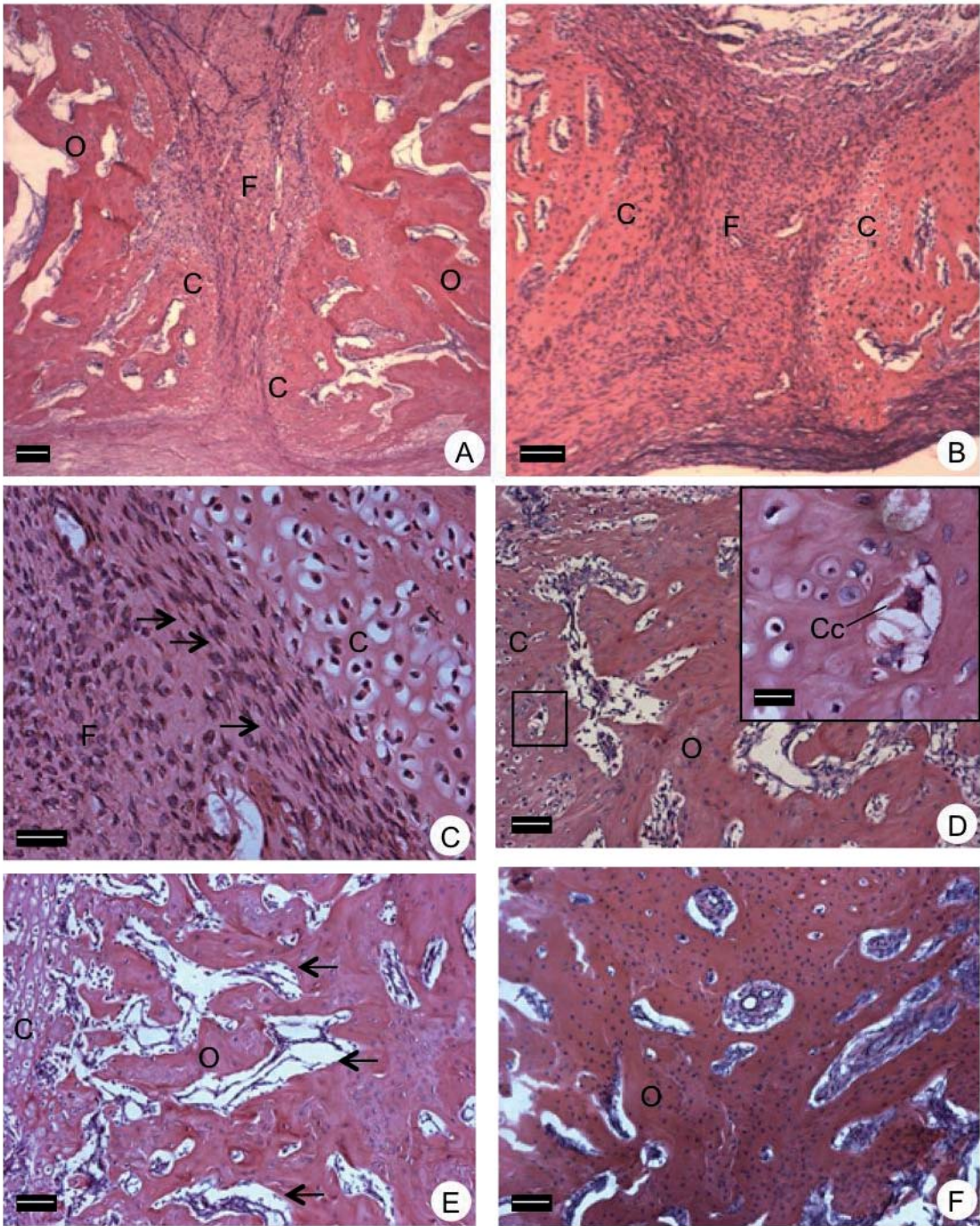
**Figura 16** - Fotomicrografias de cortes sagitais das hemimandíbulas direitas submetidas a distração osteogênica dos animais do GC do período de 28 dias. **(A)** Presença de fibras do tecido conjuntivo (setas) paralelas e dispostas no sentido da força de tração exercida sobre segmentos ósseos. **(B)** Interface entre matriz óssea (O) e tecido conjuntivo remanescente. Notar a disposição das fibras e células do tecido conjuntivo fibrocelular coincidindo com a direção da deposição de matriz óssea nas extremidades osteotomizadas (setas). O, osso. **(C)** Disposição de matriz óssea (O) no mesmo sentido da força de tração (seta). **(D)** Áreas de matriz óssea exibindo interface entre a matriz óssea recém formada (ON) e a superfície de matriz óssea original (OM). **(E)** Região de ossificação intramembranosa situada periféricamente à matriz cartilaginosa residual, mostrando trabéculas de matriz óssea (O) circundada por muitas células na sua superfície (setas) e a presença de vários vasos sanguíneos próximos da região (cabeças de setas). **(F)** Aumento da região de ossificação intramembranosa delimitada na fotomicrografia E. Setas, células na superfície óssea; Cabeças de setas, vasos sanguíneos; O, trabécula óssea. Escalas=100µm. H&E.



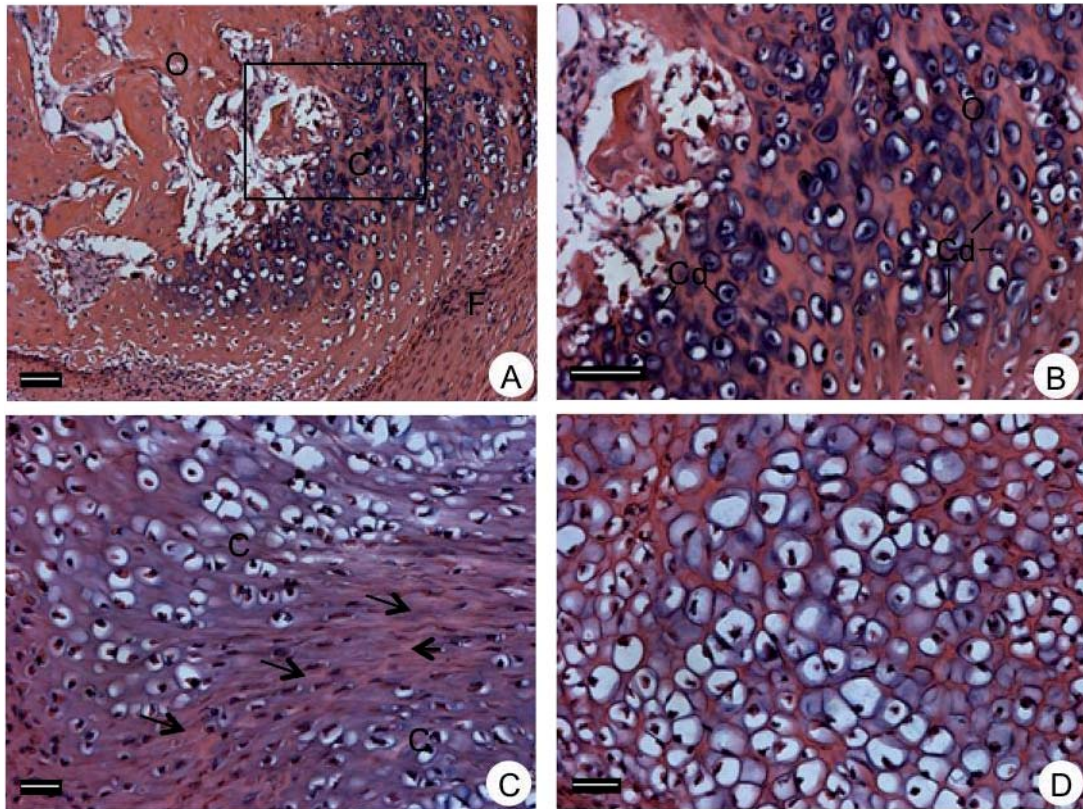


**Figura 17** - Fotomicrografias de cortes sagitais das hemimandíbulas direitas submetidas a distração osteogênica dos animais do GO do período de 28 dias. **(A)** Área de tecido conjuntivo fibrocelular (F) interposta entre as extremidades osteotomizadas. C, Cartilagem; O, osso. **(B)** Outra região de fenda (F) preenchida por uma delgada camada de tecido conjuntivo fibrocelular. C, Cartilagem; O, osso. Escalas **(A), (B)**=150µm. **(C)** Células conjuntivas (setas) orientadas paralelamente a superfície de matriz de cartilagem (C). O, osso. **(D)** Presença de osteoclasto (Oc) na superfície de matriz óssea (O) próxima a zona de cartilagem (C). Escalas **(C), (D)**=100µm. **(Em detalhe)** Aumento da região delimitada mostrando célula clástica (Cc) na superfície da matriz de cartilagem. Escala=25µm. **(E)** Interface entre a matriz de cartilagem (C) e a matriz óssea (O) neoformada. Observar espaços medulares amplos na matriz óssea (setas). **(F)** Área de osso (O) esponjoso neoformado situado distalmente à matriz óssea relacionada com a matriz de cartilagem (C). Escalas **(E), (F)**=100µm. H&E.





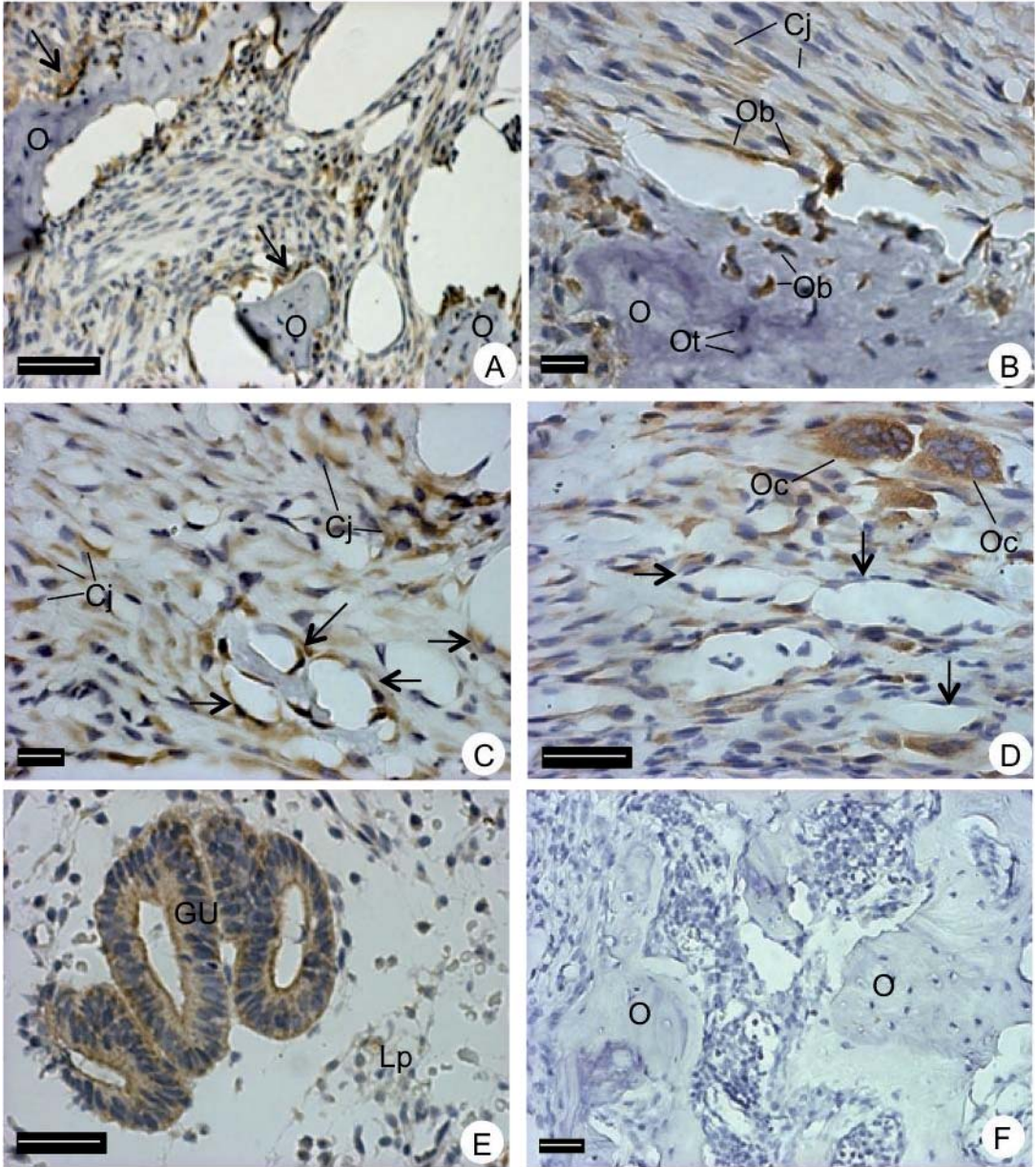




**Figura 18** - Fotomicrografias de cortes sagitais das hemimandíbulas direitas submetidas a distração osteogênica dos animais do GC e do GO do período de 14 dias. **(A)** Interface entre a matriz cartilaginosa (C) e a matriz óssea (O) neoformada de um animal do GC. F, Fenda. **(B)** Aumento da região de matriz cartilaginosa (C) delimitada na fotomicrografia A. Cd, condrócitos. **(C)** Observar interposição de tecido conjuntivo (acidófilo-setas) entre áreas de cartilagem (basófila-C) de um animal do GO. **(D)** Região de matriz de cartilagem com áreas de matriz amorfa acidófila e basófila (setas) de um animal do GO. Escalas=100 $\mu$ m. *Alcian blue-Eosina*.

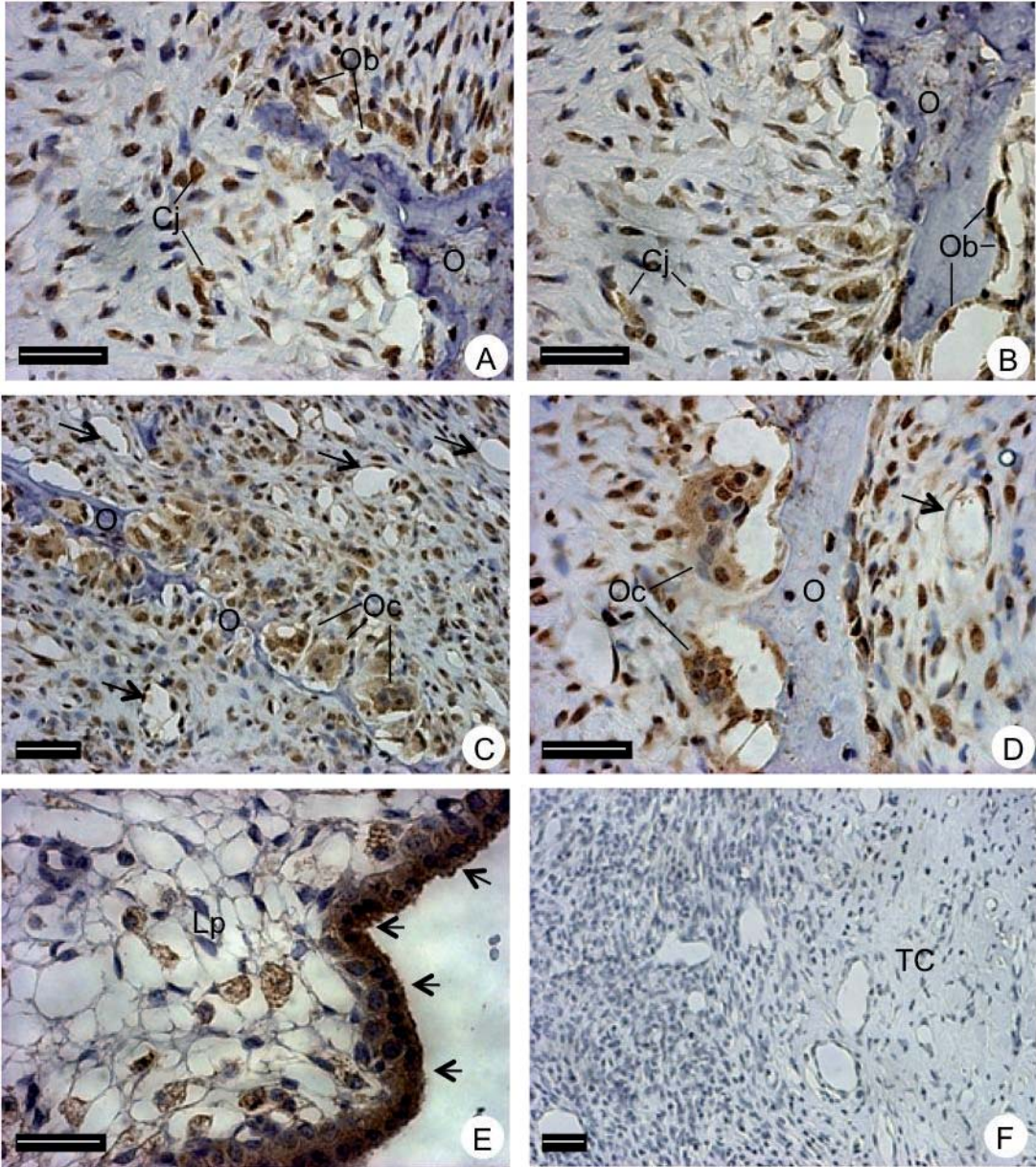


**Figura 19** - Fotomicrografias de secções do grupo GC do período de 28 dias submetidos ao método imuno-histoquímico para detecção de VEGF e contra-corados com hematoxilina. **(A)** Área mostrando trabéculas ósseas (O) com células imuno-positivas (setas) para VEGF margeando sua superfície. Escala=25µm. **(B)** Região mostrando osteoblastos (Ob) na superfície da matriz óssea (O) e algumas células conjuntivas (Cj) próximas ao osso imuno-marcadas pelo VEGF. Ot, Osteócitos. **(C)** Células conjuntivas (Cj) próximas de vasos sanguíneos (setas), ambos imuno-marcados para VEGF. **(D)** Osteoclastos (Oc) imuno-marcados para VEGF nas proximidades de uma região rica em vasos sanguíneos (setas). **(E)** Endométrio humano mostrando células da glândula uterina (GU) imuno-marcadas pelo VEGF. Controle positivo da reação. Lp, Lâmina própria. Escalas **(B), (C), (D), (E)**=50µm. **(F)** Corte sagital da hemimandíbula direita submetida a distração osteogênica, incubada sem o anticorpo primário (controle negativo) e contra-corada com hematoxilina. O, osso. Escala=100µm.



**Figura 20** - Fotomicrografias de cortes histológicos do grupo GC do período de 28 dias submetidos ao método imuno-histoquímico para detecção de FLT-1 e contra-corados com hematoxilina. **(A)** e **(B)** Imuno-marcação para FLT-1 nos osteoblastos (Ob) e em algumas células conjuntivas (Cj). **(C)** Osteoclastos (Oc) na superfície de matriz óssea (O) imuno-marcados para FLT-1. Setas, Vasos sanguíneos. **(D)** Imuno-marcação nos osteoclastos, osteoblastos e algumas células conjuntivas. **(E)** Placenta humana mostrando células do epitélio de revestimento (setas) imuno-marcadas para FLT-1. Controle positivo da reação. Lp, Lâmina própria. Escalas **(A)**, **(B)**, **(C)**, **(D)**, **(E)**=50µm. **(F)** Área da hemimandíbula direita submetida a distração osteogênica, incubada sem o anticorpo primário (controle negativo) e contra-corada com hematoxilina. TC, Tecido Conjuntivo. Escala=100µm.

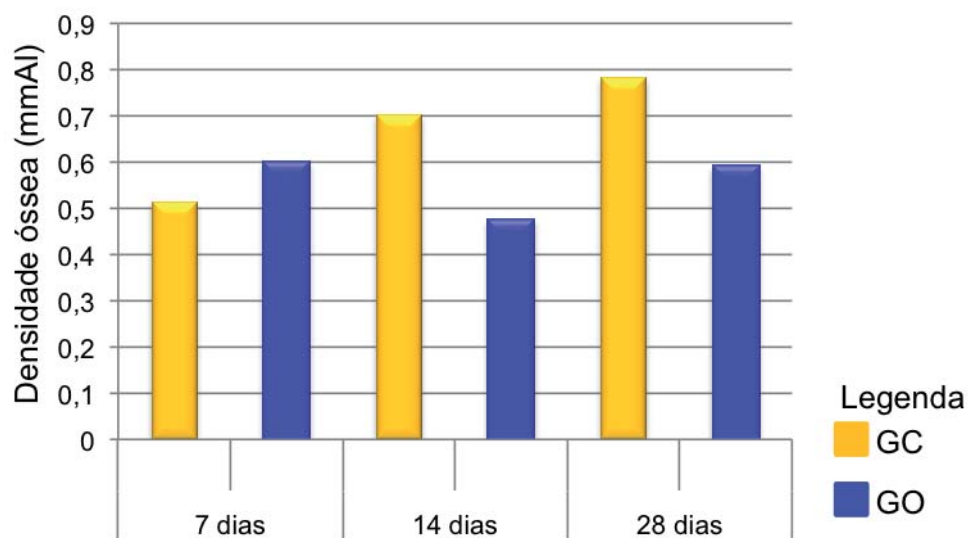




**Tabela 1** - Valores referentes ao número médio de densidade óssea equivalente em mmAl das imagens radiográficas das hemimandíbulas direitas em relação aos períodos.

Períodos	Grupos	
	GC (n=15)	GO (n=14)
7 dias	0,51 ± 0,13	0,60 ± 0,16
14 dias	0,70 ± 0,16	0,47 ± 0,06
28 dias	0,78 ± 0,23	0,59 ± 0,20

Valor da média ± Desvio Padrão (DP)

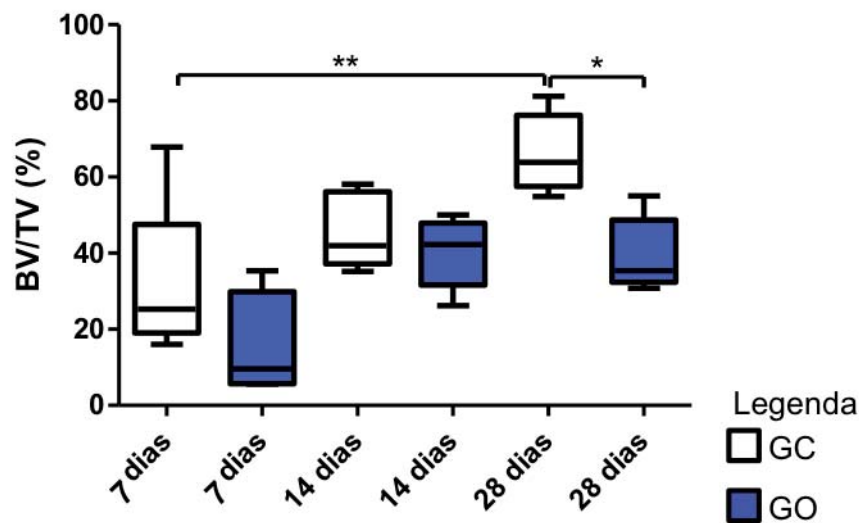


**Gráfico 1** - Valores referentes ao número médio de densidade óssea equivalente em mmAl das imagens radiográficas das hemimandíbulas direitas em relação aos períodos.

**Tabela 2** – Análise histomorfométrica da quantidade de volume ósseo/volume tecidual (%) das hemimandíbulas direitas dos animais do GO e GC.

Parâmetros	Períodos	GC (n=15)			GO (n=14)		
		Mediana	IQ1	IQ3	Mediana	IQ1	IQ3
BV/TV (%)	7 dias	25,3	19	47,5	9,6	5,7	29,9
	14 dias	42	37,2	56,1	42,3	31,6	47,9
	28 dias	63,8	57,5	76,2	35,3	32,4	48,7

Valor da mediana, Intervalos Interquartis (IQ)



**Gráfico 2** - Análise histomorfométrica da quantidade de volume ósseo/volume tecidual (%) das hemimandíbulas direitas dos animais do GO e GC. Os valores representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa calculada pelo teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* e pós-teste de comparação múltipla de *Dunn*. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ .



O presente estudo mostrou que houve formação de matriz óssea no espaço criado pela distração osteogênica entre os fragmentos ósseos osteotomizados, indicando que este procedimento estimula a osteogênese, mesmo nos animais ovariectomizados. Nestes animais, a ossificação aconteceu de forma mais lenta, sugerindo que a deficiência de estrógeno provocada pela ovariectomia influencia no processo de reparo ósseo em áreas submetidas à distração osteogênica.

Entretanto, os achados radiográficos não apresentaram diferença estatisticamente significativa de densidade óssea dentro do espaço entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos no osso mandibular dos animais estudados, indicando que a técnica radiográfica não foi sensível em detectar diferenças de matriz óssea observadas nos achados morfológicos.

Os resultados imuno-histoquímicos do presente estudo mostraram imunomarcação para VEGF e seu receptor (FLT-1) nos osteoblastos, osteoclastos e células conjuntivas presentes na região de reparo ósseo da distração osteogênica mandibular nos animais do GC, sugerindo que estas moléculas tenham ação direta sobre estas células durante a osteogênese. Estes resultados reforçam a ideia de que fatores de crescimento relacionados com a angiogênese estão intimamente associados com formação de matriz óssea (DAI; RABIE, 2007; KANCZLER; OREFFO, 2008).

A distração osteogênica mandibular tem sido utilizada como tratamento alternativo de reconstrução óssea facial (SAULACIC et al., 2008; KREISNER et al., 2010) e sua eficácia em expandir o corpo mandibular foi relatada na literatura (LOBOA et al., 2004; ORTAKOGLU et al., 2007; TAKEUSHI; MATSUO; CHIBA, 2010; BIGI et al., 2011). Como descrito por alguns autores (AMIR et al., 2006; BIGI et al., 2011), durante a distração osteogênica, o espaço entre as extremidades ósseas é ampliado pelo alongamento gradual do corpo mandibular e simultaneamente preenchido por uma matriz óssea neoformada, de forma orientada no sentido da força de tração realizada pelo distrator.

Alguns trabalhos mostraram que o processo de reparo observado na distração osteogênica compreende uma série de eventos biológicos semelhantes àqueles que ocorrem nas fraturas de ossos longos (ARSLAN et al., 2003; AMIR et al., 2006; FUNK et al., 2009). Os eventos biológicos descritos incluem atividades simultâneas de ossificação endocondral e intramembranosa, que resultam na



formação de um calo ósseo durante o reparo (DIMITRIOU et al., 2005; GERSTENFELD et al., 2006; FUNK et al., 2009).

Nos achados, pôde ser observado o desenvolvimento de uma matriz cartilaginosa subjacente a superfícies dos fragmentos ósseos, com zonas de cartilagem hipertrófica, células condroblásticas em diferenciação, sugestivo de ossificação endocondral, regiões de ossificação intramembranosa próximas à matriz cartilaginosa, com intensa vascularização ao redor e a formação de calo ósseo. Para alguns autores (WAN et al., 2006; CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009), é o estímulo mecânico promovido pela força gradual durante distração osteogênica que induz efeitos sobre células e desencadeia a liberação de fatores de crescimento que proporcionam a ossificação.

Foram encontrados, nos resultados do presente estudo, osteoclastos e osteoblastos dispostos sobre a superfície de trabéculas ósseas formadas entre as extremidades ósseas da distração, células clásticas na superfície da matriz de cartilagem subjacente às trabéculas e células conjuntivas orientadas paralelamente umas às outras dentro do espaço entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos no osso mandibular. A presença destas células demonstra o intenso processo de remodelação óssea e ossificação, importante para a osteogênese durante a distração osteogênica (DIMITRIOU et al., 2011; MARSELL; EINHORN, 2011).

As células conjuntivas visualizadas no presente estudo estavam condensadas no espaço entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos, subjacentes à periferia da cartilagem e orientadas no mesmo sentido da força de tração ou paralelas à superfície de matriz cartilaginosa. Em algumas destas áreas, estas células estavam associadas a pequenos vasos sanguíneos, indicando uma intensa vascularização local, sugerindo uma relação entre a angiogênese e a necessidade para recompor o tecido por meio do fornecimento de células indiferenciadas ou para sustentar nutricionalmente as células relacionadas com o reparo. Alguns trabalhos sugeriram a presença abundante de células precursoras de células endoteliais no espaço entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos (LI et al., 1999; JACOBSEN et al., 2008) como uma importante resposta angiogênica induzida pelo estímulo mecânico da distração osteogênica (JACOBSEN et al., 2008).

O metabolismo do tecido ósseo e o seu processo de reparo são regulados por vários elementos, dentre eles fatores de crescimento, moléculas mediadoras e

sinalizadoras (DIMITRIOU et al., 2011; GIANNOUDIS; JONES; EINHORN, 2011) e hormônios (ROBLING et al., 2006). TGF- $\beta$ , IGF, FGF e VEGF são alguns destes elementos frequentemente estudados na distração osteogênica (KNABE et al., 2005; BYUN et al., 2007; JACOBSEN et al., 2008), estando relacionados com algumas etapas da distração e a algumas ações que desencadeiam a osteogênese (BOULETREAU et al., 2002; BYUN et al., 2007).

Outro elemento envolvido no metabolismo ósseo e diretamente relacionado com a remodelação do tecido, porém não estudado num modelo de distração osteogênica, é o estrógeno (RICKARD et al., 1999; NAKAMURA et al., 2007). Contudo, o mecanismo de ação deste hormônio no tecido ósseo não é completamente entendido (SØRENSEN et al., 2006). Sabe-se, no entanto, que a deficiência de estrógeno interfere na osteoclastogênese, na função osteoclástica, na apoptose de osteoclastos (RIGGS, 2000; PIVA et al., 2006; FALONI et al., 2007, CRUSOÉ-SOUZA; SASSO-CERRI; CERRI, 2009) e na diferenciação e função dos osteoblastos (MICHAEL et al., 2005).

Uma forma de avaliar o papel do estrógeno no reparo ósseo é utilizar modelos de animais ovariectomizados (KUBO et al., 1999; ARSLAN et al., 2003). Há evidências da indução de apoptose em osteoblastos e inibição de apoptose em osteoclastos nas condições de deficiência de estrógeno promovida por ovariectomia (MIYAZAKI et al., 2004). Um estudo em tíbia de coelhos ovariectomizados e submetidos à distração osteogênica demonstrou, através de análises histológica, histomorfométrica e radiográfica, que a deficiência de estrógeno afeta a formação do calo ósseo gerado pela distração (ARSLAN et al., 2003).

Entretanto, não há estudos em modelos de ratos que reportam à influência da deficiência deste hormônio promovido por ovariectomia na osteogênese gerada pela distração em osso mandibular. Na análise histológica do presente estudo, o espaço entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos dos animais do GO no período de 7 dias foi maior quando comparado com animais do GC de mesmo período. No período de 14 dias na maioria dos animais do GO este espaço também foi maior quando comparado com os animais do GC. No período de 28 dias estes animais do GO não exibiram completa união dos fragmentos ósseos criados pela distração. Estes achados, mais uma vez sugerem um atraso na fusão entre as extremidades ósseas osteotomizadas dos animais ovariectomizados e submetidos à distração quando comparado com os animais normais.

Embora tenha sido percebido este atraso na fusão das extremidades ósseas ao longo do tempo, o estudo histológico descritivo não foi capaz de detectar uma diferença marcante no trabeculado do osso neoformado entre os grupos GO e GC. Este é um parâmetro importante nos estudos para avaliar a deficiência de estrógeno no tecido ósseo (PARFITT et al., 1987; ARLOT et al., 1990; ERIKSEN et al., 1990).

Por isso, pretendendo confirmar a diferença de volume ósseo entre os grupos estudados, optou-se por realizar uma análise histomorfométrica da quantidade em percentual do volume ósseo no espaço entre os fragmentos ósseos osteotomizados e distraídos nos animais do presente estudo (PARFITT et al., 1987). Através desta análise, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 7 e 28 dias nos animais do GC, indicando, de acordo com alguns trabalhos (MCCARTHY et al., 1995; CATAGNI; GUERRESCHI; LOVESETTI, 2011), que a distração osteogênica mandibular é uma técnica que aumenta o comprimento ósseo com concomitante deposição de matriz óssea na área osteotomizada.

Também foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos GO e GC dos períodos de 28 dias, sugerindo que os animais privados de estrógeno possuíam um menor volume ósseo na área em reparo, confirmando a interferência do estrógeno na osteogênese mandibular induzida pela distração osteogênica. Mesmo não tendo encontrado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GO e GC nos demais períodos (7 e 14 dias), notou-se que a maioria dos percentuais foi menor no GO. É provável que esta diferença não tenha sido detectada nestes períodos devido ao padrão histológico comum nos primeiros estágios do processo de ossificação, onde há formação de coágulo (RAHN, 2002), inflamação, deposição de fibras orientadas no sentido da tração (AMIR et al., 2006), recrutamento, diferenciação e ativação de células (MARSELL; EINHORN, 2011; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011).

Nestas etapas iniciais ainda não é possível notar divergências expressivas da quantidade de volume de matriz óssea entre os grupos. Provavelmente, a síntese proporcionada pelos osteoblastos seja o evento predominante sobre os osteoclastos. É possível que com a remodelação, quando os osteoclastos tiverem uma participação mais efetiva, essas diferenças fiquem mais marcantes.

Diferenças no padrão de reparo ósseo também podem ser detectadas por meio de exames imaginológicos. A densidade óssea foi utilizada para análise do reparo ósseo da distração osteogênica mandibular nas tomadas radiográficas. Da

análise dos resultados, foi observado um aumento da densidade óssea ao longo dos períodos estudados nos animais do GC e não houve diminuição nas ratas do GO. Estes achados sugerem que, ainda que lenta, há formação óssea no GO, porém sob uma possível influência da ovariectomia na densidade de osso formada.

Pôde ser percebido também que, com exceção dos animais do período de 7 dias, a densidade óssea do GO foi menor que a do GC nos outros períodos (14 e 28 dias). Isso demonstra uma diferença de densidade óssea entre os grupos e ao longo dos períodos, sugerindo um aumento da deposição de matriz óssea no reparo ósseo após distração osteogênica em função do tempo em condições normais e, mais uma vez, a influência da ovariectomia neste processo. Entretanto, estes dados não apresentaram diferença estatisticamente significativa de densidade óssea entre os grupos e períodos. Isto pode estar relacionado à baixa sensibilidade da radiografia para detecção da mineralização óssea, já percebido em outros trabalhos (HINTZE; WENZEL, 2002; FARMAN, A.; FARMAN, T., 2005; PONTUAL et al., 2010).

É possível que esta detecção não tenha sido percebida nos achados radiográficos devido ao grau de mineralização e maturação do osso neoformado pela distração osteogênica mandibular até o último período estudado, sendo, então, sugerida a realização de estudos com este modelo em períodos de tempo maiores. Ao comparar os dados obtidos pelas imagens radiográficas e os dados microscópicos do presente estudo, podem ser percebidas diferenças entre os resultados utilizando os parâmetros das análises. Isso sugere que as análises histológica e histomorfométrica são mais sensíveis para detecção da perda ou formação de tecido mineralizado.

A distração osteogênica tem sido empregada como um bom modelo não só para o estudo do reparo ósseo, como também para o estudo do processo de angiogênese (FANG et al., 2005; FUNK et al., 2009). Por isso, com intuito de investigar este processo, utilizamos a técnica imuno-histoquímica para detecção de VEGF e seu receptor (FLT-1), importantes fatores angiogênicos relacionados também à osteogênese (STREET et al., 2002; HU et al., 2003; BYUN et al., 2007).

Além disso, tem sido demonstrado em outros tecidos o aumento da expressão de VEGF regulado pelo estrógeno (JUNGSTRÖM; THOMPSON; DABROSIN, 2007; ROBB; PEPE; ALBRECHT, 2007; BOSQUIAZZO et al., 2010), inclusive em processo de cicatrização de tecido mole (MOWA et al., 2008), sugerindo que o VEGF seja um potente mediador dos efeitos angiogênicos e antiapoptóticos deste

hormônio (JESMIN et al., 2010). Contudo, em virtude do longo período de tempo necessário para desmineralização das amostras de tecido ósseo, além da necessidade de padronização das reações, a avaliação imuno-histoquímica ainda está em fase de conclusão, tornando este estudo não conclusivo. Os achados imuno-histoquímicos mostraram imunomarcagem para VEGF e seu receptor (FLT-1) nos osteoblastos, osteoclastos e em algumas células conjuntivas presentes na região de reparo ósseo nos animais do GC, sugerindo a possibilidade de uma ação direta destas moléculas sobre estas células durante reparo ósseo.

Nos osteoclastos, a imunomarcagem para FLT-1 pode ser explicada pelo fato deste receptor poder estimular a osteoclastogênese quando devidamente ativado, pois o bloqueio do FLT-1 suprime a migração de monócitos (célula que apresenta precursor comum ao osteoclasto) induzida pelo VEGF. Além disso, culturas de células CD34+ possuindo receptores FLT-1 se transformam em células osteoclásticas na presença de fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) (SAWANO et al., 2001), o que indica um mecanismo de regulação da osteoclastogênese via VEGF/ FLT-1 (GERBER et al., 1999; NIIDA et al., 1999).

Em relação ao VEGF, tem sido dito que esta citocina pode substituir alguns fatores estimuladores para desenvolvimento dos osteoclastos (NIIDA et al. 2005). Considerando que muitos desses fatores estimuladores são produzidos pelos osteoblastos e que o VEGF também pode ser produzido por esta célula (REN et al., 2006), sugere-se que a imuno-marcagem para VEGF observada no presente estudo pode indicar um mecanismo de controle no qual o osteoblasto produz VEGF que interage com o FLT-1 presentes nos osteoclastos ou nas células precursoras estimulando a sua maturação ou diferenciação. Tal processo é crucial no reparo ósseo, considerando que eventos de síntese e reabsorção devem acontecer de forma coordenada para recompor a integridade tecidual.

Alguns estudos demonstram a expressão de VEGF em osteoblastos na região de calo ósseo formado durante processo de cicatrização de fraturas (TATSUYAMA et al., 2000; VAROGA et al., 2009; PUFÉ et al., 2001) e distração osteogênica mandibular (HU et al., 2003; BYUN et al., 2007). De acordo com estes estudos, esta expressão sugere que o VEGF não somente estimula a angiogênese durante a osteogênese, mas também age diretamente sobre a formação e atividade dos osteoclastos (STREET et al., 2002; HU et al., 2003; BYUN et al., 2007).

Nos osteoclastos, a expressão de VEGF também já havia sido mencionada em outros trabalhos (GERBER et al., 1999; NIIDA et al., 1999; ENGSIG et al., 2000; AOYAMA et al., 2004; SHIBUYA, 2006). Alguns destes autores (NIIDA et al., 1999; ENGSIG et al., 2000; SHIBUYA, 2009; TREBEC-REYNOLDS et al. 2010) relacionam esta via de sinalização VEGF-osteoclasto com a atividade de recrutamento destas células. Esta atividade quimiotática sobre os osteoclastos pode estar relacionada à detecção destas moléculas nos osteoclastos em uma região de reparo ósseo, o qual envolve processo inflamatório, ossificação endocondral e intramembranosa, semelhante nos eventos de distração osteogênica (TREBEC-REYNOLDS et al. 2010; STEMPEL et al., 2011). O VEGF é uma molécula presente na ossificação endocondral (GERBER et al., 1999) e na ossificação intramembranosa (STREET et al., 2002), como também foi detectado em condrócitos hipertróficos (GERBER et al., 1999) e condroblastos (TATSUYAMA et al., 2000; PUFÉ et al., 2001), indicando sua relação direta nos processos de osteogênese envolvidos nos tipos de ossificações.

No presente estudo foram encontradas regiões de ossificação endocondral e intramembranosa, porém ainda não foram possíveis mais investigações imunohistoquímicas para análise de possíveis imunomarcações nestas regiões. Algumas dificuldades como o longo período de tempo necessário para desmineralização das amostras de tecido ósseo, a necessidade de padronização das reações imunohistoquímicas, impediram que a avaliação imuno-histoquímica fosse completamente concluída. A imunomarcação de algumas células conjuntivas para VEGF, também mostradas em outros trabalhos (BYUN et al., 2007; MAYER et al., 2005), sugere a participação desta molécula nos processos iniciais de osteogênese e angiogênese, os quais envolvem recrutamento de células indiferenciadas.

Os osteoblastos, osteoclastos e algumas células conjuntivas também mostraram imunomarcação para FLT-1, reforçando a influência destas moléculas associadas ao processo de angiogênese e, conseqüentemente, sobre o processo de osteogênese. Estudos demonstraram a expressão de FLT-1 em osteoblastos (GERBER et al., 1999; UCHIDA et al., 2003; BYUN et al., 2007) e um deles identificou uma expressão mais intensa para FLT-1 em relação à expressão de outros tipos de receptores para VEGF, sugerindo como causa para este achado que o FLT-1 está relacionado a diferentes funções nas células osteogênicas e sua participação na manutenção celular faz com que sua expressão esteja presente por mais tempo durante o período de consolidação da distração (BYUN et al., 2007).



Por isso, optou-se pela marcação do FLT-1 na análise imuno-histoquímica do presente estudo. A expressão de FLT-1 em osteoclastos (GERBER et al., 1999; NIIDA et al., 1999; ENGSIG et al., 2000; AOYAMA et al., 2004; SHIBUYA, 2006) e em células de mesma origem como os monócitos (NIIDA et al., 2005; CAO, 2009) também já havia sido relatada, assim como a imunomarcação de FLT-1 em fibroblastos (MAYER et al., 2005; BYUN et al., 2007; BERTHAUT et al., 2009).

Um estudo observou que o bloqueio de receptores para VEGF em áreas de fraturas femurais resulta na redução da angiogênese e da formação óssea (STREET et al., 2002). Camundongos *knockout* para FLT-1 exibiram menor volume ósseo (OTOMO et al., 2007), confirmando esta relação entre ação do VEGF via FLT-1 sobre o processo de formação óssea. Estes trabalhos, assim como os resultados imuno-histoquímicos desta pesquisa, reafirmam a íntima relação entre osteogênese e angiogênese. Adicionalmente, podemos sugerir, contudo, que a distração osteogênica demonstra ser um modelo de estudo viável para análise molecular e celular da angiogênese dentro do reparo ósseo.

De acordo com os achados histológicos, histomorfométricos e radiográficos do presente estudo, a distração osteogênica mandibular em ratas promove osteogênese, mesmo na condição de deficiência de estrógeno provocada pela ovariectomia. De acordo com os resultados imuno-histoquímicos, pode ser sugerida a associação entre os processos de osteogênese e angiogênese dentro deste modelo de pesquisa. Entretanto, é necessário um aprofundamento das investigações imuno-histoquímicas para VEGF e seu receptor (FLT-1), a fim de detalhar a relação entre estas moléculas e as células envolvidas na osteogênese e com o estrógeno.

A relação entre a angiogênese e osteogênese poderá ser esclarecida por análises imuno-histoquímicas que privilegiem a detecção de vasos sanguíneos, correlacionando com os achados para VEGF e seu receptor (FLT-1) e em condições de deficiência de estrógeno provocada pela ovariectomia. Além disso, é possível que outros parâmetros de análise histomorfométrica possam ser utilizados com intuito de ampliar informações sobre a ação do estrógeno na osteogênese e angiogênese, contribuindo para o aprofundamento do conhecimento sobre biologia óssea, particularmente àquele relacionado à técnica de distração osteogênica mandibular e ao reparo ósseo em osso osteoporótico.

## **7 CONCLUSÕES**



A partir dos resultados pode-se concluir que:

1. A osteogênese promovida pela distração osteogênica mandibular em ratas ovariectomizadas ocorreu de forma mais lenta, sugerindo a influência da deficiência de estrógeno provocada pela ovariectomia neste reparo ósseo;
2. O maior volume de matriz óssea formada entre as extremidades ósseas submetidas a distração osteogênica no grupo controle quando comparado com àquele do grupo experimental no período de 28 dias, sugere a interferência da privação de estrógeno promovida pela ovariectomia;
3. Não houve diferenças radiográficas de densidade da matriz óssea formada durante distração osteogênica mandibular entre os grupos e períodos estudados;
4. O VEGF e seu receptor VEGFR-1 estando presentes em osteoblastos, osteoclastos e algumas células conjuntivas do tecido conjuntivo fibrocelular, parecem estar envolvidos no reparo ósseo promovido pela distração osteogênica mandibular.



AUBIN, J. E.; BONNELYE, E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporosis International*, Toronto, v. 11, n. 11, p. 905-13, 2000.

ALBUQUERQUE, R. et al. Trigeminal nitric oxide synthase correlates with bone formation during distraction osteogenesis. *Calcified Tissue International*, Ribeirão Preto, v. 82, p. 309-15, 2008.

ALI, M.N. et al. Histologic study of the cellular events during rat mandibular distraction osteogenesis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, Niigata, v. 107, n. 3, p.325-35, 2009.

AMIR, L.R. et al. Formation of new bone during vertical distraction osteogenesis of the human mandible is related to the presence of blood vessels. *Clinical Oral Implants Research*. v. 17, n. 4, p. 410-6, 2006

AOYAMA, J. et al. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor in rat condylar cartilage during postnatal development. *Histochemistry and cell biology*, Hiroshima, V. 122, n. 1, p. 35-40, 2004.

ARLOT, M. et al. Trabecular and endocortical bone remodeling in postmenopausal osteoporosis: comparison with normal postmenopausal women. *Osteoporosis International*, Lyon, v. 1, n. 1, p. 41-9, 1990.

ARSLAN, H. et al. The effects of osteoporosis on distraction osteogenesis: an experimental study in an ovariectomised rabbit model. *Acta Orthopaedica Belgica*, Diyarbakir, v. 69, n. 1, p. 67-73, 2003.

BALASCH, J. Sex steroids and bone: current perspectives. *Human Reproduction Update*, Barcelona, v. 9, n. 3, p. 207-22, 2003.

BARON, 2002. Anatomy and ultrastructure of bone - histogenesis, growth and remodeling. *Clinical Relevance and Applications* [periódico na Internet]. Disponível em: <<http://www.endotext.org/parathyroid/parathyroid1/index.htm>> Acesso em: fev. 2009.

BERTHAUT, A. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) expression in human corneal fibroblast decreased with age. *Molecular Vision*, Paris, v. 29, n. 15, p. 1997-2007, 2009.

BIGI, M. et al. Experimental model of distraction osteogenesis in edentulous rats. *Brazilian Oral Research*, Buenos Aires, v. 25, n. 3, p. 217-24, 2011.

BOULETREAU, P.J.; WARREN, S.M.; LONGAKER, M.T. The molecular biology of distraction osteogenesis. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery, official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, Lyon, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2002.

BOSQUIAZZO, V. et al. Effects of neonatal exposure to bisphenol A on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell

proliferation in the adult rat uterus. *Biology of Reproduction*, Santa Fé, v. 82, n. 1, p. 86-95, 2010.

BYUN, J.H. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors after mandibular distraction osteogenesis. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, Gyeongnam, v. 36, n. 4, p. 338-44, 2007.

CATAGNI, M.; GUERRESCHI, F.; LOVESETTI, L. Distraction osteogenesis for bone repair in the 21st century: lessons learned. *Injury*, Lecco, v. 42, n. 6, p. 580-6, 2011.  
CAO, Y. Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. *Science Signaling*, Stockholm, v. 2, n. 59, p. 1-11, 2009.

CAPP, C. et al. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. *HCPA*, v.29, n.1, p.51-59, 2009

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, Leuven, v. 9, n. 6, p. 653-60, 2003

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature Medicine*, Leuven, v. 438, n. 7070, p. 932-6, 2005.

CARVALHO, R. S. et al. The role of angiogenesis in a murine tibial model of distraction osteogenesis. *Bone*, Boston, v. 34, n. 5, p. 849-61, 2004.

CHIAPASCO, M.; CASENTINI, P.; ZANIBONI, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *The International of Oral and Maxillofacial Implants*, São Paulo, v. 24, p. 237-59, 2009.

CHOW, J. et al. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *The journal of clinical investigation*, London, v. 89, n. 1, p. 74-8, 1992.

CRUSOÉ-SOUZA, M. et al. Glicocorticoides e osteoporose - artigo de revisão. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, Salvador, v. 9, Supl. 1, p. 57-64, 2010.

CRUSOÉ-SOUZA, M.; SASSO-CERRI, E.; CERRI, P. Immunohistochemical detection of estrogen receptor beta in alveolar bone cells of estradiol-treated female rats: possible direct action of estrogen on osteoclast life span. *Journal of Anatomy*. Araraquara, v. 215, n. 6, p. 273-81, 2009.

DAI, J.; RABIE, A.B. VEGF: An essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *Journal of Dental Research*, Hong Kong, v. 86, n. 10, p. 937-50, 2007.

DECKERS, M. et al. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*, Takasaki, v. 141, n. 5, p. 1667-74, 2000.

DEVESCOVI, V. et al. Growth factors in bone repair. *La Chirurgia degli organi di movimento*, Bologna, v. 92, p. 161-68, 2008.

DIMITRIOU, R. et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*. v. 9, n. 66, p. 2-10, 2011.

EJIRI, S.; TOYOOKA, E.; TANAKA, M. et al. Histological and histomorphometrical changes in rat alveolar bone following antagonistic tooth extraction and/or ovariectomy. *Archives of Oral Biology*, Niigata, v. 51, n. 11, p. 941-50, 2006.

ENGSIG M. T. et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *The journal of cell biology*, Herlev/ Ballerup, v. 151, n. 4, p. 879-89, 2000.

ERIKSEN, E. et al. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *Journal of Bone and Mineral Research*, Rochester, v. 5, n. 4, p. 311-9, 1990.

FALONI, A.P.S. et al. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *The Journal of Periodontal Research*, Araraquara, v. 42, n. 3, p. 193-201, 2007.

FANG, T. et al. Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*, Stanford, v. 20, n. 7, p. 1114-24, 2005.

FANG, T. et al. Creation and characterization of a mouse model of mandibular distraction osteogenesis. *Bone*, Stanford, v. 34, n. 6, p. 1004-12, 2004.

FENG, X. et al. Ultrastructural cell response to tension stress during mandibular distraction osteogenesis. *The British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Xian, v. 46, n. 7, p. 527-32, 2008.

FARMAN, A.; FARMAN, T. A comparison of 18 different x-ray detectors currently used in dentistry. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. Louisville, v. 99, n. 4, p. 485-9, 2005.

FOLKMAN, J. Incipient angiogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 92, n. 2, p. 94-5, 2000.

FOLKMAN, J.; D'AMORE, P. A. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, Boston, v. 87, n. 7, p. 1153-5.

FUNK, J. F. et al. Distraction osteogenesis enhances remodeling of remote bones of the skeleton: a pilot study. *Clinical orthopaedics and related research*, Berlin, v. 467, n. 12, p. 3199-205, 2009.

GERBER, H.P. et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 623-81, 1999.

GERSTENFELD, L. C. et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, Boston, v.18, n. 9, p. 1584-92, 2003.

GIRO, G. et al. Influence of estrogen deficiency on bone around osseointegrated dental implants: an experimental study in the rat jaw model. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 69, n. 7, p. 1911-8, 2011.

GIANNOUDIS, P.; JONES, E.; EINHORN, T. Fracture healing and bone repair. *Injury, International Journal Care Injured*, Boston, v. 42, p. 549-50. 2011.

GLOWACKI, J. et al. Nicotine impairs distraction osteogenesis in the rat mandible. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Boston, v. 32, n. 2, p. 156-61, 2008.

HELOTERA, H.; ALITALO, K. The VEGF family, the inside story. *Cell*, Helsinki, v. 130, n. 4, p. 591-2, 2007

HINTZE, H.; WENZEL, A. Influence of the validation method on diagnostic accuracy for caries. A comparison of six digital and two conventional radiographic systems. *Dento Maxillo Facial Radiology*, Aarhus, v. 31, n. 1, p. 44-9, 2002.

HOFBAUER, L.C.; HEUFELDER, A.E. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*, v. 79, n. 5-6, p. 243-53, 2001.

HU, J. et al. Temporalspatial expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during mandibular distraction osteogenesis. *Journal of Cranio-maxillofacial Surgery*, Chengdu, v. 31, p. 238-43, 2003.

HUANG, X. et al. Combined antiangiogenic and immune therapy of prostate cancer. *Angiogenesis*, Pittsburgh v. 8, n. 1, p. 13-23, 2005

ISSA, J. P. et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in the acute distraction osteogenesis of rat mandibles. *Clinical Oral Implants Research*, v. 20, n. 11, p. 1286-92, 2009.

JACOBSEN, K. et al. Bone formation during distraction osteogenesis is dependent on both VEGFR1 and VEGFR2 signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*, Boston, v. 23, n. 5, p. 596-609, 2008.

JAIN, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, Boston, v. 9, n. 6, p. 685-93, 2003.

JESMIN, S. et al. Estrogen receptor alpha and beta are both involved in the cerebral VEGF/Akt/NO pathway and cerebral angiogenesis in female mice. *Biomedical Research*, Tokyo, v. 31, n. 6, p. 337-46, 2010.

JUNGSTRÖM, M.; THOMPSON, L.; DABROSIN, C. Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. *Clinical Cancer Research*, Linköping, v. 13, n. 3, p. 1061-7, 2007.

KHANAL, A. et al. The BMP signaling and its smads in mandibular distraction osteogenesis. *Oral diseases*, Kytakyushu, v. 14, p. 347-55, 2008.

KINDT, F. et al. Reduced expression of nicotinic alpha subunits 3, 7, 9 and 10 in lesional and nonlesional atopic dermatitis skin but enhanced expression of alphasubunits 3 and 5 in mast cells. *Br J Dermatol*, v. 159, p. 847-57, 2008.

KNABE, C. et al. Growth factor expression following clinical mandibular distraction osteogenesis in humans and its comparison with existing animal studies. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, Germany, v. 33, n. 6, p. 361-9, 2005.

KANCZLER, J.M.; OREFFO, R.O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *European Cells and Materials*, Southampton, v. 15, p. 100-14, 2008.

KERAMARIS, N.C.; CALORI, G.M.; NIKOLAOU, V.S. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*, v. 39, n. 2, p.45–57, 2008.

KIM, U.; LI, K.; SENG, W. Bone Regeneration in mandibular distraction osteogenesis combined with compression stimulation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Busan, v. 64, p. 1498-1505, 2006.

KING, G.J. et al. Effect of distraction rate and consolidation period on bone density following mandibular of osteodistraction in rats. *Archives of Oral Biology*, Seattle, v. 48, n. 4, p. 299-308, 2003.

KHANAL, A. et al. The BMP signaling and its Smads in mandibular distraction osteogenesis. *Oral Diseases*, Kitakyushu, v. 14, n. 4, p. 347-55, 2008.

KHOSLA, S.; WESTENDORF, J.J.; MODER, U.I. Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair. *Stem Cells*, Ohio, v. 28, n. 12, p. 2124-8, 2010.

KNABE, C. et al. Growth factor expression following clinical mandibular distraction osteogenesis in human and its comparison with existing animal studies. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, Berlim, v. 33, p. 361-69, 2005.

KODAMA, I. et al. Estrogen regulates the production of VEGF for osteoclast formation and activity in op/op mice. *Hiroshima: Journal of Bone Mineral Research*, v. 19, n. 2, p. 200-6, 2004.



KREISNER, P. et al. Histological evaluation of the effect of low-level laser on distraction osteogenesis in rabbit mandibles. *Medicina Oral, Patología Oral, Cirugía Bucal*, Porto Alegre, v. 15, n. 4, p. 616-8, 2010.

KUBO, T. et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Kyoto, v. 68, n. 5-6, p. 197-202, 1999.

LEE, D. et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone*, Seoul, v. 42, n. 5, p. 932-41, 2008.

LELOVAS, P.P. et al., The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative Medicine*. v. 58, n. 5, p. 424-30. 2008.

LERNER, U.H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Umea: Journal of Dental Research*, v. 85, n. 7, p. 584-95, 2006.

LI, G. et al. Effect of lengthening rate on angiogenesis during distraction osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Research*, Headington, v. 17, n. 3, p. 362-7, 1999.

LIANG, L. et al. Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. *Journal of Periodontology*, Beijing, v. 79, n. 9, p. 1745-51, 2008.

LIU, C. et al. Sutural distraction osteogenesis (SDO) versus osteotomy distraction osteogenesis (ODO) for midfacial advancement: a new technique and primary clinical report. *The journal of craniofacial surgery*, Beijing, v. 16, n. 4, p. 537-48, 2005.

LIU, Z.; KING, G.; HERRING, S. Condylar mineralization following mandibular distraction in rats. *Journal of Dental Research*, Washington, v. 85, n. 7, p. 653-7, 2006.

LOBOA, E.G. et al. Mechanobiology of mandibular distraction osteogenesis; experimental analyses with a rat model. *Bone*, Stanford, v. 34, n. 2, p. 336-43, 2004.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews*, Little Rock, v. 21, n. 2, p. 115-37, 2000.

MANOLAGAS, S. C.; KOUSTENI, S.; JILKA, R.L. Sex steroids and bone. *Arkansas: Recent Progress in Hormone Research*, v. 57, p. 385-409, 2002.

MARCU, F. et al. The histopathological study of osteoporosis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. v. 52, n. 1, p. 321-5, 2011.

MARSELL, R.; EINHORN, T.A. The biology of fracture healing. *Injury*, v. 42, n. 6, p. 551-5, 2011.

MAYER, H. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. Freiburg, v. 95, p. 827–839, 2005.

MCCARTHY, J.G. et al. Introduction of an intraoral bone-lengthening device. *Plastic and Reconstructive Surgery*, New York, v. 96, n. 4, p. 978-81, 1995.

MCNAMARA, L. M. Perspective on post-menopausal osteoporosis: establishing an interdisciplinary understanding of the sequence of events from the molecular level to whole bone fractures. *Journal of the Royal Society, Interface / The Royal Society*. v. 7, n. 44, p. 353-72, 2009.

MCNAMARA, L. M. Perspective on post-menopausal osteoporosis: establishing an interdisciplinary understanding of the sequence of events from the molecular level to whole bone fractures. *Journal of the Royal Society, Interface*, Galway, v. 7, n. 44, p. 353-72, 2010.

MICHAEL, H. et al. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *Journal of bone and mineral research*, Turku, v. 20, n. 12, p. 2224-32, 2005.

MIYAZAKI, T. et al. Changes in receptor activator of nuclear factor-kappaB, and its ligand, osteoprotegerin, bone-type alkaline phosphatase, and tartrate-resistant acid phosphatase in ovariectomized rats. *Journal of Cell Biochemistry*, Saitama, v. 93, n. 3, p. 503-12, 2004.

MODIF, M. M. et al. Craniofacial distraction osteogenesis: a review of 3278 cases. *Plastic and Reconstructive Surgery*, Baltimore, v. 108, n. 5, p. 1103-14, 2001.

MOWA, C. et al. Delineation of VEGF-regulated genes and functions in the cervix of pregnant rodents by DNA microarray analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, Boone, v.6, n. 64, 2008.

NAKAMURA, T. et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of fas ligand in osteoclasts. *Tokyo: Cell*, v. 130, n. 5, p. 811-23, 2007.

NIIDA, S. et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *The journal of experimental medicine*, Hiroshima, v. 190, n. 2, p. 293-8, 1999.

NIIDA, S. et al. VEGF receptor 1 signaling is essential for osteoclast development and bone marrow formation in colony-stimulating factor 1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Tokyo, v. 102, n. 39, p. 14016-21, 2005.

NOTELOVITZ, M. Androgen effects on bone and muscle. *Fertility and Sterility*, Gainesville, v. 77, n. 4, p. 34-41, 2002.

OETTGEN, P. Transcriptional regulation of vascular development. *Circulation Research*, Boston, v. 89, n. 5, p. 380-8, 2001.

OKAFUJI, N.; LIU, Z.J.; KING, G.J. Assessment of cell proliferation during mandibular distraction osteogenesis in the maturing rat. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*, Shiojiri, v. 130, n. 5, p. 612-21, 2006.

OLIVEIRA, L. *Estudo comparativo entre radiografia digitalizada e digital na avaliação de reparo de defeito ósseo crítico com biomateriais*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde – UFBA, Salvador, 2010.

ORRICO, S. R. et al. The influence of loss of bone mass on induced periodontal disease: a radiographic and densitometric study of female rats. *Journal of periodontology*, Araraquara, v. 76, n. 9, p. 1436-42, 2005.

ORTAKOGLU, K. et al. Distraction osteogenesis in a severe mandibular deficiency. *Head and Face Medicine*, Ankara, v. 20, n. 3, p. 7, 2007.

OTOMO, H. et al. Flt-1 tyrosine kinase-deficient homozygous mice result in decreased trabecular bone volume with reduced osteogenic potential. *Bone*, Yahatanishi-ku, v. 40, n. 6, p. 1494-501, 2007.

OURSLEER, M.J. et al. Estrogen modulation of avian osteoclast lysosomal gene expression. *Endocrinology*, v. 132, n. 3, p.1373-80, 1993.

PACIFICI, R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis - the second decade. *Endocrinology*, v. 139, n. 6, p. 2659-61, 1998.

PARFITT, A. et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone and Mineral Research*, Detroit, v. 2, n. 3, p. 595-610, 1987.

PHAN, T.C.; XU, J.; ZHENG, M.H. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histology and Histopathology*, Nedlands, v. 19, v. 4, p. 1325-44, 2004.

PINHEIRO, M.; EIS, S.R. Epidemiology of osteoporotic fractures in Brazil: what we have and what we need. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. v. 54, n. 2, p. 164-70, 2010.

PIVA, R. et al. Induction of apoptosis of osteoclasts by targeting transcription factors with decoy molecules. *Annals of the New York Academy of Science*, Ferrara, v. 1091, p. 509-16, 2006.

PONTUAL, A. et al. Comparison of digital systems and conventional dental film for the detection of approximal enamel caries. *Dento Maxillo Facial Radiology*, Recife, v. 39, n. 7, p. 431-6, 2010.

PUFE, T. et al. The splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage. *Arthritis and rheumatism*, Kiel, v. 44, n. 5, p. 1082-8, 2001.

- PUFE, T.; CLAASSEN, H.; SCHOLZ-AHRENS, K.E. et al. Influence of estradiol on vascular endothelial growth factor expression in bone: a study in Göttingen miniature pigs and human osteoblasts. *Calcified Tissue International*, Kiel, v. 80 n. 3, p. 184-91, 2007.
- QI, M. et al. Mandibular distraction osteogenesis enhanced by bone marrow mesenchymal stem cells in rats. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, China, v. 34, n. 5, p. 283-9, 2006.
- QUINN, J.M.; GILLESPIE, M.T. Modulation of osteoclast formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Fitzroy, v. 328 n. 3, p. 739-45, 2005.
- RAHN, B.A. Bone healing: histologic and physiologic concepts. In: Fackelman GE, editor. *Bone in clinical orthopedics*. Stuttgart, NY, 2002.
- RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clinical Chemistry*, v. 45, n. 8, p. 1353-8, 1999.
- REN, W. et al. Association between UHMWPE particle-induced inflammatory osteoclastogenesis and expression of RANKL, VEGF, and Flt-1 in vivo. *Biomaterials*, Detroit, v. 27, n. 30, p. 5161-9, 2006.
- RICKARD, D.J. et al. Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. *Rochester: Journal of Cellular Biochemistry Supplements*, v. 32/33, p. 123-32, 1999.
- RIGGS, B. L. Endocrine causes of age-related bone loss and osteoporosis. *Novartis Foundation symposium*, Rochester, v. 242, p. 247-59, d. 260-4, 2002.
- RIGGS, B.L. The mechanism of estrogen regulation of bone resorption. *Journal of Clinical Investigation*, v. 106, n. 10, p. 1203-04, 2000.
- ROBB, V.; PEPE, G.; ALBRECHT, E. Placental villous vascular endothelial growth factor expression and vascularization after estrogen suppression during the last two-thirds of baboon pregnancy. *Endocrine*, Baltimore, v. 31, n. 3, p. 260-7, 2007.
- ROBLING, A.G. et al. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. Indianapolis: *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 8, p. 1-44, 2006.
- SAULACIC, N. et al. Alveolar distraction osteogenesis: a systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Bern, v. 37, n. 1, p. 1-7, 2008.
- SAWANO, A. et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*, Tokyo, v. 97, n. 3, p. 785-91, 2001.
- SCHROEDER, J. E.; MOSHEIFF, R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. *Injury*, v. 42, n. 6, p. 609-13. 2011.
- SCHULTEN, A. et al. Effect of Nicotine on distraction osteogenesis of the rat mandible. *Journal of Bone Mineral Research*, v. 17, n. 243, 2002.

SENGER, D. R. Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor. *Molecular biology of the cell*, Boston, v. 21, n. 3, p. 377-9, 2010.

SFEIR, C. et al. Fracture Repair. Bone regeneration and repair. *Lieberman JR, Friedlaender GE, editors*. Totowa, 2005.

SHIBUYA, M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Tokyo, v. 39, n. 5, p. 469-78, 2006.

SHIBUYA, M. Angiogenesis regulated by VEGF and its receptors and its clinical application. *The japanese journal of clinical hematology*, v. 50, n. 5, p. 404-12, 2009.

SIPOS, W. Pathophysiology of osteoporosis. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, Vienna, v. 159, n. 9-10, p. 230-4, 2009.

SIMON, L. S. Osteoporosis. *Clinics in geriatric medicine*, Boston, v. 21, n. 3, p. 603-29, 2005.

SOJO, K. et al. Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2, -4 (BMP-2, -4) on lengthened rat femurs. *Journal of Cracio-Maxillo-Facial Surgery*, Nagoya, v. 33, n. 4, p. 238-45, 2005.

SØRENSEN, M.G. et al. Estrogen directly attenuates human osteoclastogenesis, but has no effect on resorption by mature osteoclasts. *DNA and Cell Biology*, Herlev, v. 25, n. 8, p. 475-83, 2006.

STEMPEL, J. et al. Development of articular cartilage and the metaphyseal growth plate: the localization of TRAP cells, VEGF, and endostatin. *Journal of Anatomy*, Innsbruck, v. 218, n. 6, p. 608-18, 2011.

STREET, J. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Cork, v. 99, n. 15, p. 9656-61, 2002.

TAKEUSHI, S.; MATSUO, A.; CHIBA, H. Beneficial role of periosteum in distraction osteogenesis of mandible: its preservation prevents the external bone resorption. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, Tokyo, v. 220, n. 1, p. 67-75, 2010.

TATSUYAMA K. et al. Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone. *European journal of histochemistry*, kui, v. 44, n. 3, p. 269-78, 2000.

TATUM, S.A.; LOSQUADRO, W.D. Advances in craniofacial surgery. *Archives of Facial Plastic Surgery*, Syracuse, v. 10, n. 6, p. 376-80, 2008.

TREBEC-REYNOLDS, D. et al. VEGF-A expression in osteoclasts is regulated by NF-kappaB induction of HIF-1alpha. *Journal of Cellular Biochemistry*, Toronto, v. 110, n. 2, p. 343-51, 2010.



UCHIDA, S. et al. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone, Kitakyushu*, v. 32, n. 5, p. 491-501, 2003.

VÄÄNÄNEN, K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption – rationale for the design of new therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 7, p. 959-71, 2005.

VAROGA, D. et al. Differential expression of vascular endothelial growth factor in glucocorticoid-related osteonecrosis of the femoral head. *Clinical Orthopaedics and related Research*, Kiel, v. 467, n. 12, p. 3273-82, 2009.

VAN DER MEULEN, M.C.; HUISKES, R. Why mechanobiology? A survey article. *Journal of Biomechanics*, Ithaca, v. 35, n. 4, p. 401-14, 2002.

VANNUCCI, M. et al. Histological and physical analysis of bone neoformation by osteogenesis distraction: a preliminary report. *Annals of Maxillofacial Surgery*. v. 1, n. 1, Jan. 2011.

WAN, D.; NACAMULI, R; LONGAKER, M. Craniofacial bone tissue engineering. *The Dental Clinics of North America*, Stanford, v. 50, p. 175-90, 2006.

WARSHAWSKY, H.; MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, v. 15, n. 9, p. 542-9, 1967.

WRONSKI et al. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcified tissue international*, v. 37, n. 3, p. 324-8, 1985.

YANG, X. et al. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*, v. 41, n. 6, p. 928–36, 2007.

ZHENG, L.; MA, L.; CHEUNG, L. Angiogenesis is enhanced by continuous traction in rabbit mandibular distraction osteogenesis. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. Hong Kong, v. 37, p. 405-11, 2009.







**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**Comissão de Ética na Experimentação Animal**


---

UFBA - Faculdade de Odontologia - Av. Araújo Pinho, 62 - Canela  
CEP: 40.140-110 - Salvador - BA - Tel: (71) 3283-8966  
Home-page: www.ufba.br

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto de Pesquisa “ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DO VEGF E DO VEGFR-1 EM MATRIZ ÓSSEA DE RATAS OVARIETOMIZADAS APÓS DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA MANDIBULAR - 14/09” de autoria de **ROBERTO J MEYERS NASCIMENTO**, foi analisado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal e considerado **APROVADO** em reunião ordinária realizada nesta data.

Salvador, 09 de DEZEMBRO de 2009

  
**Prof. Antonio Luiz B. Pinheiro**  
Presidente



Instituto de Ciências da Saúde  
Programa de Pós Graduação  
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas  
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100  
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>