

Capítulo 5

5.1 Discussão

Antes de iniciar a discussão propriamente dita desse trabalho, serão feitas algumas considerações referentes à forma de apresentação deste capítulo e ao contexto em que o trabalho foi desenvolvido. É necessário lembrar que o experimento foi executado em animais de laboratório coelhos *New Zealand*, sem modificações genéticas. Dessa forma, os animais estavam sujeitos a variações metabólicas, genéticas e estruturais (relativas a variações anatômicas) individuais. Para o estudo celular, utilizou-se diferentes tempos e técnicas para a avaliação dos resultados, através do método de elaboração dos defeitos ósseos com trefinas. Para o estudo molecular, o procedimento utilizado para desencadear o estresse foi o trauma cirúrgico, o qual, além dos inúmeros fatores envolvendo o processo inflamatório, pode incluir variações individuais. Assim, as informações contidas no capítulo introdutório referentes ao dinamismo do processo inflamatório e de reparo, como também as sinalizações intra e inter-celulares, estão englobadas nesta situação e representadas nesse trabalho. Tentou-se estabelecer uma situação o mais próxima possível das cirurgias realizadas em seres humanos, para a obtenção de informações que possam auxiliar a prática clínica.

O estudo do tecido ósseo é extremamente complexo, tendo em vista sua característica rígida. As dificuldades metodológicas para o estudo desse tecido estão relacionadas, principalmente, à sua dureza, dificultando a obtenção de cortes passíveis de serem analisados em microscopia de luz e em outras metodologias frequentemente utilizadas em outros tipos de tecidos como, por exemplo, as marcações de proteínas por procedimentos de imunistoquímica.

Ao contrário dos tecidos moles, o tecido ósseo tem apenas três métodos consagrados de estudo: (1) a técnica de descalcificação, utilizada para estudos histológicos; (2) a técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM), utilizada, principalmente, para análises de superfícies de implantes/biomateriais e sua interrelação com o tecido ósseo adjacente; e (3) a técnica de embebição em resina acrílica, utilizada, principalmente, para a avaliação da interface implante, tecido ósseo e células adjacentes. Estas três técnicas consagradas possuem limitações, que em muitos casos impedem estudos mais aprofundados, trazendo grandes dificuldades aos pesquisadores na obtenção de informações, muitas vezes valiosas para a conclusão de seus trabalhos.

Quanto à forma da apresentação da discussão dos resultados, assim como foi feito na apresentação do capítulo de materiais e métodos, decidiu-se fazer em ordem cronológica conforme foi realizado o trabalho para a uma melhor compreensão. Dessa forma, os resultados de cada etapa serão discutidos separadamente, até chegarmos às considerações finais.

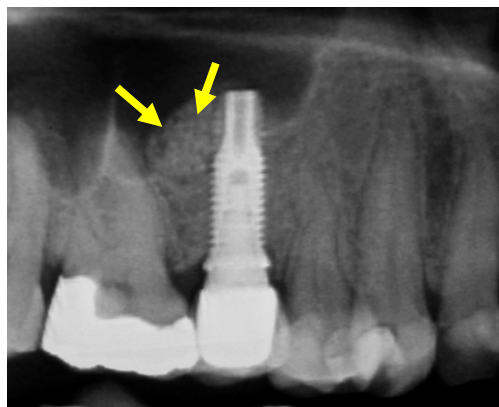
5.1.1 Discussão do estudo inicial

A busca por materiais que possam substituir o tecido ósseo ou recuperá-lo após algum tipo de trauma ou enfermidade tem sido muito estudada nos últimos anos, surgindo várias proposições e tipos de materiais para essa finalidade. Basicamente, três motivos que dão forte subsídio à utilização dos biomateriais: não necessitam de uma área cirúrgica doadora por ser de origem laboratorial; suas propriedades osteocondutoras foram amplamente demonstradas, permitindo que osso neoformado deposite-se entre as partículas mineralizadas do material

(estas por sua vez servem de arcabouço para deposição de nova matriz óssea). Sendo essa uma vantagem quando comparado com o enxerto ósseo autógeno e, o osso autógeno esponjoso particulado por ser rapidamente remodelado pode apresentar uma considerável perda precoce de volume na área enxertada (BLOKHUIS et al, 2000; DOS SANTOS et al, 1999)

Entretanto, a maioria desses apenas apresenta um potencial osteocondutor. A partir daí com o conhecimento através da literatura descrevendo a possibilidade do resveratrol de induzir colágeno e ativar *Stem Cells* em processos ósseos (BÄCKESJÖ et al, 2006), vimos a possibilidade de através da aplicação dessa ferramenta molecular em defeitos ósseos associados à esse materiais torná-los mais eficientes e termos uma propriedade indutiva. Conforme foi apresentado nos resultados desse estudo piloto observou-se que houve uma grande diferença nos resultados obtidos, sendo que no grupo experimental, no mesmo período de tempo proposto houve uma formação óssea muito mais intensa e efetiva, com uma completa reabsorção dos grânulos de osso bovino utilizados para o preenchimento do defeito criado. Enquanto isso, no grupo controle 2, onde foi aplicado apenas o material de preenchimento (osso bovino), em sua composição original, tivemos uma neoformação óssea muito menor e a presença de uma grande área com partículas e presença de tecido colágeno distribuído de forma irregular. Esses resultados referentes aos obtidos no grupo controle 2 até hoje podem ser observados clinicamente em pacientes, pois a qualidade do tecido ósseo neoformado não é adequada para o suporte funcional e suas partículas levam muito tempo para serem completamente reabsorvidas, conforme figura 34 exemplificando isso em uma paciente enxertada com osso bovino na radiografia

após 3 anos da realização do enxerto ósseo, mesmo que em pouca quantidade (figura 34, setas amarelas).



Figuras 34: Radiografia demonstrando uma área enxertada com osso bovino inorgânico após 3 anos, onde podemos verificar a presença de partículas não reabsorvidas.

5.1.2 Discussão dos grupos para a determinação da concentração de resveratrol associado ao material para enxerto

O material eleito para a utilização como controle e como meio de associação foi o osso bovino porque sabidamente esse material apresenta apenas uma função osteocondutora, não desenvolvendo reação imunogênica e não tendo nenhuma ação molecular (CARBONARI et al, 2010) e, ainda, é de fácil obtenção e baixo custo. Como no estudo inicial foi utilizada uma proporção de mistura onde o resveratrol foi adicionado na concentração de 50% do peso de osso bovino, as outras misturas, para a determinação da concentração ideal, foram com quantidades que variaram para baixo e para cima desse valor. Conforme podemos observar os grupos apresentaram resultados bastante semelhantes entre si. Como o resveratrol tem uma meia vida bastante curta no organismo, podemos observar que uma maior quantidade trouxe melhores resultados. No entanto, quando a proporção de osso bovino foi muito menor que o resveratrol misturado tivemos

resultados inferiores aos dos grupos com concentrações menores, o que nos pareceu estar relacionado ao tamanho das partículas dentro do defeito preparado, onde o sangue removeu o material enxertado.

No Grupo experimental (**Gexp3**), que foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico com osso bovino liofilizado associado a 60% do seu peso de *resveratrol*, foi que apresentou os melhores resultados, sendo encontrado no interior das trabéculas sinais de células viáveis dentro dos espaços celulares (figuras 16 a, b e c). Outra presença marcante foram as linhas de crescimento claramente detectáveis nas trabéculas ósseas (figuras 15 a e b). Foram evidenciadas nas trabéculas imagens sugestivas de um ativo processo de remodelação óssea em andamento. Uma característica frequente nos espaços medulares foi a presença de infiltrado inflamatório mononuclear discreto a moderado, provavelmente associado ao próprio processo de reparação óssea em andamento no local, que nos demais grupos apresentou-se muito mais intenso. Em aumentos menores, observou-se nitidamente uma maior densidade óssea na área enxertada com *resveratrol* em uma concentração de 60% do peso de osso bovino (figuras 34 a 38). Todos esses indícios nos levam a concluir que os processos de neoformação e remodelação óssea estavam em andamento nessas áreas preenchidas.

Após essa determinação, algumas lâminas foram coradas com a utilização do *Tricrômico de Masson* (figuras 17 a, b e c) para a verificação da orientação das fibras neoformadas, pois, a matriz orgânica do osso inclui diferentes tipos de macromoléculas, principalmente colágeno tipo I (90% do peso), mas também fosforo-proteínas tais como sialoproteínas e glicoproteínas (osteonectina e proteoglicanos) (FRANZEN & HEINEGARD, 1985). Foi analisada a orientação das

fibras colágenas da matriz óssea orgânica pela coloração com *Tricrômico de Masson* (TM) em microscopia de luz (JUNQUEIRA et al., 1982), revelando que no grupo com resveratrol a organização foi bem mais adequada do que quando comparado com os grupos controle, aparecendo o colágeno com uma orientação lamelar de suas fibras. Ainda, o grande número de osteonas presentes no grupo experimental reforça a indicação da remodelação óssea na presença de resveratrol.

No presente estudo, a grande proporção de vermelho corando as fibras (densidade correspondente ao colágeno tipo I) foi somente encontrado nas amostras do grupo com *resveratrol*. Isso sugere que a presença do *resveratrol* associado ao osso bovino estimula a maturação do colágeno tipo I. Geralmente a maturação das fibras colágenas é promovida pela sua mineralização (LEES, 2003) e depende de íons Ca^{2+} disponíveis.

O colágeno do tipo III ocorre somente no tecido ósseo imaturo (BLAND et al., 1999; LAWTON et al., 1997), sendo que foi encontrado regularmente nas amostras dos grupos controle 1 e 2, enquanto no grupo com *resveratrol* foi identificado somente ocasionalmente em poucas amostras.

5.1.3 Discussão do efeito do resveratrol na regulação do NF-kB

a) Método

Uma limitação importante da técnica da desmineralização é a necessidade da utilização de soluções quelantes ou ácidas, com a finalidade de remoção dos íons Ca^{++} ou a apatita do tecido, com grande possibilidade de perder informações

relativas à mineralização e à localização de recentes neoformações ósseas (YANG et al., 2003). Outra desvantagem importante desta técnica é a dificuldade de análise biológica entre o tecido receptor e um biomaterial, principalmente de origem cerâmica e/ou metálica, com alta resistência à corrosão, o que impossibilita a realização de cortes pelo método convencional.

A utilização da técnica de embebição em resina acrílica com metilmetacrilato (MMA) para análise de tecido ósseo foi descrita por SCHENK (1965) e BURKHARDT (1966). Apesar dessa técnica ser amplamente utilizada, principalmente em pesquisas para avaliação de osteointegração e neoformação óssea (KOO et al., 2006, ALLEGRINI et al., 2006), as análises para a identificação de proteínas (imunoistoquímicas *in situ*) são extremamente complexas, pois a falta de porosidade da resina não permite a passagem do anticorpo para o interior do tecido e, assim, a reação não se estabelece.

A ativação do NF- κ B está relacionada à relevância que esta endonuclease tem na resposta imunológica do tecido ósseo e sua participação no processo inflamatório, sendo considerado um sensor de estresse (ARRIGO, 1999; SEN e PACKER, 1996; CHABOT et al., 1998; SCHRECK et al., 1992; BUNN e POYTON, 1996; CARTER et al., 1998; MEISTER, 1998). Sua ativação provoca a indução de citocinas pró-inflamatórias, podendo provocar a morte, multiplicação ou diferenciação celular (LI e STARK, 2002; DOLCET et al., 2005; MOYNAGH, 2005; YAMAMOTO e GAYNOR, 2004; KUMAR et al., 2004; AGGARWAL, 2004; PERKINS, 2004; RAVI e BEDI, 2004). Esta endonuclease também já foi descrita como um dos fatores responsáveis pela osteoporose (AHN e AGGARWALL, 2005).

b) Grupos *Curva de Ativação e Irrigado*

Estes três experimentos foram agrupados com o propósito de discutir a dinâmica de ativação do NF- κ B pela cortical óssea. Para isto, é necessário lembrar a teoria do fluxo do fluido, já apontada anteriormente no capítulo introdutório, proposta por Wolff, no século XIX (BERTRAN e SWARTZ 1991), a qual indica que o fluxo do fluido no interior da rede de canalículos pode estimular a sinalização dos osteócitos que, trabalhando em conjunto, podem influenciar na remodelação óssea (MARK et al., 2000). É oportuno lembrar também a teoria do *shear stress* ou estresse de cisalhamento, aplicada normalmente em estudos referentes à vascularização, que diz que a pressão do fluxo sanguíneo exercida sobre a parede vascular ou celular pode promover alterações funcionais e/ou morfológicas e estas deformações podem desencadear inúmeras respostas biológicas, adaptando o tecido a uma nova condição (TURNER et al., 1994).

É amplamente considerado na literatura que a ativação do NF- κ B está relacionada ao sistema imune, ao processo de sinalizações das citocinas próinflamatórias, como as IL-1, IL-6 e TNF- α , quimiocinas (IL-8, proteína inflamatória de macrófagos-1 α [*macrophage inflammatory protein-1 α*] {MIP-1 α }) e moléculas de adesão, como a molécula vascular de adesão-1 e molécula de adesão intercelular-1 (*vascular cell adhesion-1* [VCAN-1], *intracellular cell adhesion molecule-1* [ICAM-1]); e à diferenciação de osteoclastos (JIMI e GHOSH, 2005). A regulação da osteoclastogênese (diferenciação do macrófago em osteoclasto) depende da presença de osteoblastos e é modulada por uma quimiocina chamada de fator de estimulação das colônias de macrófagos (*macrophage colony stimulating factor* M-CSF), e do ligante do receptor de

ativação do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- κ B) (RANKL) (KARST et al, 2004). Este ligante (RANKL) liga-se ao receptor RANK, localizado na membrana dos osteoblastos, estimulando a síntese de M-CSF e a posterior diferenciação para osteoclastos. O ligante RANKL é uma proteína que, ao se ligar ao receptor ativador da NF- κ B (RANK), inicia o processo de diferenciação dos macrófagos em osteoclastos.

A imunorreatividade positiva do NF- κ B em osteócitos nos animais foi observada por toda a cortical óssea nesse trabalho, o que pode indicar que esta última tem um papel significativo no processo de remodelação e reparação óssea, atuando como um gestor dos processos fisiológicos que estão envolvidos na remodelação e no reparo do tecido ósseo lesado, modulando a reabsorção realizada pelos osteoclastos, bem como a neoformação proporcionada pelos osteoblastos. Existe, assim, uma ligação biofísica entre os osteócitos e os osteoblastos, promovida por uma junção comunicante (*gap junctions*) (TAYLOR et al., 2007).

Talvez estas observações indiquem a existência de um “gatilho” para o estresse, isto é, a partir de um determinado estímulo há uma propagação do sinal que se estende e se concentra na região do joelho (o que foi observado nesse trabalho). Estatisticamente, observou-se nestes dois grupos (controle e irrigado) uma similaridade dos resultados, principalmente na região da articulação do joelho. As correlações clínicas serão analisadas posteriormente.

Finalmente, a disposição helicoidal da imunorreatividade positiva observada na Figura 26, avaliada nesse trabalho, pode estar diretamente ligada à morfologia dos canalículos que, coincidindo com a maneira helicoidal da disposição das

lamelas que proporcionam um embricamento mecânico entre os sistemas lamelares (GARTNER et al., 1999).

Até o momento, discutiu-se as várias hipóteses relativas aos possíveis mecanismos que envolvem a propagação da imunorreatividade positiva para NF-kB por toda a cortical óssea. Não obstante aos interesses acadêmicos encontrados neste trabalho, deve-se agora correlacionar estas observações com a clínica.

Correlações Clínicas:

As hipóteses levantadas podem explicar, pelo menos em parte, algumas patologias idiopáticas, principalmente as relacionadas às articulações e processos inflamatórios, já que o NF-kB a eles está diretamente ligado, como também à apoptose e à proliferação celular. A propagação pela cortical pode estimular a formação de um processo inflamatório na região articular. Como foi visto anteriormente, a osteoclastogênese depende da presença de osteoblastos, sendo modulada pelos fatores de estimulação das colônias de macrófagos e pelo sistema RANKL/RANK (KARST et al., 2004).

Outra correlação clínica que podemos fazer é referente a imagem próxima a um triângulo com base voltada para a região cortical em torno de alguns implantes figura 35. Essa disposição característica é chamada pelos implantodontistas de salcerização, que está relacionada a uma perda óssea em forma de pires (ou cálice). Normalmente, esse fenômeno é observado em radiografias periapicais e panorâmicas, comumente em regiões onde houve um aquecimento inapropriado do tecido ósseo, mais frequentemente notada em mandíbula, onde o tecido ósseo é mais resistente, ou em outras regiões, quando há falha na técnica cirúrgica

operatória como: deficiência na irrigação ou força excessiva durante a perfuração para a confecção do leito cirúrgico (GEHRKE et al, 2006). Esta imagem triangular indicando uma imunorreatividade positiva para a NF-kB, pode estar relacionada à perda óssea descrita anteriormente, já que a ativação desta endonuclease está diretamente relacionada aos processos moleculares de ativação dos osteoclastos e reabsorção óssea (CANHÃO et al. 2006).

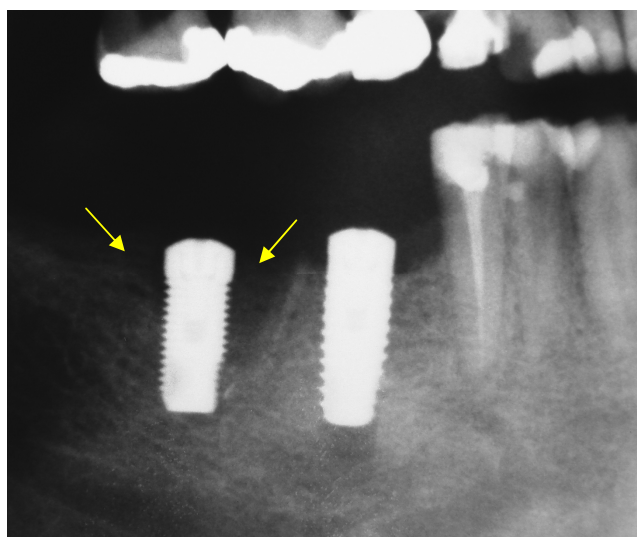


Figura 35: Radiografia demonstrando perda óssea 30 dias após a colocação do implante (setas).

c) Grupo resveratrol

Pensando neste aspecto, seria bastante interessante aproveitar o potencial contido no início do processo inflamatório/reparativo e direcioná-lo para um tecido organizado, já que a cicatrização do tecido lesado é definida nos estágios iniciais do processo de reparo (KHODR e KHALIL 2001).

Em uma visão conservadora, os radicais livres produzidos após um trauma cirúrgico ou acidental levam ao dano e posteriormente à morte celular. Porém, trabalhos recentes indicam que os radicais livres podem regular a sinalização

intracelular (SEN e PACKER. 2002; RHEE et al., 2000), sendo considerados como segundos mensageiros, em biologia molecular (DROGE. 2002, GRIENGLING. 2000). O equilíbrio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o dano que estas possam causar estão relacionados à proteção antioxidante do tecido lesado. A relação entre trauma, dano e adaptação celular é extremamente curta, e a estratégia de controle do balanço redox pode constituir um meio efetivo no processo de reparo (SEM, 2003).

A adição de antioxidantes em materiais de enxertia óssea, com a finalidade de reduzir a ação deletéria dos radicais livres sobre os tecidos lesados, tem sido uma boa ferramenta para a redução do processo inflamatório local (SCHUBERT et al., 1996; UDIPI e ORNBERG, 2000).

Porém, a segurança de uma ossificação organizada não está garantida apenas pelo controle da produção de radicais livres no local da lesão. Os elementos da matriz extracelular (ECM) têm grande importância na calcificação da matriz óssea. Foi demonstrado, há mais de 50 anos, que o cálcio e o fosfato podem se precipitar de forma passível sobre o colágeno (GLIMCHER et al., 1957). Não obstante, o aumento da possibilidade de uma ossificação pode estar relacionado a ausências de inibidores de mineralização na matriz, como relata Karsenty (1999).

A resultante destes processos descritos anteriormente é a redução do estresse oxidativo e, conseqüentemente, a diminuição da ativação do NF- κ B, como visto nesse trabalho. Os dados estatísticos apontam uma redução significativa nas posições e regiões próximas a lesão cirúrgica, indicando uma efetiva participação do resveratrol nesse processo. Esta redução da ativação do

NF- κ B pode estar diretamente ligada às propriedades dessa substância frente aos processos inflamatórios e a sua estimulação celular (BÄCKESJÖ et al,2006; LEI et al, 2008).

Correlações clínicas:

As possíveis aplicações clínicas desse material não estão só ligadas à enxertia óssea, pois o mesmo também pode ter aplicação na proteção outros tecidos lesados. Porém, como podemos verificar, sua ação é bastante efetiva nas proximidades da lesão, o que nos leva a pensar que para uma ação ainda melhor e mais duradoura seria necessário fixar ou encapsular o resveratrol para uma liberação controlada.

5.1.4 Discussão dos resultados com a injeção de marcadores de crescimento ósseo em diferentes períodos

Conforme pode-se verificar nas fotomicrografias de fluorescência, os resultados foram semelhantes aos obtidos no estudo piloto, onde ocorreram uma formação de tecido ósseo muito mais efetiva no grupo quando o *resveratrol* participou do processo de enxertia.

A sequência de marcadores ósseos (Polifluorocromáticos) é uma importante ferramenta para identificar o osso neoformado após enxertos ou inserção de implantes (KÖNIG JR et al., 2010). Esses marcadores indicam o lugar, o tempo e a quantidade de deposição óssea, reforçando as informações obtidas através das amostras coletadas (RAHN, 2003).

Foram usados como marcadores polifluorcromáticos uma sequência de alizarina, calceína e tetraciclina nesse estudo. As cores que foram detectadas com esses marcadores estão de acordo com relatos prévios de Haider et al. (1993).

As imagens demonstram que houve uma deposição óssea muito maior nas amostras do grupo com resveratrol que nas amostras dos outros dois grupos controle. O novo osso teve uma maturação conforme avaliado pela intensidade da fluorescência. A presença dos grânulos no grupo controle 2 confirma que o osso bovino tem uma capacidade osteocondutiva, mas não osteoindutiva.

5.1.5 Considerações finais

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, fica clara a efetiva participação do resveratrol na estimulação da neoformação óssea quando associado à biomateriais osteocondutores, onde podemos observar que além do estímulo que este promove sobre a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, comprovado por diferentes autores, podemos comprovar que a substância atua na redução da ativação do NF-κB em cortical óssea, como indicam os resultados estatísticos e experimentais e que foi o objetivo inicial desse trabalho.

No entanto, os demais resultados apresentados e discutidos, também neste trabalho, que inicialmente poderiam justificar a aplicação ou não do resveratrol em seres humanos, tornaram-se tão ou mais importantes do que o objetivo inicial. Foi observada uma ativação do NF-κB por toda a cortical óssea dos animais, não se limitando à região do trauma, mas propagando-se por toda a cortical, aumentando na região do joelho. É claro que este estudo avaliou apenas uma pequena parte

deste processo, mas pela relevância desta endonuclease, que tem uma participação ativa no sistema imune, e também em especial na diferenciação de osteoclastos pelo sistema RANK/RANKL, a mesma pode ser um importante indicativo em processos degenerativos, e seu controle fisiológico uma ferramenta para controlar tais processos.

6 CONCLUSÕES

De acordo com o que foi verificado nesse trabalho e com os objetivos iniciais, pode-se concluir que:

- 1- o resveratrol pode influenciar o processo de reparação óssea, aumentando significativamente a qualidade da resposta;
- 2- o resveratrol pode modular o NF-kB quando aplicado *in loco* nos processos ósseos;
- 3 – pelos resultados obtidos pode-se verificar que o controle do trauma cirúrgico está diretamente relacionado com a qualidade e quantidade de resposta do tecido ósseo;
- 4 – a quantidade de resveratrol adicionada a um material osteocondutor deve ser equilibrada e quantificada para a obtenção de resultados adequados.

7 ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

Emissão de Parecer
25/2008

Nº Processo:	23081.006154/2008-13
Título:	Avaliação in vivo dos efeitos do Reservatrol nos processos de neoformação e crescimento de tecidos ósseo.
Pesquisador Responsável:	Prof. Dr. Paulo Cícero da Nascimento e Sergio Alexandre Gerke.
Instituição:	UFSM
Área:	Departamento de Química - QMC
Data de Entrada:	02.05.2008
Data do Parecer:	05.05.2008

Termo de compromisso com o bem estar animal:

- Termo de compromisso assinado pelo Coordenador e outros executores do projeto
 Termo de compromisso assinado pelo Coordenador se responsabilizando pelos demais executores do projeto
 Termo de compromisso assinado unicamente pelo Coordenador
 Termo de compromisso ausente no processo

Adequação e relevância do projeto:

- Problema científico relevante
 Hipótese adequada
 Objetivos relevantes
 Metodologia adequada

Caráter do projeto/ Linha de pesquisa quanto aos resultados esperados e benefícios potenciais, para a área em estudo e/ ou setores de aplicação da sociedade brasileira:

- Inovador / novo conceito
 Incremental (novas informações)
 Confirmatório
 Pouco relevante

Necessidade da utilização de animais na experimentação:



- O projeto necessita de animais para responder a pergunta científica
 O projeto não necessita de animais e pode ser realizado com metodologia in vitro ou similar

48 Coelhos

Análise do número de animais a ser utilizado no projeto:

- Adequado
 Inadequado

Base científica para classificar como inadequado e sugestão do número de animais que deverá ser utilizado:

Currículo do pesquisador em relação à área de abrangência do projeto:

- Adequado
 Inadequado

Avaliação global do projeto:

- Aprovado
 Aprovado com ressalva _____

- Reprovado (a proposta não está de acordo com a ética e bem estar animal)

Detalhe os pontos relevantes que o(a) levaram a avaliar negativamente o projeto:

Santa Maria, 05 de maio de 2008.

Declaramos que o projeto "Avaliação in vivo dos efeitos do Reservatrol nos processos de neoformação e crescimento de tecidos ósseo." registrado no Comitê de Ética e Bem Estar Animal sob número 23081.006154/2008-13, coordenado pelo pesquisador Prof. Dr.Sergio Alexandre Gerke, cumpriu todas as exigências em relação ao Bem Estar Animal.

Prof. Tales de Moura Branda
Presidente do Comitê de Ética e Bem Estar Animal

OBSERVAÇÃO: ENTREGAR RELATÓRIO AO FINAL DA EXECUÇÃO AO TÉRMINO DO PROJETO.

Referências Bibliográficas

AGGARWAL BB. Nuclear factor- κ B: The enemy within. *Câncer Cell*, 2004, 6:203-208.

AHMAD KA, CLEMENT MV, HANIF IM, PERVAIZ S. Resveratrol inhibits drug-induced apoptosis in human leukemia cells by creating an intracellular milieu nonpermissive for death execution. *Cancer Res* 2004; 64: 1452-1459.

AHN KS, AGGARWALL BB. Transcription factor NF- κ B: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci*. 2005, Nov;1056: 218-33.

ALLEGRINI JR S, RUMPELB E, KAUSCHKEB E, FANGHANELB J, KONIG JR B. Hydroxyapatite grafting promotes new bone formation and osseointegration of smooth titanium implants. *Ann Anat* 188:143—151, 2006.

ANDERSON, M.T; STAAL, F.J; GILTER C;HERZENBERG, L.A. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF- κ B signal transduction pathway *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v. 91, p. 11527–11531; 1994.

ARRIGO, A.P. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med*. 27, p. 936–944, 1999.

BÄCKESJÖ CM, LI Y, LINDGREN U, HALDOSÉN LA. Activation of Sirt1 Decreases Adipocyte Formation During Osteoblast Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *J Bone Miner Res*, 2006: 993-1003.

BAUR JA, PEARSON KJ, PRICE NL, JAMIESON HA, LERIN C, KALRA A, PRABHU VV, ALLARD JS, LOPEZ-LLUCH G, LEWIS K, PISTELL PJ, POOSALA S, BECKER KG, BOSS O, GWINN D, WANG M, RAMASWAMY S, FISHBEIN KW, SPENCER RG LAKATTA EG, LE COUTEUR D, SHAW RJ, NAVAS P, PUIGSERVER P, INGRAM DK, DE CABO R, SINCLAIR DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 444(7117): 337-42.

BERTRAM, J. E. A; SWARTZ, S. M. The law of bone transformation: a case of crying Wolff? *Biol. Rev.*v. 66,p.245-273, 1991.

BLAND YS, CRITCHLOW MA, ASHHURST DE. The expression of the fibrillar collagen genes during fracture healing: heterogeneity of the matrices and differentiation of the osteoprogenitor cells. *Histochem. J.* 31, 797–809, 1999.

BLOKHUIS TJ, WIPPERMANN BW, DEN BOER FC, VAN LINGEN A, PATKA P, BAKKER FC, HAARMAN HJ. Resorbable calcium phosphate particles as a carrier

material for bone marrow in an ovine segmental defect. *J Biomed Mater Res.* 2000 Sep 5;51(3):369-75.

BOURQUE WT, GROSS M, HALL BK. A histological processing technique that preserves the integrity of calcified tissues (bone, enamel), yolky amphibian embryos, and growth factor antigens in skeletal tissue. *J Histochem Cytochem* 1993 Sep; 41(9):1429-34.

BOWERS GM, CHADROFF B, CARNEVALE R, MELLONIG J, CORIO R, EMERSON J, STEVENS M, ROMBERG E. Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part II. *J Periodontol.* 1989 Dec; 60(12): 675-82.

BUNN, H.F.; POYTON, O.R. Oxygen sensing and the molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev.* v.76, p.839–885; 1996.

BURKHARDT, R. [Preparative prerequisites in clinical histology of human bone marrow. 1.Methodical studies on embedding in acrylates of lipid-rich tissue material] *Blut.* v. Sep;13(6), p. 337-57, 1966.

BUSER D, DAHLIN C, SCHENK RK. *Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia.* 1ed., São Paulo: Ed. Quintessence; 1996.

CARBONARI M; LUDTKE J; DOS SANTOS PCV; CARVALHO NTA; GEHRKE SA. Caracterização físico-química e biológica de enxerto ósseo bovino, Bonefill, em bioensaios – Parte 1. v. 7(1):103-10, 2010.

CARTER, A.B.; MONICK, M.M.; HUNNINGHAKE, G. Lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and cytokine release in human alveolar macrophages is PKC-independent and TK- and PC-PLC-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol.* v. Mar;18(3), p.384-91, 1998.

CANHAO, H.; FONSECA, J.E.; QUEIROZ, M.V. [Eating habits and life styles in a Portuguese population--protective and risk factors for osteoporosis] *Acta Reumatol Port.* v.Oct-Dec;31(4), p.331-9, 2006.

CHAPPARD D, PALLE S, ALEXANDRE C, VICO L, RIFFAT G. Bone embedding in pure methyl methacrylate at low temperature preserves enzyme activities. *Acta Histochem.* 1987; 81(2):183-90.

CHEN D; ZHAO M; MUNDY GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* Dec;22(4):233-41, 2004.

DAI Z, LI Y, QUARLES LD, SONG T, PAN W, ZHOU H, XIAO Z. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine* 2007:0.

DOLCET X, LLOBET D, PALLARES J, MATIAS-GUIU X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005 May; 446(5): 475-82

DONATH K, LAASS M, GUNZL HJ. The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 420(2):131-7.

DONATH K, BREUNER G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol*. 1982 Aug; 11(4):318-26.

DOS SANTOS LA, DE OLIVERIA LC, RIGO EC, CARRODEGUAS RG, BOSCHI AO, DE ARRUDA AC. Influence of polymeric additives on the mechanical properties of alpha-tricalcium phosphate cement. *Bone*. 1999 Aug;25(2 Suppl):99S-102S.

DROGE, W. Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol Rev*. v. 82: 47-95, 2002.

ELLIS III E. Treatment methods for fractures of the mandibular angle. *J Craniomaxillofac Trauma*. 1996 Spring; 2(1): 28-36.

FORWOOD, M.R. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *J.Bone Miner. Res* 1996; 11: 1688-1693.

FRANZEN A, HEINEGARD D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem. J*. 232, 715–724, 1985.

GARBIN CM, GARBIN NM. *Enxertos Ósseos e Regeneração Tecidual Guiada: Noções Básicas*. 1ª. ed. São Paulo: Ed. Pancast; 1994.

GARDNER TN, MISHRA S, MARKS L. The role of osteogenic index, octahedral shear stress and dilatational stress in the ossification of a fracture callus. *Med Eng Phys* 2004 Jul; 26(6):493-501.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. *Tratado de Histologia em Cores*. 1. Edição. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 1999.

GEHRKE SA; EMBACHER A; KÖNIG JR B. *Bases Clínicas e Cirúrgicas da Implantodontia*. 1ª. Edição. Santa Maria: Ed Bioface, 2006.

GEHRKE SA, KÖNIG JR B, BECK MARTINS NM. Use of a bone regeneration cement for bone grafting in atrophic areas - Clinical, radiographic and histological analysis. *Implants; issue 1;24-30, 2009.*

GEHRKE SA; ROSSI JR R; KÖNIG JR B. Implantodontia – Fundamentos Clínicos e Cirúrgicos. 1ª. Edição. Santa Maria: Ed Bioface, 2005.

GLIMCHER, M.J.; HODGE, A.J.; SCHMITT, F.O. Macromolecular aggregation states in relation to mineralization: the collagen-hydroxyapatite system as studied in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. v. 43, p. 860-6; 1957.*

GRIENDLING, K. K.; SORESCU, D.; LASSEGUE, B.; USHIO-FUKAI, M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thomb Vasc Biol. v. 20, p. 2175-2183. 2000.*

HADDAD JJ, LAND SC, TARNOW-MORDI WO, ZEMBALA M, KOWALCZYK D, LAUTERBACH R Immunopharmacological potencial of selective phosphodiesterase inhibition II. Evidence for the involenment of na inhibitory-kappaB/nuclear factor-kappaB-sensitive pathway alveolar epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ter 2002 Feb; 300(2): 567-76.*

HAIDER, R., WATZEK, G., PLENK, H. Effects of drill cooling and bone structure on IMZ implant fixation. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants 8, 83–91, 1993.*

HAUSCHKA P, LIAN J, COLE D, GUNDBERG C, Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev. 1989; 69: 990-1047.*

HIROTA, K.; MATSUI, M.; MURATA, M.; TAKASHIMA, Y. CHENG, F.S.; ITOH, T.; Nucleoredoxin, Glutaredoxin, and Thioredoxin Differentially Regulate NF-κB, AP-1, and CREB Activation in HEK293 Cells .*Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 274, p. 177–182, 2000.*

HSIEH HJ, LI NQ, FRANGOS JA. Shear stress increases endothelial platelet, dereved grow factor mRNA level *Am.J.Physiol 1991; 260: 642-646.*

HUNG, C. T. ALLEN, F.D; POLLACK, S.R.; BRIGHTON, C. T. Intra-celllar Ca²⁺ are required in the real-time Ca²⁺ response of bone cell experiencing fluid flow. *J.Biomech 1996; 29:1411-1417.*

JANG M, CAI L, UDEANI GO, SLOWING KV, THOMAS CF, BEECHER CW, FONG HH, FARNSWORTH NR, KINGHORN AD, MEHTA RG, MOON RC, PEZZUTO JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science 1997; 275: 218–220.*

JIMI, E.; GHOSH, S.; Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol Rev. v.Dec;08, p. 80-7, 2005.*

JUNQUEIRA ULC. JUNQUEIRA SSML. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. 1º ed. Santos: Ed. Santos; 1984.

KARST, M.; GORNY, G.; GALVIN, R.J.; OURSLER, M.J. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF-beta regulation of osteoclast differentiation. *J Cell Physiol.* v. Jul;200(1), p. 99-106, 2004.

KARSENTY G. Bone formation and factors affecting this process. *Matrix Biology* 2000; 19:85-89.

KASSEM M, KVEIBORG M, ERIKSEN EF. Production and action of transforming growth factor-B in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation and modulation by calcitrol. *European J of Clinical Investigation* 2000; 30: 429-437.

KHODR B, KHALIL Z. Modulation of inflammation by reactive oxygen species: implications for aging and tissue repair. *Free Radic Biol Med.* v. Jan 1;30(1), p.1-8, 2001.

KÖNIG JR, B. Implantodontia e osteointegração: quanto à pesquisa em cerâmicas, aplicações e outros materiais. 1ª. Ed., Editora Roca. São Paulo, 2009.

KÖNIG JR, B; BECK, TJ; KAPPERT, HF; KAPPERT, CC; MASUKO, TS. A study of different calcification areas in newly formed bone 8 weeks after insertion of dental implants in rabbit tibias. *Anat. Anz.* 180, 471–475, 1998.

KOO, S.; KONIG, B. JR.; ALLEGRINI, S. JR.; YOSHIMOTO, M.; CARBONARI, M.J.; MITRI-LUIZ, F.F. Titanium implant osseointegration with calcium pyrophosphate in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* v. Feb;76(2), p. 373-80, 2006.

KUMAR, A.; TAKADA, Y.; BORIEK, A.M.; AGGARWAL, B.B. Nuclear factor-κB: its role in health and disease. *Journal of Molecular Medicine.* v.82, p. 434-448, 2004.

LAWTON, D.M., ANDREW, J.G., MARSH, D.R., HOYLAND, J.A., FREEMONT, A.J. Mature osteoblasts in human non-union fractures express collagen type III. *Mol. Pathol.* 50, 194–197, 1997.

LACROIX P. Organizers and the Growth of Bone. *J Bone Joint Surg Am* 1947; 29(2): 292.

LAGOUGE M, ARGMANN C, GERHART-HINES Z, MEZIANE H, LERIN C, DAUSSIN F, MESSADEQ N, MILNE J, LAMBERT P, ELLIOTT P, GENY B, LAAKSO M, PUIGSERVER P, AUWERX J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1α. *Cell* 2006; 127: 1109–1122.

LANE, J.M.; SANDHU, H.S. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.* 1987 Apr;18(2):213-25.

LANYON LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling remodeling. *Calcif.Tissue Int* 1993; 53: S102-107.

LEAN JM, JAGER TJ, CHAMBERS TJ, CHOW JW. Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stress. *Am. J. Physiol* 1995; 268: E318-327.

LEES S. Mineralization of type I collagen. *Biophys. J.* 85, 204–207, 2003.

LEI M, LIU SQ, LIU YL. Resveratrol protects bone marrow mesenchymal stem cell derived chondrocytes cultured on chitosan-gelatin scaffolds from the inhibitory effect of interleukin-1 β . *Acta Pharmacologica Sinica* (2008) 29, 1350–1356.

LI X, STARK GR. NF κ B-dependent signaling pathways. *Experimental Hematology* 2002; 30: 285-296.

LINDHE J, KARRING T, LANG NP. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral. 4^a ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2003.

MARK AFT, QIN L, HUNG LK, CHENG CW, TIN CFF. A histomorphometric observation of flows in cortical bone under dynamic loading. *Microvasc. Res.* 2000; 59:290-300.

MASSART DL; VANDEGINSTE BGM; DEMING SN; MICHOTTE Y; KAUFMAN L. Chemometrics: a textbook. 1. Ed. New York: Elsevier, 1988.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* v.263, p. 17205–17208, 1988.

MICHAN S, SINCLAIR D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 2007; 404(1):1-13.

MENG Y, MA QY, KOU XP, XU J. Effect of resveratrol on activation of nuclear factor kappa-B and inflammatory factors in rat model of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11(4): 525-528.

MISCH CE. Implantes Dentários Contemporâneos. 2.ed. São Paulo: Ed. Santos, 2000.

MIZUTANI K, IKEDA K, KAWAI Y, YAMORI Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. - *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 253: 859-863.

MOYNAGH PN. The NF- κ B pathway. *Journal of cell Science*, 2005; 118: 4389-4392.

MUNDAY, R; WINTERBOUM, C.C. Reduced glutathione in combination with superoxide dismutases as an important biological antioxidant defense mechanism. *Biochem. Pharmacol* 1989; 38: 4349-4352.

NOMURA N, TAKANO Y. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Mat. Biol.* 2000; 19: 91-96.

OLDENBERG A, FRAZÉM A, HEINEGARD D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals a Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 8819-8823.

PAN W, QUARLES LD, SONG LH, YU YH, JIAO C, TANG HB, JIANG CH, DENG HW, LI YJ, ZHOU HH, XIAO ZS. Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. *J Cell Biochem.* 2001, Feb 1; 94(2): 307-16.

PERKINS ND. NF- κ B: tumor promoter or suppressor/ *Trends in Cell Biology* 2004; 14(2): 64-69.

PITSILLIDES AA, RAWLINSON SC, SUSWILLO RF, BOURRIN S, ZAMAN G, LANYON LE. Mechanical strain-induce NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone remodeling. *FASEB J* 1995; 9: 1614-162.

QU Q, PERALA-HEAPE M, KAPANEN A, DAHLLUND J, SALO J, VAANANEN HK, HARKONEN P. Estrogen Enhances Differentiation of Osteoblasts in Mouse Bone Marrow Culture. *Bone* 1998 march; 22(3): 201-209.

RAHN BA. Fluorochrome labelling of bone dynamics. *Eur. Cells Mater.* 5 (Suppl. 2), 41, 2003.

RAHMAN, I. Regulation of nuclear factor- κ B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor- α and dexamethasone in alveolar epithelial cells *Biochem. Pharmacol.* v. 60, p. 1041–1049; 2000.

RAVI R, BEDI A. NF κ B in cancer-a friend turned foe. *Drug Resistance Updates*, 2004; 7: 53-67.

RAWLINSON S, EL-HAJ A, J MINTER SL, TAVARES IA, BENETT A, LANYON LE. Loading-related increases in prostaglandin production in cores of adult canine cancellous bone in vitro: a role prostacyclin in adaptive bone remodeling. *J. Bone Miner. Res.* 1991; 6: 1345-1351.

RHEE, S.G.; BAE, Y.S.; LEE, S.R.; KWON, J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci. Stke. [Electronic Resource]* E1; 2000.

ROACH, H. I. Trans-differentiation of hypertrophic chondrocytes into cells capable of producing a mineralized bone matrix. *Bone Miner.Res.* v.19, p. 1-20; 1992.

SAUVE AA, WOLBERGER C, SCHRAMM VL, BOEKE JD. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem.* 2006; 75: 435-65.

SATO M, OCHI T, NAKASE T. *et al.* Mechanical tension-stress induces expression of BMP2 and-4, but not BMP-6, -7 and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 1999; 14: 1084-1095.

SATO M, YASUI N, NAKASE T, KAWAHATA H, SUGIMOTO M, HIROTA S, KITAMURA Y, NOMURA S, OCHI T. Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. *J Bone Miner. Res.* 1998; 13: 1221-1231.

SCHENK RK, OLAH AJ. What is osteomalacia? *Adv Exp Med Biol.* 1980; 128: 549-62.

SCHUCHMANN, M.; GALLE, P.R. Dead or alive- NFkB, the guardian which tips the balance. *Journal of Hepatology* , v. 36, p. 827-828, 2002.

SCHUBERT, M. A.; WIGGINS, M. J.; DEFIFE, K. M.; HILTNER, A.; ANDERSON, J. M. Vitamin E as an antioxidant for poly(etheryrethane urea): in vivo studies. In: *Jornal of Biomedical Materials Reserch*, v. 32, p. 493-504, 1996.

SEN C. K. The general case for redox control of wound repair. *Wound Rep. Reg.* v. 11, p. 431-438, 2003.

SEN, C.K., PACKER, L. Redox cell biology and genetics. Part A. New York: Academic Press, 2002.

SHISHODIA, S. & B.B. AGGARWAL. 2004. Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer? *Biochem. Pharmacol.* **68**: 1071–1080.

SIGURDSSON T, HARDWICK R, BOGLE G, WIKESJO U. Peridodontal repair in dogs: Space provision by reinforced ePTFE membranes enhances bone and cementum regeneration in large supraalveolar defects. *Journal Periodontology* 1994; 65: 350-356.

TAYLOR, A.F.; SAUNDERS, M.M.; SHINGLE, D.L.; CIMBALA, J.M.; ZHOU, Z.; DONAHUE, H.J. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol.* v. Jan;292(1), p. C545-52. Epub 2006 Aug 2, 2007.

TEN CATE AR. *Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2001.

TRIFFITT JT. Initiation and enhancement of bone formation. A review. *Acta Orthop Scand*. 1987 Dec; 58(6): 673-84.

TURNER, C.H.; FORWOOD, M.R.; OTTER, M.W.: *Mechanotransduction in bone: Do bone cells act as sensors of fluid flow?* *FASEB J*. v. 8, p. 875-878, 1994.

UDIPI, K.; ORNBERG, R.L.; THURMOND II, B.K.; SETTLE, S.T.; FORSTER, D.; RILEY, D. Modification of inflammatory response to implanted biomedical materials in vivo by surface bound superoxide dismutases mimics. *Biomed. Mater. Res*, v. 51, p. 549-560, 2000.

URIST MR, HUDAK RT, HUO YK, RASMUSSEN JK. Osteoporosis: a bone morphogenetic protein auto-immune disorder. *Prog Clin Biol Res*. 1985a; 187: 77-96.

URIST MR, NILLSSON OS, HUDAK R, HUO YK, RASMUSSEN J, HIROTU W, LIETZE A. Immunologic evidence of a bone morphogenetic protein in the milieu interior. *Annales de Biologie Clinique (Paris)* 1985b; 43: 755-766.

ZÉTOLA A; SHIBLI JA; JAYME SJ. *Implantodontia Clínica – Baseada em Evidências Científicas – ABROSS*. 1ª. ED, Ed. Quintessence. São Paulo, 2010.

WANG LX, HEREDIA A, SONG H, ZHANG Z, YU B, DAVIS C, REDFIELD R. Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *J Pharm Sci*. 2004; 93(10):2448-57.

YAMAMOTO Y, GAYNOR RB. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends Biochem Sci*. 2004 Feb; 29(2):72-9.

YANG Y, SHARMA A, SHARMA R, PATRICK B, SINGHAL SS, ZIMNIAK P, AWASTHI S, AWASTHI YC. Cells preconditioned with mild, transient UVA irradiation acquire resistance to oxidative stress and UVA-induced apoptosis: role of 4-hydroxynonenal in UVA-mediated signaling for apoptosis. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17; 278(42): 41380-8.

YASUI N, SATO M, OCHI T, Kimura T, Kawahata H, Kitamura Y, Nomura S. Three modes of ossification during osteogenesis in the rat. *J Bone Jt. Surg. Br*. 1997; 79: 824-830.

ZÁRATE-KALFÓPULOS B, REYES-SÁNCHEZ A. Bone grafts in orthopedic surgery. *Cir Cir*. 2006 May-Jun; 74(3):217-22.