

TATIANA MEULMAN LEITE DA SILVA



1290004246

TCE/UNICAMP  
M571a  
FOP

## ANGIOGÊNESE E REGENERAÇÃO PERIODONTAL

Monografia apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da Universidade  
Estadual de Campinas, como requisito para  
obtenção do título de Especialista em  
Periodontia.

PIRACICABA  
2007

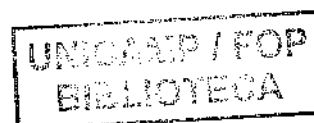
TATIANA MEULMAN LEITE DA SILVA

ANGIOGÊNESE E REGENERAÇÃO  
PERIODONTAL

Monografia apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da Universidade  
Estadual de Campinas, como requisito para  
obtenção do título de Especialista em  
Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto  
Nociti Junior

PIRACICABA  
2007



Unidade - FOP/UNICAMP

TCE/UNICAMP

1154133 Ed.

Vol. .... Ex. ....

Tombo 4246

C ☐ D ☒

Proc. 16-148/2009

Preço R\$ 11,00

Data 22-10-09

Registro 471088

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

~~8138a~~

*Meulman, Tatiana Leite Bertoloni*  
Silva, Tatiana Meulman Leite da.

Angiogênese e regeneração periodontal. / Tatiana Meulman  
Leite da Silva. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.  
52f.

Orientador: Francisco Humberto Nociti Junior.  
Monografia (Especialização) – Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontia. 2. Ossos - Regeneração. 3. Angiogênese. 4.  
Substancias de crescimento. I. Nociti Junior, Francisco Humberto.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Dedico esse trabalho à minha família,  
que sempre apoiou todas as minhas  
escolhas na vida profissional e pessoal  
Ao Rodrigo, que é uma pessoa muito  
especial e importante na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Aos professores Enilson A. Sallum, Márcio Z. Casati, Edwil, Jorge e Vinícius pelos ensinamentos importantes para minha formação como especialista, mas também pelas experiências de vida e conselhos de amigos divididos com todos os alunos.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, onde tive a oportunidade de dar um importante passo na minha vida profissional, desde a minha formação no curso de graduação e agora no curso de especialização.

Ao Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior, que prestou preciosas informações e orientações para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos do curso pelos bons momentos compartilhados nesses dois anos.

As minhas amigas desde a época de graduação Letícia, Flávia, Débora e Andréa por mais dois anos de convivência.

À Letícia, minha grande amiga e irmã aqui de Piracicaba, você estará sempre no meu coração.

## SUMÁRIO

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumo                                                                               | 07 |
| Abstract                                                                             | 09 |
| 1. Introdução                                                                        | 11 |
| 2. Desenvolvimento                                                                   | 13 |
| 2.1 Cicatrização X Regeneração Periodontal                                           | 13 |
| 2.2 Angiogênese                                                                      | 16 |
| 2.3 Fatores de Crescimento relacionados<br>à Angiogênese e a Regeneração Periodontal | 22 |
| 2.3.1 Fator de Crescimento do Endotélio Vascular – VEGF                              | 22 |
| 2.3.2 Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos – FGFb                             | 27 |
| 2.3.3 Fator de Transformação de Crescimento $\beta$ – TGF- $\beta$                   | 29 |
| 2.3.4 Fator de Crescimento derivado de Plaquetas-PDGF                                | 31 |
| 2.3.5 Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMP)                                          | 33 |
| 3. Conclusão                                                                         | 35 |
| 4.Referência Bibliográfica                                                           | 36 |

## Resumo

A regeneração dos tecidos periodontais é o objetivo final do tratamento periodontal (Egelberg, 1987), no entanto o que ocorre é a cicatrização como resultado do fenômeno de reparo, no qual os tecidos formados não restabelecem totalmente a arquitetura dos tecidos perdidos (Caton et al, 1976; Wikesjö et al, 1991; Bowers et al, 1982). Nesse processo de reparo o que ocorre é uma migração apical do epitélio juncional entre o tecido gengival e a superfície radicular (Murakami et al, 2003). Tanto no processo de reparo quanto na regeneração ocorre à ação de múltiplas citocinas e fatores de crescimento que trabalham em conjunto para regular a função de vários tipos de células dentro e adjacentes à ferida. Esses fatores como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de insulina (IGF-I), proteínas ósseas morfogenéticas (BMP-2) e fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) são importantes para o processo, pois regulam a migração, adesão, proliferação e diferenciação das células do ligamento e intensificam a formação/regeneração do periodonto (Lynch et al, 1989; Kinoshita et al, 1997; Sigurdsson et al, 1995; Giannobile et al, 1998). Além disso, diversos estudos relataram à participação do VEGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, fator de crescimento do hepatócito (HGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (Gospodarowicz et al, 1986; Ledoux et al, 1992) na angiogênese que é essencial para intensificar o processo normal de cicatrização das feridas (Roesel and Nanney, 1995), pois é através dos vasos sanguíneos que esses mediadores têm acesso a região da ferida (Nobuto et al, 2005).

Diante da importância dos mediadores biológicos e da angiogênese nos processos de cicatrização de feridas e da possibilidade de novas opções

terapêuticas para o tratamento da doença periodontal, o objetivo deste estudo foi relacionar os fatores de crescimento envolvidos nos processos de angiogênese e sua importância na regeneração dos tecidos periodontais.

## Abstract

Periodontal tissue regeneration is the final goal of periodontal treatment (Egelberg, 1987), however what really occurs cicatrisation as the result of the healing process, in which the tissue formed don't completely reestablish the "architecture" of the lost tissues (Caton et al., 1976; Wikesjö et al., 1991; Bowers et al., 1982). In this healing process what occurs is apical migration of junctional epithelium between gingival tissue and root surface (Murakami et al., 2003). In both healing process and regeneration, multiple cytokines and growth factors are working in a network to regulate the function of a number of cells within and adjacent to the wound. This factors, as the Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Insulin Growth Factor-I (IGF), Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), and Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) are important to the process because they regulate migration, adhesion, proliferation and differentiation of the periodontal ligament cells (PDL) and intensify the formation/regeneration of the periodontium (Lynch et al., 1989; Kinoshita et al., 1997; Sigurdsson et al., 1995; Giannobile et al., 1998). Besides that, several studies reported the participation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Hepatocyto Growth Factor (HGF) and Fibroblast Growth Factor (FGF) (Gospodarowicz et al., 1986; Ledoux et al., 1992) in angiogenesis, wide is essential to intensify the wound healing (Roesel and Nanney, 1995), once it is trough blood vessels that these mediators have access to the wound (Nobuto et al., 2005).

Having considered the importance of biological mediators and angiogenesis in the wound healing and of the possibility new therapeutical option to the treat periodontal diseases, the aim of this study was to relate

growth factors involved in angiogenesis process and their importance to periodontal tissue regeneration.

## 1. Introdução

A regeneração dos tecidos periodontais é o objetivo final do tratamento periodontal, no entanto uma completa regeneração não é observada após o tratamento convencional das periodontites (Egelberg, 1987). Para a regeneração periodontal ocorrer são necessários os processos de osteogênese, cementogênese e uma inserção funcional de fibras do tecido conjuntivo ao novo cimento formado e ao osso alveolar, formando uma unidade gengival competente (AAP, 1992). Entretanto, a cicatrização seguida da terapia convencional como resultado do fenômeno de reparo, no qual os tecidos formados não restabelecem totalmente a arquitetura dos tecidos perdidos (Caton et al, 1976; Wikesjö et al, 1991; Bowers et al, 1982). Nesse processo de reparo o que ocorre é uma migração apical do epitélio juncional entre o tecido gengival e a superfície radicular (Murakami et al, 2003). O processo de cicatrização das feridas é iniciado por uma fase inflamatória, na qual múltiplas citocinas agem em conjunto para regular a função de vários tipos de células dentro e adjacentes à ferida. Essas citocinas juntamente com os fatores de crescimento são importantes para o processo, pois regulam a migração, adesão, proliferação e diferenciação das células do ligamento e intensificam a formação/regeneração do periodonto (Lynch et al, 1989; Kinoshita et al, 1997; Sigurdsson et al, 1995; Giannobile et al, 1998). A aplicação tópica desses mediadores biológicos, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de insulina (IGF-I), proteínas ósseas morfogenéticas (BMP-2) e fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) têm mostrado atividade na indução da regeneração periodontal em modelo animal (Mohammed et al, 1998). Além disso, diversos

estudos relataram à participação do VEGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, fator de crescimento do hepatócito (HGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (Gospodarowicz et al, 1986; Ledoux et al, 1992) na angiogênese que é essencial para intensificar o processo normal de cicatrização das feridas (Roesel and Nanney, 1995). O processo de angiogênese é necessário para que a regeneração ocorra, pois é através dos vasos sanguíneos que esses mediadores têm acesso a região da ferida (Nobuto et al, 2005). No entanto, a angiogênese também é conhecida como um processo essencial no desenvolvimento de doenças crônicas inflamatórias, como a periodontite crônica que apresenta uma aberrante neovascularização e persistente granulação no tecido gengival, o que contribui para a progressão da doença (Oyama, 2000). Estudos recentes estabeleceram a importância do VEGF para a angiogênese de desenvolvimento e angiogênese que ocorre em tecidos normais e patológicos (Ferrara et al., 1997). Além disso, esse fator está fortemente relacionado com doenças angiogênese-dependentes como a psoríase, artrite reumatóide (Koch et al., 1994), retinopatia por diabetes (Gilbert et al., 1998), tumores malignos (Hashimoto et al., 1995), e tem ação sistêmica participando da cicatrização das feridas, formação de tecido de granulação da inflamação, luteinização do ciclo estral, proliferação transiente do endométrio e placenta (Torry et al., 1997; Howdieshell et al., 1998; Polimeni et al., 2006).

Diante da importância dos mediadores biológicos e da angiogênese nos processos de cicatrização de feridas e da possibilidade de novas opções terapêuticas para o tratamento da doença periodontal, o objetivo do nosso estudo foi relacionar os fatores de crescimento envolvidos nos processos de angiogênese e sua importância na regeneração dos tecidos periodontais.

## **2. Desenvolvimento**

### **2.1 Cicatrização X Regeneração Periodontal**

Os processos de reparo ou regeneração periodontal apresentam uma situação complexa, pois a ferida é composta de um lado por um tecido conjuntivo e epitélio gengival e do outro por uma superfície rígida, não-vascular e muitas vezes desprovidas dos seus tecidos de suporte (Polimeni et al, 2006). A cicatrização seguida da terapia convencional é o resultado do fenômeno de reparo, no qual os tecidos formados não restabelecem totalmente a arquitetura dos tecidos perdidos (Caton et al, 1976; Wikesjö et al, 1991; Bowers et al, 1982).

Do ponto de vista celular, o que ocorre é a formação de um coágulo sanguíneo que protege os tecidos desnudos e serve como uma matriz para a migração de células (Clark, 1996). A formação desse coágulo é seguida por uma fase inflamatória com neutrófilos e monócitos como células predominantes. Essas células eliminam as bactérias e os tecidos necróticos da ferida através de fagocitose, liberação de enzimas e produtos tóxicos do oxigênio (Clark, 1996; Wikesjö et al, 1999). Após 3 dias, os macrófagos que são células importantes para a formação do tecido de granulação, migram através da ferida e secretam fatores de crescimento e citocinas que estimulam a proliferação e migração dos fibroblastos e das células endoteliais (Polimeni et al, 2006). Os fibroblastos são responsáveis por substituir a matriz extracelular por uma matriz rica em colágeno. As células endoteliais, responsáveis pela angiogênese, migram através da matriz extracelular para formar tubos e alças

vasculares. Com a maturação dessa matriz as células endoteliais sofrem apoptose e o número de unidades vasculares é reduzido (Aukhil, 2000; Martin, 1997).

A epitelização da ferida se inicia rapidamente, as células epiteliais se proliferam e migram através do coágulo de fibrina e eventualmente a fenda no epitélio é selada. As células epiteliais na gengiva normal têm receptores de superfície conhecidos como integrinas, ligados a laminina na lâmina basal. Para iniciar a migração, os queratinócitos dissolvem essa ligação para expressar as integrinas susceptíveis ao meio externo (Aukhil, 2000).

A maturação do tecido de granulação irá guiar para regeneração ou reparo da ferida, dependendo da disponibilidade das células necessárias e a presença ou ausência de sinais necessários para recrutar e estimular essas células (Grzesik et al, 2002).

No caso do Reparo periodontal o que vai ocorrer 7 dias após o início do processo é a formação de um epitélio juncional em contato com a superfície radicular, ou seja, uma migração apical do epitélio juncional entre o tecido gengival e a superfície radicular (Murakami et al, 2003).

No caso de Regeneração periodontal, o que vai determinar se ela vai ocorrer ou não são as "stem cells" (células indiferenciadas) presentes no ligamento periodontal, capazes de se diferenciar em cementoblastos, fibroblastos e osteoblastos (Grzesik et al, 2002). As estruturas periodontais são subdivididas em 4 componentes - tecido gengival, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar e a natureza da nova inserção é determinada pelas células que vão repovoar a superfície radicular (Melcher, 1976). Esses achados foram comprovados por estudos que mostraram que porções das superfícies

radiculares expostas à doença periodontal e que foram tratadas com raspagem e alisamento radicular durante o reparo não apresentaram formação de tecido conjuntivo, enquanto que as porções radiculares com ligamento periodontal preservado apresentaram uma inserção de fibras funcionalmente orientadas (Karring, Nyman et al, 1980, 1993). Além disso, em estudo realizado por Nyman et al, 1982, defeitos periodontais do tipo fenestração foram criados em primatas não-humanos, um filtro Millipore foi colocado para cobrir a fenestração com objetivo de impedir o contato do tecido gengival com a superfície radicular e novo cemento com fibras inseridas funcionalmente foi observado após um intervalo de 6 meses. Usando esse mesmo raciocínio e tecnologia, eles obtiveram a primeira evidência que a regeneração periodontal pode ser conseguida em dentes humanos afetados pela periodontite e criaram a Regeneração Tecidual Guiada (RTG) que é um dos procedimentos regenerativos mais efetivos atualmente (Nyman et al, 1982).

A partir desses estudos de Nyman, Karring e colaboradores foi estabelecido que células do ligamento periodontal têm capacidade de regenerar a inserção periodontal, enquanto o osso alveolar e o tecido conjuntivo gengival não possuem essa habilidade (Karring et al, 1993). No entanto, foram necessários estudos para investigar a dinâmica dos processos de reparo e regeneração e os fatores que desempenham papel importante nesses processos.

## **2.2 Angiogênese**

A angiogênese é um processo crucial para a remodelação e regeneração de tecidos do organismo, como o tecido ósseo (Amir et al., 2006), pois é através dos vasos sanguíneos que as células necessárias para a formação/regeneração dos tecidos são recrutadas. Durante a embriogênese, a ossificação endocondral é acompanhada pela invasão de novos capilares vindos dos vasos sanguíneos vizinhos através da cartilagem calcificada (Marks & Hermey, 1996). Essa invasão é seguida por um recrutamento de células osteogênicas e deposição de tecido ósseo em substituição à cartilagem (Ferguson et al., 1999). Já durante a ossificação intramembranosa o papel dos vasos sanguíneos ainda é pouco estudado. Na distração osteogênica, onde o osso se forma principalmente via ossificação intramembranosa, a osteogênese está presente somente onde há vasos sanguíneos (Li et al., 1999). Isso se deve ao fato das células que constituem as paredes dos vasos secretarem fatores osteogênicos e algumas dessas células parecem ter potencial osteogênico (Reilly et al., 1998; Kuznetsov et al., 2001; Lewinson et al., 2001; Bronckers et al., 2005). Alguns estudos têm sugerido uma relação entre angiogênese e forças mecânicas (Li et al., 1999; Brown & Hudlicka 2003; Moore et al., 2003; Yoshino et al., 2003; Yao et al., 2004). Nos tecidos da medula óssea, a angiogênese é aumentada em resposta aos exercícios físicos, além de apresentar maior formação óssea e menor reabsorção (Moore et al., 2003). Essas forças hemodinâmicas agem como estímulo para as células endoteliais migrarem, proliferarem e até mesmo formarem novos vasos (Ando et al., 1987; Resnick & Gimbrone 1995; Lehoux & Tedgui 1998; Rowe et al.,

1999) e a resposta biológica para esses estímulos mecânicos é mediada por uma variedade de fatores angiogênicos, sendo o VEGF (Fator de crescimento do endotélio vascular) o mais importante (Brown & Hudlicka 2003; Yao et al., 2004). Aronson (1994) mostrou em seu estudo que durante a distração osteogênica o fluxo sanguíneo é de quatro a cinco vezes maior no tecido que sofreu distração em comparação ao grupo controle. Esse aumento permanece durante o período pós-distração (17 semanas) e é duas vezes maior quando comparado com o grupo controle. Segundo Amir et al., 2006, as áreas que sofreram um processo de distração osteogênica mais lento apresentaram maior vascularização e maior quantidade de osso neoformado. Esse efeito adicional na osteogênese pode ser causado por um melhor suprimento sanguíneo nessa área, uma vez que há uma correlação positiva entre o número de vasos sanguíneos e a quantidade de novo osso. Li et al., 1999, mostrou com marcadores específicos para a formação de vasos que um maior número de células precursoras de capilares estava presente no tecido fibroso próximo à área com maior formação óssea, sugerindo que a formação de vasos sanguíneos precede e co-determina a formação óssea (Li et al., 1999; Lewinson et al., 2001).

Nos tecidos periodontais, a angiogênese exerce um importante papel na manutenção da saúde e no desenvolvimento da doença periodontal crônica inflamatória assim como para o processo de cicatrização (Yoshino et al., 2003; Yao et al., 2004; Ando et al., 1987). Alguns fatores de crescimento são importantes para a indução da angiogênese durante a cicatrização periodontal, como o FGF-2 que é sintetizado pelos macrófagos e destrói as células endoteliais e o VEGF que é induzido pelos queratinócitos da borda da ferida e

por macrófagos (Aukhil, 2000). Experimento feito com o FGF mostrou que a sua depleção bloqueou a cicatrização da ferida, confirmando sua importância nesse processo (Broadley, et al., 1989).

Em relação a cirurgias periodontais, um aumento no fluxo sanguíneo do periósteo, facilitado pela angiogênese, é essencial para o processo de cicatrização após cirurgias com retalho mucoperiosteal e uma análise das sucessivas mudanças do sistema vascular é necessária para entender completamente o processo de cicatrização das feridas (Nobuto et al., 2005). Esse processo é dependente da angiogênese em seu estágio inicial e a formação dos vasos pode desencadear a diferenciação das células do endotélio vascular e das células no tecido a ser reparado, completando a morfologia desse tecido (Stevens & Lowe, 2000). Em enxertos gengivais livres, a anastomose entre o plexo vascular periosteal (como leito receptor) e os vasos sanguíneos do enxerto serve como origem para o suprimento sanguíneo (Nobuto et al., 1988; Oliver et al., 1968; Janson et al., 1969). Em processos regenerativos com membranas, a exposição dessa barreira é o maior problema pós-operatório, mas a interrupção da circulação no retalho devido a distúrbios na revascularização do tecido regenerado e a presença da membrana não-reabsorvível também devem ser considerados (Vergara et al., 1997). Além disso, o suprimento sanguíneo e a angiogênese têm importância no desenho do retalho e no método de sutura que vai dar estabilidade pós-operatória. Nobuto et al., 2005 observaram em seu estudo que novos vasos foram formados a partir dos capilares e paredes das vênulas do plexo vascular do periósteo em resposta a vários estímulos inflamatórios no processo de cicatrização das feridas após cirurgias mucoperiosteas. Esses vasos

sanguíneos do periosteio já exibem alta atividade angiogênica através de vários mecanismos, incluindo a vasculogênese (desenvolvimento do sistema vascular), e no terceiro dia após a cirurgia as reações do reparo periodontal já foram rapidamente iniciadas. Os novos vasos já estão maduros e propriamente construídos de 5 a 7 dias após o procedimento cirúrgico de elevação do retalho e os fibroblastos imaturos, que ativamente formam a matriz em paralelo com o crescimento dos vasos, também estão presentes. Os resultados desse estudo confirmaram que a rede de vasos sanguíneos e fibroblastos constituem o tecido conjuntivo vascular no processo de cicatrização das feridas após cirurgia periodontal, além disso, foi possível concluir que a angiogênese vinda do periosteio, induzida pela elevação deste, interage com a angiogênese do ligamento periodontal, que também contribui para a cicatrização de ferida após cirurgia a retalho.

A angiogênese também é um componente integral da patogênese de várias doenças como artrite reumatóide, retinopatia por diabetes, psoríase e tumores (Larrivee, et al, 2000; Ferrara, 1997). Nessas doenças, os fatores angiogênicos são produzidos por células inflamatórias ou por células ao redor dos vasos sanguíneos e formam novos vasos a partir dos vasos pré-existentes para fornecer nutrição e oxigênio para os novos tecidos (ref 10-11). Esse processo é controlado por várias citocinas e fatores de crescimento como TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , HGF (hepatócito), TNF- $\alpha$ , prostaglandina E<sub>2</sub>, angiogenina, IL-8 e VEGF (Ferrara, 1996; Ferrara, 1997). Um prolongado e excessivo processo de angiogênese são marca de doenças inflamatórias em muitos órgãos (Carmeliet & Jain, 2000). Os monócitos, macrófagos, plaquetas, mastócitos e outros leucócitos da inflamação levam a liberação de vários fatores

angiogênicos incluindo VEGF, Ang 1, FGFb, TGF $\beta$ 1, PDGF, TNF- $\alpha$ , HGF (Fator de crescimento do hepatócito), IGF-1, entre outros (Pinedo et al., 1998; Seljlid et al., 1999). Alguns desses fatores atraem células de reparo, que liberam fatores angiogênicos adicionais (Schaper & Ito, 1996; Coussens et al., 1999). As células sanguíneas também contêm proteinases que degradam as barreiras anatômicas para migração das células vasculares (Heymans et al., 1999) e ativam ou liberam esses fatores de crescimento da matriz extracelular (Coussens et al., 1999; Carmeliet & Collen, 1998).

Estudos recentes sugeriram que mudanças no relativo equilíbrio entre indutores e inibidores da angiogênese podem afetar esse processo. Em tecidos avasculares, a ausência de ativadores angiogênicos ou a presença de altos níveis de inibidores pode impedir a angiogênese, sendo que os maiores ativadores são FGF-2 (Fator de crescimento do fibroblasto) e VEGF e os maiores inibidores são angiostatina e endostatina (Yoshino, et al., 2003). Além disso, o estresse que os tecidos periodontais sofrem durante a mastigação também pode afetar a remodelação e o reparo nesses tecidos (Ferrara & Alitalo, 1999), uma vez que a diminuição da função oclusal causa mudanças na rede microvascular do periodonto como o fechamento e a diminuição do número de vasos (Benjamin et al., 1999). Yoshino et al., 2003, induziram um estresse semelhante ao oclusal em uma cultura de células endoteliais aórticas bovinas e observaram um aumento na secreção do VEGF na presença do estresse oclusal, sendo que essa maior secreção do fator de crescimento foi dependente da duração do estresse (quanto maior a duração do estímulo estressante, maior a secreção do VEGF). Uma aplicação clínica desses achados pode ser feita em relação ao tratamento ortodôntico, Murrell et al.,

demonstraram que a aplicação e remoção de forças ortodônticas produzem uma significativa mudança no número e na densidade dos vasos sanguíneos do periodonto.

Em relação à formação de tumores, o que ocorre também é um desequilíbrio entre as moléculas pró e anti-angiogênicas que podem surgir de células cancerígenas, células endoteliais, células do estroma, do sangue e da matriz extracelular (Fukumura et al., 1998). Sem os vasos sanguíneos os tumores não podem crescer e nem sofrer metástase para outros órgãos. Entretanto, sem um eficiente suprimento sanguíneo não é possível que as drogas anticâncer alcancem todas as regiões necessárias na quantidade efetiva (Carmeliet & Jain, 2000).

O sinal para a angiogênese é interrompido quando as moléculas pró-angiogênese estão balanceadas com as anti-angiogênese e é reativado quando esse balanço está em favor a angiogênese (Hanahan et al., 2000; Bouck et al., 1996). Vários sinais dessa ativação foram descobertos incluindo estresse metabólico (baixa pressão de oxigênio, baixo pH ou hipoglicemia), estresse mecânico (pressão gerada pela proliferação de células), resposta imune/inflamatória (infiltrado de células imune/inflamatórias nos tecidos) e mutações genéticas (ativação de oncogenes ou depleção de genes supressores de tumor que controlam a produção de reguladores angiogênicos) (Kerbel, 2000; Carmeliet, 1999).

## **2.3 Fatores de Crescimento relacionados à Angiogênese e a Regeneração Periodontal**

### **Fator de Crescimento do Endotélio Vascular – VEGF**

O desenvolvimento do suprimento sanguíneo é uma condição fundamental para um organismo se desenvolver e se diferenciar durante a embriogênese (Hamilton et al., 1962; Gilbert, 1988), assim como durante os processos de cicatrização e para as funções reprodutivas nos adultos (Folkman et al., 1987; Folkman, 1991). Entretanto, a angiogênese também participa da patogênese de várias doenças (Larivée, et al, 2000; Ferrara, 1997).

O VEGF é uma glicoproteína homóloga ao PDGF e ao PIGF (Fator de Crescimento da Placenta) que recebe especial atenção devido ao seu potencial de induzir a permeabilidade vascular e a angiogênese (Deckers, et al, 2000). Ele participa de uma variedade de eventos fisiológicos e patológicos, incluindo a embriogênese, processos de cicatrização de feridas, crescimento de tumores, isquemia do miocárdio, doença ocular neovascular e inflamações crônicas como artrite reumatóide e a doença periodontal (Folkman, 1995; Ferrara, 1996). Ele tem um papel central no desenvolvimento embrionário dos vasos, que foi confirmado por achados que mostram que a inativação de um único alelo do gene do VEGF em ratos causou uma condição letal para a angiogênese e formação de vasos sanguíneos (Ferrara, 1996; Carmeliet et al., 1996).

Alguns membros da família do VEGF já foram descritos incluindo VEGF-A, PIGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E, sendo que o VEGF-C

desempenha um papel na linfangiogênese, uma super expressão desse fator na pele de ratos transgênicos causou proliferação epitelial e alargamento dos vasos no tecido linfático e não no tecido vascular (Jeltsch et al., 1997).

Esse fator de crescimento promoveu a angiogênese em modelos tridimensionais *in vitro*, induzindo células endoteliais microvasculares a invadirem géis de colágeno e formarem capilares (Pepper et al., 1992). Nesse estudo também foi observado um potencial sinergismo entre o VEGF e o FGFb na indução desse efeito. O VEGF também induz germinação dos anéis aórticos de ratos embebidos em gel de colágeno (Nicosia et al., 1994). Esse modelo dá ênfase à especificidade do VEGF, pois ele atua exclusivamente em células endoteliais vasculares, ao contrário do IGF e PDGF que induzem a germinação das células endoteliais acompanhado por uma extensiva proliferação de fibroblastos (Nicosia et al., 1994). Um aumento na expressão do VEGF é causado pela hipoxia do tecido, tanto em vivo quanto em tumores e células normais (Risau, 1997). A hipoxia é um mecanismo que super regula a expressão de RNA mensageiro do VEGF, mas essa expressão também é regulada por vários fatores incluindo o PDGF-BB, TGF- $\beta$ , FGF e IL1- $\beta$  (Ferrara, 1996; Stavri et al., 1995).

O VEGF também apresenta um importante papel na angiogênese de processos patológicos como câncer, retinopatia por diabetes e outras doenças vasculares (Folkman, 1995; Ferrara, 1996), uma vez que um aumento tanto na permeabilidade vascular quanto na angiogênese é típico de condições patológicas como o crescimento de tumores e inflamações crônicas (Maeda et al, 1998; Nör et al., 1999). Como estratégia para combater o câncer e outras doenças neovasculares o uso do receptor antagonista do VEGF e de moléculas

anti-angiogênicas são boas opções. Folkman e colaboradores descobriram que a angiostatina e a endostatina, que são moléculas anti-angiogênicas endógenas, podem suprimir o crescimento de tumores em animais. Entretanto, os efeitos angiogênicos do VEGF podem beneficiar clinicamente outras doenças. Esse fator promove regeneração endotelial e formação colateral de vasos em isquemia do miocárdio (Folkman, 1995; Asahara et al., 1996).

Durante a progressão da doença periodontal, a vascularidade do periodonto é profundamente afetada e existem evidências que os tecidos inflamados aumentam a expressão de mediadores inflamatórios, que promovem a angiogênese (Johnson, et al, 1998). O VEGF também aumenta a permeabilidade vascular e a angiogênese, como relatado na doença periodontal (Suthin et al., 2003).

Os maiores agentes etiológicos da periodontite são o *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) (Forng, et al, 2000), eles contém diversos componentes bioativos na superfície celular como fimbrias, cápsulas, vesícula extracelular (Ve), lipopolissacarídeos (LPS) e membrana protéica externa (OMP) que induzem numerosos mediadores inflamatórios como prostaglandinas, IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  das células mononucleares periféricas e dos fibroblastos do ligamento periodontal e estão envolvidos na progressão da doença periodontal (Imatani, et al, 2001).

Estudos têm mostrado que o VEGF é expresso por monócitos e células da polpa dental em resposta ao LPS (Sakuta et al, 2001; Matsushita et al, 2000). Uma excessiva indução do VEGF devido à presença dos patógenos periodontais nos tecidos do periodonto, especialmente no ligamento periodontal, pode ser associada com a etiologia da periodontite, uma vez que

esta é acompanhada por forte neovascularização, inchaço e edema. Booth e colaboradores detectaram maior quantidade de VEGF no fluido gengival coletado de sítios clinicamente doentes do que nos sítios com saúde periodontal.

A possibilidade de o VEGF ser produzido pelos fibroblastos do ligamento periodontal têm importantes implicações para o estudo da doença periodontal e sua progressão, assim como para os processos de regeneração após o tratamento periodontal. Suthin e colaboradores mostraram que ocorre maior produção de VEGF pelos fibroblastos em resposta a vesícula extracelular (Ve) e membrana protéica externa (OMP) dos periodontopatógenos. Enquanto a Ve e a OMP de diferentes patógenos tem efeito similar na produção de VEGF, a LPS não aumentou a produção desse fator pelos fibroblastos. Além disso, foi demonstrado que a Ve e a OMP do *Pg* tem maior influência na produção de VEGF pelos fibroblastos, que os mesmos componentes do *Aa*. Como o VEGF não aumenta só a permeabilidade vascular, mas também a quimiotaxia de monócitos/macrófagos, um aumento na produção do VEGF pelos fibroblastos aumenta também o acúmulo de células inflamatórias, similar ao que acontece na fase inflamatória da doença periodontal.

O VEGF também pode ter um papel importante para a cicatrização do periodonto não só por promover angiogênese e permeabilidade vascular (Brown et al., 1992), mas também por ter sido identificado como fator de diferenciação de osteoclastos. Kohno e colaboradores mostraram que o VEGF é expresso na superfície dos osteoblastos no ligamento periodontal durante movimentação experimental do dente. A partir desse estudo é possível sugerir que o VEGF endógeno participa da diferenciação dos osteoclastos e

reabsorção óssea essenciais para a movimentação dental. A angiogênese é requerida para o desenvolvimento, remodelação e reparo da maioria dos tecidos incluindo o osso (Nakagawa et al., 2000; Gerber et al., 1999), com isso o VEGF pode estar associado à cicatrização dos tecidos periodontais através da promoção da angiogênese e osteogênese.

Como foi citado anteriormente, muitas citocinas e fatores de crescimento têm recebido especial atenção por terem importantes papéis no processo de regeneração, ou seja, regulam migração, ligação, proliferação e/ou diferenciação de células do ligamento periodontal, intensificando a regeneração desses tecidos (Lynch et al., 1989; Lynch et al., 1991; Sigurdsson et al., 1995).

O fator de crescimento básico do fibroblasto (FGFb, FGF-2) é um membro da família dos fatores de crescimento ligantes de heparina que possui diversas ações fisiológicas e participa dos estágios iniciais dos processos de cicatrização das feridas (Gibran et al., 1994; Yu et al., 1994). Muitas pesquisas têm demonstrado que o FGFb aplicado localmente como opção terapêutica estimula a formação óssea no sítios que receberam a aplicação e mostrou também ser efetivo no reparo de úlceras (Okumura et al., 1996).

Diante dessas informações Murakami e colaboradores (1999) examinaram o efeito da aplicação local do FGFb na regeneração dos tecidos periodontais e sua possível forma de ação foi observada verificando a influencia do FGFb em células do ligamento. Foi criado cirurgicamente um defeito de 3 paredes em cachorros beagle. Esses defeitos foram tratados com uma aplicação tópica do FGFb e foram observados em 3 períodos (1, 2 e 4 semanas). Na segunda semana uma maior quantidade de novo osso formado é observada nos defeitos que receberam o FGFb em comparação ao grupo controle. Na quarta semana foi observada significativa formação de ligamento periodontal com depósitos de novo cemento e osso neoformado no grupo que recebeu FGFb em comparação ao grupo controle. Quando se examinou a ação do FGFb em culturas de células do ligamento periodontal em diferentes períodos observa-se

que o efeito é decrescente, o que pode sugerir que o FGFb age preferencialmente em células imaturas do ligamento periodontal nos estágios iniciais do processo de cicatrização (Murakami et al., 1999).

O FGFb também tem importante função durante a angiogênese, agindo sinergicamente com o VEGF (Pepper et al., 1992; Goto et al., 1993; Asahara et al., 1995). Dentre os diferentes membros da família do FGF, o FGF-1 e o FGF-2 estão preferencialmente envolvidos com a angiogênese. Um grande aumento nos níveis desses fatores é observado em pacientes com câncer, o que permite ao tumor estimular a formação de novos vasos (Malek et al., 1997). Além disso, o tratamento com o FGF promove a diferenciação das células endoteliais em angioblastos (Jain et al., 1997; Flamme et al., 1992).

Em relação a suas funções nas fases da regeneração periodontal, esse fator pode acelerar o processo de regeneração ideal sem causar anquilose e migração apical do epitélio juncional (Takayama et al., 1997). Ele induz a proliferação das células do ligamento periodontal, mas inibe a atividade da fosfatase alcalina e a formação de colágeno pelas células osteoblásticas. Esses resultados sugerem que o FGF induz a proliferação das células do ligamento periodontal, mas não sua citodiferenciação em células osteoblásticas (Hurley et al., 1993).

Com o objetivo de estabelecer uma terapia regenerativa com fatores de crescimento é preciso esclarecer melhor a função do FGF e de outros fatores nas fases da regeneração periodontal (Takayama et al., 1997)

## Fator de Transformação Crescimento $\beta$ – TGF- $\beta$

O fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) é uma proteína reguladora multifuncional que tem um papel crítico no processo de cicatrização por aumentar a angiogênese e a formação de fibroblastos (Hauschka, et al., 1986; Centrella et al., 1987). O TGF-  $\beta$  aumenta a ação do FGF sobre a proliferação de células ósseas (Globus et al., 1988), dá suporte para formação óssea intramembranosa e endocondral (Joyce et al., 1990) e estimula o recrutamento e proliferação de osteoblastos em defeitos ósseos (Beck et al., 1993). Essas informações permitem sugerir que o TGF-  $\beta$  é um potente osteoindutor e pode ter aplicação terapêutica na regeneração periodontal (Wikesjö et al., 1998). Esse fator de crescimento foi associado à técnica de regeneração tecidual guiada (RTG) em defeitos de furca classe II criados cirurgicamente em cachorros beagle. Houve um resultado estatisticamente significativo em relação à altura, regeneração e densidade ósseas no grupo que recebeu a aplicação tópica de TGF-  $\beta$  em relação ao grupo controle, entretanto esse resultado não foi considerado clinicamente significativo (Wikesjö et al., 1998).

O potencial osteoindutivo do TGF-  $\beta$  foi demonstrado em calvárias de coelhos, através da sua aplicação tópica nos defeitos ósseos, no entanto observou-se que esse fator tem efeito dose dependente (Beck, et al., 1993). Isso foi observado também por Bosch e colaboradores (1996) e Ripamonti e colaboradores (1996).

Okubo e colaboradores (2003) estudaram a hipótese de que a aplicação tópica do TGF-  $\beta$  e outros fatores de crescimento associada ao Emdogain –

Matriz Derivada do Esmalte (EMD) podem ter alguma influencia positiva na promoção da regeneração periodontal, uma vez que Gestrelus e colaboradores (1997) demonstraram que o EMD não possui nenhum fator de crescimento em sua composição. Foi observado que o TGF-  $\beta$  e o IGF (fator de crescimento de insulina) endógenos apresentam-se em maior nível quando o EMD é utilizado (Van der Pauw et al.,2000; Okubo et al.,2003), o que sugere que o EMD estimula o crescimento e proliferação celular mediado por esses fatores (Okubo et al.,2003).

O TGF-  $\beta$  foi associado à RTG em defeitos de furca classe II em carneiros observando-se uma formação de cemento celular em toda a área da furca e maior formação óssea após um período de 6 semanas comparando-se com o grupo controle (Mohammed et al., 1998).

## Fator de Crescimento derivado de Plaquetas-PDGF

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) está presente na matriz óssea, é secretado pelas plaquetas durante as fases iniciais de reparo e produzido também localmente (Lynch, 1999; Marx, 1999; Bolander, 1992; Andrew et al., 1995; Fujii et al., 1999). Ele tem ação quimiotática (recrutamento) e mitogênica (proliferação) sobre os osteoblastos e estimula a produção de colágeno tipo I, que é o componente extracelular primário do osso (Bolander, 1992) e melhora a angiogênese por estimular a formação de novos vasos sanguíneos (Nevins, et al., 2003). Ocorre um aumento nos receptores celulares do PDGF durante o reparo de fraturas, sugerindo que ele tem função nesse processo (Andrew et al., 1995; Fujii et al., 1999). Além disso, o PDGF apresenta importante papel no desenvolvimento embriológico do esqueleto (Lynch, 1999). Quando esse fator de crescimento é injetado na cavidade medular de animais o reparo na região de fratura é acelerado (Nash et al., 1994). O PDGF também é utilizado com sucesso no tratamento de osteoporose em modelos animais, resultando em um aumento na densidade do osso trabeculado em todo o esqueleto (Mitlak et al., 1996).

Esse fator de crescimento tem muita importância na periodontia por promover regeneração de osso, cemento e ligamento periodontal (Lynch et al., 1989; Giannobile, 1999). Nevins e colaboradores (2003) testaram a hipótese que a aplicação do PDGF incorporado enxerto ósseo alógeno poderia induzir a regeneração periodontal em humanos. Foram tratados defeitos intra-ósseos interproximais e defeitos de furca classe II e na maioria significativa dos casos houve regeneração periodontal com formação de osso, ligamento periodontal e

cimento. O PDGF também foi testado em associação com a RTG em cães, mostrando uma regeneração periodontal em 100% dos casos após 8 semanas, em comparação a uma regeneração de 19,2% no grupo controle que recebeu apenas RTG (Cho et al., 1995). É possível associar também o PDGF com o IGF resultando em uma melhora no preenchimento de defeitos ósseos (Howell et al., 1997).

Uma característica clínica interessante do PDGF é que ele não necessita ser administrado em longo prazo, sua ideal administração parece ser aquela que ocorre naturalmente durante a formação do coágulo ou com uma série de aplicações freqüentes (Nevins et al., 2003).

## Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMP)

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) tem atraído muita atenção como fatores de crescimento desde que Urist (1965) demonstrou que a matriz óssea desmineralizada poderia induzir a formação de cartilagem e osso em sítios ectópicos. As BMPs-2-8 são da família do TGF- $\beta$  e podem ser divididas em subfamílias (Wozney et al., 1988; Hahn et al., 1992). Essas proteínas têm a habilidade de induzir formação de tecido ósseo através de múltiplos efeitos em sua homeostase (Takahashi et al., 2005). BMPs específicas podem ser usadas para o reparo e regeneração óssea (Ripamonti et al., 1994; Bowers et al., 1991), uma vez que a liberação de BMPs nativas na matriz colágena induz formação de cemento, osso alveolar e ligamento periodontal (Ripamonti et al., 1994). Significante formação de osso e cemento em cirurgias periodontais reconstrutivas com o uso da BMP-2 em cães foi relatada (Sigurdsson et al., 1995; Kinoshita et al., 1997), assim como a ação favorável das BMPs-2 e-7 na regeneração de defeitos ósseos em ratos (King et al., 1997; Giannobile et al., 1998). Foi demonstrado também em estudos in vitro que as BMPs-2 e-7 podem induzir formação de osso e cemento assim como a diferenciação de osteoblastos e condroblastos (Sampath et al., 1992). Huang e colaboradores (2005) demonstraram em seu estudo que a BMP-6 pode promover regeneração de osso, cemento e ligamento periodontal, sugerindo uma participação dessa proteína no processo de regeneração periodontal. Muitos estudos têm mostrado que a BMP-2 e a proteína osteogênica-1 (OP-1) promovem regeneração do osso alveolar, cemento e ligamento periodontal em animais com defeitos ósseos criados cirurgicamente por sua ação na

proliferação e diferenciação celular (Sigurdsson, et al., 1995; Ripamonti et al., 1996; Kinoshita et al., 1997; Giannobile et al., 1998; King et al., 1998; Talwar et al., 2001; Wiskejö et al., 1999; Choi et al., 2002). No entanto, para obter um ótimo efeito da BMP sobre a regeneração periodontal é preciso um sistema de liberação rápido ou lento (King et al., 1998). Com isso, Talwar e colaboradores (2001) testaram uma gelatina degradável como carregador da BMP-2, com tempos diferentes de liberação, em defeitos de fenestração criados na mandíbula de ratos. Foi observado que uma rápida liberação da BMP-2 aumentou significativamente a formação óssea quando comparada com o grupo controle, no entanto o grupo de liberação lenta também apresentou formação óssea. Em relação ao novo cemento, houve uma significante maior formação no grupo de liberação lenta, comparando com os outros grupos, sugerindo que a liberação lenta da BMP-2 intensifica a cementogênese.

A BMP-2 também foi associada à RTG observando-se maior formação óssea e anquilose no grupo que recebeu o fator de crescimento (grupo teste) em comparação ao grupo controle, entretanto similar formação de novo cemento foi observada entre os grupos. Cada grupo apresentou uma inserção periodontal de natureza diferente, sendo que o grupo controle possuía fibras do ligamento periodontal inseridas funcionalmente e no grupo teste essas fibras raramente foram observadas.

Embora evidências recentes sugiram que essa ação das BMPs pode ser influenciada por fatores como condicionamento da superfície radicular (King et al., 1998) sistemas de liberação (King et al., 1998) e forças mastigatórias (King & Hughes, 1999) pouco se conhece sobre como esses fatores podem interferir mecanismo de ação das BMPs durante a regeneração periodontal.

### 3. Conclusão

A regeneração periodontal é o objetivo final do tratamento convencional das periodontites, entretanto é um processo complexo que envolve muitos mediadores biológicos e por isso é difícil de ser alcançada.

A angiogênese pode ser considerada de grande importância para o processo de regeneração de tecidos, incluindo os tecidos do periodonto como osso alveolar, cemento e ligamento periodontal, pois é através dos vasos sanguíneos que as células necessárias para a formação/regeneração desses tecidos são recrutadas. Diante do anseio pela regeneração dos tecidos perdidos, a angiogênese e os fatores angiogênicos merecem atenção especial como possíveis integrantes da terapia regenerativa.

Os fatores de crescimento são moléculas que participam do recrutamento, proliferação e diferenciação de células importantes para os processos regenerativos. O VEGF, FGF, TGF- $\beta$ , PDGF e a BMP são alguns fatores bastante estudados, que mostraram importante papel na regeneração periodontal e que também podem ser importantes para a terapia regenerativa periodontal futura.

#### 4. Referências Bibliográficas\*

Amir LS, Becking AG, Jovanovic A, Perdijk FBT, Everts V, Bronckers ALJJ., Formation of new bone during vertical distraction osteogenesis of the human mandible is related to the presence of blood vessels. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 410-416.

Ando J, Nomura H, Kamiya A., The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvascular Research* 1987; 33: 62-70.

Andrew JG, Hoyland JA, Freemont AJ, Marsh DR., Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone*. 1995; 16 (4): 455-60.

Aronson J., Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clin Orthopaedis* 1994; 301: 124-131.

Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al., Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1995 1; 92 (9 Suppl): II 365-71.

Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, Kearney M, Rossow S, Passeri J, et al., Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation*. 1996 15; 94 (12): 3291-302.

Aukhil I., Biology of wound healing. *Periodontol 2000* 2000; 22: 44-50.

Beck LS., Richardson L, Zioncheck TF, Amento EP, Deguzman L, Lee WP, et al., Characterization of radioiodinated recombinant human TGF-beta 1 binding to bone matrix within rabbit skull defects. *J Bone Miner Res.* 1993; 8(11): 1407-14.

Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E., Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999; 103: 159-165.

Bolander ME., Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992; 200 (2): 165-70.

Bosch C, Melsen B, Gibbons R, Vargervik K., Human recombinant transforming growth factor-beta 1 in healing of calvarial bone defects. *J Craniofac Surg.* 1996; 7 (4): 300-10.

Bouck N, Stellmach V, Hsu SC., How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 1996; 69: 135-174.

Bowers G, Felton F, Middleton C, Glynn D, Sharp S, Mellonig J, et al., Histologic comparison of regeneration in human intrabony defects when osteogenin is combined with demineralized freeze-dried bone allograft and with purified bovine collagen. *J Periodontol.* 1991; 62 (11): 690-702.

Bowers GM, Schallhorn RG, Mellonig JT., Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. *J Periodontol.* 1982; 53 (8): 509-14.

Broadley KN, Aquino AM, Hicks B, Ditesheim JA, McGee GS, Demetriou AA, et al., The diabetic rat as an impaired wound healing model: stimulatory effects of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor. *Biotechnol Ther.* 1989; 1 (1): 55-68.

Bronckers AL, Sasaguri K, Cavender AC, D'Souza RN, Engelse MA., Expression of Runx2/Cbfa1/Pebp2alphaA during angiogenesis in postnatal rodent and fetal human orofacial tissues. *Journal of Bone and Mineral Research* 2005; 20: 428-437.

Brown LF, Yeo KT, Berse B et al., Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992; 176: 1375-1379.

Brown MD, Hudlicka O., Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis* 2003; 6: 1-14.

Carmeliet P, Collen D., Development and disease in proteinase-deficient mice: role of plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res* 1998; 91: 255-285.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein Met al., Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996 4; 380 (6573): 435-9.

Carmeliet P, Jain RK., Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.

Carmeliet P., Controlling the cellular brakes. *Nature* 1999; 401: 657-658.

Caton J, Zander HA., Regeneration and repair of periodontal tissues. *J Periodontal Res*. 1987; 22 (3): 233-42.

Centrella M, McCarthy TL, Canalis E., Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem*. 1987 25; 262 (6): 2869-74.

Cho MI, Lin WL, Genco RJ., Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol.* 1995; 66 (6):522-30.

Choi SH, Kim CK, Cho KS, Huh JS, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjö UM., Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs. *J Periodontol.* 2002; 73 (1): 63-72.

Clark RAF., Wound repair. Overview and general considerations. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair, 2° edição; *Plenum Press*, 1996: 3-50.

Coussens LM et al., Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 1999; 13: 1382-1397.

Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW., Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2000; 141 (5): 1667-74.

Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 1997; 32 (8): 667-75.

Egelberg J., Regeneration and repair of periodontal tissues. *J Periodontal Res.* 1987; 22 (3): 233-42.

Fergusson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mechanism of Development* 1999; 87: 57-66.

Ferrara N & Alitalo K., Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature Med* 1999; 5: 1359-1364.

Ferrara N, Davis-Smith T., The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.

Ferrara N, Davis-Smyth T., The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997; 18 (1): 4-25.

Ferrara N., Vascular Endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2413-2422.

Flamme I, Risau W., Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development.* 1992; 116 (2): 435-9.

Folkman J, Klagsbrun M., Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature.* 1987 22-28; 329 (6141): 671-2.

Folkman J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1995; 1 (1): 27-31.

Folkman J., How the field of controlled-release technology began, and its central role in the development of angiogenesis research. *Biomaterials.* 1990; 11 (9): 615-8.

Forng RY, Champagne C, Simpson W, Genco CA., Environmental cues and gene expression in *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Dis.* 2000; 6 (6): 351-65.

Fujii H, Kitazawa R, Maeda S, Mizuno K, Kitazawa S., Expression of platelet-derived growth factor proteins and their receptor alpha and beta mRNAs during fracture healing in the normal mouse. *Histochem Cell Biol.* 1999; 112 (2): 131-8.

Fukumura D et al., Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998; 94: 715-725.

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N., VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Med.* 1999; 5 (6): 623-8.

- Gestrelus S, Andersson C, Lidström D, Hammarström L, Somerman M., In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol.* 1997; 24 (9 Pt 2): 685-92.
- Giannobile WV, Ryan S, Shih MS, Su DL, Kaplan PL, Chan TC., Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *J Periodontol.* 1998; 69 (2): 129-37.
- Giannobile WV., Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. *Tissue Engineering Application in Maxillofacial Surgery and Periodontics*, 1999; 231-243.
- Gibran NS, Isik FF, Heimbach DM, Gordon D., Basic fibroblast growth factor in the early human burn wound. *J Surg Res.* 1994; 56 (3): 226-34.
- Gilbert DA., On G0 and cell cycle controls. *Bioessays.* 1988; 9 (4): 135-6.
- Gilbert RE, Vranes D, Berka JL, Kelly DJ, Cox A, Wu LL, et al., Vascular endothelial growth factor and its receptors in control and diabetic rat eyes. *Lab Invest.* 1998; 78 (8): 1017-27.
- Globus RK, Patterson-Buckendahl P, Gospodarowicz D., Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Endocrinology.* 1988; 123 (1): 98-105.
- Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L., Fibroblast growth factor. *Mol Cell Endocrinol.* 1986; 46 (3): 187-204.
- Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J., Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest.* 1993; 69 (5): 508-17.

Grzesik WJ, Narayanan AS., Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 474-484.

Hahn GV, Cohen RB, Wozney JM, Levitz CL, Shore EM, Zasloff MA, et al., A bone morphogenetic protein subfamily: chromosomal localization of human genes for BMP5, BMP6, and BMP7. *Genomics*. 1992; 14 (3): 759-62.

Hamilton, 1962

Hanahan D, Weinberg RA., The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100: 57-70.

Hashimoto M, Ohsawa M, Ohnishi A, Naka N, Hirota S, Kitamura Y, et al., Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNA in angiosarcoma. *Lab Invest*. 1995; 73 (6): 859-63.

Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrafi MD, Doleman SE, Klagsbrun M., Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem*. 1986 25; 261 (27): 12665-74.

Heymans S et al., Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevent cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nature Med* 1999; 5: 1135-1142.

Howdieshell TR, Riegner C, Gupta V, Callaway D, Grembowicz K, Sathyanarayana , et al., Normoxic wound fluid contains high levels of vascular endothelial growth factor. *Ann Surg*. 1998 N; 228 (5): 707-15.

Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE., A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol*. 1997; 68 (12): 1186-93.

Huang KK, Shen C, Chiang CY, Hsieh YD, Fu E., Effects of bone morphogenetic protein-6 on periodontal wound healing in a fenestration defect of rats. *J Periodontal Res.* 2005; 40 (1): 1-10.

Hurley MM, Abreu C, Harrison JR, Lichtler AC, Raisz LG, Kream BE., Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem.* 1993 15; 268 (8): 5588-93.

Imatani T, Kato T, Okuda K., Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16 (2): 65-72.

Jain RK, Leunig M, Yuan F, Gerweck LE., Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis and growth of isografted bone: quantitative in vitro-in vivo analysis in mice. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1997; 17 (1): 1-9.

Janson WA, Ruben MP, Kramer GM, Bloom AA, Turner H., Development of the blood supply to split-thickness free gingival autografts. *J Periodontol.* 1969; 40 (12): 707-16.

Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al., Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science.* 1997 25; 277 (5325): 463-5.

Johnson RB, Serio FG, Dai X., Vascular endothelial growth factor and progression of periodontal disease. *J Periodontol* 1998; 70: 848-852.

Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME., Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol.* 1990; 110 (6): 2195-207.

Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L., Development of the biological concept of guided tissue regeneration – animal and human studies. *Periodontol* 2000 1993; 26-33.

Karring T, Nyman S, Lindhe J., Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol* 1980; 7: 96-105.

Kerb R., Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21: 505-515.

King GN, Hughes FJ., Effects of occlusal loading on ankylosis, bone, and cementum formation during bone morphogenetic protein-2-stimulated periodontal regeneration in vivo. *J Periodontol.* 1999; 70(10): 1125-35.

King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ., Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res.* 1997; 76 (8): 1460-70.

King GN, King N, Hughes FJ., The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *J Periodontol.* 1998; 69 (5): 561-70.

Kinoshita A, Oda S, Takahashi K, Yokota S, Ishikawa I., Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol.* 1997; 68 (2): 103-9.

Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, et al., Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 1994 15; 152 (8): 4149-56.

Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG, Circulating skeletal stem cells. *Journal of Cell Biology* 2001; 153: 1133-1140.

- Larrivée B, Karsan A., Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor (review). *Int J Mol Med*. 2000 ;5 (5): 447-56.
- Ledoux D, Gannoun-Zaki L, Barritault D., Interactions of FGFs with target cells. *Prog Growth Factor Res*. 1992; 4 (2): 107-20.
- Lehoux S & Tedgui A., Signal transduction of mechanical stress in the vascular wall. *Hypertension* 1998; 32: 338-345.
- Lewinson D, Maor G, Rozen N, Rabinovich I, Stahl S, Rachmiel A., Expression of vascular antigens by bone cells during bone regeneration in a membranous bone distraction system. *Histochemistry and Cell Biology* 2001; 116: 381-388.
- Li G, Simpson AH, Kenwright J, Triffitt JT., Effect of lengthening rate on angiogenesis during distraction osteogenesis. *Journal of Orthopaedics Research* 1999; 17: 362-367.
- Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, et al., The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol*. 1991;62 (7): 458-67.
- Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniades HN., A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol*. 1989; 16 (8): 545-8.
- Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, Jikko A, Furukawa S, Ishida T, et al., Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. *J Clin Pathol*. 1998; 51 (10): 771-5.

Malek AM, Connors S, Robertson RL, Folkman J, Scott RM., Elevation of cerebrospinal fluid levels of basic fibroblast growth factor in moyamoya and central nervous system disorders. *Pediatr Neurosurg.* 1997; 27 (4): 182-9.

Marks SC & Hermey DC., The structure and development of bone. Principles of bone biology, *Academic Press*; 1996: 3-14.

Martin P., Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276: 75-81.

Marx RE., Platelet-rich plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. *Tissue Engineering Application in Maxillofacial Surgery and Periodontics*, 1999; 71-82.

Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Yamaguchi N, Koga T, Matsuo K, et al., The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J Dent Res.* 2000; 79 (8): 1596-603.

Melcher AH., On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; 47: 256-260.

Mitlak BH, Finkelman RD, Hill EL, Li J, Martin B, Smith T, et al., The effect of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton. *J Bone Miner Res.* 1996; 11 (2): 238-47.

Mohammed S, Pack AR, Kardos TB., The effect of transforming growth factor beta one (TGF-beta 1) on wound healing, with or without barrier membranes, in a Class II furcation defect in sheep. *J Periodontal Res.* 1998; 33 (6): 335-44.

Moore DC, Leblanc CW, Muller R, Crisco JJ, Ehrlich MG., Physiologic Weight-bearing increases new vessel formation during distraction osteogenesis: o

micro-tomographic imaging study. *Journal of Orthopaedics Research* 2003; 21: 489-496.

Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, et al., Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res.* 1999; 34 (7): 425-30.

Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, et al., Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res.* 2003; 38 (1): 97-103.

Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett.* 2000 12; 473(2): 161-4.

Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ., Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone.* 1994; 15 (2): 203-8.

Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE., Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol.* 2003; 74 (9): 1282-92.

Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M., Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol.* 1994; 145 (5): 1023-9.

Nobuto T, Imai H, Yamaoka A., Microvascularization of the free gingival autograft. *J Periodontol* 1988; 59: 639-646.

Nobuto T, Suwa F, Kono T, Taguchi Y, Takahashi T, Kanemura N, et al., Microvascular response in the periosteum following mucoperiosteal flap surgery in dogs: angiogenesis and bone resorption and formation. *J Periodontol*. 2005; 76 (8): 1346-53.

Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Poverini PJ., Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 1999; 154:375-384.

Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J., The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the Monkey. *J Clin Periodontol* 1982; 9: 257-265.

Oda S, Kinoshita A, Higuchi T, Shizuya T, Ishikawa I., Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Med Dent Sci*. 1997;44 (3): 53-62.

Okubo K, Kobayashi M, Takiguchi T, Takada T, Ohazama A, Okamatsu Y, et al., Participation of endogenous IGF-I and TGF-beta 1 with enamel matrix derivative-stimulated cell growth in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2003; 38 (1): 1-9.

Okumura M, Okuda T, Okamoto T, Nakamura T, Yajima M., Enhanced angiogenesis and granulation tissue formation by basic fibroblast growth factor in healing-impaired animals. *Arzneimittelforschung*. 1996; 46 (10): 1021-6.

Oliver RC, Loe H, Karring T., Microscopic evaluation of the healing and revascularization of free gingival grafts. *J Periodontal Res*. 1968; 3 (2): 84-95.

Oyama T, Sakuta T, Matsushita K, Maruyama I, Nagaoka S, Torii M., Effects of roxithromycin on tumor necrosis factor-Alpha- induced vascular endothelial

growth factor expression in human periodontal ligament cells in culture. *J Periodontol.* 2000; 71 (10): 1546-1553.

Ozawa K, Kondo T, Hori O et al., Relates articles expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J Clin Invest* 2001; 108: 41-50.

Pepper MS, Sappino AP, Montesano R, Orci L, Vassalli JD., Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in migrating endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1992; 153 (1): 129-39.

Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J., Involvement of platelets in tumor angiogenesis? *Lancet* 1998; 352: 1775-1777.

Polimeni G, Andreas V, Xiropaidis & Ulf M E Wikesjö., Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol. 2000* 2006; 41: 30-47.

Reilly TM, Seldes R, Luchetti W, Brighton CT., Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clinical Orthopaedics* 1998; 346: 95-103.

Resnick N & Gimbrone MA., Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB Journal* 1995; 9: 874-882.

Ripamonti U, Bosch C, van den Heever B, Duneas N, Melsen B, Ebner R., Limited chondro-osteogenesis by recombinant human transforming growth factor-beta 1 in calvarial defects of adult baboons (*Papio ursinus*). *J Bone Miner Res.* 1996; 11 (7): 938-45.

Ripamonti U, Heliotis M, van den Heever B, Reddi AH., Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in the baboon (*Papio ursinus*) *J Periodontal Res.* 1994; 29(6): 439-45.

Risau W., Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997 17; 386 (6626): 671-4.

Roesel JF, Nanney LB., Assessment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair. *J Surg Res.* 1995; 58 (5): 449-59.

Rowe NM, Mehrara BJ, Luchs JS, Dudziak ME, Steinbrech DS Illei PB et al., Angiogenesis during mandibular distraction osteogenesis. *Annals of plastic Surgery* 1999; 42: 470-475.

Sakuta T, Matsushita K, Yamaguchi N, Oyama T, Motani R, Koga T, et al., Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1. *J Med Microbiol.* 2001; 50 (3) :233-7.

Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, et al., Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem.* 1992; 267 (28): 20352-62.

Schaper W, Ito WD., Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 1996; 79: 911-919.

Seljlid R, Josefowski S, Sveinbjornsson B., Tumor stroma. *Anticancer Res* 1999; 19: 4809-4822.

Sigurdsson TJ, Tatakis DN, Lee MB, Wikesjö UM., Periodontal regenerative potential of space-providing expanded polytetrafluoroethylene membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins. *J Periodontol.* 1995; 66 (6): 511-21.

Singer AJ, Clark RA., Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-746.

Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD., Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation*. 1995 1; 92 (1): 11-4.

Stevens & Lowe

Suthin K, Matsushita K, Machigashira M, Tatsuyama S, Imamura T, Torii M., Enhanced expression of VEGF by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. *J Periodontol Res* 2003; 38:90-96.

Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y., Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2005 ;26 (23): 4856-65.

Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, et al., Talwar R, Di Silvio L, Hughes FJ, King GN., Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo. *J Clin Periodontol*. 2001; 28 (4): 340-7.

Torry DS, Torry RJ., Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *Am J Reprod Immunol*. 1997; 37 (1): 21-9.

Urist MR., Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150 (698): 893-9.

Van der Pauw MT, Van den Bos T, Everts V, Beertsen W., Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor beta1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2000; 71 (1): 31-43.

Vergara JA, Quiñones CR, Nasjleti CE, Caffesse RG., Vascular response to guided tissue regeneration procedures using nonresorbable and bioabsorbable membranes in dogs. *J Periodontol.* 1997; 68 (3): 217-24.

Wikesjö UM, Razi SS, Sigurdsson TJ, Tatakis DN, Lee MB, Ongpipattanakul B, Nguyen T, et al., Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human transforming growth factor-beta1 on guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1998; 25 (6): 475-81.

Wikesjö UM, Selvig KA, Zimmerman G, Nilvéus R., Periodontal repair in dogs: healing in experimentally created chronic periodontal defects. *J Periodontol.* 1991; 62 (4): 258-63.

Wikesjö UME, Selvig KA., Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol 2000* 1999; 19: 21-39.

Wozney JM., The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev.* 1992; 32 (2): 160-7.

Yao Z, Lafage-Proust MH, Plouet J, Bloomfield S, Alexander C, Vico L., Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF. *Journal of Bone Mineral Research* 2004; 19: 1471-1480.

Yoshino H, Morita I, Murota SI, Ishikawa L., Mechanical stress induces production of angiogenic regulators in cultured human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol Res* 2003; 38: 405-410.

Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ., Expression of growth factors in early wound healing in rat skin. *Lasers Surg Med.* 1994; 15 (3): 281-9.