

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**JOÃO PAULO LIMA MACHADO**

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA AÇÃO DO  
B - TRICÁLCIO FOSFATO (CERASORB<sup>®</sup>) PARA  
PREENCHIMENTO DE DEFEITOS  
PERI-IMPLANTARES CRÍTICOS**

BAURU

2016

**JOÃO PAULO LIMA MACHADO**

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA AÇÃO DO  
B - TRICÁLCIO FOSFATO (CERASORB<sup>®</sup>) PARA  
PREENCHIMENTO DE DEFEITOS  
PERI-IMPLANTARES CRÍTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Centro de Ciências da  
Saúde como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de bacharel em  
Odontologia, sob a orientação da Profa.  
Dra. Pâmela Leticia dos Santos.

BAURU

2016

Machado, João Paulo Lima

M1491a

Avaliação imuno-histoquímica da ação do B - Tricálcio Fosfato (cerasorb®) para preenchimento de defeitos peri-implantares críticos / João Paulo Lima Machado. -- 2016.

33f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Pâmela Letícia dos Santos.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em - Odontologia) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Implante Dentário. 2. Substitutos ósseos. 3. Osseointegração. I. Santos, Pâmela Letícia dos. II. Título.



## ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de João Paulo Lima Machado.

Ao dezenove de outubro de dois mil e dezesseis, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de João Paulo Lima Machado intitulado: "**Avaliação imuno-histoquímica da ação do  $\beta$ -tricalcio fosfato (cesasorb®) para preenchimento de defeitos peri-implantares críticos**". Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Pâmela Letícia dos Santos, Dra. Jéssica Lemos Gulinelli e Dra. Luciana Monti Lima Rivera. Após a exposição oral, o candidato foi arguido pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, APROVADO, com a nota 10,0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segues assinada pelo Orientador e pelos demais membros da banca.

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Pâmela Letícia dos Santos (Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Jéssica Lemos Gulinelli (Avaliador 1)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Luciana Monti Lima Rivera (Avaliador 2)

Dedico este Trabalho de Conclusão de curso à minha família, por sempre me apoiar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada. À Prof<sup>a</sup>. Dra. Pâmela Leticia dos Santos, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, e me deu forças não somente na vida universitária, mas em todos obstáculos já superados.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional, que não mediram esforços para que esse sonho fosse realizado. Obrigado meus irmãos, que tanto me apoiaram nos momentos difíceis.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Pâmela Leticia dos Santos, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho, e a me ajudar com todas as minhas dúvidas.

Meus agradecimentos aos amigos, companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação.

À Instituição pelo ambiente criativo e amigável que proporciona. A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, muito obrigado.

“Os dias prósperos não vem por acaso,  
nascem de muita fadiga e persistência.”  
(Henry Ford).

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a efetividade do  $\beta$ -fosfato tricálcio no processo de reparo de defeitos peri-implantares, por meio da análise imuno-histoquímica. Quinze coelhos receberam 1 ostectomia em cada tíbia por meio de trefina de 6.1 mm de diâmetro. Em seguida, foram utilizadas as fresas lança e helicoidais no preparo dos leitos receptores e 1 implante foi instalado. Os defeitos ósseos foram preenchidos de acordo com os grupos: CO-coágulo sanguíneo; CERA -  $\beta$ -fosfato tricálcio (Cerasorb<sup>®</sup>). Os animais foram submetidos a eutanásia nos períodos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Em seguida, os espécimes foram submetidos ao processamento laboratorial de rotina e realizou-se a análise imuno-histoquímica para a expressão das proteínas osteoprotegerina (OPG), ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANK-L) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Os resultados mostraram que na comparação intragrupos, a expressão da OPG, no grupo CO foi diferente estatisticamente entre os períodos de 15 e 60 dias e 30 e 60 dias ( $p \leq 0,001$ ), observando menor expressão no período final. Já no grupo CERA, o período inicial apresentou maior expressão em relação 30 e 60 dias ( $p \leq 0,001$ ). Na avaliação intergrupos para essa proteínas, nos períodos de 15 e 60 dias, houve diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,002$ ), observando maior expressão para o grupo do biomaterial. A expressão de RANK-L, no grupo CO manteve-se em equilíbrio nos períodos estudados, em contrapartida, no grupo CERA houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 15 e 60 dias ( $p=0,04$ ). Na comparação entre os grupos, a expressão de RANK-L para o período de 15 dias, mostrou-se maior estatisticamente no grupo CERA quando comparada ao CO ( $p= 0,002$ ). No balanço da expressão da TRAP, no grupo CO, o período de 30 dias apresentou-se menor, com diferença estatisticamente significativa, quando comparado com os grupos 15 e 60 dias ( $p \leq 0,001$ ). O grupo CERA, mostrou-se em equilíbrio, sem diferença estatística na comparação entre os períodos estudados. Na avaliação estatística intergrupos, notou-se diferença estatística, no período de 30 dias, sendo que a expressão de TRAP foi maior no grupo CERA ( $p = 0,026$ ). Com esse estudo pode-se concluir que o biomaterial não foi totalmente degradado no período de 60 dias.

**Palavras-chave:** Implante Dentário. Substitutos ósseos. Osseointegração.

## ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the effectiveness of B-tricalcium phosphate in the repair process peri-implant defects in the tibia of rabbits by immunohistochemistry analysis. Fifteen rabbits received one in each tibia osteotomy through trephine 6.1mm in diameter. Then we used the spear and helical cutters in the preparation of receptors beds and 1 implant was installed. Bone defects were filled according to the groups: I- blood cut; II B-tricalcium phosphate (Cerasorb®). The animals were euthanized at 15, 30 and 60 days postoperatively. In a previous project was carried out immediately after euthanasia, the biomechanical analysis. Then the specimens were submitted to a routine of processing and held histological analysis. Due to the results found in the above analysis, justified the need for the immunohistochemistry analysis for the expression of osteoprotegerin protein (OPG), ligand activator of nuclear factor receptor kb (RANK-L) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). The results showed that in comparison with intragroup comparisons over, the expression of OPG, in the group CO was different statistically between the periods of 15 and 60 days, and 30 and 60 days ( $p \leq 0,001$ ), with lower expression in the final period. Already in the group CERA, in the initial period showed higher expression in terms of 30 and 60 days ( $p \leq 0,001$ ). In assessing intergroup for this protein in the periods of 15 and 60 days, there was a statistically significant difference ( $p = 0,002$ ), observing higher expression for the biomaterial group. RANK-L expression in the CO group remained in balance during periods studied. The CERA group was no statistically significant different between the periods of 15 and 60 days ( $p = 0,04$ ). Comparing the groups, RANK-L expression for the period of 15 days was higher statistically in the CERA group, compared to CO ( $p = 0,002$ ). In the balance of the expression of TRAP, the CO group, the 30 days period was lower, with the 15 and 60 days groups ( $p \leq 0,001$ ). CERA group, proved to be in balance, with no statistical difference when comparing the two periods. In the statistical evaluation groups, there was no statistical difference in the period of 30 days, being that the expression of TRAP was higher in the group CERA (0,026). With this study we conclude that the biomaterial has not been totally degraded in the period of 60 days

**Keywords:** Dental Implants. Bone substitute. Osseointegration.

## SUMÁRIO

1.Introdução	11
2 Objetivos	13
3 Material e Métodos	14
4 Resultados	18
5 Discussão	27
6.Conclusão	29
Referências	30
Anexo	33

## 1. INTRODUÇÃO

A extração dentária tem como consequência a reabsorção significativa do rebordo alveolar (Mardas et al. 2010). Imediatamente após a exodontia, o alvéolo é preenchido por coágulo sanguíneo, o qual estimula a formação óssea. Contudo, o processo de reparo alveolar não resulta na restituição completa do volume ósseo original devido à reabsorção fisiológica (Brokovic et al. 2012). Pesquisas evidenciam que no período de 6 a 12 meses após a extração, o rebordo alveolar reduz aproximadamente de 0,34 a 7,7 milímetros na dimensão horizontal, e 0,22 a 3,25 na dimensão vertical, e essa redução é mais acentuada nos primeiros 3 meses (Shi et al. 2007).

Nestas áreas de reabsorção óssea torna-se difícil a obtenção de resultados estéticos e funcionais satisfatórios quando é realizada a instalação de implantes tardios (Buser et al. 1996; Shi et al. 2007). Para suprir essa limitação, em 1976, os pesquisadores Schulte & Heimke descreveram a instalação de implantes em alvéolos frescos, nomeando esse procedimento de implante imediato. Esse tipo de cirurgia além permitir a estabilidade primária do dispositivo de titânio, possui a vantagem de reduzir o tempo de reabilitação e o número de procedimentos cirúrgicos (Botticelli et al. 2003; Botticelli et al. 2008). No entanto, após a extração dentária o alvéolo pode apresentar um diâmetro maior que o diâmetro do implante dental, resultando em um gap marginal entre o implante e o osso hospedeiro (Botticelli et al. 2003). Em 1977, Schenk & Willenegger, realizaram um estudo em coelhos, e concluíram que nos gaps maiores que 1 milímetro, entre o implante e o osso marginal, não há formação óssea completa.

Com a finalidade de preservar as dimensões do rebordo alveolar, o enxerto autógeno é a primeira opção de tratamento. No entanto, a limitada disponibilidade de tecido e o aumento do tempo e número de intervenções torna questionável esta opção de tratamento, principalmente em casos de grandes reconstruções (Gotfredsen et al. 1991; Piattelli et al. 1997; Becker et al. 1998; Trejo et al. 2000). Esses motivos incentivam a busca por substitutos ósseos, que devem permitir o crescimento das células osteoblásticas em sua superfície, possuir porosidade suficiente para penetração das células, induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ativos e, conseqüentemente, promover a substituição gradual pelo osso primário (Brokovic et al. 2012).

Dentre os materiais aloplásticos, encontra-se o Cerasorb<sup>®</sup> que é composto por uma cerâmica  $\beta$ -tricálciofosfato ( $\beta$ -TCP), relativamente nova no mercado, que apresenta multiporosidade aberta e interconectada, porosidade total de 65% e estrutura granular poligonal (Neamat et al., 2009). Segundo informações do fabricante, os grânulos do material apresentam elevada aspereza o que contribui de forma significativa para a invasão por células osteoblásticas e fluidos teciduais, acelerando o processo de ossificação. Entretanto, na literatura são escassos os trabalhos avaliando as reações teciduais, bem como o potencial osteocondutivo de cerâmicas  $\beta$ -TCP de multiporosidade interconectada (Neamat et al., 2009; Luvizuto et al, 2011).

O tecido ósseo realiza processos regenerativos altamente regulados, durante seu crescimento, desenvolvimento e manutenção (Nijweide et al. 1986). Estão ativamente envolvidos nestes processos e exercem atividade direta sobre células com atividade osteoblástica e osteoclástica, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica, as proteínas, os hormônios, os fatores de crescimento e as citocinas, (Ducy et al. 2000). Nesse contexto destaca-se a presença de proteínas da matriz extracelular, que são conhecidas por desempenharem uma importante função na atividade celular ao redor dos implantes e, conseqüentemente, na osseointegração (Rammelt et al. 2004).

Dentre essas proteínas destacam-se a osteoprotegerina (OPG), o ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANK-L) e a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) essas são expressas por osteoclastos, sendo essenciais na regulação da atividade osteoclástica. (Ducy et al. 2000; Rammelt et al. 2004).

A proteína importante na dinâmica tecidual óssea é a osteoprotegerina (OPG), também conhecida como fator inibitório de osteoclastogênese. A OPG é secretada por osteoblastos, fibroblastos e linfócitos T. Esta proteína é considerada reguladora da formação e atividade de osteoclastos e sua presença está envolvida com a inibição da reabsorção óssea (Crotti et al. 2004). Ela atua como um receptor decodificador por ligação e neutralização da RANK-L, inibindo a maturação e a reabsorção óssea osteoclástica e, portanto, regula a densidade óssea (Rogers & Eastell 2005).

O ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANK-L), é constituinte da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). Alguns tipos celulares expressam esta proteína, incluindo osteoblastos e linfócitos T ativados (Rogers

&Eastell 2005). Considerando que OPG e RANK-L têm funções opostas, a análise da expressão relativa das mesmas permite avaliar a tendência ao estímulo ou inibição da formação e da atividade osteoclástica e, conseqüentemente, influencia a remodelação óssea (de Souza Faloni et al. 2011).

A fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) consiste de uma enzima encontrada nas células de origem osteoclástica e eritrócitos, liberadas durante a reabsorção óssea e após o afastamento dos osteoclastos do seu local de atuação, sendo utilizada como importante marcador da atividade osteoclástica (Schwarz & O'Keefe 2000).

Tendo em vista a dinâmica do processo de reparo ósseo e a necessidade de seu melhor entendimento associado ao uso de substitutos ósseos, considera-se relevante avaliar os defeitos peri-implantares, criados em tibia de coelhos, preenchidos por coágulo sanguíneo e Cerasorb<sup>®</sup>, por meio das análises imunohistoquímica. Frente as observações histológicas de células gigantes multinucleadas em contato com grânulos de Cerasorb<sup>®</sup>, em cortes corados com hematoxilina e eosina (obtidos em resultados preliminares pela professora responsável do projeto), o objetivo deste estudo foi definir se essas células gigantes são osteoclastos ou células gigantes de corpo estranho, para isso serão realizadas reações imunohistoquímicas, contribuindo com a elucidação do processo de degradação do Cerasorb<sup>®</sup> *in vivo*.

## **2. OBJETIVOS**

### *2.1 Objetivo geral*

Avaliar os defeitos peri-implantares criados em tibia de coelhos preenchidos por coágulo sanguíneo e  $\beta$ -tricalcio fosfato (Cerasorb<sup>®</sup> M, Curassan Ltd., Alemanha), por meio da análise imunohistoquímica.

### *2.2 Objetivo específico*

Analisar a expressão das proteínas OPG, RANK-L e TRAP em defeitos peri-implantares criados em tibia de coelhos preenchidos por coágulo sanguíneo e  $\beta$ -tricalcio fosfato (Cerasorb<sup>®</sup> M, Curassan Ltd., Alemanha), por meio da análise estatística, com o intuito de elucidar o processo de degradação do biomaterial.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados 15 coelhos machos brancos (Nova Zelândia), variação albinus, com idade de aproximadamente 5 meses e peso corporal entre 3 e 4 Kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta padrão, ração sólida (Procoelho, Primor) e água “ad libitum”, exceto no período de oito horas antecedentes ao ato cirúrgico. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (protocolo número 02388-2011).

#### 3.2 Procedimento cirúrgico

A etapa cirúrgica foi realizada sob sedação, administrando-se por via intramuscular a combinação de 50mg/kg de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Após a anestesia local do animal, foi realizada tricotomia nas tíbias direita e esquerda, seguida de rigoroso protocolo asséptico com o uso de Polivinil Pirrolidona, iodo Tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto).

Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tóquio, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha), foi realizada uma incisão de 3 cm de comprimento na porção medial das tíbias, até a base óssea e, a seguir, o tecido mole foi divulsionado e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo-se, deste modo, o osso para receber os implantes.

O preparo dos leitos receptores foi iniciado com uma trefina de 6.1 mm para delimitar a localização dos implantes e remover a primeira cortical óssea. Em seguida, no centro do orifício de 6.1 mm, foram utilizadas as fresa lança, fresa de 2.0 mm, piloto de 2.0/3.0 mm e fresa de 3.0 mm passando pela segunda cortical, seqüencialmente, na velocidade máxima de perfuração de 1200 RPM, com irrigação constante por meio de solução de cloreto de sódio a 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) durante toda a preparação.

Posteriormente foi instalado 1 implante de 4,1 mm/8,5 mm cônicos (SIN – Sistemas de Implantes – São Paulo – Brasil), na porção medial das tíbias, com um torque de 40N, com o auxílio de motor e contra-ângulo, totalizando 30 implantes (Betoni et al. 2011; Queiroz et al., 2012).

Os defeitos foram preenchidos por: (1) coágulo sangüíneo e (2) Cerasorb® (M, Curassan Ltd., Alemanha). Os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo, obtendo-se o fechamento primário da ferida. Após a sutura novamente foi realizada a anti-sepsia da área com Polivinil Pirrolidona, iodo Tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto).

No pós-operatório os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1mL/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) com uma dose no pós-operatório imediato e outra dose após 5 dias e de Dipirona Sódica(1mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil) totalizando 3 doses. Nenhuma restrição alimentar ou de movimentação foi imposta aos animais, os quais foram mantidos em gaiolas individuais, durante todo o experimento.

Nos períodos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, os animais foram submetidos a eutanásia por meio de pentobarbital 200mg/kg.

### *3.3. Processamentos Histológico*

Após a remoção dos implantes por torque-reverso, as amostras de tíbia, contendo a região de interface osso/implante, foram removidas e imersas em formalina neutra tamponada a 10%, durante 48 horas. Em seguida, foi realizada a descalcificação das mesmas em ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) a 5%, por 3 meses, à temperatura ambiente, respeitando as trocas semanais. Finalizado o processo de descalcificação, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, e em seguida submetidas à técnica de rotina para inclusão em parafina Histosec® (parafina + resina). Para inclusão, procedeu-se a desidratação das amostras em 3 banhos de soluções de etanol 100% (dois banhos de por 4 horas,

seguido de um banho de 12 horas). Em seguida as amostras desidratadas passaram por 3 banhos de 1 hora em soluções de xilol, e por fim foram incluídas em parafina para confecção dos blocos.

### *3.4 Análise Imuno-histoquímica*

Para a análise imuno-histoquímica foram utilizados os seguintes anticorpos primários: osteoprotegerina (OPG, Goat anti-OPG - Santa Cruz Biotechnology, SC21038), ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANKL, Goat anti-RANKL - Santa Cruz Biotechnology, SC7627) e fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP, Goat anti-TRAP – Santa Cruz Biotechnology).

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido longitudinal (paralelo ao longo eixo do defeito peri-implantar), de 6  $\mu$ m de espessura, utilizando-se um micrótomo Leica Jung RM 2045. Os cortes da parafina com tecido foram colocados em água a  $\pm 45^{\circ}\text{C}$ , para a parafina derreter e liberar o tecido, dessa forma os mesmos poderão ser “pescados” com as lâminas embebidas em Albumina (50% glicerina / 50% clara de ovo).

Em seguida, os cortes histológicos foram desparafinados em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, e posteriormente passaram por três banhos de xilol de 5 minutos cada, três banhos de etanol absoluto de 2 minutos cada e um banho em etanol 70% de 2 minutos, para hidratação. Subsequentemente, as lâminas foram submetidas a 3 banhos de PBS (tampão fosfato salina) de 1,5 minutos cada (totalizando 5 minutos). Para o preparo de 2 litros da solução de PBS, utiliza-se 100 ml PB 0.2M, 17,52 g de NaCl, 400 mg KCL e 1900 ml H<sub>2</sub>O (osmose reversa). A solução de PB 0.2M foi preparada com a associação de 3,17g de fosfato de sódio monobásico, 13,7g de fosfato de sódio dibásico e 500ml H<sub>2</sub>O (osmose reversa). (Cuello, 1993).

Feito isso, as lâminas foram imersas em uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (20mL) associada com PBS sem Triton (180mL), por 45 minutos, no escuro. Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS + Triton por 5 minutos ( 3 banhos de 1,5 minuto cada). Então, os cortes foram colocados no tampão citrato e aquecidos a temperatura de  $55^{\circ}\text{C}$ , por 20 minutos. Em seguida, aguardou-se 20 minutos para o resfriamento natural do material, em temperatura ambiente.

Subsequentemente, os cortes foram submetidos ao bloqueio das proteínas do soro com solução de leite em pó Molico<sup>®</sup> desnatado (Nestlé Brasil Ltda, Araçatuba,

São Paulo, Brasil) por 20 minutos. O preparo do leite foi realizado com a mistura de 8g de leite em pó com 200mL de H<sub>2</sub>O destilada. Removido o excesso de solução bloqueadora, os cortes foram limitados com caneta hidrofóbica e cobertos com anticorpo primário específico diluído na proporção 1:50 µl com diluidor de anticorpo ADS-125 (Spring Bioscience Corporation, CA, USA), e incubados pelo período de 18 hora em câmara úmida, escura e em temperatura ambiente.

Após incubação, os cortes foram lavados com com PBS + Triton duas vezes por 5 minutos e incubados com anticorpo secundário diluído 50 µL ( conforme descrito na bula), por 1 hora em temperatura ambiente . O método de detecção foi pela imunoperoxidase, utilizando-se como anticorpo secundário o anticorpo biotilado anti-cabras e produzido em burros (Jackson Immunoresearch), sendo posteriormente lavados por 5 minutos em PBS + Triton (3 vezes de 1,5 minuto, com total de 5 minutos).

Depois de 15 minutos (faltando 45 minutos para completar 1 hora) iniciou-se preparo o complexo Avidina/Biotina (Vector Laboratories), o qual foi utilizado para a amplificação do sinal. Para a revelação dos sítios antigênicos, os cortes foram expostos à solução de cromógeno DAB (solução líquida de 3,3'-diaminobenzidine, Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) por um período de 5 minutos. Em seguida, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris por 2 minutos, lavagem por 10 minutos em água corrente e passaram por banhos de álcoois e xilol. Após a seqüência foi realizada a montagem das lâminas. Para isto, foi utilizada gaze para a limpeza ao redor do material na lâmina, colocado uma gota de Permout e então a lamínula sobre o material e pressionado para colagem e de forma a evitar bolhas entre a lâmina e a lamínula.

Foram realizados procedimentos de controle negativo por meio da omissão dos anticorpos primários. A cortical inferior da tíbia dos coelhos foi utilizada como controle positivo, a fim de verificar a efetividade dos anticorpos utilizados.

A expressão das proteínas foi analisada na região das espiras do implante, por meio da atribuição de escores, hiperpositivo, superpositivo, positivo e negativo, de acordo com a metodologia previamente descrita (Queiroz et al. 2008; Santos et al., 2013). Foi obtida também a razão RANK-L:OPG para avaliar a tendência à inibição ou estímulo à formação osteoclastos, nos diferentes grupos, de acordo com estudos previamente realizados (de Souza Faloni et al. 2011; Santos et al., 2013).

A comparação de cada grupo entre si nos diferentes períodos, bem como a comparação dos diferentes grupos para cada período, foi realizada por meio do teste estatístico de análise de variância para a comparação de médias percentuais de marcações celulares, adotando-se o nível de significância de 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 OSTEOPROTEGERINA (OPG)

No grupo CO, as imunomarcações observadas para OPG foram mantidas entre o nível positivo para os períodos de 15 e 30 dias (Média  $\pm$  Desvio Padrão =  $2 \pm 0$ ), e negativo para o período de 60 dias ( $1 \pm 0$ ), sendo confirmada uma diferença estatística significativa entre os períodos 15 e 60 dias, e entre 30 e 60 dias, em ambos, o valor de  $p \leq 0,001$  (Gráfico 1 e Figura 1).

Em contrapartida no grupo CERA, observou-se que as marcações de OPG que variam de superpositivo, para o período de 15 dias ( $3 \pm 0$ ), a positivo para os períodos de 30 e 60 dias ( $2 \pm 0$ ). Após a aplicação do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls, constatou uma diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ) entre os períodos de 15 e 30 dias, bem como entre 15 e 60 dias, sendo maior a expressão dessa proteína no período de inicial (Gráfico 1, e Figura 1).

Na comparação intergrupos, pelo teste de Mann-Whitney, nos períodos de 15 e 60 dias, houve diferença estatisticamente significativa com  $p = 0,002$ , com valores absolutos maiores para o grupo CERA. Já no período de 30 dias, ambos grupos apresentaram escores positivo para expressão de OPG, sem diferença estatística (Gráfico 1 e Figura 1).

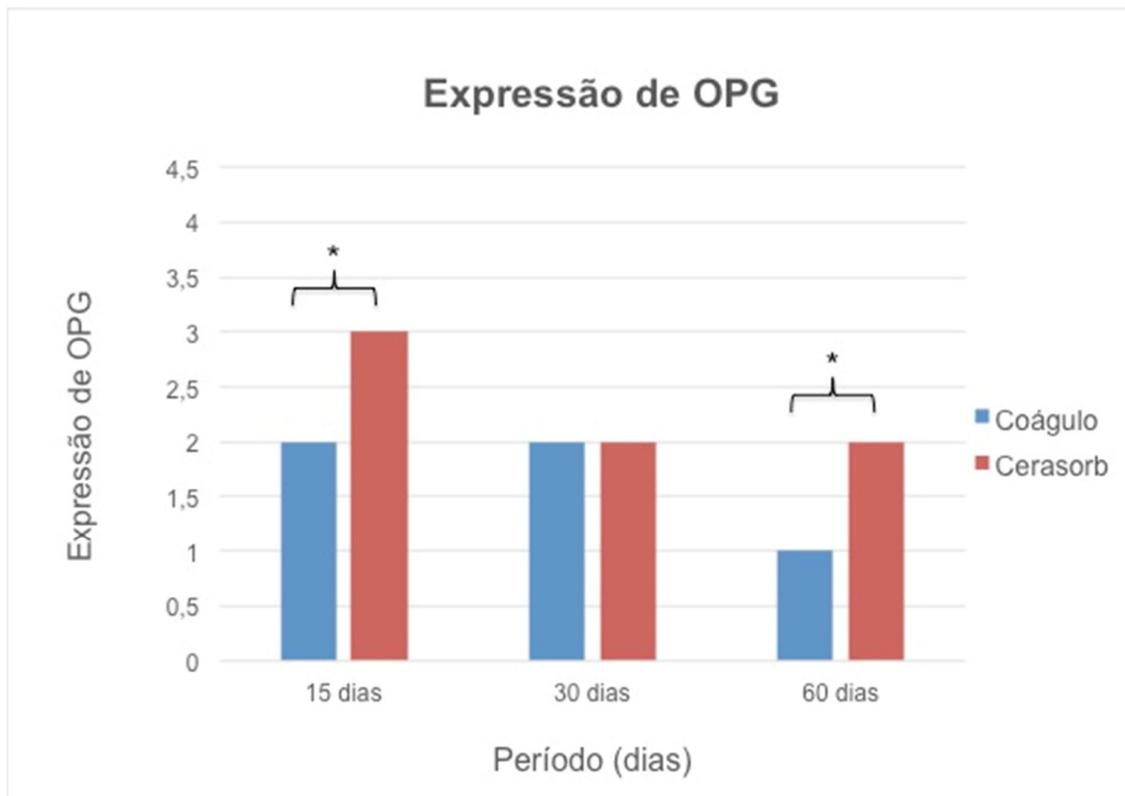


Gráfico 1 - Representação gráfica do balanço da expressão de OPG pelo período de tempo. (Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls –  $p < 0,05$ ). 15 e 60 dias: \*CO  $\neq$  CERA

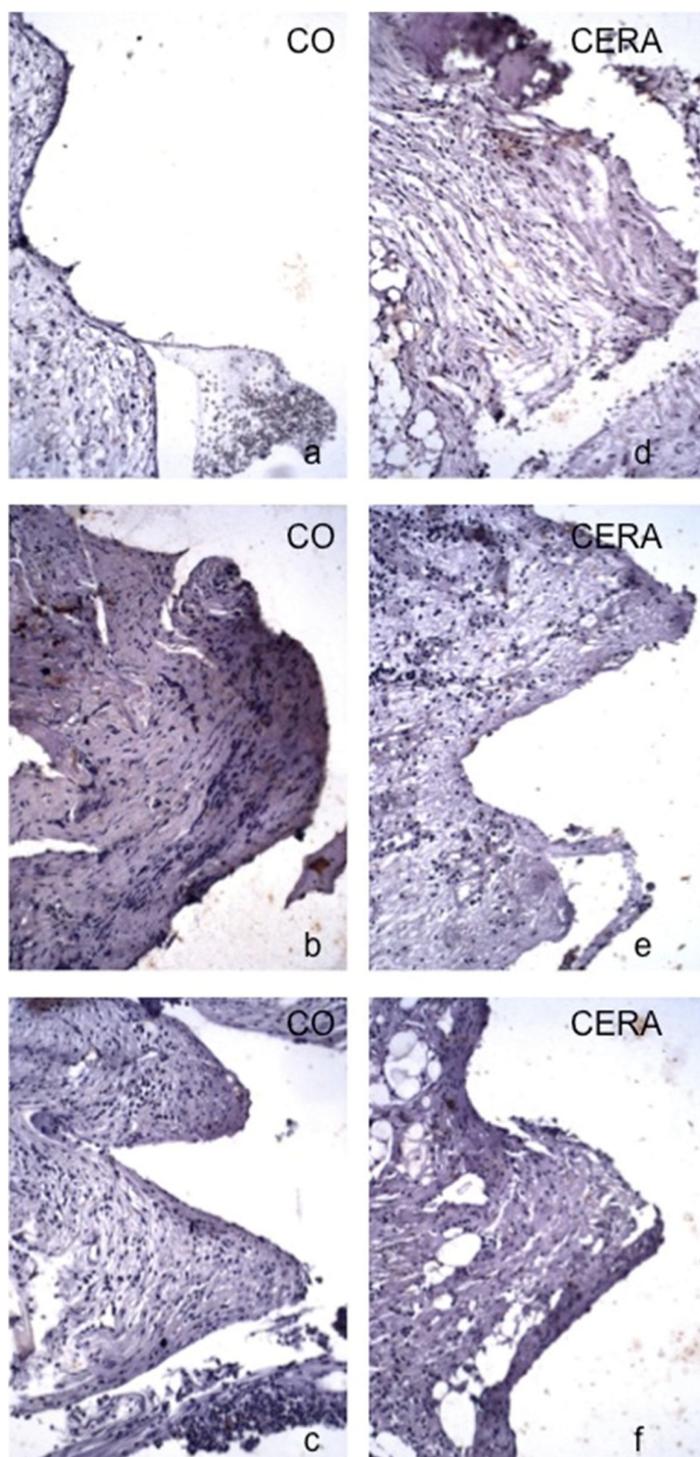


Figura 1 - Fotomicrografias de cortes Imuno-histoquímicos representando a expressão de OPG, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (5A-5C) e CERA (5D-5F), nos períodos de 15 ( 5a e 5d) 30 (5b e 5e) e 60 (5c e 5f) dias. (aumento de 200 X).

#### 4.2 LIGANTE DO RECEPTOR ATIVADOR DO FATOR NUCLEAR K $\beta$ (RANK-L)

As imunomarcações observadas RANK-L, no grupo CO, foram mantidas entre os níveis negativo e positivo. Os valores relacionados à expressão dessas proteínas foram comparados e nos períodos 15, 30 e 60 dias, não apresentaram diferença estatística significativa.

No grupo CERA, a expressão de RANK-L reduziu gradativamente em relação ao aumento do período, variando os níveis de imunomarcações de hiperpositivo para negativo. Observou-se diferença estatisticamente significativa somente entre os períodos de 15 e 60 dias, com  $p=0,04$ .

Na comparação entre os grupos, a expressão de RANK-L para o período de 15 dias, mostrou-se maior estatisticamente no grupo CERA quando comparada aos grupo CO ( $p= 0,002$ ). Já nos período de 30 e 60 dias não houve diferença estatística, mantendo um equilíbrio da expressão dessa proteína entre os grupos. Contudo, pela avaliação gráfica pode-se notar um discreto aumento da expressão dessa proteína no período de 30 dias em relação ao de 60 dias (Gráfico 2 e Figura 2).

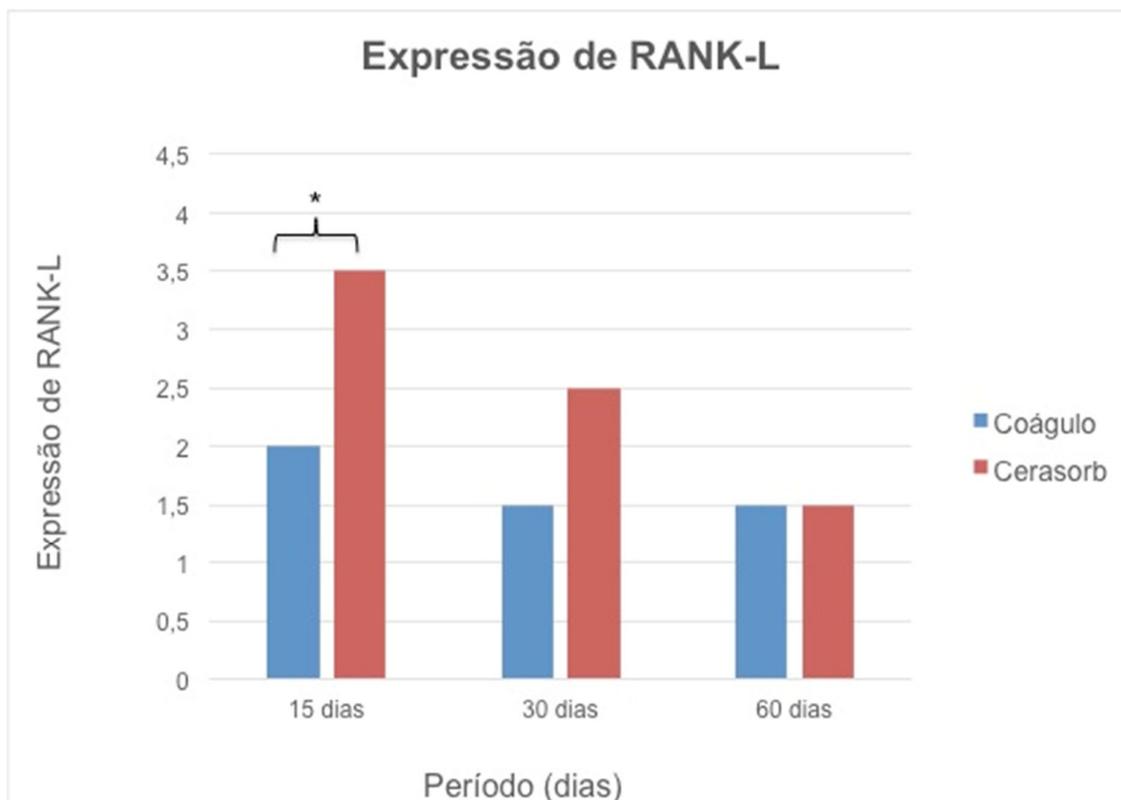


Gráfico 2 - Representação gráfica do balanço da expressão de RANK-L pelo período de tempo. (Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls –  $p < 0,05$ ). 15 dias: \*CO  $\neq$  CERA.

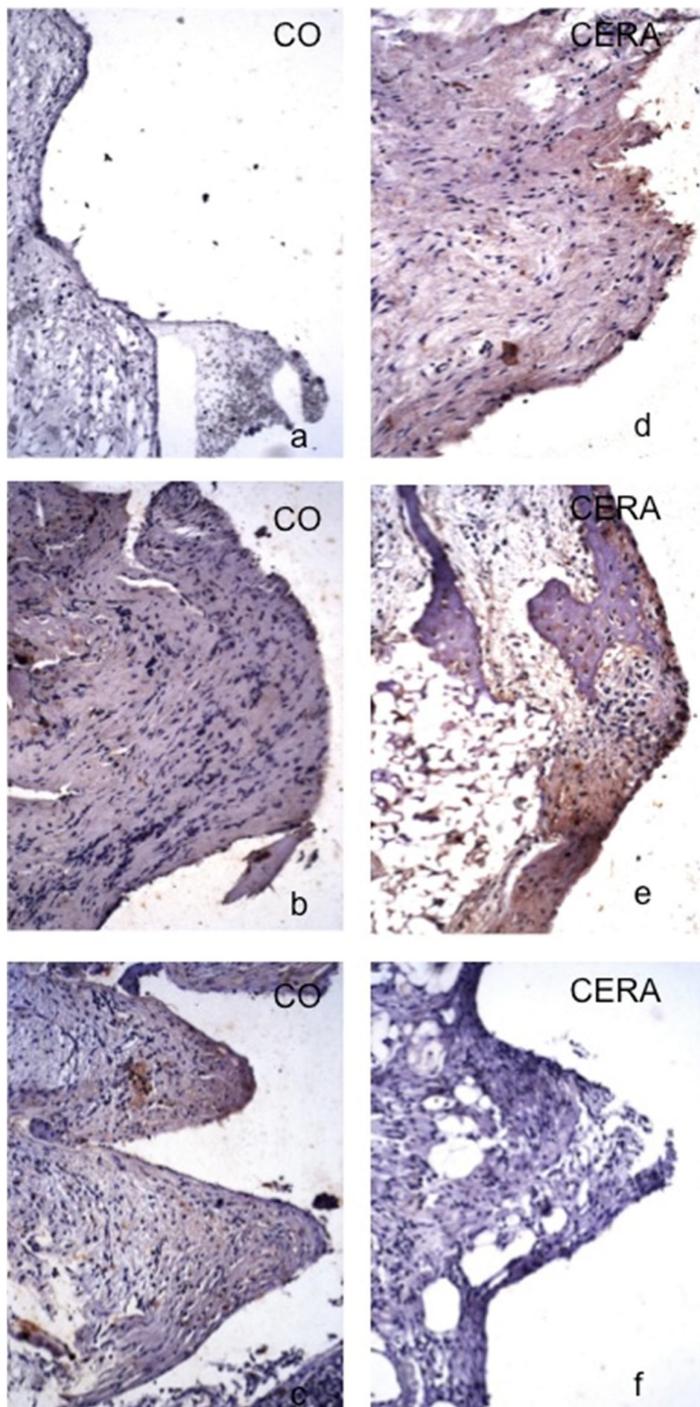


Figura 2 Fotomicrografias de cortes Imuno-histoquímicos representando a expressão de RANKL, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (6A-6C) e CERA (6D-6F), nos períodos de 15 (6a e 6d) 30 (6b e 6e) e 60 (6c e 6f) dias. (aumento de 200 X).

A razão RANK-L/OPG não apresentou diferenças estatística entre os grupos. No entanto, o grupo CO apresentou uma tendência à menores valores dessa razão em relação ao grupo CERA, no período de 30 dias, fato que se inverteu no período de 60 dias. (Tabela 01).

	CO	CERA
15 dias	1,0	1,16
30 dias	0,75	1,25
60 dias	1,5	0,75

*Tabela 1 - Razão entre RANK-L: OPG.*

#### **4.3 FOSFATASE ÁCIDA TARTARATO-RESISTENTE (TRAP)**

Em relação à TRAP, no grupo CO, o período de 30 dias apresentou-se menor, com diferença estatisticamente significativa, quando comparado com os grupos 15 e 60 dias ( $p \leq 0,001$ ).

A expressão da TRAP, no grupo CERA, mostrou-se em equilíbrio, não apresentando diferença estatística na comparação entre os períodos estudados. No balanço da expressão da TRAP, pela avaliação estatística foi encontrada diferença estatística entre os grupos somente no período de 30 dias, sendo que no grupo CERA a expressão de TRAP foi maior ( $p = 0,026$ ) ( Grafico 3 e Figura 3).

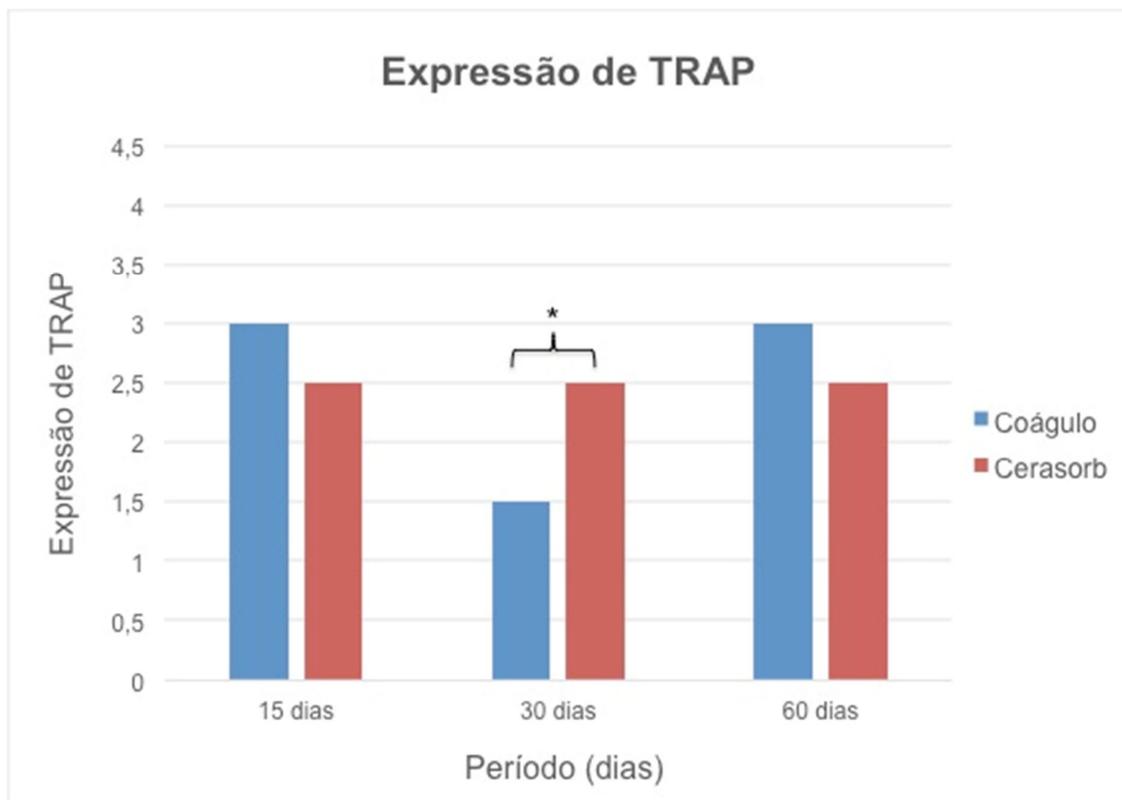


Gráfico 3 - Representação gráfica do balanço da expressão de TRAP pelo período de tempo. (Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls –  $p < 0,05$ ). 30 dias: \*CO  $\neq$  CERA.

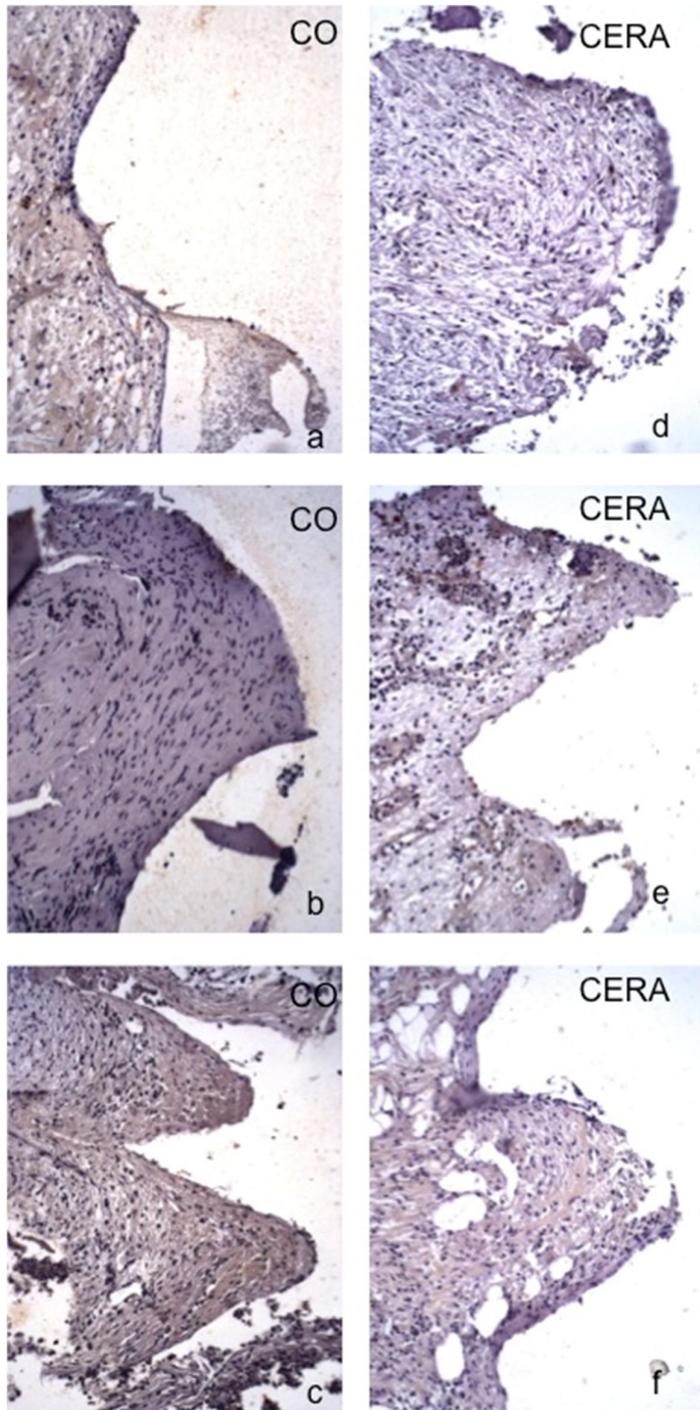


Figura 3 - Fotomicrografias de cortes Imuno-histoquímicos representando a expressão de TRAP, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (7a-7c) e CERA (7d-7f), nos períodos de 15 (7a e 7d) 30 (7b e 7e) e 60 (7c e 7f) dias. (aumento de 200 X).

## 5. DISCUSSÃO

O processo de reparo ósseo em defeitos peri-implantares preenchidos com biomateriais, são amplamente pesquisados em modelo experimental animal (Araújo et al., 2011; Botticelli et al., 2003; Park et al. 2011), e em humanos.(Zerbo et al., 2001; Botticelli et al., 2008), por meio de análises clínica, histológica, imaginológica e imuno-histoquímica. Neste estudo, optou-se pela porção medial da tíbia de coelhos, como modelo experimental, pois essa área está localizada distante do centro de crescimento, a metafise tibial.

O preenchimento dos alvéolos frescos com biomaterial e implante dentário é indicado com o objetivo de preservar as dimensões do rebordo alveolar e promover o reparo, bem como favorecer a osseointegração, restauração funcional e estética do sistema estomatognático. (Akimoto et al., 1999; Mardas et al., 2010; Araújo et al., 2011; Botticelli et al., 2008; Queiroz et al., 2012). Dessa forma o intuito desse trabalho foi analisar o processo de reparo ósseo ao redor do implante dentário em áreas preenchidas com coágulo sanguíneo e Cerasorb<sup>®</sup>.

Estudo realizado em coelhos, relatou comprometimento na formação óssea em defeitos peri-implantares com dimensões iguais/maiores que 1mm (Schenk e Willeneger, 1997). Todavia, Carlsson e colaboradores (1988), utilizando modelo similar, concluíram que esse comprometimento na formação óssea ocorre em defeitos iguais/maiores 0,85 mm. Corroborando com as pesquisas supracitadas nesse trabalho foi confeccionado um defeito peri-implantar cujo diâmetro cervical foi 1 mm, simulando assim a instalação de um implante dentário em um alvéolo fresco de extração.

A análise imuno-histoquímica fornece importantes informações em relação a dinâmica do comportamento celular, de acordo com a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo ósseo durante o processo de osseointegração. As proteínas analisadas neste estudo foram OPG, RANKL e TRAP.

A OPG é considerada uma proteína reguladora da formação e atividade de osteoclastos. Sua presença está envolvida com a inibição da reabsorção óssea (Woo et al. 2002; Crotti et al. 2004). O padrão da expressão dessa proteína apresentou-se maior no grupo CERA comparado ao CO, nos períodos de 15 e 60 dias. Demonstrando que nesses períodos há uma maior inibição da reabsorção óssea no grupo do biomaterial.

Em contrapartida, a expressão da proteína RANK-L está envolvida com a ativação da reabsorção óssea. Os resultados dessa pesquisa mostraram que no período de 15 dias, o grupo CERA apresentou maior expressão dessa proteína, em relação ao CO, indicando que aos 15 dias há uma maior reabsorção no grupo do biomaterial.

Considerando que OPG e RANK-L têm funções opostas, a análise da expressão relativa das mesmas permite avaliar a influência a remodelação óssea (Suda et al. 1999). Dessa forma foram realizadas as razões RANK-L/OPG, nos períodos estudados, os resultados mostraram que o grupo CO apresentou uma tendência à menores valores dessa razão em relação ao CERA, para 15 e 30 dias, porém, no período de 60 dias esse resultado se inverteu.

A TRAP é uma proteína que está relacionada com a reabsorção óssea, sendo utilizada como importante marcador da atividade osteoclástica (Schwarz & O'Keefe, 2000). Os resultados dessa pesquisa mostram que o grupo CERA possui maior expressão dessa proteína, no período de 30 dias, indicando há uma intensa reabsorção óssea no grupo do biomaterial.

Os osteoclastos TRAP-positivos foram encontrados, em todos os períodos, próximos e em contato com os grânulos do Cerasorb<sup>®</sup>, sugerindo que estas células sejam responsáveis pela reabsorção do biomaterial (Velard et al, 2013; Marques et al., 2014). Embora a literatura indique que o Cerasorb<sup>®</sup> seja reabsorvido e substituído por osso neoformado (Oliveira, Braga, 2012), no presente estudo, os grânulos de  $\beta$ -TCP estão presentes até o período de 60 dias, resultado semelhante ao observado por Marques e colaboradores, em 2014.

Dessa forma constata-se que no período de 15 dias, há uma maior expressão de OPG e RANK-L no grupo do CERA comparando-o com o CO, estes resultados demonstram que há um equilíbrio no *turnover* ósseo. Esses resultados estão corroborando com a razão RANK-L/OPG, a qual apresenta um discreto estímulo a formação de osteoclasto, e a expressão de TRAP, indicando que há um início de remodelação óssea.

Já no período de 30 dias, a expressão de OPG e RANK-L, foram semelhantes entre os grupos estudados. Porém a razão entre essas proteínas, bem como a maior expressão de TRAP, no grupo CERA, mostrou estimular a formação de osteoclasto e a reabsorção óssea. E no período de 60 dias, houve a inibição da formação de osteoclasto, confirmado pela alta expressão de OPG e razão RANK-L/OPG,

indicando que há redução da reabsorção, esse fato pode ter ocorrido, sugere-se que isso ocorreu pois o biomaterial foi intensamente reabsorvido no período de 30 dias, possuindo menor quantidade do mesmo, no período de 60 dias.

A partir dos resultados imuno-histoquímicos obtidos, foi possível observar que há uma resposta de formação óssea pela imunomarcação para osteoprotegerina para o grupo CERA nos períodos de 15 e 60 dias. No entanto, é importante destacar que a reabsorção óssea, caracterizada pelas imunomarcações de RANKL e TRAP, evidenciam os osteoclastos em atividade, indicando que aos 30 dias, esta resposta foi intensa.

## **6. CONCLUSÃO**

Baseado na metodologia estudada pode-se concluir que:

1. Cerasorb<sup>®</sup> é um biomaterial com propriedades osteocondutoras satisfatórias.
2. Cerasorb<sup>®</sup> não sofreu total degradação em 60 dias.

## REFERÊNCIAS

- Betoni W Jr, Queiroz TP, Luvizuto ER, Valentini-Neto R, Garcia-Júnior IR, Bernabé PF. **Evaluation of centrifuged bone marrow on bone regeneration around implants in rabbit tibia.** *Implant Dent.* 2012;21(6):481-485.
- Botticelli D, Berglundh T, Buser D, Lindhe J. **The jumping distance revisited.** An experimental study in the dog. *Clin Oral Impl Res.* 2003; 14: 35–42.
- Botticelli, D., Renzi, A., Lindhe, J. & Berglundh, T. **Implants in fresh extraction sockets: a prospective 5-year follow-up clinical study.** *Clin Oral Impl Res* 2008;19: 1226-1232.
- Brkovic BM, Prasad HS, Rohrer MD, Konandreas G, Agrogiannis G, Antunovic D, Sándor GK. **Beta-tricalcium phosphate/type I collagen cones with or without a barrier membrane in human extraction socket healing: clinical, histologic, histomorphometric, and immunohistochemical evaluation.** *Clin Oral Invest* 2012;16(2):581-590.
- Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. **Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: A clinical study with 40 partially edentulous patients.** *J Oral Maxillofac Surg* 1996;54:420–432.
- Chen, S. T; Buser, D., **Clinical and esthetic outcomes of implants placed in postextraction sites.** *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2009. 24 Suppl: p. 186-217.
- Chen, S. T., Wilson, T. G., Jr., and Hammerle, C. H., **Immediate or early placement of implants following tooth extraction: review of biologic basis, clinical procedures, and outcomes.** *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2004. 19 Suppl: p. 12-25.
- Clementini, M., Morlupi, A., Agrestini, C., and Barlattani, A., **Immediate versus delayed positioning of dental implants in guided bone regeneration or onlay graft regenerated areas: a systematic review.** *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2013. 42(5): p. 643-50.
- Crotti TN, Smith MD, Findlay DM, Zreiqat H, Ahern MJ, Weedon H, Hatzinikolous G, Capone M, Holding C, Haynes DR. **Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NF- $\kappa$ B, RANK ligand and osteoprotegerin.** *Biomaterials* 2004;25: 565-573.
- Cuello AC. **Immunohistochemistry II.** 1st ed. John Wiley & Sons, Chichester, England: 474.
- De Souza Faloni AP, Schoenmaker T, Azari A, Katchburian E, Cerri PS, de Vries TJ, Everts V. **Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential.** *Calcif Tissue Int* 2011; 88: 63-74.
- Dos Santos PL, Queiroz TP, Margonar R, Gomes de Souza Carvalho AC, Okamoto R, de Souza Faloni AP, Garcia IR Jr. **Guided implant surgery: what is the influence of this new technique on bone cell viability?** *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(3):505-512.
- Ducy P, Schinke T, Karsenty G. **The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance.** *Science* 2000;289: 1501-1504.
- Esposito, M., Grusovin, M. G., Polyzos, I. P., Felice, P., and Worthington, H. V., **Interventions for replacing missing teeth: dental implants in fresh extraction sockets (immediate, immediate-delayed and delayed implants).** *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(9): p. CD005968.
- Felice, P., et al., **Immediate non-occlusal loading of immediate post-extractive versus delayed placement of single implants in preserved sockets of the anterior maxilla: 4-month post-loading results from a pragmatic multicentre randomised controlled trial.** *Eur J Oral Implantol*, 2011. 4(4): p. 329-44.
- Gotfredsen K, Warrer K, Hjorting-Hansen E, Karring, T. **Effect of membranes and hydroxyapatite on healing in bone defects around titanium implants.** An experimental study in monkeys. *Clin Oral Impl Res.* 1991; 2: 172-178.

- Harel, N., Moses, O., Palti, A., and Ormianer, Z., **Long-term results of implants immediately placed into extraction sockets grafted with beta-tricalcium phosphate: a retrospective study.** J Oral Maxillofac Surg, 2013. 71(2): p. e63-8.
- Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. **The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of  $\beta$ -tricalcium phosphate in rat calvaria defects.** Biomaterials 2011; 32(15):3855-3861.
- Mardas N, Chadha V, Donos N. **Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial.** Clin Oral Impl Res.2010; 21: 688–698.
- Muhamad, A.H., Azzaldeen, A., Aspasia, S.A., and Nikos, K., **Implants into fresh extraction site: A literature review, case immediate placement report.** Journal of Dental Implants, 2013. Vol 3(Issue 2).
- Neamat, A. et al.  **$\beta$ -tricalcium phosphate promotes cell proliferation, osteogenesis and bone regeneration in intrabony defects in dogs.** Arch Oral Biol 2009; 54:1083-90.
- Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH. **Cells of bone: Proliferation, differentiation, and hormonal regulation.** Physiology Review1986; 66: 855-886.
- Piattelli A, Podda G, Scarano A. **Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate.** Biomaterials 1997; 18: 623-627.
- Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia-Jr IR, Hochuli Vieira E. **Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis.** J Oral MaxillofacSurg2008;66: 1233-1240.
- Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Luvizuto ER, Margonar R, Garcia I R Jr, Hochuli Vieira E. **Compromised primary implant stability.** J CraniofacSurg2012; 23: e524-528.
- Quirynen, M., Van Assche, N., Botticelli, D., and Berglundh, T., **How does the timing of implant placement to extraction affect outcome?** Int J Oral Maxillofac Implants, 2007. 22 Suppl: p. 203-23.
- Rammelt S, Schulze E, Bernhardt R, Hanisch U, Scharnweber D, Worch H, Zwipp H, Biewener A. **Coating of titanium implants with type-I collagen.** Journal Orthopedic Research 2004;22:1025-1034.
- Rogers A, Eastell R. **Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment.** J ClinEndocrinolMetab 2005; 90: 6323- 6331.
- Santos, P. L., et al., Bone **Substitutes for Peri-Implant Defects of Postextraction Implants.** Int J Biomater, 2013. 2013: p. 307-136.
- Scala, R., Ghensi, P., Cucchi, A., and Pistoia, E., **Postextraction implant placement with immediate provisionalisation and finalisation, using a simplified technique: technical notes and a case report.** Open Dent J, 2012. 6: p. 164-9.
- Schenk R, Willenegger H. Zur. **Histologie der primären Knochenheilung. Modifikation enune Grenzen der spaltheilung in Abhängigkeit von der Defktgrösse.** Unfallheilkunde 1977; 80: 155.
- Schulte, W. & Heimke, G. **The tubinger immediate implant.** Quintessence1976; 27: 17 - 23.
- Schwarz EM, O'Keefe RJ. **Breakthrough in bone: the molecule mechanism of osteoclast/osteoblast coupling revealed.** CurrOpinOrthop. 2000; 11(5): 329-335.
- Shi B, Zhou Y, Wang YN, Cheng XR. **Alveolar ridge preservation prior to implant placement with surgical-grade calcium sulfate and platelet-rich plasma: a pilot study in a canine model.** J Oral Maxillofac Implants 2007;22:656–665.

Soydan, S. S., Cubuk, S., Oguz, Y., and Uckan, S., **Are success and survival rates of early implant placement higher than immediate implant placement?** Int J Oral Maxillofac Surg, 2013. 42(4): p. 511-5.

Trejo PM, Weltman R, Cafesse R. **Treatment of intraosseous defects with bioabsorbable barriers alone or in combination with decalcified freeze-dried bone allograft:** a randomized clinical trial. J Periodontol 2000; 71: 1852-1861.

Vittorini Orgeas, G., Clementini, M., De Risi, V., and de Sanctis, M., **Surgical techniques for alveolar socket preservation:** a systematic review. Int J Oral Maxillofac Implants, 2013. 28(4): p. 1049-61.

Yong, L. T., **Single stage immediate implant placements in the esthetic zone.** J Oral Implantol, 2012. 38(6): p. 738-46.

## ANEXOS

### Anexo 01 – Parecer do comitê de ética.

