

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

LIVIA GRANDINI SARAIVA

**PRODUÇÃO DE OSTEOCALCINA NO PROCESSO DE
REPARAÇÃO ÓSSEA EM CAVIDADES
CIRURGICAMENTE CRIADAS EM CALVÁRIAS DE
RATOS PREENCHIDAS COM CIMENTO DE FOSFATO
DE CÁLCIO ASSOCIADO OU NÃO A BMP-2**

BAURU

2013

LIVIA GRANDINI SARAIVA

**PRODUÇÃO DE OSTEOCALCINA NO PROCESSO DE
REPARAÇÃO ÓSSEA EM CAVIDADES
CIRURGICAMENTE CRIADAS EM CALVÁRIAS DE
RATOS PREENCHIDAS COM CIMENTO DE FOSFATO
DE CÁLCIO ASSOCIADO OU NÃO A BMP-2**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de Cirurgião
Dentista, sob orientação da Profa. Dra.
Bella Luna Colombini Ishikiriama.

BAURU

2013

Saraiva, Livia Grandini

S2434p

Produção de osteocalcina no processo de reparação óssea em cavidades cirurgicamente criadas em calvárias de ratos preenchidas com cimento de fosfato de cálcio associado ou não a BMP-2 / Livia Grandini Saraiva -- 2013.

31f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Bella Luna Colombini Ishikiriama.

Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Okamoto.

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

1. Reparo ósseo. 2. Cimento de fosfato de cálcio. 3. BMP-2. 4. Osteocalcina. I. Ishikiriama, Bella Luna Colombini. II. Okamoto, Roberta. III. Título.

LIVIA GRANDINI SARAIVA

**PRODUÇÃO DE OSTEOCALCINA NO PROCESSO DE
REPARAÇÃO ÓSSEA EM CAVIDADES CIRURGICAMENTE
CRIADAS EM CALVÁRIAS DE RATOS PREENCHIDAS COM
CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO ASSOCIADO OU NÃO A
BMP-2**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião Dentista sob orientação da Profa. Dra. Bella Luna Colombini Ishikiriama.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Bella Luna Colombini Ishikiriama
Universidade Sagrado Coração

Prof. Dr. Thiago Amadei Pegoraro
Universidade Sagrado Coração

Profa. Dra. Karin Cristina Modena
Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Madalena e Álvaro por todo incentivo dado durante a graduação, sem o amor de vocês eu não seria capaz de nada.

Aos meus irmãos, Fernando Henrique e Rodrigo, agradeço pela cumplicidade desde sempre, apesar das brigas na infância, acredito que foi essencial para construir a amizade e o amor que temos hoje uns pelos outros.

A toda minha família e amigos, obrigada por tudo, sinto falta de todos sempre, eu amo vocês! Agradeço também ao Felipe, que apesar de tudo me deu forças quando precisei e sempre me ajudou.

À Ana Paula e Lidiane, minhas queridas amigas, obrigada pela força, pelo ombro amigo, pelos empurrões, apesar dos pesares deu tudo certo. Minha trajetória na graduação não teria tido a mesma graça se não fossem por vocês.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Bella Luna Colombini Ishikiriama, obrigada pela paciência, pelo humor, carinho, toda ajuda, apoio e compreensão durante a realização deste trabalho, nós conseguimos!

Aos Prof. Dr. Thiago Amadei Pegoraro e a Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto agradeço por toda atenção e suporte dado. Especialmente ao Prof. Dr. Lucas Villaça Zogheib obrigada pelo aprendizado, atenção e ajuda no início da pesquisa.

RESUMO

Defeitos ósseos extensos na região maxilo-facial podem ser corrigidos com enxerto autógeno, no entanto nem sempre há a possibilidade de se utilizar esta modalidade terapêutica levando à pesquisa por novos substitutos ósseos. Com isso, o uso de fatores osteoindutores, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), tem sido uma alternativa. Para a utilização destas, carreadores e arcabouços são essenciais para manter a capacidade osteoindutora das BMPs. Portanto, este trabalho teve o objetivo de avaliar o papel biológico do cimento de fosfato de cálcio (NORIAN) como carreador para BMP-2 no processo de reparação óssea em cavidades cirurgicamente criadas em calvária de ratos. Defeitos críticos de 5 mm de diâmetro foram preparados com broca trefina com motor baixa rotação em cada animal. Os animais foram divididos em 2 grupos, no Grupo I: defeito preenchido com coágulo, no Grupo II: preenchido com cimento de fosfato de cálcio e no Grupo III: preenchido com cimento de fosfato de cálcio e BMP-2. Os animais foram sacrificados aos 5, 15 e 30 dias pós-operatório. Os mecanismos biológicos envolvidos no processo de reparo ósseo foram avaliados por análise imunoistoquímica, através da produção da proteína osteocalcina. A análise imunohistoquímica revelou uma marcação positiva para osteocalcina em todos os grupos experimentais, independente do material utilizado como preenchimento nos defeitos ósseos. No entanto, quando comparados entre si, o grupo **(GIII)**, obteve escores de marcação para a produção desta proteína nos osteoblastos, na matriz extracelular e no tecido ósseo neoformado, mais expressivos do que nos outros grupos, em todos os períodos de tempo (5, 15 e 30 dias), o que não pode ser observado quando da utilização do cimento de fosfato de cálcio utilizado isoladamente **(GII)**, a não ser no período de 15 dias de observação, a semelhança do comportamento observado também no grupo preenchido somente por coágulo. Desta forma pode-se concluir que a utilização do cimento de fosfato de cálcio (NORIAN) quando utilizado como material de enxertia em defeitos críticos de calvárias de ratos, não influencia a produção da proteína osteocalcina, no entanto, sua utilização como agente carreador da proteína morfogenética óssea (BMP-2) causa uma tendência de aumento na produção desta proteína.

PALAVRAS CHAVE: reparo ósseo, cimento de fosfato de cálcio, BMP-2, osteocalcina.

ABSTRACT

Bone defects in maxillofacial region can be corrected with autogenous insertion, however there is not always a possibility of using this therapeutic modality leading to new research by bone substitutes. Thus, the use of osteoinductive factors such as bone morphogenetic proteins (BMPs), has been an alternative. To use these, carriers and frameworks are essential to maintain the osteoinductive capacity of BMPs. Therefore, this study aimed to assess the biological role of the calcium phosphate cement (Norian) as a carrier for BMP - 2 in bone repair in surgically created cavities in calvaria of rats. Critical defects of 5 mm in diameter will be prepared with a trephine drill with a low rotation motor under abundant irrigation in each animal. The animals were divided in two groups, Group I: the defect is filled with calcium phosphate cement in Group II, filled with calcium phosphate cement and BMP- 2 and Group III: the defect is filled with autogenous bone particulates. The animals were euthanized at 5, 15 and 30 days post-operative. The biological mechanisms involved in the bone repair process was assessed by immunohistochemical analysis, through the expression of osteocalcin protein which is involved in the osteogenesis, mineralization and resorption processes.

Immunohistochemical analysis showed a positive staining for osteocalcin in all groups , regardless of the material used for filling bone defects. However, when compared, the group (GIII), labeling scores obtained for the production of this protein in osteoblasts, extracellular matrix and the newly formed bone tissue, more expressive than in the other groups at all time periods (5, 15 and 30 days), which can not be observed when using the calcium phosphate cement used alone (IGI), except during the 15 days of observation, similarly to the behavior observed in the group also completed only by clot. Thus it can be concluded that the use of calcium phosphate cement (Norian) when used as graft material in critical defects in rat calvaria not influence expression of the protein osteocalcin, however, its use as a protein carrier agent bone morphogenetic (BMP - 2) causes a tendency to increase in the expression of this protein.

KEYWORDS : bone repair , calcium phosphate cement , BMP - 2 , osteocalcin .

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 ANIMAIS.....	13
3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	14
3.3 EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL.....	16
3.4 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	17
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

A reabilitação do sistema estomatognático colabora para a recuperação estética, funcional e psicossocial dos pacientes. Entretanto, a falta de osso nos rebordos alveolares constitui um grande desafio para o sucesso destas reabilitações. Neste sentido, o osso autógeno continua sendo considerado o biomaterial padrão ouro (Boyne e James 1980; Tatum 1986; Misch 1987) para a reconstrução dos defeitos causados por patologias e traumas (Tessier *et al.*, 2005) e, principalmente, para a reconstrução dos rebordos edêntulos possibilitando entre outras coisas a instalação de implantes dentários de titânio (Proussaefs e Lozada 2005; Wada *et al.*, 2001; Esposito *et al.*, 2006; Brånemark *et al.*, 1975).

O osso autógeno possui propriedades importantes como: (I) osseointegração, a capacidade de unir-se quimicamente a superfície óssea sem a intervenção de uma camada de tecido fibroso (Constantino *et al.*, 1994); (II) osteocondução, a capacidade de sustentar o crescimento ósseo sobre esta superfície (Constantino *et al.*, 1994); (III) osteoindução, a capacidade de induzir a diferenciação de células mesenquimais (pluripotentes) do tecido circunjacente (leito receptor) em células osteoblásticas (Cypher, *et al.*, 1996); e (IV) osteogênese, a neoformação óssea pelas células osteoblásticas presentes no material enxertado - características diferenciais que conferem ao osso autógeno seu alto índice de sucesso (Triplett e Schow 1996; Hirsch e Ericsson 1991; Lundgren *et al.*, 1996; Raghoobar *et al.*, 1993; Wood e Moore, 1988). No entanto, o seu uso pode ser limitado pelos seguintes fatores: a) morbidade da área doadora; b) quantidade limitada de enxerto que pode ser removido de regiões intra-orais, e c) a necessidade de anestesia geral para a remoção de enxertos de áreas extra-orais em casos de reconstruções mais extensas.

Devido a estas limitações dos enxertos biológicos, a engenharia tecidual tem surgido como alternativa para se obter materiais que possuam propriedades de indução ou auxílio no processo de neoformação óssea (Yao *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2004). Dos fatores osteoindutores, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) ganham popularidade no campo da

odontologia. Elas são produzidas por osteoblastos e estimulam a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em condrócitos, promovendo uma ossificação endocondral, bem como podem diferenciar as células mesenquimais em células com fenótipo osteoblástico, com formação direta de tecido ósseo (Wozney e Rosen 1998; Reddi 1998).

As BMPs fazem parte da superfamília TGF- β (Transforming Grow Factor - β) e compreendem uma família grande de proteínas semelhantes em estrutura e função. Apresentam efeito sobre a regeneração tecidual, principalmente no que diz respeito ao tecido ósseo. Várias proteínas pertencem a este grupo, no entanto, nesta família de BMPs, a BMP-2 e a BMP-7 são os principais alvos dos estudos científicos devido ao seu potencial de formação óssea em diferentes variações clínicas e modelos experimentais (Cypher e Grossman 1996; Triplett e Schow 1996; Hirsch e Ericsson 1991; Lundgren *et al.*, 1996; Raghoobar *et al.*, 1993; Wood e Moore 1988; Yao *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2004; Boyne 1996; Margolin *et al.*, 1998; Mcallister *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 2001; Terheyden *et al.* 1999; Van Den Bergh *et al.*, 2000). Dentre estas, predominantemente a BMP-2, tem demonstrado um papel significativo na regulação da diferenciação celular durante o reparo ósseo (Bostrom *et al.*, 1995). Wozney e Rosen (1998) revisaram vários estudos e confirmaram a importância da BMP-2 na diferenciação celular e reparo ósseo. Entretanto, apesar desta conhecida capacidade de auxiliar do reparo ósseo a associação das BMPs a biomateriais carreadores e/ou arcabouços são essenciais para manter a capacidade osteoindutora da BMPs, já que possuem uma grande influência na retenção mecânica e na liberação destas no ambiente cicatricial.

Para Toriumi e Robertson (1993), um dos fatores mais importantes que podem determinar o sucesso ou fracasso de enxertos ósseos indutores em cirurgias reconstrutivas é a eficiência do material carreador. Para tal, o carreador ideal deve aumentar a exposição dos tecidos do hospedeiro à substância de crescimento e assegurar uma distribuição uniforme sem permitir que o material implantado ultrapasse os limites do sítio. O carreador deve ainda ser reabsorvido na medida em que for ocorrendo a formação óssea. Além disso, este deve ainda ser seguro, biodegradável, biocompatível e formulado para permitir tamanhos e formas variados, adequados para o enxerto.

É possível se identificar na literatura diferentes tipos de biomateriais utilizados como carreadores, como: cola de fibrina (Kim *et al.*, 2007; Arnander *et al.*, 2006), hidrogéis (Takahashi *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007), copolímeros de ácido polilático e poliglicólico (Cowan *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2006), colágeno (Hou *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2006; Arnander *et al.*, 2006), ácido hialurônico (Arnander *et al.*, 2006), osso liofilizado desmineralizado (DFDBA) (Boyan *et al.*, 2006); cimentos de fosfatos de cálcio (Maus *et al.*, 2008), lipossomos magnéticos (Matsuo *et al.*, 2003), associação de hidroxiapatita e fosfato tri-cálcio (Jung *et al.*, 2008), associação de polipropileno e fosfato tri-cálcio (Chu *et al.*, 2006) entre outras associações.

Dentre os materiais carreadores os cimentos à base de fosfato de cálcio são considerados uma boa opção de biomaterial. São materiais de enxertia biodegradáveis e bioativos, apresentados na forma de pó e líquido, que quando misturados, funcionam como uma hidroxiapatita. Este material tem sido extensivamente investigado devido as suas excelentes propriedades biológico, potencial reabsortivo, capacidade de modelagem e facilidade de manipulação.

Entretanto, a formação, o desenvolvimento e a manutenção do tecido ósseo após a utilização de materiais de enxertia, são processos delicados e completamente regulados (Nijweide *et al.*, 1986). Proteínas, hormônios, fatores crescimento e citocinas, estão ativamente envolvidos nestes processos e exercem atividade direta sobre células com atividade osteoblástica e osteoclástica, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica para a produção de novo tecido ósseo (Ducy *et al.*, 2000).

Neste contexto, alguns marcadores podem ser usados para monitorização da formação óssea, sendo a maior parte produtos dos osteoblastos. A osteocalcina (OC), constitui-se na mais abundante proteína não-colagenosa no osso, sendo um importante indicador do processo de mineralização na formação óssea implementada pela calcificação dos osteócitos na camada de colágeno. Sua concentração sérica é um marcador sensível da formação óssea, e quando correlacionada com índices histomorfométricos se mostra um excelente indicador bioquímico da atividade formadora dos osteoblastos (Lieberman *et al.*, 2002; Thorwarth *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Diante da importância que os materiais sintéticos exercem nas terapias de reparo e reconstrução ósseas e da complexidade dinâmica do processo de reparo ósseo, a literatura mostra ainda ser necessário e oportuno a realização de estudos histológicos e imunoistoquímicos que melhor expliquem o desempenho destes materiais de enxertia, em especial do cimento de fosfato de cálcio, utilizado como carreadores de BMP, bem como a expressão de proteínas da matriz óssea como indicadores durante o processo de ossificação.

Portanto, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o papel biológico do cimento de fosfato de cálcio como carreador para BMP-2 no processo de reparo ósseo em cavidades cirurgicamente criadas em calvária de ratos, baseados na marcação imunohistoquímica para as proteínas osteocalcina e esclerostina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista, Brasil (protocolo nº 2008-004517). Para isso foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) adultos machos, com peso variando de 250 a 300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta padrão (ração sólida e água “ad libitum”), em condições climatizadas e água canalizada no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba– UNESP.

Um total de 45 defeitos críticos foram criados nas calvária dos ratos e posteriormente estes foram aleatoriamente divididos em 3 grupos de acordo com o material de preenchimento em: Grupo I (n=15) - preenchido com coágulo; Grupo II (n=15) - preenchimento por cimento de fosfato de cálcio (Norian® - Craniofacial Repair System®, Germany); Grupo III (n=15) – preenchido com cimento de fosfato de cálcio (Norian® - Craniofacial Repair

System[®], Germany) + BMP-2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA). Posteriormente os grupos foram subdivididos de acordo com o período de avaliação em: 5, 15 e 30 dias (n=5/ período) **(TABELA1)**.

PERÍODO DE AVALIAÇÃO/GRUPO	GRUPO I COÁGULO 15 ANIMAIS	GRUPO II NORIAN[®] 15 ANIMAIS	GRUPO III NORIAN[®] + BMP-2 15 ANIMAIS
5 DIAS	5	5	5
15 DIAS	5	5	5
30 DIAS	5	5	5

Tabela 1. Distribuição dos animais de acordo com o período de avaliação e grupo experimental.

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após um período de doze horas em jejum os animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) via intramuscular na proporção de 1:1 e com dose equivalente a 0,5 mL /100 g de peso do animal. Receberam, ainda, infiltração de solução anestésica local contendo cloridrato de mepivacaína (0.03ml/100mg, Scandicaine[®] 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França), para hemostasia do campo operatório. Em seguida foi realizado tricotomia e antissepsia da região da calota craniana, incisões divergentes, no sentido ântero-posterior a partir da linha mediana e deslocamento de um retalho de espessura total **(Figuras 1 e 2)**.



Figura 1- Tricotomia na região frontal e anti-sepsia



Figura 1- Tricotomia na região frontal e anti-sepsia

Uma vez exposta a calota craniana, defeitos ósseos de tamanho crítico, foram realizados utilizando uma broca trefina (**Figuras 3 e 4**) de 5 mm de diâmetro (3i Implant Innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA).



Figura 3 – Afastamento dos tecidos para exposição do osso da calota craniana.

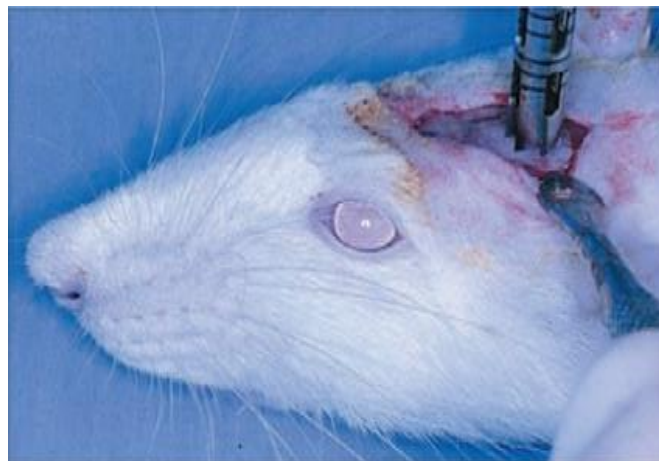


Figura 4 – Confecção dos defeitos ósseos com auxílio da broca trefina.

Os defeitos foram preenchidos de acordo com o grupo experimental, conforme especificado anteriormente, e os tecidos moles devidamente reposicionados e suturados (**Figura 5**). No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) por via intramuscular.

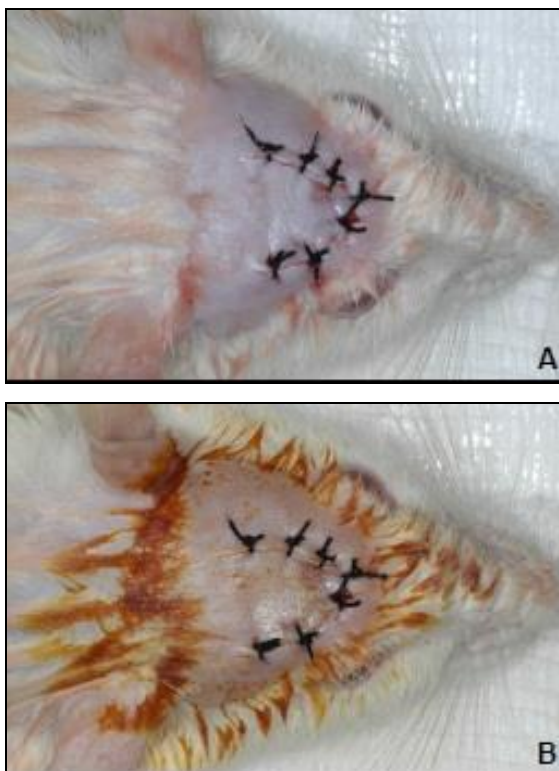


Figura 5 (A e B)- Reposicionamento do retalho, sutura e antisepsia final.

3.3 EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL

Os animais (n=45) foram subdivididos em 3 grupos de acordo com o período de análise experimental (5, 15 e 30 dias pós-operatório) e eutanasiados por meio de dose excessiva do anestésico. A parte de interesse do crânio foi removida e fixada em tamponado neutro com 4% solução de formol.

As peças obtidas foram fixadas em formol e sofreram descalcificação em EDTA (18%) e desidratação utilizando uma seqüência de álcoois. Após essas etapas, realizou-se a diafanização com xilol, inclusão em parafina e obtenção de cortes com 5 μ m de espessura montados em lâminas. Em seguida procedeu-se o preparo para reação imunoistoquímica.

3.4 - ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

O experimento de imunoistoquímica utilizou como método de detecção a imunoperoxidase. A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Foi utilizado um anticorpo primário para a osteocalcina (Santa Cruz Biotechnology), com o objetivo de se analisar as respostas celulares quanto à ocorrência do processo de mineralização.

No momento da realização destes mesmos experimentos para o outro alvo, a esclerostina, foi detectada uma incompatibilidade do anticorpo com o tecido alvo dos ratos, e por este motivo, este alvo foi descartado do estudo, seguindo-se as reações somente para o alvo osteocalcina.

Para tal, foi utilizado o anticorpo secundário biotilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o complexo amplificador Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno.

A expressão de osteocalcina foi avaliada qualitativamente pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas na região do defeito criado. Esta análise foi realizada em microscópio ótico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), através da contagem manual das células marcadas em áreas previamente determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo, e foram consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos.

A análise qualitativa das imunomarcações foi realizada por meio da atribuição de escores, conforme **Tabela 2**:

ESCORE	CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO
0	Ausência de marcação
1	Marcação Leve
2	Marcação Moderada
3	Marcação Intensa

Tabela 2- Escores utilizados na avaliação das imunomarcações obtidas.

Após examinados e classificados de acordo com os escores, os dados obtidos das análises das lâminas foram tabulados e posteriormente submetidos à análise estatística.

3.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) à 2 critérios (material e tempo de avaliação) seguido do Teste de Tukey para identificação das diferenças. Para todos os testes foi utilizado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4- RESULTADOS

A análise imunohistoquímica para a produção da proteína osteocalcina revelou uma marcação positiva para todos os grupos experimentais, independente do material utilizado como preenchimento nos defeitos ósseos críticos criados nas calotas cranianas dos ratos (**Figuras 6, 7 e 8**).

No entanto, quando comparados entre si, o grupo (**GIII**), nos quais os defeitos foram preenchidos com o cimento de fosfato de cálcio associado a proteína morfogenética óssea (BMP-2), obtiveram escores de marcação para a produção desta proteína nos osteoblastos, na matriz extracelular e no tecido ósseo neoformado, mais expressivos do que nos outros grupos, em todos os períodos de tempo (5, 15 e 30 dias), o que não pode ser observado quando da utilização do cimento de fosfato de cálcio utilizado isoladamente (**GII**), a não ser no período de 15 dias de observação, a semelhança do comportamento observado também no grupo preenchido somente por coágulo (**Tabela 3**).

Desta forma, pôde-se perceber uma maior expressão do marcador de formação óssea, osteocalcina, no grupo no qual foi associada a utilização de um agente osteocondutor (cimento de fosfato de cálcio) a um agente osteoindutor (BMP-2) quando comparada a intensidade de marcação observada quando da utilização somente do agente osteocondutor (cimento de fosfato de cálcio), bem como para o preenchimento com coágulo, demonstrando uma resposta biológica mais favorável quando da utilização da associação.

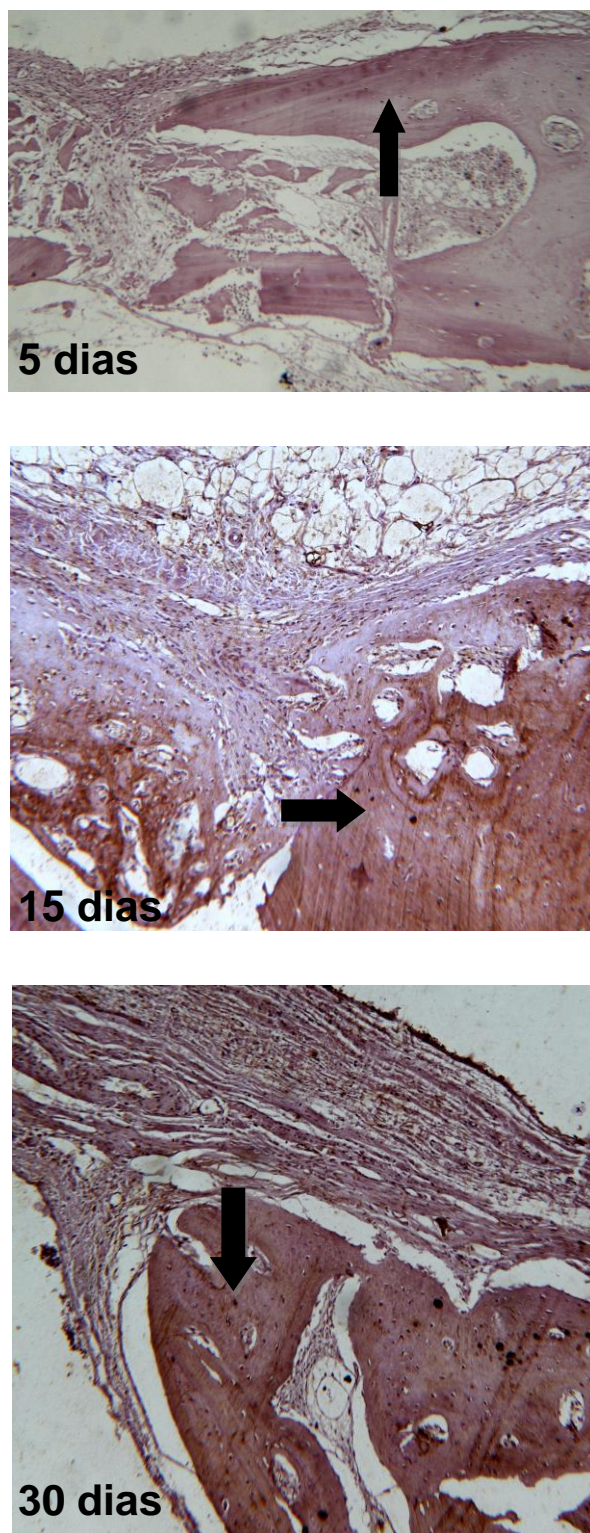


Figura 6 – Imagens representativas da imunomarcção para osteocalcina no grupo cujos defeitos foram preenchidos com **coágulo (GI)** nos períodos de 5, 15 e 30 dias, respectivamente. As setas indicam células imunomarcadas para o alvo osteocalcina.

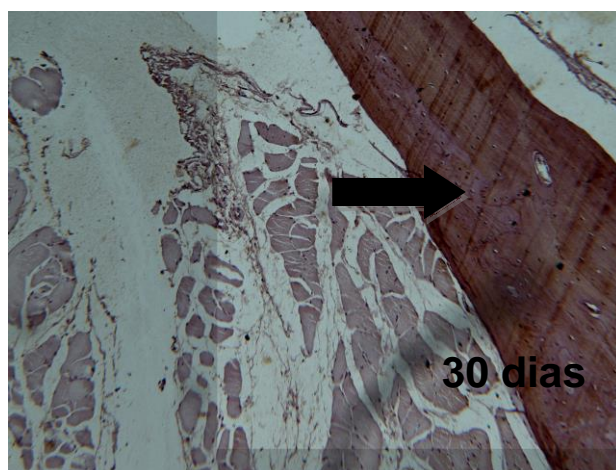
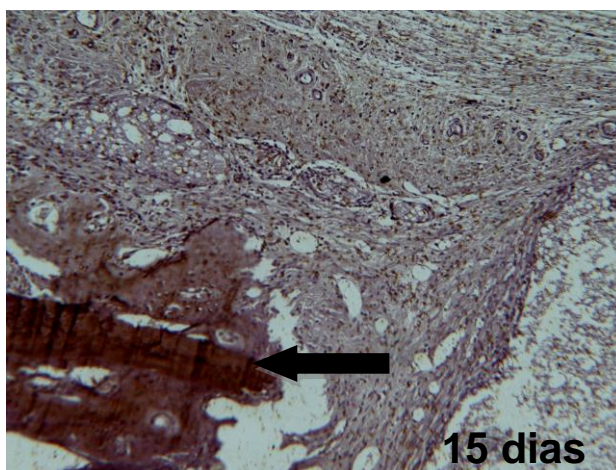
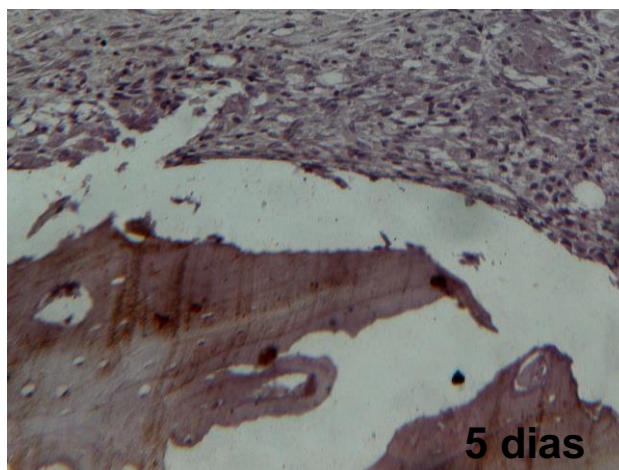


Figura 7 – Imagens representativas da imunomarcção para osteocalcina no grupo cujos defeitos foram preenchidos com cimento de fosfato de cálcio - **Norian (GII)** nos períodos de 5, 15 e 30 dias, respectivamente. As setas indicam células imunomarcadas para o alvo osteocalcina.

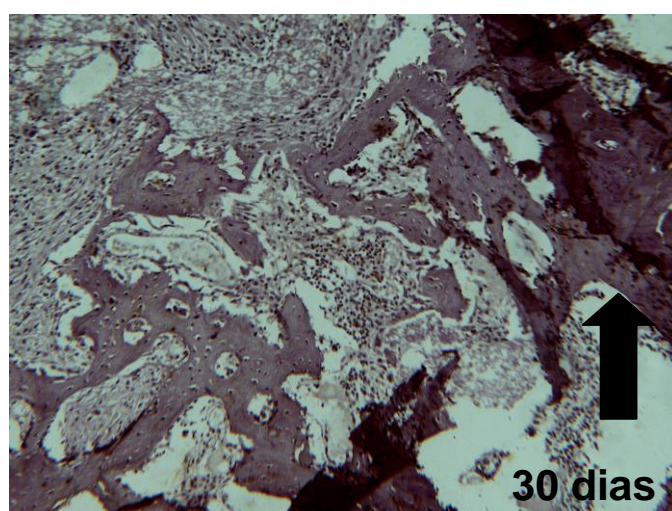
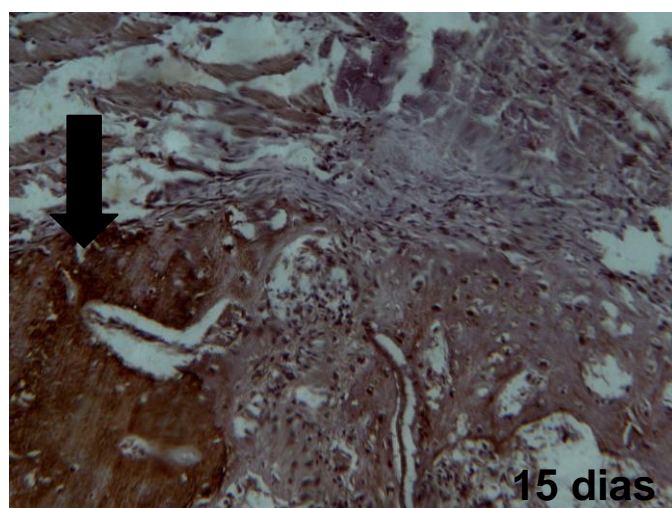
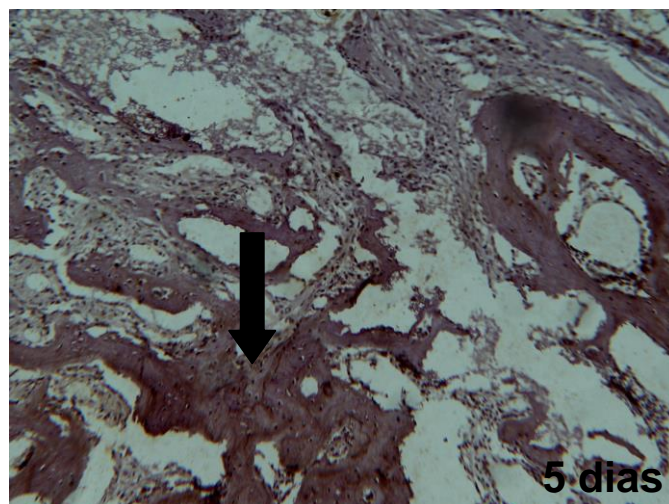


Figura 8 – Imagens representativas da imunomarcção para osteocalcina no grupo cujos defeitos foram preenchidos com cimento de fosfato de cálcio - **Norian+BMP-2 (GIII)** nos períodos de 15 e 30 dias, respectivamente. As setas indicam células imunomarcadas para o alvo osteocalcina.

GRUPO EXPERIMENTAL	Média dos escores obtidos por período de avaliação		
	5 dias	15 dias	30 dias
GI – Coágulo	1	2	1
GII – Norian	1	2	1
GIII – Norian+BMP-2	2	2	2

Tabela 3 - Média dos escores observados nos grupos experimentais em função do período de avaliação experimental.

5 - DISCUSSÃO

Muitos procedimentos realizados nas condutas terapêuticas médica e/ou odontológica, como por exemplo, a correção de defeitos ósseos pós-traumáticos, as ressecções oncológicas, exodontias, infecções ou previamente a instalação de implantes dentários, que envolvem a necessidade de reparos ósseos de maiores magnitudes, apresentam algumas dificuldades na sua execução em virtude da capacidade reparativa limitada que o tecido ósseo apresenta (Boyne e James 1980; Tatum 1986; Misch 1987).

Com o intuito de otimizar o processo de reparo do tecido ósseo nesse tipo de terapia e ainda, de suplantar as desvantagens dos enxertos autógenos (morbidade, necessidade de confecção de dois leitos cirúrgicos, etc.) tem-se testado a substituição deste pelos chamados biomateriais - materiais de enxertia utilizados como substitutos ósseos de origem natural ou sintética (Ambard *et al.*, 2006). Dentre os materiais sintéticos destacam-se na literatura os materiais cerâmicos como os biovidros e os materiais a base de fosfato de cálcio, como a hidróxiapatita (HA), o fosfato tricálcico entre outros (LeGeros, 1991).

Para avaliar a eficácia desses materiais durante o processo de reparo ósseo é necessário que se utilize um modelo experimental no qual são confeccionados defeitos ósseos considerados críticos, ou seja, aqueles que não se reparam espontaneamente a menos que um enxerto ou biomaterial seja utilizado. Corroborando com dados da literatura, o presente estudo optou por cavidades cirúrgicas criadas em calvárias de ratos com 5 mm de diâmetro e tempo de avaliação curto, não superior a 30 dias pós-operatórios (Hollinger & Kleinschmidt, 1990; Guskuma *et al.*, 2013; Luvizuto *et al.*, 2012). O grupo

coágulo (COA) confirmou a validade do modelo experimental, onde não se observou a capacidade de reparação óssea completa na porção central do defeito, dado que também se encontra de acordo com a expressão de osteocalcina para este grupo, no qual os escores mostraram-se maiores no período de 15 dias, devido a uma maior atividade dos osteoblastos para a formação óssea neste período, e depois, voltaram a decair aos 30 dias, onde esta atividade diminuiu tendo em vista a incapacidade destas células em reparar a lesão, graças a sua extensão.

Neste estudo, optou-se por avaliar neste mesmo modelo experimental a eficácia regenerativa de um biomaterial à base de fosfato de cálcio, o cimento de fosfato de cálcio (NORIAN), quando utilizado sozinho como material de preenchimento de defeitos ósseos, bem como sua eficácia em servir como material carreador para a ação da proteína morfogenética óssea, a BMP-2, por meio da marcação, por métodos imunológicos, da produção da proteína osteocalcina.

A osteocalcina é uma pequena γ -carboxiglutamato proteína, preferencialmente expressa por osteoblastos, principalmente nos estágios tardios de sua diferenciação, ou seja, sua presença pode ser considerada como um forte indicativo da capacidade formadora do tecido ósseo (Carvallo *et al.*, 2008). Sua expressão está fortemente relacionada a fase de mineralização da matriz óssea, pois liga-se fortemente ao cálcio, e seu envolvimento na regulação da mineralização da matriz, apesar de controverso na literatura, tem sido sugerido por alguns autores como estando relacionado aos processos de crescimento do cristal de hidróxiapatita (Menanteau *et al.*, 1982; Boskey *et al.*, 1985; Romberg *et al.*, 1986; Hunter *et al.*, 1996; Hoang *et al.*, 2003) ou a inibição da nucleação deste cristal (Hunter *et al.*, 1996).

Assim, a osteocalcina dentre outros marcadores ósseos como a osteopontina são conhecidos marcadores para a diferenciação de osteoblastos e consta na literatura, diversos estudos que utilizam estes marcadores, entre outros, para confirmar a osteogênese. (Weijs *et al.*, 2010; Szabo *et al.*, 2005).

A detecção da produção destas proteínas em tecidos em fase de reparação, como no modelo experimental proposto neste estudo, pode ajudar a entender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no reparo,

durante o processo de ossificação, podendo sua produção ser detectada através de técnicas imunoistoquímicas, que atuam como ferramentas metodológicas, possibilitando a análise da dinâmica do tecido ósseo em defeitos preenchidos com biomateriais, por meio da imunomarcação de proteínas presentes durante o reparo ósseo.

A utilização de biomateriais como materiais de preenchimento de defeitos ósseos considerados críticos, visa favorecer a diferenciação e migração de osteoblastos nas áreas centrais da ferida, onde a formação espontânea de osso não acontece. Neste contexto, os cimentos à base de fosfato de cálcio, como o utilizado neste estudo, mostraram segundo trabalhos da literatura possuírem propriedades de osteocondução e osteoindução, o que poderia favorecer a formação óssea nestas áreas críticas (Ambard & Mueninghoff, 2006). No entanto, no presente trabalho, quando o cimento de fosfato de cálcio (NORIAN) foi utilizado como material de preenchimento, a expressão de osteocalcina, indicador da formação óssea utilizado neste trabalho, não se mostrou expresso de forma significativamente maior do que no grupo coágulo, no qual este não estava presente. Muitos fatores podem influenciar a regeneração do tecido ósseo quando regenerado por meio de materiais de enxertia e, portanto, mais estudos são necessários para que se possa compreender a fundo o papel regenerador dos materiais de enxertia óssea.

Na tentativa de otimizar o reparo ósseo, pode-se associar aos materiais de enxertia, substâncias indutoras da formação óssea como as proteínas morfogenéticas ósseas, aumentando a capacidade regenerativa dos enxertos. No presente trabalho, a adição da BMP-2 ao material de preenchimento (NORIAN) apresentou uma tendência no aumento na expressão da osteocalcina, o que pode ser entendido como uma tendência de aumento da formação óssea, e pode ser explicado pela capacidade da BMP-2 de promover a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, favorecendo a formação de osso e o reparo (Heckman *et al.*, 1999). No entanto, dada a complexidade dos eventos envolvidos neste processo, mais estudos são necessários para elucidar o papel combinado destas substâncias na regeneração de defeitos críticos em calvárias de ratos.

6 - CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e considerando os limites do presente trabalho, pode-se concluir que a utilização do cimento de fosfato de cálcio (NORIAN) quando utilizado como material de enxertia em defeitos críticos de calvárias de ratos, não influencia a expressão da proteína osteocalcina, no entanto, sua utilização como agente carreador da proteína morfogenética óssea (BMP-2) causa uma tendência de aumento na expressão desta proteína.

REFERÊNCIAS

1. Ambard AJ, Mueninghoff L. Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties. *J Prosthodont.* 2006;Sep-Oct;15(5):321-8.
2. Arnander C, Westermark A, Veltheim R, Docherty-Skogh AC, Hilborn J, Engstrand T. Three-dimensional technology and bone morphogenetic protein in frontal bone reconstruction. *J Craniofac Surg.* 2006;17(2):275-9.
3. Boskey AL, Wians Jr. FH, Hauschka PV. The effect of osteocalcin on in vitro lipid-induced hydroxyapatite formation and seeded hydroxyapatite growth. *Calcif. Tiss. Int.* 37:57-62, 1985.
4. Bostrom M, Lane JM, Berberian WB, Missri AA, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 1995; 13:357–363.
5. Boyan BD, Ranly DM, Schwartz Z. Use of growth factors to modify osteoinductivity of demineralized bone allografts: lessons for tissue engineering of bone. *Dent Clin North Am.* 2006;50(2):217-28, viii.
6. Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus with autogenous marrow and bone. *Journal of Oral Surgery* 1980; 38:613-616.
7. Boyne PJ. Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone* 1996;19:83–92.
8. Branemark PI, Lindstrom J, Hallen O. Reconstruction of the defective mandible. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1975; 9:116-128.
9. Carvalho, PSP, Bassi, APF & Pereira, LAVD. Revisao e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News* 2004;1:255-260.
10. Carvallo L, Henríquez B, Paredes R, Olate J, Onate S, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Stein JL, Montecino1alpha,25-dihydroxy vitamin D3-enhanced expression of the osteocalcin gene involves increased promoter occupancy of basal transcription regulators and gradual recruitment of the 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3 receptor-SRC-1 coactivator complex. *J Cell Physiol.* 2008 Mar;214(3):740-9.

11. Chu TM, Sargent P, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL. Preliminary evaluation of a load-bearing BMP-2 carrier for segmental defect regeneration. *Biomed Sci Instrum.* 2006;42:42-7.
12. Chung YI, Ahn KM, Jeon SH, Lee SY, Lee JH, Tae G. Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex. *J Control Release* 2007;121(1-2):91-9. Epub 2007 Jun 2.
13. Constantino, PD. & Freidman, CD. (1994) Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 27:1037-73.
14. Cowan CM, Aghaloo T, Chou YF, Walder B, Zhang X, Soo C, Ting K, Wu B. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Eng.* 2007;13(3):501-12.
15. Cypher, TJ. & Grossman, JP. (1996) Biological principles of bone graft healing. *J. Foot Ankle Surg.* 35:413-17.
16. Ducky P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289:1501-1504.
17. Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *J Oral Maxillofac Implants.* 2006; 21(5):696-710. Review
18. Guskuma MH, Hochuli-Vieira E, Pereira FP, Rangel-Garcia I Jr, Okamoto R, Okamoto T, Filho OM. . Evaluation of the presence of VEGF, BMP2 and CBFA1 proteins in autogenous bone graft: Histometric and immunohistochemical analysis. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013 Aug 7. pii: S1010-5182(13)00152-2.
19. Heckman JD, Ehler W, Brooks BP, Aufdemorte TB, Lohmann CH, Morgan T, et al., Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor-beta enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg Am* 81: 1717e1729, 1999
20. Hirsch JM, Ericsson I. Maxillary sinus augmentation using mandibular bone grafts and simultaneous installation of implants. A surgical technique. *Clin Oral Implants Research* 1991; 2:91-96.
21. Hoang K, Tan JC, Derby G, Blouch KL, Masek M, Ma I, Lemley KV,

- Myers BD. Determinants of glomerular hypofiltration in aging humans. *Kidney Int.* 64, 1417-1424.
22. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990 Jan;1(1):60-8.
23. Hou LT, Liu CM, Liu BY, Chang PC, Chen MH, Ho MH, Jehng SM, Liu HC. Tissue engineering bone formation in novel recombinant human bone morphogenetic protein 2-atelocollagen composite scaffolds. *J Periodontol* 2007;78(2):335-43.
24. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1;317(Pt1):59-64. Jul 1996
25. Jones AA, Buser D, Schenk R, Wozney J, Cochran DL. The effect of rhBMP-2 around endosseous implants with and without membranes in the canine model. *J Periodontol.* 2006;77(7):1184-93.
26. Jung RE, Weber FE, Thoma DS, Ehrbar M, Cochran DL, Hammerle CH. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate. *Clin Oral Implants Res* 2008;19(2):188-95.
27. Kim HJ, Kang SW, Lim HC, Han SB, Lee JS, Prasad L, Kim YJ, Kim BS, Park JH. The role of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein with fibrin glue in healing of bone-tendon junction injury. *Connect Tissue Res* 2007;48(6):309-15.
28. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci.* 1991;15:1-201.
29. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *Biology and Clinical Applications.* *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:1032-1044.
30. Lundgren S, Moy P, Johansson C, Nilsson H. Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: a histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11:760-766.
31. Luvizuto ER, Dias MS, Chiantelli CC, Machado LA, Garcia-Júnior IR, Okamoto T, Okamoto R. Temporal localization of osteocalcin protein

- during healing of tooth extraction sockets in rats. *Minerva Stomatol.* 2010 Jun;59(6):355-61.
32. Luvizuto ER, Queiroz TP, Margonar R, Panzarini SR, Hochuli-Vieira E, Okamoto T, Okamoto R. Osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate matrix, polylactic and polyglycolic acid gel, and calcium phosphate cement in bone defects. *J Craniofac Surg.* 2012 Sep;23(5):e430-3.
33. Margolin MD, Cogan AG, Taylor M, Buck D, Mcallister TN, Toth C, Mcallister BS. Maxillary sinus augmentation in the non-human primate: a comparative radiographic and histologic study between recombinant human osteogenic protein-1 and natural bone mineral. *J Periodontol* 1998;69:911–919.
34. Matsuo T, Sugita T, Kubo T, Yasunaga Y, Ochi M, Murakami T. Injectable magnetic liposomes as a novel carrier of recombinant human BMP-2 for bone formation in a rat bone-defect model. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(4):747-54.
35. Maus U, Andereya S, Gravius S, Ohnsorge JA, Siebert CH, Niedhart C. BMP-2 Incorporated in a Tricalcium Phosphate Bone Substitute Enhances Bone Remodeling in Sheep. *J Biomater Appl* 2008;Jan 21
36. Mcallister BS, Margolin MD, Cogan AG, Taylor M, Wollins J. Residual lateral wall defects following sinus grafting with recombinant human osteogenic protein-1 or Bio-Oss in the chimpanzee. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18:227–239.
37. Menanteau J, Neuman WF, Neuman MW. A study of bone proteins which can prevent hydroxyapatite formation. *Metab Bone Dis Relat Res.* 4(2):157-62, 1982
38. Misch CE. Maxillary sinus augmentation for endosteal implants: Organized alternative treatment plans. *International Journal of Oral Implantology* 1987; 4:49-58.
39. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JHM. Cells of the bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation *Physiological Reviews* 1986;66:855-886.

40. Proussaefs P, Lozada J. The use of intraorally harvested autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation: a human study. *J Periodontics Restorative Dent* 2005; 25(4):351-63.
41. Raghoobar GM, Brouwer TJ, Reintsema H, Van Oort RP. Augmentation of the maxillary sinus floor with autogenous bone for the placement of endosseous implants: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993; 51:1198-1203.
42. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998;16(3):247–52.
43. Romberg RW, Werness PG, Lollar P, Riggs BL, Mann, KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 25, 1176-1180. 1986
44. Szabo G, Huys L, Coulthard P, Maiorana C, Garagiola U, Barabas J, et al., A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20:371-81.
45. Takahashi Y, Yamamoto M, Yamada K, Kawakami O, Tabata Y. Skull bone regeneration in nonhuman primates by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng.* 2007;13(2):293-300.
46. Tamura S, Kataoka H, Matsui Y, Shionoya Y, Ohno K, Michi KI, Takahashi K, Yamaguchi A. The effects of transplantation of osteoblastic cells with bone morphogenetic protein (BMP)/carrier complex on bone repair. *Bone* 2001;29:169–175.
47. Tatum H. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dental Clinics of North America* 1986; 30:207-229.
48. Terheyden H, Jepsen S, Moller B, Tucker MM, Rueger DC. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 1999;10:510–521.
49. Tessier P, Kawamoto H, Matthews D, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, Wolfe SA. Autogenous bone grafts and bone substitutes-tools and

- techniques: I A 20,000 case experience in maxillofacial and craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg* 2005; 116(5 Suppl):6S-24S; discussion 92S-94S.
50. Thorwarth M, et al., Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)- an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* 2005;26:2575-2584.
51. Toriumi DM, Robertson K. Bone inductive biomaterials in facial plastic and reconstructive surgery. *Facial Plast Surg* 1993;9:29-36.
52. Triplett RG, Schow SR. Autologous bone grafts and endosseous implants: Complementary techniques. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54:486.
53. Van Den Bergh JP, Ten Bruggenkate CM, Groeneveld HH, Burger EH, Tuinzing DB. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 in maxillary sinus floor elevation surgery in 3 patients compared to autogenous bone grafts. A clinical pilot study. *J Clin Periodontol* 2000;27:627-636.
54. Wada K, Niimi A, Watanabe K, Sawai T, Ueda M. Maxillary sinus floors augmentation in rabbits: a comparative histomorphometric study between rhBMP-2 and autogenous bone. *J Periodontics Restorative Dent*. 2001; 21(3):252-63.
55. Weijjs WL, Siebers TJ, Kuijpers-Jagtman AM, Berge SJ, Meijer GJ, Borstlap WA. Early secondary closure of alveolar clefts with mandibular symphyseal bone grafts and beta-tri calcium phosphate (beta-TCP). *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39:424-9.
56. Wood RM, Moore, DL. Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988; 3:209-214.
57. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998;(346):26-37.
58. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 1998;346:26-37

59. Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng.* 2006;12(5):1305-11.
60. Yao, J., Radin, S., Leboy, P.S. & Ducheyne, P. The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly (lactic-co-glycolic acid)/ bioactive glass substrate for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26:1935-1943.