

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

BÁRBARA MACIEL BRAGA

**UTILIZAÇÃO DO FISIOGRAFT COMO CARREADOR
PARA BMP-2 NO PROCESSO DE REPARAÇÃO
ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS. ANÁLISE
IMUNOHISTOQUÍMICA do RANKL e OPG**

BAURU
2016

BÁRBARA MACIEL BRAGA

**UTILIZAÇÃO DO FISIOGRAFT COMO CARREADOR
PARA BMP-2 NO PROCESSO DE REPARAÇÃO
ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS. ANÁLISE
IMUNOHISTOQUÍMICA do RANKL e OPG**

Trabalho de conclusão de curso sob
orientação da Profa. Dra. Patrícia Pinto
Saraiva e coorientação da Profa. Dra.
Roberta Okamoto.

BAURU
2016

Braga, Barbara Maciel

B8131u

Utilização do Fisiograft como carreador para BMP-2 no processo de reparação óssea em calvária de ratos. Análise imunohistoquímica do RANKL e OPG / Barbara Maciel Braga. -- 2016.

35f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pinto Saraiva.

Coorientadora: Dra. Roberta Okamoto

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

1. Reparo ósseo. 2. BMP-2. 3. RANKL. 4. Imunohistoquímica.
5. Osteoprotegerina I. Saraiva, Patrícia Pinto. II. Okamoto, Roberta
III. Título.



ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Bárbara Maciel Braga.

Ao dia 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 BÁRBARA MACIEL BRAGA intitulado: "**Utilização do Fisiograft como carreador para BMP-2 no processo de reparação óssea em calvária de ratos. Análise imunohistoquímica do rankl e OPG.**" Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Patrícia Pinto Saraiva (orientadora), Dra. Camila Lopes Cardoso e Dra. Andréia Aparecida da Silva. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, aprovada, com a nota 10.0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pela Orientadora e pelos demais membros da banca.

Dra. Patrícia Pinto Saraiva (Orientadora)

Dra. Camila Lopes Cardoso (Avaliador 1)

Dra. Andréia Aparecida da Silva (Avaliador 2)

Dedico esse trabalho a minha mãe Sueli Terezinha Domingues Maciel Braga e ao meu pai Edilson Braga que foram as peças chaves para que eu conseguisse chegar onde estou neste momento. Ela, mulher trabalhadora que sempre me incentivou e me apoiou em todos os momentos, às vezes um pouco dura em suas decisões, mas sempre firme e presente ao meu lado. Ele, homem forte, batalhador, de infância sofrida, que em nenhum momento, me deixou esquecer a humildade e sempre esteve ali, do meu lado me fortalecendo, nos momentos ruins e bons. Ambos me mostraram, que de alguma forma o sorriso é a única linha torta que endireita a vida.

Dedico também, esse trabalho, a todos os meus queridos professores, que nesses quatro anos de graduação, conseguiram de alguma maneira me tocar e me mostraram o quão apaixonada eu sou pela Odontologia; fizeram isso através de simples atitudes, explicações, paciência, sabedoria e um milhão de coisas mais.

Esses, com toda a certeza, irei levar pelo resto da minha vida dentro do meu coração, e serei grata eternamente por tão grandioso foi o aprendizado que eles me proporcionaram!

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas que em todos os momentos é o mestre maior.

Agradeço, a minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva pela dedicação a meu projeto, auxiliar-me tanto no desenvolvimento quanto na escrita deste trabalho, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

Agradeço muito à Profa. Dra Roberta Okamoto que me auxiliou no desenvolvimento dos experimentos, que mesmo não estando por perto estava presente sempre que precisávamos.

Agradeço a todos os professores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Agradeço à Universidade do Sagrado Coração USC, representada pela digníssima reitora Profa. Irmã Susana de Jesus Fadel.

Agradeço à Pró-Reitoria de Pesquisa, representada pela digníssima Pró-Reitora Sandra de Oliveira Saes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq; pelo apoio financeiro concedido em forma de bolsa PIBIC fundamental para a realização da minha iniciação científica.

E por último, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar se o Fisiograft atua como bom carreador para BMP-2 no processo de reparação óssea em calvária de ratos. Foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) adultos machos. Defeitos críticos de 5 mm de diâmetro foram preparados na calvária dos animais, utilizando broca trefina. Os animais foram divididos em 3 grupos: Grupo I - defeito preenchido por coágulo; Grupo II - defeito preenchido com copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PGLA) (Fisiograft); Grupo III - defeito preenchido com copolímero de ácido polilático e poliglicólico (Fisiograft) + BMP-2. Os animais foram eutanasiados aos 5, 15 e 30 dias de pós-operatório. A análise da ativação das proteínas OPG e RANKL, envolvidas no processo de reparo ósseo foi realizada por imunohistoquímica. A marcação foi avaliada por meio de escores atribuídos a marcação das proteínas em cada lâmina analisada (- ausente, + fraca, ++ moderada, +++ intensa). A análise estatística foi realizada por meio de testes não paramétricos sobre variáveis quantitativas de amostras independentes. Os valores de cada grupo foram comparados entre si, pelo teste de Kruskal – Wallis. O nível de probabilidade de erro foi fixado em 5% ($P < 0.05$). No grupo tratado com Fisiograft + BMP-2 a marcação para RANKL predominou sobre a OPG de forma significativa ($p < 0,001$), nos períodos de 5 e 15 dias. A predominância desta proporção foi observada em dois períodos somente neste grupo, quando comparados ao Coágulo e Fisiograft ($p < 0,05$). A ativação de RANKL e OPG nos diferentes grupos e tempos de análise mostrou que o Fisiograft não se comporta como um bom carreador para BMP-2, uma vez que a marcação de RANKL (que ativa osteoclastos) esteve presente em grande parte do período analisado, indicando prejuízo ao processo de reparo.

Palavras-chave: Reparo ósseo. BMP-2. Osteoprotegerina. RANKL. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the activation of proteins related to bone metabolism (and OPG RANKL) by means of immunohistochemistry, when the Fisiograft (polylactic acid Polyglycolic copolymer) is used as a carrier for BMP-2, in the process of bone repair in rat calvarium. 45 rats (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar) adult males were used. Critical defects of 5 mm in diameter were prepared in the calvarium of animals, using trephine drill. The animals were divided into 3 groups: Group I-default populated by clot; Group II-defect filled with a copolymer of polylactic acid and Polyglycolic (PGLA) (Fisiograft); Group III-defect filled with a copolymer of polylactic acid and Polyglycolic (Fisiograft) + BMP-2. The animals were euthanasiaded to 5, 15 and 30 days after surgery. Activation analysis of OPG and RANKL, proteins involved in the process of bone repair was performed by Immunohistochemistry. The markup was evaluated by means of scores assigned marking of proteins in each blade analysed (-absent, weak, ++ moderate +, +++ intense). Statistical analysis was performed by means of nonparametric tests on quantitative variables of independent samples. The values of each group were compared with each other, by Kruskal-Wallis test. The level of probability of error was set at 5% ($P < 0.05$). In the group treated with Fisiograft + BMP-2, the markup for RANKL predominated on the OPG significantly ($p < 0.001$) in the periods of 5 and 15 days. The predominance of this proportion was observed in two periods only in this group, when compared to the blood clot and Fisiograft ($p < 0.05$). The activation of RANKL and EPG in different groups and times of analysis showed that the Fisiograft does not behave as a good carrier for BMP-2, since the markup of RANKL (which activates osteoclasts) was present in much of the analysis period, indicating damage to the repair process.

Keywords: Bone repair. BMP-2. Osteoprotegerin. RANKL. Immunohistochemistry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	09
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 ANIMAIS	16
3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	17
3.3 EUTANÁSIA E PREPARO DO MATERIAL	18
3.4 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	18
3.5 ANÁLISE ESTÁTICA	19
4. RESULTADOS	20
4.1 MARCAÇÃO PARA OPG	20
4.2 MARCAÇÃO PARA RANKL	23
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	31
7. REFERÊNCIAS	32
8. ANEXOS	35

1 INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são fatores de crescimento que pertencem à superfamília do fator de crescimento transformador β e que são caracterizadas pela sua capacidade de iniciar a formação ectópica de osso. Reconhecidas pelos excelentes resultados na regeneração óssea, as BMPs são fundamentais para a ossificação endocondral, cada qual responsável por níveis adequados de atividade em diferentes áreas do esqueleto. Além disso, as BMPs são necessárias para a manutenção do *status* ósseo na fase adulta, quando mantém nichos de células-tronco, especialmente as hematopoiéticas na medula óssea, juntamente com as osteoprogenitoras. (SCHMOEKEL et al., 2005)

A BMP-2 desempenha um papel essencial no esqueleto pós-natal: a ausência de sua produção produz atrasos significantes na formação de centros de ossificação secundários nos membros, produzindo microfraturas e levando à fratura propriamente dita em curto período de tempo (MCKAY et al., 2007). Células osteoprogenitoras que não expressam BMP-2 possuem capacidade limitada de proliferação e diferenciação em osteoblastos, sugerindo que a progressão para osteócitos também seja prejudicada (FISCHER et al., 2013). A atividade da BMP-2 declina com a idade e seu polimorfismo e está ligada à osteoporose e fraturas (CANALIS et al., 2003).

In vitro, Li et al. (2011) investigaram o efeito da BMP-2 na proliferação de condrócitos isolados do joelho de ratos *Sprague Dawley*. De 48 animais machos livres de patógenos, as cartilagens dos joelhos foram removidas, seccionadas e cultivadas em placas contendo colagenase. As células foram filtradas e semeadas em frascos, onde proliferaram até atingir 80% de confluência. A segunda geração de condrócitos foi identificada com azul de toluidina e semeadas novamente para receberem 5, 10 ou 20 ng/ml de BMP-2. Após este tratamento, as sequências de RNA de β -catenina, GSK-3 β , DVL1, e ciclina D1 foram amplificadas e os níveis mensurados. Os resultados sugerem que o acréscimo de BMP-2 na cultura aumentou a viabilidade celular, além dos níveis de β -catenina, DVL1 e ciclina D1 nas concentrações de 10 e 20 ng/ml; por outro lado, os níveis de GSK-3 β foram mais baixos com 20 ng/ml de BMP-2. A proliferação de condrócitos foi significativamente aumentada nas células tratadas com 10 ou 20 ng/ml de BMP-2 quando comparadas

às controles. Concluíram que a BMP-2 promoveu a proliferação dos condrócitos pelo aumento da expressão de β -catenina, DVL1 e ciclina D1, redução da expressão de GSK-3 β , e estímulo da fase G1/S do ciclo celular.

Embora a BMP-2 deva estar presente em pequenas concentrações locais para induzir a formação de osso, o excesso não é desejável devido aos efeitos adversos, como indução de resposta imunológica. (CHUANG et al., 2010). Além disso, o alto custo e a rápida perda da atividade *in vivo* torna o tratamento inviável com altas doses da proteína. Por outro lado, um dos inibidores da biodisponibilidade da proteína, Noggin, pode ser bloqueado por um inibidor competitivo, L51P, o que poderia aumentar a atividade da BMP-2 exógena. (DUDARIĆ et al., 2013). Enquanto novos estudos são necessários para a aplicação dessa estratégia, duas abordagens podem ser utilizadas para promover a liberação local contínua: utilização de veículos poliméricos ou minerais, reabsorvíveis ou não, que carregam o BMP-2; e a fixação por ligações covalentes ou iônicas na superfície do implante.

Estudos com modelos experimentais

Hirata et al. (2007) observaram que a esponja de apatita carbonada não era por si só, capaz de estimular a formação ectópica de osso suficiente, apesar de possuir porosidade de tamanho propício à proliferação de osteoblastos. Assim, testaram a embebição de BMP-2 humano recombinante na esponja reforçada com estrutura anelar de hidroxiapatita de 06 mm de diâmetro externo por 02 mm de altura e 01 mm de espessura, inserindo sob o perióstio da calvária de ratos *Wistar* machos. Após quatro semanas, os animais foram eutanasiados, e os espécimes foram processados histologicamente. Formação ativa de osso foi observada dentro e fora da estrutura da esponja, com o osso neoformado mostrando grande ligação com o perióstio. Concluíram que o BMP-2 recombinante humano era extremamente útil e efetivo na reparação rápida do osso, combinado com a esponja de colágeno e apatita carbonada como arcação carreador.

Tschon et al. (2007) realizaram um estudo *in vivo* para investigar a eficácia terapêutica do copolímero de ácido polilactato-poliglicólico (Fisiograft®, Ghimas – Bolonha, Itália), comparando-o com substitutos ósseos. Em 12 miniporcos machos, um pré-molar superior de cada lado foi extraído, com remoção da cortical vestibular, e o alvéolo aleatoriamente preenchido com gel ou esponja do copolímero, BioOss

(Geistlich Biomaterials) ou Biocoral (Inoteb, França). Aos 15, 30 e 60 dias pós-cirúrgicos, quatro animais foram eutanasiados em cada período. Os espécimes ósseos foram incluídos em metilmetacrilato para análise histológica e histométrica, no qual se mediu o volume de osso trabecular, espessura do trabeculado, o número de trabéculas e o espaçamento trabecular. Aos 15 dias, osso neoformado foi observado em todos os alvéolos, porém de aparência imatura, uma vez que o trabeculado era denso e fino; com 30 dias, tanto o gel quanto a esponja estavam degradados, e os alvéolos encontravam-se preenchidos com osso que em termos de volume, número e espaçamento não foram estatisticamente diferentes do osso receptor; e no final dos 60 dias, não foi possível distinguir osso neoformado do osso receptor. Concluíram que ambas as apresentações do copolímero eram materiais osteocondutivos adequados e desapareciam totalmente após a reparação óssea completa.

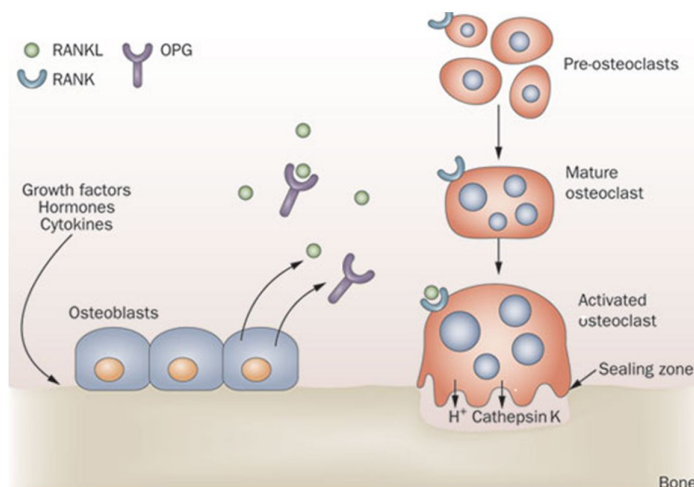
LUVIZUTO et al. (2011) compararam as propriedades osteocondutivas de três biomateriais comercialmente disponíveis, suplementados ou não com BMP-2. Em 20 ratos *Wistar*, dois defeitos de 5 mm foram feitos na calvária e divididos em oito tratamentos: fosfato tricálcico β , gel de ácido polilactato-poliglicólico e cimento de fosfato de cálcio, cada um com ou sem BMP-2, controle vazio e enxerto autógeno. Aos 15 e 30 dias, os animais receberam uma dose de calceína e alizarina, marcadores ósseos, e foram sacrificados aos 45 dias, quando a porção da calvária foi removida para inclusão em resina. A microtomografia revelou completo fechamento apenas com fosfato tricálcico β , com ou sem BMP-2, e permanência do defeito com o gel e o cimento de fosfato de cálcio, ambos suplementados com BMP-2. Tridimensionalmente, o enxerto autógeno e ambos os grupos de fosfato apresentaram tendência de mais tecido mineralizado do que o gel e o cimento. A histomorfometria refletiu os achados da microtomografia, com o gel apresentando o menor volume de osso mineralizado, em contraste ao fosfato tricálcico β ; a suplementação com BMP-2 não aumentou a quantidade absoluta e nem relativa de formação de osso em quaisquer materiais e induziu a degradação do cimento de fosfato de cálcio. A imunofluorescência revelou maior coloração com o fosfato tricálcico β e menor com o gel, e influência do BMP-2 apenas no cimento de fosfato de cálcio. Concluíram que nem o gel de ácido polilactato-poliglicólico e cimento de fosfato de cálcio, suplementados ou não com BMP-2, foram superiores aos resultados obtidos com o fosfato tricálcico β sem BMP-2.

Chappuis et al. (2012) testaram o papel da BMP-2 na incorporação do enxerto ósseo após inativarem o gene responsável (*knock-out*) pela transcrição da proteína em camundongos. Em grupos de oito, constituídos tanto de animais *knock-out* quanto pelo mesmo número de controles, os seguintes procedimentos foram realizados: enxertos autógenos, com remoção e recolocação dos fêmures no mesmo animal ou entre irmãos; enxertos alógenos com osso desidratado e congelado, coletados de animais *knock-out* ou não; e adição de BMP-2 humano recombinante, nos dois enxertos anteriores. Como esperado, com 21 dias os animais controles apresentaram formação de calo conectando o osso hospedeiro e o enxerto autógeno, ao contrário dos animais *knock-out*, nos quais o enxerto se apresentava desconectado, além de menor neoformação de osso. Quando enxerto alógeno de animais controles foi transplantado para animais *knock-out*, as células do perióstio foram capazes de formar osso com 21 dias, porém restrito ao espaço delimitado pelo perióstio; o acréscimo de BMP-2 ao enxerto foi capaz de estimular as células do perióstio do osso hospedeiro, capacitando-os a formar o calo ósseo. No experimento reverso, o enxerto alógeno de osso de animal *knock-out* em animais controles resultou em formação de calo, porém, não ultrapassou os limites do enxerto. Com relação ao enxerto desidratado, não houve formação de calo nos primeiros 21 dias em nenhuma das condições experimentais, ao contrário do que ocorreu com o acréscimo de BMP-2, que induziu a formação de osso entre enxerto e osso hospedeiro. Concluíram que a BMP-2 era uma molécula sinalizadora cuja presença determinava o sucesso ou a falha dos enxertos ósseos.

Proteínas relacionadas às BMPs-2 no remodelamento ósseo

O padrão de sinalização RANK/RANKL/OPG possui um papel fundamental no remodelamento ósseo; a interação do RANK com o RANKL aumenta a produção, atividade e sobrevivência de osteoclastos, mas os efeitos do RANKL são bloqueados pela osteoprotegerina (OPG) (KAMIYA, 2012). A ligação de RANKL, produzido pelos osteoblastos, a seu receptor RANK, localizado nos pré-osteoclastos, induzem a diferenciação osteoclástica, fusão celular e reabsorção óssea. Em adição, os osteoblastos expressam osteoprotegerina, um receptor solúvel para RANKL que inibe a ligação RANK-RANKL (Figura1). A média entre RANKL e OPG é o principal determinante para a atividade de formação osteoclástica. (TANAKA et al., 2005).

Figura 1 - RANKL liga-se ao seu receptor RANK, e ativa a formação dos osteoclastos. Quando a OPG liga-se ao RANKL impede que o processo de formação dos osteoclastos ocorra.



Fonte: Nature Reviews Rheumatology 7, 631-638, 2011).
(Lewiecki EM. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis.

A atividade osteoindutiva das proteínas ósseas morfogenéticas sugerem que elas são importantes reguladores no processo de reparação óssea e podem estar envolvidas na manutenção destes tecidos. (WOZNEY et al., 1992).

Embora a BMP-2 seja reconhecida como um dos mais efetivos tratamentos para indução de formação óssea. (YAMAMOTO et al., 2003), existem evidências de que as BMPs podem reduzir a massa óssea por meio da indução da via de ativação de osteoclastogênese. O tratamento de células osteoblásticas com BMP-2 ou RANKL resulta na formação de células multinucleadas positivas à fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), indicando a formação e ativação de células responsáveis pela reabsorção. (GRANHOLM et al., 2013).

Em um estudo de Itoh et al. (2001), os autores mostram que a BMP-2 pode influenciar diretamente a osteoclastogênese por meio de células da linhagem osteoblástica, uma vez que a BMP-2 aumentou a sobrevivência de osteoclastos, por meio da manutenção de altos níveis de RANKL.

O reconhecimento da ação da BMP-2 sobre a ativação dos osteoclastos é

ainda possui algumas divergências, parecendo que sua ação é dependente da concentração de BMPs utilizada. O uso de carreadores pode modificar a disponibilidade desta proteína, levando a um melhor aproveitamento da substância pelo tecido ósseo.

Portanto, nosso objetivo é avaliar de que forma o Fisiograft atua como carreador para BMP-2 no processo de reparação óssea em calvária de ratos e se ele influencia na produção do RANKL, que pode levar a um aumento no processo de reabsorção, prejudicando a formação óssea esperada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ativação de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo (RANKL e OPG), quando utilizado o ácido polilático e poliglicólico (Fisiograft), associado ou não a BMP2, no reparo de defeitos cirúrgicos de tamanho crítico em calvária de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar:

- Atividade de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo, por meio de marcação imunohistoquímica das proteínas RANKL (reabsorção óssea) e OPG (bloqueio da reabsorção).

3 MATERIAL E MÉTODOS (Etapas realizadas)

3.1 ANIMAIS

Para o presente estudo foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*) adultos machos, com 3 a 4 meses de idade, e peso corporal variando de 250 a 300g, em bom estado de saúde, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta padrão, ração sólida e água *ad libitum*, em condições climatizadas, no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, protocolo nº 2008-004517.

Cada grupo do estudo foi formado por 15 animais, sendo destinados 05 animais para cada tempo de tratamento pré-estabelecido (5, 15 e 30 dias). Em todos os animais foram realizados dois defeitos ósseos de tamanho crítico (5 mm) localizados na calvária, constituindo os grupos experimentais:

Grupo Coa (n=15): o defeito foi preenchido somente por coágulo;

Grupo Fi (n=15): o defeito foi preenchido com copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PLA/PGA) (Fisiograft® - Ghimas SPA, Italia);

Grupo Fib (n=15): o defeito foi preenchido com copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PLA/PGA) (Fisiograft® - Ghimas SPA, Italia) associado a BMP2.

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos e a eutanásia dos animais foram realizados no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, em associação com a Profa. Dra. Roberta Okamoto.

Os animais foram mantidos em jejum durante doze horas prévias ao procedimento cirúrgico e receberam administração de Cloridrato de Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na concentração de 10 mg/kg, associado a Cloridrato de Ketamina. (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) na dosagem de 75-100 mg/kg, administrados na forma intramuscular. Receberam ainda, infiltração de solução anestésica local contendo cloridrato de mepivacaína. (0.3 ml/Kg, Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França), para hemostasia do campo operatório.

Após a anestesia dos animais foi realizada tricotomia e antissepsia da região da calota craniana que foi operada, com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) foi realizada uma incisão linear longitudinal, a seguir realizou-se o descolamento de retalho de espessura total e afastamento deste com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso onde foi realizado o defeito ósseo. Foi utilizado um motor elétrico com rotação variando entre 20 e 2600 rpm para confecção dos defeitos ósseos, com bomba peristáltica e um contra-ângulo redutor de 1:16. (Kavo, Santa Catarina, Brasil). Para obtenção do defeito crítico foi utilizada uma broca trefina de 5 mm de diâmetro. (3i Implant Innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA), com irrigação por meio de solução de cloreto de sódio a 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) durante toda a preparação.

O defeito ósseo foi preenchido de forma igualitária em cada animal, nos diferentes grupos e com o mesmo material. Os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no

plano mais externo, de modo a obter o fechamento primário da ferida. Após a sutura novamente foi realizada a antissepsia da área com Polivinil Pirrolidona, Iodo Tópico. (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto).

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única de Tramadol (5mg/kg, IP) que possui efeito por cerca de 12 horas, por se tratar de um procedimento agressivo, que pode causar dor relativamente forte nos animais.

3.3 EUTANÁSIA E PREPARO DO MATERIAL

Os animais foram eutanasiados por meio de injeção de barbitúricos (Tiopental), na dose de 150mg/kg, IP, em conjunto com lidocaína (10mg/mL). As peças contendo o implante foram removidas e fixadas em formol a 10% tamponado.

A preparação das lâminas foi realizada no Laboratório de Histologia e Imunologia da Universidade do Sagrado Coração. (USC- Bauru). As análises imunohistoquímica foram realizadas no mesmo laboratório (USC- Bauru). Após processamento laboratorial de rotina, as peças foram incluídas em parafina para possibilitar a microtomia. Os cortes, semisseriados, com 5 µm de espessura, foram preparados para as reações de imunohistoquímica.

Previamente à realização da análise imunohistoquímica as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador soube quais grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconheceu o respectivo grupo da secção.

3.4 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram realizados experimentos de imunohistoquímica utilizando 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). Os anticorpos primários a serem utilizados foram contra OPG e RANKL. (Santa Cruz Biotechnology), com o objetivo de se caracterizar as respostas celulares quanto à formação (OPG) e

quanto à reabsorção óssea (RANKL), considerando-se que a avaliação conjunta da expressão destas duas proteínas indica a taxa de remodelação óssea.

Foi utilizado o anticorpo secundário biotinilado anti cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology). O amplificador foi a Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) foi utilizada como cromógeno. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a marcação das proteínas pela atribuição de diferentes escores de acordo com o número de células imunomarcadas na calota craniana. A análise foi realizada em microscópio ótico. (Leica® DMLB, Heerbrugg, Switzerland).

Uma vez realizada a marcação, foram avaliados 5 campos por lâmina, em aumentos de 40X. A determinação dos níveis de marcação para cada anticorpo foi realizada de modo semiquantitativo, utilizando-se escores de 1 a 4 (1 = ausente, 2= fraco, 3=moderado e 4 = intenso), de acordo com Pedrosa Jr. et al. (2009).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

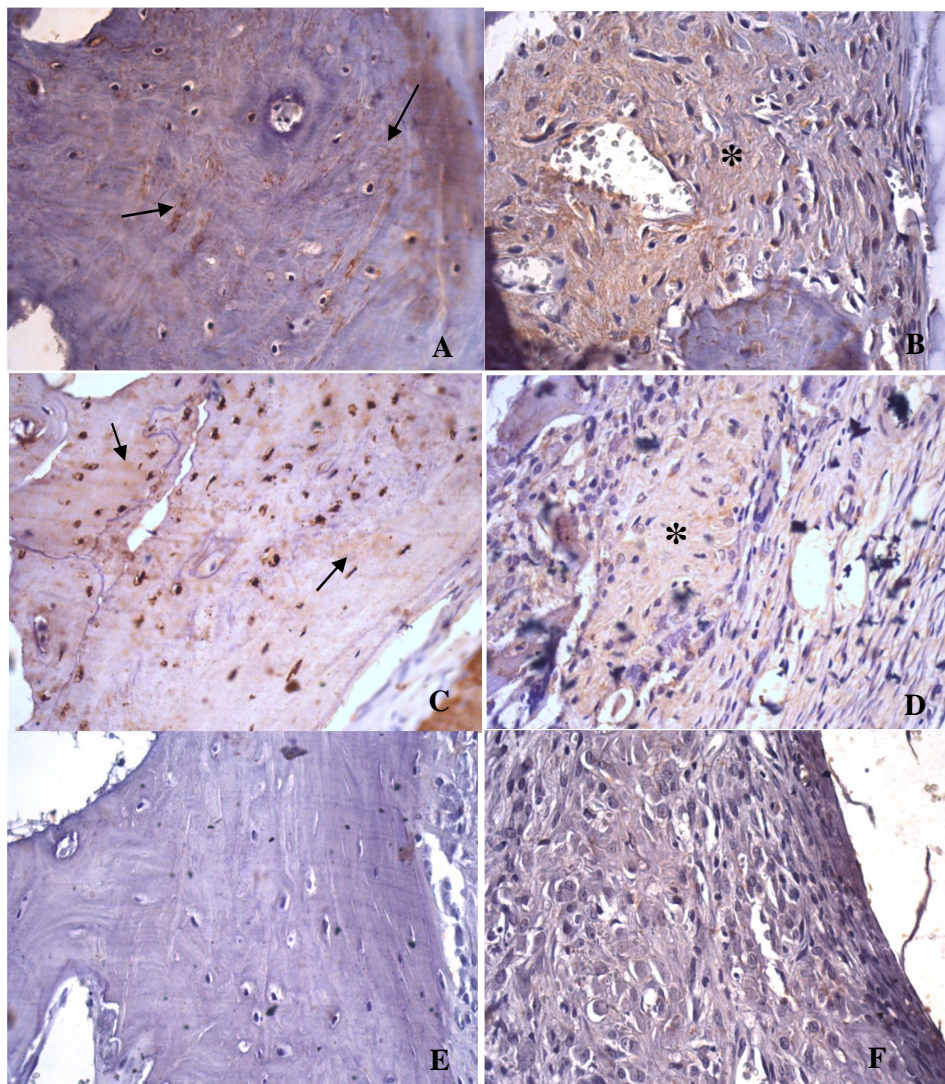
A análise estatística foi realizada por meio de testes não paramétricos sobre variáveis quantitativas de amostras independentes. Os valores de cada grupo foram comparados entre si, pelo teste de Kruskal – Wallis. O nível de probabilidade de erro foi fixado em 5% ($P < 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1 MARCAÇÃO PARA OPG

Aos 5 dias, no grupo Coa a marcação de OPG mostrou-se moderada a intensa, e no grupo Fi foi moderada, marcando região de matriz extracelular e ao redor das lacunas dos osteócitos, além de áreas de matriz de tecido conjuntivo, especialmente em regiões vascularizadas. No grupo Fib a marcação para OPG esteve ausente neste período (Figura 2).

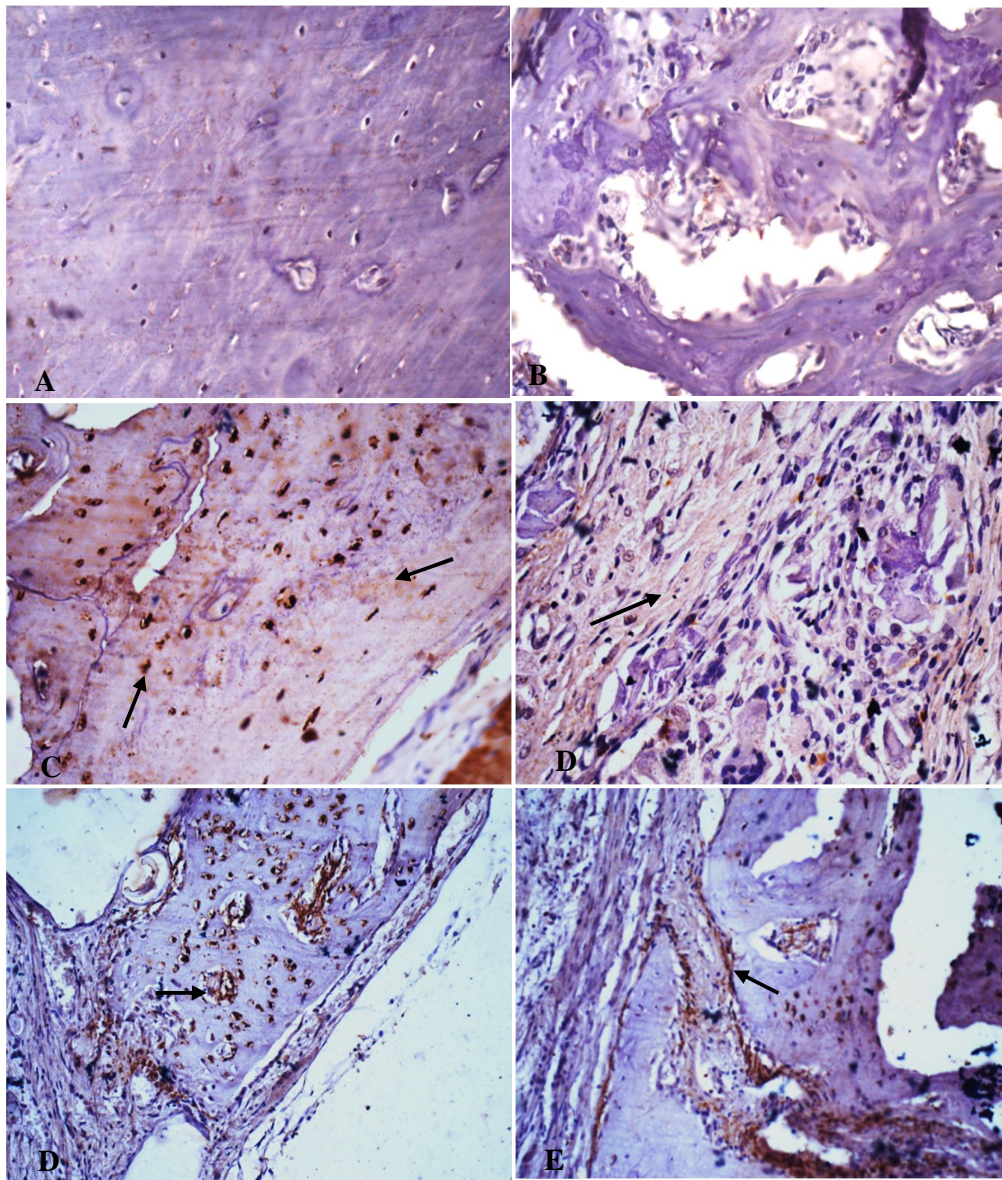
Figura 2 - Marcação para OPG aos 5 dias.



Fonte: Elaborada pelos autores. Imunomarcção para OPG aos 5 dias. A e B – Coa; C e D – Fi. OPG foi marcada na matriz óssea (setas), assim como na matriz do tecido conjuntivo (*). E e F – Fib. Ausência de marcação, tanto no tecido ósseo, como no conjuntivo. Aumento de 40x.

Aos 15 dias, o grupo Coa apresentou ausência de marcação, enquanto nos grupos Fi a marcação foi de moderada a intensa, e Fib foi moderada, localizada na matriz óssea e lacunas dos osteócitos, e matriz de tecido conjuntivo (Figura 3).

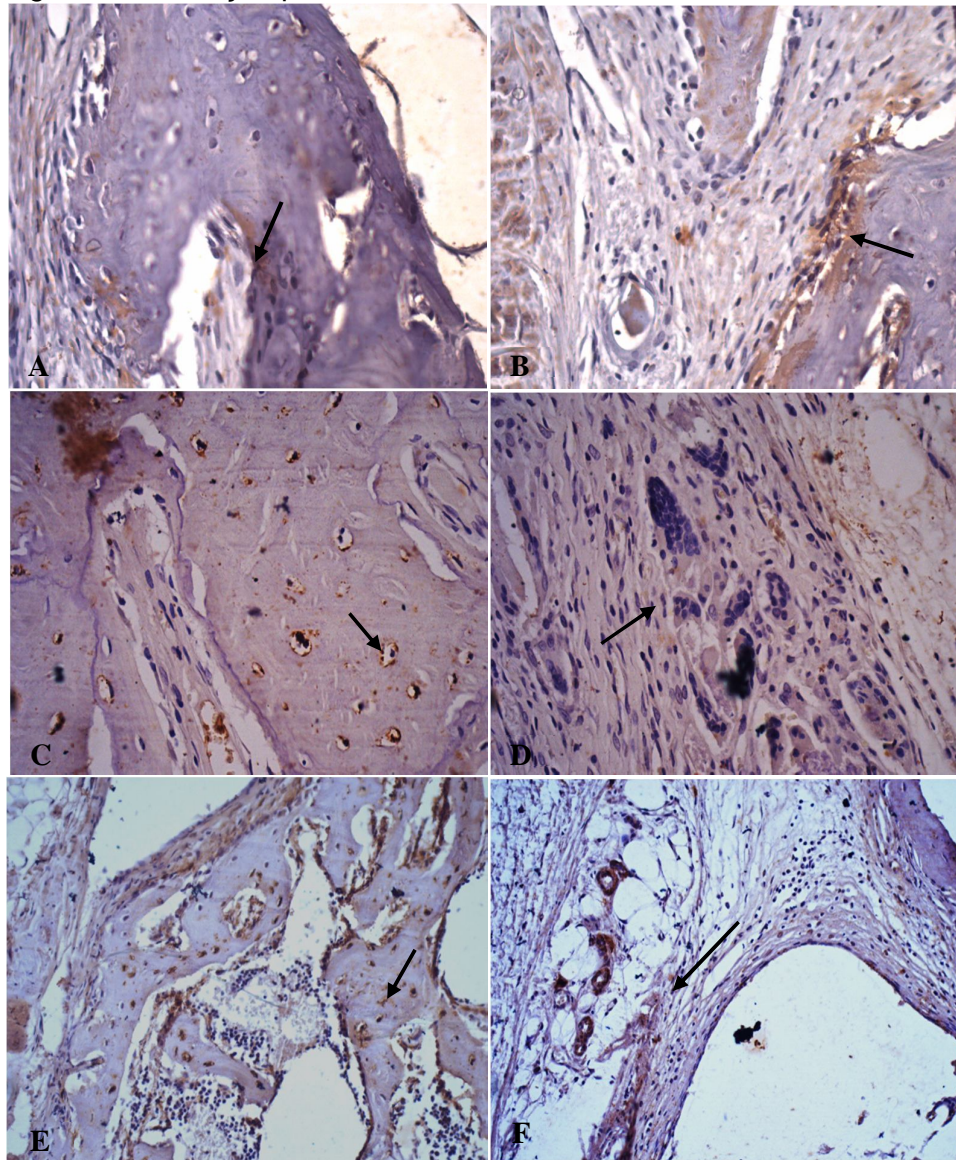
Figura 3 - Marcação para OPG aos 15 dias.



Fonte: Elaborada pelos autores. Marcação para OPG aos 15 dias. A e B - Coa com marcação ausente. C e D - Fi, E e F- Fib, apresentam marcação moderada na matriz óssea, lacunas dos osteócitos e matriz do conjuntivo (setas). Aumento de 40x.

Aos 30 dias a marcação para Coa e Fib se apresentou fraca e em Fi, de fraca a moderada (Figura 4).

Figura 4 - Marcação para OPG, aos 30 dias.

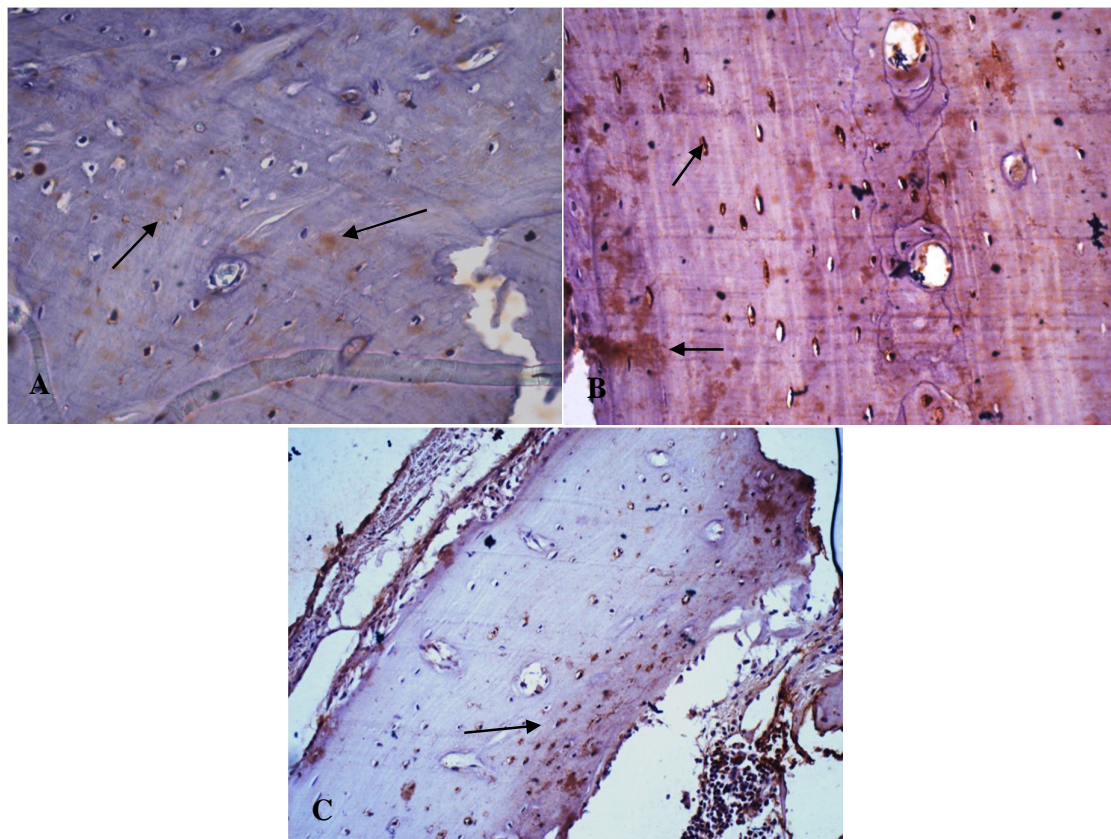


Fonte: Elaborada pelos autores. Marcação para OPG aos 30 dias foi fraca para Coa A e B, Fi C e D, Fib E e F. Em todos os grupos a marcação ocorreu em matriz óssea e de tecido conjuntivo (setas). Aumento de 40x.

4.2 MARCAÇÃO PARA RANKL

Aos 5 dias, a marcação para RANKL em Coa e Fib foi fraca, presente na matriz óssea, enquanto no grupo Fi foi moderada, presente, além da matriz, nas lacunas dos osteócitos (Figura 5).

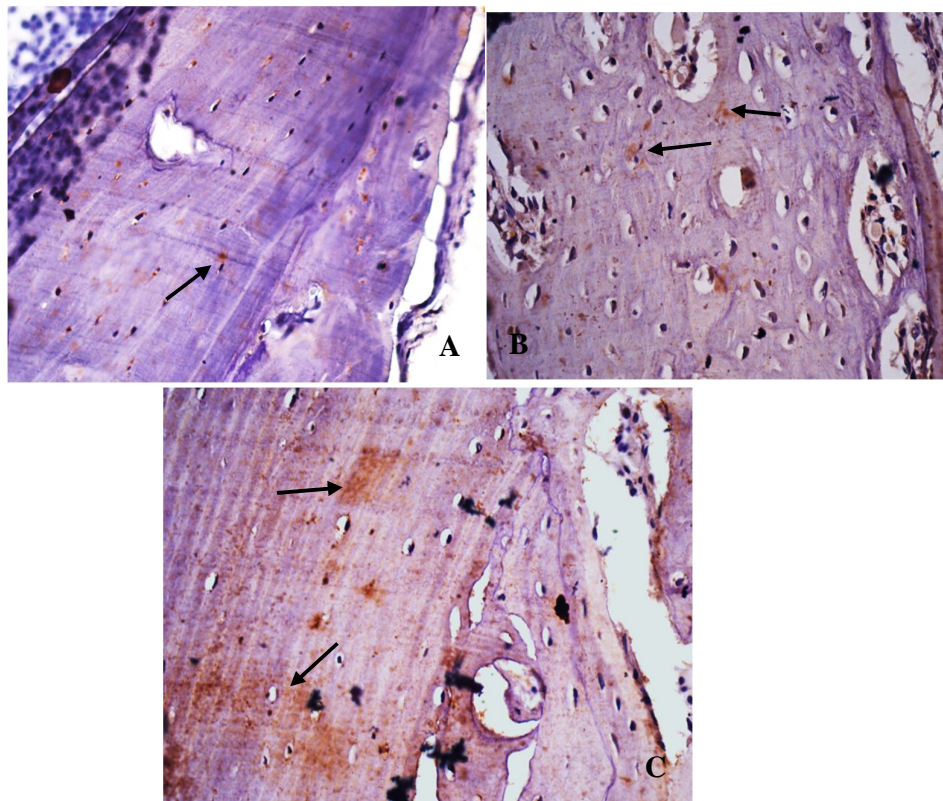
Figura 5 - Imunomarcção para RANKL, aos 5 dias.



Fonte: Elaborada pelos autores. Imunomarcção para RANKL. Em A e C, grupo Coa e Fib, respectivamente, a marcação mostrou-se fraca, distribuída pela matriz óssea (seta). Em B, no grupo Fi, a marcação foi moderada, distribuída pela matriz e lacunas dos osteócitos (setas). Aumento de 40x.

Aos 15 dias, nos grupos Coa e Fi a marcação foi fraca, concentrada na matriz óssea, mas no grupo Fib a marcação tornou-se moderada (Figura 6).

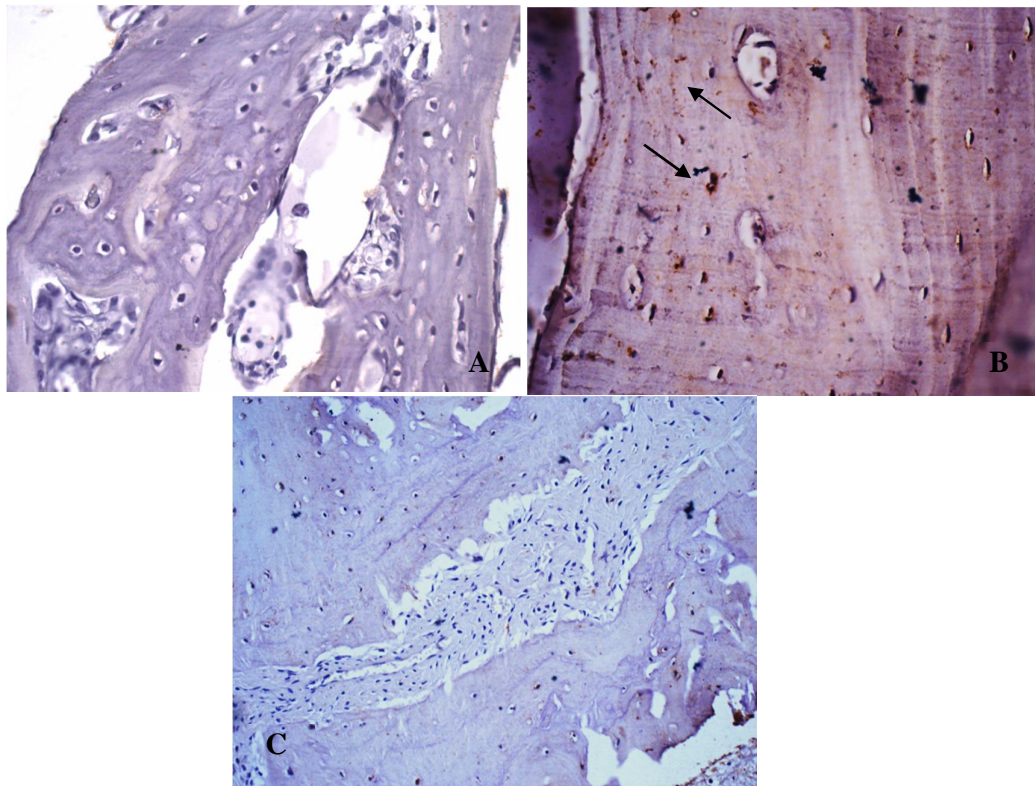
Figura 6 - Imunomarcação para RANKL aos 15 dias.



Fonte: Elaborada pelos autores. A marcação para RANKL esteve presente de forma fraca nos grupos Coa (A) e Fi (B), encontrada na matriz óssea (setas). Em C, a marcação ocorreu de forma moderada no grupo Fib, encontrada na matriz óssea (seta). Aumento de 40x.

Aos 30 dias, a marcação por RANKL foi ausente nos grupos Coa e Fib, e fraca no grupo Fi, encontrada na matriz óssea (Figura 7).

Figura 7 - Imunomarcação por RANKL aos 30 dias.



Fonte: Elaborada pelos autores. Nos grupos Coa (A) e Fib (C), não foram observadas marcação. No grupo Fi (B), a marcação foi fraca, encontrada na matriz óssea (setas). Aumento de 40x.

A análise semiquantitativa dos escores atribuídos às marcações de cada proteína analisada (OPG e RANKL) está representada Tabela 1. A análise estatística realizada entre os tratamentos ocorreu baseando-se nos diferentes períodos analisados.

Na análise de 5 dias, a marcação de osteoprotegerina foi significativamente diferente entre os três tratamentos ($p < 0,001$), sendo que no grupo Coa foi maior que no Fi, e o grupo Fib apresentou a menor marcação entre os grupos. Aos 15 dias os três grupos mostram-se diferentes entre si ($p < 0,001$), sendo que o Fib apresentou a menor marcação, sendo seguido pelo Fi e Coa. Aos 30 dias Coa e Fib apresentaram marcação semelhante ($p > 0,05$). A diferença foi constatada entre os grupos Coa e Fi, e entre Fi e Fib ($p < 0,001$).

Cada grupo, nos períodos de 05, 15 e 30 dias, foram feitas 04 lâminas por animal de cada grupo, e em cada lâmina, foram fotografados 05 campos.

Com relação ao RANKL, no período de 5 dias, a marcação entre os grupos Coa e Fib foi semelhante ($p>0,05$). Diferença foi notada entre Coa e Fi, sendo que Coa apresentou menor marcação ($p<0,001$) e entre Fi e Fib (menor marcação) ($p<0,001$). Aos 15 dias o escore do grupo Fi diminuiu e tornou-se semelhante ao Coa ($p>0,05$). Nestes dois grupos, a marcação foi menor que em Fib ($p<0,001$). Aos 30 dias, a marcação em Coa e Fib diminuiu e torna os grupos semelhantes ($p>0,05$). O grupo Fi mantém a marcação, sendo maior que nos demais grupos ($p<0,001$).

Tabela 1 – Escores da análise semiquantitativa, variando de “-“ para ausência de imunomarkação a “+, ++, +++” para marcação leve, moderada e intensa, respectivamente.

	OPG	RANKL
5 dias		
Coa	+++	+
Fi	++	++
Fib	-	+
15 dias		
Coa	-	+
Fi	+++	+
Fib	++	+++
30 dias		
Coa	+	-
Fi	++	+
Fib	+	-

Fonte: elaborada pelos autores.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho se propôs avaliar o comportamento do Fisiograft como carreador para BMP-2 no processo de reparação óssea em calvária de ratos. Porém, o que foi observado, é que a associação do Fisiograft à BMP-2 não produziu melhores resultados que o Fisiograft sozinho.

A utilização de biomateriais associados a fatores de crescimento podem auxiliar no processo de cicatrização de tecido ósseo, sendo de fundamental importância para a neoformação óssea (LUVIZUTO, 2011).

As BMPs foram descobertas pelo Dr. Marshall Urist, quando observou neoformação óssea em ratos após a formação de matriz óssea descalcificada em bolsas de tecido mole, que ele mais tarde chamou de “proteínas responsáveis pela formação óssea” – BMPs. (URIST, 1965) . Mais de 20 BMPs foram identificadas, das quais 7 parecem ser capazes de iniciar o crescimento ósseo. (EL-AMIN et al., 2010).

O papel da BMP-2 na atuação da diferenciação de osteoblastos foi amplamente investigado e foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como alternativa para enxertos ósseos, em fraturas de ossos longos e aplicações ortopédicas e maxilofaciais. (GAUTSCHI et al., 2007).

Diferentes modelos animais têm sido usados para verificar o potencial terapêutico das BMPs na reparação e regeneração óssea. (REDDI, 1998). Para este estudo utilizamos ratos Wistar, que possuem a calota craniana, e possibilita a realização de defeitos críticos.

A meia-vida da BMP-2 é de cerca de 6 a 7 min em primatas não humanos, devido à degradação enzimática e rápida taxa de depuração. (SEEHERMAN et al., 2005). Para aumentar a sua eficácia as BMPs são combinadas com veículos biocompatíveis, tais como as esponjas absorvíveis de colágeno. O carregamento das BMPs numa esponja de colágeno absorvível permite a liberação gradual das BMPs ao longo do tempo, o que estimula a formação de osso novo no local do defeito ósseo ou implante .

Existem vários tipos de transportadores que foram investigados para carrear as BMPs. (KEMPEN et al., 2008). Em geral, os cinco grupos são: natural, polímeros sintéticos, cerâmicas naturais e artificiais.

Dos vários tipos de polímeros biodegradáveis disponíveis, ácidos poli-alfa-hidroxí, tais como o ácido poliláctico (PLA) , Ácido poliglicólico (PGA) , e o seu

copolímero poli (DL - lactido - co - glicolido) (PLGA) , surgiram como escolhas para carreadores. (SAITO N, TAKAOKA, 2003). Para este trabalho foi escolhido como carreador o ácido poliglicólico/polilático, da marca comercial Fisiograft.

No entanto, apesar de ser biocompatível, a aplicação clínica de PLGA puro para a regeneração óssea é dificultada pela falta de osteocondutividade. Portanto , o PLGA muitas vezes utilizado em combinação com outros materiais, tais como cerâmica, vidro bioactivo , ou é oportunamente modificado de modo a tornar o PLGA mais biomimético e capaz de aumentar a regeneração óssea. (PAN & DING, 2012). Para este experimento, um dos grupos foi tratado com PLGA puro (Fisiograft), sem adição de outros componentes, já que este grupo serviu como uma base para verificarmos sua associação com a BMP-2.

O estudo da reabsorção de tecido ósseo pode ocorrer pelo monitoramento de proteínas que participam ativamente na ativação de osteoclastos: a tríade RANK/RANKL/OPG. O RANKL se liga ao receptor de RANK, localizado na superfície de células precursoras de osteoclastos, induzindo estas células a se diferenciarem em osteoclastos maduros, capazes de realizar reabsorção de tecido ósseo. (LACEY et al., 2000). A osteoclastogênese é regulada negativamente pela osteoprotegerina (OPG), que é um receptor que compete com RANK pela ligação ao RANKL. (YASUDA et al., 1998). O controle da expressão destas proteínas fornece dados importantes para se obter informações da atividade celular do tecido alvo, e conseqüentemente do processo de reparo. Assim, neste estudo, para acompanharmos a influência do carreador na entrega local de BMP-2, determinamos a marcação das proteínas OPG e RANKL no processo de reparo, em defeito ósseo crítico.

Aos 5 dias de cicatrização é evidente e significante estatisticamente a maior marcação de OPG no grupo coágulo, seguido pelo grupo Fi e a menor marcação para OPG foi encontrada no grupo Fib. Por outro lado, o RANKL predominou no grupo que utilizou Fi sozinho, e os grupos coágulo e Fib foram semelhantes. A proporção entre OPG/RANKL foi positiva para OPG no coágulo, manteve-se equilibrado com Fi e foi positiva para RANKL na associação Fib. Assim, nesta fase inicial a utilização do carreador parece ter prejudicado o reparo, com melhores resultados para o coágulo.

Aos 15 dias a marcação de OPG para Fi foi a maior obtida, seguida pelo Fib e a menor delas no coágulo. Já a marcação de RANKL foi semelhante para coágulo e Fi e predominou no grupo Fib. Com relação à proporção OPG/RANKL, o predomínio de RANKL ocorreu somente no coágulo, predomínio de OPG no Fi e semelhança entre OPG/RANKL no Fib. Neste período intermediário o maior bloqueio da reabsorção foi no grupo .

Os resultados obtidos aos 5 e 15 dias evidenciam que o processo de reparo começa a apresentar melhores resultados aos 15 dias. PAN & DING, em 2012, salientaram que apesar de ser biocompatível, a aplicação clínica de PLGA puro para a regeneração óssea é dificultada pela falta de osteocondutividade. Esta falta de condutividade pode ter interferido com o processo inicial do reparo no grupo PLGA, no qual notamos que a reabsorção é maior que no grupo coágulo. Portanto, o PLGA muitas vezes utilizado em combinação com outros materiais é modificado, de modo a tornar o PLGA capaz de aumentar a regeneração óssea.

Aos 30 dias a OPG é semelhante entre coágulo e Fib e maior no Fi. Com o RANKL houve predominância no Fi e semelhança entre coágulo e Fib. A proporção OPG/RANKL causou predomínio de OPG em todos os grupos analisados, mas de forma mais eficaz no grupo Fi.

Diferentes estudos mostram comportamentos diferentes para a liberação de BMP-2, dependendo do tipo de material utilizado como carreador. Kim et al, em 2008, mostraram que a associação de PLGA revestido com apatita em combinação com BMP-2 suspensa em gel de fibrina mostrou uma diminuição da velocidade de liberação de proteínas, e aumento na formação de osso, em defeitos críticos de calvária, em ratos.

Outro estudo (OEST et al., 2007) também mostrou a diferença entre os carreadores para BMP-2. Neste trabalho os autores mostraram que a combinação de BMP-2/PLGA com polímeros naturais, tais como hidrogel de alginato aumentam o reparo ósseo femoral em modelo de rato. Mas a combinação de PLGA com polímeros sintéticos demonstraram diminuição da taxa de liberação de BMP-2 *in vivo*.

Assim, podemos afirmar que nossos dados estão em consonância aos encontrados por OEST et al., 2007, já que também encontramos dados que refletem um processo de reparo atrasado em relação ao grupo Fi, que é caracterizado como polímero sintético.

LUVIZUTO et al., 2011, avaliou, em ratos, a influência da BMP-2 associada ao Fisiograft, entre outros biomateriais, e assim como neste estudo, não observou melhores resultados quando o fator de crescimento foi associado ao PLGA. Outros estudos, como o de CHAPPUIS et al. (2012), porém, observou resultados positivos quando houve associação da BMP-2 a um enxerto alógeno.

Outra linha de pesquisa também poderia justificar a ausência de resultados positivos frente à incorporação de BMP-2 ao PLGA observada neste experimento. Observações de ITOH et al. (2001) e GRANHOLM et al., 2013, indicam que a atividade da BMP-2 pode estar associada ao processo de ativação da osteoclastogênese. Esta atividade foi observada claramente no período inicial deste estudo, no qual a marcação de RANKL predominou sobre a de OPG.

A comparação entre os três grupos analisados mostra que o Fisiograft promove uma aceleração inicial do processo de neoformação, quando comparado aos demais tratamentos propostos, o que seria mais interessante para a cicatrização do tecido ósseo. Este processo é comprometido quando a BMP-2 é incorporada ao Fisiograft, que, ao invés de auxiliar na cicatrização, aparentemente poderia causar um atraso no processo cicatricial. Os resultados mostram que a utilização do Fisiograft como carreador para a BMP-2 não produz resultados satisfatórios para a cicatrização. Estes dados corroboram com os resultados encontrados por LUVIZUTO et al., 2011, que mostram que a presença de BMP-2 diminui as propriedades osteocondutivas do Fisiograft.

6 CONCLUSÃO

A ativação de RANKL e OPG nos diferentes grupos e tempos de análise imunohistoquímica mostrou que o Fisiograft não se comporta como um bom carreador para BMP-2, uma vez que não obtivemos os resultados esperados no processo de reparação óssea, indicando em algumas marcações prejuízo a este processo.

7 REFERÊNCIAS

- CANALIS, E.; ECONOMIDES, A.N.; GAZZERRO, E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. **Endocr Rev**, v.24, p.218–235, 2003.
- CHAPPUIS, V.; GAMER, L.; COX, K.; LOWERY, J.W.; BOSSHARDT, D.D.; ROSEN, V. Periosteal BMP-2 activity drives bone graft healing. **Bone**, v.51, p.800-809, 2012.
- CHUANG, C.K.; LIN, K.J.; LIN, C.Y.; CHANG, Y.H.; YEN, T.C.; HWANG, S.M.; SUNG, L.Y.; CHEN, H.C.; HU, Y.C. Xenotransplantation of human mesenchymal stem cells into immunocompetent rats for calvarial bone repair. **Tissue Eng Part A**, v.16, p.479-488, 2010.
- DUDARIĆ, L.; CVEK, S.Z.; CVIJANOVIĆ, O.; SANTIĆ, V.; MARIĆ, I.; CRNCEVIĆ-ORLIĆ, Z.; BOBINAC, D. Expression of the BMP-2, -4 and -7 and their antagonists gremlin, chordin, noggin and follistatin during ectopic osteogenesis. **Coll Antropol**, v.37, p.1291-1298, 2013.
- EL-AMIN, S.F.; HOGAN, M.V.; ALLEN, A.A.; HINDS, J.; LAURENCIN, C.T. The Indications and Use of Bone Morphogenetic Proteins in Foot, Ankle, and Tibia Surgery. **Foot Ankle Clin.**, v.15, p.543–551, 2010.
- FISHER, D.M.; WONG, J.M.; CROWLEY, C.; KHAN, W.S. Preclinical and clinical studies on the use of growth factors for bone repair: a systematic review. **Curr Stem Cell Res Ther**, v.8, p.260–268, 2013.
- GAUTSCHI, O.P.; FREY, S.P.; ZELLWEGER, R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. **ANZ J Surg**, v.77, p.626–631, 2007.
- GRANHOLM, S.; HENNING, P.; LINDHOLM, C.; LERNER, U.H. Osteoclast progenitor cells present in significant amounts in mouse calvarial osteoblast isolations and osteoclastogenesis increased by BMP-2. **Bone**, v.52, p.83-92, 2013.
- HIRATA, I.; NOMURA, Y.; ITO, M.; SHIMAZU, A.; OKAZAKI, M. Acceleration of bone formation with BMP-2 in frame-reinforced carbonate apatite-collagen sponge scaffolds. **J Artif Organs**, v.10, p.212-217, 2007.
- ITOH, K.; UDAGAWA, N.; KATAGIRI, T.; IEMURA, S.; UENO, N.; YASUDA, H. et al. Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. **Endocrinology**, v.142, p.3656–3662, 2001.
- KAMIYA, N. The role of BMPs in bone anabolism and their potential targets SOST and DKK1. **Curr Mol Pharmacol**, v.5, p.153-163, 2012.
- KEMPEN DH, LU L, HEFFERAN TE, CREEMERS LB, MARAN A, CLASSIC KL, DHERT WJ, YASZEMSKI MJ. Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.29, p.3245–3252, 2008.

KIM SS, GWAK SJ, KIM BS. Orthotopic bone formation by implantation of apatite-coated poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite particulates and bone morphogenetic protein-2. **J Biomed Mater Res**, v.87, p.245–253, 2008.

LACEY, D.L.; TAN, H.L.; LU, J.; KAUFMAN, S.; VAN, G.; QIU, W.; et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. **Am J Pathol**, v.157, p.435–448.

LEWIECKI, E.M. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Nature Reviews Rheumatology**, v.7, p.631-638, 2011.

LI, X.; PENG, J.; WU, M.; YE, H.; ZHENG, C.; WU, G.; XU, H.; CHEN, X.; LIU, X. BMP-2 promotes chondrocyte proliferation via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Mol Med Rep**, v.4, p.621-626, 2011.

LUVIZUTO, E.R.; TANGL, S.; ZANONI, G.; OKAMOTO, T.; SONODA, C.K.; GRUBER, R.; OKAMOTO, R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvarial defects. **Biomaterials**, v.32, p.3855-3861, 2011.

MCKAY, W.F.; PECKHAM, S.M.; BADURA, J.M. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). **Int Orthop**. v.31, p.729–734, 2007.

PAN Z, D.J.D. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. **Interface Focus**, v.2, p.366–377, 2012.

PEDROSA JR, W.; OKAMOTO, R.; FARIA, P.E.; ARNEZ, M.F.; XAVIER, S.P.; SALATA, L.A. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. **Clin Oral Implants Res**, v.20, p.1254-1264, 2009.

REDDI AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. **Nat Biotechnol.**, v.16, p.247–252, 1998.

SAITO N, TAKAOKA K. New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.24, p.2287–2293, 2003.

SCHMOEKEL, H.G.; WEBER, F.E.; SCHENSE, J.C.; GRATZ, K.W.; SCHAWALDER, P.; HUBBELL, J.A. Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. **Biotechnology and Bioengineering**, v.89, p.253–262, 2005.

SEEHERRMAN, H.; WOZNEY, J.M. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.16, p.329–345, 2005.

TANAKA, K.; PRACYK, J.B.; TAKEDA, K.; YU, Z.X.; FERRANS, V.J.; DESHPANDE, S.S.; OZAKI, M.; HWANG, P.M.; LOWENSTEIN, C.J.; IRANI, K.; FINKEL, T. Expression of Id1 results in apoptosis of cardiac myocytes through a redoxdependent mechanism. **J Biol Chem**, v.273, p.25922–25928, 1998.

TANAKA, S.; NAKAMURA, K.; TAKAHASHI, N.; SUDA, T. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL/RANK signaling system. **Immunol Rev**, v.208, p.30-49, 2005.

TSCHON, M.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; RIMONDINI, L.; AMBROSIO, L.; GIARDINO, R. In vivo preclinical efficacy of a PDLLA/PGA porous copolymer for dental application. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.88, p.349-357, 2009.

URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v.150, p.893–899, 1965.
WOZNEY, J.M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. **Mol Reprod Dev**, v.32, p.160–167, 1992.

YAMAMOTO, M.; TAKAHASHI, Y.; TABATA, Y. Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. **Biomaterials**, v.24, p.4375–4383, 2003.

YASUDA, H.; SHIMA, N.; NAKAGAWA, N.; MOCHIZUKI, S.I.; YANO, K.; FUJISE, N. et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. **Endocrinology**, v.139, p.1329–1337, 1998.

8 ANEXOS

Anexo I



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "UTILIZAÇÃO DO FISIOGRAFT COMO CARREADOR PARA BMP-2 NO PROCESSO DE REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA do RANKL e OPG", protocolado sob o CEUA nº 8224140515, sob a responsabilidade de **Patricia Pinto Saraiva e equipe; Bárbara Maciel Braga; Patricia Pinto Saraiva; Maira Couto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC) em reunião de 16/06/2015.

We certify that the proposal "FISIOGRAFT AS CARRIER USE FOR BMP -2 IN THE PROCESS OF BONE REPAIR IN RATS CALVARY. ANALYSIS IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF RANKL AND OPG", utilizing 45 Heterogenics rats (45 males), protocol number CEUA 8224140515, under the responsibility of **Patricia Pinto Saraiva and team; Bárbara Maciel Braga; Patricia Pinto Saraiva; Maira Couto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Sagrado Coração University (CEUA/USC) in the meeting of 06/16/2015.

Vigência da Proposta: de 06/2015 a 05/2016

Área: Ciências Da Saúde/odontologia

Procedência: Biotério Externo

Espécie: Ratos heterogênicos

Gênero: Machos

idade: 3 a 4 meses N: 45

Linhagem: Wistar

Peso: 250 a 300g

Nota: Defeitos ósseos extensos em região maxilo-facial podem ser corrigidos com enxerto autógeno, no entanto as desvantagens desta modalidade terapêutica levam à pesquisa por novos substitutos ósseos. Com isso, a aplicação dos conhecimentos da biologia molecular e o uso de fatores osteoindutores, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), ganham popularidade no campo da odontologia. As BMPs são produzidas por osteoblastos e apresentam uma possibilidade de regeneração tecidual. Entretanto, carreadores e arcabouços são essenciais para manter a capacidade osteoindutora das BMPs, pois tem grande importância na retenção e liberação destas. O metabolismo do tecido ósseo pode ser avaliado por meio da marcação de proteínas ativadas durante o processo de reparo, como o receptor ativador do ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG). Estas duas proteínas atuam competitivamente para a ativação dos osteoclastos, determinando, assim, o processo de remodelação óssea. Portanto, este estudo tem o objetivo de avaliar a ativação de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo (RANKL e OPG), quando utilizado o fisiograft (copolímero de ácido polilático poliglicólico) como carreador para BMP-2, no processo de reparação óssea em calvária de ratos. Para o presente estudo serão utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) adultos machos. Defeitos críticos de 5 mm de diâmetro serão preparados com broca trefina, com motor baixa rotação sob irrigação abundante, em cada animal. Os animais serão divididos em 3 grupos: no Grupo I - o defeito será preenchido por coágulo; Grupo II - defeito preenchido com copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PLA/PGA); Grupo III - defeito preenchido com copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PLA/PGA) e BMP-2. Os animais serão eutanasiados aos 5, 15 e 30 dias pós-operatório. A análise da ativação das proteínas envolvidas no processo de reparo ósseo será realizada por imunohistoquímica, por meio da marcação de RANKL e OPG.

Bauru, 16 de junho de 2015

Prof. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração