

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Programa de Mestrado em Odontologia - Implantodontia

Marco Antonio Coelho

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE VEGF E COLÁGENO I
EM PROCEDIMENTO DE GANHO ÓSSEO VERTICAL EM ENXERTOS
XENÓGENOS, ASSOCIADOS AO rhBMP-2**

São Paulo
2015

Marco Antonio Coelho

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE VEGF E COLÁGENO I
EM PROCEDIMENTO DE GANHO ÓSSEO VERTICAL EM ENXERTOS
XENÓGENOS, ASSOCIADOS AO rhBMP-2**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação da
Universidade de Santo Amaro –
UNISA, para obtenção do título de
Mestre em Odontologia - Área de
concentração em Implantodontia.

Orientador: Professor Doutor Wilson
Roberto Sendyk

São Paulo

2015

**Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Milton Soldani Afonso – Campus I**

Coelho, Marco Antonio

Análise imuno-histoquímica da expressão de VEGF e colágeno I em procedimento de ganho ósseo vertical em enxertos xenógenos, associados ao rhBMP-2 / Marco Antonio Coelho – São Paulo, 2015.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Implantodontia) - Universidade de Santo Amaro, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk.

1. Osteogênese 2. Implantes dentários 3. Proteína morfogenética óssea 2 4. Fator A de crescimento do endotélio vascular 5. Colágeno do tipo I. I. Sendyk, Wilson Roberto II. Título

Autorizo a disponibilização do texto integral por meio impressa ou eletrônica desta Dissertação na Base de Dados da Biblioteca Milton Soldani Afonso a título de divulgação da produção científica da Universidade de Santo Amaro.
São Paulo, 30 de novembro de 2015.

Marco Antonio Coelho

“O bom conceito é aquele que traz a companhia da bondade, da gentileza e do respeito”.

Dedico este trabalho a todos aqueles que generosamente compartilharam comigo o conhecimento, agregado aos bons conceitos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sublime energia vital,

A Lenita Rodrigues da Silva Coelho, minha esposa, pela cumplicidade, apoio, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, por compreender minhas ausências, por todo seu carinho e seu amor.

Ao Pedro Henrique Silva Coelho, meu filho, por seu exemplo, pois na verdade aprendo mais com ele do que o ensino. Sua força de vontade e dedicação em tudo o que faz, lutando sempre por seus sonhos, me deram forças para nunca desistir nos momentos difíceis.

Aos meus pais Marcos Coelho e Marcia Coelho, pelos valores e educação que recebi.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk, pelo exemplo a ser seguido, carinho e pragmatismo na transmissão de seus conhecimentos.

A toda a equipe de Professores do Curso de Mestrado da UNISA, em especial ao Dr. Caio Vinícius Roman Torres, à Dra. Yeon Jung Kim, Dra. Débora Pallos, pela generosidade na partilha das experiências práticas e teóricas.

Aos queridos colegas do Mestrado, Danilo, Fábio, Mirko e Rafael, pela amizade e companheirismo,

À Profa. Ana Paula de Souza Faloni da UNIARA, pelo incentivo e inestimável presteza nas orientações em meu experimento.

Ao Prof. Joni Augusto Cirelli da UNESP, ao aluno doutorando Rafael Scaf de Molon da UNESP e ao Leandro Alves dos Santos, pela valorosa ajuda na pesquisa realizada no laboratório da UNESP de Araraquara.

A todos os familiares e amigos pelo apoio, e que de uma forma ou de outra fizeram parte desta conquista.

Sem essa força nada disso seria possível e partir desta experiência, as varandas da minha mente ficaram um pouco mais iluminadas.

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade." Rui Barbosa.

RESUMO

Novos materiais têm surgido na área da saúde, com o intuito de aumentar a previsibilidade e diminuir morbidades em áreas onde se necessitam de enxertos ósseos. Dentre estes, a proteína óssea morfogenética recombinante humana tipo 2 tem demonstrado resultados promissores quando associados à membrana de colágeno. O presente estudo tem como objetivo analisar e comparar a expressão de VEGF e do colágeno tipo I em procedimento de ganho ósseo vertical em enxertos xenógenos associados ao rhBMP-2. 26 blocos, provenientes de coelhos da raça Nova Zelândia, que foram divididos em quatro grupos: blocos sem membrana e sem rhBMP-2 (G1), blocos com membrana e sem rhBMP-2 (G2), blocos sem membranas associados a rhBMP-2 (G3) e blocos com membranas associados rhBMP-2 (G4). Após 12 semanas, os animais foram eutanasiados e os blocos colhidos. Foram feitos cortes para histologia e imuno-histoquímica. Na análise histológica, observou-se evidências de histocompatibilidade do biomaterial, com presença de remanescentes residuais do bloco xenógeno bovino de coloração basófila em todos os grupos, e formação de novo osso recobrimdo o biomaterial xenógeno. Osso neoformado diferenciando-se do implante xenógeno bovino com suas lacunas totalmente preenchidas por osteócitos. A expressão de VEGF tendeu a ser mais intensa no G4. A imunopositividade para colágeno I mostrou-se aparentemente maior nos G3 e G4. A presença da membrana pareceu reduzir a expressão de VEGF e de colágeno tipo I no G2. Assim, conclui-se que os xenógenos bovinos tem capacidade osteocondutora, facilitando a neoformação óssea no tempo estudado e que a adição de rhBMP-2 não modificou a observação histológica dos tecidos, assim como a membrana de colágeno.

Palavras-chave: Osteogênese. Implantes dentários. Proteína morfogenética óssea
2. Fator A de crescimento do endotélio vascular. Colágeno do tipo I.

ABSTRACT

New materials have emerged in health care, in order to increase predictability and decrease morbidity in areas where they require bone grafts. Among these, the recombinant human bone morphogenetic protein type 2 has shown promising results when combined with collagen membrane. This study aims to analyze and compare the VEGF and type I collagen expression in bone vertical gain procedure xenogenous grafts associated with rhBMP-2. 26 blocks from rabbits of New Zealand breed were divided into four groups: blocks without membrane and with no rhBMP-2 (G1) blocks with the membrane and without rhBMP-2 (G2) without membranes blocks associated with rhBMP-2 (G3) and blocks associated with rhBMP-2 membranes (G4). After 12 weeks, the animals were sacrificed and the harvested blocks. Sections were prepared for histology and immunohistochemistry. In the histological analysis, there was evidence histocompatibility biomaterial with presence of residual remnants of xenogeneic bovine block basophilic staining in all groups and formation of new bone covering the xenogeneic biomaterials. Bone newly formed differing from the xenogeneic bovine implant with its gaps completely filled by osteocytes. The expression of VEGF tended to be more intense in G4. The immunopositivity for collagen I showed up apparently higher in G3 and G4. The presence of the membrane appeared to reduce VEGF and type I collagen expression in G2. Thus, it is concluded that bovine xenogenous have osteoconductive, facilitating new bone formation in the studied time and the addition of rhBMP-2 did not modify histological observation of tissues, as well as the collagen membrane.

Keywords: Osteogenesis. Dental Implants. Bone Morphogenetic Protein 2. Vascular Endothelial Growth Factor A. Collagen Type I.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anestesia infiltrativa complementar para controle de hemostasia.....	48
Figura 2: Área receptora decorticalizada em tíbia de coelho.....	48
Figura 3: Fixação de blocos de osso mineral bovino inorgânico (BBM).....	49
Figura 4: Membrana de colágeno bovino absorvível tipo 1 – ACS recobrando o bloco de BBM	49
Figura 5: Aplicação de rhBMP-2 sobre a membrana ACS tipo	49
Figura 6: Aplicação de rhBMP-2 sobre bloco ósseo	50
Figura 7: Tíbia de coelho após remoção da amostra.....	50
Figura 8: Tíbia removida com os blocos.....	50
Figura 9: Vista lateral da amostra.....	51
Figura 10: Vista transversal da amostra.....	51
Figura 11: Amostras armazenadas em paraformaldeído a 4% para fixação.....	51
Figura 12: Etapa de reidratação.....	53
Figura 13: Etapa de reidratação.....	53
Figura 14: Bateria de coloração.....	53
Figura 15: Hematoxilina de Harris.....	54
Figura 16: Corante de hematoxilina.....	54
Figura 17: Corante de eosina.....	54
Figura 18: Permout para montagem de lâminas.....	55
Figura 19: Lâmina pronta.....	55
Figura 20: Estufa para secagem de lâminas.....	55
Figura 21: Lâminas coradas.....	55
Figura 22: Fotomicroscópio Leica DM 2500.....	56
Figura 23: Prancha 1.....	59

Figura 24: Prancha 2.....62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS	Esponja absorvível de colágeno
ALG	Alógeno
ALP	Fosfatase alcalina
ANFH	Necrose avascular da cabeça femural
AUG	Autógeno
AXCB	Osso esponjoso xenógeno com extração do antígeno
BBM	Osso mineral bovino
BCP	Beta fosfato de cálcio
BHC	Hidroxiapatita bovina incorporada com matriz de colágeno
BMP-2	Proteína óssea morfogenética 2
BMSC	Células da medula óssea estromal
BV	Volume ósseo
CBFA-1	Núcleo de ligação do fator 1
CEUA	Comitê de Ética no uso de animais
CM	Membrana de colágeno
COL1	Colágeno tipo 1
CONT	Controle
DBBM	Osso mineral bovino desproteinizado
DBM	Matriz óssea desmineralizada
DFDBA	Osso alógeno desmineralizado seco e congelado
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ENX	Enxerto
et al.	E outros

FDBA	Osso alógeno seco e congelado
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-Eosina
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Síntese do óxido nítrico
LCA	Ligamento cruzado anterior
MMP9	Metalo proteinase 9
MSCS	Células tronco mesenquimais
MSP	Sialo proteína óssea
MVD	Densidade micro vascular
NB	Osso neoformado
nHA-coral	Nano hidroxiapatita/coralline
NMT	Tecido não mineralizado
OA	Osso autógeno
OC	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
POSTN	Periostina positiva
RANKL	Ativador do receptor do fator nuclear K ligante
rh	Recombinante humana
rhBMP-2	Recombinante humana da Proteína óssea morfogenética 2
ROG	Regeneração óssea guiada
SBA	Aumento ósseo sanduíche
TG	Angiogênese
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral - α
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato

UHVEM	Microscopia eletrônica de ultra-alta tensão
VEGF	Fator A de crescimento endotelial vascular
VOL	Volume de área de interesse
β-TCP	Beta tricálcio fosfato

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
μm	Micrômetro
°C	Graus Celsius
X	Vezez
mm	Milímetro
mm³	Milímetro cúbico
cm	Centímetro
®	Marca registrada
mg	Miligramas
ml	Mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Enxertos xenógenos bovinos	19
2.2. Proteína morfogenética de osso - BMP-2.....	24
2.3. Fatores de indução óssea VEGF e colágeno I	31
3 PROPOSIÇÃO	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1. Procedimentos Cirúrgicos.....	46
4.2. Eutanásia dos animais e coleta da amostra	48
4.3. Análise histológica.....	52
4.3. Análise imuno-histoquímica.....	56
5 RESULTADOS.....	58
5.1. Análise histológica	58
5.2. Análise imuno-histoquímica.....	61
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO 1	76

1 INTRODUÇÃO

A colocação de implantes dentais em áreas edêntulas da mandíbula e da maxila é frequentemente limitada pela altura e pelo volume ósseo inadequado do rebordo residual em áreas edêntulas. Várias técnicas para aumentar o rebordo e preparar o local da instalação do implante foram sugeridas e preconizadas ao longo do tempo, assim como diversos tipos de biomateriais têm sido extensivamente usados. Dentre estes materiais, os mais comumente utilizados estão o osso autógeno, osso homogêneo, osso mineral bovino (BBM), hidroxiapatita (HA), beta-tricálcio fosfato (β -TCP) e associações entre estes.

Apesar do osso autógeno ainda ser considerado o material para enxerto padrão ouro, ainda se apresentam inconvenientes, tais como: a morbidade da área doadora, aumento do tempo operatório, quantidades insuficientes de tecido ósseo na área doadora e aumento de custos financeiros, dentre outros. Por estas razões, faz-se necessário o desenvolvimento de alternativas a este tipo de procedimento.

Biomateriais naturais e sintéticos também são usados para o propósito, de enxertia, obtendo resultados de eficiência variável. O material em partículas é preferencial para o preenchimento de cavidades, e serve como uma estrutura de suporte que promove uma matriz tridimensional para estabilizar e manter a forma da área preenchida.^(1,2) Entretanto, para ganhos em espessura, a preferência é por enxertos em bloco tipo *onlay*. Uma característica fundamental para estes materiais, é que permitam e suportem a migração de células e a angiogênese, facilitando assim na formação de novo osso no processo de reparação.⁽³⁾

Estudar fatores que influenciam e aumentam o conhecimento dos mecanismos moleculares na regeneração e remodelação óssea, é essencial para otimizar os procedimentos terapêuticos. Um substituto ósseo ideal deve ser biocompatível, biodegradável, possuir propriedades osteocondutoras e osteoindutoras. A busca deste material tem sido o grande desafio em pesquisas na área da Odontologia e da Medicina.⁽⁴⁾

A cicatrização óssea e a capacidade de restaurar a forma e função envolvem uma série de diferentes eventos biológicos bem orquestrados com fatores sistêmicos do metabolismo ósseo e mediadores locais que regulam o recrutamento, a diferenciação e a função das células que participam na remodelação óssea. A ossificação é acompanhada pela proliferação de novos vasos capilares, que a partir de alguns já existentes fazem a manutenção da homeostase pela entrega de nutrientes, oxigênio e mediadores biológicos. Células endoteliais envolvidas na angiogênese participam na construção da microvascularização e ajudam na resposta do tecido por expressão de moléculas de adesão de osteoblastos.⁽⁵⁾

Mais recentemente, tem sido pesquisados fatores de crescimento, tais como a proteína morfogenética recombinante humana (rhBMP-2), que é um material de engenharia de tecidos e membro da família do fator de crescimento transformante β , estimulante da formação óssea endocondral e intramembranosa a partir de células mesenquimais, onde inicia a diferenciação destas em osteoblastos e formação óssea. Estudos em animais e em humanos tem mostrado rápida nova formação óssea através do uso da rhBMP-2 liberada na área cirúrgica por meio de uma esponja de colágeno absorvível (ACS).⁽⁶⁻⁸⁾

Com a utilização de métodos imunohistoquímicos, determinados fatores de transcrição, que determinam o grau de maturação das células na linhagem dos osteoblastos, podem ser detectados. Um dos métodos de investigação utilizado para se determinar o grau de maturação da ferida cirúrgica é observar as características do colágeno I.⁽⁹⁾

Outra molécula importante é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A produção do VEGF é o principal mecanismo que associa a angiogênese e osteogênese durante a reparação óssea. Além disso, há evidências de que o VEGF exerce um efeito quimiotático sobre os osteoblastos. Sabe-se que este estimula a produção de proteases e ativadores do plasminogênio por células do endotélio, degradando a membrana basal vascular e permite a proliferação e migração de células endoteliais. Esses eventos levam a revascularização, o que é crucial para a reparação do tecido ósseo.⁽¹⁰⁾

Com o intuito de tentar clarificar a formação e a otimização dos fatores de crescimento ósseos e vasculares no processo de formação óssea, se faz necessário o presente estudo, com o objetivo de um maior aprofundamento do conhecimento biológico para se verificar como e quando ocorrem esses fatores de crescimento ósseo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com finalidade didática optou-se por dividir a revisão da literatura em 3 tópicos, a saber:

- 2.1 Enxertos xenógenos bovinos
- 2.2 Proteína morfogenética de osso - Bmp-2
- 2.3 Fatores de indução óssea VEGF e colágeno I

2.1 Enxertos xenógenos bovinos

Os enxertos xenógenos são extraídos de indivíduos de espécie diferente daquela do receptor humano. Quando de origem bovina, seu processamento confere uma biossegurança sem que haja qualquer transmissão de doença. Além disso, os enxertos xenógenos tem se mostrado como uma alternativa ao uso do osso autógeno nas reconstruções ósseas maxilares. Apresentam algumas vantagens, a saber: maior disponibilidade de material de enxertia, menor tempo cirúrgico pela não abordagem de um segundo sítio para remoção óssea, menor sangramento e menor anestesia. Sob o formato particulado, trata-se de um material bastante consagrado na literatura, sendo sua utilização em cirurgias de elevação do assoalho do seio maxilar e em procedimentos de regeneração óssea guiada.⁽¹¹⁾ As complicações apresentadas na remoção do osso autógeno, principalmente nos sítios doadores extraorais, tais como grande exposição cirúrgica, equipe multidisciplinar e ambiente hospitalar, altos custos, pós-operatórios prolongados e sensibilidade nas áreas doadoras por períodos prolongados, estão ausentes quando a opção pelo uso de enxerto xenógeno é realizada pelo profissional e paciente.⁽¹²⁾

Estudos a longo prazo, onde o osso xenógeno particulado foi utilizado nos procedimentos de enxertia em seio maxilar, mostram um íntimo contato do osso neoformado com as partículas e sua lenta substituição por osso lamelar, o que caracteriza o alto potencial osteocondutor deste material.^(10,13) Sob o formato de blocos, os enxertos xenógenos são utilizados para aumentos verticais e horizontais em áreas de grandes perdas ósseas.⁽³⁾

Wenz, Oesch e Horst⁽¹⁴⁾, estudaram os substitutos ósseos de origem bovina, mais utilizados para o tratamento de defeitos ósseos em cirurgia bucal e cirurgia ortopédica. Devido à ocorrência da encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca - BSE) e da nova variante da doença de *Creutzfeldt Jakob*, os riscos de transmissão de doenças por meio da utilização de tais materiais têm de ser cuidadosamente avaliados. A análise de risco pode ser baseada em avaliações teóricas ou evidência experimental. Foi apresentado um estudo comparativo sobre dois substitutos de osso bovino (Bio-Oss® e Osteograf/N) que se baseiam em valores teóricos. Além disso, para um destes materiais, isto é, Bio-Oss®, a capacidade de inativação do prion de uma das etapas de produção foi avaliada experimentalmente. Dados teóricos e experimentais indicaram que o uso destes materiais não implicariam um risco de transmissão da BSE para pacientes.

Araújo et al.⁽³⁾, realizaram estudo em 5 cães, para determinar se a utilização de um enxerto Bio-Oss® em bloco poderia ser utilizado como um arcabouço para a formação de osso novo. Os pré-molares inferiores foram extraídos e os blocos foram colocados na região posterior da mandíbula. Enxertos autógenos contralaterais foram utilizados como controle. Após 6 meses de cicatrização, os cães foram sacrificados e biópsias foram processadas para secção. Os autores concluíram que os enxertos de osso cortical autógenos podem apresentar reabsorções grave durante a cicatrização, enquanto que um enxerto semelhante de Bio-Oss® pode manter seu tamanho, onde quantidades limitadas de novo osso se formaram dentro do biomaterial.

Cornelini et al.⁽¹⁵⁾, utilizaram enxertos xenógenos Bio-Oss® em conjunto com membranas de colágeno Bio-Guide em áreas que, pós extração dentária, receberam implantes. Avaliaram 20 indivíduos que foram divididos em dois grupos; o grupo teste, que recebeu Bio-Oss® e Bio-Guide, e o grupo controle, que recebeu apenas Bio-Guide. Após 6 meses, exames clínicos e radiográficos foram realizados e os resultados não mostraram diferenças quanto ao nível ósseo verificado radiograficamente e profundidade de sondagem. Foi observada diferença significativa com relação ao posicionamento da margem gengival nas faces proximais, sendo que, no grupo teste, este posicionamento foi mais coronário do que no grupo controle. Concluíram que a utilização de

osso bovino juntamente com a membrana em áreas que receberam implantes após exodontia oferece vantagens estéticas relacionadas a problemas em áreas proximais.

Araújo e Lindhe⁽¹⁾, estudaram o efeito do enxerto xenógeno em alvéolos frescos de extração na neoformação óssea em cães. Os terceiros e quartos pré-molares foram extraídos bilateralmente, e de um lado foi colocado osso mineral bovino (BBM) e nenhum enxerto do outro lado. Após 6 meses foram feito biópsias. Em comparação com os sítios não enxertados, a dimensão e o perfil do processo alveolar, foram melhor preservados com o uso de osso bovino mineralizado, e concluíram que este, em um alvéolo de extração, pode modificar a modelagem e diminuir a contração da crista óssea que ocorre após a remoção do dente.

Kim et al.⁽¹⁶⁾, avaliaram os efeitos da rhBMP-2 em blocos xenógenos bovinos e blocos cortico-medulares humanos em aumento ósseo vertical na calvária de coelhos. Os resultados mostraram que os grupos que receberam blocos cortico-medulares humanos apresentaram maior neoformação óssea e manutenção da área enxertada comparada aos grupos com blocos xenógenos bovinos. Entretanto, a aplicação de rhBMP-2 não mostrou efeito adicional tanto no blocos cortico-medulares humanos quanto nos blocos xenógenos bovinos no aumento ósseo vertical.

Cordaro et al.⁽¹⁷⁾, avaliaram o uso do osso mineral bovino desproteínizado (DBBM) com membrana de colágeno (CM) em combinação com o enxerto em bloco de osso mandibular, se poderiam reduzir reabsorção óssea do enxerto em bloco durante a cicatrização, em humanos. Vinte e dois rebordos que apresentavam deficiência alveolar horizontal menor que 4mm, e pelo menos dois dentes adjacentes em falta foram avaliados. No grupo controle, um ou vários blocos mandibulares foram usados para obter o aumento horizontal da crista. No grupo de teste, grânulos DBBM foram adicionados na periferia e sobre o enxerto. As reconstruções foram cobertas por duas camadas de CM. Os implantes foram colocados após quatro meses. Medidas diretas da largura da crista foram realizadas antes e imediatamente após o aumento do osso, e imediatamente antes da colocação do implante. Os

resultados mostraram que a adição de osso mineral bovino e uma CM em torno e ao longo de um bloco de enxerto de osso mandibular poderia minimizar a reabsorção do enxerto durante a cicatrização, porém, a utilização de substitutos ósseos bovinos e membranas em combinação com enxerto em bloco aumentou a frequência de complicações e a dificuldade da sua gestão.

Schmitt et al.⁽¹⁸⁾, avaliaram a taxa de formação óssea e osseointegração de bloco mineral bovino (Bio-Oss®) associado a rhBMP-2 e ou rhVEGF, inseridos em defeitos críticos em calvária de porcos para ganho vertical. Todos os blocos ósseos inseridos apresentaram crescimento ósseo ao redor e em seu interior com suficiente estabilidade volumétrica podendo ser utilizado para procedimentos de aumento. No entanto, a adição de fatores de crescimento (BMP-2 e VEGF) não promoveu aumento significativo de neoformação óssea dentro do prazo estudado.

Block e Kelley⁽¹⁹⁾, descreveram uma melhoria técnica de um método anteriormente publicado para aumento de rebordo posterior em mandíbula fina em humanos. A técnica utiliza um túnel subperiosteal para colocar uma membrana de colágeno dentro do túnel para manter a forma do aumento. Após a membrana de colágeno ter sido posicionada, foi colocado um xenoenxerto bovino particulado embalado como um enxerto *onlay*, com a colocação dos implantes 6-9 meses depois. Concluíram que esta técnica fechada pode ser útil como um avanço em relação à diminuição da morbidade e aumento do sucesso no aumento horizontal do rebordo alveolar.

Lutz et al.⁽²⁰⁾, compararam em 47 pacientes, a altura remanescente de enxertos realizados em seios maxilares com xenoenxerto bovino ou osso autógeno, após um período de carga funcional de 60 meses. A sobrevivência dos implantes e a redução na altura do enxerto entre os dois grupos foram avaliados. 43,5% dos casos não mostraram nenhuma redução na altura de aumento de 5 anos após a inserção do implante no grupo do osso autógeno, enquanto no de Bio-Oss®, nenhuma reabsorção foi encontrada em 50% das áreas. Até 25% de redução na altura do enxerto foi encontrado em 47,8% no autógeno e em 45,8% no grupo do Bio-Oss®. Em 8,7% dos casos no grupo osso autógeno e em 4,2% no Bio-Oss®, até 50% da altura aumentada foi

reabsorvida. Após esse período de avaliação de 5 anos, a indicação do Bio-Oss® como material para aumento do seio maxilar mostrou ser equivalente a de enxerto de osso autógeno.

Antunes et al.⁽²¹⁾, avaliaram em 12 cães, a eficácia do xenoenxerto com diferentes porosidades na região da crista óssea, com e sem regeneração óssea guiada, sobre a instalação de implantes imediatos. Cinco defeitos ósseos circunferenciais (6mm de diâmetro / 4mm de profundidade) foram criados de um lado na mandíbula dos cães. Implantes de 3,3mm × 10mm, foram instalados no lado mesial de cada defeito, proporcionando uma folga de 2,7mm distal. Os defeitos foram preenchidos aleatoriamente com osso autógeno, coágulo, um bloco ósseo mineral bovino desproteínizado (DBBM), uma esponja DBBM, ou grânulos DBBM. Os mesmos procedimentos foram realizados no lado oposto após 8 semanas, onde membranas de colágeno foram utilizadas para cobrir os defeitos. Os animais foram sacrificados após 8 semanas, e os resultados mostraram que o bloco de alta porosidade (bloco DBBM) não apresentou maior reparo ósseo dentro do defeito e que biomateriais com porosidades inferiores (DBBM esponja e grânulos) mostraram a formação óssea semelhante ou superior, quando comparado com osso autógeno.

Schulz et al.⁽²²⁾, compararam a capacidade de preservação do volume ósseo após extração dentária, do osso autógeno ou de substitutos ósseos bovinos, em 17 pacientes. 20 alvéolos foram preenchidos com osso autógeno ou Bio-Oss® collagen e cobertos com uma membrana reabsorvível. A largura do rebordo alveolar foi medida no pós-operatório, e após quatro e seis meses, respectivamente. Antes da colocação do implante, biópsias ósseas foram retiradas das áreas enxertadas e avaliadas histologicamente. A largura da crista alveolar no grupo do Bio-Oss® collagen diminuiu cerca de $5,33 \pm 6,62\%$ depois de quatro e $9,45 \pm 10,51\%$ depois de seis meses. A redução no grupo com osso autógeno foi de $14,31 \pm 21,41\%$ depois de quatro e de $19,17 \pm 8,38\%$ depois de seis meses. O estudo demonstrou que o osso autógeno e o osso bovino Bio-Oss® collagen são adequados para a preservação da crista, entretanto, ambas as técnicas não poderiam impedir totalmente a perda de volume dos tecidos.

2.2 – Proteína morfogenética óssea - BMP-2

Urist⁽²³⁾ implantou matriz óssea desmineralizada intramuscular em ratos e coelhos, e observou uma produção óssea ectópica nos locais do implante. Atribuiu o processo para a presença de uma proteína da matriz óssea, que atraiu quimiotaticamente células mesenquimais pluripotentes e induziu a formação óssea no local. Ele nomeou essa substância responsável de proteína morfogenética.

BMPs são membros da superfamília do fator de crescimento transformante-beta e provocam efeitos celulares através da indução de complexos heteroméricos de receptores serina/treonina tipo I e tipo II. Além da formação óssea, as BMPs desempenham um papel no desenvolvimento de praticamente todos os órgãos e tecidos, incluindo sistema nervoso, pulmões, rins, pele e gônadas e no estabelecimento do plano do corpo embrionário. Atualmente, cerca de 20 diferentes membros do supergrupo de BMPs foram identificados; no entanto, apenas um subconjunto é capaz de promover isoladamente osteoindução. Estes incluem BMP-2, a BMP-7 e BMP-9. A BMP ocorre naturalmente, coletada por meio de purificação da matriz óssea desmineralizada, e está disponível em quantidades ínfimas. Utilizando técnicas de biologia molecular, os homólogos humanos de sequências de codificação de BMP de bovino foram adquiridos e células de mamífero foram manipuladas para expressar cada proteína numa forma purificada. Por isso, utilizando a tecnologia de genes recombinantes, uma grande oferta, uniforme de um BMPs específica pode ser gerado. Atualmente, recombinante humana rhBMP-2 e rhBMP-7 são os mais extensivamente estudados e são comercialmente disponíveis para indicações específicas.⁽⁷⁾

Wozney et al.⁽²⁴⁾, tornaram possível a clonagem da BMP, que começou a ser aplicada clinicamente na ortopedia.

Moghadam et al.⁽²⁵⁾, estudaram a proteína morfogenética óssea e a utilizaram para reconstrução primária de um defeito mandibular de 6cm de descontinuidade, após uma ressecção segmentar de um ameloblastoma.

Evidência radiográfica de indução de novo osso foi vista entre 3 e 9 meses, no pós-operatório. Biópsia após 9 meses, demonstrou formação de novo osso viável no local do enxerto. Este é o primeiro caso relatado usando uma proteína morfogenética óssea num ser humano, seguido de confirmação histológica de osso novo.

Jung et al.⁽⁶⁾, realizaram estudo clínico aleatório com análise histológica para avaliar a otimização da regeneração óssea guiada (ROG) com Bio-Oss® e rhBMP-2. O experimento foi realizado com instalação de 34 implantes em duas áreas da mesma arcada com 5 implantes na maxila e 6 na mandíbula de pacientes parcialmente desdentados. Os implantes foram instalados em áreas com defeitos ósseos submetidos a terapia com ROG para aumento horizontal de crista óssea com Bio-Oss® e BioGuide® no grupo controle e acrescido de rhBMP-2 no grupo teste. Os resultados mostraram diferença estatisticamente significantes na redução dos defeitos ósseos com a rhBMP-2. Concluíram que a associação de Bio-Oss® e rhBMP-2 aumenta o processo de reparação óssea e otimiza o contato do enxerto ao osso humano.

Boyne et al.⁽²⁶⁾, avaliaram em humanos, a segurança e eficácia de duas concentrações de rhBMP-2 (0,75mg/ml e 1,50mg/ml), em cirurgias de seio maxilar para posterior colocação de implantes. Analisaram também a taxa de sucesso dos implantes colocados no osso induzido após 36 meses em função. Estes resultados foram comparados com os seios maxilares enxertados e subsequente colocação dos implantes. O aumento médio da altura do rebordo alveolar em 4 meses após a cirurgia foi comparado entre os grupos e variaram 9,5mm a 11,3mm. A densidade óssea foi significativamente maior após os primeiros quatro meses no grupo de 1,50mg/ml que nos pacientes do grupo 0,75mg/ml, mas a densidade óssea se igualou nos grupos após 6 meses de carga funcional nos implantes. Eles concluíram que ambas as concentrações de rhBMP-2 são seguras para os procedimentos de enxerto do seio maxilar e induzem a mesma quantidade de formação óssea, mas a maior concentração de rhBMP-2 induz a formação óssea a uma velocidade mais rápida que a concentração mais baixa.

Wikesjö et al.⁽²⁷⁾, em estudos pré-clínicos, demonstraram que a rhBMP-2 induz osso fisiológico normal em defeitos clinicamente relevantes no esqueleto crânio facial e o novo osso formado tem características do osso adjacente e permite a colocação de implantes, osseointegração e até re-osseointegração.

Boyce et al.⁽²⁸⁾, compararam histologicamente os efeitos da rhBMP-2 associada ou não ao enxerto ósseo autógeno na cicatrização de defeito ósseo em tíbia de cães. Os animais foram divididos em 5 grupos de tratamento, o primeiro com 0,43mg/ml de rhBMP-2/ACS mais colágeno e matriz cerâmica, o segundo com 0,22mg/ml de rhBMP-2/ACS mais matriz cerâmica, o terceiro com 0,43mg/ml de rhBMP-2/ACS mais matriz cerâmica mais enxerto ósseo autógeno, o quarto com 0,22mg/ml de rhBMP-2/ACS mais matriz cerâmica mais enxerto ósseo autógeno e o quinto somente com enxerto ósseo autógeno. Defeitos ósseos foram criados e fixados com uma placa de bloqueio mais um dos tipos de enxerto citados anteriormente e a seguir avaliaram a união radiográfica duas vezes por semana durante 12 semanas. Concluíram que grandes defeitos segmentares em tíbias de cães podem ser reparados com fixação estável e uso de BMP, BMP mais enxerto ósseo autógeno ou enxerto ósseo autógeno somente.

Herford et al.⁽²⁹⁾, analisaram as vantagens do uso das BMPs em humanos, como a não necessidade de área doadora ou área doadora mais limitada para a formação de novo osso, o fato dos pacientes poderem retornar às atividades normais muito mais cedo com menos morbidade e que além da osseointegração, também promove a cicatrização do tecido mole. Como preocupações, o potencial para toxicidade, reatividade imunológica, formação óssea descontrolada que são baixas em humanos. A quantidade de edema, que poderia comprometer vias aéreas é aumentada em associação com rhBMP-2 devido ao recrutamento celular regional. Contra indicaram o uso em áreas de infecção ativa, de tumores ressecados, em grávidas ou que esteja programando a gravidez dentro de 1 ano e suspeita de tumor maligno e hipersensibilidade ao rhBMP-2 ou ao colágeno bovino.

Thoma et al.⁽³⁰⁾, verificaram se as combinações de rhBMP-2 com aloenxertos e com uma malha de titânio melhorariam a regeneração óssea em

cães. Analisaram 4 grupos, sendo: grupo 1- rhBMP-2 / (ACS), sob uma malha de titânio; grupo 2 - rhBMP-2 / ACS mais osso canino liofilizado (FDBA); grupo 3 - rhBMP-2 / ACS mais osso canino descalcificado liofilizado (DFDBA); e grupo 4 - rhBMP-2 / ACS mais um bloco de enxerto esponjoso canino (Bloco Alógeno). Após 8 semanas foram colocados implantes, e 16 semanas foi colhido material para histologia e histomorfométrico. Todos os locais aumentados com DFDBA, e um com Bloco Alógeno não permitiram a colocação de implantes. Concluíram que a combinação de rhBMP-2 com o enxerto em bloco alógeno forneceram a maior largura do rebordo dentre as opções testadas.

Canan Junior et al.⁽³¹⁾, compararam métodos convencionais de reconstrução alveolar maxilar em paciente com fissura, que são a periosteoplastia e o enxerto ósseo autógeno com um método alternativo usando o recombinante humano de proteína morfogenética óssea-2 (rhBMP-2). Pacientes com defeito de fenda alveolar foram divididos em 3 grupos de 6 pacientes que foram submetidos a enxerto autógeno com osso de crista ilíaca, esponja de colágeno reabsorvível com rhBMP-2 e periosteoplastia, respectivamente. A análise foi realizada por meio de tomografia computadorizada no pré-operatório e nos meses 3, 6 e 12 de pós-operatório. As variáveis analisadas foram o volume do defeito alveolar, o volume de osso formado, taxa de formação óssea, taxa de reparo da altura maxilar e a média da densidade óssea formada. O volume de osso formado foi semelhante comparando o enxerto ósseo e grupos BMP na análise pós-operatória de 1 ano. Ambos tinham o volume ósseo formado significativamente maior do que o grupo periosteoplastia em 3 e 6 meses de pós-operatório. Neste último grupo, o acompanhamento foi cancelado em 1 ano, porque a formação óssea era insuficiente. A taxa de formação óssea, a taxa de reparo da altura maxilar e a média de densidade do osso formado foram semelhantes no enxerto ósseo e grupos BMP em 1 ano de acompanhamento. Concluíram que a quantidade de osso formada no grupo periosteoplastia foi insuficiente. Não houve diferença entre o enxerto ósseo e a terapia com rhBMP-2 considerando os parâmetros analisados.

Herford et al.⁽³²⁾, avaliaram a rhBMP-2 como opção na reconstrução de defeitos ósseos. Foram avaliados 13 macacos e em cada um, 2 defeitos mandibulares foram realizados. A terapêutica com a aplicação de rhBMP-2 foi feita com diferentes concentrações (0,75mg/ml – 2,0mg/ml) e combinados com esponja de colágeno (ACS Infuse®) com uma matriz resistente à compressão, a fim de verificar a sua eficácia para melhor apoio do material de enxertia. Os defeitos tratados com rhBMP-2 em concentração de 2mg/ml mostraram resultados significativamente melhores do que os defeitos tratados com concentração de 1,5mg/ml. Concluíram que a combinação de rhBMP-2 com uma matriz resistente à compressão mostraram uma maior densidade óssea e melhor manutenção do espaço do que a combinação de rhBMP-2 com ACS nesse modelo de estudo avaliado.

Kao et al.⁽¹³⁾, compararam a formação óssea em humanos, em 22 pacientes – 2 grupos com 10 amostras cada grupo foi feita elevação de seio maxilar, e para preenchimento, usou rhBMP-2 / ACS combinada com Bio-Oss ou Bio-Oss® sozinho. A histologia demonstrou que a nova formação óssea foi menor naqueles que receberam rhBMP-2 / ACS + Bio-Oss® do que aqueles com Bio-Oss® apenas.

Polo et al.⁽⁸⁾, avaliaram o efeito da rhBMP-2 associado a vários biomateriais em calvária de coelho, sendo eles β -TCP, BCP, BBM, onde usou 4 cartolas de titânio que foram fixadas na calvária de 22 coelhos. Grupo 1 – n 10, 3 cartolas receberam um dos materiais, e uma apenas coágulo e no grupo 2 – n 12, o mesmo procedimento, mas com adição de rhBMP-2. O uso de rhBMP-2 / ACS combinada com todos os materiais de substituição óssea testados resultou em uma maior quantidade de formação óssea do que o produzido com os materiais substitutos de osso isolados, ou rhBMP-2 / (ACS) mais coágulo.

Yasuda et al.⁽³³⁾, avaliaram a capacidade da proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP-2) usando como veículo uma pasta de retenção à base de um polímero sintético biodegradável para promover o potencial osteogênico do osso alógeno congelado abastecido da proteína para reparar defeitos intercalados da diáfise do fêmur, em ratos. Após a confirmação

da intolerância entre duas espécies de ratos (Wistar e Lewis) através de transplante de pele de ratos Lewis em ratos Wistar, um segmento de osso de 8mm de comprimento, foi removido a partir de ratos Wistar, e um aloenxerto congelado revestidos com o rhBMP-2 com a pasta de retenção dos ratos Lewis foi colocada dentro do defeito e submetido a fixação intramedular com uma agulha de injeção calibre 18 com pino. Os fêmures enxertados foram avaliados por exames radiográficos, histológicos e biomecânicos em pontos de tempo específicos. Os resultados revelaram a reparação de defeitos ósseos corticais de tamanho crítico bem sucedidos através da implantação de aloenxertos congelados revestidos com a pasta veículo de retenção biodegradável sintética de rhBMP-2 a partir de um hospedeiro imunologicamente intolerante. Este estudo experimental sugeriu que enxerto ósseo alógeno em combinação com rhBMP-2 e do seu sistema de entrega local pode representar uma abordagem inovadora para a reconstrução de defeitos ósseos.

Mariner et al.⁽³⁴⁾, demonstraram que um veículo de entrega da rhBMP-2 alternativo de polímero, usando uma simples luz mediada quimicamente por uma rede de peptídeos de etileno glicol pode ser utilizado para criar uma entrega eficaz de rhBMP-2, eliminando o uso de materiais xenográficos e reduzir a dose de rhBMP-2 necessária para atingir os efeitos terapêuticos. Composta inteiramente de componentes sintéticos, este sistema aprisiona rhBMP-2 dentro de um andaime de hidrogel biocompatível que é degradado por enzimas e que ocorrem naturalmente a remodelação, abrindo caminho para a formação de tecido novo. Quando testados lado-a-lado com ACS em um modelo de ratos, em defeito ósseo de tamanho crítico, neste sistema de libertação polimérica aumentou significativamente a formação de osso em relação aos controles com ACS.

Chang et al.⁽³⁵⁾, compararam membranas de colágeno (CM) e substituto de osso como um portador para a rhBMP-2 em enxerto lateral *onlay*, utilizando hidroxiapatita bovina incorporada com matriz de colágeno (BHC) em combinação com CM, em cães (n = 5), sendo grupo BHC, em que o BHC foi carregado com rhBMP-2 e coberto por uma CM, e grupo CM, em que BHC foi coberta por uma CM carregada em rhBMP-2. A análise histológica e histométrica foi realizada após 8 semanas de cicatrização. Tanto os grupos

BHC e CM apresentaram substancial osso recém-formado (NB). Mais NB foi encontrado no grupo CM do que no grupo BHC. A maior parte do NB estava em contato direto com o substituto de osso residual no grupo BHC, enquanto que as projeções e as ilhas de NB foram observadas nos espaços entre os agrupamentos de substituição óssea residuais no grupo CM. A relação de contato substituto ósseo com osso residual foi significativamente menor no grupo CM do que no grupo BHC. Concluíram que a CM carregada com rhBMP-2 em enxertos *onlay* laterais podem ser realizadas de forma tão eficaz como BHC carregado com rhBMP-2 enquanto mostra menos contato osso residual em relação à substitutos ósseos em cães. O carregamento de CMs com rhBMP-2 pode ser uma opção de tratamento recomendável para facilitar o enxerto lateral *onlay* combinado com rhBMP-2.

Leal et al.⁽³⁶⁾, avaliaram a evolução do edema facial no pós-operatório de cirurgias de enxertos alveolares realizados com membrana de colágeno embebido com a recombinante humana da proteína morfogenética óssea-2 (rhBMP-2) em cento e cinquenta indivíduos com fissura lábio palatina. Na consulta pré-operatória e 4 dias após a cirurgia, os indivíduos foram avaliados quanto à idade, performance do profissional na cirurgia, duração do procedimento, tipo de fissura, medição do edema facial, abertura da boca, e avaliação global do pós-operatório. Resultados mostraram que o edema facial máximo ocorreu entre 3 e 4 dias de pós-operatório, foi inversamente proporcional à idade e abertura de boca, maior para os pacientes do sexo feminino, por fissura labial e palatina unilateral incompleta, e para o cirurgião 1, em comparação com os outros cirurgiões em algum momento no pós-operatório. As cirurgias foram mais tempo para fendas unilaterais e bilaterais completas. A diferença foi estatisticamente significante para estas variáveis. Concluíram que o edema facial foi influenciado pela rhBMP-2 usada no enxerto alveolar, e o trismo era proporcional a intensidade do edema facial.

Milani et al.⁽³⁷⁾, investigaram, por meio de imuno-histoquímica, padrões de remodelação do osso desproteinizado bovino, em humanos. 20 pacientes foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos de tratamento. No grupo de teste os alvéolos foram enxertados com DBB, enquanto que no grupo controle não foi aplicado nenhum enxerto e os alvéolos foram deixados para cicatrizar

espontaneamente. Após 5 semanas, os implantes foram colocados. Biópsias ósseas foram colhidas para cada paciente tanto no momento do enxerto e também no da implantação. Investigações imuno-histoquímicas foram realizadas para analisar a expressão de BMP-2, BMP-7, ALP, IL-6, TNF- α . Os resultados mostraram que as proteínas morfogenéticas ósseas foram expressas mais no grupo controle que no grupo de teste, enquanto que o valor TNF- α foi maior no grupo teste; não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os outros marcadores. Concluíram que o osso bovino desproteinizado garante a atividade dos processos de remodelação óssea em alvéolos de extração em humano em 5 meses de cicatrização, trazendo uma maior expressão de marcadores ósseos anabólicos e catabólicos.

Li et al.⁽³⁸⁾, avaliaram a reparação de defeitos mandibulares em 48 coelhos, tratados com osso esponjoso xenógeno com extração do antígeno (AXCB) de origem suína, e sua aplicabilidade embebido com a recombinante humana proteína morfogenética óssea-2 (rhBMP-2). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, em que os defeitos mandibulares foram enxertados com: AXCB, AXCB embebido com rhBMP-2, osso autógeno, ou deixado sem nenhum enxerto. Um número igual de animais de cada grupo foram sacrificados em três momentos (4, 8 e 12 semanas) após a cirurgia. A observação patológica, coloração com HE, exame radiográfico, e medição da densidade óssea foram realizadas. Foi demonstrado melhor efeito osteogênico do enxerto AXCB / rhBMP-2, onde a percentagem de aumento da área de regeneração óssea, e os materiais implantados foram gradualmente degradados e substituídos por regeneração do osso autógeno ao longo do tempo. Concluíram que o enxerto AXCB embebido com rhBMP-2 mostrou um bom efeito osteogênico na reparação de defeitos ósseos e boa biocompatibilidade. AXCB serve como um bom portador de rhBMP-2, o que promove a formação de osso.

2.3 Fatores de indução óssea VEGF e colágeno tipo I

A sinergia clara entre a formação óssea e a angiogênese está despertando o desenvolvimento de estratégias que incorporam as abordagens de neovascularização em sistemas de regeneração óssea.

O osso é um tecido altamente vascularizado que depende dos vasos sanguíneos para o transporte de nutrientes essenciais e oxigênio, bem como a entrega de fatores osteogênicos circulantes e células tronco. A vascularização é formada por dois mecanismos: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese envolve a formação de novos vasos sanguíneos nos quais as células progenitoras endoteliais se unem para formar vasos no desenvolvimento inicial. A rede primitiva de vasos sanguíneos subsequentemente se expande e se remodela para formar uma rede mais madura através da angiogênese, um processo no qual, novos vasos sanguíneos brotam dos vasos sanguíneos existentes.⁽³⁹⁾ Células multipotentes dão origem aos elementos esqueléticos, linfáticos e hematopoiéticos do corpo. Estas células se diferenciam para formar o osso através de um ou dois mecanismos: ossificação endocondral, ou a ossificação intramembranosa. Durante a ossificação endocondral, o osso se forma através de uma cartilagem intermediária. As células tronco se proliferam, se agregam e se diferenciam em condrócitos que produzem marcadores de cartilagem específicos, tais como o agrecano e o colágeno do tipo II. Estes condrócitos subsequentemente hipertrofiam, mineralizam e se tornam vascularizados através da invasão de vasos sanguíneos. Os osteoblastos, células de formação primária, migram e substituem a cartilagem com o osso mineralizado. Ao contrário da ossificação endocondral, no osso intramembranoso, os osteoblastos se tornam maduros sem se passar por uma cartilagem intermediária. Um passo inicial nesse caminho ocorre mediante a ativação do CBFA-1, um fator de transcrição chave que regula o comprometimento da célula tronco mesenquimal com a linhagem dos osteoblastos. Estas células tronco mesenquiais comprometidas, chamadas pré-osteoblastos, se proliferam e formam osteoblastos maduros que sintetizam e secretam as principais proteínas da matriz óssea (por exemplo, o colágeno I, o componente predominante da matriz orgânica óssea) e proteínas ósseas

específicas (por exemplo, a osteocalcina e a osteopontina) que determinam a estrutura e a função óssea.⁽⁴⁰⁾

O osso é um tecido complexo que a função principal é a de resistir a forças mecânicas e fraturas. Força óssea depende não só da quantidade de tecido ósseo, mas também da qualidade, o qual é caracterizado por sua geometria, forma, a micro-arquitetura das trabéculas, o volume, o mineral, e o colágeno. Diferentes fatores determinantes da qualidade óssea estão inter-relacionados, especialmente o mineral e colágeno, e análise de suas funções específicas na resistência óssea é difícil.

A matriz orgânica ou osteóide é responsável por um terço da massa óssea. 90% da matriz extra celular é composta por colágeno, onde 95% deste é do tipo I e menos de 5% são do tipo V, pequenas quantidades do tipo 3 são encontradas relacionadas à fibras de Sharpey e do tipo XII que são encontradas sob *stress* mecânico. A presença de colágeno do tipo I é um indicativo de formação óssea.⁽⁵⁾

Viguet-Carrin, Garnero e Delmas⁽⁴¹⁾, descreveram as interações de colágeno tipo I com o mineral e a contribuição das orientações das fibras de colágeno quando o osso é submetido a forças mecânicas. Diferentes processos de maturação do colágeno ocorrem no osso, o que pode resultar quer de processos enzimáticos ou não enzimáticos. O processo envolve a ativação enzimática de lisil-oxidase, o que leva à formação de ligações cruzadas imaturas e maduras que estabilizam as fibrilas de colágeno. Dois tipos de processos não enzimáticos são descritos em colágeno do tipo I: a formação de produtos finais de glicação avançada, devido à acumulação de açúcares redutíveis em tecido ósseo, e o processo de isomerização e racemização no telopéptido do colágeno. Estas modificações do colagénio estão relacionadas com a idade e podem comprometer as propriedades mecânicas do osso.

Durante o processo de crescimento ósseo, desenvolvimento e remodelação, a angiogênese, bem como a osteogênese estão intimamente associados, compartilhando alguns mediadores essenciais. O Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi inicialmente reconhecido como o

fator de crescimento endotelial melhor caracterizado, que aumenta a permeabilidade vascular e a angiogênese, e é agora evidente que esta citocina regula várias funções biológicas da ossificação endocondral do crescimento condilar mandibular, bem como a formação de ossos longos.⁽⁴²⁾

Faria et al.⁽⁴³⁾, correlacionaram os efeitos da perfuração do leito ósseo receptor em enxerto autógeno, o tempo de revascularização do enxerto autógeno onlay, a manutenção de volume / densidade do enxerto (avaliada através de tomografia) e a ocorrência de proteínas ósseas de remodelação (utilizando a técnica de imuno-histoquímica) entregues no enxerto. Trinta e seis coelhos foram submetidos ao enxerto ósseo onlay de crista ilíaca, em ambos os lados da mandíbula. O leito ósseo foi perfurado em um dos lados com o objetivo de acelerar a revascularização, enquanto do outro lado foi mantido intacto. Depois da fixação dos enxertos e sutura dos retalhos, todos os animais foram submetidos a tomografia em ambos os lados da mandíbula. Seis animais foram sacrificados, respectivamente, em 3, 5, 7, 10, 20 e 60 dias após a cirurgia. Uma segunda tomografia foi tomada imediatamente antes do sacrifício. Lâminas histológicas foram preparados a partir de cada local enxertado tanto para análise imuno-histoquímica (para os anticorpos osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo I e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e histométrica. Os valores medidos em volume ósseo na tomografia não mostraram significância estatística ($P > \text{ou} = 0,05$) entre os locais perfurados e os intactos. Enxertos colocados em leitos perfurados apresentaram maiores valores de densidade óssea em comparação com os não-perfurados em 3 dias. Essa correlação foi invertida aos 60 dias de pós-operatório. Os resultados da rotulagem de VEGF revelaram uma tendência para revascularização no início do grupo perfurado. A revascularização inicial do enxerto ósseo acelerou o processo de remodelação óssea (osteocalcina, colágeno tipo I e osteopontina), que levou a um aumento da deposição óssea em 10 dias. O processo prolongado de diferenciação dos osteoblastos em fases intermediárias do grupo perfurado colaborou para um osso mais denso em 60 dias.

Boëck-Neto et al.⁽⁴⁴⁾, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e densidade microvascular

(MVD) no aumento do seio maxilar com osso autógeno e diferentes materiais de enxerto para avaliar seu potencial angiogênico. Cirurgias de elevação de seio maxilar foram realizadas com diferentes materiais: hidroxiapatita, banco de ossos, trifosfato de cálcio e osso autógeno (controle). Como resultados, eles observaram que as taxas mais altas de VEGF estavam localizadas no osso neoformado com hidroxiapatita e no trifosfato de cálcio em relação ao grupo controle. As maiores taxas de densidade microvascular foram encontradas nos ossos neoformados com autógeno, hidroxiapatita e trifosfato de cálcio. Eles concluíram que com tais resultados, vários materiais podem ser bem sucedidos nos procedimentos de enxertia em seio maxilar, porém as interações entre a formação óssea e a angiogênese precisam ser melhor esclarecidas.

Nunes et al.⁽¹⁰⁾, compararam a expressão do núcleo de ligação do fator-1 (CBFA-1) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em procedimentos de elevação do seio utilizando BBM e β -TCP. 24 coelhos submetidos a de elevação do seio bilateral divididos em três grupos: Grupo 1: enxerto ósseo autógeno – controle, Grupo 2: BBM, Grupo 3: β -TCP, Todos os grupos foram sacrificados após 7, 14, 30 e 60 dias. Grupo 2 apresentou maior imunoexpressão de CBFA-1 comparado com o Grupo 3. Imunoexpressão de VEGF foi semelhante entre os grupos. Ambos os biomateriais permitiram o crescimento do tecido ósseo em um padrão condutor e não interferiram com a remodelação óssea no período final. Melhor formação óssea ao usar BBM, confirmada pela expressão de CBFA-1 em períodos iniciais.

Nunes et al.⁽²⁾, compararam em coelhos, o uso de hidroxiapatita bovina (HA), com e sem uma membrana biológica por análise histopatológica e imunoexpressão do fator 1 de ligação do núcleo – CBFA-1, e fator de crescimento do endotélio vascular - VEGF, na área de osteotomia em procedimentos de elevação do seio. Em 16 coelhos foram feitos procedimentos de elevação do seio bilateral. Grupo 1 receberam bovina HA (Bio-Oss®) e grupo 2 receberam HA bovina e uma membrana não porosa de politetrafluoretileno. Todos os grupos foram sacrificados após 7, 14, 30 e 60 dias para análise microscópica, histomorfométrica, e imuno-histoquímica. A análise microscópica mostrou um padrão de reparação óssea semelhante entre os grupos testados e não foram observadas diferenças marcantes na

expressão imunológica do fator1 de ligação do núcleo ou do fator de crescimento do endotélio vascular pelo imuno-histoquímico. Concluíram que o uso de uma membrana biológica não melhora a reparação óssea induzida por HA bovina.

Tetè et al.⁽⁴⁵⁾, analisaram as alterações clínicas, histológicas e por imuno-histoquímica, a expressão das proteínas metaloproteinase-9, o fator de crescimento endotelial vascular, sialo proteína óssea e síntese de óxido nítrico em enxertos ósseos obtidos de calvária versus de crista ilíaca, em humanos. 10 pacientes receberam enxertos ósseos da calota craniana (Grupo 1) e da crista ilíaca (Grupo 2), respectivamente. De cinco pacientes de cada grupo, amostras de biópsia óssea foram coletadas em dois momentos experimentais diferentes: no (T0), blocos ósseos foram retirados para enxerto do local doador, e depois de quatro meses, a partir dos locais reconstruídos, (T1). As amostras foram processadas por microscopia de luz e imuno-histoquímica para avaliar a expressão de MMP9, VEGF, BSP, iNOS. A análise morfológica de T0 na calvária mostrou áreas de matriz extracelular com coloração uniforme e organizada em lamelas concêntricas mineralizadas, alguns canais vasculares ao redor evidenciados, enquanto que na crista ilíaca T0 apresentou maior celularidade comparado à calota craniana, com áreas mineralizadas raras, cercando lacunas de medula óssea amplas. Em T1, mostraram grandes áreas de matriz extracelular, uniformemente coradas, ao mesmo tempo que amostras do Grupo 2 mostraram algumas áreas de tecido mineralizado. Em T0 não houve diferenças significativas na expressão de proteínas entre os grupos, mas em T1 foram descobertos maior expressão de proteínas no grupo 1 do que no Grupo 2, exceto a expressão da iNOS que aumentou no Grupo 2. Em ambos os grupos, a expressão das moléculas aumentaram na passagem de T0 para T1. Concluíram que o enxerto ósseo de calvária parece melhorar não só a quantidade de tecido ósseo no local do defeito, mas também a sua qualidade, melhor do que fez o da crista ilíaca. Ambos os enxertos parecem promover uma neoangiogênese adequada, como demonstrado por análise morfológica e expressão de MMP9 e de VEGF. Em termos de formação de osso novo e falta de ocorrência de eventos inflamatórios, a calvária poderia ser considerada um local doador mais apropriado para enxertos ósseos.

Hawthorne et al.⁽⁴⁶⁾, compararam aloenxerto com enxerto autógeno, usando histologia, imuno-histoquímica e análise tomográfica. 56 coelhos foram submetidos a procedimentos cirúrgicos. 20 animais foram doadores e 36 foram submetidos a enxerto *onlay* com halógeno (grupo experimental) e autógeno (grupo controle), colocados aleatoriamente em ambos os lados da mandíbula. Seis animais de cada grupo foram sacrificados em 3, 5, 7, 10, 20 e 60 dias de pós-operatórios. Imunomarcagem foi realizada com osteoprotegerina (OPG); ativador do receptor do fator nuclear κ ligante (RANKL); fosfatase alcalina (ALP); osteopontina (OPN); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP); colágeno tipo I (COL 1); e osteocalcina (OC). Densidade e volume dos enxertos foram avaliados com tomografias obtidas na cirurgia e no sacrifício. O enxerto autógeno e o alógeno apresentaram padrões semelhantes de densidade e volume durante os experimentos. Os dados intra-grupo mostraram diferença estatística entre os dias 7 e 60 em comparação com outros momentos ($p = 0,001$), em ambos os grupos. Uma ligeira expansão da fixação do enxerto até o dia 20 ($P = 0,532$), foi observado no grupo de AUG e depois reabsorvida significativamente no dia 60 ($P = 0,015$). O volume de ALG manteve-se estável até o dia 7 e diminuição no dia 10 ($P = 0,045$). A análise de microscopia de luz revelou incorporação mais eficiente de autógeno sobre o leito receptor, se comparado com o grupo ALG. A imuno-histoquímica escolhida nos dias 10 e 20 com OPG no grupo de autógeno e no dia 7 com TRAP no grupo Alógeno. A rotulagem para proteína VEGF expressada pelos osteoblastos e intimamente ligada ao processo de angiogênese não mostrou diferença estatística entre todos os períodos de tempo. Concluíram que os enxertos autógenos e alógenos não foram diferentes nos padrões de volume e densidade durante a experiência inteira. Dados histológicos mostraram mais eficiente incorporação do autógeno no leito receptor em comparação com o grupo Alógeno. Resultados imunohistoquímicos demonstraram padrão semelhante para ambos os grupos, com exceção de uma atividade de reabsorção aumentada no grupo alógeno mediada pela TRAP e no grupo autógeno pela maior rotulagem de OPG. No entanto, esta última observação não parece influenciar os resultados clínicos.

Nahles et al.⁽⁴⁾, compararam em humanos de 30-73 anos, o potencial osteogênico com a vascularização da matriz provisória em alvéolos de extração enxertados e não enxertados com Bio-Oss® após 4 e 12 semanas de cicatrização. Após esse período, biópsias ósseas foram colhidas e os implantes colocados e nestes espécimes, o potencial osteogênico e endotelial das células mesenquimais na matriz provisória foram analisadas usando imuno-histoquímica com três anticorpos monoclonais, sendo CBFA-1, osteocalcina, e CD31. Após 4 semanas, uma quantidade média de 56% de células positivas para CBFA-1 e após 12 semanas a média foi de 61%. Os resultados mostraram que com o aumento da idade foi observada uma diminuição no potencial endotelial não após 4 semanas, mas após 12 semanas, assim, sugere que a angiogênese é diminuída em pacientes mais velhos na fase posterior de cicatrização em alvéolos de extração.

Sager et al.⁽⁴⁷⁾, avaliaram as características imuno-histoquímica da cicatrização de feridas após a aplicação de fosfato de cálcio bifásico ou um osso autógeno, revestidos com uma membrana de colágeno, em cães. Defeitos do tipo deiscências vestibulares foram criados cirurgicamente após a preparação do local de implantação em seis cães. Após a colocação do implante, os defeitos foram preenchidos aleatoriamente com osso nativo ou com fosfato de cálcio bifásico, e coberto com uma membrana de colágeno. Após a cicatrização, em 1, 4 e 9 semanas, blocos foram colhidos e processados para imuno-histoquímica. Colágeno tipo 1 (COL1), angiogênese (TG) e osteocalcina (OC), foram analisados. Em uma semana, em ambos, os grânulos foram homogeneamente rodeados por um tecido bem vascularizado, não mineralizado (NMT). A reatividade dos antígenos COL1 e OC foram geralmente observadas adjacentes a ambos os substitutos de enxertos ósseos. Em 4 e 9 semanas, os grânulos dos dois materiais foram completamente integrados em uma rede esponjosa formada em segundo lugar. Em 9 semanas, a dissolução de alguns grânulos foi observada no grupo fosfato de cálcio bifásico. Adjacente aos grânulos, tecidos não mineralizados foram significativamente aumentados e revelaram uma pronunciada reação antigênica de COL1, OC e TG. O padrão inicial de regeneração óssea e

integração do enxerto foi comparável em ambos os grupos; a remodelação óssea foi mais pronunciada com o fosfato de cálcio bifásico.

Kim et al.⁽⁴⁸⁾, avaliaram o efeito do revestimento de implantes anodizados com um combinado de rhBMP-2 e rhVEGF, sobre a regeneração óssea vertical na parte marginal do peri-implante, em 3 cães. Defeitos supra-alveolares foram criados, e cada animal recebeu 8 implantes que foram revestidos com um fator de crescimento único (rhBMP-2) ou fatores de crescimento combinadas (rhBMP-2 com rhVEGF), ou um implante anodizado (grupo de controle). O valor da regeneração óssea vertical, o contato osso-implante, e a densidade óssea entre as roscas foram investigadas pela análise histomorfométrica em 8 semanas. O grupo de proteína morfogenética óssea (BMP) e o grupo BMP-VEGF mostraram regeneração óssea alveolar vertical melhorada no contato osso-implante nas micro roscas em comparação com o grupo controle. Concluíram que implantes anodizados revestidos com rhBMP-2, e rhBMP-2 com rhVEGF podem induzir regeneração óssea alveolar vertical, mas o efeito combinado de rhBMP-2 e rhVEGF não foi verificado.

Li et al.⁽⁴⁹⁾, em seus estudos com a finalidade de explorar a viabilidade de células-tronco mesenquimais alogênicas (MSCs), transplantados por via intravenosa para a angiogênese e reparo ósseo de necrose avascular da cabeça femoral (ANFH) em coelhos. Quarenta e cinco coelhos foram randomizados em três grupos: um grupo de controle em branco (sem tratamento), um grupo de controle com ANFH induzida, mas sem terapia, e um grupo de transplante MSC com ANFH induzida e tratada com transplante MSC. As biópsias, coleta de sangue e exames de imagem foram realizados em cada um dos animais em diferentes momentos (2, 4 e 6 semanas). Para monitorar a angiogênese e o progresso da reparação óssea, exames incluídos em tempo real de reação em cadeia da polimerase, análise de Western blot, raio-x, tomografia computadorizada, coloração com tricromo Masson, coloração vermelha picrosírio, e coloração imuno-histoquímica foram realizados. A necrose e colapso do osso foram observados em cabeças femorais bilaterais necróticas do grupo controle, enquanto que a morfologia da cabeça do fêmur foi geralmente restaurada no grupo de transplante MSC. Os níveis de RNAm de CBFA-1, BMP, VEGF, e OPN em tecido ósseo foram significativamente

maiores no grupo de transplante MSC do que no grupo controle com necrose. Além disso, a quantidade total de proteína de CBFA-1 no grupo de transplante MSC também foi significativamente mais elevada do que no grupo de controle necrose. Os autores concluíram que o transplante alogênico intravenoso de MSCs pode promover regeneração óssea e vascular na região necrótica da cabeça femural em um modelo de coelho de ANFH. Os resultados do estudo sugeriram que o transplante intravenoso de MSCs poderia ser uma opção potencial e minimamente invasiva de tratamento para pacientes ANFH.

Fu et al.⁽⁵⁰⁾, avaliaram o fenótipo biológico e estrutural do osso regenerado através da técnica de aumento ósseo sanduíche (SBA), em caso de defeitos de deiscência vestibular de implantes. Vinte e seis pacientes com implantes com deiscência vestibular foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Ambos os grupos receberam uma quantidade padronizada de enxerto ósseo alógeno medular e cortical mineralizado. No grupo de teste, uma membrana de pericárdio bovino foi colocada sobre o enxerto, enquanto nenhuma membrana foi colocada no grupo de controle. Após 6 meses de cicatrização, uma biópsia do osso regenerado foi colhida e processada para análise histológica, imuno-histoquímica, RNA, e de micro tomografia computadorizada. Das 26 biópsias ósseas, apenas seis núcleos do grupo teste e seis núcleos do grupo controle foram adequados para a análise. O volume do osso (BV) no grupo de teste foi mantido, mas a maturação do tecido parecia ser retardada. Em contraste, a maturação do tecido pareceu para ser completa no grupo controle, mas o BV foi comprometido. Análise Micro-CT mostraram que as amostras do grupo controle eram mais estruturadas e mineralizadas em comparação com os do grupo de teste. A análise histológica demonstrou partículas de enxerto mais residuais dispersos em uma matriz de tecido conjuntivo fibroso solto com a formação óssea escassa no grupo teste, enquanto o grupo controle apresentou a formação de osso vital óbvio que envolve as partículas residuais de enxerto. Periostina positivo (POSTN), esclerostina, e imunorreatividades relacionadas ao Runx2 foram detectados em ambos os grupos controle e teste. No entanto, a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) foi positiva observada principalmente no grupo controle. Houve diferenças significativas na expressão em POSTN, Runx2 e VEGF entre

os grupos teste e controle. Estes resultados indicam que a técnica SBA foi um método eficaz na preservação de volume estrutural adequado, promovendo a formação de osso novo vital. A utilização da membrana de colágeno tem tido sucesso em manter as dimensões volumétricas da crista, mas pode ter abrandado a maturação completa da camada mais exterior do sítio do enxerto.

Gohil et al.⁽⁵¹⁾, com o objetivo de estudar o uso de proteína repórter fluorescentes transgênicas em ratos, para entender os processos celulares da recombinante humana proteína morfogenética óssea-2 (rhBMP-2) na mediação da formação óssea. Em defeitos ósseos parietais bilaterais em calvárias, foram usados Col 3.6 Topaz fluorescente repórter transgênico osteoblastos para compreender a formação óssea na presença e ausência de rhBMP-2 e ou Col3.6Cyan células derivadas de medula óssea estromal (BMSC), por meio da matriz de colágeno-hidroxiapatita como um biomaterial. A regeneração óssea não foi confinada ao local de implantação de BMP-2, e formação óssea significativa foi observada próximo ao local do defeito. Atividade celular osteogênica foi observada em ambos os defeitos indicando mineralização induzida da célula hospedeira, através de coloração complexo alizarina sobreposta. No entanto, o implante de BMSC juntamente com rhBMP-2 demonstrou formação óssea derivadas de células do doador. A presença de rhBMP-2 não apoiou o recrutamento de células hospedeiras na presença de células do doador. Este estudo demonstra o potencial de vários marcadores fluorescentes para compreender os processos celulares envolvidos no processo de regeneração óssea utilizando biomateriais, fatores de crescimento e ou células-tronco.

Hsu et al.⁽⁵²⁾, em estudo sobre a cicatrização do tendão e do osso na cirurgia de reconstrução do ligamento cruzado anterior (LCA) e a matriz óssea desmineralizada (DBM) que é um componente fisiológico que tem o potencial inerente de regeneração óssea. Com a finalidade de verificar se este substituto ósseo pode afetar as propriedades estruturais do tendão na cicatrização túnel tibial, dois grupos com 5 coelhos cada, com 12 semanas de idade, foram submetidos à reconstrução do LCA unilaterais, com a aplicação de 0,5 cc DBM no túnel tibial de um dos grupos. A avaliação incluiu a avaliação radiológica e histológica e análises de imuno-histoquímica. Exame radiológico revelou que o

grupo DBM teve o menor deslocamento do tendão no túnel tibial. O exame histológico mostrou significativamente melhor integração entre tendão e osso no grupo DBM. Na análise imuno-histoquímica, o grupo DBM mostrou expressões significativamente mais elevadas de BMP-2 e fator de crescimento endotelial vascular do que o grupo controle. Concluíram que a DBM melhora a cicatrização do tendão-osso na reconstrução do LCA e que esta tem um potencial de uso em cirurgia LCA.

Koerdt et al.⁽⁵³⁾, avaliaram por imuno-histoquímica a expressão de vários fatores de crescimento e marcadores de vascularização em mandíbula comparando enxertos ósseos *onlay* e regeneração óssea guiada em ovelhas. Enxertos autógenos foram colhidos da crista ilíaca, e de um lado, uma combinação de uma membrana de colágeno reabsorvível com osso bovino desproteinizado foi feita e ajustada sobre o enxerto autógeno, e do outro lado, um grupo controle de enxerto ósseo *onlay* apenas. A expressão de diferentes marcadores de vascularização foi comparada entre os grupos. A expressão de marcadores de revascularização foi significativamente mais elevada do lado onde recebeu autógeno mais osso bovino e membrana. No que se refere diferentes regiões do enxerto, uma expressão significativamente mais elevada no interior do enxerto de osso autógeno mais Bio-Oss® e membrana pode ser observado na coloração em proteína morfogenética do osso-2 (BMP-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), receptor 1 VEGF (VEGFR-1) e VEGF receptor 2 (VEGFR-2), e síntese endotelial do óxido nítrico (eNOS) e síntese do óxido nítrico induzível (iNOS), enquanto o grupo controle apresentou uma maior taxa de reabsorção durante o período de vigilância até a eutanásia das ovelhas após 16 semanas. Concluíram que a utilização de regeneração óssea guiada e osso bovino desproteinizado no processo de transplante de enxertos autógenos em comparação com o uso terapêutico de certos fatores de crescimento, pode aumentar a vascularização e diminuir a atrofia e a reabsorção, e que o uso de uma combinação de GBR e DBBM em procedimentos de enxerto sobre a mandíbula mostra menos reabsorção do que enxertos ósseos *onlay* apenas, e parece ser superior no uso clínico.

Du et al.⁽⁵⁴⁾, avaliaram em defeitos ósseos críticos, a nano-hidroxiapatita/coralline (nHA/coral), onde blocos foram pré-vascularizados

revestindo-os com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e em seguida implantados em cães com defeitos mandibulares de tamanho crítico. In vivo, os resultados indicaram que os blocos de nHA/coral permitiram crescimento interno de colágeno e células devido ao seu tamanho e à interligação apropriada dos poros. Além disso, as propriedades de pré-vascularização foram obtidas por revestimento do arcabouço com VEGF. Exames histológicos, de imuno-histoquímica, bem como a análise de fluorescência, revelaram que a entrega local de VEGF pode melhorar significativamente a neovascularização e a mineralização de osso recentemente formado na fase inicial de cicatrização óssea neste modelo de implantação em cães. Os dados demonstraram coletivamente que blocos nHA / coral têm possíveis aplicações na engenharia de tecido ósseo, e que excelentes resultados podem ser obtidos por pré-vascularização com VEGF.

Hosaki-Takamiya et al.⁽⁹⁾, em estudo com microscopia eletrônica de ultra-alta tensão (UHVEM) usado para observar a produção de fibrilas de colágeno, tridimensionalmente em calvária de frangos com 16 dias de idade embrionária. Observaram fibrilas de colágeno abaixo da membrana celular de osteoblastos alongadas para fora da célula e também que os osteoblastos produziram fibrilas de colágeno com polaridade. Com o uso do software AVIZO, observaram fibrilas de colágeno produzidas por osteoblastos ao longo do contorno destes em direção à área da matriz óssea. Imediatamente após ser liberado da célula, as fibrilas correm de forma aleatória e escassas. Mas como elas retornam a partir do osteoblasto, as fibrilas começaram a correr paralelas à direção definitiva e se tornaram espessas, e observou-se listras periódicas naquela área. Observaram também estruturas da membrana envolvidas em torno de estruturas filamentosas dentro dos osteoblastos. As estruturas filamentosas tinham densidades semelhantes às fibrilas de colágeno e uma forma e diâmetro colunar. Os resultados sugeriram que as fibrilas de colágeno correm paralelas e densamente, que podem ser relacionadas com os movimentos laterais dos osteoblastos. No osso, fibrilas de colágeno formam uma estrutura lamelar chamada de "modelo de madeira compensada torcida". Devido a esta estrutura única, o osso pode suportar diversas tensões mecânicas. No entanto, a formação desta estrutura não foi elucidada por causa

da dificuldade de se observar a produção de fibrilas de colágeno dos osteoblastos através de métodos atualmente disponíveis. Isso é porque a formação ocorre no espaço muito limitado entre a camada de osteoblastos e a matriz óssea. UHVEM é uma ferramenta poderosa para observar a produção de fibrilas de colágeno.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo analisar e comparar a expressão de VEGF e do colágeno tipo I em procedimento de ganho ósseo vertical em enxertos xenógenos associados ao rhBMP-2, fixados em tíbia de coelho, por meio de teste imunohistoquímico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada com aprovação prévia do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Santo Amaro – UNISA nº 18-2012, (anexo 1).

Neste estudo utilizou-se 26 blocos, provenientes de 7 coelhas fêmeas da raça Nova Zelândia, pesando de 3,5 a 4,0 kg, com 11 a 15 meses de idade originados de criadouro particular. Os animais ficaram no Biotério da UNISA em observação clínica inicial de 7 dias para avaliação do estado de saúde, sendo submetidos a exames laboratoriais de sangue e fezes pelos médicos veterinários e mantidos sob condições ambientais controladas de ventilação e temperatura (ao redor de 22° C), foram alimentados com ração Nutríara (Paulínia, São Paulo, Brasil) e água administrada *ad libitum*. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no laboratório multidisciplinar de técnica cirúrgica da UNISA.

4.1 Procedimentos cirúrgicos

Antes de cada intervenção cirúrgica, os animais foram pesados e anestesiados de acordo com o protocolo pelos médicos veterinários da UNISA: de Cetamina- 30 - 50 mg/kg/IM, Xilasina- 5 – 10 mg/kg/IM e Meperidina- 5 – 10 mg/kg/IM. Os procedimentos cirúrgicos deste trabalho foram executados pelo Mestre Guilherme Pirágine Contador, a quem agradecemos a cessão das amostras estudadas.

Inicialmente, foi realizada a tricotomia da tíbia seguida de antissepsia da região com clorexidina a 2% (Rio Química, São José do Rio Preto, Brasil). Foi aplicada anestesia intramuscular, infiltrativa na tíbia do animal, com cloridrato de mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Scandicaine-Septodont, DFL, Rio de Janeiro,RJ) (Fig.1). A seguir foram realizadas as incisões pela técnica de retalho dividido com incisão longitudinal do plano cutâneo ao longo da tíbia com bisturi e lâminas nº 5, depois foi realizada a divulsão do plano muscular com tesoura Metzembraum curva (Quinelato, Rio Claro, Brasil) e os tecidos

foram descolados. Após a exposição da tíbia, foram realizadas a decorticalização com brocas esféricas nº 2 sob refrigeração nas áreas de enxertia previamente ao tratamento (Fig.2). Em cada tíbia, dois blocos de enxerto de osso mineral bovino (Critéria, Brasil) retangulares de 5 mm de altura, 5mm de largura e 6mm de comprimento foram fixados com um parafuso de enxertia (Dentoflex, SP, Brasil) com dimensões de 1,4mm de diâmetro por 10mm de comprimento, sendo um na região medial da epífise proximal e outro no terço distal da epífise proximal, separados pelo menos 5mm entre eles (Fig.3).

Os blocos foram distribuídos em quatro grupos experimentais de acordo com o tratamento:

Grupo 1 (G1): apenas osso mineral bovino

Grupo 2 (G2): osso mineral bovino + ACS

Grupo 3 (G3): osso mineral bovino + rhbmp-2

Grupo 4 (G4): osso mineral bovino + rhbmp-2 + ACS

Cada bloco recebeu o tratamento indicado de acordo com os grupos experimentais determinados previamente: G1 somente o enxerto de osso mineral bovino, G2 osso mineral bovino e membrana de ACS, G3, osso mineral bovino e fator de crescimento rhBMP-2 (INFUSE®, Memphis, EUA) a 1,3125 mg/ml e G4, osso mineral bovino e membrana de ACS, acrescidos de rhBMP-2 a 1,3125 mg/ml (Fig.4, 5 e 6).

A técnica de síntese foi a mesma para todos os grupos com sutura em 2 planos livres de tensão com pontos simples de fios de sutura Mononylon Ethicon 5-0 (Johnson & Johnson, Brasil) no plano muscular e 4-0 no plano cutâneo.

No controle pós-operatório, os animais foram medicados com antibiótico Enrofloxacin 5g – 5-10mg/kg SC/10dias, anti-inflamatório Meloxicam – 0,2mg/kg SC/3dias, antisséptico Iodopovidine e Rifomicina spray. Foi realizada assepsia, troca dos curativos e bandagens a cada 3 dias com esparadrapo tipo

micropore ao redor das tíbias protegendo as feridas cirúrgicas durante três semanas sob supervisão diária dos médicos veterinários e do pesquisador.

4.2 Eutanásia dos animais e coleta da amostra

Após doze semanas, as coelhas foram sacrificadas por aprofundamento anestésico e injeção letal pelos médicos veterinários seguindo o protocolo utilizado: Cetamina- 30 mg/kg/IM; Xilasina- 5 – 10 mg/kg/IM; Tiopental- 20 mg/kg/IV e Cloreto de potássio – 19,1% - 1 ampola/animal.

Realizada a tricotomia, os tecidos foram incisados, dissecados e tecidos ósseos expostos. A amostra do animal contendo a tíbia e os tecidos integrados foi removida com o disco diamantado e colocada num recipiente contendo paraformaldeído a 4% por 48 horas para fixação, em seguida foram transferidas para solução de etanol a 70% para posterior processamento (Fig 7 a 11).



Figura 1 - Anestesia infiltrativa complementar para controle de hemostasia

Fonte: Contador, 2013*



Figura 2 - Área receptora decorticalizada em tíbia de coelho

Fonte: Contador, 2013*

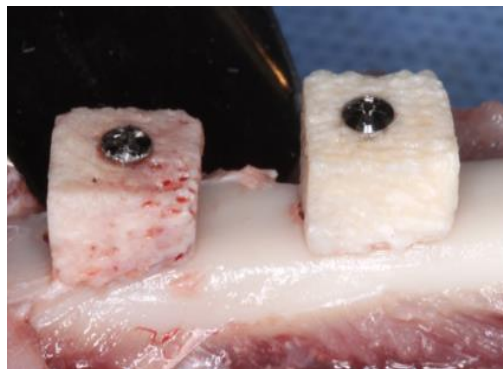


Figura 3 - Fixação de blocos de osso mineral bovino inorgânico (BBM)

Fonte: Contador, 2013*



Figura 4 - Membrana de colágeno bovino absorvível tipo 1 – ACS recobrindo o bloco de BBM

Fonte: Contador, 2013*

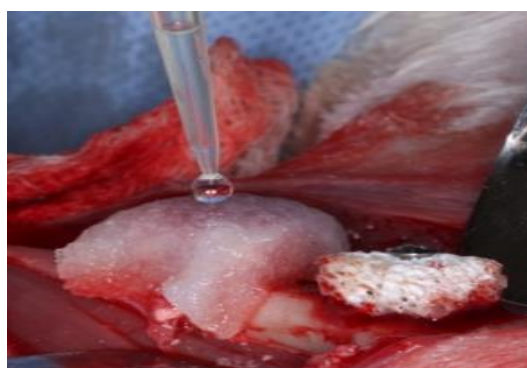


Figura 5 - Aplicação de rhBMP-2 sobre a membrana ACS tipo 1

Fonte: Contador, 2013*

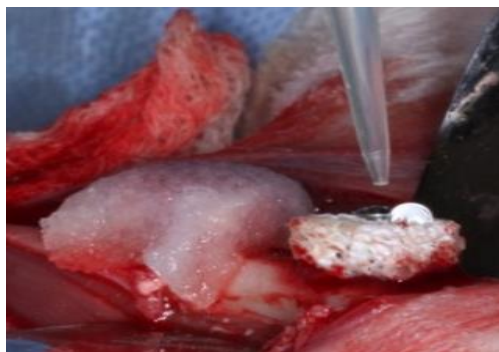


Figura 6 - Aplicação de rhBMP-2 sobre bloco ósseo
Fonte: Contador, 2013*



Figura 7 - Tíbia de coelho após remoção da amostra
Fonte: Contador, 2013*

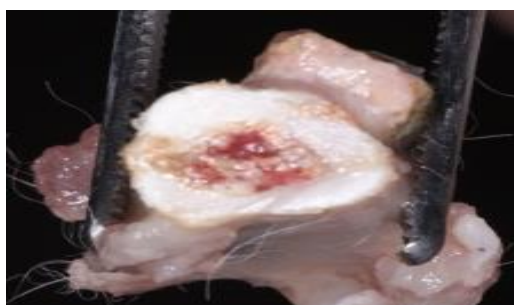


Figura 8 - Tíbia removida com os blocos
Fonte: Contador, 2013*



Figura 9 - Vista lateral da amostra

Fonte: Contador, 2013*



Figura 10 - Vista transversal da amostra

Fonte: Contador, 2013*



Figura 11 - As amostras armazenadas em paraformaldeído a 4% para fixação

Fonte: Contador, 2013*

*Fotografias gentilmente cedidas pelo Mestre Guilherme Piráquine Contador

4.3 Análise histológica

Após a fixação, as peças foram descalcificadas com EDTA 7%, que foi trocado três vezes por semana, durante 3 meses. Seguinte à descalcificação, os blocos ósseos foram lavados em água corrente por mais ou menos 08 horas, seguido de desidratação por meio de uma sequência de álcoois com concentração crescente (50% a 100% de 02 em 02 horas). Após desidratação, foi realizada a diafanização com a colocação das peças em xilol (três soluções de 02 em 02 horas) até ficarem transparentes. A seguir, foi então feita a impregnação em parafina, em estufa a 60°C em três banhos de 03 horas. A próxima etapa constituiu-se na inclusão das peças em formas com parafina, a qual endureceu com as peças totalmente embebidas.

Os blocos de parafina contendo as peças foram cortados em micrótomo de maneira padronizada (4µm de espessura), onde foram divididas de maneira intercalada para as análises histológicas e imuno-histoquímicas. Para cada peça cortada foram feitas as lâminas, sendo os segundos e oitavos cortes de cada peça os selecionados para a análise histológica.

Para se processar a coloração, a parafina foi removida, através de banhos em xilol, álcool e água, inversamente ao procedimento executado acima (fig. 12,13 e 14).

Os cortes semi-seriados foram corados com hematoxilina (fig. 15 e 16) e eosina (fig. 17) - HE e utilizados para a descrição morfológica de diferentes aspectos teciduais avaliados nas regiões de implantação do biomaterial associado ou não à rhBMP-2, com ou sem o uso de membranas. As Lâminas foram processadas (fig. 18 e 20) e as imagens nas regiões de interesse destas (fig. 19 e 21) foram obtidas utilizando-se um microscópio de luz Leica DM 2500 (fig. 22). Nas fotomicrografias Foram avaliadas: presença de células mononucleadas (polimorfonucleares, linfócitos, plasmócitos e macrófagos), bem como de células multinucleadas contendo 3 ou mais núcleos. Além disso, a formação óssea e o aspecto microscópico do biomaterial também foram

observados. Todas as análises foram executadas por um examinador cego e previamente calibrado.

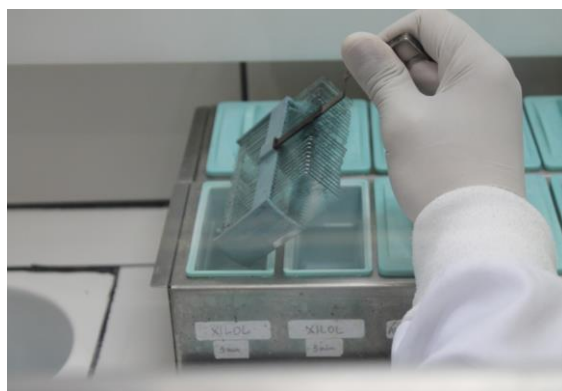


Figura 12 - Etapa de reidratação

Fonte: o autor, 2015

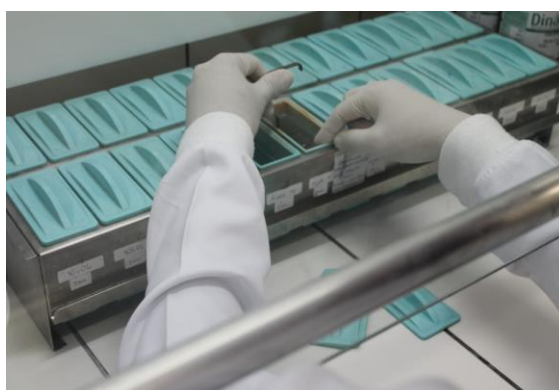


Figura 13 - Etapa de reidratação

Fonte: o autor, 2015



Figura 14 - Bateria de coloração

Fonte: o autor, 2015



Figura 15 - Hematoxilina de Harris

Fonte: o autor, 2015



Figura 16 - Corante de hematoxilina

Fonte: o autor, 2015



Figura 17 - Corante de eosina

Fonte: o autor, 2015

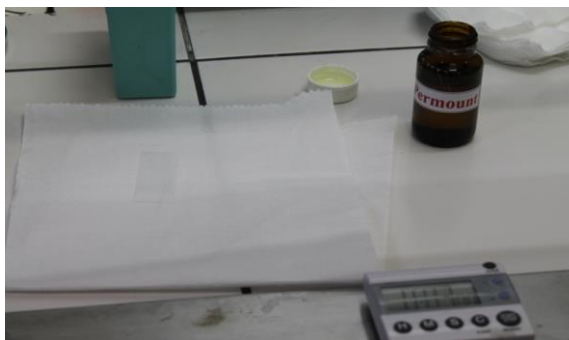


Figura 18 - Permout para montagem de lâminas

Fonte: o autor, 2015



Figura 19 - Lâmina pronta

Fonte: o autor, 2015



Figura 20 - Estufa para secagem de lâminas

Fonte: o autor, 2015



Figura 21 - Lâminas coradas

Fonte: o autor, 2015



Figura 22 - Fotomicroscópio Leica DM 2500

Fonte: o autor, 2015

4.4 Análise imuno-histoquímica

Para detecção da expressão de Colágeno tipo I e do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) foi empregado o método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC), utilizando-se o kit Immuno Cruz mouse ABC staining system (Sc:2017, Santa Cruz biotechnology - EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos primários para as proteínas em análise foram Anti-Collagen I antibody (ab6308, Abcam - Alemanha) em diluição 1:800 e Anti-VEGF antibody (ab13418, Abcam - Alemanha) em diluição 1:500. Como controle negativo, o anticorpo primário foi omitido e substituído por tampão fosfato de sódio (PBS).

A desparafinização foi realizada com xileno seguido de rehidratação com etanol em graduação descendente, em seguida, foi feita a recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6), a uma temperatura de 95° C durante 20 minutos deixando esfriar por mais 20 minutos. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi feito incubando as lâminas por 30 minutos em peróxido de hidrogênio a 1%. O bloqueio da avidina - biotina foi realizado com 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada, e os cortes foram incubados durante uma hora em soro PBS a 1,5%. A incubação com os anticorpos primários foram realizadas durante a noite, a uma temperatura de 4 ° C em câmara húmida. Depois foram lavados com PBS 3 vezes por 5 minutos cada uma. No segundo dia, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário biotilado

por 30 minutos, e após foi feito a incubação com o reagente de enzima AB conjugado com a peroxidase durante 30 minutos. Os complexos ligados foram visualizados por aplicação de uma solução 0,05% de 3-3 diaminobenzidine (solução DAB) e a contracoloração com hematoxilina de Harris por 45 segundos foi realizada. Depois foram lavados com várias trocas de água. A desidratação foi realizada com graduações ascendentes de etanol seguido xileno. Os cortes foram montados e puderam ser armazenados à temperatura ambiente permanentemente.

Para a avaliação das imunomarcações foram atribuídos (análise qualitativa ordinal das imunomarcações) os seguintes escores: negativo (-), positivo (+), superpositivo (++) ou hiperpositivo (+++). A intensidade da coloração foi registrada por um examinador cego e previamente calibrado, onde (-) se refere à ausência de marcação ou controle negativo, (+) ao castanho claro, (++) ao castanho escuro e (+++) ao marrom.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica

A análise histológica de lâminas dos grupos 1, 2, 3 e 4 mostraram presença de remanescentes residuais do bloco xenógeno bovino com coloração basófila. As pequenas lacunas que existem dentro do biomaterial xenógeno bovino encontram-se vazias de células, de produtos citoplasmáticos ou de vasos sanguíneos e também não há presença de osteoblastos por sobre a superfície do biomaterial xenógeno.

Observou-se também em todos os grupos, tecido ósseo neoformado com coloração intensamente acidófila em superposição ao implante ósseo bovino e intimamente ligado a ele. Ao contrário do que se observa no remanescente xenógeno bovino, o osso neoformado está revestido por uma camada de osteoblastos. Além disso, diferenciando-se do implante xenógeno bovino suas lacunas estão totalmente preenchidas por um material celular, ou seja, por osteócitos. É possível visualizar vascularização do osso neoformado, infiltrado inflamatório constituído por células inflamatórias mononucleares e também presença de células gigantes. Células que se assemelham à células adiposas foram observadas, porém com mais intensidade nas lâminas dos grupos 3 e 4.

Remanescentes acidófilos, semelhantes ao citoplasma de osteócitos foram encontrados no interior do biomaterial na figura 1G.

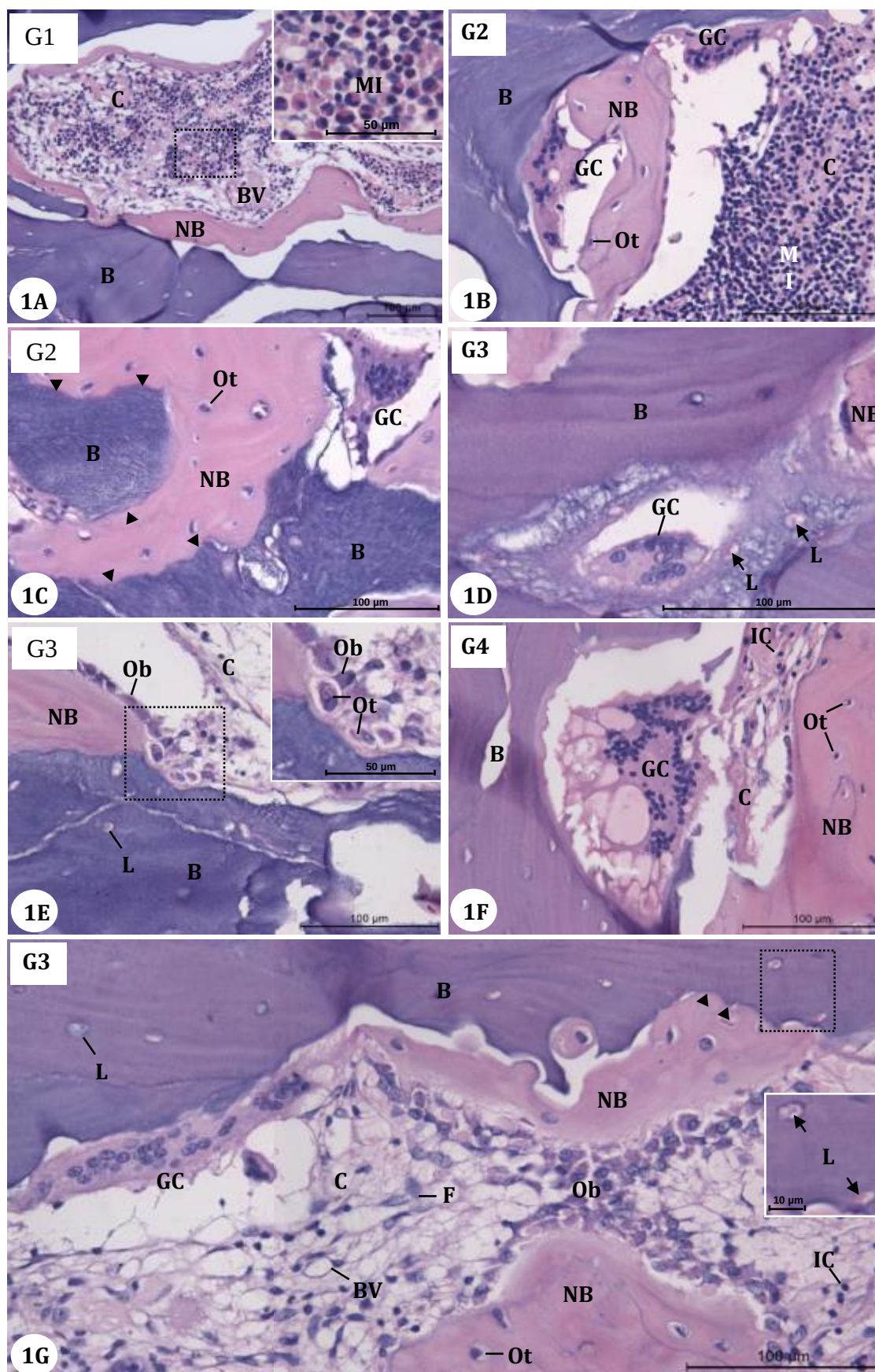


Figura 23 – Prancha 1: Fotomicrografias de cortes histológicos ilustrando aspectos morfológicos comuns ao diferentes grupos (G) investigados.

Fonte: o autor, 2015

G1: implante *onlay* do biomaterial xenógeno bovino Criteria®, **G2:** Criteria® associado ao uso de membrana, **G3:** Criteria® e rhBMP-2 (proteína morfogenética óssea-2 recombinante humana), **G4:** Criteria® e rhBMP-2 associados ao uso de membrana. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

1A: Em menor aumento, observa-se o tecido ósseo neoformado (NB) acidófilo em proximidade/contato com o biomaterial (B). O remanescente do biomaterial (B) apresenta aspectos semelhantes ao de uma matriz orgânica óssea, porém, exibe intensa basofilia. No tecido conjuntivo (C), observa-se diversas células inflamatórias. Em maior aumento, no detalhe referente à região delimitada pelo retângulo, é possível notar que o infiltrado inflamatório está constituído por células inflamatórias mononucleares (MI). Vasos sanguíneos (BV). Barras: 100 µm (figura 1A) e 50 µm (detalhe). **1B:** Em íntimo contato com o biomaterial (B) e próximas também ao tecido ósseo (NB), células gigantes (GC) são observadas. No tecido conjuntivo (C), intenso infiltrado inflamatório (MI) é encontrado. Osteócito (Ot). Barra: 100 µm. **1C:** Observa-se íntimo contato entre o osso neoformado (NB) e o biomaterial (B) (cabeças de setas). O osso neoformado (NB) exibe numerosos osteócitos (Ot) no interior de amplas lacunas. Próximo ao tecido ósseo (NB), uma célula gigante exibindo diversos núcleos (GC) é observada. Barra: 100 µm. **1D:** Em uma porção de um perfil de biomaterial (B), uma célula gigante multinucleada (CG) é encontrada no interior de uma lacuna. Além disso, na estrutura com aspecto orgânico (B), remanescentes acidófilos (setas) podem ser observados no interior de lacunas (L). Tecido ósseo (NB). **1E:** Em íntimo contato com biomaterial (B), está ocorrendo a formação de tecido ósseo (NB). O tecido ósseo (NB) exibe diversos osteoblastos (Ob) em sua superfície. No detalhe, em maior aumento, observa-se que os osteoblastos (Ob) apresentam-se polarizados e basófilos. Além disso, alguns osteoblastos (Ob) estão incorporados à matriz óssea, originando osteócitos (Ot). Tecido conjuntivo (C). Lacunas (L). Barras: 100 µm (figura 1E) e 50 µm (detalhe). **1F:** Uma célula gigante (GC) é encontrada em proximidade com o biomaterial (B). O tecido conjuntivo (C) exibe apenas algumas células inflamatórias (IC). No tecido ósseo neoformado (NB), diversos osteócitos (Ot) são encontrados. Barra: 100 µm. **1G:** O tecido ósseo neoformado (NB) está em íntimo contato (cabeças de seta) com o biomaterial (B). Diversos osteoblastos (Ob) exibindo citoplasma basófilo encontram-se

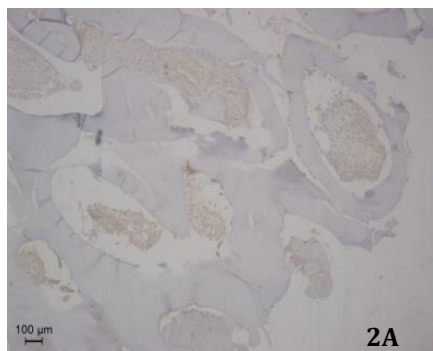
dispostos na superfície do tecido ósseo (NB). Justaposta ao biomaterial (B) observa-se uma célula gigante exibindo diversos núcleos (GC). Em maior aumento, no interior do biomaterial (B), lacunas (L) exibem remanescentes acidófilos, semelhantes ao citoplasma de osteócitos (setas). No tecido conjuntivo (C), vasos sanguíneos (BV), fibroblastos (F) e algumas células inflamatórias (IC) são encontrados. Barra: 100 μ m.

5.2 Análise imuno-histoquímica

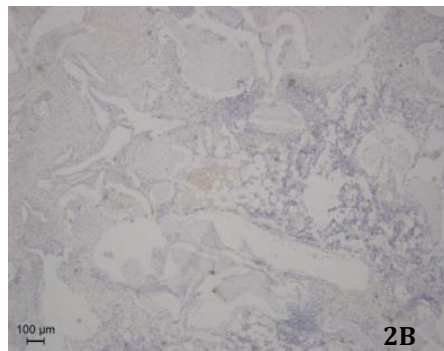
Intensidades diversas de imuno-marcações (castanho ao marrom) foram encontradas para ambos os anticorpos. A expressão de VEGF tendeu a ser mais intensa no G4 (castanho-marrom). A imunopositividade para o colágeno I mostrou-se aparentemente maior nos G3 e G4 (castanho-marrom). A presença da membrana pareceu reduzir a expressão tanto de VEGF quanto de colágeno tipo I no G2, que apresentou fracas intensidades de imunorreações (castanho).

VEGF

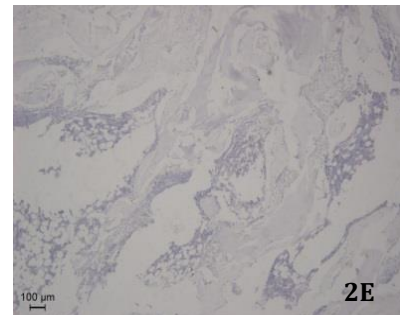
G1



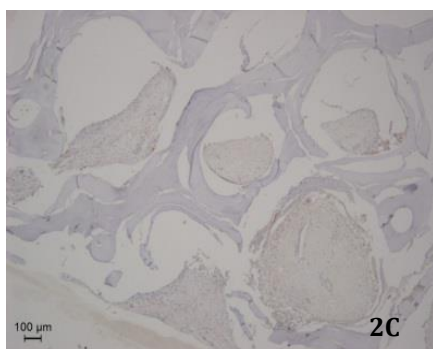
G2



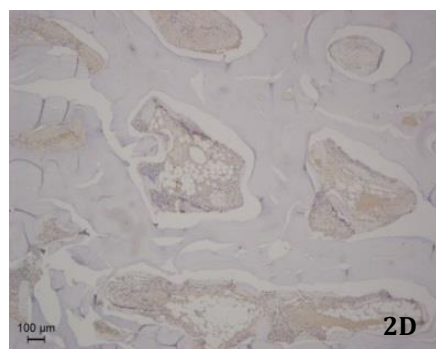
C-



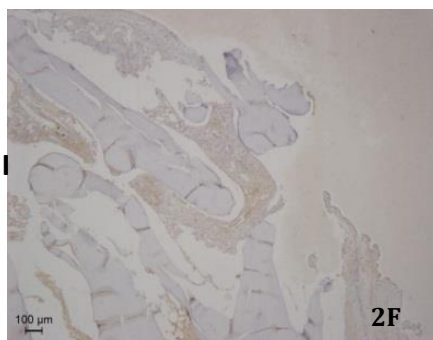
G3



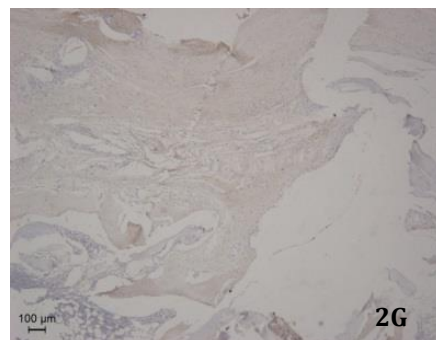
G4



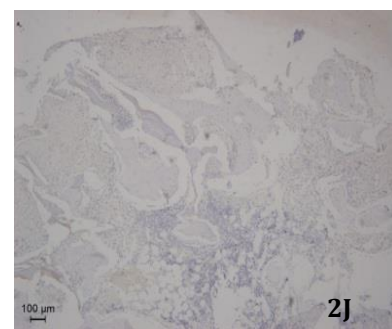
G1



G2

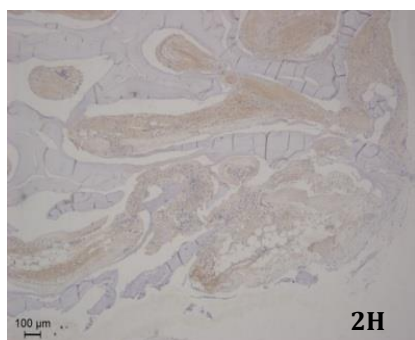


C-



Colágeno I

G3



G4

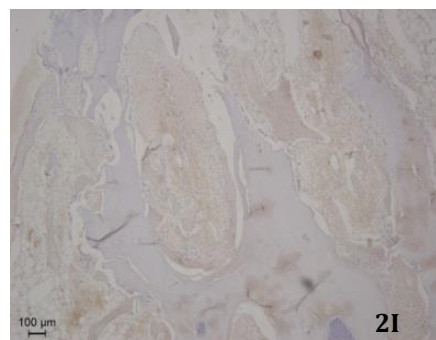


Figura 24 – Prancha 2: Fotomicrografias de cortes histológicos submetidos à imunohistoquímica para detecção de VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) ou para detecção de Colágeno tipo I nos diferentes grupos (G) investigados.

Fonte: o autor, 2015

G1: implante onlay do biomaterial xenógeno bovino Criteria®, **G2:** Criteria® associado ao uso de membrana, **G3:** Criteria® e rhBMP-2 (proteína morfogenética óssea-2 recombinante humana), **G4:** Criteria® e rhBMP-2 associados ao uso de membrana. Imuno-histoquímicas para VEGF ou para Colágeno I contra-coradas com Hematoxilina.

Apesar não haverem diferenças significantes entre os grupos, diversas intensidades de imuno-marcação (cores castanho ou marrom) foram encontradas para ambos os anticorpos. A expressão de VEGF tendeu a ser mais intensa no G4 (castanho-marrom). A imunopositividade para o colágeno I mostrou-se aparentemente maior nos G3 e G4 (castanho-marrom). A presença da membrana pareceu reduzir a expressão tanto de VEGF quanto de colágeno tipo I no G2, que apresentou fracas intensidades de imunorreação (castanho). Barra: 100 µm.

6 DISCUSSÃO

As recentes pesquisas realizadas na área da Implantodontia, buscam cada vez mais encontrar possibilidades de aumento de tecido ósseo, para utilização em procedimentos reconstrutivos preparatórios à futura reabilitação com implantes dentários.

Várias técnicas de reconstrução conseguiram melhorar o volume ósseo antes da colocação de implantes. No entanto, selecionar a abordagem mais adequada para aumentar maxilares atróficos permanece um desafio para os clínicos. Assim, em casos de rebordos alveolares extremamente reabsorvidos ou em pacientes com maxila atrófica, cirurgias de enxerto ósseo são frequentemente usadas para resolver a limitação da quantidade e qualidade do osso que são de particular interesse nos fatores que determinam a localização ideal para a colocação de implantes dentários e de seu prognóstico ao longo do tempo.^(3,6)

Este é o desafio encontrado nas pesquisas experimentais, *in vitro*, *in vivo*, e nas análises dos biomateriais desenvolvidos, que visam ampliar essas técnicas, considerando e respeitando os diversos elementos envolvidos, tais como: base científica, procedimento técnico, morbidades ao paciente, custo/benefício, etc.⁽²⁹⁾

Desde que Urist⁽²³⁾, descobriu o potencial osteoindutor das BMPs, a busca por um substituto ósseo ideal com essa capacidade tem sido intensa e com resultados estimuladores, mas até o momento sem uma aplicação clínica segura. O osso autógeno é considerado como o padrão ouro para os procedimentos de reconstrução óssea por uma combinação de características, mas o que realmente o difere dos outros biomateriais é a sua capacidade osteoindutora, porém, ainda faltam estudos mostrando como e quando os fatores osteoindutores agem durante o reparo dos enxertos autógenos cortical, medular, particulado ou em bloco.⁽⁴³⁾

Sabe-se que, durante o processo de regeneração óssea, ocorre uma complexa interação entre células mesenquimais, hematopoiéticas, endoteliais,

proteínas da matriz óssea, citocinas e fatores de crescimento, estimulando a angiogênese, migração, diferenciação e proliferação celular.

O enxerto xenogênico vem apresentando resultados promissores. Alicerçado na abundância, baixo custo do osso bovino e no processamento mecânico e químico adequado, diversas empresas vem produzindo biomateriais com osso bovino, como substituto ósseo. Estes representam uma alternativa em substituição ao osso autógeno. Sob o formato particulado, trata-se de um material bastante consagrado na literatura, sendo sua utilização em cirurgias de elevação do assoalho do seio maxilar e em procedimentos de regeneração óssea guiada.^(1,11,17)

O processamento do osso bovino pode resultar em dois tipos distintos de material: o inorgânico e o orgânico. O inorgânico é livre de proteínas e células e é caracterizado pelo elevado conteúdo de hidroxiapatita. A desproteínização é obtida através de tratamento térmico a temperaturas superiores a 300°C, mas, quanto mais alta a temperatura, menor a taxa de bioabsorção do material.

Por outro lado, o tratamento do osso bovino com solventes orgânicos, álcalis e ácidos com concentração e temperatura controlada resultam na remoção de células, detritos celulares e várias proteínas não colágenas, bem como a porção mineral deixando um arcabouço proteico constituído basicamente de colágeno tipo 1 e pequenas quantidades de fatores de crescimento, como a proteína morfogenética óssea. Apesar disto nossos resultados mostraram a presença de remanescentes celulares nos enxertos utilizados. Se estes remanescentes já estavam presentes no osso xenógeno ou se são resultados de reparação óssea incompleta, não foi estabelecido.

Em nossa avaliação histológica, encontramos células inflamatórias mononucleares, que são comuns em reações inflamatórias nos períodos iniciais de cicatrização, enquanto que se este infiltrado aparece em momentos posteriores, tal fato poderia ser por uma reação contra o biomaterial. Houve também formação de vasos sanguíneos (Ver Figura 1A - G1), compatível com estudos anteriores.⁽¹⁰⁾

Foi observada presença de células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos, porém, não é possível afirmar que os são, pois para tanto seria necessária aplicação de teste imunohistoquímico, para avaliar a presença da enzima TRAP, que é uma enzima de reabsorção presente nos osteoclastos.

Tendo em vista o número de semanas de reparação óssea até a eutanásia (12 semanas), o osso formado foi semelhante em todos os grupos, porém, nos grupos G3 e G4 foram observados maiores quantidades de células adiposas comparado aos outros grupos. Tal fato nos sugere uma formação óssea mais lenta com osso menos denso, o que implicaria em uma maior espera no tempo para formação óssea e consequentemente para a colocação de implante. Isso vai de acordo com os trabalhos que demonstraram indução da diferenciação de células mesenquimais em adipócitos por BMP-2. ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾ Consideração importante é o fato de todos os grupos apresentarem células ósseas viáveis com neoformação, sendo que do ponto de vista microscópico em nenhum deles foi observado alguma particularidade, indicando que a rhBMP-2 não apresentou vantagens sob o aspecto histológico, como mostram alguns trabalhos na literatura^(13,16) quando associado ao material de uso xenógeno.

Encontramos ainda, no interior do biomaterial, lacunas que exibem remanescente acidófilos, semelhantes ao citoplasma de osteócitos, fato este preocupante em relação a segurança do biomaterial, uma vez que poderiam causar algum tipo de reação imunológica e até mesmo transmissão de doenças, achado esse que não é comum nos materiais xenógenos mais estudados na literatura internacional, que por seu processamento à uma temperatura de 300°C, ou com álcalis seguido de neutralização remove praticamente qualquer príon que por ventura exista na amostra, e tornariam assim, essas lacunas livres de qualquer componente orgânico.⁽¹⁴⁾

Do ponto de vista da formação óssea, o enxerto xenógeno mostrou ter boa capacidade osteocondutiva, pois observou-se osso neoformado integrado ao biomaterial (fig. 1C e 1E). Presença de osteoblastos próximos ao biomaterial, e em alguns locais osteoblastos estavam incorporados na matriz

óssea, originando osteócitos, achados estes compatíveis com outros estudos⁽⁸⁾ e também por trabalho onde se usou BBM particulado em seio maxilar.⁽²⁾

Para melhor elucidar o comportamento biológico do uso biomaterial xenógeno associado ou não com a rhBMP-2, foi avaliada também a expressão de VEGF e colágeno 1 por meio de imuno-histoquímica.

Nossos resultados não mostraram diferenças significantes entre os grupos, onde diversas intensidades de imuno-marcação foram encontradas para ambos os anticorpos. Não houve uma expressão tão intensa de VEGF após as 12 semanas, o que vai de encontro com trabalhos na literatura que mostram que após 60 dias a expressão de VEGF não é mais tão expressiva, e sim nos períodos iniciais,⁽⁴³⁾ entretanto, foi observado com mais intensidade no G4.

Já a presença da membrana pareceu diminuir a expressão de VEGF e colágeno tipo I no G2, desta vez divergindo de trabalho onde houve maior expressão de VEGF no interior do enxerto onde se usou Bio-Oss® e membrana absorvível de colágeno, porém, associados a enxerto autólogo.⁽⁵³⁾

Fato importante a se considerar em relação ao rhBMP-2 em sua pouca influência na expressão do colágeno tipo 1 e do VEGF é o de que as amostras foram avaliadas com 12 semanas de pós operatório, ou seja, já em fase final do período cicatricial, pois sabe-se que estes fatores são expressados mais em períodos iniciais.⁽⁵⁴⁾

Para o colágeno do tipo I, a imunopositividade se mostrou mais intensa no G3 e G4, onde estavam associados ao uso da rhBMP-2.

A regeneração dos tecidos com o uso de enxertos ósseos, ainda representa um desafio à odontologia. Diversas outras proteínas envolvidas no processo de reparo dos enxertos devem ser estudadas, bem como, diferentes modelos experimentais, leitos receptores, comparações entre diferentes tipos ósseos precisam ser mais estudados para melhor compreender as reações fisiológicas do organismo quando submetido aos processos de cicatrização.

7 CONCLUSÃO

1. Os xenógenos tem capacidade osteocondutora, facilitando a neoformação óssea no tempo estudado.
2. A adição de rhBMP-2 não modificou a observação histológica dos tecidos, mas pareceu induzir maior expressão de VEGF e colágeno tipo I.
3. A presença ou ausência de membrana também não modificou as características histológicas.

REFERÊNCIAS

1. Araújo MG, Lindhe J. Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation: an experimental study in the dog. *Clinical oral implants research*. 2009;20(6):545-9.
2. Nunes LSDS, De Oliveira RV, Holgado LA, Nary Filho H, Ribeiro DA, Matsumoto MA. Use of bovine hydroxyapatite with or without biomembrane in sinus lift in rabbits: histopathologic analysis and immune expression of core binding factor 1 and vascular endothelium growth factor. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2011;69(4):1064-9.
3. Araujo M, Sonohara M, Hayacibara R, Cardaropoli G, Lindhe J. Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29(12):1122-31.
4. Nahles S, Nack C, Gratecap K, Lage H, Nelson JJ, Nelson K. Bone physiology in human grafted and non-grafted extraction sockets—an immunohistochemical study. *Clinical oral implants research*. 2013;24(7):812-9.
5. Hernandez-Gil IF-T, Gracia MA, del Canto Pingarrn M, Jerez LB. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2006;11(1):E47-51.
6. Jung RE, Glauser R, Schärer P, Hämmerle CH, Sailer HF, Weber FE. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clinical oral implants research*. 2003;14(5):556-68.
7. Davies SD, Ochs MW. Bone morphogenetic proteins in craniomaxillofacial surgery. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2010;22(1):17-31.
8. Polo CI, Lima JLO, De Lucca L, Piacezzi CB, Naclério-Homem MdG, Arana-Chavez VE, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein 2 associated with a variety of bone substitutes on vertical guided bone regeneration in rabbit calvarium. *Journal of periodontology*. 2013;84(3):360-70.
9. Hosaki-Takamiya R, Hashimoto M, Imai Y, Nishida T, Yamada N, Mori H, et al. Collagen production of osteoblasts revealed by ultra-high voltage electron microscopy. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2015:1-9.

10. Nunes LSS, Oliveira RV, Holgado LA, Nary Filho H, Ribeiro DA, Matsumoto MA. Immunoexpression of Cbfa-1/Runx2 and VEGF in sinus lift procedures using bone substitutes in rabbits. *Clinical oral implants research*. 2010;21(6):584-90.
11. Sartori S, Silvestri M, Forni F, Icaro Cornaglia A, Tesei P, Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clinical Oral Implants Research*. 2003;14(3):369-72.
12. Rothamel D, Schwarz F, Herten M, Ferrari D, Mischkowski RA, Sager M, et al. Vertical ridge augmentation using xenogenous bone blocks: a histomorphometric study in dogs. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2008;24(2):243-50.
13. Kao D, Kubota A, Nevins M, Fiorellini JP. The negative effect of combining rhBMP-2 and Bio-Oss on bone formation for maxillary sinus augmentation. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2012;32(1):61-7.
14. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*. 2001;22(12):1599-606.
15. Cornelini R, Cangini F, Martuscelli G, Wennström J. Deproteinized bovine bone and biodegradable barrier membranes to support healing following immediate placement of transmucosal implants: a short-term controlled clinical trial. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2004;24(6):555-63.
16. Kim S-J, Shin H-S, Shin S-W. Effect of bone block graft with rhBMP-2 on vertical bone augmentation. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2010;39(9):883-8.
17. Cordaro L, Torsello F, Morcavallo S, di Torresanto VM. Effect of bovine bone and collagen membranes on healing of mandibular bone blocks: a prospective randomized controlled study. *Clinical oral implants research*. 2011;22(10):1145-50.
18. Schmitt C, Lutz R, Doering H, Lell M, Ratky J, Schlegel KA. Bio-Oss® blocks combined with BMP-2 and VEGF for the regeneration of bony defects and vertical augmentation. *Clinical oral implants research*. 2013;24(4):450-60.

19. Block MS, Kelley B. Horizontal posterior ridge augmentation: the use of a collagen membrane over a bovine particulate graft: technique note. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013;71(9):1513-9.

20. Lutz R, Berger-Fink S, Stockmann P, Neukam FW, Schlegel KA. Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft—a 5-year retrospective study. *Clinical oral implants research*. 2015;26(6):644-8.

21. Antunes AA, Grossi-Oliveira GA, Martins-Neto EC, De Almeida ALG, Salata LA. Treatment of Circumferential Defects with Osseointegrative Xenografts of Different Porosities: A Histological, Histometric, Resonance Frequency Analysis, and Micro-CT Study in Dogs. *Clinical implant dentistry and related research*. 2015;17(S1):e202-e220.

22. Schulz MC, Kallweit MB, Kallweit S, Koch R, Lauer G, Mai R, et al. Autogenous bone and a bovine bone substitute for ridge preservation—preliminary clinical and histologic findings. *Australian dental journal*. 2015. DOI: 10.1111/adj.12313

23. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-9.

24. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988;242(4885):1528-34.

25. Moghadam HG, Urist MR, Sandor GK, Clokie CM. Successful mandibular reconstruction using a BMP bioimplant. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2001;12(2):119-27.

26. Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, et al. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2005;63(12):1693-707.

27. Wikesjö UM, Huang Y-H, Polimeni G, Qahash M. Bone morphogenetic proteins: a realistic alternative to bone grafting for alveolar reconstruction. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2007;19(4):535-51.

28. Boyce AS, Reveal G, Scheid DK, Kaehr DM, Maar D, Watts M, et al. Canine investigation of rhBMP-2, autogenous bone graft, and rhBMP-2 with autogenous bone graft for the healing of a large segmental tibial defect. *Journal of orthopaedic trauma*. 2009;23(10):685-92.

29. Herford AS. rhBMP-2 as an option for reconstructing mandibular continuity defects. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2009;67(12):2679-84.

30. Thoma DS, Jones A, Yamashita M, Edmunds R, Nevins M, Cochran DL. Ridge augmentation using recombinant bone morphogenetic protein-2 techniques: an experimental study in the canine. *Journal of periodontology*. 2010;81(12):1829-38.

31. Canan Jr LW, da Silva Freitas R, Alonso N, Tanikawa DYS, Rocha DL, Coelho JCU. Human bone morphogenetic protein-2 use for maxillary reconstruction in cleft lip and palate patients. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2012;23(6):1627-33.

32. Herford AS, Lu M, Buxton AN, Kim J, Henkin J, Boyne PJ, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 combined with an osteoconductive bulking agent for mandibular continuity defects in nonhuman primates. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;70(3):703-16.

33. Yasuda H, Yano K, Wakitani S, Matsumoto T, Nakamura H, Takaoka K. Repair of critical long bone defects using frozen bone allografts coated with an rhBMP-2-retaining paste. *Journal of Orthopaedic Science*. 2012;17(3):299-307.

34. Mariner PD, Wudel JM, Miller DE, Genova EE, Streubel SO, Anseth KS. Synthetic hydrogel scaffold is an effective vehicle for delivery of INFUSE (rhBMP2) to critical-sized calvaria bone defects in rats. *Journal of Orthopaedic Research*. 2013;31(3):401-6.

35. Chang YY, Lee JS, Kim MS, Choi SH, Chai JK, Jung UW. Comparison of collagen membrane and bone substitute as a carrier for rhBMP-2 in lateral onlay graft. *Clinical oral implants research*. 2015;26(1):e13-e9.

36. Leal CR, Calvo AM, de Souza Faco RA, da Cunha Bastos Júnior JC, Yaedú RYF, da Silva Dalben G, et al. Evolution of Postoperative Edema in Alveolar Graft Performed With Bone Morphogenetic Protein (rhBMP-2). *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2015;52(5):e168-e175.

37. Milani S, Dal Pozzo L, Rasperini G, Sforza C, Dellavia C. Deproteinized bovine bone remodeling pattern in alveolar socket: a clinical immunohistological evaluation. *Clinical oral implants research*. 2014. DOI: 10.1111/clr.12535.
38. Li Z-j, Lu C-t, Feng Z-q, Zhao Q-t, Zhou Z-y, Lai R-f. Antigen-extracted xenogeneic cancellous bone graft with recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances bone regeneration in repair of mandibular defect in rabbits. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2015;31(1):18-25.
39. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*. 2000;6(4):389-96.
40. DeLise A, Fischer L, Tuan R. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and cartilage*. 2000;8(5):309-34.
41. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas P. The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*. 2006;17(3):319-36.
42. Dai J, Rabie A. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *Journal of dental research*. 2007;86(10):937-50.
43. Faria PE, Okamoto R, Bonilha-Neto RM, Xavier SP, Santos AC, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clinical oral implants research*. 2008;19(4):393-401.
44. Boëck-Neto R, Artese L, Piattelli A, Shibli J, Perrotti V, Piccirilli M, et al. VEGF and MVD expression in sinus augmentation with autologous bone and several graft materials. *Oral diseases*. 2009;15(2):148-54.
45. Tetè S, Zara S, Zizzari VL, Carlo A, Vinci R, Cataldi A, et al. Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinase-9, vascular endothelial growth factor, bone sialoprotein and i-nitric oxide synthase in calvaria vs. iliac crest bone grafts. *Clinical oral implants research*. 2012;23(11):1254-60.
46. Hawthorne AC, Xavier SP, Okamoto R, Salvador SL, Antunes AA, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic, and histological study on onlay bone graft remodeling. Part III: allografts. *Clinical oral implants research*. 2013;24(10):1164-72.

47. Sager M, Ferrari D, Wieland M, Dard M, Becker J, Schwarz F. Immunohistochemical characterization of wound healing at two different bone graft substitutes. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2012;41(5):657-66.

48. Kim J-E, Kang S-S, Choi K-H, Shim J-S, Jeong C-M, Shin S-W, et al. The effect of anodized implants coated with combined rhBMP-2 and recombinant human vascular endothelial growth factors on vertical bone regeneration in the marginal portion of the peri-implant. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2013;115(6):e24-e31.

49. Li Z, Liao W, Zhao Q, Liu M, Xia W, Yang Y, et al. Angiogenesis and bone regeneration by allogeneic mesenchymal stem cell intravenous transplantation in rabbit model of avascular necrotic femoral head. *Journal of surgical research*. 2013;183(1):193-203.

50. Fu JH, Oh TJ, Benavides E, Rudek I, Wang HL. A randomized clinical trial evaluating the efficacy of the sandwich bone augmentation technique in increasing buccal bone thickness during implant placement surgery. *Clinical oral implants research*. 2014;25(4):458-67.

51. Gohil SV, Adams DJ, Maye P, Rowe DW, Nair LS. Evaluation of rhBMP-2 and bone marrow derived stromal cell mediated bone regeneration using transgenic fluorescent protein reporter mice. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(12):4568-80.

52. Hsu S-L, Wang C-J. The use of demineralized bone matrix for anterior cruciate ligament reconstruction: a radiographic, histologic, and immunohistochemical study in rabbits. *Journal of Surgical Research*. 2014;187(1):219-24.

53. Koerdt S, Ristow O, Wannhoff A, Kübler AC, Reuther T. Expression of growth factors during the healing process of alveolar ridge augmentation procedures using autogenous bone grafts in combination with GTR and an anorganic bovine bone substitute. *Clinical oral investigations*. 2014;18(1):179-88.

54. Du B, Gao Y, Deng Y, Zhao Y, Lai C, Guo Z, et al. Local delivery of rhVEGF165 through biocoated nHA/coral block grafts in critical-sized dog mandible defects: a histological study at the early stages of bone healing. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(4):4940.

55. Date T, Doiguchi Y, Nobuta M, Shindo H. Bone morphogenetic protein-2 induces differentiation of multipotent C3H10T1/2 cells into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes in vivo and in vitro. *Journal of Orthopaedic Science*. 2004;9(5):503-8.
56. Lee SY, Lee JH, Kim J, Bae YC, Suh KT, Jung JS. BMP2 Increases Adipogenic Differentiation in the Presence of Dexamethasone, which is Inhibited by the Treatment of TNF- α in Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2014;34(4):1339-50.
57. Rogers MB, Shah TA, Shaikh NN. Turning Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) On and Off in Mesenchymal Cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2015;16(10):2127-2138.

ANEXO 1



MINISTÉRIO DA SAÚDE

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais

PARECER N.º 18/2012**REGISTRO CEUA UNISA N.º 18/2012**

Projeto de Pesquisa: "Avaliação do Efeito da rhBMP 2 em Blocos Xenógenos Fixados para Ganho Ósseo Vertical em Tíbia de Coelhos. Avaliação Morfométrica e Histológica".

Pesquisadores Responsáveis: Wilson Roberto Sendyk
Pós-Graduando: Guilherme Pirágine Contador

Curso: Mestrado em Implantodontia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do Projeto "**Avaliação do Efeito da rhBMP 2 em Blocos Xenógenos Fixados para Ganho Ósseo Vertical em Tíbia de Coelhos. Avaliação Morfométrica e Histológica**".

São Paulo, 13 de Junho de 2012.

PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA
UNISA - Universidade de Santo Amaro