



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

YASMIN BERTIN BAIROS

**Avaliação da associação beta tricálcio fosfato e BMP2 no
reparo ósseo de alvéolos dentais curetados**

Araçatuba

2018

YASMN BERTIN BAIROS

Avaliação da associação beta tricálcio fosfato e BMP2 no reparo ósseo de alvéolos dentais curetados

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Profa. Adj. Dra. Roberta Okamoto

Coorientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

Araçatuba

2018

Aos meus pais, João Sérgio Bairos e Maria José Berlin Bairos, por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim. Serei eternamente grata a todo apoio, incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por nunca ter me desamparado e ouvido todas minhas preces. Obrigada por todas as pessoas que o Senhor colocou em minha vida durante esses 5 anos de graduação.

Ao meu pai, que sempre esteve me apoiado nos momentos mais difíceis e me fazendo enxergar que para tudo há uma solução, mesmo quando eu não queria. Por sempre fazer o possível e, até o impossível, por mim.

A minha melhor amiga, minha mãe, por nunca ter me deixado desanimar. Que sempre estava pronta a atender uma ligação em qualquer horário. Por ter me ouvido tantas e tantas vezes, em momentos de alegria e choros. Mãe, você é minha inspiração.

Roberta Okamoto, minha doce e meiga orientadora, por toda sua paciência e disposição em me ajudar. A senhora não poderia ter sido mais prestativa e compreensível.

Aos doutorandos, Fábio e Pedro pela ajuda e disponibilidade para a realização deste trabalho. Sem vocês nada disso seria possível.

A minha banca, Professor Francisley e Pedro, por cederem um pouco do seu tempo e me contemplarem com seus ensinamentos.

Ao Vínicius Orasmo, meu namorado, por ser tão compreensível e estar sempre ao meu lado, me apoiando.

Ao melhor amigo que a faculdade poderia me dar, Paulo Augusto Penitente. Obrigada por me aturar.

A turma 60: apesar das diferenças, não poderia ter tido melhores companheiros. Sentirei saudades!

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP por ter me proporcionado experiências incríveis e me concedido uma formação impecável.

Aos meus amigos de infância, Higor, Isabela, Katriel e Lucas que, apesar da distância, continuamos nos apoiando após tantos anos. “Se a amizade é verdadeira, a distância não separa, o amor não enfraquece e ninguém substitui.”

As meninas do departamento, Letícia e Ana Cláudia, por estarem sempre dispostas a me ajudar.

A todos os pacientes, por confiarem em meu trabalho e compreenderem nossas dificuldades.

“Os dias prósperos não vêm por acaso; nascem de muita fadiga e persistência.”

Henry Ford

BAIROS, Y. B. **Avaliação da associação beta tricálcio fosfato e BMP2 no reparo ósseo de alvéolos dentais curetados.** 2018. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos osteoindutores e osteocondutores da associação tricálcio fosfato (TCP) e proteína morfogenética óssea (rhBMP-2) utilizada para preencher o alvéolo pós extração do incisivo superior com o intuito de analisar as respostas celulares na presença de ausência dos remanecentes do ligamento periodontal da parede alveolar. Foram utilizados 24 ratos, divididos em dois grupos: com ligamento periodontal ou sem ligamento periodontal. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos, de acordo com o material a ser estudado na cavidade óssea (Bone Ceramic sozinho ou em associação com BMP-2). Após a indução da anestesia geral por infiltração intramuscular, os animais tiveram extraído o incisivo superior direito, com um instrumento que foi especialmente adaptado e após o preenchimento da cavidade com os diferentes materiais, foi realizada a sutura com fio poliglactina 910. Os subgrupos foram: manutenção do ligamento periodontal e utilização do Bone Ceramic (LP-BC), remoção do ligamento periodontal e utilização de Bone Ceramic (SLP-BC), Bone Ceramic e BMP com Ligamento Periodontal (LP-BC+BMP), Bone Ceramic e BMP sem Ligamento Periodontal (SLP-BC+BMP). Para cada subgrupo experimental, os animais foram distribuídos para avaliar os períodos de 28 dias após a extração dentária: 6 animais por período. Após os períodos experimentais que foram determinados, os animais foram sacrificados, a fim de obter as amostras que foram fixadas em formaldeído a 4%, por 48 horas. Em sequência, foram lavados em água corrente por 24 horas e, em seguida, foram mantidos em EDTA a 10% até a etapa de desmineralização. Ao final deste período, as amostras passavam pelo processamento laboratorial de rotina, a fim de realizar a inclusão da parafina e, posteriormente, obter cortes histológicos de 5 micrômetros de espessura. As secções foram montadas em lâminas histológicas que foram separadas para serem submetidas à reação imunohistoquímica contra RUNX2, osteocalcina e TRAP. As

imunomarcações foram avaliadas através da atribuição de escores, determinando a presença das proteínas no soquete reparador. Os resultados mostram que a cerâmica óssea foi capaz de manter a dinâmica do reparo ósseo alveolar de acordo com os eventos esperados aos 28 dias após a extração, com baixa expressão de RUNX2, maior expressão de osteocalcina e moderada expressão de TRAP (sinalizando equilíbrio no remodelamento ósseo). A ausência do ligamento periodontal promoveu um atraso no processo que foi caracterizado por alterações na expressão das proteínas. O BMP2 adicionado ao Bone Ceramic promoveu um aumento nas respostas reabsortiva, caracterizado pela maior expressão do TRAP. Na cavidade alveolar sem ligamento periodontal, a BMP2 adicionada ao Bone Ceramic produziu uma importante expressão do RUNX2. Os resultados avaliados juntos permitem concluir que a presença do ligamento periodontal é essencial para o desenvolvimento das respostas celulares que ocorrem durante a reparação do alvéolo e o Bone Ceramic é um substituto que não interfere nesta resposta. O efeito osteoindutor da BMP2 promoveu um aumento da atividade dos osteoclastos, bem como uma expressão importante do fator de transcrição RUNX-2.

Palavras-Chave: Transplante ósseo, Regeneração óssea, Imunoistoquímica.

BAIROS, Y. B. **Evaluation of beta-tricalcium phosphate and BMP2 association in the bone repair of curetted alveoli**. 2018. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

The presente study have the aim to evaluate the osteoinductive and osteoconductive effects of the beta tricalcium phosphate (TCP) and bone morphogenetic protein (rhBMP-2) association used to fill the upper incisor extraction socket in order to analyse cellular responses in the presence of absence of periodontal ligament remanants of the alveolar wall. It was used 24 rats, divided in two groups: with periodontal ligament or with no periodontal ligament. Each group was divided in two sub groups, according to the material to be studied into the dental socket (Bone Ceramic alone or in association with BMP-2). After general anesthesia induction through intramuscular infiltration, animals had right upper incisor extracted, with an instrument that was specially adapted and after the socket filling with the different materials, it was performed the suture with 910 polyglactin thread. The sub-groups were: Bone Ceramic with Periodontal Ligament (LP-BC), Bone Ceramic without Periodontal Ligament (SLP-BC), Bone Ceramic BMP with Periodontal Ligament (LP-BC+BMP), Bone Ceramic BMP without Periodontal Ligament (SLP-BC+BMP) . To each experimental sub group, the animals were distributed in order to evaluate the periods of 28 days after tooth extraction: 6 animals per period. After the experimental periods that were determined, the animals were sacrificed, in order to obtain the samples that were fixed in 4% formaldehyde, through 48 hours. In sequence, they were washed in running water through 24 hours and then, they were kept in 10% EDTA to the demineralization step. At the end of this period, samples passed through routine laboratorial processing, in order to perform the paraffin inclusion and after this, to obtain histological sections with 5 micrometer thickness. The slices were mounted in histological slides that were separated in order to be submitted to immunohistochemical reaction against RUNX2, osteocalcin and TRAP. The immunolabelings were evaluated through the scores atribution, determined the

presence of the proteins in the repairing socket. Results show that Bone Ceramic was capable to maintain the dynamics of alveolar bone repair according to the expected events at 28 days post extraction, with low expression of RUNX2, higher expression of osteocalcin and with moderate expression of TRAP (signaling the equilibrium in the remodeling bone responses). The absence of the periodontal ligament promoted a delay in the process that was characterized by changes in the expression of the proteins. BMP2 added to Bone Ceramic promoted an increase in reabsorbing responses, characterized by the higher expression of TRAP. In the alveolar socket without periodontal ligament, the BMP2 added to Bone Ceramic produced an important expression of RUNX2. The results evaluated together allow us to conclude that the presence of periodontal ligament is essential to the development of the cellular responses that occurs during the alveolar socket repair and bone Ceramic is a substitute that do not interfere in this response. The osteoinductive effect of BMP2 promoted an increase of osteoclast's activity as well as an important expression of the transcription factor RUNX-2.

Key-words: Bone transplantation, Bone regeneration, Immunohistochemistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição da avaliação imunoistoquímica das proteínas RUNX-2, osteocalcina (OC) e TRAP nos diferentes grupos experimentais	21
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imunomarcações das proteínas RUNX-2, osteocalcina (OC) e TRAP nos diferentes grupos experimentais 22

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	esponja de colágeno absorvível
BC	bone ceramic
BCP	fosfato de cálcio bifásico
BMP	proteína morfogenética óssea
BMU	unidade multicelular básica
HA	hidroxiapatita
HE	hematoxilina e eosina
G LP	grupo presença do ligamento periodontal alveolar
G SLP	grupo ausência do ligamento periodontal alveolar
OCN	osteocalcina
rhBMP-2	proteína morfogenética óssea recombinante tipo 2
TCP	tricálcio fosfato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Animais e grupos experimentais	17
3.2 Procedimento cirúrgico	18
3.3 Técnica imunohistoquímica	18
4. RESULTADOS	20
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26
ANEXOS	28

1 INTRODUÇÃO

A busca pelo material ideal para a substituição óssea é um dos desafios dentro da odontologia, o que tem impulsionado os estudos, utilizando materiais sintéticos e biológicos. A falta de osso nos rebordos alveolares é um fator limitante para a colocação dos implantes dentários e, geralmente ocorre em pacientes que sofreram traumatismos dentoalveolares, extrações dentárias traumáticas, ausência dentária congênita, ou com outras patologias que envolvam maxila e mandíbula. Esta perda óssea é uma das limitações para a reabilitação com implantes, pois um volume ósseo inadequado compromete a estabilidade primária (Carvalho et al., 2003).

O material ideal deve induzir a osteogênese, sendo biocompatível, não carcinogênico, de fácil obtenção e baixo custo, não devendo causar maiores inconvenientes ao profissional e ao paciente (Dalculsi et al., 1989; Serri et al., 1993).

Os enxertos ósseos autógenos são considerados “padrão ouro” pela literatura, tendo em vista sua alta previsibilidade de sucesso (Ahlmann et al., 2002 e Jung et al., 2003). Por ser o único enxerto com potencial osteogênico, osteoindutor, osteocondutor, e não exibir propriedades antigênicas, existir em abundância e prover adequada estabilidade e suporte (Boyne, 1973; Triplett & Schow, 1996; Hirsch & Ericsson, 1991 e Lundgren et al., 1996). Todavia, diante de algumas situações como a morbidade da área doadora, quantidade limitada de enxerto que pode ser removido de regiões intrabucais e a necessidade de anestesia geral para a remoção de enxertos de áreas extrabucais, em que os pacientes apresentam alguma contra indicação sistêmica para a anestesia geral, estes enxertos podem não ser indicados (Lundgren et al., 1996; Raghoobar et al., 1993; Wood Moore 1988).

A tendência atual é utilizar biomateriais que acelerem ou, ao menos, permitam o reparo normal e completo do defeito ósseo, diminuindo a taxa de insucesso pós-operatória (Blank & Levy, 1999; Young et al., 1999). São denominados osteogênicos quando são capazes de promover a formação óssea por disponibilizarem células viáveis; osteoindutores quando são capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e, osteocondutores quando sua estrutura serve de arcabouço para a migração celular e

deposição óssea oriunda das imediações, desta forma, o biomaterial pode ser gradativamente reabsorvido e simultaneamente substituído por novo tecido ósseo (Urist, 1984; Urist, 2002).

Neste contexto, os materiais aloplásticos são de origem sintética. Os biomateriais cerâmicos a base de fosfato de cálcio podem ser porosos, cristalinos, amorfos, granulados, sobretudo, devem garantir a formação de ligações estáveis com o osso neoformado, ao decorrer do tempo (Lynch et al., 1999). São exemplos de biocerâmicas as hidroxiapatitas (HA), o fosfato tricálcico e os biovidros.

BoneCeramic (Straumann®) é um substituto ósseo 100% sintético, com morfologia para estimular a formação de osso vital. É composto por fosfato de cálcio bifásico (BCP), uma combinação de hidroxiapatita (HA) a 60% em peso e 40% em peso de beta-fosfato tricálcio. A estabilidade mecânica do volume aumentado é mantida graças à lenta reabsorção da hidroxiapatita, que impede o excesso de reabsorção, de acordo com informações do fabricante (Straumann®).

A rhBMP-2 (Infuse) faz parte de uma família importante na formação óssea. Consiste em um recombinante humano proteína morfogenética óssea – 2 e um veículo para a proteína morfogenética óssea, a esponja de colágeno absorvível (ACS). A proteína é uma versão da proteína natural humana, encontrada em pequenas quantidades no corpo, cujo propósito é estimular a formação óssea. O ACS é feito de colágeno bovino tipo I, que age como um carreador para a rhBMP-2 e funciona como uma armação para a formação de osso novo.

Para utilização clínica de um biomaterial, é imprescindível que anteriormente seja testado em estudos *in vitro* e *in vivo*. É esperado de um biomaterial sintético, que além de biocompatibilidade e potencial osteocondutor, ele seja gradualmente reabsorvido à medida que novo osso viável é formado. Desta forma, justifica-se a idealização desta pesquisa que irá verificar o potencial osteocondutor do Bone Ceramic® em alvéolo de incisivo superior de ratos na ausência e na presença do ligamento periodontal.

O processo de reparo alveolar ocorre a partir de uma sequência dinâmica de fenômenos descritos na literatura (Perri de Carvalho & Okamoto, 1987). A primeira etapa consiste na formação de filamentos de fibrina, que atuarão como sustentação para a segunda etapa deste processo, que consiste na proliferação celular a partir dos remanescentes do ligamento periodontal. Concomitantemente a

estes eventos, ocorre um processo de angiogênese e diferenciação das células em osteoblastos, que sintetizarão a matriz extracelular, para que ocorra o processo de mineralização. O processo de reparo alveolar é considerado completo quando o alvéolo se encontra preenchido por tecido ósseo e há remodelação da crista óssea alveolar. Em ratos, este processo se completa aos 28 dias após a exodontia do incisivo superior (Okamoto e Fialho, 1990).

Ainda com o objetivo de avaliar o potencial osteoindutor, estes materiais serão avaliados numa situação em que o ligamento periodontal, a fonte de células mesenquimais indiferenciadas, é removido. O grupo sem ligamento periodontal foi incluído no projeto com a finalidade de avaliar o potencial osteoindutor dos materiais numa situação adversa, em que o processo de reparo alveolar está prejudicado.

Portanto, este trabalho visa avaliar, o tecido ósseo formado durante o processo de reparo alveolar após a exodontia do incisivo superior, estudando comparativamente o comportamento de diferentes materiais introduzidos no interior do alvéolo. Os materiais a serem estudados caracterizam-se por apresentar atividades osteocondutora e osteoindutora. Serão avaliadas duas situações experimentais: o processo de reparo alveolar evoluindo com a preservação do ligamento periodontal e sem a preservação do ligamento periodontal.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial osteocondutor e osteoindutor da associação do Beta Tricálcio Fosfato e Proteína Morfogenética Óssea 2, implantadas no alvéolo de incisivo superior de ratos, após a exodontia, na presença e ausência do ligamento periodontal, através de análises imunoistoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Grupos Experimentais

Após a aprovação do Comitê de ética em pesquisa no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo FOA nº 2014-01051) (**Anexo A**), 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos, com peso de 250g, aproximadamente foram utilizados.

Estes animais foram submetidos à exodontia do incisivo superior direito, sendo que em metade dos animais, o processo de reparo alveolar evoluiu com a presença do ligamento periodontal alveolar (Grupo LP) e a outra metade, após a exodontia, o ligamento periodontal foi removido através da utilização de cureta para este fim, realizando-se uma raspagem na parede lingual do alvéolo (Grupo SLP). Após as exodontias os alvéolos foram parcialmente preenchidos com Beta Tricálcio Fosfato isolado ou associado com rhRMP-2, obtendo desta forma os seguintes grupos:

- **LP-BC**: realizada a exodontia e imediatamente após, o Beta Tricálcio Fosfato foi colocado no terço médio/cervical do alvéolo;

- **SLP-BC**: realizada a exodontia e remoção do ligamento periodontal, seguido pela colocação do Beta Tricálcio Fosfato no terço médio/cervical do alvéolo;

- **LP-BC+BMP**: realizada a exodontia e imediatamente após, o Beta Tricálcio Fosfato associado a proteína morfogenética óssea tipo 2 (rhBMP-2) em proporções iguais, foram colocado no terço médio/cervical do alvéolo;

- **SLP-BC+BMP**: realizada a exodontia e remoção do ligamento periodontal, seguido pela colocação do Beta Tricálcio Fosfato associado a proteína morfogenética óssea tipo 2 (rhBMP-2) em proporções iguais, no terço médio/cervical do alvéolo.

Para cada grupo experimental, os animais foram distribuídos de forma que foram analisados os períodos de 28 dias após a exodontia, com número de 6 animais por grupo.

3.2 Procedimento Cirúrgico

A exodontia do incisivo superior de ratos ocorreu da seguinte forma: após a indução anestésica por infiltração intramuscular com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e Cloridrato de Cetamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.), na dosagem indicada pelo fabricante, foi realizada a antisepsia do campo operatório com polivinilpirrolidona iodada (Riodeine Indústria Química e Farmacêutica Rio Química Ltda) e em seguida, foi feita a exodontia do incisivo superior direito, utilizando instrumental especialmente adaptado para este fim (Okamoto & Russo, 1973). Os alvéolos foram tratados e preenchidos com os biomateriais de acordo com cada grupo (LP-BC, SLP-BC, LP-BC+BMP e SLP-BC+BMP) como citado previamente e a mucosa gengival foi suturada com fio de poliglactina 910 (Vicryltm – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). em todos os animais.

Estes animais foram mantidos em gaiolas, alimentados com ração balanceada (Ração Ativada Produtor, Moinho Primor S/A), exceto 24 horas após a intervenção cirúrgica (ração em pó) e água “ad libitum”.

3.3 Técnica imunoistoquímica

Após eutanásia dos animais, seis maxilas de cada grupo experimental (LP-BC, SLP-BC, LP-BC+BMP e SLP-BC+BMP) foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 10% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas em xilol. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e receberam cortes de 6 µm de espessura e foram montadas em lâminas histológicas para reações de imunoistoquímica.

Para isto, foi utilizado o método de detecção por imunoperoxidase e os cortes em parafina foram selecionados para a realização da imunomarcção contra as proteínas RUNX2, Osteocalcina e TRAP com o objetivo de caracterizar as respostas de diferenciação osteoblástica e as respostas de formação/mineralização óssea e reabsorção/atividade osteoclástica.

O processamento imunistoquímico iniciou-se pelas etapas de desparafinização (manutenção dos cortes em estufa durante 20 minutos), seguidos banhos em CitriSolv e banhos em concentrações decrescente de álcoois e finalizando com a hidratação dos cortes imersos em PBS (solução de tampão fosfato salina 0,01M). A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio e na etapa seguinte, as lâminas passaram pela recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) em calor úmido. Foi realizado ainda o bloqueio da biotina endógena com leite desnatado por 20 minutos. Ainda como método de bloqueio de marcações inespecíficas, o anticorpo primário foi preparado em solução de tampão fosfato e albumina bovina a 1%.

Os anticorpos primários (anticorpos policlonais, produzidos em cabra) utilizados foram contra RUNX-2, osteocalcina (OC) e TRAP. O anticorpo secundário utilizado foi o anticorpo biotilado anti-cabra, produzido em coelhos (Pierce Biotechnology). O sinal da reação foi amplificado através da incubação em avidina e biotina (Kit ABC standard, Vector Laboratories) e a reação foi revelada utilizando a Diaminobenzidina (Dako laboratories). Ao término das reações imunistoquímicas, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Na sequência, as lâminas passaram pelas etapas de desidratação, embebidas em Xilol, as lamínulas foram montadas para posterior análise em microscópio óptico (Nikon, Eclipse 80i, Shinagawa, Tokyo, Japão), objetiva de 25x.

Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas por análise qualitativa ordinal através da atribuição de diferentes “scores” de acordo com a quantidade de células e área de matriz extracelular imunomarcadas durante o processo de osseointegração. O analisador foi submetido ao teste Kappa onde o índice acima de 0,8 foi obtido, mostrando que os escores observados foram consistentes. Os escores utilizados representam - (ausência de marcação), ++ (marcação leve), +++ (marcação moderada) e ++++ (marcação intensa) (Pedrosa et al., 2009 e Manrique et al., 2015).

4 RESULTADOS

Imunoistoquímica

Foram avaliadas as proteínas relacionadas às respostas de osteoindução, fator de transcrição RUNX-2, que se apresenta marcado em pré-osteoblastos; respostas de mineralização e maturação óssea, osteocalcina, que se apresenta marcada em células da linhagem osteoblástica, na matriz óssea mineralizada e não mineralizada, resposta de reabsorção óssea, TRAP, que se apresenta marcada em osteoclastos que estão em atividade, junto a matriz óssea mineralizada.

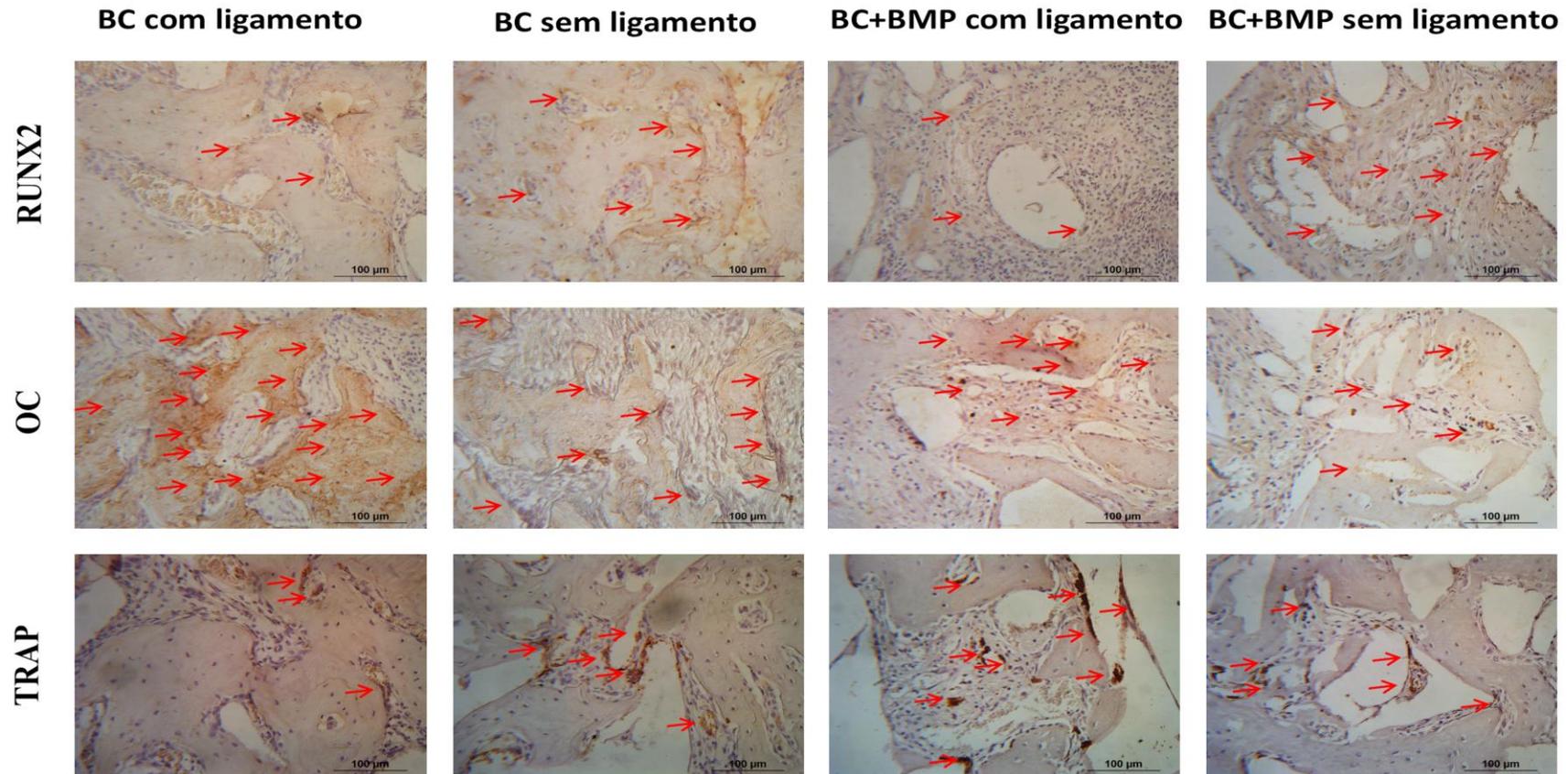
Assim, a avaliação conjunta destas proteínas permitiu caracterizar a dinâmica do processo de reparo alveolar frente às diferentes situações representadas nos grupos experimentais.

As avaliações das imunomarcações foram realizadas através de escores, sendo que os valores mais representativos para os grupos experimentais encontram-se relacionados na tabela 1 e figura 1.

Tabela 1 – Descrição da avaliação imunohistoquímica das proteínas RUNX-2, osteocalcina (OC) e TRAP nos diferentes grupos experimentais.

	RUNX-2	OC	TRAP
<i>LP-BC</i>	Escore 1 (onde havia mais osso), Escore 2 apenas em algumas regiões onde havia conjuntivo (muito poucas). Representativo: 1	Escore 3 (importante resposta de mineralização óssea)	Escore 1 a 2
<i>SLP-BC</i>	Escore 1 a 2. Nota: nos animais onde havia predomínio de conjuntivo, havia escore 1, portanto, houve um prejuízo na expressão deste fator de transcrição	Escore 2 (há um atraso em relação ao grupo LP-BC)	Escore 2
<i>LP-BC+BMP</i>	Escore 1 (esperado para essa etapa de avaliação, 28 dias pós operatórios)	Escore 1 a 2 (atraso quanto a resposta de mineralização, mas há predomínio de tecido ósseo no alvéolo)	Escore 3 (BMP parece ativar a resposta osteoclástica. Ver paper publicado na Acta Histochemical)
<i>SLP-BC+BMP</i>	Escore 2 (mostra atraso na resposta reparacional, no entanto, chamar atenção para a importante marcação dos pré osteoblastos junto ao tecido conjuntivo)	Escore 1 a 2 (muita área com conjuntivo, diferente do grupo LP-BC+BMP. Portanto, este grupo mostra importante atraso na resposta reparacional . O escore 2 em alguns espécimes relaciona-se a marcação observada em matriz extracelular não mineralizada).	Escore 2 a 3 (a ausência do LP parece atrasar a resposta osteoclástica exacerbada, observada no grupo LP-BC+BMP)

Figura 1 – Imunomarcações das proteínas RUNX-2, osteocalcina (OC) e TRAP nos diferentes grupos experimentais.



5 DISCUSSÃO

O conjunto de resultados avaliados mostra que há diferenças no comportamento de proteínas da matriz extracelular do tecido ósseo nas diferentes situações dos grupos experimentais avaliados neste estudo.

Os melhores resultados do ponto de vista qualitativo foram observados no grupo LP-BC, onde observou-se uma importante formação de tecido ósseo mineralizado, ainda com atividade osteoindutora (compatível com o período pós operatório avaliado) e com a atividade osteoclástica em andamento, especialmente em função da ativação das BMUs e também da presença do biomaterial no interior do alvéolo.

Quando se avalia a ausência do ligamento periodontal nesta mesma situação (grupo SLP-BC), observa-se que há um atraso na cronologia do processo pois no período de 28 dias pós exodônticos, foram evidenciadas marcação leve para a RUNX2, mesmo nas áreas com tecido conjuntivo, mostrando que a presença de pré-osteoblastos estava menos evidente. Este pode ser um reflexo da remoção do ligamento periodontal que sabidamente representa uma fonte de células mesenquimais indiferenciadas, que seriam as principais candidatas a apresentarem a marcação positiva para a RUNX-2.

Já no grupo LP-BC+BMP, observou-se uma marcação leve para a RUNX2, compatível com a cronologia do processo de reparo alveolar avaliado. Quando se removeu o LP e introduziu-se o BC-BMP (SLP-BC+BMP), observou-se um atraso na cronologia do processo de reparo alveolar, mostrando grandes áreas com tecido conjuntivo não mineralizado preenchendo o alvéolo, no entanto, com marcação moderada para o fator de transcrição RUNX-2. Pode-se relacionar este achado com o efeito osteoindutor da BMP-2 (Marx et al., 2013 e 2014), lembrando-se que no grupo SLP-BC, esta característica não foi evidenciada.

Os efeitos a longo prazo quanto a qualidade do osso reparacional foram avaliados pela marcação para a Osteocalcina, proteína não colágena predominante na matriz extracelular do tecido ósseo e que caracteriza a etapa de mineralização óssea. Para esta proteína, os melhores resultados foram observados nos grupos

LP-BC e os piores resultados foram observados para o grupo SLP-BC+BMP. No entanto, alguns aspectos precisam ser considerados quando se avalia conjuntamente a expressão da OC junto com a TRAP.

Para a TRAP, foram observadas as maiores imunomarcações para os grupos com BMP2, Este achado foi evidenciado em estudos anteriores do nosso grupo, onde a adição de BMP-2 ao beta tricálcio fosfato utilizados no preenchimento de defeitos críticos confeccionados em calvária de ratos, mostrou uma ativação da resposta osteoclástica a partir da marcação positiva para TRAP e para a metaloproteinase 9 (enzima que degrada o colágeno, base da matriz orgânica do tecido ósseo) (Luvizuto et al., 2017). Neste estudo observou-se que mesmo que não houvesse diferenças entre a quantidade de tecido ósseo preenchendo o defeito de calvária de ratos com o biomaterial sozinho ou associado a BMP-2, a ativação osteoclástica relacionada a presença da BMP-2 poderia levar a alterações a longo prazo no osso reparacional, em função da ativação das BMUs, o que poderia levar a um processo de precipitação de matriz mineralizada que a longo prazo resultaria num tecido ósseo de melhor qualidade durante o procedimento de reconstrução óssea.

Neste estudo, evidenciou-se que a presença da BMP-2 ativou as respostas osteoclásticas o que pode ser refletido pela menor marcação positiva para osteocalcina em comparação aos grupos onde foi utilizado apenas o BC (com ou sem LP). Mais uma vez deve-se considerar que a longo prazo, haveria a possibilidade de as respostas osteoblásticas que vêm na sequência (atividade das BMUs) poderia levar a uma melhora na síntese de proteínas e precipitação de minerais, resultando numa melhora da qualidade do osso reparacional. Mais estudos, avaliando tempos pós operatórios posteriores se fazem necessários para que esta hipótese seja confirmada.

6 CONCLUSÃO

Através do resultado obtido, pode-se concluir que o biomaterial testado mostrou um bom desempenho em preencher e conduzir a formação de osso alveolar, porém a remoção do ligamento periodontal através de curetagens piora esta resposta. A adição de rhBMP2 caracteriza maior diferenciação celular marcada pela RUNX2.

REFERÊNCIAS

PERRI DE CARVALHO, A.C. E OKAMOTO, T. Cirurgia Experimental. Fundamentos Experimentais Aplicados à Clínica. Editorial Médica Panamericana, 1987.

ADELL, R.; LEKHOHLM, U.; ROCKLER, B. et al., A 15-years study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int. J. oral Surg.*, v. 10, n. 6, p. 387-416, dec., 1981.

ALBREKTSON T. The Branemark osseointegrated implant. Chicago: Quintessence, 1989. 262p.

FINKEMEIER, C. G. Bone grafting and bone graft substitutes. *J Bone Joint Surgery*, v.84-A, n.3, p.454-464, 2002

MISCH CE. Biomateriais utilizados em implantes dentários. In : Misch CE, editor. Implantes dentários contemporâneos. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Santos; 2000: 271-302.

URIST, M. R.; STRATES, B. S. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*, v.50, p.1392-1406, 1971.

VARGHESE, S.; RYDZIEL, S.L CANALIS, E. Bone morphogenetic protein 2 suppresses collagenase-3 promoter activity in osteoblasts through a runt Domain Factor 2 binding site. *Journal of Cellular physiology*, v. 202, p.391-399, 2005.

DALCULSI, G. et al. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res*, v.23, p.883-894, 1989.

TEITELBAUM, S. L. Bone remodeling and the osteoclast. *J Bone Miner Res*, v.8, suppl. 2, p.5523-5525, 1993.

BRUNSVOLD, M.A.; MELLONIG, J.T. Bone grafts and periodontal regeneration. *Periodontology*, v. 1, p. 80-91, 1003.

CARVALHO, P.S.P.; OKAMOTO, T.; CARVALHO, A.C.P. The influence of intra-alveolar curettage on wound healing after tooth extraction. A histological study in rats. *J. Nihon University School Dent.*, v.24; p. 28-34; 1982.

KOMAKI, M.; KARAKIDA, T.; ABE, M.; OKIDA, S.; MIMORI, K.; IWASAKI, K.; NOGUCHI, K.; ODA, S.; ISHIKAWA, I. Twist negatively regulates osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 100, p. 303-314, 2007.

WANG, J. S. Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. *Acta Orthop Scand Suppl*, v.269, p.1-33, 1996.

OKAMOTO, T. E RUSSO, M.C. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev. Fac. Odont. Araçatuba*; v. 2, n.2; p. 153-169, 1973.

LUVIZOTO ER, de Oliveira JCS, Gomes-Ferreira PHS, Pereira CCS, Faverani LP, Antoniali C, Okamoto R. Immunohistochemical response in rats of beta-tricalcium phosphate (TCP) with or without BMP-2 in the production of collagen matrix critical defects. *Acta Histochem.* 2017 Apr;119(3):302-308. doi: 10.1016/j.acthis.2017.02.006. Epub 2017 Mar 3. PubMed PMID: 28262327.

MARX RE, Armentano L, Olavarria A, Samaniego J. rhBMP-2/ACS grafts versus autogenous cancellous marrow grafts in large vertical defects of the maxilla: an unsponsored randomized open-label clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013 Sep-Oct;28(5):e243-51. doi: 10.11607/jomi.te04. PubMed PMID: 24066341.

MARX RE, Harrell DB. Translational research: The CD34+ cell is crucial for large-volume bone regeneration from the milieu of bone marrow progenitor cells in craniomandibular reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014 Mar-Apr;29(2):e201-9. doi: 10.11607/jomi.te56. PubMed PMID: 24683583.

ANEXO A – Comitê de ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação da associação Beta-tricálcio-fosfato e BMP2 no reparo ósseo de alvéolos dentais curetados", Processo FOA nº 2014-01051, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 27 de Outubro de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 10 de Dezembro de 2015.

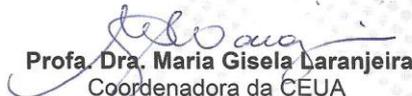
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Janeiro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation association of Beta-tricalcium-Phosphate and BMP2 in bone repair curettage dental alveolus", Protocol FOA nº 2014-01051, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 27, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 10, 2015.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 10, 2016.


Profa. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator