ANDRÉA CARVALHO DE MARCO

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO BMP-2 EM
ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO EM BLOCO RECOBERTO
OU NÃO POR MEMBRANA DE PTFE-e**

São Paulo

2007

Andréa Carvalho De Marco

**Imunolocalização do fator de crescimento BMP-2 em enxerto ósseo autógeno
em bloco recoberto ou não por membrana de PTFE-e**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Assoc. Luiz Antônio P. Alves de Lima

São Paulo

2007

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

De Marco, Andréa Carvalho

Imunolocalização do fator de crescimento BMP-2 em enxerto ósseo autógeno em bloco recoberto ou não por membrana de PTFE-e / Andréa Carvalho De Marco; orientador Luiz Antônio P. Alves de Lima. -- São Paulo, 2007.

65 p. : 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Periodontia) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Reparação periodontal -- Enxerto ósseo autógeno -- Fator de crescimento BMP 2. Periodontia

CDD 617.632
BLACK D64

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____ / ____ / ____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

De Marco AC. Imunolocalização do fator de crescimento BMP-2 em enxerto ósseo autógeno em bloco recoberto ou não por membrana de PTFE-e [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, / /2008

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À **Deus**, por guiar meus passos, por estar sempre presente, me iluminando e abençoando com sua luz divina.

Ao meu querido marido, **Fernando**, por todo o carinho, respeito e, sobretudo pelo amor que existe entre nós.

À minha mãe, **Zélia**, por tudo que sou. Pelo seu amor incondicional, companheirismo e proteção.

À **Clarice e Fernando De Marco**, pessoas muito queridas, sempre presentes com afeto, compreensão e confiança.

À **Tia Cecília**, por me preparar para viver a vida com força e confiança em mim mesma.

À toda a minha família, especialmente Tias e Tios que sempre me apoiaram e vibraram muito com as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Assoc. **Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima**, por me conduzir durante todo o curso de pós-graduação com sua competência, experiência e brilhantismo.

Aos professores da Disciplina de Periodontia, **Francisco Emílio Pustiglione, Roberto Lotufo, Giorgio De Michelli, José Hildebrando Todescan, Marco Georgetti, Giuseppe Alexandre Romito, Koto Nakae, Silvia Rosana Carneiro** (*in memoriam*), que com extrema capacidade e dedicação, contribuíram para minha formação acadêmica.

À **Maria Aparecida Neves Jardini (Ucha)**, excelente professora. Pela sua intensa participação nos meus trabalhos de pós-graduação. Pela confiança depositada em mim no início da carreira acadêmica. Por todos os momentos que já compartilhamos e pelos que ainda virão. Pela nossa amizade.

Ao **Prof. Fábio Daumas Nunes**, por ter confiado neste trabalho, colocando a Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP à disposição para execução do mesmo. Também por sua imensa colaboração científica.

Ao **Prof. Filipe Modolo**, por sua valiosa participação no trabalho, pela motivação e incentivo nas fases de trabalho laboratorial, análise e redação.

Ao **Prof. Cláudio Mendes Pannuti**, por sua presteza em contribuir e elaborar parte dos resultados.

Aos professores **Fernando Renó de Lima** e **Warley David Kerbauy** da Disciplina de Periodontia da FOSJC-UNESP, grandes responsáveis pelo meu ingresso na carreira acadêmica. Por todo o incentivo, apoio e confiança ao longo de tantos anos de convivência.

Às minhas amigas da turma de Mestrado, **Ana Cristina, Gisele, Elaine, Carmen, Alessandra, Mônica, Eliane e Daniela**, posso dizer que nesta empreitada senti falta de vocês. Como o melhor da vida é viver intensamente cada momento, os nossos momentos continuarão perpetuados pela nossa amizade.

À **Elisa Santos**, bióloga, extremamente competente, responsável pelo laboratório de Patologia Bucal da FOUSP. Pela sua colaboração, paciência e delicadeza.

À **Edna Toddai** (*in memoriam*), grande conhecedora das técnicas laboratoriais, por estar sempre pronta a me ensinar e ajudar.

À **Profª. Yasmin Rodarte Carvalho** da Disciplina de Patologia Bucal da FOSJC-UNESP, pela ajuda na elaboração do projeto.

À **Profª. Luana Reis**, por nossa amizade no caminho da Periodontia.

À **Profª. Adriana Aigotti Brandão** da Disciplina de Patologia Geral da FOSJC-UNESP, por ter me atendido prontamente quando precisei de sua ajuda.

Ao **Dr. Hélio Okamoto**, que gentilmente cedeu os espécimes para o controle positivo das reações.

Aos funcionários da FOUSP, especialmente **Márcia Maria dos Santos, Maria Aparecida Pinto e Vânia Martins Bueno de O. Funaro**, que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

À **FAPESP**, pelo auxílio à pesquisa (processo nº00/11085-7).

À **CAPES**, pela bolsa de doutorado.

“...o esforço intelectual para se conseguir as titulações universitárias nos conduz pelos rigorosos caminhos da Ciência. E quanto mais se caminha pela Ciência, mais se passa a acreditar em Deus, autor primeiro de todas as coisas que nós humanos estamos apenas redescobrimdo.”

Carlos França

De Marco A. C. Imunolocalização do fator de crescimento BMP-2 em enxerto ósseo autógeno em bloco recoberto ou não por membrana de PTFE-e [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a imunolocalização do fator de crescimento BMP-2 em enxerto ósseo autógeno em bloco recoberto ou não por membrana de PTFE-e na fase inicial da reparação óssea. MATERIAL E MÉTODOS: Quarenta e oito ratos “*wistar*” foram divididos em dois grupos de estudo, um que recebeu somente o enxerto ósseo autógeno (E) e o outro que recebeu o enxerto ósseo autógeno recoberto por membrana (ME). Os períodos de avaliação foram: 0 hora, 3, 7, 14, 21 e 45 dias. Os cortes foram submetidos à reação imunoistoquímica. Foram realizadas as análises, qualitativa e quantitativa: contagem de células com marcação intracitoplasmática nas estruturas bordo, enxerto, tecido conjuntivo superior ao enxerto, interface e leito. RESULTADOS: No leito o maior número de células marcadas foi observado em 3 dias nos grupos (E) e (ME). A região de bordo apresentou maior número de células marcadas em 7 dias no grupo (E) e em 14 dias no grupo (ME), onde a marcação foi predominante em osteoblastos e células osteoprogenitoras em áreas de remodelação óssea. No tecido conjuntivo superior ao enxerto a maior proporção de marcação no grupo (E) ocorreu em 7 dias e no grupo (ME) em 21 dias, no entanto, neste último, ainda havia marcação em células osteoprogenitoras ao final dos 45 dias. Na interface, o maior número de células marcadas ocorreu entre 7 e 21 dias, considerando os grupos (E) e (ME), quando células osteoprogenitoras apresentaram-se positivas nas áreas de pontes de osso imaturo entre o leito e o enxerto. A maior proporção de marcação no enxerto foi variável entre os períodos de 3 dias no grupo (E) e 21 dias no grupo (ME), mas esta foi considerada de menor proporção quando comparada às marcações observadas nas outras estruturas. CONCLUSÕES: Os dados observados mostram que as estruturas de maiores proporções de marcação são aquelas relacionadas à intensa revascularização e osteogênese. Células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos apresentaram marcação intracitoplasmática, independentemente do período ou da estrutura analisada. À exceção da interface, o grupo (ME) apresentou marcação mais tardia quando comparado ao grupo (E) para as estruturas bordo e tecido conjuntivo superior ao enxerto.

Palavras-Chave: Enxerto ósseo autógeno – Regeneração Óssea Guiada – Imunoistoquímica – Fatores de Crescimento –BMP-2

De Marco AC. Immunolocalization of BMP-2 growth factor in autogenous block graft covered or not with an e-PTFE membrane [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the immunolocalization of the BMP-2 growth factor in an autogenous block graft covered or not with an e-PTFE membrane on the early phases of bone repair. MATERIAL AND METHODS: Forty-eight wistar male rats had their mandibles augmented by either an autogenous bone block graft (B) or an autogenous bone block graft covered with an e-PTFE membrane (MB). The specimens were evaluated at baseline, 3, 7, 14, 21 and 45 days after surgery by immunohistochemistry. Qualitative and quantitative analysis were performed. RESULTS: On the receptor bed the greatest number of staining cells was observed within three days on groups (B) and (MB). The border region has shown a largest number of staining cells in seven days on (B) group and in fourteen days on (MB) group, where the staining was prominent in osteoblasts and osteoprogenitor cells in bone remodeling areas. On the connective tissue above the graft, the greatest staining proportion occurred on (B) group within seven days and on (MB) group in twenty one days. However, there was still staining in osteoprogenitor cells in the end of the experiment, (at forty-five day period). On the interface, the greatest number of staining cells occurred between seven and twenty one days for groups (B) and (MB) respectively, when osteoprogenitor cells were positive in woven bone edges between the receptor bed and the graft. The greatest proportion of staining on the graft was variable among three days on group (B) and twenty one days on group (MB), but this was considered a smaller proportion when compared to other structures staining. CONCLUSIONS: The data suggest that the greatest staining proportions structures are related to intense revascularization and osteogenesis. Osteoprogenitor cells, osteoblasts and osteocytes showed intracytoplasmatic staining, independently of the period or structure analyzed. Except for the interface, the (MB) group has shown later staining compared to group (B) for border and connective tissue above the graft.

Key-works: Autogenous bone graft – Guided bone regeneration – Immunohistochemistry – Growth Factors – BMP-2

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Nesta lâmina corada em H.E., pode-se observar as estruturas bordo (B), enxerto (E), tecido conjuntivo superior ao enxerto (TC), interface (I) e leito (L). Aumento de 40 X. 36
- Figura 5.1 - Espécime do Grupo (E) - 7 dias. Fotomicrografia mostrando interface (I) com células osteoprogenitoras marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas). Enxerto (E). Aumento de 630 X. 41
- Figura 5.2 - Espécime do Grupo (E) – 7 dias. Fotomicrografia mostrando tecido conjuntivo superior ao enxerto (TC). Presença de células osteoprogenitoras marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas). Enxerto (E). Aumento de 630 X..... 41
- Figura 5.3 - Espécime do Grupo (E) – 7 dias. Fotomicrografia mostrando no bordo do enxerto (E) a presença de célula osteoprogenitora positiva para o anticorpo BMP-2 (seta) ao lado de célula multinucleada – osteoclasto (OC). Aumento de 630 X..... 41
- Figura 5.4 - Espécime do Grupo (E) – 14 dias. Fotomicrografia mostrando o leito (L), o enxerto (E) e células osteoprogenitoras (OP) marcadas para o anticorpo BMP-2. Osso neoformado (ON). Aumento de 100 X..... 41
- Figura 5.5 - Espécime do Grupo (E) – 14 dias. Fotomicrografia mostrando células osteoprogenitoras positivas para o anticorpo BMP-2 na região de bordo do enxerto (setas). Aumento de 630 X. 41
- Figura 5.6 - Espécime do Grupo (E) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando o leito (L), a interface (I) e o enxerto (E). Presença de células positivas para o anticorpo BMP-2 na interface (I) e na metade inferior do enxerto (E). Aumento de 25 X. 41
- Figura 5.7 - Espécime do Grupo (E) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando células perivasculares marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas) na interface. Vaso sangüíneo (V). Aumento de 630 X..... 42

- Figura 5.8 - Espécime do Grupo (E) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando osteócitos marcados para o anticorpo BMP-2 (setas) no enxerto (E). Aumento de 400 X.42
- Figura 5.9 - Espécime do Grupo (E) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando osteócito (seta verde), osteoblasto (seta preta) e célula osteoprogenitora (seta vermelha) positivos para o anticorpo BMP-2 no leito (L) e na interface (I). Aumento de 400 X.42
- Figura 5.10 - Espécime do Grupo (E) – 45 dias. Fotomicrografia mostrando área de remodelação no enxerto (E) e células marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas) na interface (I). Aumento de 200 X.....42
- Figura 5.11 - Espécime do Grupo (E) – 45 dias. Fotomicrografia mostrando a região do bordo do enxerto com células osteoprogenitoras perivasculares marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas). Enxerto (E). Vasos sangüíneos (V). Aumento de 400 X.42
- Figura 5.12 - Espécime do Grupo (ME) – 3 dias. Fotomicrografia mostrando deposição de osteóide (★) e linhas de reversão (setas pretas) no leito (L). Osteoblastos positivos para o anticorpo BMP-2 (setas vermelhas). Aumento de 200 X.42
- Figura 5.13 - Espécime do Grupo (ME) – 3 dias. Fotomicrografia mostrando marcação intracitoplasmática em osteoblastos (setas) depositando osteóide (★). Aumento de 630 X.43
- Figura 5.14 - Espécime do Grupo (ME) – 3 dias. Fotomicrografia mostrando leito (L). Presença de osteócitos marcados para o anticorpo BMP-2 (setas). Aumento de 630 X.43
- Figura 5.15 - Espécime do Grupo (ME) – 7 dias. Fotomicrografia mostrando região de bordo do enxerto com osteoblastos marcados para o anticorpo BMP-2 (setas) e área de remodelação óssea (★). Aumento de 400 X.....43
- Figura 5.16 - Espécime do Grupo (ME) – 7 dias. Fotomicrografia mostrando o tecido conjuntivo superior ao enxerto com células osteoprogenitoras marcadas para anticorpo BMP-2 (setas). Aumento de 400 X.43

- Figura 5.17 - Espécime do Grupo (ME) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando leito (L), interface (I), enxerto (E), tecido conjuntivo superior ao enxerto (TC). Osso neoformado (ON). Espaço ocupado pela membrana (M). Aumento de 25 X.43
- Figura 5.18 - Espécime do Grupo (ME) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando área de substituição do enxerto (E). Osteócitos recém aprisionados na nova matriz (setas pretas) e linha de reversão (seta vermelha). Aumento de 400 X.....43
- Figura 5.19 - Espécime do Grupo (ME) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando canais de reabsorção no interior do enxerto (E). Osteoblastos marcados para o anticorpo BMP-2 (setas). Aumento de 400 X.44
- Figura 5.20 - Espécime do Grupo (ME) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando o tecido conjuntivo superior ao enxerto (TC). Presença de células osteoprogenitoras marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas). Vasos sanguíneos (V). Espaço ocupado pela membrana (M). Aumento de 400 X.....44
- Figura 5.21 - Espécime do Grupo (ME) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando células osteoprogenitoras positivas para o anticorpo BMP-2 (setas) na interface (I). Aumento de 630 X.44

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 5.1 - Média, desvio padrão e comparação dos grupos (E) e (ME) com relação à BMP-2 – BORDO.....	45
Tabela 5.2 - Média, desvio padrão e comparação dos grupos (E) e (ME) com relação à BMP-2 – ENXERTO.	45
Tabela 5.3 - Média, desvio padrão e comparação dos grupos (E) e (ME) com relação à BMP-2 – TECIDO CONJUNTIVO.....	46
Tabela 5.4 - Média, desvio padrão e comparação dos grupos (E) e (ME) com relação à BMP-2 – INTERFACE	46
Tabela 5.5 - Média, desvio padrão e comparação dos grupos (E) e (ME) com relação à BMP-2 – LEITO	47
Gráfico 5.1 - Proporção de marcação no grupo (E) nos períodos experimentais	48
Gráfico 5.2 - Proporção de marcação no grupo (ME) nos períodos experimentais ..	48

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ROG	Regeneração Óssea Guiada
TGF-β	Fator de crescimento de transformação
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
BMPs	Proteínas ósseas morfogenéticas
BMP-2	Proteína óssea morfogenética 2
PTFE-e	Politetrafluoretileno expandido
E	Enxerto ósseo autógeno
ME	Enxerto ósseo autógeno recoberto por membrana de PTFE-e
BMP1 a 9	Proteínas ósseas morfogenéticas de 1 a 9
BMP	Proteína óssea morfogenética
BMP-4	Proteína óssea morfogenética 4
BMP-7	Proteína óssea morfogenética 7
PDGF-B	Fator de crescimento derivado de plaquetas B
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
TGF-β1	Fator de crescimento de transformação β 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
bFGF	Fator de crescimento básico derivado de fibroblastos
MMP- 1-3	Metaloproteinases 1 e 3 da matriz

CD-31	Marcador para células endoteliais
PDGF-A	Fator de crescimento derivado de plaquetas – A
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
rhBMP-2	Recombinante humano da BMP-2
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
RPM	Rotações por minuto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
BSA	Albumina de soro bovino
TRIS	Trihidroximetilamino metano
LSAB	Complexo estreptavidina - biotina
TBST	Solução salina tamponada Tris Tween- 20
ICC	Coeficiente de correlação intra-classe

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Imunolocalização do fator de crescimento BMP-2 na reparação de fraturas	23
2.2 Imunolocalização do fator de crescimento BMP-2 em distração osteogênica	25
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Técnica Imunoistoquímica	32
4.2 Método de análise do material	35
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

O enxerto ósseo autógeno foi confirmado como *gold standard* dos enxertos por fornecer células osteogênicas, matriz extracelular e sinais moleculares para indução de diferenciação óssea (KHOURI et al., 1996; SPRINGFIELD, 1992). Este tipo de enxerto associado à membrana, utilizado na técnica de Regeneração Óssea Guiada (ROG) tem mostrado resultados clínicos positivos e previsíveis (BUSER et al., 1990, 1993, 1995).

Com o surgimento de novas tecnologias de pesquisa, como a imunoistoquímica e a hibridização *in situ*, tornou-se possível estudar a osteogênese e a reparação óssea nos níveis da biologia celular e molecular.

Atualmente tem-se conhecimento de vários fatores de crescimento, TGF- β (fator de crescimento de transformação), FGF (fator de crescimento de fibroblastos), BMPs (proteínas ósseas morfogenéticas), entre outros, que participam do processo de desenvolvimento do tecido ósseo, bem como da neoformação óssea, por exemplo, após um procedimento cirúrgico tipo enxerto ósseo (MEHRARA et al., 1999; O'KANE; FERGUSON, 1997), ou após distração osteogênica (CHEUNG; ZHENG; MA, 2006; KNABE et al., 2005).

Sabe-se que a BMP-2, como membro da superfamília dos TGF- β tem importante participação na cascata de eventos celulares que regulam a formação, bem como a reparação óssea, induzindo células mesenquimais à proliferação, diferenciação e síntese de matriz extracelular (BAYLINK; FINKELMAN; MOHAN, 1993; BOLANDER, 1992; KINGSLEY, 1994). BMPs podem induzir células

indiferenciadas ao redor de vasos sangüíneos a se diferenciarem em osteoblastos e condrócitos e deste modo, regulam a formação óssea (SI et al., 1997).

Com o desenvolvimento de um modelo experimental em ratos para avaliação das fases mais precoces da reparação óssea, Jardini, De Marco e Lima (2005) demonstraram que o osso autógeno quando associado à membrana de PTFE-e, permite maior neoformação óssea do que o osso autógeno apenas. Estas diferenças significativas no processo de reparação foram observadas, precocemente, após 21 dias da cirurgia. Em complementação a este trabalho, De Marco, Jardini e Lima (2005) avaliaram a revascularização para as duas técnicas e observaram que este processo apresentou correlação com os resultados obtidos naquele trabalho. A revascularização ocorreu de maneira mais intensa e extensa no grupo que recebeu o enxerto ósseo autógeno apenas, quando comparado ao enxerto recoberto com membrana, em todos os períodos experimentais. Adicionalmente, no grupo das membranas os autores observaram que a revascularização ocorria a partir do leito apenas, enquanto, no grupo do enxerto, sem a proteção da membrana, esta ocorria a partir do leito e do tecido conjuntivo circunjacente. Assim, a revascularização esteve diretamente ligada a neoformação óssea ao redor do enxerto, bem como a substituição do enxerto por novo osso, ou mesmo à reabsorção do enxerto quando este estava sem a cobertura da membrana.

Seria importante para o melhor entendimento das técnicas reconstrutivas usadas na atualidade, assim como para o desenvolvimento de novas técnicas, o esclarecimento dos mecanismos celulares e moleculares associados aos eventos já conhecidos do processo de reparação, inclusive a seqüência, os períodos e os meios de expressão daqueles.

Estudos têm demonstrado a localização temporal e espacial da BMP-2 na reparação de fraturas (BOSTROM et al., 1995; ONISHI et al., 1998; RASUBALA et al., 2003; SI et al., 1997; SPECTOR et al., 2001) e no processo de distração osteogênica (CAMPISI et al., 2003; KNABE et al., 2005; RAUCH et al., 2000), porém, informações sobre o fator de crescimento BMP-2 na ROG ou no enxerto autógeno em bloco, ainda são escassas. Desta forma, seria interessante a realização de um estudo em que fosse possível avaliar a imunolocalização da BMP-2 no enxerto ósseo autógeno recoberto ou não por membrana de PTFE-e.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A literatura nos oferece informações para consagrar o enxerto ósseo autógeno devido às suas competências fundamentais: osteoindução e osteocondução, como o procedimento de eleição quando se idealiza a Regeneração Óssea Guiada (BURCHARDT, 1983; BUSER et al., 1990, 1993, 1995, 1996; SPRINGFIELD, 1992).

O surgimento da técnica da Regeneração Óssea Guiada (ROG) veio viabilizar a reconstrução óssea alveolar de maneira previsível e, por conseqüência, a possibilidade da colocação de implantes osseointegrados em uma posição mais adequada tanto funcional como estética (BUSER et al., 1990, 1993, 1995).

Dados da literatura relataram a importância do aporte sangüíneo quando se idealiza a neoformação óssea e a substituição do enxerto (NATHANSON, 1978; SCHIMD et al., 1997; SPRINGFIELD, 1992). O processo de integração é função do leito receptor e depende do íntimo contato com o tecido da área doadora, da seqüência de eventos e do equilíbrio dos processos que seguem: 1) proliferação de células osteoprogenitoras, 2) diferenciação em osteoblastos, 3) osteoindução, 4) osteocondução e 5) propriedades biomecânicas do enxerto (BURCHARDT, 1983).

Em se tratando da fase inicial dos processos de reparação e revascularização do enxerto, Jardini, De Marco e Lima (2005) e De Marco, Jardini e Lima (2005) realizaram um modelo experimental em ratos em que foi possível o aumento de rebordo mandibular por meio de enxerto ósseo autógeno (E) e enxerto ósseo autógeno recoberto por membrana de PTFE-e (ME). O Grupo (E) demonstrou perda óssea durante o período de reparação. No Grupo (ME) foi observado ganho de

tecido ósseo em quantidades significativas durante os períodos de observação. Houve uma mudança significativa no padrão de reparação entre os grupos após 21 dias, possivelmente devido à presença da membrana que contribuiu para a preservação do enxerto. A revascularização ocorreu em ambos os grupos ao final do experimento (21 dias), embora tenha ocorrido de forma mais intensa e extensa no grupo (E), em todos os períodos experimentais.

No momento em que está acontecendo a integração das estruturas, leito receptor e enxerto, há um estímulo para que células mesenquimais locais se diferenciem em osteoblastos. Este fato pode ocorrer pela presença de mediadores químicos liberados do enxerto ósseo necrosado que vai sendo substituído por novo osso. Estes mediadores químicos são chamados de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (SPRINGFIELD, 1992; URIST; McLEAN, 1952; URIST; STRATES, 1971).

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) podem ser subdivididas em até nove classes (BMP1-9). Com exceção da BMP-1, as BMPs 2 a 9 possuem seqüência de aminoácidos que as identifica como membros da superfamília dos TGF- β (KINGSLEY, 1994; WOZNEY et al., 1988). Mas entre todas elas, a BMP-2 apresenta um forte potencial de osteoindução.

As funções precisas e individuais que as BMPs exercem durante as formações, óssea e cartilaginosa, ainda não estão completamente esclarecidas (ONISHI et al., 1998), embora Urist et al. (1997), tenham descrito que BMPs são executoras da ativação ou repressão de genes ou grupos de genes relacionados aos desenvolvimentos, ósseo e cartilaginoso.

As BMPs controlam os estágios de pré-diferenciação do desenvolvimento. A fase de cito diferenciação determina o momento de diferenciação em condrócitos,

adipócitos, osteócitos e fibrócitos. Antes que a fase de cito diferenciação se complete, as células se agregam e proliferam em sítios de condensação. Neste momento os gradientes de concentração de BMP estão aumentados nestes sítios de condensação. Esta característica poderia justificar o termo proteína morfogenética (URIST, 1997). Em outras palavras, tanto no processo de reparação como na regeneração, estão envolvidos: quimiotaxia de células apropriadas, transformação de células mesenquimais indiferenciadas em células osteoprogenitoras, proliferação e diferenciação de células precursoras de osteoblastos, síntese de matriz extracelular, mineralização do osteóide, maturação e remodelação óssea (HOLLINGER; WONG, 1996; WONG; HOLLINGER; PINERO, 1996).

A localização temporal e espacial de fatores de crescimento são aspectos que merecem ser avaliados com grande atenção nos processos de formação ou neoformação óssea.

2.1 Imunolocalização do fator de crescimento BMP-2 na reparação de fraturas

Torna-se cada vez mais evidente o fato de que a reparação de fraturas envolve uma interação complexa de muitos fatores de regulação sistêmica e local (BOSTROM et al., 1995). O papel destes fatores tem sido descrito em níveis histológicos e ultra-estruturais, permitindo a compreensão da participação das BMPs na reparação de fraturas (BOSTROM et al., 1995; ONISHI et al., 1998; RASUBALA et al., 2003; SI et al., 1997; SPECTOR et al., 2001;).

Bostrom et al. (1995), Onishi et al. (1998), Rasubala et al. (2003) e Spector et al. (2001), utilizaram modelo experimental em ratos e realizaram reação imunoistoquímica para avaliar a localização espacial e temporal de BMP-2 e outros fatores de crescimento como BMP-4, BMP-7 e PDGF-B, enquanto que Si et al. (1997), realizaram hibridização *in situ*, utilizando mandíbulas de coelhos, para avaliar a expressão do RNAm de BMP-2 e TGF- β . Os resultados destes estudos foram bastante semelhantes em se tratando da localização da BMP-2 e das células onde se observou expressão dos fatores de crescimento.

Nos estágios iniciais após a fratura até o período de 3 dias, Bostrom et al. (1995), Onishi et al. (1998), Rasubala et al. (2003) observaram forte marcação positiva em células osteogênicas em proliferação, localizadas no periósteo, na área de ossificação intramembranosa próxima à linha de fratura.

No período entre 7 e 14 dias após realização de fraturas, foram observados muitos osteoblastos e células multinucleadas marcadas no trabeculado ósseo neoformado (osso imaturo) (BOSTROM et al., 1995; ONISHI et al., 1998). Estas mesmas células foram observadas na região do periósteo, adjacente à área de osteotomia e a marcação foi considerada intensa nas ilhas de deposição e remodelação óssea (SPECTOR et al., 2001). Rasubala et al. (2003), observaram osteoblastos com marcação positiva no osso imaturo e em áreas de ossificação endocondral. Bostrom et al. (1995), observaram em 14 dias, o osso imaturo apresentando sinais de remodelação, tornando-se lamelar e osteócitos positivos, e ainda, observaram que a partir deste período houve diminuição da intensidade de marcação.

Entre 21 e 28 dias, conforme foi ocorrendo a substituição de osso imaturo por osso lamelar, a intensidade de marcação diminuiu, desaparecendo quase que

completamente em 28 dias (ONISHI et al., 1998). Rasubala et al. (2003), observaram neste período que osteoblastos do osso trabecular ainda se apresentavam marcados para BMP-2. Ao final do experimento, Spector et al. (2001), assim como Onishi et al. (1998), também observaram diminuição da intensidade de marcação, com poucas células do periósteo positivas para BMP-2, e osteócitos que não se apresentaram marcados.

Si et al. (1997), realizaram um modelo experimental de reparação de fraturas em mandíbulas de coelhos, detectando-se a expressão do RNAm de BMP-2 e TGF- β 1 por hibridização *in situ*. A expressão do RNAm de BMP-2 foi mais intensa nos períodos iniciais após a fratura, entre o 5º e o 11º dia, sendo que no 28º dia os sinais para BMP-2 foram praticamente escassos. Os elevados níveis de RNAm de BMP-2 foram mostrados em células mesenquimais, osteoblastos e condroblastos em diferenciação, indicando formação óssea intramembranosa e condrogênese inicial; enquanto níveis mais elevados do RNAm de TGF- β 1 foram mostrados numa fase mais avançada do processo da reparação da fratura.

2.2 Imunolocalização do fator de crescimento BMP-2 em distração osteogênica

Estudos sobre a presença de BMPs em distração osteogênica têm sido desenvolvidos em diversos modelos experimentais (KNABE et al., 2005; RAUCH et al., 2000; SOJO et al., 2005). O interesse de se estudar estas proteínas neste tipo de reparação óssea se explica, basicamente, devido às propriedades osteoindutoras das BMPs.

A presença de marcação para BMP-2 foi evidente mesmo antes do início do processo de distração e foi localizada principalmente em células mesenquimais e pré-osteoblastos da região de periósteo (CAMPISI et al., 2003; RAUCH et al., 2000).

Nos primeiros dias de distração, marcação significativa foi observada no tecido conjuntivo vascularizado e moderada em osteoblastos (CAMPISI et al., 2003).

Aproximadamente 21 dias após o início da distração, áreas de ossificação intramembranosa e endocondral foram observadas entre os fragmentos da osteotomia, onde células semelhantes à fibroblastos e condrócitos apresentaram marcação intensa para a BMP-2, -4 e -7 (RAUCH et al., 2000). Campisi et al. (2003), observaram marcação em condrócitos na quarta semana de distração (30 dias).

Rauch et al. (2000), observaram elevados níveis de expressão de BMP-2, -4 e -7 que foram mantidos na fase de distração e diminuíram gradualmente até desaparecerem durante a fase de consolidação.

No primeiro dia de consolidação, marcação intensa para BMP-2 e -4 foi observada no periósteo e nas pontes de osso neoformado (CHEUNG; ZHENG; MA, 2006).

Na primeira semana de consolidação, após completa a distração, a expressão das BMP-2 e -4 foram observadas por Sojo et al. (2005), em condrócitos hipertróficos e células similares à osteoblastos próximas ao osso neoformado, sendo que em 14 dias a intensidade de marcação nestas células diminuiu. Os autores observaram também, neste período, marcação para VEGF em células endoteliais e em células similares a fibroblastos, que apresentaram a marcação tênue em 14 dias. Em 7 dias de consolidação, Cheung, Zheng e Ma (2006), observaram expressão das BMP-2 e -4 no periósteo, e no trabeculado ósseo neoformado, quando em 14 dias se observou diminuição da intensidade de marcação.

A expressão de fatores de crescimento foi observada após distração osteogênica mandibular em humanos, no estudo desenvolvido por Knabe et al. (2005). Biópsias do centro da área de distração foram realizadas 21 dias depois de completo o processo de distração. Os espécimes passaram por processamento histológico para realização de reação imunoistoquímica para PDGF, TGF- β , bFGF, BMP-2, -4, -7, MMP-1, -3, VEGF, CD-31 e colágeno tipo IV. Observou-se marcação positiva para BMP-2, -4 e -7, TGF- β , bFGF e PDGF nas células e nos componentes da matriz. A marcação para BMP-2 foi considerada intensa na matriz fibrosa, nos fibroblastos e moderada nos osteoblastos.

Outros modelos experimentais foram delineados para se estudar a presença, as características e a localização de determinados fatores de crescimento.

Lalani et al. (2003), avaliaram a localização espacial e temporal dos fatores TGF- β 1, BMP-2 e PDGF-A na reparação alvéolos após exodontia em coelhos. A região em questão foi avaliada em 48 horas, 4 dias e em 1, 2, 4, 8, 12 e 16 semanas para se analisar os eventos iniciais, intermediários e tardios da reparação. O material para análise foi congelado. Em seguida foram realizadas as reações imunoistoquímicas. Observou-se para BMP-2 maior intensidade de marcação entre 2 e 4 dias, entre 7 e 14 dias, seguido de aumento contínuo entre 1 e 2 meses e entre 2 e 3 meses; entre 3 e 4 meses houve decréscimo da intensidade de marcação. Para BMP-2, em 7 dias observou-se marcação em osteóide. Entre 14 dias e 1 mês, a marcação concentrou-se na periferia de espículas ósseas, seguindo este padrão até o final de 4 meses, quando passou a apresentar-se na periferia do novo osso. Marcação para BMP-2 na matriz extracelular foi observada em todos os períodos experimentais.

Recentemente, Alam et al. (2007), analisaram a expressão de BMP-2 e FGF-2 na regeneração óssea histologicamente e por imunistoquímica. O estudo foi realizado em 48 coelhos que foram divididos em 4 grupos, de acordo com o material a ser utilizado. Os diferentes grupos receberam: fosfato tricálcio- β , osso autógeno derivado do osso radio, recombinante humano BMP-2 (rhBMP-2). Não foi colocado nenhum material no grupo controle. Todos os grupos receberam os materiais implantados (enxertos *onlay*) na borda inferior da mandíbula. No grupo que recebeu osso autógeno, em 4 semanas, muitos osteoblastos tornaram-se ativos. Após 8 semanas reabsorção e neoformação óssea foram observadas na interface, área de integração entre o leito receptor e o enxerto. Após 12 semanas, remodelação e neoformação óssea foram observadas no enxerto. Neste mesmo grupo, após reação imunistoquímica, em 4 semanas observou-se maior número de células com marcação positiva nas áreas de neoformação óssea. E após 24 semanas se observou que continuava o processo de reabsorção e o número de células com marcação positiva foi diminuindo.

Em outro estudo recente, McCullough et al. (2007), avaliaram a distribuição e a intensidade de marcação das BMPs 2, 4, 6 e 7 por imunistoquímica em formação óssea induzida por implantes subcutâneos de células Saos-2 em 7 camundongos com acompanhamento de 14 dias. Estas células (Saos-2) são derivadas de um osteosarcoma e expressam, sintetizam e secretam fatores de crescimento. Sendo assim, podem induzir formação óssea endocondral. Após 14 dias, observou-se marcação mais intensa nos condrócitos, nas células osteoprogenitoras, como células do periósteo e células perivasculares e nos osteoblastos. Com estes resultados afirmou-se que os produtos celulares de Saos-2 promovem expressão de BMP por células osteoprogenitoras e isto leva à formação óssea; a expressão de BMP por

células do periósteo e células perivasculares indica que células osteoprogenitoras também podem expressar BMP; e ainda, a BMP liberada por osteoclastos pode promover a diferenciação de osteoblastos em sítios de remodelação óssea. Estes dados são importantes para o entendimento do papel das BMPs na reparação óssea de condições clínicas patológicas.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é:

- 3.1 Avaliar a imunolocalização do fator de crescimento BMP-2 em enxerto ósseo autógeno em bloco, recoberto ou não por membrana de PTFE-e, na fase inicial da reparação óssea, nos períodos de 0, 3, 7, 14, 21 e 45 dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este protocolo de pesquisa foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Nº 073/03) (Anexo A).

Foram selecionados 48 ratos machos da raça *wistar*, com peso aproximado de 250 a 300g originários do biotério do ICB – USP. Os animais foram divididos em dois grupos de estudo, um que recebeu enxerto ósseo autógeno recoberto por uma membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e)¹ (ME) e outro que recebeu apenas o enxerto ósseo autógeno (E).

O modelo experimental foi estabelecido e descrito anteriormente por Jardini, De Marco e Lima (2005) e De Marco, Jardini e Lima (2005). Resumidamente, o osso parietal serviu como área doadora de osso autógeno, enquanto a região do ângulo da mandíbula foi a área receptora. Para a remoção do enxerto ósseo, assim como para a realização das perfurações, utilizou-se um motor elétrico² que permitiu o controle da velocidade em 800 RPM e refrigeração com fluxo constante de soro fisiológico estéril. O enxerto ósseo e a área receptora receberam uma perfuração com broca carbide 1/2³, permitindo a passagem de um fio de sutura 5,0 poliéster verde trançado⁴. Este procedimento permitiu o posicionamento do enxerto em íntimo contato com a superfície óssea da mandíbula, assim como sua estabilização. No grupo (ME), o fio de sutura foi passado através da mandíbula, pelo bloco ósseo e

¹ WLGore' & Assoc., Flagstaff, AZ, USA

² Implant Inovation Incorporation, USA

³ Sorensen, São Paulo, Brasil

⁴ Ethicon, Johnson&Jonhnsen, S.J. dos Campos, Brasil

por uma membrana de 5,5mm de diâmetro⁵, de forma que esta recobriu e ultrapassou os bordos do enxerto.

A eutanásia dos animais de ambos os grupos foi realizada em 0 hora, 3, 7, 14, 21 e 45 dias. Para cada período experimental foram utilizados quatro animais por grupo. Os animais foram anestesiados, a mandíbula foi removida e a hemimandíbula, incluindo a área operada, foi fixada por formol tamponado a 10% por um período de no máximo 48 horas.

Cada espécime foi catalogado. Em seguida teve início o processo de descalcificação em EDTA a 10% - pH 7,8 com o auxílio do aparelho de microondas.

Para descalcificação, os frascos contendo os espécimes e o EDTA eram parcialmente imersos em gelo para que se mantivesse constante a temperatura em 33°C. Cada ciclo de descalcificação no aparelho de microondas foi de 15 minutos, com troca do gelo entre os ciclos. O EDTA foi trocado a cada quatro ciclos (1hora).

A descalcificação completa ocorreu, após 24 horas de realização do processo descrito acima.

4.1 Técnica Imunoistoquímica

Foram preparados, a partir do material emblocado em parafina, cortes 3 µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas pelo 3-

⁵ WLGore&Assoc EUA – GT-10

aminopropiltrietoxisilano⁶ a 10% em etanol absoluto. Substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) e soro fetal bovino em tampão tris (hidroximetilaminometano)-(Tris) foi utilizado como controle negativo. Osso de feto humano, costela e fêmur (12 semanas) foram utilizados como controle positivo.

Os cortes foram submetidos ao anticorpo anti: BMP-2⁷, policlonal, titulação 1:10.

As reações imunoistoquímicas foram realizadas seguindo o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, descrito a seguir:

- 1) Desparafinização dos cortes de 3µm de espessura em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos;
- 2) Reidratação em uma série de etanol em concentrações decrescentes (100%, 95%, 85%) durante 5 minutos cada;
- 3) Remoção de pigmentos formólicos por imersão em solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol 95%, durante 10 minutos;
- 4) Lavagem em água corrente por 10 minutos seguida de dois banhos em água destilada;
- 5) Recuperação dos sítios antigênicos para o anticorpo BMP-2: pepsina 0,5%; pH 1,8; 37°C; 30 minutos (estufa);
- 6) Lavagem em água corrente por 10 minutos seguida de dois banhos em água destilada;

⁶ Sigma, St. Louis, MO, USA

⁷ Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

- 7) Bloqueio da peroxidase endógena tecidual com imersão do material em solução de peróxido de hidrogênio a 6% em metanol na proporção 1:1, em dois banhos de 20 minutos cada;
- 8) Lavagem em água corrente por 10 minutos seguida de dois banhos em água destilada;
- 9) Dois banhos de solução tampão de TRIS 0,5M pH 7,4, por 5 minutos cada;

Após esse preparo realizado manualmente, as lâminas foram levadas à DAKO Autostainer Universal Staining System⁸, onde as reações foram concluídas mecanicamente. Nela foram efetuadas:

- A) Incubação dos anticorpos primários a 1%, sob temperatura controlada a 37°C;
- B) Incubação com o complexo terciário estreptavidina-biotina (Kit LSAB Peroxidase K0690⁹).
- C) Revelação da reação com DAKO Liquid DAB plus (cód. K3468)¹⁰;
- D) Contra-coloração com hematoxilina de Mayer.

Entre cada uma das reações realizadas automaticamente, os cortes foram lavados duas vezes em TBST.

Concluídas as reações, os cortes foram desidratados manualmente numa série de etanol em concentrações crescentes (80%, 95% e 3 vezes em álcool absoluto) por 5 minutos e diafanizados em xilol, seguindo para montagem em Permunt¹¹ e análise dos resultados em microscópio de luz.

⁸ DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA

⁹ DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA

¹⁰ DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA

¹¹ Fisher Scientific, New Jersey, NY, USA

4.2 Método de análise do material

Foram realizadas as análises: qualitativa e quantitativa.

Todas as lâminas foram examinadas em microscópio de luz, Axioskope 2 plus¹², com aumentos que variaram de 250 a 630 X para a coleta dos resultados descritivos. Para a contagem de células foram selecionadas as lâminas que apresentaram marcação intracitoplasmática, sem reação de fundo. As imagens foram capturadas com aumento de 400 X de áreas consecutivas das estruturas: bordo (B), enxerto (E), tecido conjuntivo superior ao enxerto (TC), interface (I) e leito (L) em cada lâmina (Figura 4.1).

Para capturar as imagens foram utilizados: microscópio Axioskope 2 plus acoplado a uma câmera digital¹³. Este sistema foi conectado a um computador e para mensuração utilizou-se o programa Axio Vision 3.0¹⁴.

A análise quantitativa foi realizada por um examinador calibrado que obteve no Coeficiente de correlação intraclasse (ICC), o valor 0,993 (0,989-0,996) para $p < 0,001$.

¹² Carl Zeiss - Germany

¹³ SV Micro – Sound Vision, USA

¹⁴ Carl Zeiss - Germany

FOTO 4.1

Figura 4.1 – Nesta lâmina corada em H.E., pode-se observar as estruturas bordo (B), enxerto (E), tecido conjuntivo superior ao enxerto (TC), interface (I) e leito (L). Aumento de 40X

5 RESULTADOS

Após as cirurgias não foi observada nenhuma complicação clínica e nenhum animal foi perdido no decorrer do experimento. Assim, 48 animais deram origem a 48 espécimes para processamento histológico. Muitos cortes foram perdidos por desprendimento do corte da lâmina, ou por reação de fundo que impedia a leitura adequada dos resultados. Assim, foi possível trabalhar com 20 espécimes dos 48 processados.

5.1 Análise Descritiva

Em 0 hora, para ambos os grupos (E) e (ME) observou-se descontinuidade e coágulo entre todas as estruturas analisadas. Não se observou qualquer marcação intracitoplasmática nesta fase experimental, para nenhum dos grupos analisados.

5.2 Imunolocalização de BMP-2 em enxerto ósseo autógeno em bloco (E)

Em 3 dias observou-se início de neoformação óssea na cortical interna do leito, região mais afastada do enxerto. Observou-se marcação em osteócitos e osteoblastos do leito. As demais estruturas estavam desprovidas de marcação. Em 7

dias, observou-se marcação em osteócitos e osteoblastos do leito, imunomarcação em células osteoprogenitoras localizadas na interface (Figura 5.1), no tecido conjuntivo superior ao enxerto (Figura 5.2) e nos bordos do enxerto, região onde se observa início de remodelação óssea (Figura 5.3). Quatorze dias após a cirurgia, células positivas foram observadas para o anticorpo BMP-2 nas regiões de bordo do enxerto (Figuras 5.4 e 5.5) e nas pontes de osso imaturo entre as estruturas do leito e do enxerto. Em 21 dias, quando a área de integração entre o enxerto e o leito, tornou-se evidente, células positivas foram observadas para o anticorpo BMP-2 no trabeculado ósseo imaturo (região de interface) (Figuras 5.6 e 5.7). Marcação celular intracitoplasmática foi observada nas regiões da cortical interna do leito, no leito e no interior do enxerto (Figura 5.8). Observou-se marcação em regiões próximas à perfuração, tanto no leito como na interface (Figura 5.9). Após 45 dias, as estruturas do leito e do enxerto apresentaram-se integradas. Marcação intracelular foi observada nesta região de integração, principalmente próxima às áreas de remodelação do enxerto, onde se observou penetração vascular e linhas de reversão, com reabsorção e neoformação óssea (Figura 5.10). Esta mesma marcação intracitoplasmática foi observada em células perivasculares localizadas na região de bordo do enxerto (Figura 5.11). Marcação também foi observada no leito, no enxerto e no tecido conjuntivo superior ao enxerto.

5.3 Imunolocalização de BMP-2 em enxerto ósseo autógeno em bloco recoberto por membrana de PTFE-e (ME)

Em 3 dias observou-se marcação intracitoplasmática na cortical interna do leito. Nesta região de remodelação óssea foi observada a deposição de osteóide em canais de reabsorção (Figura 5.12). Osteócitos e osteoblastos apresentaram-se positivos nesta região (Figuras 5.13, 5.14). Após 7 dias, observou-se marcação em osteócitos do leito e em células osteoprogenitoras localizadas no tecido conjuntivo jovem encontrado na interface. Células positivas para o anticorpo BMP-2 foram observadas nas regiões de bordo do enxerto (Figura 5.15) e no tecido conjuntivo superior ao enxerto (Figuras 5.16). Regiões estas, localizadas abaixo da membrana. Osteócitos recém aprisionados no interior do enxerto apresentaram-se positivos. Em 14 dias, marcação intracitoplasmática foi observada nas áreas de grande atividade osteoblástica, como a interface e os bordos do enxerto.

Vinte e um dias após o procedimento cirúrgico observou-se integração do enxerto ao leito e uma grande área de neoformação óssea no bordo do enxerto (Figura 5.17). Neste período observou-se uma intensa substituição da matriz óssea desestruturada por nova matriz sendo depositada, caracterizada pela remodelação óssea no enxerto propriamente dito. No interior do enxerto e nos bordos, regiões onde foi possível observar osteóide e linhas de reversão, observou-se marcação intracitoplasmática (Figuras 5.18 e 5.19). O tecido conjuntivo superior ao enxerto, mesmo próximo à membrana, apresentou marcação em células osteoprogenitoras (Figura 5.20). Células positivas para o anticorpo BMP-2 foram observadas no leito e na interface (Figura 5.21). Após 45 dias, quando as estruturas apresentaram-se

totalmente integradas e o enxerto bem remodelado, observou-se marcação no leito, no enxerto e na área de integração (interface), assim como nos bordos e no tecido conjuntivo superior ao enxerto.

5.4 Análise Quantitativa

Após reação imunoistoquímica com o anticorpo BMP-2, os grupos (E) e (ME) foram comparados realizando-se contagem de células marcadas nas diferentes regiões avaliadas (bordo, leito, enxerto, interface e tecido conjuntivo superior ao enxerto).

Na região do bordo, observou-se maior número de células marcadas após 7 dias no grupo (E) e em 14 dias no (ME) (Tabela 5.1 e Gráficos 5.1 e 5.2). No enxerto, houve maior número de células marcadas em 3 dias no (E) e em 21 dias no (ME), embora os valores da média tenham sido bastante semelhantes em todos os períodos experimentais (Tabela 5.2 e Gráficos 5.1 e 5.2). No tecido conjuntivo superior ao enxerto, observou-se maior número de células marcadas em 7 dias no (E) e em 21 dias no (ME) (Tabela 5.3 e Gráficos 5.1 e 5.2). Na interface, maior número de células marcadas ocorreu em 21 dias no (E) e em 7 dias no (ME) (Tabela 5.4 e Gráficos 5.1 e 5.2). E no leito, houve maior número de células marcadas em 3 dias para ambos os grupos (E) e (ME) (Tabela 5.5 e Gráficos 5.1 e 5.2). Nenhuma das estruturas analisadas apresentou maior número de células marcadas em 45 dias.

FIGURA 5.1

Figura 5.1 – Espécime do Grupo (E) – 7 dias. Fotomicrografia mostrando interface (I) com células osteoprogenitoras marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas). Enxerto (E). Aumento de 630X

Figura 5.2 – Espécime do Grupo (E) – 7 dias. Fotomicrografia mostrando tecido conjuntivo superior ao enxerto (TC). Presença de células osteoprogenitoras marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas). Enxerto (E). Aumento de 630X

Figura 5.3 – Espécime do Grupo (E) – 7 dias. Fotomicrografia mostrando no bordo do enxerto (E) a presença de célula osteoprogenitora positiva para o anticorpo BMP-2 (seta) ao lado de célula multinucleada – osteoclasto (OC). Aumento de 630X

Figura 5.4 – Espécime do Grupo (E) – 14 dias. Fotomicrografia mostrando o leito (L), o enxerto (E) e células osteoprogenitoras (OP) marcadas para o anticorpo BMP-2. Osso neoformado (ON). Aumento de 100X

Figura 5.5 – Espécime do Grupo (E) – 14 dias. Fotomicrografia mostrando células osteoprogenitoras positivas para o anticorpo BMP-2 na região de bordo do enxerto (setas). Aumento de 630X

Figura 5.6 – Espécime do Grupo (E) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando o leito (L), a interface (I) e o enxerto (E). Presença de células positivas para o anticorpo BMP-2 na interface (I) e na metade inferior do enxerto (E). Aumento de 25X

FIGURA 5.2

Figura 5.7 – Espécime do Grupo (E) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando células perivasculares marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas) na interface. Vaso sanguíneo (V). Aumento de 630X

Figura 5.8 – Espécime do Grupo (E) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando osteócitos marcados para o anticorpo BMP-2 (setas) no enxerto (E). Aumento de 400X

Figura 5.9 – Espécime do Grupo (E) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando osteócito (seta verde), osteoblasto (seta preta) e célula osteoprogenitora (seta vermelha) positivos para o anticorpo BMP-2 no leito (L) e na interface (I). Aumento de 400X

Figura 5.10 – Espécime do Grupo (E) – 45 dias. Fotomicrografia mostrando área de remodelação no enxerto (E) e células marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas) na interface (I). Aumento de 200X

Figura 5.11 – Espécime do Grupo (E) – 45 dias. Fotomicrografia mostrando a região de bordo do enxerto com células osteoprogenitoras perivasculares marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas). Enxerto (E). Vasos sanguíneos (V). Aumento de 400X

Figura 5.12 – Espécime do Grupo (ME) – 3 dias. Fotomicrografia mostrando deposição de osteóide (•) e linhas de reversão (setas pretas) no leito (L). Osteoblastos positivos para o anticorpo BMP-2 (setas vermelhas). Aumento de 200X

FIGURA – 13

Figura 5.13 – Espécime do Grupo (ME) – 3 dias. Fotomicrografia mostrando marcação intracitoplasmática em osteoblastos (setas) depositando osteóide (•). Aumento de 630X

Figura 5.14 – Espécime do Grupo (ME) – 3 dias. Fotomicrografia mostrando leito (L). Presença de osteócitos marcados para o anticorpo BMP-2 (setas). Aumento de 630X

Figura 5.15 – Espécime do Grupo (ME) – 7 dias. Fotomicrografia mostrando região de bordo do enxerto com osteoblastos marcados para o anticorpo BMP-2 (setas) e área de remodelação óssea (•). Aumento de 400X

Figura 5.16 – Espécime do Grupo (ME) – 7 dias. Fotomicrografia mostrando o tecido conjuntivo superior ao enxerto com células osteoprogenitoras marcadas para anticorpo BMP-2 (setas). Aumento de 400X

Figura 5.17 - Espécime do Grupo (ME) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando leito (L), interface (I), enxerto (E), tecido conjuntivo superior ao enxerto (TC). Osso neoformado (ON). Espaço ocupado pela membrana (M). Aumento de 25X

Figura 5.18 - Espécime do Grupo (ME) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando área de substituição do enxerto (E). Osteócitos recém aprisionados na nova matriz (setas pretas) e linha de reversão (seta vermelha). Aumento de 400X

FIGURA – 19

Figura 5.19 - Espécime do Grupo (ME) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando canais de reabsorção no interior do enxerto (E). Osteoblastos marcados para o anticorpo BMP-2 (setas). Aumento de 400X

Figura 5.20 - Espécime do Grupo (ME) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando o tecido conjuntivo superior ao enxerto (TC). Presença de células osteoprogenitoras marcadas para o anticorpo BMP-2 (setas). Vasos sanguíneos (V). Espaço ocupado pela membrana (M). Aumento de 400X

Figura 5.21 – Espécime do Grupo (ME) – 21 dias. Fotomicrografia mostrando células osteoprogenitoras positivas para o anticorpo BMP-2 (setas) na interface (I). Aumento de 630X

Tabela 5.1 - Média, desvio padrão e comparação dos grupos (E) e (ME) com relação à BMP-2 – BORDO

Período		E	ME
3 dias	N Média DP [†]	2 10,67 8,01	2 3,50 3,53
7 dias	N Média DP [†]	1 17,00 0	1 5,75 0
14 dias	N Média DP [†]	2 13,08 2,71	1 20,50 0
21 dias	N Média DP [†]	2 6,75 0,35	2 12,00 10,60
45 dias	N Média DP [†]	1 12,50 0	2 5,50 7,07

[†] DP = desvio padrão

Tabela 5.2 - Média, desvio padrão e comparação dos grupos (E) e (ME) com relação à BMP-2 – ENXERTO

Período		E	ME
3 dias	N Média DP [†]	2 3,70 5,23	2 0,89 0,86
7 dias	N Média DP [†]	1 1,00 0	1 0,00 0
14 dias	N Média DP [†]	2 2,08 2,94	1 0,00 0
21 dias	N Média DP [†]	2 2,87 4,06	2 0,98 1,16
45 dias	N Média DP [†]	1 2,62 0	2 0,91 0,82

[†] DP = desvio padrão

Tabela 5.3 - Média, desvio padrão e comparação dos grupos (E) e (ME) com relação à BMP-2 – TECIDO CONJUNTIVO SUPERIOR AO ENXERTO

Período		E	ME
3 dias	N Média DP [†]	2 6,05 5,16	2 1,30 1,83
7 dias	N Média DP [†]	1 11,14 -	1 11,25 -
14 dias	N Média DP [†]	2 7,16 0,47	1 8,46 -
21 dias	N Média DP [†]	2 5,12 1,43	2 14,1 7,18
45 dias	N Média DP [†]	1 8,37 -	2 6,57 9,29

[†] DP = desvio padrão

Tabela 5.4 - Média, desvio padrão e comparação dos grupos (E) e (ME) com relação à BMP-2 – INTERFACE

Período		E	ME
3 dias	N Média DP [†]	2 2,70 3,81	2 1,51 0,89
7 dias	N Média DP [†]	1 8,71 0	1 18,46 0
14 dias	N Média DP [†]	2 7,85 2,61	1 13,46 0
21 dias	N Média DP [†]	2 10,01 1,59	2 3,16 1,41
45 dias	N Média DP [†]	1 5,12 0	2 1,58 2,23

[†] DP = desvio padrão

Tabela 5.5 - Média, desvio padrão e comparação dos grupos (E) e (ME) com relação à BMP-2 – LEITO

Período		E	ME
3 dias	N Média DP[†]	2 15,47 10,10	2 2,28 3,23
7 dias	N Média DP[†]	1 7,42 -	1 1,30 -
14 dias	N Média DP[†]	2 7,52 0,38	1 1,58 -
21 dias	N Média DP[†]	2 11,66 1,88	2 1,78 2,52
45 dias	N Média DP[†]	1 1,75 -	2 0,83 1,17

[†] DP = desvio padrão

Gráfico 5.1 - Proporção de marcação no grupo (E) nos períodos experimentais

Gráfico 5.2 - Proporção de marcação no grupo (ME) nos períodos experimentais

6 DISCUSSÃO

O presente estudo define e caracteriza a presença, a localização e a cronologia da BMP-2 na reparação, quando realizada a ROG com enxerto autógeno *onlay* recoberto ou não por membrana de PTFE-e. A imunolocalização de BMP-2 foi avaliada nos grupos (E) e (ME) em diferentes períodos e em diversas estruturas. Em uma análise geral por estrutura, observou-se marcação em maiores proporções no bordo, na interface e no tecido conjuntivo superior ao enxerto, independente do grupo analisado. As menores proporções foram observadas no enxerto. No leito, as maiores proporções de marcação foram observadas no grupo (E). Diferenças quanto à marcação foram observadas com relação ao período e ao grupo, em se tratando da mesma estrutura.

Spector et al. (2001), relataram que, embora a maioria das marcações seja intracelular nas fases iniciais da reparação óssea, parece haver marcação moderada na matriz da área de neoformação óssea onde inicialmente foi criado um defeito ósseo estável em mandíbula de ratos. Este é um aspecto que gera controvérsias quanto à definição de imunomarcação e reação de fundo. Bostrom et al. (1995), não observaram marcação para BMP-2 ou BMP-4 na matriz em reparação de fratura em ratos. McCullough et al. (2007), relataram imunomarcação em células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos, condrócitos, osteoclastos e megacariócitos, mas não em matriz extracelular, após indução de formação óssea em camundongos. Ao passo que Lalani et al. (2003), avaliando a reparação de alvéolos após exodontia, observaram marcação para BMP-2 na periferia de espículas ósseas em 2 e 4 semanas e na matriz extracelular em todos os períodos

experimentais; assim como Knabe et al. (2005), que constataram marcação em osteoblastos, fibroblastos e em matriz após 21 dias de completo o processo de distração osteogênica em humanos. Embora Bostrom et al. (1995), não tenham observado marcação em matriz extracelular, consideraram este fato inesperado, uma vez que a maioria das BMPs é extraída da matriz óssea desmineralizada e atribuíram a ausência de marcação à inabilidade do anticorpo utilizado em reconhecer seus epítomos alvo. Considerando que a reação de fundo é uma marcação não específica, vários fatores podem ocasioná-la: resíduos de materiais plásticos no corte, altos níveis de peroxidase endógena, ligação não específica a imunoreagentes, presença de anticorpos de especificidade não desejada, difusão intracelular de antígenos, ligação complemento mediada por imunoglobulinas (DE LELLIS, 1981). Assim, neste estudo, a marcação em matriz extracelular não foi considerada, apenas a intracitoplasmática.

No leito o maior número de células marcadas foi observado em 3 dias nos grupos (E) e (ME). As diferenças observadas entre os grupos com relação às diversas estruturas analisadas sugerem maior atividade no grupo (E). Nesta fase, o periósteo está reagindo aos estímulos recebidos durante o ato cirúrgico e células mesenquimais indiferenciadas, ou mesmo pré-osteoblastos, estão em proliferação. Há presença de brotos vasculares na região mais superficial do leito que começam a se orientar em direção ao enxerto (DE MARCO; JARDINI; LIMA, 2005). Estudos da reparação de fraturas, como os de Bostrom et al. (1995), Onishi et al. (1998) e Rasubala et al. (2003), Si et al. (1997), relatam que nos estágios iniciais após a realização das fraturas, foi possível observar marcação citoplasmática em células osteogênicas em proliferação. Dentre os trabalhos sobre distração osteogênica, Campisi et al. (2003), Rauch et al. (2001), observaram expressão das BMPs 2, 4 e 7

logo após a cirurgia, mesmo antes de ter início o processo de distração. Estes dados estão em concordância e nos levam a constatar a presença de BMP-2 no início do processo de reparação óssea.

A região do bordo apresentou maior número de células marcadas em 7 dias no grupo (E) e em 14 dias no grupo (ME), onde se observou marcação em osteoblastos e células osteoprogenitoras em áreas de remodelação óssea e com quantidade considerável de osso neoformado. Após 14 dias, houve um ligeiro decréscimo na proporção de marcação para ambos os grupos, mas mesmo em 21 e 45 dias foi possível constatar células marcadas nesta área de intensa atividade osteogênica.

No tecido conjuntivo superior ao enxerto a maior proporção de marcação no grupo (E) ocorreu em 7 dias e no grupo (ME) em 21 dias, em células osteoprogenitoras. No entanto, analisando o intervalo de tempo entre 7 e 45 dias, observou-se um ligeiro decréscimo nas proporções de marcação, ainda encontrando ao final do experimento células marcadas para BMP-2.

Diversos autores relataram a expressão de BMP-2 em osteoblastos do osso imaturo (BOSTROM et al. 1995; RASUBALA et al. 2001), em células multinucleadas (pré-osteoclastos) (ONISHI et al. 1998; SPECTOR et al. 2001) e em osteóide (LALANI et al. 2003), na reparação óssea, referente ao período entre 7 e 28 dias; e deste modo, confirmam os achados deste estudo. Entretanto, ao contrário de Onishi et al. (1998), no presente estudo não foi observada marcação em osteoclastos. Onishi et al. (1998) sugeriram que as BMP-2 e -4 podem estar envolvidas na diferenciação e maturação de osteoclastos.

Nas regiões do bordo e na porção superior do enxerto no grupo (E), entre 7 e 14 dias, pode-se observar atividade de reabsorção, remodelação e início de

osteogênese. A marcação na região do bordo e no tecido conjuntivo superior ao enxerto no grupo (E) está intimamente relacionada ao fato de em 7 dias se observar um plexo vascular nos bordos do enxerto e a penetração dos vasos no mesmo, sendo que desta maneira células mesenquimais e osteoprogenitoras conseguem chegar ao local e atuar no processo de remodelação. Este mesmo evento só foi observado no grupo (ME) entre 14 e 21 dias. Assim, a substituição do enxerto acontece mais rapidamente no grupo (E) do que no (ME) (JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005) (DE MARCO; JARDINI; LIMA, 2005).

O referido processo de remodelação apresenta um ciclo com quatro fases: ativação, reabsorção, reversão e formação; podemos relacionar as maiores proporções de marcação observadas na região de bordo do enxerto e no tecido conjuntivo superior ao enxerto, com a transição entre as fases de reabsorção e reversão, quando pré-osteoclastos oriundos da rede vascular se ligam à matriz óssea, osteoclastos totalmente diferenciados secretam enzimas proteolíticas e osteoblastos se movimentam para dar início à etapa de formação. É durante a fase de reversão que uma seqüência de sinais é liberada das lacunas de reabsorção, para que ocorra o recrutamento de osteoblastos para esta área (BARON; VIGNERY; TRAN VAN, 1980; SARMA; FLANAGAN, 1996). Quando precursores dos osteoblastos se acumulam nos locais de reparação e começam a proliferar, aumenta-se a expressão de BMP que será responsável por diferenciações adicionais, formação e mineralização óssea. Todo o processo de formação óssea é uma cascata, na qual um estímulo inicial gera quimiotaxia e proliferação, seguida por diferenciação (LALANI et al. 2003).

Na interface o maior número de células marcadas ocorreu entre 7 e 21 dias, considerando os grupos (E) e (ME), quando células osteoprogenitoras

apresentaram-se positivas nas áreas de pontes de osso imaturo entre o leito e o enxerto. Em 21 dias, se observa que enxerto, leito e interface já estão integrados formando praticamente uma estrutura única (JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005). Neste período foram observados vasos neoformados penetrando e alcançando quase que toda a extensão do enxerto (DE MARCO; JARDINI; LIMA, 2005).

Embora na interface o período de maior proporção de marcação tenha ocorrido em 21 dias no grupo (E), ou seja, um período mais tardio do que o observado no grupo (ME), nas outras estruturas a maior proporção de marcação foi observada em períodos antecipados para o grupo (E). Assim, pode-se dizer que há uma imunomarcação um pouco mais tardia nas estruturas relacionadas para o grupo (ME). Esta diferença existente com relação à marcação predominante, o período em que ela se apresenta e a diferença ocorrida entre os grupos, provavelmente ocorreu porque a revascularização acontece de maneira mais intensa no grupo (E) (DE MARCO; JARDINI; LIMA, 2005).

Analisando estágios iniciais da reparação de fratura femoral, Onishi et al. (1998), relataram imunomarcação em osteoblastos e células multinucleadas para BMP-2, -4 e -7, entre 7 dias e 14 dias, nas áreas de trabeculado ósseo neoformado. Também entre 7 e 14 dias, Spector et al. (2001), observaram na reparação fraturas em mandíbulas de ratos, que osteoblastos e osteoclastos foram as células mais intensamente marcadas e a imunomarcação concentrou-se em células localizadas e alinhadas em ilhas de deposição e remodelação óssea. Estudos sobre a expressão da BMP-2 em distração osteogênica têm a observação comum de que entre 14 e 21 dias após a distração, nas áreas de ossificação intramembranosa, marcação pode ser observada em osteoblastos e em células semelhantes à fibroblastos. E nas

áreas de ossificação endocondral (ossos longos) condrócitos também se apresentam marcados (KNABE et al., 2005; RAUCH et al., 2000; SOJO et al., 2005).

Marcação para BMP-2 foi observada no enxerto com maior número de células contadas em 3 dias no grupo (E) e em 21 dias no grupo (ME), mas esta foi considerada de menor proporção quando comparada às marcações observadas nas outras estruturas, para os dois grupos. No grupo (ME) ocorre que o enxerto encontrar-se recoberto pela membrana, não entrando em contato com o tecido conjuntivo circunjacente, já que o diâmetro da membrana ultrapassa suas bordas proporcionando uma reparação por células e rede vascular neoformada oriundas do leito receptor. Portanto, a revascularização do enxerto no grupo (ME) ocorre a partir do leito receptor e assim, pode-se justificar a pouca intensidade de marcação pela BMP-2 por esta lenta revascularização e substituição do enxerto. (DE MARCO; JARDINI; LIMA, 2005; JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005).

Entre os períodos de 21 e 45 dias as estruturas, bordo, tecido conjuntivo superior ao enxerto, interface e leito demonstraram proporções consideráveis de marcação. Os resultados deste estudo sugerem que em 45 dias ainda há presença de células positivas para o anticorpo BMP-2. Estes dados estão em concordância aos resultados de Alam et al. (2007), no estudo em que avaliaram a regeneração óssea após a colocação de três diferentes tipos de enxerto ósseo. No grupo que recebeu osso autógeno, observou-se que no decorrer de quatro semanas houve neoformação óssea, mas o número de células com marcação positiva para BMP-2 foi diminuindo. Assim como demonstrado também por Si et al. (1997), Rauch et al. (2001), Spector et al. (2001). Nossos resultados concordam com um período de maior proporção de células marcadas pela BMP-2 que variou de 3 a 21 dias e redução nessas proporções nos períodos posteriores.

O grupo (ME) apresentou maiores proporções de marcação em períodos mais tardios da fase inicial do processo de reparação, para todas as estruturas quando comparado ao grupo (E), exceto para o leito, quando a maior proporção de marcação foi observada em três dias para ambos os grupos e para a interface, onde a maior proporção de marcação apresentou-se em 21 dias no grupo (E). Em linhas gerais, pode-se afirmar que as áreas em que se observou maior proporção de marcação são as localidades de atividade osteogênica mais intensa.

Todos estes acontecimentos estão intimamente relacionados ao processo de revascularização do enxerto descrito por De Marco, Jardini e Lima (2005), quando foi observado que a revascularização ocorreu de maneira mais intensa no grupo (E), embora tenha ocorrido também no grupo (ME), entretanto de forma mais lenta e com maior preservação das estruturas, maior ganho em termos de volume ósseo, como demonstrado por Jardini, De Marco e Lima (2005).

Ao analisarmos os gráficos 5.1 e 5.2, notamos um deslocamento da maior proporção de marcação da BMP-2 nas estruturas avaliadas para o período de 7 dias no grupo (E), sugerindo uma rápida revascularização e intensa atividade de remodelação desde períodos mais precoces. No entanto, o grupo (ME) mostra proporções maiores de marcação para a interface aos 7 dias, o bordo aos 14 dias e o tecido conjuntivo superior ao enxerto após 21 dias, sugerindo que a intensidade e a localização da atividade osteogênica acompanham o processo de revascularização originário do leito.

No que diz respeito à angiogênese, o estudo de Sojo et al. (2005), constatou que células marcadas para VEGF foram observadas entre 7 e 14 dias após distração osteogênica. A marcação foi observada inicialmente em células endoteliais e células similares à fibroblastos, mantendo-se nestas células e em condrócitos ao final dos

14 dias. Assim, pode-se estabelecer e afirmar a íntima relação existente entre o processo de neoformação óssea e a angiogênese. Os autores abordaram ainda, o fato das células endoteliais estimularem os osteoblastos pelo aumento da expressão da BMP-2 na área de fratura e sugerem que a angiogênese é um processo que ocorre anteriormente à osteogênese em se tratando de distração osteogênica e que em algumas regiões ambos os processos ocorrem simultaneamente. Estes dados corroboram nossos achados que estão de acordo com De Marco, Jardini e Lima (2005).

Bouletreau, Warren e Longaker (2002) discutiram a biologia molecular do processo de distração osteogênica e afirmaram que para que ocorra neoformação óssea, além da formação do osteóide, se faz necessária a revascularização. Após a osteotomia, com a ruptura vascular, ocorre a liberação de enzimas lisossômicas do osso necrótico e dos tecidos moles e ainda, vasoconstrição do periósteo e de artérias medulares resultando na formação de uma zona de hipóxia. Esta condição de hipóxia atua como um catalisador para a revascularização (GRUNDES; REIKERAS, 1992). A revascularização é um processo que requer sinalização integrada por meio de receptores expressados especificamente por células endoteliais de maneira ordenada e numa seqüência temporal (SCHNEIDER; HU; HELMS, 1999).

Neste estudo observou-se marcação para o anticorpo BMP-2 em células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos, localizados em áreas de osteogênese, próximos à vasos sanguíneos. McCullough et al. (2007), observaram marcação em condrócitos perivasculares e colocaram que fatores de difusão que são liberados pelas células perivasculares podem estar envolvidos na diferenciação e apoptose dos condrócitos adjacentes. Estes autores, assim como Onishi et al. (1998), Spector

et al. (2001), observaram marcação variável de intensa a moderada em osteoclastos. As BMPs presentes no citoplasma dos osteoclastos podem simplesmente ser resultado da fagocitose de BMP da matriz, entretanto existem suposições de que osteoclastos sejam sintetizadores de BMP. A expressão de BMPs por osteoclastos nos sítios de reabsorção durante a remodelação óssea constitui-se numa importante comunicação intercelular, que leva ao recrutamento e diferenciação de osteoblastos (ANDERSON; HODGES; AGUILERA, 2000). E a expressão de BMP-2 em células multinucleadas – semelhantes à osteoclastos, sugere que BMPs podem estar envolvidas com a diferenciação e maturação de osteoclastos (ONISHI et al. 1998).

Os eventos celulares responsáveis pela reparação são controlados e regulados por moléculas de sinalização específicas, fatores de crescimento e citocinas, algumas destas moléculas, como TGF- β 1 e BMP-2, são secretadas por células recrutadas para a reparação óssea e são liberadas mediante estímulos de injúria, detectados na superfície celular (JOYCE et al., 1991). BMP-2 é uma proteína solúvel que desempenha papel crítico na interação intercelular dentro dos tecidos esqueléticos, por mecanismos de regulação autócrina e parácrina (NEMETH; BOLANDER; MARTIN, 1988). Observando as características de marcação intracelular e a ausência de marcação extracelular pelas BMP-2 e -4, Bostrom et al. (1995), consideraram que o mecanismo de ação das BMPs na ossificação endocondral pode não ser parácrino, exceto nos osteoblastos alinhados sobre a camada de osso imaturo. Deste modo, os autores sugeriram que BMPs também podem atuar de modo autócrino. Assim, no presente estudo, a exemplo de Bostrom et al. (1995), a ausência de marcação extracelular sugere mecanismo de regulação

autócrino, exceto em osteoblastos alinhados formadores de osteóide observados nas áreas de neoformação e remodelação óssea.

No presente estudo, a marcação observada em osteócitos recém imersos na matriz, sugere que osteoblastos foram aprisionados enquanto ainda estavam sintetizando BMP-2. Ao passo que, os osteócitos marcados localizados no interior do enxerto, apresentam núcleos menores com cromatina mais densa.

Contudo, os dados observados, sugerem que nas estruturas onde se encontram as maiores proporções de marcação, são aquelas relacionadas à intensa revascularização e osteogênese, ou seja, há maior proporção de marcação para BMP-2 onde existe neoformação e remodelação óssea, e estas se correlacionam fortemente com o processo de revascularização. Assim, não se observa marcação para BMP-2 de modo generalizado na área operada, mas nas estruturas e nos períodos condizentes com os eventos histológicos de neoformação óssea.

7 CONCLUSÕES

- 7.1 A marcação intracitoplasmática da BMP-2 foi observada consistentemente em áreas de revascularização e osteogênese.
- 7.2 Células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos apresentaram marcação intracitoplasmática para BMP-2, independentemente do período ou da estrutura analisada.
- 7.3 As maiores proporções de marcação foram observadas no bordo, na interface, no tecido conjuntivo superior ao enxerto e no leito, enquanto, a menor proporção foi verificada no enxerto.
- 7.4 À exceção da interface, o grupo (ME) apresentou marcação mais tardia quando comparado ao grupo (E) para as estruturas bordo e tecido conjuntivo superior ao enxerto.
- 7.5 A atividade osteogênica avaliada através da marcação para BMP-2, inicia-se mais precocemente no grupo (E) e segue de modo mais desordenado, enquanto, no grupo (ME), esta inicia-se tardiamente, marcando estruturas que sugerem o acompanhamento da gradativa revascularização.

REFERÊNCIAS¹

Alam S, Ueki K, Marukawa K, Ohara T, Hase T, Takazakura D, et al. Expression of bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 during bone regeneration using different implant materials as an onlay bone graft in rabbit mandibles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:16-26.

Anderson HC, Hodges PT, Aguilera XM. Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage. *J Histochem Cytochem* 2000;48:1493-502.

Baron R, Vignery A, Tran Van P. The significance of lacunar erosion without osteoclasts: Studies on the reversal phase of the remodeling sequence. *Metab Bone Dis Relat Res* 1980;2S:35-40.

Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 1993;8:S565-72.

Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:165-70.

Bostrom MPG, Lane JM, Berberian WS, Missri AAE, Tomin E, Weiland A, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 1995;13:357-67.

Bouletreau PJ, Warren SM, Longaker, MT. The molecular biology of distraction osteogenesis. *J Craniomaxillofac Surg* 2002;30:1-11.

Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop* 1983;174:28-42.

Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res* 1990;1:22-32.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. I – Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1993;13:29-45.

Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II – Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1995;15:11-29.

Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1996;54:420-33.

Campisi P, Hamdy RC, Lauzier D, Amako M, Rauch F, Lessard M-L. Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2003;111:201-8.

Cheung LK, Zheng LW, Ma L. Effect of distraction rates on expression of bone morphogenetic proteins in rabbit mandibular distraction osteogenesis. *J Craniomaxillofac Surg* 2006;34:263-9.

DeLellis RA. *Diagnostic Immunohistochemistry*. Chicago: Masson;1981. p. 7-16.

De Marco AC, Jardini MAN, Lima LAPA. Revascularization of autogenous block grafts with or without an e-PTFE membrane. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:867-74.

Grundes O, Reikeras O. Blood flow and mechanical properties of healing bone. Femoral osteotomies studies in rats. *Acta Orthop Scand* 1992;63:487-91.

Hollinger J, Wong MEK. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:594-606.

Jardini MAN, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:666-73.

Joyce ME, Jingushi S, Scully SP, Bolander, ME. Role of growth factors in fracture healing. *Prog Clin Biol Res* 1991;365:391-416.

Khoury RK, Brown DM, Koudsi B, Deune EG, Gilula LA, Cooley BC, et al. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. *Plast Reconstr Surg* 1996;98:103-9.

Kingsley DM. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes* 1994;8:133-46.

Knabe C, Nicklin S, Yu Y, Walsh WR, Radlanski RJ, Marks C, et al. Growth factor expression following clinical mandibular distraction osteogenesis in humans and its comparison with existing animal studies. *J Craniomaxillofac Surg* 2005;330:361- 9.

Lalani Z, Wong M, Brey EM, Mikos AG, Duke PJ. Spatial and temporal localization of transforming growth factor- β 1, bone morphogenetic protein-2, and platelet-derived growth factor-A in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1061-72.

McCullough KA, Waits CA, Garimella R, Tague SE, Sipe JB, Anderson HC. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) 2, 4, 6, and 7 during induced heterotopic bone formation. *J Orthop Res* 2007;25:465-72.

Mehrara BJ, Rowe NM, Steinbrech DS, Dudziak ME, Saadeh PB, McCarthy JG, Gittes GK, Longaker MT. Rat mandibular distraction osteogenesis: II. Molecular analysis of transforming growth factor beta-1 and osteocalcin gene expression. *Plast Reconstr Surg* 1999;103:536-47.

Nathanson A. The early vascularization of an autogenous bone inlay into an artificial defect in the rabbit mandibula. *Acta Otolaryngol* 1978;85:135-48.

Nemeth GG, Bolander ME, Martin GR. Growth factors and their role in wound and fracture healing. *Prog Clin Biol Res* 1988;266:1-17.

O'kane S, Ferguson MWJ. Transforming growth factor β s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:63-78.

Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone* 1998;22:605-12.

Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Iijima T, Ohishi M. Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003;41:173-8.

Rauch F, Lauzier D, Croteau S, Travers R, Glorieux FH, Hamdy R. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 2000;26:611-17.

Sarma U, Flanagan AM. Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) induces substantial osteoclast generation and bone resorption in human marrow cultures. *Blood* 1996;88:2531-40.

Schimid J, Wallkamm B, Hämmerle CHF, Gogolewski S, Lang NP. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:244-8.

Schneider RA, Hu D, Helms JA. From head to toe: conservation of molecular signals regulating limb and craniofacial morphogenesis. *Cell Tissue Res* 1999; 296:103-9.

Si XH, Jin Y, Yang LJ, Tipoe GL, White FH. Expression of BMP-2 and TGF- β 1 mRNA during healing of the rabbit mandible. *Eur J Oral Sci* 1997;105:325-30.

Sojo K, Sawaki Y, Hattori H, Mizutani H, Ueda M. Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2, -4 (BMP-2, -4) on lengthened rat femurs. *J Craniomaxillofac Surg* 2005;33:238-45.

Spector JA, Luchs JS, Mehrara BJ, Greenwald JA, Smith LP, Longaker MT. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg* 2001;107:124-34.

Springfield DS. Autogenous bone grafts: nonvascular and vascular. *Orthopedics* 1992;15:1237-41.

Urist MR. Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development. *J Bone Miner Res* 1997;12:343-6.

Urist MR, McLean FC. Osteogenic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg* 1952;34-A:443-76.

Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. J Dent Res 1971;50:1392-406.

Urist MR, Raskin K, Goltz D, Merickel K. Endogenous bone morphogenetic protein: immunohistochemical localization in repair of a punch hole in the rabbit's ear. Plast Reconstr Surg 1997;99:1382-9.

Wong MEK, Hollinger JO, Pinero GJ. Integrated processes responsible for soft tissue healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1996;82:475-92.

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

Anexo A – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091-7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 073/03, sobre o projeto intitulado **“Imunolocalização dos fatores de crescimento FGF-2, TGF-beta1 e BMP2 e sua associação com a revascularização de enxerto ósseo autólogo em bloco recoberto ou não por membrana de PTFE-e”**, sob a responsabilidade de **Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de **22/09/2003**.

(We certify that the protocol nº 073/03, about **“FGF-2, TGF-beta1 and BMP2 growth factors immunolocalization and its association with autogenous bone block graft revascularization when covered or not with an e-PTFE membrane”** agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in **22/09/2003** meeting.)

São Paulo, 23 de setembro de 2003.

Prof. Dra. Sonia Malheiros L. Sanioto
Coordenadora da CEEA

Prof. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender
Secretária da CEEA