UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ANDERSON PAIM ROSA

INFLUÊNCIA DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO À PROTEÍNA
OSTEOINDUTORA rhBMP-2 NO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS EM CALVÁRIA DE
RATAS WISTAR

Ribeirão Preto

2013

ANDERSON PAIM ROSA

**INFLUÊNCIA DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO À PROTEÍNA
OSTEOINDUTORA rhBMP-2 NO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS EM CALVÁRIA DE
RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre no Programa de Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Reabilitação Oral- Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Selma Siessere

Ribeirão Preto
2013

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.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Rosa, Anderson Paim

Influência do laser em baixa intensidade associado à proteína osteoindutora rhBMP-2 no reparo de defeitos ósseos em calvária de ratas Wistar. Ribeirão Preto, 2013.

93 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Programa de Odontologia: Reabilitação Oral - Área de concentração: Biologia Oral.

Orientadora: Siessere, Selma.

1. Reparo ósseo. 2. Morfometria. 3. Laser em baixa intensidade. 4. Proteína morfogenética óssea do tipo 2.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Anderson Paim Rosa

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Reabilitação Oral - Biologia Oral

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta obra a todos coautores e a todas as pessoas envolvidas neste projeto, sem os quais não obteria o êxito.

Ao meu avô Nílo Paím pela referência de dedicação e pioneirismo na profissão.

Aos meus tios, cirurgiões-dentistas, pela dedicação à profissão.

À minha família, meus pais, sogros, irmãos, cunhados, sobrinhas, à minha esposa Marina e minha filha Laura.

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Selma Siessere, minha orientadora, pela assistência, paciência e generosidade com que me orientou durante todo esse período.

Ao meu amigo e colega Dr. Edmilson Bersani, por ser responsável e grande incentivador, tanto neste projeto, bem como na profissão, interferindo diretamente por toda minha evolução pessoal e profissional.

Às Profas. Dras. Marisa Semprini e Simone Cecílio Hallak Regalo pela atenção, sugestões e ajuda.

Aos Especialistas de Laboratório, Luiz Gustavo de Sousa e Paulo Batista de Vasconcelos, e ao Técnico de Laboratório, Dimitrius Leonardo Pitol, pela disponibilidade e pelo apoio irrestrito para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus sogros, José e Alice e toda sua família, por todo apoio recebido.

À minha irmã Fabiana, pela ajuda e estímulo na fase pré-exame.

Aos meus pais, Dalva Lúcia e Homero Antonio, pelo apoio, incentivo e formação pessoal.

À minha esposa Marina, pelo suporte, paciência e incentivo, principalmente nas horas não muito agradáveis e difíceis que passamos, estando sempre ao meu lado, concedendo apoio moral e emocional durante minha vida.

E finalmente, agradeço à minha filha Laura, pelo amor incondicional, mesmo me ausentando e abdicando de passar alguns momentos altamente prazerosos ao seu lado, se manteve sempre com seu sorriso e abraço apertado.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo seu Diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros pela oportunidade de desenvolvimento profissional.

À Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela atenção e apoio.

Ao Chefe do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica, Prof. Dr. José Moacir Marín, pela oportunidade concedida para conclusão deste trabalho.

Aos Professores do Curso de Mestrado, pelos ensinamentos e bons exemplos que enriqueceram a minha formação.

Às funcionárias da seção de Pós-Graduação, Isabel Cristina Galino Sola, Regiane Cristina Moí Sacílloto, Mary Possani Carmessano, pela cordialidade e atenção sempre concedida.

Às Secretárias da Pós- Graduação do Programa de Reabilitação Oral, Regiane de Cássia Tírado Damasceno e Fernanda Talita de Freitas, pela dedicação, presença constante e disponibilidade.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Clélia Aparecida Celino e Adalberto Toneto, pela atenção dispensada.

Aos Amigos e Colegas do Curso de Mestrado, pela colaboração e convivência durante essa nossa trajetória.

Agradeço a todos que de certa forma contribuíram para essa conquista.

Resumo

ROSA, A. P. Influência do laser em baixa intensidade associado à proteína osteoindutora rhBMP-2 no reparo de defeitos ósseos em calvária de ratas Wistar. Ribeirão Preto, 2013. 93p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral - Biologia Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A irradiação com laser em baixa intensidade (LLLI) e a proteína morfogenética óssea recombinante humana do tipo 2 (rhBMP-2) tem sido utilizadas para estimular a formação óssea. A LLLI estimula a proliferação de células precursoras de osteoblastos e a diferenciação celular e a rhBMP-2 recruta células osteoprogenitoras para a área de cicatrização óssea. Este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da LLLI e da rhBMP-2 sobre o processo de cicatrização óssea em calvária de ratas Wistar. Foram utilizados 42 animais e foram criados defeitos ósseos críticos nos ossos parietais. Os animais foram divididos em seis grupos de tratamento com 7 animais cada: Grupo 1- aplicação única de laser; Grupo 2 – 7 µg de rhBMP-2 pura; Grupo 3 – aplicação única de laser e 7 µg de rhBMP-2 pura; Grupo 4 – 7 µg de rhBMP-2 associada ao gel de monoleína; Grupo 5 – aplicação única de laser e 7 µg de rhBMP-2 associada ao gel de monoleína e Grupo 6 - defeito ósseo crítico sem qualquer tipo de tratamento (grupo controle). Foi utilizado o laser diodo de arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl, comprimento de onda de 780 nm, potência 60mW, área do feixe de 0,04 cm², tempo de irradiação de 80 segundos, densidade de energia de 120 J/cm², irradiância de 1,5 W/cm²). Após 15 dias as calvárias foram removidas para análise histomorfométrica. Após análise estatística, verificou-se que o Grupo 3 apresentou a maior quantidade de osso neoformado (37,89%) quando comparado aos outros grupos ($p<0,05$). As quantidades de osso neoformado nos defeitos ósseos dos Grupos 1 e 4 não foram estatisticamente significantes (24,00% e 24,75%, respectivamente), mas foram significantes quando comparadas aos valores dos outros Grupos ($p<0,05$). As quantidades de osso neoformado nos defeitos ósseos dos Grupos 2 e 5 não foram estatisticamente significantes (31,42% e 31,96%, respectivamente), mas foram significantes quando comparadas aos valores dos outros Grupos ($p<0,05$). O Grupo 6 apresentou neoformação óssea (14,10%) e esta foi estatisticamente significativa quando comparada aos valores dos outros Grupos ($p<0,05$). Pode-se concluir que a LLLI administrada durante a cirurgia efetivamente acelerou a cicatrização de defeitos ósseos críticos preenchidos com rhBMP-2 pura, conseguindo melhores resultados quando comparadas com a aplicação isolada da LLLI ou da rhBMP-2.

Palavras-chave: reparo ósseo, morfometria, irradiação com laser em baixa intensidade, proteína óssea morfogenética do tipo 2 (rhBMP-2)

Abstract

ROSA, A. P. Influence of the combination of low-level laser irradiation and rhBMP-2 osteoinductive protein in the repair of bone defects in calvaria's Wistar rats. Ribeirão Preto, 2013. 93p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral - Biologia Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Low-level laser irradiation (LLLI) and recombinant human bone morphogenetic protein type 2 (rhBMP-2) have been used to stimulate bone formation. LLLI stimulates proliferation of osteoblast precursor cells and cell differentiation and rhBMP-2 recruits osteoprogenitor cells to the bone healing area. This in study evaluated the effects of LLLI and rhBMP-2 on the bone healing process in calvaria of female Wistar rats. Critical bone defects were created in the parietal bone in 42 animals, and the animals were divided into six treatment groups with 7 animals: Group 1 – laser in a single application; Group 2 – 7 µg of pure rhBMP-2; Group 3 – laser in a single application and 7 µg of pure rhBMP-2; Group 4 - 7 µg of rhBMP-2 combined with monoolein gel, Group 5 – laser in a single application and 7 µg of rhBMP-2 combined with monoolein gel; and Group 6 - critical bone defect controls. A gallium-aluminum-arsenide diode laser was used (GaAlAs; wavelength 780 nm, output power 60mW, beam area 0.04 cm², irradiation time 80 s, energy density 120 J/cm², irradiance 1.5 W/cm²). After 15 days, the calvarial tissues were removed for histomorphometric analysis. Group 3 defects showed higher amounts of newly formed bone (37.89%) than the defects of all the other Groups ($p<0.05$). The amounts of new bone in defects of Groups 1 and 4 were not significantly different from each other (24.00% and 24.75%, respectively), but were significantly different from the amounts in the other Groups ($p<0.05$). The amounts of new bone in the defects of Groups 2 and 5 were not significantly different from each other (31.42% and 31.96%, respectively), but were significantly different from the amounts in the other Groups ($p<0.05$). Group 6 defects had 14.10% new bone formation, and this was significantly different from the amounts in the other Groups ($p<0.05$). It can be concluded that LLLI administered during surgery effectively accelerated healing of critical bone defects filled with pure rhBMP-2, achieving a better result than LLLI alone or the use of rhBMP-2 alone.

Keywords: Bone repair, morphometry, low-level laser irradiation, human bone morphogenetic protein type 2 (rhBMP-2)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Laser em baixa intensidade.....	25
2.2 Proteína Morfogenética Óssea do tipo 2 (BMP-2)	28
2.3 Carreadores - Monoleína	36
2.4 Reparo Ósseo	37
3. PROPOSIÇÃO	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. Material.....	47
4.2. Métodos	47
4.2.1. Obtenção da formulação	47
4.2.2. Obtenção dos animais.....	48
4.2.3. Realização dos defeitos ósseos críticos e dos tratamentos associados	48
4.2.4. Obtenção das peças para análise.....	54
4.2.4.1. Sacrifício dos animais.....	54
4.2.4.2. Processamento de peças histológicas	54
4.2.4.3. Análise qualitativa ao microscópio de luz.....	55
4.2.4.4. Análise quantitativa	55
4.2.4.5. Análise estatística	57
5. RESULTADOS	61
5.1. Análise histológica ao microscópio de luz (qualitativa).....	61
5.2. Análise quantitativa	67
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES.....	77
8. REFERÊNCIAS	81
ANEXO.....	93

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O reparo dos defeitos ósseos tem atraído o interesse de pesquisadores de vários campos da saúde, dentre eles o da Odontologia, com o intuito de desenvolver novas estratégias que levem a formação óssea frente a doenças que acarretem a sua perda.

A literatura revela que a deposição óssea tem sido conseguida por meio de aplicação de estímulos químicos, biomateriais, proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) bem como o uso de estímulo físico, tais como ultrassom, campos eletromagnéticos e mais recentemente a irradiação com laser em baixa intensidade (LLLI).

A proteína óssea morfogenética é uma substância que ocorre naturalmente, é derivada do osso e induz a neoformação óssea quando implantada em sítios ósseos ou extra-ósseos (Fiorellini; Nevins, 1996). Sommernan et al. (1983) afirmam que são glicoproteínas responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação óssea. É única entre os fatores de crescimento, uma vez que é fator de diferenciação, induzindo a diferenciação primitiva de células tronco não comprometidas em tipos celulares mais específicos, as quais participam da formação óssea (Fiorellini; Nevins, 1996), sendo considerada a responsável pela habilidade osteoindutiva em defeitos ósseos (Bowers; Reddi, 1991). Segundo Hogan (1996) as BMPs que têm demonstrado importância fundamental na osteogênese são as do tipo 2, 4 e 7, porém a literatura mostra que a BMP com maior capacidade osteoindutora é a do tipo 2 (Wozney, 1992).

A utilização da proteína morfogenética óssea recombinante humana do tipo 2 (rhBMP-2) *in vivo*, em situações clínicas diversas na Odontologia, tais como, cirurgias reconstrutivas, aumento de rebordo, defeitos ósseos provocados por processos patológicos, procedimentos para aumento de seio, têm demonstrado o potencial osteoindutor desta proteína (Marden et al., 1994; Boyne, 1995), o que demonstra que a mesma pode ser uma alternativa aos enxertos ósseos autógenos e alógenos. A coleta de tecido ósseo para enxertos autógenos, seja de sítios doadores da

cavidade da boca ou extraorais, adicionam ao paciente morbidade e despesas, devido a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico. Porém, para otimizar a osteoindução, as BMPs devem estar associadas a uma substância carreadora apropriada, que possua efeito sobre a sua farmacocinética (Lindholm; Gao, 1993) já que as mesmas se difundem rapidamente quando depositadas em soluções, sendo ineficazes quando altas doses de rhBMP-2 são aplicadas diretamente sobre os tecidos (Fujimura et al., 1995). As substâncias carreadoras devem apresentar algumas características tais como: apresentarem relativa solubilidade em condições fisiológicas e proteção contra atividade proteolítica; serem biodegradáveis, substrato para adesão celular e proliferação, imunologicamente inertes, estáveis mecanicamente no defeito ósseo e facilmente manufaturadas; liberarem as BMPs lentamente (Aldinger et al., 1991) para que as proteínas osteoindutoras tenham o efeito clínico desejado.

Outro procedimento que vem sendo bastante utilizado na Odontologia é a LLLI. Quando se utiliza o laser de baixa intensidade, este apresenta influência no comportamento celular e utiliza baixas irradiâncias de luz, com efeitos fotofísicos, fotobioquímicos e fotobiológicos nos tecidos (Karu, 1987). A LLLI tem sido aplicada como coadjuvante em quase todos os procedimentos clínicos, onde os efeitos antiinflamatório, analgésico e de biomodulação tecidual são desejados (Eduardo, 2010). No tecido ósseo, o laser atua sobre a proliferação dos osteoblastos e na produção de matriz óssea (Dörtbudak et al., 2000), porém os efeitos da LLLI não são mensuráveis e evidentes, podendo ocorrer somente horas ou dias após sua aplicação, constituindo uma terapia ainda controversa e não totalmente elucidada, demandando a realização de novas pesquisas (Eduardo, 2010).

Desta forma, este trabalho se propôs a avaliar a associação de dois métodos capazes de induzir a osteogênese: o uso da rhBMP-2, associada ou não a um agente carreador, e do laser em baixa intensidade em ratas com defeitos ósseos críticos, a fim de verificar a eficácia clínica dos tratamentos propostos.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Laser em baixa intensidade

A palavra laser é um acrônimo com origem na língua inglesa que significa *Light amplification by stimulated emission of radiation* – cuja tradução é amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. De início, os lasers eram classificados de acordo com o tipo de aparelho disponível no mercado, mas atualmente a classificação se baseia na interação do laser com o tecido a ser atingido. A célula tem limiar de sobrevivência que depende do tipo de tecido onde se situa e de seu estado fisiológico. Quando se trabalha com o laser que respeita o limiar da célula, oferecendo à mesma, baixa intensidade de energia, o laser opera em baixa densidade de potência. Daí a utilização dos termos laser de baixa potência ou laser em baixa intensidade de energia. Apesar da intensidade de energia ser baixa, para que o laser tenha efeito biomodulador, é necessário que esta seja suficientemente alta para que a célula alvo a utilize de maneira a estimular sua membrana ou suas organelas (Almeida Lopes, 2013).

Os primeiros sistemas de laser de baixa potência tinham como meio ativo a mistura gasosa de gás hélio e neônio (laser de HeNe) que emitiam na região do vermelho (632,8 nm), mas que apresentavam também outra linha de emissão no verde. Atualmente os sistemas laser de baixa potência são, na sua grande maioria, constituídos de cristal crescido em laboratório de diodo semicondutor de arseneto de gálio (GaAs) podendo estar dopado por diversos outros elementos, dependendo do comprimento de onda desejado (por exemplo: In-índio dopa o cristal para emitir no comprimento de onda vermelho) (Lizarelli, 2005).

Vários estudos *in vivo* em diferentes modelos experimentais têm demonstrado o efeito biomodulador do laser em baixa intensidade no tecido ósseo.

Silva Junior et al. (2002) avaliaram morfometricamente a quantidade de osso neoformado em feridas do fêmur de ratos após a irradiação com laser de AsGaAl. Estes pesquisadores verificaram que, animais que foram irradiados com $4,8 \text{ J/cm}^2$ (Joules/centímetro quadrado) por três sessões e que foram observados por sete dias, apresentaram maior quantidade de osso mineralizado que os respectivos controles (não irradiados), sendo esta diferença significativa.

Nicola et al. (2003) estudaram a atividade dos osteoblastos em defeitos ósseos em fêmur de ratos que foram irradiados com laser de AsGaAl com comprimento de onda de 660 nm (nanômetros) e densidade de energia de 10 J/cm^2 no segundo, quarto, sexto e oitavo dias após a cirurgia. Verificaram que as células dos animais irradiados apresentaram maior atividade quando comparadas ao grupo controle (não irradiado).

Khadra et al. (2004) avaliaram o efeito do AsGaAl com comprimento de onda de 830 nm, potência de 75 mW (miliwatts) e densidade de energia de 23 J/cm^2 aplicado imediatamente e seis dias consecutivos após a criação de defeitos ósseos em calvária de ratos. Estes pesquisadores constataram que os animais tratados com laser apresentavam maiores níveis de cálcio, fósforo e proteínas. Além disso, a análise histológica demonstrou além da angiogênese mais pronunciada, maior formação de tecido conjuntivo e maior formação de tecido ósseo.

Merli et al. (2005) também avaliaram o efeito do laser de AsGaAl, com comprimento de onda de 670 nm, 15 mW de potência e densidade de energia de 3 J/cm^2 no reparo de defeitos ósseos em fêmur de camundongos. Os autores verificaram, após análise histomorfométrica, que o laser promoveu maior quantidade de osso neoformado quando comparado ao grupo não irradiado.

Lirani-Galvão et al. (2006) compararam o efeito do laser de AsGaAl, com comprimento de onda de 780 nm, 30 mW de potência e densidade de energia de $112,5 \text{ J/cm}^2$ e

do ultrassom pulsado de baixa intensidade (1,5 MHz, 30 mW/cm²), ambos por doze sessões (cinco vezes por semana) no reparo de defeitos ósseos em tíbias de ratos Wistar. Esses autores verificaram que o ultrassom acelerou o reparo ósseo promovendo reabsorção óssea na área do defeito e que o laser acelerou o processo de reparo por meio da formação óssea.

Pretel et al. (2007) pesquisaram o efeito de uma única aplicação de laser (AsGaAl; 780 nm; 35 mW; 178 J/cm²) em defeitos ósseos em mandíbulas de ratos. Estes pesquisadores verificaram que o uso da LLLI diretamente ao tecido injuriado mostrou efeito bioestimulador na remodelação óssea, pelo estímulo da modulação da resposta inflamatória inicial e levando a antecipação da condição de normalidade. A aplicação única da LLLI no tecido lesado foi efetiva na aceleração do reparo ósseo quando comparado às feridas que não receberam a aplicação de laser.

AboElsaad et al. (2009) investigaram a influência do laser de AsGaAl de comprimento de onda de 830 nm, potência de 40 mW e densidade de energia de 4 J/cm² na cicatrização de defeitos ósseos em mandíbulas de ratos tratados com enxerto de biovidro. Os autores verificaram que os animais que receberam o laser e o biovidro tiveram aceleração da cicatrização óssea após quatro e oito semanas quando comparados aos animais que receberam somente o biovidro.

Em 2010, Nascimento et al. analisaram ratos com defeitos ósseos submetidos ao laser associado a calcitonina (extraída do salmão), submetidos somente a calcitonina e submetidos somente ao laser. O laser utilizado foi o AsGaAl (10 mW, 20 J/cm², 830 nm). Concluíram que o grupo tratado apenas com laser e o grupo tratado com laser e calcitonina tiveram melhores resultados de densidade óssea quando comparados aos grupos controle e ao que recebeu apenas calcitonina, mostrando assim que o laser tem alta influência no reparo ósseo.

Em 2012, Omasa et al. investigaram o efeito estimulatório do laser de AsGaAl (830 nm, 200 mW, 195 J/cm², 135 segundos) uma vez por dia, durante sete dias, na estabilidade de

mini-implantes em tíbias de ratos. As quantidades de tecido ósseo foram medidas no terceiro, quinto e sétimo dias e foi analisada a expressão do gene da BMP-2. Os autores verificaram que a aplicação de laser aumentou a estabilidade dos mini-implantes, como também, aumentou a formação óssea peri-implantar por meio do aumento da expressão da BMP-2 nas células circundantes.

Fernandes et al. (2013) avaliaram os efeitos da aplicação do laser de AsGaAl (830 nm, 30 mW, 94 segundos, $100 \square \square \text{J/cm}^2$) nas modificações histológicas e expressões gênicas durante as fases iniciais da cicatrização óssea em defeitos não críticos em tíbia de ratos. Verificaram que o laser modulou o processo de reação inflamatória e acelerou o reparo ósseo, e esta aceleração do reparo ósseo foi devido a maior expressão dos genes Runx-2, da fosfatase alcalina e osteocalcina, quando comparado aos animais não irradiados.

2.2 Proteína Morfogenética Óssea do tipo 2 (BMP-2)

Em 1965, Marshall Urist descobriu que a matriz óssea descalcificada implantada em sítios não ósseos induziu a formação de tecido ósseo e cartilaginoso, processo denominado autoindução. Demonstrou que extratos de proteínas poderiam ser separados de ossos descalcificados e eram responsáveis por esta nova formação óssea. Mais tarde ele nomeou estas proteínas responsáveis pela formação de osso de BMPs (proteína morfogenética óssea).

Mais de vinte BMPs já foram identificadas, e dentre estas, sete são capazes de iniciar o crescimento ósseo (Abe, 2006; El-Amin et al., 2010).

Embora a BMP tenha a habilidade de induzir a neoformação óssea, é difícil de ser obtida pelo processo de purificação porque está presente no osso em quantidades muito pequenas (Fiorellini; Nevins, 1996). Utilizando um processo de clonagem e recombinação Wozney et al. (1988) sintetizaram a partir de células de mamíferos com DNA modificado a

proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP). Recentes técnicas em biologia molecular permitem a produção de grandes quantidades de proteínas humanas, tais como as BMPs. Atualmente, a produção de rhBMPs é realizada a partir de *Escherichia coli* e a rhBMP-2 tem sido amplamente utilizada para melhorar a regeneração óssea (Fiorellini; Nevins, 1996).

Os estudos clínicos envolvendo cirurgias orais e maxilofaciais e que utilizam BMPs são bastante limitados (Lo et al., 2012).

Os primeiros estudos foram conduzidos por Boyne et al. (1997) em um grupo em doze pacientes que realizaram implantes de seio maxilar. Estes pacientes receberam rhBMP-2 em uma esponja de colágeno absorvível, em que a dose total administrada de rhBMP-2 variava de 1,77 a 3,40 miligramas (mg) por paciente. Estes pesquisadores verificaram crescimento ósseo significativo em todos os pacientes avaliados. Exames tomográficos computadorizados revelaram que o aumento da altura do seio maxilar foi em média 8,51 milímetros tendo como base o seu assoalho.

Cochran et al. (2000) avaliaram o uso de rhBMP-2 em esponja de colágeno absorvível em alvéolos de doze pacientes que necessitavam aumento de rebordo alveolar. Estes foram acompanhados por até três anos. Durante o período do estudo não ocorreram efeitos adversos graves. As biópsias ósseas humanas foram utilizados para confirmar a formação de osso nas áreas tratadas com rhBMP-2. Todos os implantes protéticos colocados nessas áreas estavam clinicamente estáveis e todos os locais foram restaurados funcionalmente.

Triplett et al. (2009) fizeram estudo sobre a segurança e eficácia da rhBMP-2 em esponja de colágeno absorvível. Nesse estudo, um total de cento e sessenta pacientes com indicação para levantamento de seio maxilar foram aleatoriamente divididos em dois grupos: grupo controle (autoenxerto) e grupo de tratamento com rhBMP-2 (1,5 mg/ml). Os resultados foram medidos com base na altura e densidade óssea utilizando tomografia computadorizada no período de estudo de cinco anos. Os dados demonstram a eficácia e segurança de rhBMP-2

em comparação com autoenxerto para levantamento do assoalho do seio maxilar. Não foram encontrados efeitos adversos relacionados com o tratamento com rhBMP-2 e não houve diferença estatisticamente significativa nos resultados entre os dois grupos. Os autores concluíram que ambos os grupos se comportaram de maneira similar.

Se os estudos clínicos utilizando rhBMPs em humanos são limitados, o mesmo não acontece em animais, onde diferentes modelos experimentais tem sido utilizados a fim de demonstrar o potencial dessas proteínas no reparo e na regeneração óssea. Um dos animais bastante utilizado como modelo experimental é o rato.

Marden et al. (1994), estudaram em defeitos ósseos críticos de 8 milímetros feitos em calvária de ratos, os efeitos regenerativos da rhBMP-2. Os defeitos foram tratados com: 1) 2,2 microgramas (μg) de rhBMP-2 em combinação com matriz óssea colagenosa insolúvel (MOCI), 2) 6,5 μg rhBMP-2 em combinação com MOCI, 3) MOCI sozinha, ou 4) matriz óssea desmineralizada (MOD), por sete, quatorze ou vinte e um dias. Estes pesquisadores demonstraram que os efeitos da rhBMP-2 na regeneração óssea eram dependentes do tempo e da dose ($p < 0,05$). Após sete dias, verificaram a presença de nova cartilagem calcificada, com uma zona pontual de tecido ósseo novo nos defeitos tratados com rhBMP-2/MOCI. Após quatorze dias, ambas as doses de rhBMP-2 em combinação com a MOCI tinham induzido a maior formação de osso do que a MOCI sozinha ou MOD sozinha, sendo maior a formação óssea nos animais que receberam 6,5 μg . Não houve evidência de resposta celular adversa. Estes resultados demonstraram que a rhBMP-2 pode restaurar a forma de um defeito ósseo da calvária e que a regeneração óssea foi mais rápida quando uma dose maior de rhBMP-2 foi utilizada.

Um estudo sobre o estímulo da osteogênese combinando as técnicas de aplicação de membrana de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) e de rhBMP-2 em defeitos ósseos críticos em mandíbulas de ratos foi feito por Linde e Hedner em 1995. Após doze dias, os

defeitos ósseos que receberam somente a rhBMP-2 apresentou ponte óssea, mas observou-se também grandes quantidades de osso novo fora da área do defeito original. Quando a rhBMP-2 foi combinada com a membrana, observou-se ponte óssea, mas o contorno do osso foi mantido por meio da membrana. Tanto após doze dias, quanto após vinte e quatro dias, o tratamento combinado com membrana e rhBMP-2 demonstraram uma melhora significativa da regeneração óssea quando comparada com a utilização somente da membrana de PTFE. Estes autores concluíram que a rhBMP-2 tem forte potencial osteoindutor e este potencial foi mantido quando se combinou a rhBMP-2 com a membrana, obtendo-se melhor cicatrização óssea do que a utilização somente da membrana, e ao mesmo tempo mantendo o contorno ósseo.

Zellin e Linde (1997) estudaram o tipo de sistema carreador na osteogênese induzida pela rhBMP-2 sob membranas osteopromotoras. Realizaram defeitos ósseos mandibulares de 5 milímetros e estes foram preenchidos com rhBMP-2, com ou sem colocação de membrana. Foram utilizadas duas doses de rhBMP-2, de 1 e 8 µg com dois tipos de sistemas carreadores, sendo um de esponja de colágeno reabsorvível e o outro D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico (PLA/PGA). Defeitos que foram cobertos com a membrana sem a rhBMP-2 serviram como controle. Verificaram que todos os defeitos tratados com rhBMP-2, sem a colocação de membrana foram unidos por osso novo depois de doze dias, independentemente da dose de rhBMP-2 ou do material carreador, e que o crescimento ósseo ocorreu além das extensões do defeito. Verificaram também que a colocação de membrana diminuiu significativamente a atividade estimuladora da BMP. Após vinte e quatro dias, os defeitos tratados com membrana, rhBMP-2 e PLA/PGA como carreador foram totalmente unidos com osso novo, ao passo que defeitos cobertos com membrana sem implante de BMP apresentou apenas 53% de osso novo. Numa análise geral quanto à neoformação óssea, o carreador PLA/PGA foi superior ao colágeno na presença de membrana, que foi, por sua vez, mais eficiente do que a colocação da

membrana por si só (sem rhBMP-2). O crescimento ósseo ficou restrito ao defeito quando combinada a rhBMP-2 e a membrana. Concluiu-se que a formação de osso abaixo da membrana pode ser significativamente melhorada por rhBMP-2 e que o sistema carreador pode afetar a quantidade de formação de osso obtido.

Em 1998, Würzler et al. investigaram o potencial das BMPs em melhorar a reparação óssea prejudicada pela irradiação. Esses pesquisadores concluíram que a irradiação induziu a prejuízo na reparação da calvária e que este pode ser evitado pela aplicação da rhBMP-2, a qual minimiza a perda e o enfraquecimento ósseo.

Murata et al. (1999) utilizaram a rhBMP-2 e colágeno como carreador, sob o periósteo craniano, em ratos de dez meses de idade, para observar o desenvolvimento dos ossos. Estes autores verificaram que o uso de rhBMP-2 e colágeno resultou na formação de osso novo e que este estava diretamente unido ao osso remanescente, ao passo que o colágeno sozinho não resultou em formação óssea nem em cartilagem. O colágeno utilizado como carreador foi encontrado no tecido ósseo e foi completamente absorvido em oito semanas quando utilizado com a rhBMP-2, enquanto que o colágeno quando utilizado sozinho permaneceu encapsulado por fina camada de tecido conjuntivo fibroso. Concluíram que a rhBMP-2 e o colágeno como material carreador foram eficazes como implante biológico, mostrando propriedades osteoindutoras e foram completamente substituídos por osso novo. O colágeno como carreador não só desempenhou papel na liberação de rhBMP-2, mas também forneceu ancoragem para a diferenciação das células e permaneceu como matriz artificial no tecido ósseo.

Higuchi et al. (1999) investigaram a aplicação da rhBMP-2 em defeitos ósseos de 5 milímetros de diâmetro no ângulo da mandíbula de ratos. No grupo experimental utilizaram a rhBMP-2 (6 µg) juntamente com uma esponja gelatinosa de polilático ácido-poliglicólico ácido copolímero (PGS) como carreador. Utilizaram no grupo controle o mesmo carreador,

mas sem a rhBMP-2. Após quatro semanas os animais foram sacrificados. Os pesquisadores observaram grande quantidade de osso neoformado, e os defeitos ósseos foram completamente preenchidos em quatro dos oito animais do grupo experimental. No grupo controle, foi observado pequena quantidade de osso neoformado. Concluíram que o sistema de regeneração óssea induzida pela rhBMP-2/PGS foi eficaz em defeitos mandibulares em ratos.

Matin et al. (2001) estudaram o papel da rhBMP-2 na reabsorção do rebordo residual após a extração dos dentes. Utilizaram a rhBMP-2 (1 µg) juntamente com esponja gelatinosa de polilático ácido-poliglicólico ácido copolímero nos alvéolos da raiz mesial após a remoção dos primeiros molares superiores em ratos Wistar. Ao final de cinco dias observaram formação óssea e esta formação se transformou em cortical alveolar na análise feita no octogésimo quarto dia, enquanto que o lado controle, onde a rhBMP-2 não foi utilizada, mostrou formação óssea mais lenta. A histomorfometria óssea mostrou maior quantidade e maior altura óssea após quatorze, vinte e oito, cinquenta e seis e oitenta e quatro dias, quando utilizaram a rhBMP-2 em comparação com o controle (sem rhBMP-2), e as diferenças foram significantes após quatorze, vinte e oito e cinquenta e seis dias. Além disso, verificaram maior número de células mesenquimais em proliferação e diferenciação quando utilizaram a rhBMP-2, e não foi observada a condrogênese. Os resultados indicam que a rhBMP-2 pode estimular a proliferação e diferenciação de células mesenquimais em alvéolos de ratos, o que permite preservar o volume de osso cortical na cavidade alveolar sem qualquer evidência de condrogênese.

Takeishi et al. (2001) estudaram os efeitos da utilização de rhBMP-2 e membrana de PTFE (politetrafluoretileno) sobre a formação óssea em defeitos ósseos (1.0 milímetros de diâmetro e 0,5 milímetros de profundidade) confeccionados em calvária de ratos. Na segunda semana pós-operatória, o grupo onde foi utilizada somente a rhBMP-2 mostrou formação

óssea mais acentuada. No entanto, o osso diminuiu em tamanho por volta da oitava semana. No grupo onde foi utilizada somente a membrana, a formação óssea ocorreu mais lentamente, porém de forma contínua pela oitava semana. No grupo onde foi utilizada a rhBMP-2 e a membrana, ocorreu neoformação óssea, preenchendo todo o espaço já na segunda semana, e este foi mantido até a oitava semana. Os autores concluíram que a combinação de rhBMP-2 e membrana de PTFE tem vantagens na produção e manutenção do tecido ósseo induzindo as células a se diferenciarem em osteoblastos diretamente sobre a superfície interna da membrana.

Matin et al. (2003) utilizaram a rhBMP-2 e esponja gelatinosa de polilático ácido-poliglicólico ácido copolímero como carreador e avaliaram a regeneração óssea em torno de implantes imediatos colocados em alvéolos de molares superiores em ratos. Estes pesquisadores verificaram que a rhBMP-2 facilitou a regeneração do osso em torno dos implantes imediatos, quando comparados aos demais animais que receberam somente o carreador ou que não receberam nenhum tipo de material de preenchimento.

Hyun et al. (2005) avaliaram e compararam o potencial osteogênico de 0,025 mg/ml de rhBMP-2, 4 e 7 associadas à esponja de colágeno absorvível (ECA) como material carreador, em defeitos ósseos críticos (oito milímetro) em calvária de ratos, no período inicial de cicatrização (duas semanas) e no período final de cicatrização da ferida (oito semanas). Verificaram que a rhBMP-2/ECA, rhBMP-4/ECA e rhBMP-7/ECA induziram a formação óssea tanto com duas quanto com oito semanas, e que a quantidade de tecido ósseo neoformado era similar nos três grupos.

Shimazu et al. (2006) avaliaram o efeito de 5 µg de rhBMP-2 e esponja gelatinosa de polilático ácido-poliglicólico ácido copolímero como material carreador sobre a regeneração óssea vertical em rebordos desdentados. No Grupo controle foi utilizado somente o material carreador. Verificaram que no grupo em que utilizaram a rhBMP-2 juntamente com o material

carreador houve aumento significativo de osso neoformado na região da crista alveolar, quando comparado ao grupo controle. Concluíram que o uso de rhBMP-2/esponja gelatinosa pode levar a aumento ósseo vertical, e permitir a estabilização de próteses totais quando a quantidade de tecido ósseo for insuficiente para a colocação de implantes.

Issa et al. (2008) avaliaram o efeito de 4 µg de rhBMP-2 em defeitos ósseos críticos em mandíbulas de ratos, associada ou não aos seguintes carreadores: gel de polaxamer e esponja de colágeno. Esses pesquisadores verificaram que a rhBMP-2 foi capaz de induzir a regeneração óssea quando associada ao gel de polaxamer ou à esponja de colágeno. Verificaram também que a rhBMP-2 teve a sua ação otimizada quando combinada aos dois materiais carreadores juntos.

Schwarz et al. (2009) avaliaram a influência do fator de crescimento de diferenciação recombinante humano e da rhBMP-2 em defeitos ósseos em calvária de ratos. Concluíram que, com 24 semanas, ambos os tratamentos induziram à regeneração óssea, mas que a rhBMP-2, pode ter o potencial para melhorar a cicatrização óssea, particularmente, durante os estágios iniciais do reparo ósseo.

Issa et al. (2010) avaliaram o potencial osteogênico da rhBMP-2 e de uma proteína extraída a partir do látex natural (*Hevea brasiliensis* - P-1), e comparou os seus efeitos sobre defeitos ósseos em calvária de ratos quando combinadas com um gel de monoleína como carreador. Concluíram que a rhBMP-2 permitiu maior neoformação óssea quando comparada à P-1.

Abdala et al. (2010) avaliaram a formação óssea após a aplicação de diferentes dosagens de rhBMP-2 (1 µg, 3 µg e 7 µg) combinada ao gel de monoleína ou gel de polaxamer como carreadores, em defeitos ósseos críticos (6 milímetros) em calvária de ratos. Após duas semanas verificaram aumento significativo da formação óssea, quando a dose de rhBMP-2 foi aumentada de 1 para 7 µg quando utilizado o gel de polaxamer como carreador,

ao passo que nos grupos que receberam o gel de monoleína como carreador, não foram observadas diferenças significantes quando maior dose de rhBMP-2 foi administrada.

Pereira et al. (2012) avaliaram o efeito da rhBMP-2 e do alveolex (Própolis 10%) no reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos. Verificaram que o alveolex aumentou a reparação óssea quando associado a rhBMP-2, porém sem diferenças significantes quando comparada com a reparação induzida pela rhBMP-2 sozinha. O grupo de animais que recebeu somente o alveolex apresentou a menor quantidade de osso neoformado, porém, sem diferenças significantes quando comparado ao grupo controle, que foi preenchido somente por coágulo.

Stancoven et al. (2013) analisaram, em defeitos ósseos críticos (8mm) em calvária de ratos, os efeitos da rhBMP-2 e da esponja de colágeno absorvível como material carreador, em comparação com a matriz óssea desmineralizada e investigar os efeitos sinérgicos da administração do hormônio da paratireóide (PTH exógeno). Estes pesquisadores verificaram que a rhBMP-2 associada a esponja de colágeno estimulou de forma significante a neoformação óssea, enquanto que a neoformação óssea foi significantemente limitada quando utilizada a matriz óssea desmineralizada. Verificaram também que a aplicação sistêmica de PTH não teve nenhum efeito sinérgico perceptível na neoformação óssea.

2.3 Carreadores - Monoleína

De acordo com Lindholm e Gao (1993) para otimizar a osteoindução das BMPs, elas devem estar associadas a uma substância carreadora apropriada, a qual parece possuir efeito sobre a farmacocinética e ação destas proteínas.

Como já relatado anteriormente as substâncias carreadoras devem apresentar algumas características tais como: apresentarem relativa solubilidade em condições fisiológicas e

proteção contra atividade proteolítica; serem biodegradáveis, substrato para adesão celular e proliferação, imunologicamente inertes, estáveis mecanicamente no defeito ósseo e facilmente manufaturadas; liberarem as BMPs lentamente (Aldinger et al., 1991) para que as proteínas osteoindutoras tenham o efeito clínico desejado.

Os lipídeos vêm se destacando como potenciais excipientes para a indústria farmacêutica, apresentando características interessantes para serem usados como sistemas carreadores de fármacos (D'Antona et al., 2000). Dentre os lipídeos, podemos citar a monoleína ou monoleato de glicerila, que na presença de água formam géis (sistemas de fase cúbica) e que apresentam várias características desejadas para os sistemas de liberação de fármacos, incluindo maior estabilidade em tecidos e fluídos (Larsson, 1989; D'Antona et al., 2000).

Em 1984, Hyde et al. verificaram que a fase cúbica é isotrópica e consiste de duas redes congruentes de canais de água envolvidas por bicamadas lipídicas curvas que se estendem em três dimensões. Estes sistemas têm sido utilizados como carreadores de fármacos em várias formas farmacêuticas, assim como em várias vias de administração, e são capazes de promover a liberação lenta de fármacos (Shah et al., 2001); possuem propriedades bioadesivas, além de serem atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis (Geraghty et al., 1996; Chang; Bodmeier, 1997; Nielsen et al., 1998).

2.4 Reparo Ósseo

O osso é essencialmente um tipo de tecido conjuntivo mineralizado. Está envolvido na regulação do tamanho e altura corporal e fornece suporte estrutural para os músculos e proteção física para os órgãos vitais. Concomitantemente, os ossos servem como principal depósito de cálcio e fosfato e são sítios essenciais de tecido medular servindo como fonte contínua para a hematopoiese (Gordeladze et al., 2009).

Sabe-se que o osso, similarmente aos outros diversos tecidos do organismo, tem um alto potencial de regeneração e reparo. Porém, a reparação do tecido ósseo depende de alguns fatores clínicos: localização, extensão da perda óssea, infecção e condições sistêmicas (Schneider; Helms, 1998; Shapiro, 2008, Marzona; Pavolini, 2009). Geralmente, a cicatrização perdura até a completa restauração da função e da anatomia óssea (Caplan, 1987).

A cicatrização óssea se caracteriza por uma série de transformações moleculares, celulares e teciduais que consistem de reabsorção e formação de tecidos moles e duros e sua classificação baseia-se na variedade de eventos e fatores que influenciam a injúria e o reparo. Frequentemente, a extensão de perda tecidual é considerada um fator crítico no reparo. A quantidade de tecido ósseo perdido relaciona-se diretamente com o atraso na cicatrização. A reparação do tecido ósseo envolve a atividade de várias células (condroblastos, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e se inicia com a formação do coágulo sanguíneo (Sela; Bab; 2012). Este serve como um meio que permite a migração celular e proliferação dos capilares. Além disso, o coágulo tem como função ser uma fonte primária de fatores de crescimento e se forma concomitantemente com o início da resposta inflamatória (Critchlow et al., 1995). Neste momento, inicia-se a expressão de moléculas sinalizadoras, interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator estimulador de colônia e fator de necrose tumoral α (TNF- α) que têm papel de iniciar o reparo. Em adição, as expressões de fator transformador de crescimento β (TGF- β), fator de crescimento de plaquetas (PDGF) e proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) inicializam a formação do calo. O recrutamento de células tronco mesenquimais está associado ao fator de crescimento e diferenciação 8 (GDF-8) sugerindo que este tenha um papel no controle da proliferação celular (Sela; Bab; 2012). O processo de cicatrização continua com a reabsorção do coágulo e sua substituição pelo tecido de granulação. Este estágio é caracterizado por uma mobilização celular e vascular a partir dos vasos periosteais

com extensiva neo-angiogênese mediada pelas angiopoietinas e diferentes fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs). Macrófagos e osteoclastos são responsáveis pela remoção e reabsorção dos restos de tecidos mole e duro, mediados pelo ligante do receptor de fator de transcrição nuclear (RANKL) e fator estimulador de colônias de monócitos (MCSF) (Bab; Einhorn, 1994; Bruder et al., 1994; Bland et al., 1995; Solheim, 1998; Veillette; McKee, 2007).

O tecido de granulação vai sendo substituído gradualmente por um calo cartilaginoso e osso primário. O tecido de granulação fornece um grande suprimento sanguíneo e um veículo para o recrutamento de células. Nesta fase, abundantes células mesenquimais indiferenciadas se dirigem ao local injuriado, proliferam, e diferenciam, evidentemente em resposta aos fatores de crescimento produzidos pelos tecidos injuriados e pelo coágulo sanguíneo (Caplan, 1987; Shapiro, 2008).

O processo descrito acima relaciona-se tanto com a ossificação intramembranosa quanto com a ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa envolve a formação de osso diretamente de células osteoprogenitoras comprometidas e células mesenquimais indiferenciadas provenientes do periósteo, dos canais de Havers e da medula, resultando na formação de um calo duro (Caplan, 1987; Schneider; Helms, 1998; Vortkamp et al., 1998; Shapiro, 2008).

Na ossificação endocondral, a condrogênese é desencadeada pela isquemia local, ou seja, baixa tensão de oxigênio, que é regulada por fatores de crescimento, dentre eles o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), e células mesenquimais diferenciam-se em condroblastos, produzindo matriz cartilaginosa, a qual se torna calcificada e é substituída por osso. A formação do osso primário é seguida por uma extensa remodelação até que a área óssea lesada recupere a forma e o tamanho original. Segundo pesquisadores, os processos de ossificação intramembranosa e endocondral na reparação óssea, se assemelham a formação

óssea embrionária, sugerindo que o reparo ósseo é uma reiteração do desenvolvimento ósseo normal (Caplan, 1987; Schneider; Helms, 1998; Vortkamp et al., 1998; Shapiro, 2008, Marzona; Pavolini, 2009).

Proposição

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar qualitativa e quantitativamente o tecido ósseo neoformado em defeitos ósseos críticos em calvária de ratas Wistar após:

1. Aplicação do laser em baixa intensidade:

1.1. Aplicação única de laser

1.2. Aplicação única de laser e 7 µg de rhBMP-2 pura

1.3. Aplicação única de laser e 7 µg de rhBMP-2 associada ao gel de monoleína

2. Aplicação da rhBMP-2:

2.1. Aplicação de 7 µg de rhBMP-2 pura

2.2. Aplicação de 7 µg de rhBMP-2 associada ao gel de monoleína

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados:

- Aparelho Twin Laser – Mm Optics com as seguintes especificações: frequência de 50/60 Hz, voltagem de 100 ~ 240 V, potência óptica máxima de 70 mW, dosagem máxima de 315J/cm², comprimento de onda de 780nm, meio semiconductor arseneto de gálio-alumínio, do laboratório de Eletromiografia do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia “Prof. Dr Mathias Vitti” da FORP/USP, adquirido por meio do auxílio FAPESP nº. 2006/55567-1

- rhBMP-2: foi obtida junto ao Prof. Dr. Walter Sebal, do Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften (Biozentrum) der Universität Würzburg, Würzburg, Alemanha, que é o autor do método de produção industrial da rhBMP-2 em cultura de *E. coli*.

- Motor elétrico para implantes (Dentscler, Ribeirão Preto, SP, Brasil

- Material cirúrgico

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção da formulação

A rhBMP-2 foi dissolvida na proporção de 1:1 em solução neutra (solução tampão de fosfato em pH 7,2)

O gel de monoleína foi obtido na proporção 7:3 (Monoleína:Água) contendo 7 µg de rhBMP-2 por volume aplicado no defeito ósseo.

O preparo da formulação consistiu da seguinte sequência: pesou-se a monoleína em béquer de vidro, aquecendo até 45°C e adicionou-se água na mesma temperatura, deixando em equilíbrio até a formação de gel transparente e viscoso. Adicionou-se a rhBMP-2 em solução aquosa e homogeneizou-se a preparação, sendo que esta quantidade de água foi descontada da anterior.

4.2.2. Obtenção dos animais

O projeto foi Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em 02/07/2008, Protocolo nº 08.1.224.53.6. Foram utilizadas 42 ratas Wistar, jovens (10 a 12 semanas), pesando aproximadamente 350g. Os animais eram procedentes do Biotério de Reprodução e Manutenção Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Estas foram mantidas em número de cinco animais por caixa de polietileno, com temperatura ambiente controlada entre máxima de 24 e mínima de 23°C e com timer programado para doze horas de iluminação diária. Os animais receberam ração e água “ad libitum”.

4.2.3. Realização dos defeitos ósseos críticos e dos tratamentos associados

Após sete dias, os animais foram divididos em seis grupos contendo sete animais cada de acordo com o tipo de tratamento que receberiam.

Os animais foram pesados e anestesiados com a mistura de 75 mg/Kg de Ketamina e de 10 mg/Kg de Xylazina injetada por via intramuscular. Foi feita a tricotomia na região central da calvária que ainda recebeu aplicação de álcool iodado e uma incisão sagital de aproximadamente 1 cm de extensão, com lâmina de bisturi estéril nº 24 montada em cabo de bisturi nº 4, de modo a expor a região óssea localizada na porção média da calota craniana (Fig. 1).

Figura 1 - Incisão sagital na região central da calvária.

Com a calota devidamente exposta criou-se um defeito ósseo crítico na região central, fugindo da região da sutura sagital mediana. Para isso utilizou-se uma broca trefina de 5 mm de diâmetro adaptada em contra-ângulo e com o auxílio de um motor elétrico para implantes (Dentscler, Ribeirão Preto, SP, Brasil), ajustado com torque 35 e em 1490 rpm, com constante e abundante irrigação com soro fisiológico 0,9%; procedeu-se à perfuração criando-se o defeito ósseo crítico cilíndrico de 5 mm de diâmetro (Figs. 2 a 5).

Figura 2 - Defeito ósseo sendo confeccionado com a broca trefina de 5 mm de diâmetro e sob constante irrigação.

Figura 3 - Calvária seccionada.

Figura 4 - Remoção de parte da calvária que foi seccionada.

Figura 5 - Defeito ósseo crítico na calvária e exposição da dura-máter.

Após a criação dos defeitos ósseos nos animais do Grupo 1 foi realizada uma única aplicação de laser (densidade de energia 120 J/cm^2 , 60 mW, 80 segundos) diretamente sobre o defeito ósseo (Fig. 6).

Figura 6 - Aplicação do laser.

Nos animais do Grupo 2 foi realizada a aplicação de 7 μ g da proteína osteoindutora rhBMP-2 pura. Para facilitar a colocação da proteína, que dissolvida no tampão se encontrava em forma líquida, foram dados alguns pontos cirúrgicos, para delimitar e elevar o retalho e, com o auxílio de uma micropipeta a proteína foi vertida sobre o defeito ósseo (Fig. 7).

Figura 7 - Colocação de 7 µg de rhBMP-2 pura com o auxílio de uma micropipeta.

Nos animais dos Grupos 3, 4, 5 e 6 foram realizados os seguintes tratamentos: Grupo 3: aplicação única de laser (120 J/cm^2) diretamente sobre o defeito ósseo e aplicação de 7 µg da proteína osteoindutora rhBMP-2 pura;

Grupo 4: aplicação de 7 µg da proteína osteoindutora rhBMP-2 combinado ao gel de monoleína como carreador;

Grupo 5: aplicação única de laser (120 J/cm^2) diretamente sobre defeito ósseo e aplicação de 7 µg da proteína osteoindutora rhBMP-2 combinado ao gel de monoleína como carreador e;

Grupo 6: controle onde foram realizados apenas os defeitos ósseos críticos.

Após o tratamento, procedeu-se à sutura dos tecidos. A pele dos animais, juntamente com o periósteo foi reposicionada a sua posição original e suturada com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), de modo a fechar devidamente as margens do retalho. Em seguida, cada animal recebeu, via intramuscular, dose única de 24.000 UI/Kg de peso de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge[®], Campinas, SP, Brasil).

A aplicação de laser nos animais seguiu os parâmetros contidos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros utilizados para a aplicação do laser em baixa intensidade.

01. Densidade de energia (dose)	120 J/cm ²
02. Potência utilizada	60 mW
03. Tempo de aplicação	80 s
04. Área do <i>spot</i> de aplicação	0,04 cm ²
05. Diâmetro do <i>spot</i> de aplicação	5 mm
06. Comprimento de onda do laser	780 nm (ir)
07. Tipo de laser	AsGaAl (diodo)
08. Número de aplicações	1
09. Número de pontos de aplicação	1
10. Energia total depositada	4,8 J
11. Intensidade de energia	1,5 W/cm ²
12. Tipo de onda	Contínua
13. Direção de aplicação do laser	Perpendicular
14. Distancia do spot de aplicação da área alvo	0 mm
15. Forma de aplicação do laser	Com contato

Para evitar contaminações cruzadas e como medida de higiene, a ponta ativa do laser foi protegida com plástico (PVC) descartável. A colocação do filme de PVC foi realizada de tal forma que o mesmo ficasse bem esticado, evitando a difusão do feixe de luz na saída da caneta. A aplicação de laser foi única e diretamente sobre o defeito ósseo crítico.

Após o tratamento os animais operados ficaram diariamente sob observação, assim como, todos os dias era realizada a limpeza de suas caixas, e a troca da maravalha.

4.2.4. Obtenção das peças para análise

4.2.4.1. Sacrifício dos animais

Passados quinze dias de criação do defeito ósseo com seus respectivos tratamentos, os animais receberam intraperitonealmente, overdose da mistura de 150mg/Kg de Ketamina e de 10mg/Kg de Xylazina e as calvárias foram removidas quando então foram obtidos fragmentos ósseos contendo o defeito ósseo com margem de segurança.

Figura 8 - Calvária sendo removida.

Figura 9 - Tecido ósseo contendo a área cicatricial e tecido ósseo circunjacente (margem de segurança).

4.2.4.2. Processamento de peças histológicas

Os fragmentos ósseos foram imersos em formaldeído a 4% tamponado, por 24 horas, para fixação dos tecidos. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA+TRIS a 0,5M, e as soluções foram trocadas a cada dois dias.

Após trinta dias, período de descalcificação das peças, a ação do ácido foi neutralizada, em solução de sulfato de sódio a 5%, por vinte e quatro horas quando então os

fragmentos foram seccionados longitudinalmente. A amostra foi desidratada em série crescente de álcoois: 70% (overnight), 80%, 85%, 90%, 95% e 100% (2 horas em cada concentração). Após a realização dessas etapas as amostras de osso foram colocadas em partes iguais de álcool e xilol (overnight) e diafanizadas em xilol, com trocas a cada 2 horas, sendo executadas 3 trocas; e em seguida, incluídas em parafina. Posteriormente a inclusão em parafina os blocos contendo as peças foram cortados com 6 µm de espessura. Os cortes foram corados em Hematoxilina – Eosina, o que permitiu avaliar a morfologia simples do tecido ósseo neoformado e Tricrômio de Masson, que permitiu avaliar a morfologia detalhada do tecido ósseo neoformado.

4.2.4.3. Análise qualitativa ao microscópio de luz

A análise qualitativa dos cortes montados em lâminas permitiu avaliar o osso neoformado na área de criação do defeito ósseo crítico, bem como diferenciar o osso existente e o neoformado nos grupos experimentais. Foi utilizado o microscópio de luz Leica DM 4000B, acoplado a uma câmera digital de vídeo Leica EC3 para captura das imagens as quais foram analisadas em aumentos de 10X, 20X e 40X.

4.2.4.4. Análise quantitativa

A área (A) foi determinada pela relação dos pontos que recaíam sobre o tecido ósseo neoformado (Pp) e o total de pontos do sistema teste (Pt), sendo representada pela seguinte fórmula: $A = Pp/Pt (\%)$.

As secções histológicas dos defeitos ósseos críticos foram fotografadas utilizando o microscópio de luz Leica DM 4000B, acoplado a uma câmera digital de vídeo Leica EC3.

Foram analisadas 28 secções por grupo (4 secções por animal), número suficiente para a análise estatística. O número de secções foi calculado pela seguinte fórmula:

$$EPR = \sqrt{(1 - V_v)/n}$$

onde EPR é o erro padrão relativo, V_v é a densidade de volume da estrutura analisada e n é o número de pontos a serem contados (Hally, 1964).

O *software* Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) gerou em cada uma das fotomicrografias uma grade (sistema-teste) constituída de linhas horizontais e verticais (Fig. 10), e as intersecções destas linhas foram consideradas pontos, totalizando 80 pontos, os quais foram quantificados por meio de contagem para determinar a área de osso neoformado (Hally, 1964).

De acordo com Weibel et al. (1966), a densidade volume (V_v) de uma estrutura pode ser analisada por meio da contagem de pontos de um sistema-teste que recaem sobre a secção dessa estrutura. O parâmetro utilizado nesse estudo mede a área de uma estrutura pela ocupação relativa dessa num sistema-teste, tendo interpretação semelhante à densidade de volume, pois a lei básica da estereologia informa que a quantidade relativa de pontos que tocam a estrutura é comparável à quantidade de área contida na área entre os pontos do sistema-teste, ou a quantidade de volume no volume de um sistema-teste (Mandarim-de-Lacerda, 1995).

Assim:

$$P_{\text{estr}}/P_{\text{teste}} = A_{\text{estr}}/A_{\text{teste}} = V_{\text{estr}}/V_{\text{teste}}$$

Onde:

P = pontos

A = área

V = volume

*_{estr} = relativo à estrutura analisada

*_{teste} = relativo ao sistema-teste como um todo (total)

A fórmula utilizada para quantificar a área de osso neoformado foi:

$$A = \sum P_{\text{estr}} / \sum P_{\text{test}} (\times 100) \text{ (Valores em porcentagem)}$$

Figura 10 - Sistema-teste (80 pontos) obtido com o auxílio do *software* Image J, constituído por linhas verticais e horizontais interpoladas.

4.2.4.5. Análise estatística

Os dados quantitativos foram tabulados e submetidos à análise estatística utilizando o *software* SPSS versão 17.0 para Windows (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). Observou-se distribuição normal em todos os dados obtidos (Shapiro Wilk) o que possibilitou utilizar-se o teste estatístico análise de variância (ANOVA). Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste de Duncan.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Análise histológica ao microscópio de luz (qualitativa)

Nos animais do Grupo 1, que receberam somente a aplicação do laser na dose de 120 J/cm², foi possível observar que na região periférica do defeito ósseo, o tecido conjuntivo presente era uma extensão do periósteo e que este se apresentou espesso e organizado. Notou-se, também, pequena trabécula óssea circundada por osteoblastos na proximidade da parede do defeito ósseo e a presença de osteócitos em lacunas osteocíticas amplas indicando a imaturidade óssea (Fig. 11).

Figura 11 - Imagem histológica representativa do Grupo 1 que recebeu aplicação de laser (região de periferia do defeito ósseo). OR: Osso remanescente; ON: Osso neoformado; TC: Tecido conjuntivo; VS: Vaso sanguíneo. Coloração: Tricrômio de Masson.

Nos animais do Grupo 2, que receberam aplicação de 7 μ g de rhBMP-2 pura, foi possível observar próximo às paredes ósseas remanescentes, tecido ósseo neoformado de aspecto trabeculado, com numerosas cavidades medulares, osteócitos alojados em lacunas, osteoblastos ativos e tecido conjuntivo abundante em continuidade com o periósteo (Fig. 12).

Figura 12 - Imagem histológica representativa do Grupo 2 que recebeu aplicação de rhBMP-2 pura (região de periferia do defeito ósseo). OR: Osso remanescente; ON: Osso neoformado; CM: Cavidade medular; TC: Tecido conjuntivo. Coloração: Tricrômio de Masson.

No Grupo 3, onde os animais foram submetidos a aplicação do laser (120 J/cm^2) e de $7 \text{ } \mu\text{g}$ de rhBMP-2 pura, observou-se, próximo as paredes ósseas remanescentes, osso neoformado de aspecto trabeculado com osteoblastos, osteócitos alojados em lacunas, vasos sanguíneos e pequena quantidade de tecido conjuntivo (Fig. 13).

Figura 13 - Imagem histológica representativa do Grupo 3 que recebeu aplicação de laser e rhBMP-2 pura (região de periferia do defeito ósseo). OR: Osso remanescente; ON: Osso neoformado; TC: Tecido conjuntivo. Coloração: Tricrômio de Masson.

No Grupo 4, em que os animais receberam 7 μ g de rhBMP-2 associada ao gel de monoleína, observou-se tecido ósseo neoformado circundado por tecido conjuntivo altamente vascularizado na periferia do defeito ósseo e o periósteo apresentava pouca quantidade de células (Fig. 14).

Figura 14 - Imagem histológica representativa do Grupo 4 que recebeu rhBMP-2 associada à monoleína (região de periferia do defeito ósseo). OR: Osso remanescente; ON: Osso neoformado; TC: Tecido conjuntivo; VS: Vaso sanguíneo. Coloração: Tricrômio de Masson.

No Grupo 5, onde foi aplicado o laser (120 J/cm^2) e $7 \mu\text{g}$ de rhBMP-2 associada ao gel de monoleína, observou-se a presença abundante de tecido conjuntivo entre as paredes de osso neofomado. Este era formado por trabéculas ósseas com osteoblastos em sua periferia. O perióstio era constituído por tecido conjuntivo delgado (Fig. 15).

Figura 15 - Imagem histológica representativa do Grupo 5 que recebeu aplicação de laser e rhBMP-2 associada à monoleína (região de periferia do defeito ósseo). OR: Osso remanescente; ON: Osso neofomado; TC: Tecido conjuntivo; P: Perióstio. Coloração: Tricrômio de Masson.

No Grupo 6, em que os animais foram submetidos somente a realização do defeito ósseo crítico, ou seja, não receberam nenhum tipo de tratamento, foi observado a presença de tecido conjuntivo espesso e bem organizado e pouco tecido ósseo em continuação com as paredes do defeito (Fig. 16).

Figura 16 - Imagem histológica representativa do Grupo 6 onde foi realizado somente o defeito ósseo crítico (região de periferia do defeito ósseo). OR: Osso remanescente; ON: Osso neoformado; TC: Tecido conjuntivo. Coloração: Tricrômio de Masson.

5.2. Análise quantitativa

Os resultados encontrados na análise quantitativa estão representados na Tabela 2 e na Figura 17.

Com os dados obtidos foi possível observar que os animais do Grupo 3 (laser e rhBMP-2 pura) apresentaram a maior quantidade de tecido ósseo neoformado ($p < 0,05$) quando comparados com os animais de todos os outros grupos. Na comparação entre os dados dos Grupos 2 (rhBMP-2 pura) e 5 (laser e rhBMP-2 associada ao gel de monoleína) não se verificou diferença estatisticamente significativa, mas quando comparados aos outros grupos houve diferença estatística ($p < 0,05$). A comparação entre os dados dos Grupos 1 (laser) e 4 (rhBMP-2 associada ao gel de monoleína) foi possível observar que não houve diferença estatística, mas quando comparados esses resultados com outros grupos a diferença foi significativa ($p < 0,05$). A menor área de neoformação óssea ocorreu nos animais do Grupo 6 (defeito ósseo crítico), evidenciando diferença estatística em relação aos demais Grupos ($p < 0,05$).

Tabela 2. Médias e erros-padrão da quantidade de tecido ósseo neoformado nos diferentes grupos.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
24,00 ^a ±1,87	31,42 ^b ±2,79	37,89 ^c ±1,35	24,75 ^a ±1,25	31,96 ^b ±1,83	14,10 ^d ±2,27
Médias com letras diferentes são estatisticamente significantes de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$)

Figura 17 - Valores médios e erro padrão da quantidade de osso neoformado (em porcentagem) nos diferentes grupos. Grupos unidos por barras não apresentaram diferença estatística significativa.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência da LLLI e rhBMP-2 (pura ou associada a um agente carreador) no processo de cicatrização óssea em defeitos ósseos em calvária de ratas.

A literatura tem demonstrado que tratamentos utilizando a LLLI e rhBMP-2 estimulam a neoformação óssea (Carvalho et al., 2006; Siessere et al., 2011). Neste estudo, estes dois métodos foram empregados isoladamente ou combinados, utilizando ratas Wistar como modelo experimental. Apesar da maioria dos estudos utilizar machos e não fêmeas, prevenindo variações hormonais o que poderia acarretar erros, a escolha de animais fêmeas foi proposital, buscando realmente analisar esse efeito em condições de variação hormonal a fim de contribuir para o melhor entendimento do efeito da terapia fotodinâmica em casos, por exemplo, de fraturas ósseas em mulheres.

A análise histomorfométrica revelou que o Grupo 3 (laser e rhBMP-2 pura) foi o grupo que apresentou a maior quantidade de osso neoformado. Tal resultado encontra apoio na literatura que descreve que a irradiação com laser em baixa intensidade tem sido indicada para diferentes tratamentos, tais como, controle da dor e cicatrização tecidual, incluindo os tecidos mineralizados (Guzzardella et al., 2002; Iyomasa et al., 2009) e também nas pesquisas que relatam que as proteínas morfogenéticas ósseas possuem propriedades osteoindutoras, induzindo a diferenciação de células mesenquimais em células osteoblásticas (Spector et al., 2001; Ruhe et al., 2004).

Nossos resultados estão de acordo também com estudos similares ao que desenvolvemos, apesar de utilizarem diferentes modelos experimentais, e que utilizaram a proteína morfogenética óssea associada a aplicação de laser e que apresentaram resultados semelhantes, ou seja, com maior formação óssea quando a LLLI e as BMPs foram associadas (Carvalho et al., 2006; Gerbi et al., 2008; Denadai et al., 2009).

A irradiação laser utilizada neste estudo foi a de modo contínuo, mas em um estudo *in vitro* foi observado que a irradiação laser superpulsada apresentou propriedades osteogênicas, incluindo a expressão de moléculas conhecidas como importantes mediadores de formação óssea e, como consequência, aumento da deposição de cálcio em células humanas (Saracino et al., 2009).

Nesta pesquisa foi utilizado o laser diodo de arseneto de gálio-alumínio (modo contínuo), seguindo os seguintes parâmetros: comprimento de onda de 780nm, 60 mW de potência, área do spot de aplicação de 0,04cm², tempo de irradiação de 80 segundos, densidade de energia de 120 J/cm² e irradiância de 1,5 W/cm². Estes parâmetros foram escolhidos porque apresentaram bons resultados em estudos prévios de regeneração óssea após a bioestimulação com laser e rhBMP-2 em ratas ovariectomizadas (Siessere et al., 2011); além disso, o laser de AsGaAl de 780 nm é o utilizado na clínica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP).

Da mesma forma que Pretel et al. (2007), nossa intenção em utilizar uma única aplicação de laser era delinear um protocolo imediato transcirúrgico em contato com o tecido cirúrgico injuriado, o que poderia fornecer melhores resultados na aplicação clínica, já que a energia seria totalmente depositada na área de cicatrização. A irradiação única no defeito ósseo objetivou verificar os benefícios de uma dose única na cicatrização óssea, buscando demonstrar que este tipo de tratamento poderia ser utilizado e padronizado como novo protocolo, funcional, mais rápido e de fácil aplicação.

Neste estudo, quando o laser foi aplicado sozinho, foi observado a presença de tecido conjuntivo organizado, com vasos sanguíneos e fibroblastos, e estes resultados são semelhantes a de outros pesquisadores (Guzzardella et al., 2002; Pretel et al., 2007; Garavello-Freitas et al., 2003; Pinheiro et al., 2003). Também foi observado a presença de pequenas trabéculas ósseas assim como encontrado por Gerbi et al. (2008), indicando a

aceleração do processo reparador como demonstrado por Ozawa et al. (1998), que encontrou aumento na proliferação e diferenciação celular após a irradiação com laser.

De acordo com Karu et al. (1995), a irradiação aumenta a quantidade de ATP e a atividade mitótica das células. O laser em baixa densidade fornece pouca energia, porém o suficiente para que as organelas e membrana das células sejam estimuladas para reparação de tecidos, formação vascular, de colágeno e fibroblastos (Silva et al., 2010). Esse estimula os fotorreceptores na mitocôndria, interfere na síntese de ATP e na produção de colágeno, auxilia ainda, no reparo das lesões e diminui a inflamação (Lins et al., 2010).

A combinação do laser e da rhBMP-2 associada ao gel de monoleína (Grupo 5) também mostrou a presença de osso trabecular, o qual era mais organizado do que o tecido ósseo do Grupo 1. O Grupo 6 também apresentou tecido ósseo neoformado, mas não tão organizado quanto o tecido ósseo dos Grupos 1 e 5. Foram observadas diferenças significantes na quantificação do tecido ósseo neoformado entre estes grupos.

Neste modelo experimental, a dose empregada foi capaz de promover a neoformação óssea e melhorar o processo de cicatrização quando associado à rhBMP-2. Estes resultados estão de acordo com os resultados de Pretel et al. (2007), que utilizaram o laser diodo de AsGaAl e densidade de energia de 178 J/cm^2 , com os resultados de Khadra et al. (2004), que utilizaram a densidade de energia de 23 J/cm^2 , e Renno et al. (2006), que utilizaram a densidade de energia de 120 J/cm^2 em ratas ovariectomizadas.

Neste estudo, foram utilizadas $7 \mu\text{g}$ da proteína óssea morfogenética recombinante humana para cada defeito ósseo crítico. As doses de rhBMP-2, objetivando recobrir a área do defeito ósseo, são bastante discutidas na literatura, e depende de vários fatores: modelo experimental utilizado, tamanho do defeito ósseo e período de tempo (Riley et al., 1996; Okubo et al., 2000; Murakami et al., 2002; Issa et al., 2009a). A literatura apresenta diferentes dosagens para a rhBMP-2 (Arosarena et al., 2005; Issa et al., 2010; Wang et al., 1990; Abdala

et al., 2010). No entanto, há consenso de que é necessário utilizar material carreador para melhorar o sistema de carregamento desta proteína, considerando que a mesma é muito cara e se dispersa rapidamente do sítio onde é inserida. Deste modo, o gel de monoleína de fase cúbica foi utilizado, representando matriz atóxica e biodegradável (D'Antona et al., 2000), com possibilidade de incorporação de diferentes substâncias hidrofílicas ou lipofílicas (Boyd et al., 2006), incluindo a proteína morfogenética óssea, com liberação sustentável (Issa et al., 2009b). Embora esse veículo possua boas propriedades como sistema de liberação de diferentes substâncias, neste estudo, não foram observadas diferenças significantes para a quantificação quando a rhBMP-2 pura (Grupo 2) foi comparada com a rhBMP-2 associada ao gel de monoleína (Grupo 4), embora o tecido ósseo neoformado no Grupo 2 estava mais organizado que o do Grupo 4.

Diferentes períodos de tempo para avaliar o tecido ósseo neoformado têm sido apresentados na literatura, mas considerando as condições experimentais deste estudo e a literatura analisada, optamos por utilizar o período de quinze dias para o sacrifício dos animais, com o objetivo de analisar a formação óssea no início do processo reparador. Autores têm demonstrado que 15, 45 e 60 dias são adequados para se observar a formação óssea em defeitos ósseos críticos porque estes tempos correspondem ao período inicial, intermediário e final do processo de reparação óssea (Pretel et al., 2007).

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Após análise dos resultados é lícito concluir que dentre todos os grupos estudados que:

1. O grupo que recebeu aplicação única de laser e 7 µg de rhBMP-2 apresentou os melhores resultados no que se refere a cicatrização dos defeitos ósseos quando comparado:

- ao grupo que recebeu somente a aplicação única do laser e que também se observou cicatrização dos defeitos ósseos e;

- ao grupo que recebeu somente a aplicação de rhBMP-2 e que também se observou cicatrização dos defeitos ósseos.

2. Tais resultados colaboram para que o procedimento clínico utilizando irradiação única de laser em baixa intensidade se torne padrão como um novo protocolo, funcional, mais rápido, de fácil aplicação e de baixo custo.

Referências

8. REFERÊNCIAS

Abdala PM, Iyomasa MM, Sato S, Bentley MV, Pitol DL, Regalo SC, Siessere S, Issa JP. Osteoinductivity potential of rhBMP-2 associated with two carriers in different dosages. *Anat Sci Int*. 2010 Dec;85(4):181-8. doi: 10.1007/s12565-010-0075-5.

Abe E. Function of BMPs and BMP antagonists in adult bone. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Apr;1068:41-53.

AboElsaad NS, Soory M, Gadalla LM, Ragab LI, Dunne S, Zalata KR, Louca C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of bone defects (an experimental study). *Lasers Med Sci*. 2009 Jul;24(4):527-33. doi: 10.1007/s10103-008-0590-y.

Aldinger G, Herr G, Kusswetter W, Reis HJ, Thielemann FW, Holz U. Bone morphogenetic protein: a review. *Int Orthop*. 1991;15(2):169-77.

Almeida Lopes L. Laserterapia: conceitos e aplicações. [citado 14 maio 2013]. Disponível em: http://www.nupen.com.br/Revista_port/introducao.php.

Arosarena O, Collins W. Comparison of BMP-2 and -4 for rat mandibular bone regeneration at various doses. *Orthod Craniofac Res*. 2005 Nov;8(4):267-76.

Bab IA, Einhorn TA. Polypeptide factors regulating osteogenesis and bone marrow repair. *J Cell Biochem*. 1994 Jul;55(3):358-65.

Bland YS, Critchlow MA, Ashhurst DE. Exogenous fibroblast growth factors-1 and -2 do not accelerate fracture healing in the rabbit. *Acta Orthop Scand*. 1995 Dec;66(6):543-8.

Bowers GM, Reddi, AH. Regeneration of the periodontium in advanced periodontal disease. *J Am Dent Assoc*. 1991 Oct;122(10):45-8.

Boyd BJ, Whittaker DV, Khoo SM, Davey G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. *Int J Pharm*. 2006 Feb 17;309(1-2):218-26.

Boyne PJ. Reconstruction of discontinuity mandibular defects in rhesus monkeys using rhBMP-2. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53 (4 suppl): 92.

Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lazaro E, Lilly LC, Alder M, Nummikoski P. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997 Feb;17(1):11-25.

Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*. 1994 Nov;56(3):283-94.

Caplan AI. Bone development and repair. *Bioessays*. 1987 Apr;6(4):171-5.

Carvalho PT, Silva IS, Reis FA, Belchior ACG, Facco GG, Guimarães RN, Fernandes GHC, Denadai AS. Effect of 650 nm low-power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors. *Acta Cir Bras*. 2006;21 (4 Suppl):63-8.

Chang C, Bodmeier R. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems. *J Pharm Sci*. 1997 Jun;86(6):747-52.

Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, Fiorellini JP, Howell H. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol*. 2000 Aug;71(8):1241-57.

Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE. The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone*. 1995 May;16(5):521-7.

D'Antona P, Parker WO, Zanirato MC, Esposito E, Nastruzzi C. Rheologic and NMR characterization of monoglyceride- based formulations. *J Biomed Mater Res*. 2000 Oct;52(1):40-52.

Denadai AS, Carvalho PTC, Reis FA, Belchior ACG, Pereira DM, Dourado DM, Silva IS, Oliveira LVF (2009) Morphometric and histological analysis of low-power laser influence on bone morphogenetic protein in bone defects repair. *Lasers Med Sci*. 2009 Sep;24(5):689-95. doi: 10.1007/s10103-008-0595-6.

Dörtbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res*. 2000 Dec;11(6):540-5.

Eduardo CP. Fundamentos de Odontologia: lasers em odontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. 232p.

El-Amin SF, Hogan MV, Allen AA, Hinds J, Laurencin CT. The indications and use of bone morphogenetic proteins in foot, ankle, and tibia surgery. *Foot Ankle Clin*. 2010 Dec;15(4):543-51. doi: 10.1016/j.fcl.2010.08.001.

Fernandes KR, Ribeiro DA, Rodrigues NC, Tim C, Santos AA, Parizotto NA, de Araujo HS, Driusso P, Rennó AC. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats. *J Biomed Opt.* 2013 Mar;18(3):038002. doi: 10.1117/1.JBO.18.3.038002.

Fiorellini JP, Nevins M. Bone regeneration. Repair and regeneration of oral tissues: the molecular approach. *Postgrad Dent.* 1996; 3(2): 3-8.

Fujimura K, Bessho K, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T. Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelopeptide type collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Mar 8;208(1):316-22.

Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Hofling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2003 May-Jun;70(2):81-9.

Geraghty PB, Atwood D, Collett JH, Dandiker Y. The invitro release of some muscarinic drugs from monoolein/water lyotropic liquid crystalline gels. *Pharm Res.* 1996 Aug;13(8):1265-71.

Gerbi ME, Marques AM, Ramalho LM, Ponzi EA, Carvalho CM, Santos RC, Oliveira PC, Nória M, Pinheiro AL. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenetic proteins: an in vivo study in a rodent model. *Photomed Laser Surg.* 2008 Feb;26(1):55-60. doi: 10.1089/pho.2007.2026.

Gordeladze JO, Djouad F, Brondello JM, Noël D, Duroux-Richard I, Apparailly F, Jorgensen C. Concerted stimuli regulating osteo-chondral differentiation from stem cells: phenotype acquisition regulated by microRNAs. *Acta Pharmacol Sin.* 2009 Oct;30(10):1369-84. doi: 10.1038/aps.2009.143.

Guzzardella GA, Fini M, Torricelli P, Giavaresi G, Giardino R. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):216-20.

Hally A. A counting method for measuring the volumes of tissue components in microscopical sections. *Quart J Micr Sci.* 1964;105:503-17.

Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Oda S, Ishikawa I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *J Periodontol.* 1999 Sep;70(9):1026-31.

Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 1996 Jul 1;10(13):1580-94.

Hyde ST, Andersson S, Ericsson B, Larsson KZ. Kristal-logr. 1984;168(1-4), 213-219.

Hyun SJ, Han DK, Choi SH, Chai JK, Cho KS, Kim CK, Kim CS. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol*. 2005 Oct;76(10):1667-74.

Issa JP, Defino HL, Netto JC, Volpon JB, Regalo SC, Iyomasa MM, Siéssere S, Tiossi R. Evaluation of rhBMP-2 and natural latex as potential osteogenic proteins in critical size defects by histomorphometric methods. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010 May;293(5):794-801. doi: 10.1002/ar.21097.

Issa JP, do Nascimento C, Iyomasa MM, Siéssere S, Regalo SC, Defino HL, Sebald W. Bone healing process in critical-sized defects by rhBMP-2 using poloxamer gel and collagen sponge as carriers. *Micron*. 2008;39(1):17-24.

Issa JP, Pitol DL, Iyomasa MM, Barbosa AP, Defino HL, Volpon JB, Shimano AC, Silva P. Collagen fibers evaluation after rhBMP-2 insertion in critical-sized defects. *Micron*. 2009a Jul-Aug;40(5-6):560-2. doi: 10.1016/j.micron.2009.03.003.

Issa JPM, Nascimento C, Lamano-Carvalho TL, Iyomasa MM, Sebald W, Albuquerque RF Jr. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in the acute distraction osteogenesis. *Clin Oral Implants Res*. 2009b Nov;20(11):1286-92. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01799.x.

Iyomasa DM, Garavelo I, Iyomasa MM, Watanabe IS, Issa JP. Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the gerbil. *Micron*. 2009 Jun;40(4):413-8. doi: 10.1016/j.micron.2009.02.002.

Karu T. Photobiological fundamentals of low-power lasers therapy. *IEEE J Quantum* 1987; 23(10):1703-19.

Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B*. 1995 Mar;27(3):219-23.

Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jun;97(6):693-700.

Larsson K. Cubic lipid-water phases: structures and biomembrane aspects. *J Phys Chem*. 1989;93(21):7304-7314. doi: 10.1021/j100358a010.

Linde A, Hedner E. Recombinant bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing, guided by osteopromotive e-PTFE membranes: an experimental study in rats. *Calcif Tissue Int.* 1995 Jun;56(6):549-53.

Lindholm TS, Gao TG. Functional carriers for bone morphogenetic proteins. *Ann Chir Gynaecol Suppl.* 1993;207:3-12.

Lins RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Neto LGC. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An Bras Dermatol.* 2010;85(6):849-855.

Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, da Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006 Dec;24(6):735-40.

Lizarelli RFZ. Protocolos clínicos odontológicos. Uso do laser de baixa intensidade. 2a ed. São Carlos: Bons Negócios Editora; 2005. 90 p.

Lo KW, Ulerly BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 Sep;64(12):1277-91. doi: 10.1016/j.addr.2012.03.014.

Mandarim-de-Lacerda CA. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: Eduerj; 1995. 131p.

Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res.* 1994 Oct;28(10):1127-38.

Marzona L, Pavolini B. Play and players in bone fracture healing match. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2009 May;6(2):159-62.

Matin K, Nakamura H, Irie K, Ozawa H, Ejiri S. Impact of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on residual ridge resorption after tooth extraction: an experimental study in the rat. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001 May-Jun;16(3):400-11.

Matin K, Senpuku H, Hanada N, Ozawa H, Ejiri S. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 around immediate implants: a pilot study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Mar-Apr;18(2):211-7.

Merli LA, Santos MT, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed Laser Surg.* 2005 Apr;23(2):212-5.

Murakami N, Saito N, Horiuchi H, Okada T, Nozaki K, Takaoka K. Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and a synthetic polymer. *J Biomed Mater Res*. 2002 Nov;62(2):169-74.

Murata M, Huang BZ, Shibata T, Imai S, Nagai N, Arisue M. Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1999 Jun;28(3):232-7.

Nascimento SB, Cardoso CA, Ribeiro TP, Almeida JD, Albertini R, Munin E, Arisawa EA. Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. *Photomed Laser Surg*. 2010 Feb;28(1):45-9. doi: 10.1089/pho.2008.2396.

Nicola RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):89-94.

Nielsen LS, Schubert L, Hansen J. Bioadhesive drug delivery systems. I- Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. *Eur J Pharm Sci*. 1998 Jul;6(3):231-9.

Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T. Osteogenesis by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at skeletal sites. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Jun;(375):295-301.

Omasa S, Motoyoshi M, Arai Y, Ejima K, Shimizu N. Low-level laser therapy enhances the stability of orthodontic mini-implants via bone formation related to BMP-2 expression in a rat model. *Photomed Laser Surg*. 2012 May;30(5):255-61.

Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*. 1998 Apr;22(4):347-54.

Pereira NT, Issa JP, Nascimento Cd, Pitol DL, Ervolino E, Cunha MR, Pedrazzi V. Effect of alveolex on the bone defects repair stimulated by rhBMP-2: Histomorphometric study. *Microsc Res Tech*. 2012 Jan;75(1):36-41. doi: 10.1002/jemt.21019.

Pinheiro AL, Limeira Junior Fde A, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA, Soares AO, de Carvalho LC, Lima HC, Gonçalves TO. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *J Clin Laser Med Surg*. 2003 Oct;21(5):301-6.

Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med*. 2007 Dec;39(10):788-96.

Renno AC, de Moura FM, dos Santos NS, Tirico RP, Bossini PS, Parizotto NA. Effects of 830-nm laser light on preventing bone loss after ovariectomy. *Photomed Laser Surg*. 2006 Oct;24(5):642-5.

Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Mar;(324):39-46.

Ruhe PQ, Kroese-Deutman HC, Wolke JG, Spauwen PH, Jansen JA. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials*. 2004 May;25(11):2123-32.

Saracino S, Mozzati M, Martinasso G, Pol R, Canuto RA, Muzio G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. *Lasers Surg Med*. 2009 Apr;41(4):298-304. doi: 10.1002/lsm.20762.

Schneider RA, Helms JA. Development and regeneration of the musculoskeletal system. *Curr Opin Orthop*. 1998 9(6):20-24.

Schwarz F, Ferrari D, Sager M, Herten M, Hartig B, Becker J. Guided bone regeneration using rhGDF-5- and rhBMP-2-coated natural bone mineral in rat calvarial defects. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Nov;20(11):1219-30. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01796.x.

Sela JJ, Bab IA. Principles of bone regeneration. New York: Springer; 2012. 154p.

Shah JC, Sadhale Y, Chilukuri DM. Cubic phase gels as drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Apr 25;47(2-3):229-50.

Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblast and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*. 2008 Apr 1;15:53-76.

Shimazu C, Hara T, Kinuta Y, Moriya K, Maruo Y, Hanada S, Minagi S. Enhanced vertical alveolar bone augmentation by recombinant human bone morphogenetic protein-2 with a carrier in rats. *J Oral Rehabil*. 2006 Aug;33(8):609-18.

Siessere S, Sousa LG, Issa JP, Iyomasa MM, Pitol DL, Barbosa AP, Semprini M, Sebald W, Bentley MV, Regalo SC. Application of low-level laser irradiation (LLLI) and rhBMP-2 in critical bone defect of ovariectomized rats: histomorphometric evaluation. *Photomed Laser Surg*. 2011 Jul;29(7):453-8. doi: 10.1089/pho.2010.2917.

Silva JP, Silva MA, Almeida AP, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):17-21. doi: 10.1089/pho.2008.2372.

Silva Júnior AN, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Med Surg.* 2002 Apr;20(2):83-7.

Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop.* 1998;22(6):410-6.

Somerman M, Hewitt AT, Varner HH, Schiffmann E, Termine J, Reddi AH. Identification of bone matrix-derived chemotactic factor. *Calcif Tissue Int.* 1983 Jul;35(4-5):481-5.

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 Jan;107(1):124-34.

Stancoven BW, Lee J, Dixon DR, McPherson JC 3rd, Bisch FC, Wikesjö UM, Susin C. Effect of bone morphogenetic protein-2, demineralized bone matrix and systemic parathyroid hormone (1-34) on local bone formation in a rat calvaria critical-size defect model. *J Periodontol Res.* 2013 Apr;48(2):243-51. doi: 10.1111/jre.12001.

Takeishi H, Irie K, Okuda K, Ozawa H, Yajima T, Ejiri S. Molded bone augmentation by a combination of barrier membrane and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Oral Dis.* 2001 Sep;7(5):281-6.

Triplett RG, Nevins M, Marx RE, Spagnoli DB, Oates TW, Moy PK, Boyne PJ. Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Sep;67(9):1947-60. doi: 10.1016/j.joms.2009.04.085.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction, *Science.* 1965 Nov 12;150(3698):893-9.

Veillette CJH, McKee MD (2007) Growth factors – BMPs, DBMs, and buffy coat products: are there any proven differences amongst them? *Injury.* 2007 Mar;38 Suppl 1:S38-48.

Vortkamp A, Pathi S, Peretti GM, Caruso EM, Zaleske DJ, Tabin CJ. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev.* 1998 Feb;71(1-2):65-76.

Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel D, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DP, Mcquaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Mar;87(6):2220-4.

Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol*. 1966 Jul;30(1):23-38.

Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev*. 1992 Jun;32(2):160-7.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988 Dec 16;242(4885):1528-34.

Würzler KK, Deweese TL, Sebald W, Reddi AH. Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Craniofac Surg*. 1998 Mar;9(2):131-7.

Zellin G, Linde A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. *J Biomed Mater Res*. 1997 May;35(2):181-90.

Anexo

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 08.1.224.53.6), intitulado: "Influência do Laser de Baixa Intensidade Associada à Proteína Osteoindutora rhBMP-2 no Reparo de Defeitos Ósseos em Calvária de Ratas Wistar com e sem Osteoporose", de autoria de **Selma Siéssere**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 02.07.2008.

Ribeirão Preto, 8 de julho de 2008

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro