UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

JULIANA ALVES PERES

**AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO EM CALVÁRIA DE
RATO APÓS IMPLANTE DE rhMMP-2 LIGADA À MONOLEÍNA**

Ribeirão Preto

2012

JULIANA ALVES PERES

AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO EM CALVÁRIA DE
RATO APÓS IMPLANTE DE rhMMP-2 LIGADA À MONOLEÍNA

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

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Lúcia Colussi Lamano

VERSÃO ORIGINAL

Ribeirão Preto

2012

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTES
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

Peres, Juliana Alves

Avaliação histométrica do reparo de defeito ósseo em calvária de rato após implante de rhMMP-2 ligada à monoleína. Ribeirão Preto, 2012.

69 p.; Il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Programa de Reabilitação Oral, Área de Concentração em Biologia Oral.

Orientadora: Lamano, Teresa

1. Reparo ósseo. 2. Metaloproteinases da matriz (MMPs). 3. MMP-2

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Alves Peres

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: 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 este trabalho,

A Deus, por iluminar meu caminho durante esta jornada, me dar força e sabedoria para enfrentar os momentos difíceis, saúde e proteção durante esta fase de aprendizagem.

Ao meu pai, Miguel Peres, por todo seu esforço para que eu pudesse estudar e estar aqui hoje, e por ser um exemplo de caráter e bondade.

À minha mãe, Lindamar Alves Peres, por estar sempre ao meu lado me aconselhando, ajudando a enfrentar as dificuldades e sempre torcendo por mim.

Aos meus irmãos, Daniel e Gustavo, por estarem comigo durante todos os momentos.

Muito Obrigada meus queridos, é com muito carinho que eu dedico a vocês esta conquista!

AGRADECIMENTOS

A minha sincera gratidão. . .

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), pela oportunidade da realização deste curso e desta pesquisa nesta instituição.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FORP-USP, pelo apoio e viabilização dos recursos para realização inicial desta pesquisa.

Em especial, à minha orientadora, Professora Teresa Lúcia Colussi Lamano, pelo carinho, paciência e atenção durante esses dois anos de mestrado. Admiro-a pela seriedade profissional, pela liderança e pelo entusiasmo que tem em ensinar. Agradeço pelas oportunidades dadas e também pelas cobranças e conselhos nos momentos de erro, que foram muito importantes para minha formação. Terá sempre o meu respeito e profundo carinho, professora.

À minha “co-orientadora”, professora Raquel Fernanda Gerlach, por acreditar na minha capacidade me dando oportunidades valiosas no início do curso e contribuindo para o meu desenvolvimento acadêmico.

Á querida Adriana Mattos, técnica do laboratório, que não hesitou em ajudar durante as cirurgias, sendo de fundamental importância para este trabalho. Obrigada por sua contribuição, por seus ensinamentos, pelo seu carinho, paciência e por sua amizade.

À Prof^a Dr^a Marilisa Guimarães Lara, do laboratório de farmácia homeopática, por ceder seu laboratório para realização de alguns experimentos.

À Lariani Aparecida Delboni, técnica do laboratório de farmácia homeopática, por seu apoio, companhia e amizade.

Aos professores da banca, pelo tempo e atenção dispensados durante a leitura deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Mestrado da FORP, Olívia, Gabriela, Cristiane e Leonardo, pelas oportunidades de aprendizado e crescimento pessoal com o convívio de vocês.

Ao colega de laboratório, César Arruda Meschiari, pelo apoio imprescindível.

À FAPESP, pelo apoio para que este trabalho pudesse ser concluído.

PERES, J. A. Avaliação histométrica do reparo de defeito ósseo em calvária de rato após implante de rhMMP-2 ligada à monoleína. Ribeirão Preto, 2012. 69p. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que degradam componentes da matriz extracelular, facilitando a remodelação tecidual e a migração celular. MMPs secretadas por osteoclastos exercem papel central na absorção óssea fisiológica e estão também associadas a processos de degradação patológica do osso. No entanto, o papel essencialmente “degradador” de osso das MMPs, particularmente da MMP-2, vem sendo questionado em anos recentes por estudos que evidenciam sua importância na diferenciação de células da linhagem osteoblástica e na formação de tecido ósseo em cultura. Neste sentido, é possível que a MMP-2 exerça um papel importante na formação de tecido ósseo em processo de reparação. O objetivo do presente trabalho foi investigar a pretensa ação osteo-estimulatória da rhMMP-2 ligada à monoleína (usada como carreador) implantada em defeito confeccionado na calvária de ratos. Foram confeccionados defeitos ósseos unilaterais de 4 mm de diâmetro na calvária de ratos adultos; nos animais controles o defeito ósseo foi mantido com o preenchimento natural de coágulo sanguíneo e nos animais implantados o defeito foi preenchido com monoleína ou com rhMMP-2 ligada à monoleína. Os animais foram eutanasiados após 2 e 4 semanas e a taxa de neoformação óssea foi estimada em cortes histológicos por um método histométrico de contagem diferencial de pontos. A taxa de neoformação óssea foi semelhante nos animais dos grupos controle e monoleína e significativamente maior nos animais do grupo MMP-2, em ambos os períodos analisados. Os resultados permitem concluir que a monoleína não interferiu com o processo reparacional e pareceu eficaz como carreador da rhMMP-2, e adicionam evidências à hipótese da importância da atividade da MMP-2 para a formação óssea, em um modelo experimental *in vivo* de reparo ósseo.

Palavras-Chave: Reparo ósseo, Metaloproteinases da matriz (MMPs), MMP-2

PERES, J. A. Histometric evaluation of bone healing after implantation with rhMMP-2 linked to monoolein into rat calvarial defects. Ribeirão Preto, 2012. 69p. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent proteolytic enzymes that degrade extracellular matrix components, facilitating cell migration and tissue remodeling. MMPs secreted by osteoclasts are important in the physiological bone resorption as in pathological bone degradation. However, the essentially bone absorbing hole of MMPs, particularly of the MMP-2, has been questioned in recent years by studies that show its importance in osteoblastic cells differentiation and *in vitro* bone formation. Therefore, the MMP-2 may have also an important role in reparational bone formation. The purpose of the present study was to investigate the putative osteostimulatory effect of the rhMMP-2 linked to monoolein (used as a carrier) implanted into rat calvarial defects. Bone defects of 4mm in diameter were created unilaterally in rats calvaria and filled with natural blood clot (control), monoolein or rhMMP-2 linked to monoolein. The animals were killed 2 and 4 weeks postoperatively and the rate of new bone formation was estimated in histological sections by a histometric differential point-counting method. The rate of reparational bone formation was similar in the animals from control and monoolein groups and was significantly greater in the MMP-2 group, in both periods. From the results it may be concluded that monoolein did not interfere with the reparational process and seemed effective as a rhMMP-2 carrier. In addition, the results add evidence to the importance of MMP-2 activity for bone formation, in an *in vivo* bone healing experimental model.

Key Words: Bone healing, Matrix metalloproteinases (MMPs), MMP-2

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1. Remodelação e Regeneração Ósseas	13
2.3. Biomateriais para Substituição de Tecido Ósseo	14
2.4. Fatores de Crescimento e Diferenciação	17
2.5. Carreadores	18
2.6. Terapia Gênica	21
2.7. Metaloproteinases da Matriz (MMPs)	21
3. PROPOSIÇÃO	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Biomateriais: Origem, Ligação, Ensaios de Pureza, Liberação e Atividade	26
4.2. Animais Experimentais	26
4.3. Procedimento Cirúrgico	27
4.4. Sacrifício, Coleta e Processamento Histológico	29
4.5. Exame Histológico, Análises Histométrica e Estatística	29
5. RESULTADOS	31
5.1. Exame Histológico	32
5.2. Análise Histométrica	42
6. DISCUSSÃO	46
6.1. Modelo Experimental	47
6.2. Análise Histológica	48
6.3. Análise Histométrica – Fator Associado ao Modelo Experimental	49
6.4. Análise Histométrica – Monoleína como Carreador	49
6.5. Análise Histométrica – Efeito Osteo-estimulatório da rhMMP-2	50
6.6. Metaloproteinases e Citocinas Inflamatórias	51
7. CONCLUSÃO	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
9. APÊNDICES	63

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Defeitos ósseos de grandes dimensões, congênitos ou devidos a doenças ou traumas, costumam ser problemas médicos ou odontológicos de difícil solução que, deixados ao seu livre curso, não se resolvem ou o fazem muito lentamente e de forma incompleta. Situações como essas se beneficiam do uso de biomateriais que substituam o tecido ósseo perdido ou estimulem a osteogênese reparacional.

Há no mercado uma variedade de biomateriais orgânicos e sintéticos diferentes quanto à origem, método de preparação, composição química, características estruturais e, portanto, quanto às propriedades e à resposta que evocam nos tecidos biológicos. Apesar dos avanços científico e tecnológico nesta área, ainda não existe um material que preencha todos os requisitos para garantir o sucesso de sua utilização clínica. Os resultados mais previsíveis ainda são obtidos com os enxertos ósseos autógenos que, não obstante, apresentam inconvenientes para sua utilização. As alternativas incluem os implantes ósseos homogêneos e heterogêneos, proteínas morfogenéticas ósseas e uma diversidade de substitutos ósseos sintéticos. Permanece, portanto, o interesse pelo desenvolvimento de novos materiais que substituam o osso humano e/ou favoreçam a regeneração óssea.

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas que regulam a composição da matriz extracelular, por sua capacidade de degradar componentes da matriz, facilitando a remodelação tecidual e a migração celular. Existe também clara associação entre atividade aumentada de várias MMPs e perda óssea, em diversas situações patológicas. Evidências recentes, no entanto, questionam o papel essencialmente “degradador” de osso das MMPs, particularmente da MMP-2, que apresenta altos níveis de atividade em cultura de células osteogênicas e tem sua expressão aumentada nos eventos iniciais de osteointegração de implantes. Uma indicação recente da importância da MMP-2 para a manutenção da normalidade do tecido ósseo foi a descrição de uma mutação que a inativa e produz um fenótipo osteolítico grave em adultos.

O objetivo do presente trabalho foi investigar a possível ação osteoestimulatória da MMP-2 implantada em defeito confeccionado em calvária de ratos.

_____ ***REVISÃO DA LITERATURA***

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Remodelação e Regeneração Ósseas

O tecido ósseo tem papel fundamental no suporte, sustentação e proteção dos órgãos, além de representar a maior reserva de cálcio do organismo, disponibilizando-o para permitir a homeostasia deste íon no sangue. Para cumprir adequadamente estas funções, sofre continuamente processos de formação e absorção que se sucedem no tempo e/ou no espaço (remodelação óssea). O osso alveolar tem particularidades associadas à sua função como suporte primário dos elementos dentários, estando sujeito à remodelação rápida e contínua decorrente da erupção dos dentes, das demandas funcionais da mastigação e das adaptações posicionais (Sodek e McKee, 2000).

A remodelação óssea envolve, por um lado, a formação e mineralização da matriz (a cargo dos osteoblastos), e por outro sua absorção (a cargo dos osteoclastos). A completa diferenciação celular, bem como a atividade funcional plena e adequada, responsáveis pela formação e absorção de matriz num ritmo e duração necessários para a normalidade do tecido ósseo, dependem da comunicação e interação entre as células das linhagens osteoblástica e osteoclástica.

Os osteoblastos estimulam e modulam a diferenciação e função dos osteoclastos produzindo citocinas, tais como fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-1 e, IL-6), fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF), ligante do receptor de fator de transcrição nuclear beta (RANKL), que se ligam diretamente às células precursoras da linhagem osteoclástica (Teitelbaum, 2000; Phan *et al.*, 2004). Estimulados por estas citocinas, os osteoclastos liberam ácidos e proteases (catepsinas, metaloproteinases) que dissolvem a parte mineral e degradam a matriz orgânica promovendo sua dissolução progressiva e a conseqüente liberação de fatores de crescimento e diferenciação ali armazenados. Os fatores de crescimento derivados do osso estimulam a diferenciação e atividade dos osteoblastos, destacando-se entre eles o fator de crescimento de plaquetas (PDGF), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fator transformador de crescimento β (TGF- β), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e as proteínas morfogenéticas ósseas

(BMPs) (Devescovi *et al.*, 2008). Os osteócitos, a etapa final da diferenciação dos osteoblastos, utilizam sinais derivados da clivagem do colágeno para se comunicarem entre si e com osteoblastos e osteoclastos localizados na superfície da matriz; na ausência desta sinalização, os diferentes tipos de células ósseas sofrem apoptose (Krane e Inada, 2008).

O tecido ósseo tem reconhecida capacidade de regeneração espontânea e seu reparo envolve uma cascata complexa de eventos biológicos regulados por células e por fatores de crescimento secretados pelas próprias células ósseas e também por células reativas presentes no local da injúria, que agem de forma coordenada para estimular a migração, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras e a neoformação vascular (Luginbuehl *et al.*, 2004; Devescovi *et al.*, 2008). No entanto, defeitos ósseos de grandes dimensões, congênitos ou decorrentes de doenças, traumas ou cirurgias, costumam ser problemas médicos e odontológicos de difícil solução que, deixados ao seu livre curso, não se resolvem ou o fazem muito lentamente e de forma incompleta. Situações como essas se beneficiam do uso de estratégias que visam estimulação da osteogênese reparacional ou a substituição do tecido ósseo perdido.

2.2. Biomateriais

Biomaterial é um material natural ou sintético destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir um órgão, tecido ou função do organismo (Williams, 1999). Os biomateriais podem ter origem autógena (material orgânico obtido e empregado no mesmo indivíduo), homogênea (material orgânico obtido de outro indivíduo da mesma espécie), heterogênea (material orgânico obtido de indivíduo de espécie diferente) ou serem sintéticos (aloplásticos) de natureza metálica, cerâmica ou plástica (Moore *et al.*, 2001; Perri de Carvalho *et al.*, 2004).

O requisito mínimo para implantação de um material no interior de tecidos biológicos é a biocompatibilidade, definida como a habilidade de um biomaterial em desempenhar a função terapêutica desejada, sem desencadear qualquer efeito local ou sistêmico indesejável no hospedeiro, gerando uma resposta celular ou tissular o mais benéfica possível na situação específica e otimizando a performance clínica daquela terapia (Williams, 2008). Qualquer material estranho colocado acidental ou

deliberadamente no interior dos tecidos vivos provoca uma resposta, e não é a resposta em si, mas sua extensão, intensidade e duração que definem a biocompatibilidade. A resposta ideal dos tecidos biológicos a um biomaterial é aquela em que a resposta inflamatória inicial decorrente do ato cirúrgico é rapidamente resolvida, sem a permanência de infiltrado inflamatório crônico ou desenvolvimento de resposta imunológica. Para que um biomaterial cumpra sua função biológica com sucesso, além de ser biocompatível, deve possuir características como previsibilidade, aplicabilidade clínica, ausência de riscos trans-operatórios e sequelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação pelo paciente. Espera-se ainda que ele não seja carcinogênico, que apresente estabilidade química e biológica, resistência mecânica e elástica adequadas e tenha baixo custo (Boss *et al.*, 1995).

2.3. Biomateriais para Substituição de Tecido Ósseo

Existe grande interesse científico e clínico quanto ao desenvolvimento de materiais que substituam, em parte ou na totalidade, ossos humanos e/ou favoreçam a regeneração óssea, tanto no complexo craniofacial como em outras partes do esqueleto. Para utilização como substitutos ósseos, espera-se que os materiais apresentem propriedades de osteocondução (materiais que funcionam como uma superfície de suporte para adesão e proliferação de células osteoblásticas, que promovem na seqüência a formação de tecido ósseo mineralizado), osteoindução (materiais que contêm proteínas indutoras normalmente presentes na matriz orgânica do tecido ósseo e são capazes de induzir diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos ou osteoblastos), osteogênese (materiais que possuem osteoblastos viáveis, capazes de determinar a formação de novo osso quando enxertados no tecido hospedeiro) e/ou osteopromoção (materiais que se constituem em barreiras físicas para o isolamento anatômico do local em reparação, visando à seleção das células que promovem o reparo, ao mesmo tempo em que excluem células concorrentes inibitórias) (Moore *et al.*, 2001; Perri de Carvalho *et al.*, 2004).

Nas clínicas médica e odontológica tem-se utilizado uma grande diversidade de biomateriais orgânicos e sintéticos que diferem quanto à origem, método de preparação, composição química, características estruturais e, portanto, quanto às propriedades e à resposta que evocam nos tecidos biológicos. Os resultados mais

previsíveis para estimular a regeneração ou substituir o tecido ósseo ainda são obtidos com os enxertos ósseos autógenos porosos que, além de terem osteoblastos viáveis e fornecerem fatores de indução óssea, possuem uma estrutura porosa que favorece o crescimento fibrovascular e osteogênico em seu interior; no entanto, eles têm a inconveniência da morbididade cirúrgica da fonte doadora e da disponibilidade limitada (Moore *et al.*, 2001; Geiger *et al.*, 2003; Sanada *et al.*, 2003). As alternativas incluem os implantes ósseos homogêneos e heterogêneos e uma diversidade de substitutos ósseos sintéticos (Perri de Carvalho *et al.*, 2004). Os implantes ósseos homogêneos são originados de ossos de cadáveres humanos e, apesar de todos os cuidados em seu processamento, apresentam risco potencial de desencadear infecção ou reação imune no hospedeiro e têm necessidade de armazenamento especial (Moore *et al.*, 2001; Geiger *et al.*, 2003; Sanada *et al.*, 2003), o que resulta nos altos custos dos bancos de ossos. Os implantes ósseos heterogêneos são obtidos de outras espécies animais e, dada a abundância e baixo custo do osso bovino, aliados ao processamento adequado que minimiza os riscos de transmissão de infecção, diversas empresas nacionais, canadense e européias têm produzido implantes ósseos bovinos para utilização nas práticas médica e odontológica (Sanada *et al.*, 2003).

Desde o início da década de 70, uma variedade de substitutos ósseos sintéticos têm sido desenvolvidos na tentativa de minimizar as dificuldades inerentes à utilização dos enxertos ósseos autógenos e dos implantes ósseos homogêneos e heterogêneos. Os materiais aloplásticos mais comumente utilizados na área médico-odontológica são os metais ou ligas metálicas, as cerâmicas, os polímeros, os compósitos e os vidros bioativos (Moore *et al.*, 2001). Apesar da grande variedade de materiais orgânicos e sintéticos capazes de substituir o tecido ósseo ou de estimular a osteogênese reparacional, e em que pese o avanço crescente no seu desenvolvimento e aperfeiçoamento, ainda não existe um material que preencha todos os requisitos desejados.

Adicionalmente ao uso dos biomateriais convencionais, a estimulação bioquímica local com BMPs ou com outros fatores de crescimento e diferenciação, separadamente ou em conjunto, pode representar uma alternativa vantajosa em procedimentos que visem à reconstrução ou preenchimento de falhas ósseas, por suplantarem muitas das dificuldades e inconvenientes apresentados pela utilização dos enxertos ósseos (Fischer *et al.*, 2011). No entanto, definir as doses e sequência

temporal adequadas à cascata dos eventos reparatórios tem sido um desafio para pesquisadores de diferentes áreas da saúde.

2.4. Fatores de Crescimento e Diferenciação

A matriz orgânica do osso é rica em fatores de crescimento e diferenciação e dentre eles destacam-se as BMPs, que são sintetizadas e secretadas pelos osteoblastos e incorporadas à matriz durante a formação óssea. Embora tenham sido descobertas por sua habilidade em induzir formação óssea ectópica (Urist, 1965), sabe-se hoje que as BMPs desempenham numerosas funções nos processos de embriogênese, formação do esqueleto, hematopoiese e neurogênese. No momento são conhecidas 20 BMPs, que pertencem à superfamília do TGF- β (Dimitriou e Giannoudis, 2005), e duas se destacam pela capacidade osteoindutora, as BMPs-2 e -7 (Geiger *et al.*, 2003). As BMPs, liberadas da matriz durante a absorção óssea osteoclástica, induzem a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, estimulando a formação de osso nos processos de remodelação e reparo (Phan *et al.*, 2004).

Em estudos pré-clínicos, realizados com diferentes espécies animais, as BMPs mostraram-se eficientes na promoção do reparo de defeitos de ossos de diferentes naturezas (calvária, ossos longos, mandíbula e maxila), inclusive na promoção do reparo de defeitos de tamanho crítico (com dimensões que impossibilitam a neoformação óssea, resultando em formação de tecido fibroso cicatricial) (Caúla *et al.*, 1999; Dimitriou e Giannoudis, 2005). Particularmente as BMPs recombinantes humanas rhBMP-2 e rhBMP-7 têm sido utilizadas com aparente sucesso na recuperação de lesões ósseas nas clínicas ortopédica e dentomaxilofacial (Geiger *et al.*, 2003; Dimitriou e Giannoudis, 2005). No entanto, alguns trabalhos discutem a segurança e eficácia do uso clínico de BMPs, relatando a formação óssea excessiva e a possibilidade de toxicidade, imunogenicidade e carcinogênese, associadas ao uso de doses excessivas da proteína e/ou ao colágeno utilizado como seu carreador (Dimitriou e Giannoudis, 2005). Além disso, o uso clínico de BMPs tem apresentado grande variabilidade nas respostas individuais, comparativamente aos resultados obtidos em animais (Groeneveld e Burger, 2000 *apud* Dimitriou e Giannoudis, 2005). A dificuldade para utilização clínica das BMPs está no fato de que, por serem solúveis e rapidamente difusíveis nos meios biológicos, para atingirem a máxima eficácia sem a necessidade de doses

excessivamente altas elas devem ser associadas a um material carreador que promova sua liberação contínua, num ritmo compatível com o da neoformação óssea (Geiger *et al.*, 2003; Dimitriou e Giannoudis, 2005; Calixto *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2011).

Outros fatores de crescimento e diferenciação (FGFs, IGFs, TGF- β , PDGF, VEGFs), usados isolada ou conjuntamente, têm apresentado resultados positivos em diferentes modelos experimentais de defeito ósseo (Blumenfeld *et al.*, 2002), com alguns resultados contraditórios, indicando a necessidade de mais estudos para definir as melhores estratégias para disponibilizar estes fatores no local da injúria e para estabelecer as doses e sequência de aplicação mais adequadas (Oreffo, 2004; Devescovi *et al.*, 2008; Schmidmaier *et al.*, 2008). Além disso, existe um número limitado de avaliações clínicas controladas para garantir sua eficácia, sendo necessários mais estudos antes de seu uso clínico, sobretudo em vista do alto custo da produção de fatores de crescimento recombinantes (Devescovi *et al.*, 2008).

O gel de plaquetas (PG) ou plasma rico em plaquetas (PRP), um produto sanguíneo rico em plaquetas produzido por método simples e de baixo custo, libera uma diversidade de fatores de crescimento e diferenciação (VEGFs, IGFs, TGF- β , PDGF, EGF) e é uma alternativa possível ao uso de fatores de crescimento recombinantes, com a vantagem de reproduzir uma condição fisiológica pela combinação desses fatores. No entanto, a eficácia de seu uso experimental ou clínico, isoladamente ou em combinação com implantes ósseos e/ou células mesenquimais da medula óssea, tem sido contestada (Devescovi *et al.*, 2008; Giovanini *et al.*, 2010; Kotsovilis *et al.*, 2011), alegadamente devido a fatores ligados à sua preparação, à utilização em quantidade insuficiente ou à presença de quantidade significativa de TGF- β , que sabidamente é um dos principais estimuladores da síntese e deposição de colágeno e do desenvolvimento de fibrose (Giovanini *et al.*, 2010).

2.5. Carreadores

São considerados requisitos para um carreador ideal de BMPs (ou de outros fatores de crescimento) que eles sejam biocompatíveis e não-tóxicos, que apresentem baixa imunogenicidade, que formem uma interface com os tecidos circundantes, que tenham afinidade pelas BMPs e pelo tecido ósseo e protejam as

BMPs contra atividades proteolíticas do meio, que sejam passíveis de esterilização e apresentem estabilidade mecânica, maleabilidade e geometria adequada (forma, tamanho, porosidade) para permitir infiltração de células e vasos sanguíneos. Mas a principal característica de um carreador é que ele sofra degradação biológica contínua e controlada, retendo as BMPs pelo tempo necessário ao reparo e permitindo sua liberação em um ritmo compatível com o da neoformação óssea (Groeneveld e Burger, 2000; Weber *et al.*, 2002; Geiger *et al.*, 2003; Dimitriou e Giannoudis, 2005; Calori *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2011).

Dentre os carreadores testados experimentalmente estão os componentes da matriz extracelular, isolados ou combinados (colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanas), a matriz óssea mineral ou desmineralizada, os materiais sintéticos (as cerâmicas como fosfato tricálcio e hidroxiapatita na forma de blocos, grânulos e discos; os polímeros particulados ou em forma de discos; os biovidros; os ácidos polilático e poliglicólico e seus copolímeros), os compósitos (pó de dentina-condroitinsulfato-colágeno e hidroxiapatita-colágeno) e os metais (Groeneveld e Burger, 2000; Weber *et al.*, 2002; Geiger *et al.*, 2003; Dimitriou e Giannoudis, 2005; Issa *et al.*, 2008; Calori *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2011).

BMPs associadas a carreadores diversos tem sido testadas em diferentes situações experimentais com resultados contraditórios, provavelmente devido aos inúmeros fatores que podem interferir, dentre eles a concentração/dose de BMPs e o tipo de carreador utilizado, uma vez que a cinética da retenção/liberação é determinante da eficácia osteoindutora (Groeneveld e Burger, 2000; Weber *et al.*, 2002; Geiger *et al.*, 2003; Calixto *et al.*, 2007). Muitos sistemas carreadores apresentam limitações em termos de biodegradabilidade, reações inflamatória e imunogênica, transmissão de doenças e, mais importante, inabilidade em promover liberação contínua e controlada da proteína no local de interesse (Calixto *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2011).

A eficácia em promover liberação controlada de fatores de crescimento para estimular a osteogênese reparacional está intimamente associada à forma de incorporação da proteína ao seu carreador e à necessidade específica de uso. A incorporação pode se dar: a) pela simples imersão do carreador em uma solução do fator de crescimento, que permanece adsorvido à sua superfície, para uso imediato ou após prévia liofilização e estocagem; b) pela ligação das moléculas do fator de crescimento à superfície do carreador; c) pela incorporação do fator de crescimento

à matriz do carreador. Considera-se que para um carreador não degradável, portanto um material permanente, a ligação do fator de crescimento à sua superfície seria o procedimento adequado. Para carreadores biodegradáveis, idealmente num ritmo compatível com o da neoformação óssea, a incorporação dos fatores de crescimento à sua matriz seria o ideal, por permitir a liberação gradual do fator de crescimento durante sua degradação. A simples adsorção do fator de crescimento à superfície do carreador é inadequada do ponto de vista da cinética do reparo ósseo (Schliephake, 2010).

Há numerosos relatos de efeitos benéficos da rhBMP-2 carregada por esponja de colágeno, estimulando, em humanos e em diferentes espécies animais, o reparo de fratura de ossos longos, o reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico produzidos na mandíbula, em rádio e em fêmur, o ritmo de fusão espinhal, a formação de osso alveolar visando à colocação de implantes metálicos, o reparo/reconstrução do *sinus* maxilar, o aumento do assoalho do seio maxilar e da crista alveolar, a preservação da crista alveolar após extração dentária (Geiser *et al.*, 2003; Devescovi *et al.*, 2008). Um gel de monoleína foi usado como carreador de rhBMP-2 em um modelo de distração osteogênica aguda em mandíbula de rato, e os resultados sugeriram sua eficácia em garantir a liberação da proteína, que estimulou a osteogênese reparacional no grupo tratado (Issa *et al.*, 2009). Adicionalmente, materiais de naturezas diversas formulados como nano ou micropartículas tem sido testados em modelos animais como carreadores de BMPs, abrindo novas perspectivas para o tratamento de lesões ósseas com fatores de crescimento e diferenciação (Calori *et al.*, 2009).

Estão comercialmente disponíveis para utilização clínica, aprovadas por agências regulatórias americana e européias, as rhBMPs-2 e -7 utilizando como carreador o colágeno bovino tipo 1, particulado ou na forma de esponja (Geiger *et al.*, 2003; Dimitriou e Giannoudis, 2005; Devescovi *et al.*, 2008). Permanece, no entanto, a necessidade de mais investigações para elucidar o sistema carreador ideal, a dose adequada e a real concentração de BMPs no sítio da lesão, pois os sistemas carreadores disponíveis para utilização clínica ainda requerem altas doses de BMPs para se alcançar o resultado osteogênico desejado, levantando questionamentos quanto à segurança e ao alto custo.

2.6. Terapia Gênica

Alternativamente ao tratamento de perdas tissulares pela aplicação direta de fatores de crescimento e diferenciação (terapia protéica), está sendo investigada a terapia gênica, que consiste na inserção de genes codificadores em células do hospedeiro para induzir a expressão de moléculas envolvidas na resposta regenerativa. Na terapia gênica local, o DNA codificador pode ser introduzido diretamente no sítio de interesse (transdução *in vivo*) ou ser introduzido em células coletadas do hospedeiro que, após expansão em cultura, são re-implantadas no sítio de interesse (transdução *in vitro*). No processo de transferência do gene, visando intensificar a entrada do DNA no núcleo da célula alvo e consequentemente aumentar a expressão gênica, têm sido utilizados vetores virais (transdução) e não-virais (transfecção). Da mesma forma que se discutiu acerca dos carreadores de proteínas, os possíveis vetores devem apresentar um conjunto de características que os habilite a cumprir adequadamente sua função. Os vetores virais têm a vantagem da alta eficiência de transdução (introdução do DNA no núcleo da célula alvo), mas concomitantemente a desvantagem do risco de imunogenicidade, enquanto os vetores não-virais apresentam menor eficiência de transfecção. O vetor ideal ainda não foi concebido. Já existem relatos de resultados promissores da utilização de terapia gênica para regeneração óssea em modelos animais, mas antes da possibilidade de sua utilização clínica tem que ser investigada a segurança do uso dos vetores virais (Dimitriou e Giannoudis, 2005; Devescovi *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2011).

2.7. Metaloproteinases da Matriz (MMPs)

As MMPs formam o maior grupo de enzimas que regulam a composição da matriz extracelular e são essenciais em vários processos biológicos normais, como os relacionados com o desenvolvimento embrionário e a morfogênese. Elas são proteases dependentes de cálcio e zinco, com capacidade de degradar componentes da matriz extracelular facilitando a remodelação tecidual e a migração celular (Woessner, 2001). As MMPs secretadas por osteoclastos exercem papel central na absorção óssea fisiológica verificada no ciclo de remodelação (Phan *et al.*, 2004).

A MMP-1, a primeira a ser descrita, é a enzima responsável pela perda da cauda do girino (Gross e Lapiere, 1962), sendo, pois, associada a um processo de lise acentuado. Em processos patológicos caracterizados pela degradação de colágeno no corpo humano, incluindo o tecido ósseo, as MMPs estão aumentadas. Há evidências de níveis aumentados de MMPs no líquido sinovial de articulações inflamadas (Yokohama *et al.*, 1995; Takagi *et al.*, 1998; Takei *et al.*, 1999) e nos tecidos e fluidos que circundam implantes que falharam (Takei *et al.*, 1999). A doxíciclina, usada em doses sem efeito antimicrobiano para diminuir a perda óssea relacionada à doença periodontal, tem seu efeito fundamentado na inibição de MMPs (Ryan *et al.*, 1996).

Entretanto, nos últimos anos o papel essencialmente “degradador” de osso das MMPs, particularmente da MMP-2, vem sendo questionado por estudos que evidenciam sua importância nos eventos iniciais de formação de osso em cultura de células (Karsdal *et al.*, 2002; Shubayev *et al.*, 2004; Oum'hamed *et al.*, 2004). Portanto, embora as MMPs sejam consideradas, no geral, proteases osteolíticas, numerosas evidências apontam para a importância da atividade da MMP-2 na diferenciação de células da linhagem osteoblástica. Neste sentido, é possível que a MMP-2 exerça um papel importante na formação de tecido ósseo em processo de reparação.

PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi investigar a pretensa ação osteoestimulatória da rhMMP-2 ligada à monoleína (carreador), implantada em defeito confeccionado na calvária de ratos.

O reparo ósseo foi avaliado pela estimativa da fração de trabéculas ósseas neoformadas, por método histométrico, nos períodos de 2 e 4 semanas após a cirurgia.

Para tanto, foram comparados defeitos controles (com preenchimento natural de coágulo sanguíneo), defeitos implantados apenas com monoleína e defeitos implantados com rhMMP-2 ligada à monoleína.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Biomateriais: Produção, Ligação, Ensaios de Pureza, Liberação e Atividade

A rhMMP-2 utilizada no presente trabalho foi produzida em bactéria geneticamente modificada (*Escherichia Coli*, linhagem BL21-PLys), pela tecnologia do DNA recombinante. Sua produção, assim como a ligação com a monoleína e os testes de pureza e atividade da proteína, foram feitos no laboratório da Prof. Dra. Raquel F. Gerlach, do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia e Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP/USP). Os testes de liberação após a mistura da proteína com monoleína foram feitos no laboratório da Prof. Dra. Marilisa Guimarães Lara, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FCFRP/USP).

O material utilizado como carreador da rhMMP-2 foi a monoleína em solução aquosa, preparada a partir de monoglicerídeos destilados de óleo de canola (Myverol 18-99, Eastman Chemical Company, Tennessee, United States), gentilmente cedida pela Prof. Dra. Marilisa Guimarães Lara (Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP), onde também foi realizada parte dos testes de liberação da proteína.

Detalhes dos materiais, equipamentos e procedimentos experimentais pertinentes constam do Apêndice.

4.2. Animais Experimentais

Foram utilizados inicialmente 60 ratos Wistar adultos (cerca de 600 g de peso corporal), procedentes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em número de dois por caixa de polietileno (41x34x16cm), em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ} \text{C}$) e iluminação (12 h de iluminação diária) e receberam ração comercial e água a vontade. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus da USP de Ribeirão Preto (Processo 10.1.1305.53.2).

4.3. Procedimento Cirúrgico

Os animais foram pesados e anestesiados com solução de Cloridrato de Cetamina 10% (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil; 75 mg/kg) associada à Xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha; 10 mg/kg por via intraperitoneal), na dose de 0,2 mL de solução/100 g de peso corporal. Após anestesia, com o animal posicionado em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica, procedeu-se à tricotomia, seguida de anti-sepsia com álcool 70% e de incisão dos tecidos cutâneo e muscular de aproximadamente 3 cm de extensão, no sentido ântero-posterior, na região central da calvária, utilizando-se lâmina de bisturi estéril número 15 montada em cabo de bisturi número 3.

Os tecidos moles foram divulsionados com tesoura de pontas rombas para exposição do perióstio, e este foi incisado no mesmo sentido dos tecidos cutâneos, com lâmina de bisturi estéril número 15, e em seguida divulsionado cuidadosamente de modo a expor a superfície óssea desejada dentro de um campo cirúrgico estéril. Um defeito ósseo esférico foi criado no osso frontal, do lado direito da sutura sagital mediana, utilizando-se uma broca trefina (Broca Trephine 4mm MK Dent) adaptada no contra-ângulo de um micromotor (Kavo), com 20.000 rpm. Procedeu-se à perfuração completa da tábua óssea, mantendo-se a integridade das meninges e criando-se um defeito esférico de 4 mm de diâmetro e cerca de 1,5 mm de espessura. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado sob irrigação constante e abundante com soro fisiológico estéril a 0,9%.

Nos animais controles, o defeito ósseo foi mantido com o preenchimento natural de coágulo sanguíneo. Nos animais dos grupos tratados, o defeito ósseo foi preenchido com biomaterial (monoleína ou metaloproteínase ligada à monoleína), com consistência de gel, utilizando-se uma espátula número 5 estéril e procurando-se o completo preenchimento do defeito, mas evitando-se o extravasamento (cerca de 75 mg de material por defeito ósseo). Na sequência, o perióstio foi rebatido e suturado com fio catgut 5-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) e o tecido cutâneo suturado com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). Finalizada a cirurgia, os animais receberam uma única dose (0,2 mL/100 mg de peso corporal, via intramuscular) de penicilina (Pentabiótico Veterinário para animais de pequeno porte - Fort Dodge[®],

Campinas, SP, Brasil) e permaneceram sob observação diária, sendo feita a limpeza das caixas e a troca da maravalha três vezes por semana.

Figura 1. Sequência cirúrgica de criação do defeito ósseo na calvária de rato.

Alguns animais morreram durante ou logo após a cirurgia. Adicionalmente, os animais em que a análise histológica revelou a presença de exsudato purulento, indicativo de infecção, não foram utilizados para a histometria. Os 44 animais restantes passaram a constituir 3 grupos experimentais:

- **Grupo Controle:** os defeitos ósseos foram mantidos com o preenchimento natural de coágulo sanguíneo e os animais foram sacrificados após 2 ($n = 9$) e 4 semanas ($n = 9$);
- **Grupo Monoleína:** os defeitos ósseos foram preenchidos com monoleína (carreador) e os animais foram sacrificados após 2 ($n = 3$) e 4 semanas ($n = 7$);
- **Grupo MMP-2:** os defeitos ósseos foram preenchidos com rhMMP-2 ligada à monoleína e os animais foram sacrificados após 2 ($n = 7$) e 4 semanas ($n = 9$).

4.4. Sacrifício, Coleta e Processamento Histológico

Nos períodos de 2 e 4 semanas após a cirurgia, os animais receberam uma dose excessiva de anestésico (0,4 mL/100 g peso corporal, via intraperitoneal) e, após constatação da morte, foram decapitados. Após remoção da mandíbula e dos tecidos cutâneos, a calvária foi fixada por imersão em solução de formol 10% durante 48 h, descalcificada (por 6 dias em solução de citrato de sódio 20% e ácido fórmico 30%, trocando-se a solução a cada 48 h) e lavada em água corrente por 24 horas. Nesta fase, foi feita uma segunda aparação para obtenção dos defeitos ósseos circundados por osso frontal hígido e com uma lâmina delgada de tecido cerebral subjacente, que garantiram sua sustentação. Na sequência, as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina, orientadas de maneira a permitir cortes semi-seriados longitudinais de 6 μ m de espessura (aproveitamento-se 1 a cada 11 cortes), iniciando pela borda lateral mediana do defeito, que foram corados pela Hematoxilina e Eosina.

4.5. Exame Histológico, Análises Histométrica e Estatística

Foi realizado exame histológico de todos os cortes presentes em todas as lâminas de cada animal. Para a histometria, foram selecionadas $4,5 \pm 0,3$ (média $\pm$ erro padrão da média) secções histológicas por animal, evitando-se secções contíguas e procurando-se manter eqüidistância entre elas.

Análise Histométrica. O reparo ósseo foi avaliado pela estimativa da quantidade de trabéculas ósseas neoformadas, utilizando-se um microscópio óptico (Zeiss Axiostar Plus, Gottingen, Germany) munido de câmera digital de vídeo para captura de imagens (Zeiss AxioCam IC, Gottingen, Germany) e um programa para histometria de domínio público (Image J, version 1.38, disponível no sítio www.mcbiophotonics.ca/imagej). Dentre as alternativas oferecidas pelo programa de histometria, optou-se pela contagem diferencial de pontos, utilizando-se uma grade de 638 pontos eqüidistantes (intersecção de 22 por 29 linhas) que se sobrepunham aos diferentes componentes de preenchimento do defeito ósseo em reparação (tecido de granulação, trabéculas ósseas neoformadas, tecido conjuntivo medular). Considera-se que a quantidade de pontos contados sobre cada componente seja proporcional ao volume relativo ocupado por ele.

Em cada secção histológica selecionada foram sobrepostas 4 grades, duas na borda esquerda da imagem histológica do defeito (uma da margem do defeito em direção ao seu interior e uma da margem do defeito em direção ao osso frontal contíguo) e duas na borda direita, obedecendo ao mesmo critério (figura 2).

Figura 2. Representação esquemática das bordas esquerda (E) e direita (D) de secção histológica de defeito ósseo, mostrando trabéculas ósseas neoformadas em área subperiosteal (1a, 1b), por remodelação interna do osso frontal (2) e avançando centripetamente para o interior do defeito (3). OF = osso frontal; md = margem do defeito; G1, G2, G3, G4 = grades para contagem diferencial de pontos (os pontos são representados pela intersecção das linhas perpendiculares, sendo 22 linhas horizontais e 29 verticais).

Foram contados $4798,2 \pm 272,9$ (média $\pm$ erro padrão da média) pontos por animal (apenas aqueles que se situavam sobre os componentes do reparo) e o volume de trabéculas ósseas neoformadas foi estimado pela quantidade de pontos contados sobre elas. Nas imagens utilizadas para estimativa da neoformação óssea também foram realizadas medidas da extensão dos defeitos, utilizando-se o mesmo programa de histometria.

Análise Estatística. A análise da evolução temporal do reparo ósseo (de 2 para 4 semanas), bem como a comparação da quantidade de pontos sobre trabéculas ósseas neoformadas entre os 3 grupos experimentais (Controle *versus* Monoleína *versus* MMP-2) foram feitas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação múltipla de amostras independentes, seguido do teste de Mann-Whitney para comparação de amostras 2 a 2, utilizando-se um programa de estatística de domínio público (GraphPad Prism 5).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Exame Histológico

Osso Frontal e Defeito Ósseo

A figura 3 mostra o aspecto histológico do osso frontal normal onde foram confeccionados os defeitos ósseos. Ele se apresenta como um osso compacto secundário lamelar (organizado em lâminas paralelas) revestido pelo periósteo, que externamente é constituído por dois folhetos de tecido conjuntivo (um superficial mais frouxo e outro mais denso em contato direto com o osso) e internamente (adjacente às meninges) é constituído por uma fina camada de tecido conjuntivo.

Na figura 4 observa-se o aspecto histológico de um defeito ósseo margeado pelo osso frontal, preenchido por tecido de granulação na maior parte de sua extensão e com neoformação óssea a partir das margens.

Figura 3. Aspecto histológico do osso frontal de rato. (A) Objetiva de 5 X; (B) ampliação de área óssea mostrada em (A); Pi = periósteo interno, Pe = periósteo externo. Coloração por Hematoxilina e Eosina (HE).

Figura 4. Aspecto histológico de defeito ósseo. (A, B) preenchimento do defeito predominantemente por tecido de granulação (TG) com novas trabéculas ósseas (ON) formando-se centripetamente a partir do osso frontal (OF). (C) Detalhe do tecido de granulação de preenchimento do defeito. Coloração por HE, objetiva 5 X

Reparo: Grupo Controle

Ao final da segunda semana, o defeito dos animais do grupo controle estava preenchido predominantemente por tecido de granulação bastante vascularizado, com fibrilas colágenas delicadas e com infiltrado inflamatório crônico (linfoplasmocitário) variando de discreto a acentuado. A partir das margens do defeito havia neoformação centrípeta de osso imaturo primário (sem organização lamelar), com trabéculas irregulares rodeadas por osteoblastos e matriz aprisionando grande quantidade de osteócitos. Enquanto em alguns animais a neoformação óssea era incipiente, em outros apresentava-se mais proeminente, com trabeculado irregular avançando para o interior do tecido de granulação (figuras 5 a 7).

Figura 5. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo Controle - 2 semanas. (A) Trabéculas ósseas neoformadas (ON) a partir do osso frontal (OF) da margem do defeito (setas apontam a linha cementante entre ambos), TG = tecido de granulação. (B) Detalhe do tecido de granulação de preenchimento do defeito ósseo. Coloração por HE, objetiva 10 X.

Figura 6. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo Controle - 2 semanas. (A) Trabécula óssea neoformada (ON) a partir do osso frontal (OF) da margem do defeito; TG = tecido de granulação. (B) Ampliação da trabécula óssea neoformada mostrada em (A). Coloração por HE, objetiva 10 X.

Figura 7. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo Controle - 2 semanas, preenchido por tecido de granulação com trabéculas ósseas proeminentes avançando a partir das margens. Coloração por HE, objetiva 5 X.

Ao final da quarta semana, o defeito dos animais controles continuou preenchido predominantemente por tecido de granulação, neste período com maior quantidade de fibras colágenas porém ainda bastante vascularizado e com persistência do infiltrado inflamatório linfoplasmocitário de intensidade variável. Osso neoformado, com aspecto ainda imaturo e sem diferença aparente em quantidade comparativamente ao período de 2 semanas, formava-se centripetamente a partir das margens do defeito (figura 8).

Em ambos os períodos, na maioria dos animais, observou-se, nas vizinhanças das margens do defeito, alguma neoformação óssea sob as lâminas interna e/ou externa do periósteo e também por remodelação interna do osso frontal (figuras 9 e 10).

Figura 8. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo Controle - 4 semanas. (A) Trabeculado ósseo neoformado (ON) centripetamente a partir do osso frontal (OF) da margem do defeito (demarcada pelas setas); neoformação óssea subperiosteal interna (▼). (B) detalhe de trabécula óssea neoformada (ON) e do tecido de granulação (TG) mostrados em (A). Coloração por HE, objetiva 5 X.

Figura 9. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo Controle - 4 semanas. (A) Trabéculas ósseas neoformadas (ON) a partir do osso frontal (OF) da margem do defeito; as setas mostram as lâminas interna (Pi) e externa (Pe) do periósteo. (B) Trabeculado ósseo neoformado (ON) centripetamente a partir do osso frontal (OF) da margem do defeito. Tanto em (A) quanto em (B) observa-se também neoformação óssea subperiosteal externa e/ou interna (▼). Coloração por HE, objetiva 5 X.

Figura 10. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo Controle - 4 semanas, mostrando áreas de novas trabéculas ósseas (ON) formando-se por remodelação interna do osso frontal (OF), demarcadas pelas setas em (A) e pelo círculo em (B). Coloração por HE, (A) objetiva 10 X, (B) objetiva 5 X.

Reparo: Grupo MMP-2

O reparo dos animais do grupo MMP-2 seguiu, no geral, o mesmo padrão descrito para os controles, com os defeitos preenchidos predominantemente por tecido de granulação bastante vascularizado e com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário de intensidade variável, exibindo neoformação óssea centrípeta de osso imaturo primário sem progresso aparente da segunda para a quarta semanas pós-cirurgia. Um achado peculiar deste grupo foi a marcante neoformação óssea nas vizinhanças do defeito, tanto sob as lâminas interna e/ou externa do periósteo quanto por remodelação interna do osso frontal (figuras 11 a 15).

Em alguns animais, o exame histológico sugeriu maior quantidade de trabéculas ósseas neoformadas do que nos animais controles do mesmo período.

Figura 11. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo MMP-2 - 2 semanas. (A) Neoformação óssea (ON) centrípeta a partir do osso frontal (OF) da margem do defeito, e também por remodelação interna do osso frontal (*) e com localização subperiosteal interna (▼). (B) Trabeculado ósseo neoformado (ON) e tecido de granulação (TG) preenchendo o defeito ósseo. Coloração por HE, (A) objetiva 5 X, (B) objetiva 10 X.

Figura 12. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo MMP-2 - 2 semanas. (A, B) Neoformação óssea (ON) proeminente a partir da margem do defeito. Em (B), demarcadas pelas setas, observam-se as lâminas periosteais interna (Pi) e externa (Pe). Coloração por HE, (A) objetiva 5 X, (B) objetiva 10 X.

Figura 13. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo MMP-2 - 2 semanas. (A, B) Neoformação óssea a partir do osso frontal (OF), com localização subperiosteal externa (▼). As setas demarcam a lâmina periosteal externa (Pe). Coloração por HE, (A) objetiva 5 X, (B) objetiva 10 X.

Figura 14. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo MMP-2 - 2 semanas. (A, B) Neoformação óssea centrípeta a partir do osso frontal (OF) da margem do defeito e também com localização subperiosteal interna (▼). As setas demarcam a lâmina periosteal interna (Pi). Coloração por HE, (A) objetiva 5 X, (B) objetiva 10 X.

Figura 15. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo MMP-2 - 4 semanas. (A) Neoformação óssea (ON) proeminente a partir do osso frontal (OF) da margem do defeito; as setas demarcam as lâminas periosteais interna (Pi) e externa (Pe). (B) Tecido conjuntivo de preenchimento do defeito ósseo exibindo infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. Coloração por HE, objetiva 5 X.

Reparo: Grupo Monoleína

O exame histológico do defeito dos animais do grupo monoleína não mostrou diferença marcante comparativamente aos animais controles do mesmo período (figuras 16 e 17).

Figura 16. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo Monoleína – 2 semanas. (A) Tecido de granulação ricamente vascularizado exibindo infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. (B) Trabéculas ósseas neoformadas a partir do osso frontal da margem do defeito. Coloração por HE, objetiva 10 X.

Figura 17. Aspecto histológico de defeito ósseo de animal do Grupo Monoleína – 4 semanas. (A) Novas trabéculas ósseas (ON) formando-se a partir do osso frontal (OF) da margem do defeito. (B) Remodelação interna do osso frontal (OF) próximo à margem do defeito (*); e neoformação óssea com localização subperiosteal interna (▼); as setas demarcam as lâminas periosteais interna (Pi) e externa (Pe). Coloração por HE, objetiva 5 X.

5.2. Análise Histométrica

Foram feitos cortes histológicos semi-seriados de 6 μm de espessura (aproveitando-se 1 a cada 11 cortes), iniciando pela borda lateral mediana do defeito. Assim, à medida que os cortes se aprofundavam em direção à área central, foram obtidos defeitos com extensão crescente.

A figura 18 mostra a variação de extensão de defeitos ósseos medidos nos animais dos grupos Controle, Monoleína e MMP-2, nos períodos de 2 e 4 semanas após a cirurgia. No intervalo demarcado pelas linhas (entre 1370 μm e 5140 μm de extensão) foram encontrados defeitos nos animais dos três grupos experimentais, e por isto este foi o intervalo escolhido para as medidas de neoformação óssea.

Figura 18. Variação de extensão dos defeitos ósseos medidos nos diferentes animais dos grupos Controle, MMP-2 (Metaloproteinase) e Monoleína.

Com o objetivo de testar se a extensão do defeito foi um fator que interferiu com a neoformação óssea, foi construída uma figura associando a quantidade de pontos sobre trabéculas ósseas neoformadas e a extensão do defeito, utilizando todos os animais do grupo controle (figura 19). Na figura observa-se que a variação na quantidade de pontos foi aleatória, não existindo portanto correlação entre as duas variáveis. Diante disto, as comparações entre as medidas de neoformação óssea levaram em consideração apenas o grupo experimental e o período pós-cirurgia, não importando a extensão do defeito ósseo.

Figura 19. Relação entre a extensão do defeito ósseo e a quantidade de pontos sobre trabéculas ósseas neoformadas, nos animais controles, nos períodos de 2 e 4 semanas pós-cirurgia.

A taxa de neoformação óssea, estimada pela quantidade de pontos sobre trabéculas ósseas neoformadas, foi semelhante nos animais dos grupos Controle e Monoleína e significativamente maior nos animais do grupo MMP-2, em ambos os períodos analisados. Não se observou aumento significativo de neoformação óssea da segunda para a quarta semana, em nenhum dos grupos experimentais (figura 20, tabela 1).

Figura 20. Mediana e intervalo interquartil (5%, 25%, 75% e 95%) referente à quantidade de pontos sobre trabéculas ósseas neoformadas nos grupos Controle, Monoleína e MMP-2 (metaloproteínase), nos períodos de 2 e 4 semanas pós-cirurgia (cada ponto representa a medida de um animal). O teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas confirmou a diferença entre as amostras ($k = 27$, $P = 0,0001$) e o teste de Mann-Whitney para comparação das amostras 2 a 2 discriminou as amostras significativamente diferentes, assinaladas na figura com letras diferentes ($A \neq B$, vide tabela 1 para nível de significância).

Tabela 1. Comparação da taxa de neoformação óssea entre os grupos Controle, Monoleína e MMP-2, nos períodos de 2 e 4 semanas pós-cirurgia. Aplicação do teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney.

Período	Grupos Experimentais	Valor de U	P	α
2 semanas	Controle <i>versus</i> Monoleína	11,0	0,36	n.s.
	Controle <i>versus</i> MMP-2	2,0	0,0003	0,001
	Monoleína <i>versus</i> MMP-2	0,0	0,0083	0,01
4 semanas	Controle <i>versus</i> Monoleína	29,0	0,4185	n.s.
	Controle <i>versus</i> MMP-2	0,0	0,0001	0,001
	Monoleína <i>versus</i> MMP-2	6,0	0,0026	0,01
2 semanas <i>versus</i> 4 semanas	Controle	29,5	0,1768	n.s.
	Monoleína	10,0	0,5000	n.s.
	MMP-2	25,0	0,2680	n.s.

U = variável calculada, P = probabilidade da hipótese H_0 (de que as amostras comparadas sejam semelhantes), α (nível de significância da diferença entre as amostras), n.s. = diferença não significativa.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Modelo Experimental

O defeito confeccionado em calvária de roedores é um modelo experimental *in vivo* bastante utilizado para testar o reparo em várias situações experimentais e frente a diferentes estratégias que visam estimular a neoformação óssea (Cooper *et al.*, 2010; Gomes e Fernandes, 2011).

Um defeito ósseo de “tamanho crítico” foi originalmente definido como aquele cuja dimensão, em um osso específico e em determinada espécie animal, impediria a regeneração espontânea, mesmo considerando todo o período de vida (Schmitz e Hollinger 1986, *apud* Cooper *et al.*, 2010). No entanto, levando em conta que a maioria dos estudos não se estende por toda a vida dos animais, mais recentemente foi proposto que defeitos de “tamanho crítico” seriam aqueles cujas dimensões impediriam a regeneração completa ao longo do período experimental (Gosain *et al.*, 2000, *apud* Cooper *et al.*, 2010). Em contraposição, defeitos de tamanho subcrítico são aqueles dos quais se espera regeneração espontânea completa em um período relativamente curto de tempo (Gomes e Fernandes, 2011).

Em que pesem as controvérsias quanto às dimensões de defeitos de “tamanho crítico” em calvária de ratos de diferentes idades e variedades (Gomes e Fernandes, 2011), o padrão experimental em ratos adultos tem dimensões da ordem de 8 mm de diâmetro (Cooper *et al.*, 2010). Contudo, Cooper e colaboradores (2010), baseados em ampla revisão da literatura e em seus próprios resultados, relataram que mesmo defeitos em calvária de roedores de dimensões significativamente menores não atingem regeneração completa até em períodos prolongados de tempo. Utilizando diferentes técnicas para confecção dos defeitos, os autores observaram que defeitos de 2,3 mm em calvária de rato apresentam regeneração da ordem de 35% em 6 semanas. Diante disto, os autores propuseram que seja abandonado o conceito de defeito ósseo de “tamanho crítico”.

No presente trabalho, foram confeccionados defeitos de 4 mm de diâmetro lateralmente à sutura sagital mediana. A vantagem de um defeito de menor dimensão como este é que se evitam a inclusão da sutura sagital mediana e a possibilidade de lesão do seio sagital superior, que faz parte da rede venosa da dura-máter. Adicionalmente, o perióstio foi incisado e, após a confecção dos

defeitos, rebatido e suturado, pois é sabido que a conservação do periósteo é um dos fatores importantes para a possibilidade de uma regeneração óssea adequada (Gomes e Fernandes, 2011).

6.2. Análise Histológica

A perda de animais pela presença de exsudato purulento (polimorfonuclear), indicativo de infecção, foi da ordem de 12% no grupo Controle e de 37%, em média, nos grupos Monoleína e MMP-2. Portanto, apesar dos cuidados para assepsia da área e dos materiais cirúrgicos, e da desinfecção dos biomateriais, não foi possível evitar algum grau de contaminação, que foi maior nos animais que tiveram material implantado.

O reparo ósseo seguiu o padrão histológico descrito na literatura (Spin-Neto *et al.*, 2010), tanto no grupo Controle quanto nos grupos com material implantado (Monoleína e MMP-2). Adicionalmente, a análise histológica do reparo dos animais controles mostrou, ao final da segunda semana, um infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (crônico) de intensidade variável, resultante da agressão cirúrgica, que persistiu até a quarta semana pós-cirurgia.

O infiltrado linfoplasmocitário foi mais acentuado na maioria dos animais implantados, em parte, provavelmente, em decorrência da presença física dos materiais. É esperado que a introdução de qualquer material no interior de defeitos em fase de reparação prolongue a fase inflamatória, muitas vezes retardando a organização do coágulo sanguíneo e a neoformação óssea reparacional (Okamoto *et al.*, 1994; Pinheiro *et al.*, 2003), e esta situação é mais relevante no caso de materiais de absorção lenta. No entanto, evidências recentes sugerem que algumas citocinas pró-inflamatórias, que orquestram a cascata dos eventos da inflamação, são necessárias para o reparo ósseo e que é a persistência da reação inflamatória, em consequência de infecção, que pode ser danosa e resultar em um reparo inadequado (Thomas e Puleo, 2011).

6.3. Análise Histométrica - Fator Associado ao Modelo Experimental

A análise histométrica não mostrou aumento significativo na neoformação óssea da segunda para a quarta semana, em nenhum dos grupos experimentais. Este achado confirma relatos da literatura de que defeitos de “tamanho crítico ou subcrítico” em calvária de roedores apresentam pequena taxa de regeneração, que não se completa mesmo em períodos prolongados de tempo (Cooper *et al.*, 2010; Gomes e Fernandes, 2011).

6.4. Análise Histométrica - Monoleína como Carreador

A taxa de neoformação óssea foi semelhante nos animais dos grupos Controle e Monoleína, em ambos os períodos analisados.

Os géis de fase cúbica de monoleína têm sido amplamente utilizados na indústria farmacêutica como carreadores de fármacos em diversas formulações e por diferentes vias de administração (matrizes para implantação subcutânea, injeção intravenosa, gel para aplicação intra-nasal, cápsulas para ingestão oral, etc.) (Shah e Paradkar, 2005). Os fármacos incorporados, inclusive peptídeos e proteínas, sofrem liberação lenta, não perdem atividade biológica e têm estabilidade aumentada pela ação protetora do carreador contra a degradação enzimática (Lee e Kellaway, 2000a; Lee e Kellaway, 2000b; Shah *et al.*, 2001).

Os resultados do presente trabalho mostram que a monoleína não interferiu com o processo reparacional e pareceu eficaz como carreador da rhMMP-2, corroborando dados anteriores da literatura em que a monoleína foi testada como carreador de rhBMP-2 em um modelo de distração osteogênica aguda, em mandíbula de rato. O reparo ósseo também foi avaliado por método histométrico duas e quatro semanas após a implantação e os resultados sugeriram a eficácia da monoleína em garantir a liberação da BMP, que estimulou a osteogênese reparacional no grupo tratado (Issa *et al.*, 2009).

6.5. Análise Histométrica - Efeito Osteo-estimulatório da rhMMP-2

A taxa de neoformação óssea foi significativamente maior nos animais do grupo MMP-2, em ambos os períodos analisados.

Na última década, o papel essencialmente “degradador” de osso das MMPs, particularmente da MMP-2, vem sendo questionado, principalmente por estudos que evidenciam sua presença nos eventos iniciais de formação de osso em cultura de células osteogênicas e mostram que a atividade de MMPs é essencial para a sobrevivência dos osteoblastos e que só na presença de MMPs estes se diferenciam em osteócitos. Neste modelo experimental, inibidores de MMPs bloqueiam a diferenciação de osteoblastos em osteócitos, porém o TGF- β ativo é capaz de reverter este bloqueio, embora o TGF- β não clivado por MMPs não o faça (Shubayev *et al.*, 2004; Oum'hamed *et al.*, 2004).

Uma evidência decisiva da importância da MMP-2 para manutenção da normalidade do tecido ósseo surgiu com a descrição de uma mutação que inativa a MMP-2 e resulta em um fenótipo osteolítico grave (Martignetti *et al.*, 2001). Portanto, enquanto muitos papéis das MMPs são “redundantes”, ou seja, não são específicos de uma MMP (inativando-se uma, outra MMP assumiria sua função), a função da MMP-2 no osso adulto parece não ser realizada por outra protease desta família.

Modelos experimentais em que a expressão da MMP-2 é interrompida mostram que a ausência da MMP-2 funcional diminui a proliferação de osteoblastos (Mosig *et al.*, 2007) e, adicionalmente, esta enzima parece ser essencial para a formação dos canaliculos dos osteócitos (Inoue *et al.*, 2006). Resultados recentes mostram que culturas osteoblásticas de calvária de rato expressam grande quantidade de MMP-2, sendo que o pico da atividade enzimática parece estar relacionado com o início da mineralização (Dra. Raquel F. Gerlach, laboratório de histologia da FORP-USP, comunicação pessoal).

Os resultados histométricos do presente trabalho, mostrando uma maior taxa de reparo em defeito de calvária de rato no grupo MMP-2, adicionam evidências à hipótese da importância da atividade desta metaloproteinase para a formação óssea.

6.6. Metaloproteinases e Citocinas Inflamatórias

Nos processos patológicos da inflamação, as MMPs frequentemente encontradas são MMP-2, -8 e -9 (Chow *et al.*, 2007), que estão associadas à liberação de citocinas e quimiocinas, ao controle dos eventos celulares da inflamação (migração e proliferação de células musculares lisas vasculares, invasão de monócitos na camada íntima, diferenciação de macrófagos) e à degradação da matriz extracelular (Galis e Khatri, 2002; Chow *et al.*, 2007). Portanto, algumas MMPs, dentre elas a MMP-2, participam tanto da regulação da inflamação quanto da osteólise associada às doenças de natureza inflamatória.

Nos últimos anos, uma nova forma de compreender muitos processos fisiológicos e patológicos surgiu com o advento da “degradômica”. Esta forma de entendimento envolve o estudo de quimiocinas, que são modificadas por proteases e tem sua função alterada. Um exemplo clássico que mostra o impacto da ação proteolítica de MMPs sobre quimiocinas é o do recrutamento de neutrófilos nas primeiras horas da resposta inflamatória e a finalização desta etapa, seguida pelo influxo de macrófagos no sítio inflamatório. Algumas quimiocinas, quando processadas principalmente pela MMP-8, tornam-se potentes agonistas de seus respectivos receptores, o que é um passo crítico para o recrutamento de neutrófilos. Em contrapartida, outras quimiocinas são inativadas pela MMP-12 derivada de macrófagos, o que leva à finalização do recrutamento de neutrófilos (para referências vide Starr *et al.*, 2012). Deste modo, a sucessão dos diferentes tipos celulares nas respostas inflamatória e imune decorrem do recrutamento destas células, que é determinado por quimiocinas, e estas moléculas tem sua função modificada por proteases.

Os estudos relativos à ação da MMP-2 sobre quimiocinas específicas são bastante recentes e mostram que a CCL2 (também chamada de MCP-1), uma quimiocina que tem papel central no recrutamento de macrófagos, modifica a sua função quando clivada pela MMP-2 (Qian *et al.*, 2011). Estudo *in vitro* confirmou que a clivagem de CCL2/MCP-1 pela MMP-2 causa diminuição da migração de uma linhagem de monócitos (Denney *et al.*, 2009). Em um modelo experimental de edema em pata de rato, algumas MMPs, dentre elas a MMP-2, apresentaram atividade antiinflamatória por clivarem quimiocinas, levando à diminuição da atividade quimiotática (McQuibban *et al.*, 2000, 2001, 2002).

Considerando os efeitos potenciais das MMPs sobre as quimiocinas e sua freqüente co-localização nos sítios inflamatórios, e também a importante relação destas quimiocinas com a remodelação óssea, é possível que a clivagem de quimiocinas tenha contribuído para os resultados observados no grupo MMP-2 do presente trabalho.

Vários trabalhos mostram que em doenças inflamatórias como periodontite e artrite reumatóide, bem como na osteoporose, a interleucina-1 beta (IL-1 β) tem ação direta na maturação e diferenciação de osteoclastos, estimulando a absorção óssea (Kamano et al., 1989; Ishimi et al., 1990; Bataille et al., 1995; Mercado et al., 2001; Jin et al., 2007). Algumas metaloproteinases, dentre elas a MMP-2, tem capacidade de clivar a IL-1 β em fragmentos biologicamente inativos, regulando desta forma o processo inflamatório (Ito et al., 1996; Schonbeck et al., 1998). A inativação da IL-1 β pela alta concentração de MMP-2 no local do defeito ósseo também pode ter contribuído para o efeito osteo-estimulatório observado nos animais do grupo MMP-2.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A análise histométrica não mostrou aumento significativo na neoformação óssea da segunda para a quarta semana, em nenhum dos grupos experimentais, confirmando relatos da literatura de que defeitos de “tamanho crítico ou sub-crítico” em calvária de roedores apresentam pequena taxa de regeneração, que não se completa mesmo em períodos prolongados de tempo.

A taxa de neoformação óssea foi semelhante nos animais dos grupos Controle e Monoleína e significativamente maior nos animais do grupo MMP-2, em ambos os períodos analisados, mostrando que a monoleína não interferiu com o processo reparacional e foi eficaz como carreador de rhMMP-2.

Os resultados acrescentam evidências á hipótese da importância da atividade da MMP-2 para a formação óssea, adicionalmente ao seu conhecido papel no controle da absorção óssea fisiológica ou patológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bataille R, Barlogie B, Lu ZY, Rossi JF, Lavabre-Bertrand T, Beck T, Wijdenes J, Brochier J, Klein B. Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood* 1995;86(2):685-91.

Blumenfeld I, Srouji S, Peled M, Livne E. Metalloproteinases (MMPs -2, -3) are involved in TGF- β and IGF-1-induced bone defect healing in 20-month-old female rats. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2002;35:59–69.

Boss JH, Shahrawi I, Aunullah J, Mendes D.G. The relativity of biocompatibility-A critique of the concept of biocompatibility. *Isr J Med Sci*. 1995; 31: 203-9.

Calixto RF, Teófilo JM, Brentegani LG, Carvalho TLL. Alveolar wound healing after implantation with a pool of commercially available bovine bone morphogenetic proteins (BMPs) - A histometric study in rats. *Braz Dent J*. 2007;18:29-33.

Calori GM, Donati D, Di Bella C, Tagliabue L. Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions. *Injury*. 2009;40(Suppl 3):S67-S76.

Caúla AL, Machado F, Barboza E. O potencial da proteína óssea morfogenética humana recombinante-2 (rhBMP-2) na regeneração óssea. *Rev Bras Odontol*. 1999; 56(4): 185-191.

Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol*. 2007;152(2):189-205.

Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125(6):1685-92.

Denney H, Clench MR, Woodroffe MN. Cleavage of chemokines CCL2 and CXCL10 by matrix metalloproteinases-2 and -9: implications for chemotaxis. *Bioch Biophys Res Comm*. 2009;382(2):341–47.

Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov*. 2008;92:161-8.

Dimitriou R, Giannoudis PV. Discovery and development of BMPs. *Injury*. 2005; 36(Suppl 3):S28-S33.

Fischer J, Kolk A, Wolfart St, Pautke C, Warnke PH, Planlk C et al.. Future of local bone regeneration - protein versus gene therapy. *J Craniomaxillofac Sur*. 2011;39: 54-64.

Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 2002;90(3):251-62.

Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55:1613-29.

Giovanini AF, Gonzaga CC, Zielak JC, Deliberador TM, Kuczera J, Goringher I et al.. Platelet-rich plasma (PRP) impairs the craniofacial bone repair associated with its elevated TGF- β levels and modulates the co-expression between collagen III and α -smooth muscle actin. *J Orthop Res*. 2010;29:457-63.

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory Animals* 2011;45(1):1–11.

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT. Osteogenesis in cranial defects: Reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106(2):360–71.

Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*. 2000;142:9-21.

Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc, Natl Acad Sci USA*. 1962;48:1014-22.

Inoue K, Mikuni-Takagaki Y, Oikawa K, Itoh T, Inada M, Noguchi T, Park JS, Onodera T, Krane SM, Noda M, Itohara S. A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. *J Biol Chem.* 2006; 281(44):33814-24.

Ishimi Y, Mijaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Suda T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol.* 1990;145(10):3297-303.

Issa JPM, Bentley MVLB, Iyomasa MM, Sebald W, Albuquerque Jr RF. Sustained release carriers used to deliver bone morphogenetic proteins in the bone healing process. *Anat Histol Embryol.* 2008;37:181-7.

Issa JPM, Nascimento C, Lamano T, Iyomasa MM, Sebald W, Albuquerque Jr RF. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in the acute distraction osteogenesis of rat mandibles. *Clin Oral Implan Res.* 2009;20: 1286-92.

Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y. Degradation of interleukin-1 beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1996; 271(25):14657-60.

Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba Jr M, Kostenuik PJ, Giannobile WV. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol.* 2007;78(7):1300-08.

Kawano M, Yamamoto I, Iwato K, Tanaka H, Asaoku H, Tanabe O, Ishikawa H, Nobuyoshi M, Ohmoto Y. Interleukin-1 beta rather than lymphotoxin as the major bone resorbing activity in human multiple myeloma. *Blood* 1989;73(6):1646-49.

Kotsovilis S, Markou N, Pepelassi E, Nikolidakis D. The adjunctive use of platelet-rich plasma in the therapy of periodontal intraosseous defects: a systematic review. *J Periodont Res.* 2010;45:428-43.

Krane SM, Inada M. Matrix metalloproteinases and bone. *Bone.* 2008;43:7–18.

Lee J, Kellaway IW. Buccal permeation of [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. *Int Journal f Pharm.* 2000;195:35–8.

Lee J, Kellaway IW. In vitro peptide release from liquid crystalline buccal delivery systems. *Int Journal f Pharm.* 2000;195:29-33.

Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58:197-208.

Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, Sheth KV, Eid WA, Dowling O, Harris J, Glucksman MJ, Bahabri S, Meyer BF, Desnick RJ. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. Nat Genet. 2001;28(3):261-5.

Mercado FB, Marshal RI, Klestov AC, Bartold PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol.* 2001;72(6):779-87.

McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 2000;289(5482):1202-6.

McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem.* 2001; 276(47):43503–8.

McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 2002;100(4):1160–7.

Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.* 2001; 71:354-61.

Mosig RA, Dowling O, DiFeo A, Ramirez MCM, Parker IC, Abe E, Diouri J, Aqeel AA, Wylieb JD, Oblander SA, Madri J, Bianco P, Apte SS, Zaidi M, Doty SB, Majeska RJ, Schaffler MB, Martignetti JA. Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial

development and results in decreased bone mineralization, joint erosion, and defects in osteoblast and osteoclast growth. *Hum Mol Genet.* 2007;16(9):1113–23.

Okamoto T, Okamoto R, Alves Rezende MCR, Gabrielli MF. Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction. *Histomorphological study in rats.* *Braz Dent J.* 1994;5(2):85-92.

Oreffo ROC. Growth factors for skeletal reconstruction and fracture repair. *Curr Opinion Invest Drugs* 2004;5:419-23.

Oum'hamed Z, Garnotel R, Josset Y, Trenteseaux C, Laurent-Maquin D. Matrix metalloproteinases MMP-2, -9 and tissue inhibitors TIMP-1, -2 expression and secretion by primary human osteoblast cells in response to titanium, zirconia, and alumina ceramics. *J Biomed Mater Res A.* 2004;68(1):114-22.

Perri de Carvalho PS, Bassi APF, Pereira LAVD. Review and proposal of nomenclature for biomaterials. *Implant News.* 2004;1:255-60.

Phan TCA, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol.* 2004;19:1325-44.

Pinheiro AL, Limeira Jr FA, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz Dent J.* 2003;14(3):177-81.

Qian B-Z, Jiufeng L, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser LA, Snyder LA, Pollard JW. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011; 475(7355): 222–5.

Ryan ME, Ramamurthy S, Golub LM. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Curr Opin Periodontol.* 1996;3:85-96.

Sanada JT, Canova GC, Cestari TM, Taga EM, Buzalaf MAR, Granjeiro JM. Histologic, radiographic and imunoglobuline profile analysis after implantation of blocks of demineralized bovine cancellous bone graft in muscle of rats. *J Appl Oral Sci.* 2003;11:209-15.

Schliephake H. Application of bone growth factors - the potential of different carrier systems. *Oral Maxillofac Surg.* 2010;14:17-22.

Schmidmaier G, Schwabe P, Strobel C, Wildemann B. Carrier systems and application of growth factors in orthopedics. *Injury.* 2008;39(Suppl 2):S37-S34.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;205:299–308.

Schönbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol.* 1998;161(7):3340-6.

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

Shah MH, Paradkar A. Cubic liquid crystalline glyceryl monooleate matrices for oral delivery of enzyme. *Int J Pharmac.* 2005;294(1-2):161-71.

Shubayev VI, Brånemark R, Steinauer J, Myers RR. Titanium implants induce expression of matrix metalloproteinases in bone during osseointegration. *J Rehabil Res Dev.* 2004;41(6A):757-66.

Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology.* 2000;24:99-126.

Spin-Neto R, Freitas RM, Payone C, Cardoso MB, Campana-Filho SP, Marcantonio RAC, marcantonio Jr E. Histological evaluation of chitosan-based biomaterials used for the correction of critical size defects in rat's calvaria. *J Biomed Mater Res.* 2010; 93A:107–14.

Starr AE, Dufour A, Maier J, Overall CM. Biochemical analysis of matrix metalloproteinase activation of chemokines CCL15 and CCL23 and increased glycosaminoglycan binding of CCL16. *J Biol Chem.* 2012;287(8): 5848-60.

Takagi M, Santavirta S, Ida H, Ishii M, Akimoto K, Saotome K, Konttinen YT. The membrane-type-matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase-2/tissue inhibitor of metalloproteinase-2 system in periprosthetic connective-tissue remodeling in loose total-hip prostheses. Lab Invest. 1998;78(6):735-42.

Takei I, Takagi M, Santavirta S, Ida H, Hamasaki M, Ishii M, Fukushima S, Ogino T, Konttinen YT. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in joint fluid of the patients with loose artificial hip joints. J Biomed Mater Res. 1999; 45(3):175-83.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science. 2000;289:1504-8.

Thomas MV, Puleo DA. Infection, inflammation and bone regeneration: a paradoxical relationship. J Dent Res. 2011;90(9):1052-61.

Weber FE, Eyrich G, Gratz KW, Maly FE, Saler HF. Slow and continuous application of human recombinant bone morphogenetic protein via biodegradable poly(lactide-co-glycolide) foamspheres. Int J Oral Maxillofac Surg. 2002;31:60-5.

Williams DF. Definitions in Biomaterials, New York, Elsevier, 1987. Apud: Marcantônio E Jr; Marcantônio RAC, Cirelli JA. Regeneração óssea: vertical e horizontal. In: TUNES, U.R. Atualização em periodontia e implantodontia. São Paulo, Artes Médicas, 1999, p. 295-316.

Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials. 2008;29:2941-53.

Woessner JF Jr. MMPs and TIMPs. An historical perspective. Methods Mol Biol. 2001;151:1-23.

Yokohama Y, Matsumoto T, Hirakawa M, Kuroki Y, Fujimoto N, Imai K, Okada Y. Production of matrix metalloproteinases at the bone-implant interface in loose total hip replacements. Lab Invest. 1995; 73(6):899-911.

APÊNDICES

9. APÊNDICES

9.1. Apêndice A

Biomateriais: Origem, Ligação, Ensaios de Pureza, Liberação e Atividade

A produção da rhMMP-2 foi descrita em Gonçalves *et al.* (2011). Resumidamente, a rhMMP-2 foi produzida em *Escherichia Coli*, cepa BL21pLys, purificada a partir do sobrenadante obtido após a lise das bactérias. A purificação da proteína foi realizada por cromatografia de afinidade em uma coluna de Gelatina-sepharose (GE Healthcare). Inicialmente, a coluna cromatográfica foi carregada com o sobrenadante que continha a rhMMP-2 e em seguida foi injetado na coluna tampão contendo 0,1% de Triton X-114 para redução da quantidade de LPS. Na sequência, a rhMMP-2 foi eluída da coluna cromatográfica com tampão contendo 5% de DMSO e concentrada utilizando-se dispositivos Amicons com membrana com poros de 30 kDa. Por fim, a proteína foi liofilizada e estocada a -80°C.

Como a rhMMP-2 foi produzida em bactérias Gram-Negativas (*E. coli*), e sua parede celular é fonte de endotoxinas, foi analisada a presença de LPS contido na rhMMP-2. O teste cromogênico de ponto final (*endpoint*) de *Limulus Amebocyte Lysate* foi realizado com o kit QCL-100 (50647-U) (Lonza do Brasil Especialidades Químicas, São Paulo, SP, Brasil). Este método baseia-se na reação de uma pró-enzima contida no lisado de amebócitos de *Limulus Amebocyte* com o LPS, que torna a enzima ativa, a qual degrada um substrato sintético incolor, liberando p-nitroaniline, e produzindo assim coloração amarelada.

As preparações de rhMMP-2 contendo quantidades de LPS inferiores a 0,4 EU/μg de proteína (EU = *endotoxin units*) foram utilizadas para este estudo. A pureza de cada preparação foi analisada por uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% corado pela prata. A atividade de cada preparação foi testada utilizando-se o kit para atividade gelatinolítica E12055, que contém a DQ-Gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon,USA). Esta atividade foi

Gonçalves AN, Meschiari CA, Stetler-Stevenson WG, Nonato MC, Alves CP, Espreafico EM, Gerlach RF. Expression of soluble and functional full-length human matrix metalloproteinase-2 in *Escherichia coli*. J Biotechnol 157(1): 20-24, 2012.

avaliada em um espectrofluorímetro de placas (Spectra Max Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) após 30 minutos de reação a 37°C, com excitação a 495 nm e emissão a 515 nm. Foi utilizado o inibidor de metaloproteinases fenantrolina (Sigma-Aldrich) na concentração de 100 µM como controle, ou seja, inibindo totalmente a atividade de MMP-2.

As preparações de rhMMP-2 contendo quantidades de LPS inferiores a 0,4 EU/µg de proteína (EU = *endotoxin units*) foram utilizadas para este estudo. A pureza de cada preparação foi analisada por uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% corado pela prata (fig. X). A atividade de cada preparação foi testada utilizando-se o kit para atividade gelatinolítica E12055, que contém a DQ-Gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA). Esta atividade foi avaliada em um espectrofluorímetro de placas (Spectra Max Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) após 30 minutos de reação a 37°C, com excitação a 495 nm e emissão a 515 nm. Foi utilizado o inibidor de metaloproteinases fenantrolina (Sigma-Aldrich) na concentração de 100 µM como controle, ou seja, inibindo totalmente a atividade de MMP-2.

SDS-PAGE corado pela prata. Amostras da purificação da rhMMP-2. A: marcador de peso molecular; B: sobrenadante do lisado bacteriano; C: fração não retida pela coluna cromatográfica; D: fração da coluna contendo a rhMMP-2 (72 kDa).

Mistura da rhMMP-2 com a Monoleína

O material utilizado como carreador da rhMMP-2 foi a monoleína em solução aquosa, preparada adicionando-se 3 partes de monoleína para 2 partes da solução

aquosa, que neste estudo foi o tampão fosfato de sódio (PBS) sem a proteína recombinante (Controle) ou PBS com a proteína recombinante. A monoleína foi preparada a partir de monoglicerídeos destilados de óleo de canola (Myverol 18-99, Eastman Chemical Company, Tennessee, United States), e foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Marilisa Guimarães Lara (Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP), onde também foram realizados parte dos testes de liberação da proteína.

Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente, utilizando-se materiais previamente esterilizados e em ambiente estéril (interior de uma capela de fluxo laminar - Veeco, Campinas, SP) que teve suas superfícies internas higienizadas com álcool 70° e submetidas à radiação ultravioleta durante 10 minutos antes da manipulação dos materiais.

A rhMMP-2 liofilizada foi resuspendida com PBS, filtrada com membranas estéreis com poros de 0,2 µm e diluída para se obter soluções de concentração final 5, 15 e 45 µg/ml. Estas soluções foram misturadas com a monoleína na proporção 2:3, ou seja, 2 partes da solução de rhMMP-2 em PBS para cada 3 partes da monoleína (exemplo: 200 µl de solução de rhMMP-2 em PBS foram misturados a 300 mg de monoleína). A mistura foi feita com espátula metálica estéril número 24, aplicando movimentos giratórios contra as paredes do Becker até que toda a solução fosse incorporada à monoleína, formando uma mistura translúcida. Os recipientes de preparo foram fechados e as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 24 horas, para atingir o equilíbrio (fase cúbica) e apresentar aspecto homogêneo. A viscosidade e as características sensoriais da monoleína são semelhantes à de uma gelatina doméstica. Esta mesma consistência era verificada após 24 horas.

Ensaio de liberação e de atividade da rhMMP-2

O ensaio da cinética de liberação da metaloproteinase foi realizado em na bomba peristáltica multicanal. Esta bomba foi originalmente projetada para mimetizar a passagem de fluido em uma bolsa periodontal, e portanto possui capacidade de injetar pequenos volumes, da ordem de microlitros de solução/minuto. Os capilares foram conectados às selas e ajustou-se o fluxo do tampão de eluição para 500 µL/h. A solução de eluição escolhida foi o PBS pH 7,4, que mimetiza as condições fisiológicas, acrescido de 1 mM de EDTA, que é um inibidor de metaloproteinases,

utilizado para impedir a autólise da proteína recombinante, por sua ação quelante sobre os íons de cálcio. Neste equipamento, o material a partir do qual a liberação ocorreu foi acondicionado em selas acrílicas. Sugere-se que a passagem constante de solução PBS/EDTA pelas selas acrílicas simule o fluxo sanguíneo do ambiente biológico onde o material foi implantado e deve liberar a proteína. Nas selas, foram testadas amostras de 350 mg de PBS/monoleína (preparada na proporção 2:3) com ou sem a rhMMP-2, nas 3 diferentes concentrações testadas (5, 15, e 45 $\mu\text{g/mL}$). Para cada concentração ou controle foram feitos testes em triplicata (3 repetições de cada amostra para cada tempo). As coletas do líquido foram feitas nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 24 horas.

As frações coletadas foram submetidas ao processo de liofilização por 18 horas, no intuito de concentrar a rhMMP-2 e facilitar sua detecção pelo método de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).

Inclusão dos corpos de prova na sela de acrílico.

Bomba peristáltica multicanal, a) vista lateral; b) vista frontal.

Análise laboratorial das amostras obtidas da liberação da proteína na mistura de monoleína

O método de ELISA indireto baseia-se na adsorção do antígeno a uma placa de poliestireno por interações eletrostáticas, seguida de um bloqueio com albumina bovina para ocupar a superfície dos poços que não foram ocupados pelo antígeno. Na sequência, aplica-se um anticorpo que possua afinidade contra o seu antígeno analisado e em seguida um anticorpo secundário, que tem afinidade contra IgG em geral e contem uma enzima. Por fim, utiliza-se um reagente revelador que serve de substrato para a enzima, formando um produto colorimétrico.

As amostras liofilizadas foram ressuspensas em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6, que fornece carga positiva para as proteínas, melhorando a adsorção à placa. Para detecção da rhMMP-2 utilizou-se o anticorpo anti-rhMMP-2 (hibridoma IMCCR-1025, Rhea Biotec, Campinas, SP, Brasil) na diluição 1:600, um anticorpo secundário conjugado à peroxidase na diluição 1:5.000 e o substrato colorimétrico TMB (Sigma do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Para se determinar a quantidade de rhMMP-2 das amostras, a intensidade das absorbâncias foi quantificada em espectrofotômetro (Biotek, São Gonçalo, RJ, Brasil) no comprimento de onda de 450 nm.

A tabela abaixo mostra o perfil de liberação de diferentes concentrações de rhMMP-2 a partir da mistura com monoleína, ao longo do tempo.

Massa Inicial	Tempo de Coleta (h)					Massa Total Liberada
	1	2	3	4	24	
37,5 µg	AS	1,1	8,0	SA	SA	9,1
19,0 µg	0	2,9	8,0	0	SA	8,9
3,75 µg	0	0,7	0,6	3,4	SA	1,3
37,5 µg em celulose*	SA	0	0	SA	SA	SA

AS = sem amostra (as amostras foram gastas em outros ensaios).

* A celulose é usada como um controle, por ser reconhecida no meio científico como um agente que não retarda a liberação de proteínas.

O ensaio de ELISA resultou em sucesso parcial (recuperação em torno de 25% da rhMMP-2 do grupo 37,5 µg, de 50% do grupo 19 ug e de 25% do grupo 3,75 ug). Não é esperado 100% de recuperação de proteína em ensaios de liberação, tendo em vista sua adsorção às paredes da máquina e aos tubos plásticos ou de borracha utilizados. Foram feitos também ensaios Western Blotting e zimograma para detectar a rhMMP-2 liberada, entretanto não se conseguiu detectar a rhMMP-2 com estes ensaios.

Portanto, no momento, mesmo sem ter feito triplicada, com a falta de amostras em alguns dos tempos, e para o ensaio de Elisa, que é pouco sensível pois não usa um anticorpo de captura, pode-se observar que houve liberação de rhMMP-2 em quantidades suficientes e que a rhMMP-2 detectada chega pelo menos a 25% da quantidade misturada à monoleína. Considerou-se este um resultado bastante razoável para dar início aos ensaios *in vivo*.

No caso da celulose (veículo controle), a liberação de rhMMP-2 possivelmente tenha ocorrido antes do tempo de 1 h. Não foram feitas coletas antes deste tempo, mas este seria o comportamento esperado para a celulose, que é um veículo conhecido como controle de liberação, por liberar os agentes a ela misturados muito rapidamente.

9.2. Apêndice B

Separata de trabalho de revisão resultante desta Dissertação, intitulado ***Strategies for Stimulation of New Bone Formation: A Critical Review***, de autoria de Juliana Alves Peres (mestranda) e Teresa Lamano (orientadora), publicado no ***Brazilian Dental Journal*** (periódico indexado no PubMed, Qualis B1 para a área odontológica - classificação de 2010).