

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto**

**Análise do Tecido Ósseo Neoformado sob
Estímulo da Proteína Morfogénica rhBMP-2
Associada a um Novo Carreador**

João Paulo Mardegan Issa

Ribeirão Preto
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

**Análise do Tecido Ósseo Neoformado sob
Estímulo da Proteína Morfogenética rhBMP-2
Associada a um Novo Carreador**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Reabilitação Oral

Orientador: Prof. Dr. Rubens Ferreira de Albuquerque Jr.

Ribeirão Preto
2006

Data da Defesa : ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Julgamento:.....Assinatura:.....

Prof. Dr.

Julgamento:.....Assinatura:.....

Prof. Dr.

Julgamento:.....Assinatura:.....

Dedicatória

“Á Deus, que nos deu o dom da vida, nos presenteou com a liberdade, nos abençoou com a inteligência, nos deu a graça de lutarmos para a conquista de nossas realizações, cabe o louvor e a glória, a mim só cabe agradecer.” (Rui Barbosa)

Aos meus pais, João Batista e Maria Clarice, pelo eterno apoio, força, compreensão, amizade e muito amor que me fizeram forte para conquistar mais esse objetivo.

A minha irmã, Mariana, pelo apoio, força, amizade, ajuda, paciência, amor e compreensão.

Agradecimentos

Ao meu Orientador e amigo Prof. Dr. Rubens Ferreira de Albuquerque Júnior e ao Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi, pela atenção e paciência em ensinar sempre da melhor forma e com brilhantismo e perfeccionismo, serviram de exemplo de educadores e pesquisadores.

À Profa. Dra. Mamie Mizusaki Iyomasa, pela grande colaboração em todas as etapas desta pesquisa, sendo imprescindível para a sua realização, por me conceder o privilégio de poder trabalhar no seu Laboratório e pela sua amizade e consideração.

À Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães pelo incentivo e grande contribuição na realização deste trabalho. Exemplo de profissionalismo, seriedade e sempre pronta a ajudar.

Aos Professores da Bioquímica, Prof. Dr. César Spadaro e Profa. Dra. Maria Vitória Bentley, pelo respeito e atenção com que receberam e pela ajuda prestada neste trabalho.

Aos pós-graduandos Cássio e Rodrigo pela contribuição prestada durante a execução da pesquisa.

As Técnicas de Laboratório Dimitrius Pitol, Nilce de Oliveira Wolga, Ana Cristina Morseli Polizello e Célia Maria Aparecida da Silva, pelo apoio durante a fase laboratorial desta pesquisa e pelo carinho e atenção em todos os momentos.

A Empresa Dentscler Ind. de Aparelhos Odontológicos Ltda pelo suporte em equipamentos e materiais.

Aos demais Professores, Funcionários e colegas da FORP-USP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP
(processo número: 04/12013-0), pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISTA DA LITERATURA.....	15
3. PROPOSIÇÃO.....	45
4. MATERIAL E MÉTODO.....	47
5. RESULTADOS.....	61
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	81

Issa, J.P.M. **Análise do tecido ósseo neoformado sob estímulo da proteína morfogenética rhBMP-2 associada a um novo carreador.** 2006. 99f. Tese (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade e a quantidade do tecido ósseo neoformado em defeitos ósseos críticos (DOC) de 5x5mm, produzidos cirurgicamente na mandíbula de ratos Wistar, sob estímulo da associação rhBMP-2/monoleína. Sessenta ratos machos adultos (350g), foram divididos em 4 grupos: grupo 1- 15 animais com DOC; grupo 2- 15 animais com DOC+15 µg rhBMP-2 em solução aquosa; grupo 3- 15 animais com DOC+gel de monoleína puro; grupo 4- 15 animais com DOC+15 µg rhBMP-2 incorporada ao gel de monoleína. Após 2 semanas, os animais foram submetidos à perfusão para remoção das hemimandíbulas, processamento histológico e análises histomorfométricas. Os dados obtidos foram analisados pelo teste de Tukey Kramer-HSD. As porcentagens de tecido ósseo para as regiões basal, central e oclusal da mandíbula foram em média (desvio padrão), respectivamente: grupo 1- 26,68(4,45); 26,16(4,58); 34,78(5,58); grupo 2- 58,9(12,31); 57,78(12,06); 64,24(11,40); grupo 3- 29,64(11,15); 25,03(7,01); 34,29(8,13); grupo 4- 59,72(13,79); 58,13(8,79); 71,81(8,29). Nos grupos 2 e 4 foram observados um percentual de osso neoformado significativamente maior que nos grupos 1 e 3 ($p < 0,05$). Entre as regiões avaliadas, a oclusal foi a que apresentou maior quantidade de tecido ósseo neoformado, seguida pelas regiões basal e média, independentemente do grupo avaliado. Os resultados sugerem que o gel de monoleína pode ser usado como um carreador eficiente para a rhBMP-2 na estimulação da cicatrização óssea, além de apresentar consistência conveniente para o preenchimento de defeitos ósseos e propriedades que facilitam uma liberação controlada da proteína. Fapesp: 04/12013-0

Palavras-chave: Proteína morfogenéticas, rhBMP-2, Monoleína, Carreador, Neoformação Óssea, Histomorfometria.

Issa, J.P.M. **Analysis of new bone formation stimulated by bone morphogenetic protein rhBMP-2 associated with a new carrier.** 2006. 99f. Tese (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the quality and quantity of new bone formation stimulated by the rhBMP-2/monoolein placed in 5x5mm critical bone defects (CBD) made in Wistar rats mandibles. Sixty male adult rats (350g) were divided into 4 groups: group 1- 15 animals with CBD; group 2- 15 animals with CBD + 15 µg rhBMP-2 in water solution; group 3- 15 animals with CBD + monoolein gel; group 4- 15 animals with CBD + 15 µg rhBMP-2 incorporated to monoolein gel. After two weeks, the animals were perfused and their hemimandibles block-removed for histological processing and histomorphometric evaluation. Tukey Kramer-HSD test was used for data analysis. The means (standard deviation) percentages of new formed bone for basal, middle and occlusal areas were, respectively: group 1- 26.68(4.45); 26.16(4.58); 34.78(5.58); group 2- 58.9(12.31); 57.78(12.06); 64.24(11.40); group 3- 29.64(11.15); 25.03(7.01); 34.29(8.13); group 4- 59.72(13.79); 58.13(8.79); 71.81(8.29). Groups treated with rhBMP-2, groups 2 and 4, presented significantly more bone formation than the control groups, groups 1 and 3, ($p < 0.05$). BMP-2 associated to monoolein demonstrated an increased percentage of new formed bone when compared with BMP-2 in water solution ($p < 0.05$). In respect to the evaluated mandibular areas, the highest amount of new formed bone was observed in the occlusal region, followed by the basal and middle areas, independently of the evaluated group. The results showed that, the rhBMP-2 associated to monoolein gel produced an efficient bone repair capability besides presenting adequate consistency for defect filling and properties that allow controlling the protein release. Fapesp: 04/12013-0

Key-words: Morphogenetic protein, rhBMP-2, Monoolein, Carrier, New bone formation, Histomorphometry.

INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de identificar proteínas capazes de induzir a formação de tecido ósseo e padronizar métodos de aplicação biológica que possam conduzir à diminuição ou eliminação de enxertias ósseas (Nawata et al., 2005).

Há mais de uma década, as proteínas morfogenéticas (BMPs) foram identificadas e purificadas a partir da matriz óssea humana (Bessho et al., 1989). Desde então, foram identificadas mais de 20 diferentes proteínas da mesma família, isto é, proteínas com estruturas semelhantes, algumas delas sintetizadas por meio de técnicas biológicas moleculares, denominadas proteínas humanas recombinantes ou rhBMPs (Wozney, 1989; Celeste et al., 1994; Urist, 1997; Bouxsein et al., 2001). Essas BMPs fazem parte da superfamília de fatores de crescimento TGF- β , que engloba polipeptídios com características estruturais comuns (Kingsley, 1994) e que desempenham papel importante na migração de células progenitoras, proliferação de células mesenquimais, diferenciação de células osteogênicas ou condrogênicas, invasão vascular e remodelação óssea (Reddi, 1997; Rauch et al., 2000; Spector et al., 2001). Além disso, as BMPs, em especial a BMP-2, são potentes indutoras da osteogênese durante a fase de formação óssea embriológica e nos casos de reparos de fraturas e recuperação de defeitos ósseos (Hogan, 1996; Rosen et al., 1996), podendo ser portanto utilizadas em várias situações que envolvem a recuperação do complexo craniofacial.

Estudos clínicos têm afirmado que a otimização na aplicação clínica das proteínas morfogenéticas é dependente de uma biodisponibilização sustentada,

pois proporcionariam menores riscos de efeitos colaterais. Além do mais, um sistema carreador adequado deve ser seguro e apresentar propriedades bem definidas, além do mais, apresentar plasticidade necessária para aplicação em regiões com características anatômicas distintas (Riley et al., 1996; Ripamonti & Duneas, 1996).

Assim, devido às possibilidades de aplicação das proteínas morfogenéticas na recuperação de defeitos ósseos craniofaciais, portanto de fundamental interesse para a Odontologia, este trabalho objetivou avaliar a qualidade e a quantidade do tecido ósseo em neoformação, sob estímulo da associação rhBMP-2/gel de monoleína, em defeitos ósseos críticos confeccionados no osso mandibular de ratos Wistar.

REVISTA DA LITERATURA

Fatores de crescimento

O tecido ósseo é uma fonte rica de fatores de crescimento com ações importantes na regulação de sua formação e reabsorção. Frequentemente, esses fatores de crescimento são sintetizados por células esqueléticas, embora algumas citocinas sejam secretadas por células estromais e do sistema imunológico ou hematopoiético, e encontradas no “microambiente” ósseo (Manolagas & Jilka, 1995). Provavelmente, esses fatores são liberados localmente pelo osso, quando reabsorvido, ou pelas células ósseas ativadas como consequência do processo de reabsorção. Essas células podem então agir de maneira seqüencial, regulando as ocorrências necessárias para a formação de tecido ósseo.

A superfamília dos fatores de crescimento teciduais β (TGF- β) pode ser particularmente importante na aposição que liga a formação com a reabsorção óssea anterior. A seguinte seqüência de ocorrências durante a remodelação óssea normal tem sido proposta: A reabsorção óssea provoca a liberação do TGF- β ativo do osso (Pfeilschifter & Mundy 1987) e sensibilização dos precursores dos osteoblastos, causando proliferação. Esta exposição ao TGF- β é, entretanto, provisória e, como consequência, as células originadas sofrem diferenciação e expressam as BMPs, proteínas morfogenéticas responsáveis por um efeito auto-estimulatório sobre os osteoblastos e formação de nódulos mineralizados. Porém, os membros da superfamília TGF- β não atuam sozinhos. Outros fatores de crescimento tais como os IGFs, FGFs e PDGF provavelmente também têm um efeito sobre a proliferação e diferenciação de osteoblastos. Estes fatores são todos estimulantes do crescimento ósseo. Há várias evidências que sugerem

interações sinérgicas, bem como inibitórias, entre os fatores de crescimento que agem sobre os osteoblastos. Por exemplo, o TGF- β , FGFs, PDGF, BMPs, IGF-I e IGF-II podem, cada um, estimular diretamente os osteoblastos, mas podem também reduzir a resposta do osteoblasto aos seus análogos (Massague, 1985; Roberts et al. 1985).

As interações entre os fatores de crescimento são complexas, mas é essencial elucidá-las para se ampliar a compreensão sobre os processos de formação óssea local. É provável que as complicadas interações entre os fatores liberados localmente de forma ativa, como uma consequência do processo de reabsorção, sejam responsáveis pela formação cuidadosamente coordenada do osso novo que ocorre nesses locais.

Segundo Deuel & Huang (1984) o PDGF estaria presente nos alfa-grânulos plaquetários, sendo secretados após a exposição das plaquetas a um corpo estranho como a membrana basal subendotelial ou colágeno. Baseados em outras pesquisas, afirmaram que o PDGF é uma glicoproteína altamente básica, separada em duas funções protéicas ativas que diferem entre si no conteúdo de carboidratos covalentemente unidos. Os PDGFs I e II apresentariam atividade mitogênica, composição aminoácida e reatividade imunológica semelhantes. O PDGF estimularia células alvo específicas através de união a receptores de superfície celular que, por sua vez, mediarão uma cascata de eventos que levariam a síntese de DNA e proliferação celular. Outra propriedade do PDGF seria a quimiotaxia de células inflamatórias e fibroblastos.

O fator de crescimento insulínico (IGF) desempenha importante papel na regulação anabólica do metabolismo ósseo e cartilaginoso (Bolander 1992; Canalis, 1993). McCarthy et al. (1989) demonstraram os efeitos regulatórios exercidos pelos IGF I e II na síntese de colágeno ósseo por osteoblastos e nos níveis de transcrição de colágeno tipo I em cultura de células enriquecidas com osteoblastos de osso parietal de ratos fetais. Seus achados demonstraram que ambos apresentaram ações similares, embora o IGF-I estimulasse a síntese de colágeno em 10nM e o IGF-II em 30nM. Ambos também aumentaram a incorporação de prolina em colágeno tipo I sem diminuir sua taxa de degradação.

Atualmente existem 4 fatores de crescimento fibroblástico, constituindo uma família de cinases tirosínicas transmembranais que possuem afinidade com pelo menos 22 receptores. Esses fatores de crescimento estão envolvidos em diversos processos, entre eles, migração e diferenciação celular, formação tecidual, diferenciação e sobrevivência neuronal, recuperação de feridas e transformações malignas (Coumoul & Deng, 2003; Franceschi et al., 2005).

Proteínas morfogenéticas

As primeiras descobertas sobre processos que determinam a formação de osso, em sítios onde não estavam previamente presentes esses tecidos, foram relatadas por Urist. Para o autor, um fator específico seria o responsável por este efeito. Esse fator foi relatado como uma substância indutora de formação óssea, presente na matriz óssea. Essas substâncias indutoras e as células induzidas

eram provenientes do hospedeiro e estas mesmas substâncias indutoras seriam descendentes de histiócitos e células do tecido conjuntivo peri-vascular. O termo osteoindução foi designado para um princípio fundamental de regeneração óssea desencadeado pela ação das proteínas ósseas morfogenéticas (Urist, 1965; Urist & Strat, 1971).

De uma seqüência de aminoácidos de extrato ósseo altamente purificado, Wozney et al., 1988, obtiveram clones de DNA que continham o código de cada proteína. Ao todo, obtiveram 8 proteínas e 7 delas, denominadas BMPs, apresentavam características estruturais semelhantes. A purificação da BMP presente no osso bovino possibilitou a identificação de diferentes variantes protéicas e a clonagem molecular de fatores com capacidade de induzir a formação de tecido ósseo. Com o isolamento de vários polipeptídios associados as BMPs, os autores determinaram sua seqüência de aminoácidos e sintetizaram sondas de oligonucleotídios. Dessa forma, foi possível a clonagem das BMPs de números 2 a 9 (BM-2 a BMP-9), que constituem membros da família de fatores de crescimento transformador beta (TGF- β). Os membros desta superfamília podem exercer efeito inibitório ou estimulante sobre as células, dependendo do estágio de diferenciação celular em que venham a atuar (Wozney et al., 1990).

As proteínas morfogenéticas possuem efeitos proliferativos sobre diferentes tipos celulares, exibindo propriedades quimiotáticas e podendo induzir a diferenciação de células mesenquimais em células de linhagem osteoblástica e condroblástica (Reddi & Cunningham, 1993). Além disso, as BMPs são potentes indutoras da osteogênese durante a fase de formação óssea embriológica e nos casos de reparos de fraturas (Hogan, 1996; Rosen et al., 1996). Entre os membros

da extensa família dessas proteínas, as BMP-2, 4 e 7 têm demonstrado importância fundamental na osteogênese (Hogan, 1996; Rosen et al., 1996).

A disponibilidade das BMPs recombinantes permitiram provar a capacidade osteoindutora dessas proteínas bem como a caracterização detalhada de suas atividades *in vivo*. A rhBMP-2 foi a primeira molécula estudada em detalhe (Wang et al., 1990), produzida a partir de células do ovário de hamsters chineses. A purificação e a caracterização bioquímica dessas moléculas demonstraram sua semelhança com as moléculas de BMP encontradas no osso humano (Israel et al., 1992; Inoda et al., 2004; Kamakura et al., 2004). Como é apontado no trabalho de Kamakura et al., 2004, o uso da rhBMP-2 em sistemas de liberação ectópicos, favorece a capacidade osteoindutora desta molécula. Nesse trabalho, diferentes dosagens de rhBMP-2 foram combinadas a um carreador específico (fosfato octacálcio- OCP) implantado em defeito ósseo crítico (9mm de extensão) na calvária de rato, e apresentaram formação óssea ectópica comprovada por exames histológicos.

Também Inoda et al. (2004) realizaram estudo em 30 ratos, combinando 50µg de rhBMP-2 em uma matriz carreadora a base de colágeno tipo I, para preenchimento de um defeito ósseo de 4mm na calvária, sacrificando os animais 3, 6 e 9 semanas após a implantação do material. Os resultados histológicos revelaram expressiva formação óssea no grupo que recebeu matriz de colágeno associada a rhBMP-2, em contraste com o grupo controle, que recebeu matriz de colágeno pura, evidenciando as propriedades osteoindutoras da rhBMP-2.

Por outro lado, a proteína morfogenética recombinante humana do tipo 4 (rhBMP-4) parece ter atividade muito similar à BMP-2, pois induziu a formação de cartilagem e osso em experimentos realizados em ratos (Sampath et al., 1992). As BMP-6 e BMP-7, assim como as BMP-2 e BMP-4, são osteoindutoras e condroindutoras, mas torna-se difícil comparar as atividades relativas de todas essas moléculas devido às diferentes metodologias utilizadas pelos pesquisadores na sua avaliação (D'Alessandro et al., 1991; Cox et al., 1991). Estudos *in vivo* demonstraram que as BMPs podem induzir a formação de tecido ósseo e cartilaginoso, porém, por um processo ainda não totalmente esclarecido e que envolve a participação de múltiplos fatores de crescimento locais e sistêmicos. Os estudos na caracterização individual dessas proteínas são complicados por 2 motivos: as comparações envolvendo os diferentes tipos de BMPs têm sido realizadas em tipos celulares distintos e alguns desses estudos, têm sido realizados com proteínas derivadas de tecido ósseo purificado, o qual geralmente contém diferentes tipos de BMPs.

Os tratamentos com BMPs resultam na diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em diferentes tipos celulares com seus respectivos fenótipos (Yamaguchi et al., 1991), por exemplo, nas células C26, a BMP-2 aumenta a expressão da fosfatase alcalina e dos receptores para o hormônio paratireoidiano (PTH) e também a expressão da osteocalcina, um marcador para diferenciação de osteoblastos.

De um modo geral, as BMPs *in vitro* possuem efeitos significantes nas células nos múltiplos estágios de formação óssea, como também observado em estudos *in vivo*. Através de quimiotaxia, as BMPs podem trazer células ao sítio de

implantação e fazer com que células mesenquimais indiferenciadas se transformem em tipos celulares específicos sintetizadores de tecido ósseo e cartilaginoso, como os osteoblastos e condroblastos (Inoda et al., 2004; Kamakura et al., 2004).

Em 1965, Marshall Urist descobriu que a matriz óssea descalcificada implantada em sítios não-ósseos induziu à formação de novo tecido ósseo e cartilaginoso (Urist, 1965). O autor definiu este processo como autoindução e mostrou que extratos de proteína poderiam ser separados do tecido ósseo descalcificado e seriam responsáveis por essa formação de osso novo (Urist et al., 1973). Nesse modelo, novo osso era formado seguindo eventos bem caracterizados de ossificação endocondral, com a formação de tecido cartilaginoso antes da formação de osso novo. (Urist et al., 1979; Sampath & Reddi, 1981).

Proteínas recombinantes humanas

O osso pode ser descrito como tendo três componentes: um componente mineral, uma matriz de colágeno e um componente de proteínas de crescimento. Usando modelos experimentais em rato, alguns autores desmineralizaram e separaram o tecido ósseo em um componente de matriz colágena e um componente de proteínas de crescimento. O componente protéico foi reconstituído com matriz inativa e implantado ectopicamente. Novo osso foi observado após 10 dias, sendo esse componente de fator de crescimento chamado de proteína óssea morfogenética (Urist et al., 1979; Sampath & Reddi, 1981).

Embora a BMP tenha a habilidade de induzir formação de osso novo, é difícil de ser obtida pelo processo de purificação porque pequenas quantidades estão presentes no osso. Recentes avanços nas técnicas de biologia molecular proporcionaram a produção de grandes quantidades de proteínas humanas recombinantes puras, como as BMPs.

O desenvolvimento das proteínas recombinantes (rhBMPs) começou por isolamento de membros individuais da superfamília de proteínas morfogenéticas. Muitas dessas proteínas são membros dos fatores de crescimento transformante beta (TGF- β) que constituem uma superfamília de proteínas baseadas na homologia de seqüência de aminoácidos primários (Celeste et al., 1990). As recombinantes BMP-2 e BMP-4 são 92% idênticas; e a BMP-5,6,7 e 8 são 82% idênticas (Wozney, 1995).

Isolando as BMPs de ossos de cadáveres humanos, somente 0,1 μ g de BMP por quilograma de osso pode ser obtido. Já a rhBMP-2 pode ser produzida em abundância. Essa proteína possui propriedades não-antigênicas e não-imunogênicas, não havendo risco de transferência de doença humana porque ela é uma proteína produzida por princípios de bioengenharia (Genetics Institute, Cambridge Mass, unpublished reports, 1995).

A atividade osteoindutora das proteínas morfogenéticas recombinantes humanas (rhBMPs) foi avaliada em estudos *in vivo* (Fujimura et al., 1995; Kusumoto et al., 1995). Devido à potente ação osteoindutora observada nesses estudos, torna-se evidente o potencial dessas proteínas para uma grande

variedade de aplicações clínicas, como cirurgias reconstrutivas, defeitos ósseos provocados por processos patológicos, perdas ósseas fisiológicas, dentre outras (Johnson et al., 1988 a, b, 1990; Toriumi et al., 1991; Marden et al., 1994; Boyne, 1995).

Relação entre BMP e TGF- β

Embora as BMPs façam parte da superfamília TGF- β , parece não haver muitos efeitos em comum sobre diversos tipos celulares, conforme demonstrado em estudos *in vitro*. Por exemplo, o TGF- β inibe a produção de fosfatase alcalina em vários tipos celulares, incluindo as células C26, W-20-17 e MC3T3-E1 (Noda & Rodan, 1986; Katagiri et al., 1990b), enquanto as BMPs aumentam a produção dessas substância nos mesmos tipos celulares. Também em contraste com as BMPs, o TGF- β suprime a incorporação de sulfato em alguns tipos celulares específicos.

Si et al. (1998) estudaram as ações sinérgicas da rhBMP-2 e TGF- β 1 na formação óssea. Os autores enxertaram essas substâncias combinadas ao osso bovino cerâmico no músculo da coxa de 45 camundongos na forma de três complexos diferentes: apenas rhBMP-2, apenas TGF- β 1 e rhBMP-2 associada ao TGF- β 1. A análise histológica após 3, 5, 7 e 14 dias mostrou que, com exceção do grupo que recebeu apenas TGF- β , ocorreu neoformação óssea ectópica, e que a quantidade de tecido ósseo neoformado induzido pela rhBMP-2/TGF- β 1 foi maior

do que com o enxerto de rhBMP-2 isoladamente, com diferenças estatisticamente significantes.

Uso ectópico da BMP

Gao et al. (1995) estudaram, por meio de métodos histoquímicos, os mecanismos pelos quais as BMPs induziam a formação óssea em outros tecidos. Verificaram que este efeito pode ser dependente da expressão celular de certas substâncias, tais como a fibronectina, a BMP endógena e a fosfatase alcalina.

Chaudhari, Ron e Rethan (1997) examinaram a rhBMP-2 e seus efeitos, *in vitro*, usando marcadores bioquímicos para fenótipos osteoblásticos, em culturas primárias de osteoblastos de calvária de fetos de ratos. Os resultados indicaram que a rhBMP-2 estimula a atividade da fosfatase alcalina e paratormônio (PTH), além de induzir a produção de AMP cíclico e a biossíntese de colágeno numa forma dose-dependente, em culturas confluentes e após 48 horas. Foram também estudados os efeitos da rhBMP-2 na atividade da fosfatase alcalina na presença ou ausência do ácido ascórbico. Os resultados indicaram que a presença do ácido ascórbico potencializou o efeito da rhBMP-2, porém sua ausência não pareceu ser determinante, demonstrando que ele não seria um co-fator essencial na ativação da rhBMP-2, mas sim capaz de amplificar os efeitos osteoindutores da rhBMP-2.

Ong et al. (1997) compararam, *in vitro*, a atividade de osteoblastos tratados ou não com BMP-2, aplicados à superfície de titânio, e verificaram um aumento significativo de fosfatase alcalina e vitamina D3, aparentemente responsável pela produção de osteocalcina.

Uso das BMPs em pequenos defeitos ósseos

Xiang et al. (1993) analisaram a osseointegração de cilindros de titânio endósseos em 15 cães edêntulos. Foram testados implantes recobertos com BMPs bovinas e com albumina bovina. Após 8 semanas, foram observadas áreas de tecido fibroso ao redor dos implantes recobertos com albumina, enquanto os implantes cobertos com BMPs apresentavam uma área de contato contínua com o osso adjacente, indicativa de maior osseointegração.

Sigurdsson et al. (1995) avaliaram a regeneração de cimento e osso em defeitos supra-alveolares de 5x5mm criados cirurgicamente em cães Beagle e tratados com rhBMP-2. O grupo experimental recebeu rhBMP-2 associada a partículas biodegradáveis misturadas em sangue autólogo enquanto os defeitos no grupo controle foram deixados apenas com o coágulo. Observou-se pequena quantidade de reabsorção óssea no primeiro grupo e extensas áreas reabsorvidas no grupo controle, indicando uma ação significativa da rhBMP-2 na estimulação da regeneração óssea periodontal.

Sigurdsson et al. (1996) avaliaram diversos carreadores para a rhBMP-2, num estudo sobre o processo de regeneração periodontal em defeitos de tamanho crítico, na região supra-alveolar de caninos de cães da raça Beagle. Foram usadas matrizes ósseas desmineralizada (DBM) e cristalina bovina (Bio-Oss), esponja de colágeno absorvível (ACS), além de ácido poliglicólico (PLGA) e grânulos de ácido polilático (PLA), associados a 0,2mg/mL de rhBMP-2. Após 8 semanas, os animais foram sacrificados e os tecidos analisados histologicamente. Regeneração óssea substancial foi observada nos grupos em que foi aplicada a rhBMP-2, sendo os carreadores DBM e Bio-Oss os que apresentaram melhores

resultados, apesar de alguns problemas quanto ao uso clínico desses carreadores. Este estudo indicou que a qualidade do material carreador, incluindo a capacidade de manter espaço pode afetar a ação da rhBMP-2 sobre o processo de regeneração periodontal.

Nevins et al. (1996) utilizaram rhBMP-2 como material de enxerto no levantamento de seio maxilar, em 6 cabras adultas. A formação óssea foi observada através de seqüenciais radiográficas, tomografias computadorizadas e análises histopatológicas. Os resultados mostraram que a rhBMP-2 foi capaz de induzir a formação de tecido ósseo trabecular denso no assoalho do seio maxilar, sem nenhuma resposta adversa após 12 semanas.

Higuchi et al. (1999) avaliaram o potencial de recuperação ósseo em ratos Long-Evans após aplicação de BMP-2. Para isso um defeito de 5mm de diâmetro foi criado na região do ângulo mandibular, sendo que no grupo experimental foi aplicado 6µg de rhBMP-2 em 60µl do copolímero PGS utilizado como material carreador e no grupo controle, apenas foi aplicado o material carreador. Os animais foram sacrificados após 4 semanas e as mandíbulas submetidas a processamento histológico para posterior análise histomorfométrica. Os resultados obtidos apontaram substancial formação óssea no grupo que continha a rhBMP-2.

Uso das BMPs em grandes defeitos ósseos

Boyne et al. (1996) produziram defeitos ósseos bilaterais de 2,2cm na mandíbula de 7 macacos Rhesus. Três macacos tiveram duas lojas cirúrgicas preenchidas com doses diferentes de rhBMP-2 (0,8mg/centímetro e 0,2mg/centímetro). Em 4 macacos, um defeito ósseo recebeu 0,4mg/centímetro de

rhBMP-2 e o outro foi preenchido por osso autógeno. Após 4 meses, as áreas enxertadas receberam implantes de titânio, sendo possível observar a completa regeneração óssea nos 7 animais. A análise histológica dos 3 macacos que receberam a proteína revelou altas taxas de matriz óssea calcificada, assim como várias camadas de osso lamelar no rebordo, indicando que a rhBMP-2 é capaz de induzir a regeneração de defeitos ósseos críticos.

Boyne, Nath e Nakamura (1998) compararam também em macacos Rhesus a utilização da proteína óssea morfogenética do tipo 2 (rhBMP-2) com enxerto ósseo medular autógeno particulado esponjoso (PMCB) para a regeneração de defeitos criados cirurgicamente, simulando fissuras maxilares. Os autores concluíram que a rhBMP-2, em combinação com um osteocondutor apropriado, pode ser um substituto efetivo para o enxerto autógeno de PMCB na reconstrução de defeitos ósseos de fissuras congênitas de maxila.

Marukawa et al. (2001) avaliaram os efeitos da rhBMP-2 na formação óssea de defeitos no osso alveolar mandibular de primatas jovens Rhesus, de forma isolada ou em esponja revestida de ácido poliglicólico (PGLA), chegando a conclusão de que a combinação com PGLA pode ser uma alternativa efetiva na substituição do enxerto ósseo autógeno para reconstrução cirúrgica na prática clínica. Entretanto, na forma isolada, a rhBMP-2 não demonstrou tanta eficiência, exigindo assim um material osteocondutor quando usada em grandes defeitos ósseos.

Yamamoto et al. (2006) propuseram investigar a capacidade do hidrogel biodegradável de gelatina como material carreador da rhBMP-2 na regeneração óssea de coelhos. Para isso, foram criados defeitos ósseos críticos de 20mm no

osso ulnar de coelhos neozelandeses e 17 μ g de rhBMP-2 foi incorporada em quantidade suficiente do gel para preencher o defeito ósseo. As análises por raios X de baixa intensidade revelaram maior quantidade de tecido ósseo neoformado no grupo que continha a BMP-2 incorporada ao hidrogel do que no grupo que continha somente o hidrogel, sugerindo assim que este gel possui propriedades adequadas para a biodisponibilização da BMP-2.

Carreador para a biodisponibilização da proteína

A proteína morfogenética de classificação 2, ou rhBMP-2, vem provocando interesses para aplicações clínicas, por sua capacidade diferenciada de induzir a ossificação e por estar disponível comercialmente.

Entretanto, *in vivo*, a rhBMP-2 se difunde rapidamente a partir do local de implantação, quando depositada em solução, o que abrevia o seu efeito osteoindutor (Fujimura et al., 1995). Para isso, estudos recentes têm demonstrado que a aplicação de doses elevadas dessas proteínas diretamente sobre os tecidos não é tão eficaz quanto à indução de osteogênese, pela rápida metabolização protéica (Wang et al., 1990; Wozney et al., 1990); entretanto, doses menores, mas sustentadas, parecem produzir resultados satisfatórios (Yasko et al., 1992; Gerhart et al., 1993; Lee et al., 1994; Bostrom et al., 1995). Assim, a presença de um material carreador influencia no volume de osso formado e diminui a quantidade de proteína necessária para a indução da formação óssea. Portanto, o papel da matriz carreadora é o de imobilizar a proteína no sítio em que foi implantada por um período de tempo suficiente para que ocorra a resposta celular. Para isso, o

carreador deve apresentar características satisfatórias quanto as propriedades químicas, textura superficial, tamanho dos poros, volume de lacunas, taxa de biodegradação, hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, cristalinidade e cinética de liberação das moléculas a serem incorporadas (Hollinger & Battistone, 1986; Hollinger, 1993; Hollinger et al., 1995; Hollinger & Leong, 1996). Nesse sentido, substâncias capazes de disponibilizar as BMPs aos tecidos por períodos prolongados, tais como as esponjas de fibrina e colágeno, hidroxiapatita, sulfato de cálcio, matriz óssea desmineralizada, cerâmicas de fosfato de cálcio, biovidros, organoapatitas, organofosfatos, homopolímeros polilácticos e materiais sintéticos como os copolímeros têm sido utilizados como carreadores em diversos estudos (Miller & Rhodes, 1982; Bolander & Balian, 1986; Kawamura et al., 1987; Yamazaki et al., 1988; Takaoka et al., 1988, 1991; Hollinger et al. 1989; Desilets et al., 1990; Richard et al., 1991; Ripamonti, 1991; Sato et al., 1991; Miyamoto et al., 1992; Stupp & Ciegler, 1992; Ripamonti & Reddi, 1992; Katz et al., 1993; Li, 1993; Ohgushi et al., 1993; Damien et al., 1994; Ducheyne et al., 1994; Hollinger et al., 1995; Renier & Kohn, 1997; Matsuo et al., 2003; Peterson et al., 2005).

Entretanto, propriedades como reabsorção controlada, densidade adequada para suportar os tecidos moles, liberação sustentada de fármacos, facilidade de manipulação e aplicação, são propriedades desejáveis, porém nem sempre encontradas nos materiais atualmente disponíveis (Bessho & Iizuka, 1995; Bessho et al., 2002; Keskin et al., 2005).

Assim, biomateriais osteocondutivos podem servir como ponto inicial para desenvolver carreadores de BMPs. Obviamente, cada classe de biomateriais

osteocondutivos tem suas vantagens e desvantagens, sendo a comparação entre os diferentes materiais usados como carreadores dessas proteínas uma tarefa difícil, em função dos diferentes modelos experimentais e dos diferentes sítios anatômicos utilizados para a implantação do material (Lindholm & Gao, 1993; Hollinger & Leong, 1996).

Estudos pré-clínicos têm enfatizado que a otimização na aplicação clínica das proteínas morfogenéticas é dependente de uma liberação sustentada em pequenas doses, pois proporcionam menores riscos de efeitos colaterais. Além do mais, um sistema carreador adequado deve ser seguro e apresentar propriedades bem definidas e resultados previsíveis. O material carreador deve exibir ainda, a plasticidade necessária para aplicação em regiões com características anatômicas distintas (Riley et al., 1996; Ripamonti & Duneas, 1996).

Assim, alguns materiais têm sido apontados como sistemas carreadores adequados para as rhBMPs. O material carreador há mais tempo utilizado e, portanto, mais estudado é o colágeno, citado na literatura como um material biocompatível e eficiente na liberação sustentada da rhBMP, independentemente do seu sítio de implantação (Sigurdsson et al., 1995; Sigurdsson et al. 1996; Toriumi et al., 1990; Kirker-Head et al., 1996). O colágeno oferece às células um substrato permissivo para sua união e diferenciação (Sampath & Reddi, 1981; Reddi, 1992). O colágeno é o principal componente da matriz extracelular (ECM), que influencia a biologia das células sensibilizando os receptores na sua superfície, interagindo com fatores de crescimento, como as BMPs, e

proporcionando um ambiente de interação (Sampath & Reddi, 1981; Paralkar et al., 1990; Reddi, 1992; Vukicevic et al., 1993).

Kenley et al. (1994) realizaram um estudo em que o PLGA foi aplicado puro ou combinado a 10 ou 30 µg de rhBMP-2 em defeitos ósseos de 8mm em calvária de ratos, para comparação com um grupo controle em que foi implantada apenas a matriz óssea colágena. Após 21 dias, os animais foram sacrificados e submetidos a análise radiográfica e histomorfométrica. O exame radiográfico revelou radiopacidade em todos os animais em que foi aplicada a rhBMP-2, indicando neoformação óssea, enquanto a análise histológica revelou reabsorção do PLGA após 21 dias. Os autores salientaram a necessidade de se pesquisar materiais carreadores que permaneçam no local e que sejam capazes de disponibilizar essas proteínas aos tecidos adjacentes de modo gradual.

Uma consideração importante no uso de carreadores para as proteínas morfogenéticas diz respeito ao volume do defeito a ser reparado. Defeitos ósseos muito grandes requerem uma quantidade apreciável de biomaterial a ser implantado e levam mais tempo para que o carreador seja reabsorvido, o que pode levar à formação de tecido fibroso e interferir no processo de remodelação óssea. Esse aspecto é apresentado no trabalho de Sirgudsson et al. (1996), que compararam a eficácia da matriz óssea desmineralizada, osso mineral bovino, esponja de colágeno e grânulos de PLGA e PLA, como carreadores para a rhBMP-2, quando implantados em defeitos periodontais na região supra-alveolar de canino. Embora esses carreadores apresentassem propriedades físico-químicas diferentes, quantidades substanciais de tecido ósseo e cementário foram

observadas em todos os casos. Nesse estudo, os grânulos de PLA e osso mineral não se degradaram de modo significativo após 8 semanas, o que limitou a quantidade de tecido ósseo neoformado. O volume do defeito dificultou a estabilização do carreador, especialmente dos particulados, que pareciam migrar para o sítio de implantação.

Uso de BMPs associadas a membranas

Galgut (1993), utilizando membranas biodegradáveis na regeneração tecidual guiada, verificou uma cicatrização rápida, com recuperação da anatomia e do epitélio queratinizado e mínima retração do tecido mole. O autor concluiu que esse material biodegradável eliminaria um segundo procedimento cirúrgico de remoção e poderia ser utilizado como rotina em procedimentos cirúrgicos de regeneração.

Zellin e Linde (1997) investigaram se membranas fixadas isoladamente ou em combinação com a rhBMP-2 na região craniofacial e precocemente expostas, são capazes de contribuir no processo de cicatrização óssea em defeitos críticos de ossos longos de coelhos. Para isso um defeito de 10mm de extensão, no osso rádio, foi tratado com a fixação de membranas dilatadas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE). Os resultados mostraram uma formação óssea mínima no interior do defeito e em muitos casos o colapso das membranas, porém, quando se utilizou membranas em combinação com a rhBMP-2, ocorreu a formação de um filete ósseo ligando os dois cotos do defeito em 10 semanas. Os autores

concluíram que membranas combinadas com rhBMP-2 podem produzir uma completa cicatrização do defeito em ossos longos de coelhos.

Fritz et al. (2000) verificaram como membranas de grande comprimento podem permanecer em posição em grandes defeitos ósseos, para a promoção de regeneração guiada, num experimento em 18 macacos adultos da espécie *Macaca mulatta*. Os autores criaram defeitos ósseo bilaterais mandibulares padronizados em 8x19mm e os recobriram com membranas reforçadas (ePTFE) estabilizadas por mini parafusos. Nenhum material foi adicionado ao defeito. Os resultados indicaram, através de radiologia digital e histomorfometria, que nenhum aumento ósseo ocorreu nos casos de membranas expostas por 1 mês ou menos. Os autores sugerem, com base nos resultados encontrados, que membranas fixadas no lugar por 1 mês ou menos resultaram em mínimo ganho ósseo, comparado com membranas fixadas por 2 a 12 meses. Os resultados histológicos mostraram que o osso formado após 2 meses da inserção da membrana já era maduro.

Aplicação clínica da rhBMP-2

A efetividade no uso da rhBMP-2, representada pela quantidade e nível de indução para formação óssea é afetada pelo carreador utilizado, espécie animal e pelo tempo de espera até o sacrifício do animal (Wozney, 1995; Zellin & Linde, 1997). Yasko et al. (1992) em um estudo sobre os efeitos da rhBMP-2 em fêmur de ratos, observaram que uma dose de 11µg de rhBMP-2 resultou em significante

formação óssea, com evidências mecânicas, radiográficas e histológicas dessa união, enquanto que uma dose de 1,4µg produziu novo osso, mas sem evidências de união. Outros estudos demonstraram também que dosagens muito altas de rhBMP-2 não são efetivas, cabendo ao carreador o papel de proporcionar uma distribuição lenta e gradual da rhBMP-2 (Zellin & Linde, 1997).

Vários experimentos foram realizados para se testar a habilidade osteoindutora das proteínas morfogenéticas na recuperação de defeitos ósseos críticos realizados nas mais variadas espécies animais, entre eles, nos ratos (Doll et al., 1990; Mark et al., 1990), coelhos (Moore et al., 1990), cachorros (Sato & Urist, 1985; Urist et al., 1987b; Nilsson & Urist, 1991), ovelhas (Lindholm et al., 1988) e macacos (Ferguson et al., 1987). Em todos esses estudos, há indícios de que as moléculas de BMP são muito úteis no tratamento de inúmeras condições clínicas onde se objetiva a formação de osso novo (Einhorn, 1992).

Assim, uma nova classe de tratamentos está sendo realizada empregando essas proteínas recombinantes e, dessas proteínas, a rhBMP-2 é a que possui maior número de estudos pré-clínicos e clínicos sobre potencial toxicológico. Esses estudos incluem a rhBMP-2 em doses única e múltipla, bem como estudos de fertilidade e teratologia. Dosagens de rhBMP-2 foram administradas por via intravenosa (IV), similarmente a outros estudos. Em todos os estudos, as dosagens de rhBMP-2 (por quilograma de peso corpóreo) foram selecionadas em uma quantidade inferior àquela utilizada nos estudos clínicos humanos.

Uma única dose intravenosa de 5,3mg/Kg de peso corpóreo em ratos e cães revelou ser compatível, não havendo perdas ou qualquer outra complicação

durante o tratamento (Schaub, 1993). A toxicidade da rhBMP-2 após múltiplas doses foi avaliada em ratos Sprague-Dawley e cães da raça beagle (Schaub, 1993), sendo que após 28 dias de estudo, nenhum efeito adverso foi notado.

Em estudos de teratologia com ratos e coelhos, o tratamento com rhBMP-2 em ratos e coelhos grávidos, não produziram qualquer toxicidade maternal sistêmica ou anormalidade fetal com dosagens de até 1,6mg/Kg/dia. Nos estudos de fertilidade, nenhum efeito maternal ou paternal na performance reprodutiva foi observada com dosagens de até 0,16mg/Kg/dia (Genetics Institute, Cambridge Mass, unpublished reports, 1995).

Monoleína

Atualmente os lipídeos estão se destacando como potenciais excipientes para a indústria farmacêutica, apresentando características interessantes para serem usados como sistemas carreadores de fármacos, com particular interesse na veiculação de fármacos pouco solúveis em água. Vários lipídeos obtidos de fontes naturais com polaridade variável já se encontram disponíveis comercialmente (D'Ántona et al., 2000).

A monoleína ou monoleato de glicerila é um lipídeo polar capaz de formar géis de fase líquido-cristalina liotrópica quando em contato com a água. Trata-se de um composto anfifílico que apresenta uma cadeia carbônica de 18 carbonos contendo uma insaturação do tipo *cis* no carbono 9 e esta cadeia está unida ao

glicerol por uma ligação éster. A presença da dupla ligação favorece a formação de estruturas não lamelares, como a fase cúbica (Shah & Paradkar, 2005).

Sistemas formados por monoleína e água apresentam várias características desejadas para os sistemas de liberação de fármacos e por isso vêm sendo propostos para este fim. Estes sistemas são atóxicos, GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) e são bastante usados na indústria farmacêutica de alimentos e cosméticos. Eles são também biodegradáveis, uma vez que a monoleína pode ser degradada por esterases presentes em vários tecidos, sendo liberado ácido oléico e glicerol, além de serem considerados biocompatíveis, pois são produzidos naturalmente como um produto final da digestão de lipídeos (Norling et al., 1992; Stoltze, 1995; D'Antona et al., 2000).

Esses sistemas têm sido utilizados como carreadores de fármacos em várias formas farmacêuticas, assim como em várias vias de administração (Shah et al., 2001), como, por exemplo, matrizes semi-sólidas, implantes subcutâneos e intra-musculares (Mallone et al., 2000), injeção intravenosa (Lee & Kellaway, 2000a,b) e também géis para aplicação intra-nasal (Ramanathan et al., 1998). A monoleína também apresenta propriedades bioadesivas, o que indica seu uso em sistemas de liberação trans-mucosa (Geraghty et al., 1997; Lee et al., 2001). Por via oral, pode se utilizar cápsulas contendo matrizes de monoleína que, no momento do uso, formará a fase cúbica quando em contato com líquidos corporais (Chang & Bodmeier, 1997a) ou ainda matrizes com monoleína, nas quais haveria a formação de uma camada líquido-cristalina ao redor da matriz quando em contato com o meio aquoso (Nielsen et al., 1998). Cápsulas contendo metoprolol e

monoleína são exemplos da administração por via oral com formação da fase cúbica *in vivo* (Carr et al., 1997).

Uma das características importantes da fase cúbica é sua estabilidade física em excesso de água, assim como estabilidade a 37°C, o que possibilita sua administração por várias vias, mantendo sua estrutura quando em contato com fluidos biológicos (Lara et al. 2005).

Para via parenteral, no entanto, uma dificuldade encontrada para a administração é a elevada viscosidade da fase cúbica, o que dificulta sua administração por meio de injeção (Puri & Bansal, 2004). Neste caso, são utilizados sistemas líquido-cristalinos de fase lamelar, menos viscosos e que podem ser injetados através de uma seringa, os quais absorvem água do meio circundante e se convertem em fase cúbica no local de aplicação (Sadhale & Shah, 1999a). As propriedades de fluxo de sistemas de monoleína, assim como a mesofase formada, também podem ser alteradas visando maior facilidade para injeção através de mistura de solventes ou outros excipientes variados (Norling et al., 1992; Alfons & Engstron, 1998; Chang & Bodmeier, 1998; Nielsen et al., 1998; D'Ántona et al., 2000; Malonne et al., 2000).

Com relação à incorporação de fármacos, os sistemas de monoleína e água são capazes de solubilizar fármacos com diferentes propriedades físicas e químicas (Caboi et al., 2000; Lee et al., 2005). Devido a seu caráter anfifílico, o sistema é capaz de incorporar tanto fármacos lipofílicos como hidrofílicos (Chang & Bodmeier, 1997b; Malonne et al., 2000; Boyd et al., 2006). Os fármacos

hidrofílicos ficam solubilizados nos canais de água do sistema, enquanto que fármacos lipofílicos ficam incorporados na bicamada lipídica. Os géis de fase cúbica de monoleína e água mostraram-se capazes de promover uma liberação lenta de fármacos (Wyatt & Dorschell, 1992). Burrows et al. (1994) estudaram a liberação *in vitro* de vários fármacos com solubilidades diferentes a partir de géis de fase cúbica de monoleína e água.

Também podem ser incorporados fármacos de várias massas moleculares, inclusive peptídeos e proteínas, sem perda da atividade biológica de enzimas (Nylander et al., 1996; Shah et al., 2001). Ericsson et al. (1983) demonstraram que sistemas de fase cúbica de monoleína e água são capazes de incorporar proteínas de várias massas moleculares, além de permitir a liberação destas proteínas, com a manutenção da atividade enzimática, o que foi observado com lizosima. Nesse estudo, a formação de fase cúbica parece ser facilitada quando as proteínas apresentam carga líquida. Também já foi demonstrado que sistemas de fase cúbica de monoleína e água aumentaram a estabilidade de fármacos peptídicos, através de uma ação protetora contra degradação enzimática (Lee & Kellaway, 2000 a,b).

Leslie et al. (1996) estudaram a encapsulação de hemoglobina em sistemas de fase cúbica de monoleína, obtendo elevada eficiência de encapsulação sem provocar alteração na estrutura da hemoglobina. O sistema permitiu uma liberação lenta da hemoglobina encapsulada e pode ser sugerido como potencial veículo para hemoglobina e outros agentes bioativos.

Os sistemas de fase cúbica de monoleína também foram estudados como veículos potenciais para a liberação de insulina, apresentando inclusive, aumento na estabilidade da mesma. Nestes estudos, o gel de fase cúbica foi capaz de incorporar insulina e aumentar sua estabilidade, por meio de um efeito protetor contra agregação de moléculas que pode ocorrer com fármacos peptídicos em solução e que leva à precipitação e inativação do fármaco. Os sistemas líquido-cristalinos de fase lamelar que são capazes de absorver água e se converterem em fase cúbica *in situ* foram utilizados para a incorporação de insulina devido a sua menor viscosidade, o que facilita a administração injetável. A insulina incorporada nestes sistemas não apresentou alteração em sua estrutura, mantendo sua conformação nativa e sua atividade biológica. A liberação *in vitro* da insulina nestes sistemas foi lenta, apresentando 100% de liberação em 4 dias. Entretanto, estudos *in vivo* apresentaram uma liberação mais rápida de insulina, provavelmente devido à degradação do sistema no tecido subcutâneo pela ação de esterases (Sadhale & Shah, 1999 a, b).

Os sistemas de monoleína e água também apresentam propriedades bioadesivas, ainda que o mecanismo de bioadesão não esteja completamente elucidado (Geraghty et al., 1997; Lee & Kellaway, 2000b). Os sistemas precursores de fase cúbica apresentam propriedades bioadesivas maiores do que a fase cúbica propriamente dita, sugerindo um mecanismo de bioadesão inespecífico, no qual ocorre a formação da fase cúbica durante o processo de bioadesão, provavelmente envolvendo a desidratação da mucosa no local de aplicação (Nielsen et al., 1998; Lee et al., 2001).

Norling et al. (1992) estudaram um sistema líquido-cristalino de monoleína capaz de se transformar em fase cúbica *in situ* para a administração do metronidazol para aplicação em bolsa periodontal. O sistema apresentou liberação lenta do fármaco, através da difusão do mesmo pelos canais de água do gel.

Geraghty et al. (1996) avaliaram o uso de um sistema de monoleína e água como sistema de liberação para fármacos anto-muscarínicos (brometo de propantelina e cloridrato de oxibutinina) para administração vaginal, observando que o sistema sustentou a liberação dos fármacos por períodos de 18 a 20 horas. A cinética de liberação foi dependente da raiz quadrada do tempo, indicando que a liberação dos fármacos foi controlada por difusão e sugerindo que a velocidade de liberação dos fármacos foi controlada pela difusão das moléculas através dos canais de água da fase cúbica líquido-cristalina.

Os sistemas de monoleína foram avaliados como sistemas intra-nasais para administração de prometazina, num estudo comparativo entre formulações intra-nasais (gel de monoleína e microsferas de carboximetilcelulose) e injeção intravenosa. As formulações intra-nasais demonstraram biodisponibilidade comparável e velocidade de absorção maior do que injeção intra-muscular em cachorros, sem apresentar irritabilidade ou inflamação local no sítio de administração, sendo consideradas como formulações promissoras para a administração de prometazina. Neste estudo, entretanto, as microsferas de carboximetilcelulose apresentaram biodisponibilidade maior do que o gel de fase cúbica (Ramnathan et al., 1998).

Lee & Kellaway (2000a,b) estudaram sistemas de fase cúbica e lamelar de monoleína para a administração de um peptídeo modelo (D-Ala, D-Leu encefalina) na forma de sistemas bioadesivos bucais, aproveitando as propriedades bioadesivas da monoleína. A liberação do peptídeo mostrou ser influenciada pelo teor inicial de água do sistema, assim como pela temperatura (Lee & Kellaway, 2000a). Os sistemas líquido-cristalinos apresentaram fluxo de permeação *in vitro* na mucosa bucal maiores do que o controle, sugerindo um efeito promotor de absorção da monoleína (Lee & Kellaway, 2000b). A adição de ácido oléico e polietileno 200 em sistemas de fase cúbica de monoleína e água não modificou a estrutura dos mesmos e aumentou a permeação *in vitro* do peptídeo D-Ala, D-leu encefalina, otimizando o efeito promotor da monoleína no sistema (Lee & Kellaway, 2000c).

Malonne et al. (2000) estudaram sistemas de monoleína para a administração de cloridrato de tramadol na forma de implantes injetáveis intramusculares, verificando através de estudos *in vitro* e *in vivo*, que a formulação avaliada proporciona liberação sustentada do fármaco.

A monoleína também vem sendo proposta como adjuvante na formulação de vacinas, mostrando-se capaz de aumentar a resposta imune em estudos de formulações para imunização através da mucosa nasal (Schröder & Svenson, 1999).

Os sistemas líquido-cristalinos podem ser utilizados no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos transdérmicos. Os cristais líquidos aumentam a

solubilidade de compostos e favorece o coeficiente de difusão de fármacos, facilitando o transporte do fármaco através de membranas biológicas, bem como através da pele (Wahlgren et al., 1984). Além disso, foi demonstrado que lipídeos extraídos do estrato córneo humano formam estruturas líquido-cristalinas lamelares, sendo que os lipídeos polares são os maiores responsáveis pela estrutura organizacional dos lipídeos da pele. A estrutura lamelar formada pelos lipídeos no estrato córneo é considerada essencial para a função de barreira do mesmo (Kayali et al., 1991). Em virtude desta afinidade com a estrutura dos lipídeos do estrato córneo, sistemas líquido-cristalinos podem ser apropriados para o desenvolvimento de sistemas transdérmicos.

Além disso, a monoleína é considerada um promotor de absorção, facilitando a permeação de fármacos através da pele. Tem sido sugerido que a monoleína é capaz de penetrar nos domínios intercelulares do estrato córneo e modificar a estrutura dos lipídeos, rompendo a estrutura organizada dos mesmos, o que é essencial para a função de barreira na pele e, desta maneira, facilitando a difusão de fármacos através da pele (Ogiso et al., 1995). A presença de uma insaturação na cadeia carbônica da monoleína pode ser responsável pelo seu efeito promotor, formando espaços que alteram a organização lipídica da pele (Tanojo et al., 1997). Os sistemas de monoleína e água foram capazes de aumentar a permeação de fármacos em membranas e na pele, além de serem capazes de controlar a liberação de fármacos. Carr et al. (1997) encontraram uma permeação de nicotina através do estrato córneo de 2 a 3 vezes maior utilizando-

se géis de monoleína e água quando comparado com sistemas não líquido-cristalinos, sugerindo o efeito promotor do lipídeo.

Embora a descoberta das proteínas morfogenéticas e sua produção em laboratório sejam relativamente recentes, já é bem reconhecida a ação osteogênica potente que apresentam. A aplicação da rhBMP-2 em combinação com o gel de monoleína, para uma liberação controlada, poderá produzir resultados cientificamente relevantes. Apesar de não haver relatos na literatura sobre seu uso em associação às proteínas morfogenéticas, é bem documentado seu sucesso na liberação controlada de fármacos sobre a pele ou mucosa. Pelo fato de apresentar consistência física apropriada, facilidade para associação de substâncias farmacologicamente ativas e ser de fácil produção, justifica-se o interesse na sua avaliação como agente carreador.

PROPOSIÇÃO

Diante das amplas possibilidades de uso das proteínas morfogenéticas na Odontologia, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade e a quantidade do tecido ósseo neoformado, sob estímulo da associação rhBMP-2/monoleína, em defeitos criados no osso mandibular de ratos Wistar, utilizando-se métodos histomorfométricos e estatísticos para a análise.

MATERIAL E MÉTODO

Infra-estrutura para implementação da pesquisa

O Campus da USP de Ribeirão Preto possui Biotério Central que providencia distribuição regular de cobaias (*Cavia porcellus*), ratos Wistar e camundongos Suíços. O laboratório de Diagnóstico Molecular localizado no Departamento de Materiais Dentários e Prótese, os laboratórios de Neurofisiologia Molecular e de Pesquisa Macro e Microscópica localizados no Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e o laboratório de Tecnologia Farmacêutica situado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-RP, contam com salas para experimentação animal, equipamentos para obtenção dos sistemas baseados em monoleína e BMP, análise química, pesagem e análises histológicas e histoquímicas. Entre os equipamentos disponíveis estão microcomputadores, microscópio Leica e Nikon, criostato, cromatógrafos a líquido, micrótomo para cortes histológicos, “freezers” (-20 e -70°C), estereotáxico, agitador orbital refrigerado, destilador de vidro, balança digital e contador Geiger.

A proteína morfogenética utilizada neste estudo foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Walter Sebald, do Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften (Biozentrum) der Universität Würzburg, Würzburg, Alemanha, que é o autor do método de produção industrial da rhBMP-2 em cultura de *E. coli*.

Obtenção das formulações

Os géis de monoleína foram obtidos na proporção 7:3 (Monoleína:Água), contendo 15 µg de BMP por volume aplicado no defeito ósseo. O preparo consistiu da seguinte seqüência: pesou-se a monoleína em béquer de vidro, aquecendo até 45° C e adicionou-se água na mesma temperatura, deixando em equilíbrio até a formação de um gel transparente e viscoso. Adicionou-se a BMP em solução aquosa e homogeneizou-se a preparação, sendo que esta quantidade de água foi descontada da anterior.

Seleção dos animais

Para este trabalho foram selecionados 60 ratos Wistar adultos, machos, pesando aproximadamente 350 gramas, oriundos do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, USP, sendo alojados em caixas com 5 animais cada, com livre acesso a água e alimento, com temperatura controlada ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 / 12 horas, sendo o início do período de claro às 07:00 horas.

Os animais foram divididos em 4 grupos, cada grupo contendo 15 animais:

Grupo 1: 15 animais contendo apenas o defeito ósseo crítico.

Grupo 2: 15 animais contendo o defeito ósseo crítico mais a aplicação de 15 µg rhBMP-2 presente em solução aquosa.

Grupo 3: 15 animais contendo o defeito ósseo crítico mais a aplicação do gel de monoleína na área.

Grupo 4: 15 animais contendo um defeito ósseo crítico mais a aplicação de 15 µg rhBMP-2 na área, utilizando-se como carreador o gel de monoleína.

Foram realizadas cirurgias em 4 animais e os dados obtidos, tanto macroscópicos quanto histológicos, revelaram a viabilidade de realização do projeto proposto.

Técnica Cirúrgica

1- Anestesia

Os animais foram anestesiados com a solução anestésica de Coopazine (Xylazina)- sedativo, analgésico e relaxante muscular; e Dopalen (Ketamina)- anestésico geral, fornecido pela Agibrands do Brasil LTDA- Campinas, SP, Brasil, na proporção de 75-100mg/Kg de Ketamina e de 5-10mg/Kg de Xylazina, injetada por via intramuscular (Figura 2A). Também foi feita a aplicação em ambos os olhos dos animais, durante a cirurgia, de uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas.

2- Incisão e divulsão dos tecidos

Os animais dos dois grupos, após anestesia, foram submetidos a uma incisão de aproximadamente 1cm de extensão na região submentoniana direita, com lâmina de bisturi estéril número 15, previamente montada em cabo de bisturi número 3. As fibras dos músculos masseter e bucinador serão levemente

afastadas com curetas (Golgran nº 3) adaptadas para se ter acesso a região óssea que se deseja (Figura 2B).

3- Criação do defeito ósseo crítico

Na mandíbula exposta, foi realizada a criação do defeito ósseo crítico na região do corpo, no bordo inferior, da porção direita da mandíbula. Para isso se utilizou de uma broca cirúrgica tronco-cônica de aço adaptada em contra-ângulo (Kavo, São Paulo, Brasil) e, com o auxílio de um motor elétrico para implantes, ajustado em 3000rpm, com constante e abundante irrigação com soro fisiológico 0,9%, procedeu-se à uma osteotomia de 5x5mm (altura x largura) de extensão, trespassando as corticais ósseas, de acordo com padrões citados na literatura (Figura 2C).

4- Sutura dos tecidos e medicação

Após a cirurgia, procedeu-se à sutura dos tecidos em camadas. Primeiramente, o tecido muscular foi reposicionado a sua posição original, ou seja, a posição que ocupava anteriormente ao afastamento. Em seguida, a pele do animal foi suturada com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), de modo a fechar devidamente as margens do retalho. Em seguida, cada animal recebeu uma dose de 0,1mL/100g de peso do antibiótico Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge[®], Campinas, SP, Brasil).

Controle pós-operatório

Os animais operados ficaram sob observação constante e receberam alimentação pastosa nos 3 primeiros dias. Após este período, receberam ração comum para animais de pequeno porte, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, diariamente.

Sacrifício dos animais e perfusão

Após o período pré-determinado de 2 semanas de criação do defeito ósseo crítico, os animais foram anestesiados com urethane 37,5% (usando-se 0,4 mL dessa solução para cada 100g de peso corpóreo) e submetidos à perfusão. Esta se dá pela passagem de uma solução isotônica, sendo a mais usada PBS (solução tamponada de fosfato) a 0,01M, pH 7,4 (± 200 ml), pelo sistema circulatório dos animais, lavando todo o sangue. Em seguida para promover a fixação dos tecidos, foi perfundido com o PFA 4% (paraformaldeído 4%) dissolvido em solução de PB a 0,1M, pH 7,4. O sistema de perfusão é constituído por dois frascos, um contendo PBS 0,01M e outro contendo PFA 4%, colocados a uma altura de aproximadamente 150cm acima do animal para que os fluidos passem pelo sistema circulatório com uma pressão aproximadamente igual à pressão sanguínea. As soluções chegam até o animal por uma agulha introduzida no ventrículo esquerdo sem se misturarem. É realizado um corte no átrio direito para a saída do sangue e das soluções. O sucesso da perfusão pode ser percebido

pelo tremor muscular causado pela reação do fixador com proteínas das células, deixando o animal rígido (Figura 2D).

Processamento Histológico

Após a perfusão, a mandíbula contendo os dentes e tecidos moles adjacentes foi removida, utilizando-se para isso tesouras e pinças adequadas. Os tecidos moles presentes foram cuidadosamente separados do osso mandibular, para a obtenção do fragmento ósseo contendo o defeito com margem de segurança. Esses fragmentos foram imersos na mesma solução fixadora por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA+TRIS a 0,5M, trocando-se as soluções a cada 2 dias. Após o período de descalcificação, que foi em torno de 3 semanas, a ação do ácido foi neutralizada por 24 horas em uma solução de sulfato de sódio a 5%. Em seguida, foram desidratados em série crescente de álcoois: 70% (*overnight*), 80%, 85%, 90%, 95% e 100% (2 horas em cada concentração). Feito isso, esses blocos ósseos foram colocados em partes iguais de álcool e xilol (*overnight*) e diafanizados em xilol, com trocas a cada 2 horas, sendo executadas 3 trocas; e em seguida, incluídos em parafina. De cada amostra foram realizados cortes semi-seriados de 6µm de espessura, paralelos à base da mandíbula, de modo a obter lâminas contendo cortes das regiões: oclusal, média e basal da mandíbula. Esses cortes foram corados por Tricrômio de Masson e Hematoxilina-Eosina (HE) e observados em microscópio de luz Leica DMLB2 (Figura 2E).

Análise qualitativa ao microscópio de luz

A análise qualitativa das lâminas permitiu avaliar o osso neoformado na área de criação do defeito ósseo crítico, bem como diferenciar o osso existente e o neoformado, nas colorações de Tricrômio de Masson e Hematoxilina-Eosina (HE). Foi utilizado um microscópio de luz Leica DMLB2, acoplado a uma câmera digital Leica DC300F, pertencentes ao Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP. As imagens digitais foram analisadas através de objetiva com 10X e 20X de aumento (Figura 9).

Análise quantitativa

A quantidade de osso neoformado (Pp) de cada animal foi analisado pelo Método de Contagem Diferencial de Pontos. Utilizou-se um sistema de captura de imagem acoplado a um microscópio de luz Leica e um sistema-teste de 100 pontos (Pt=100). Este sistema-teste é de padrão quadrático, com intervalo entre linhas de 98,67 μ m (d) e a área do ponto teste equivalente a d^2 , ou seja, a área do quadrado (Mandarim-de-Lacerda). Cinco campos aleatórios da região basal da mandíbula foram selecionados dos cortes histológicos de cada animal com 10X de aumento para a contagem da quantidade de pontos que recaiam sobre o tecido ósseo neoformado (Pp) e obtido uma média aritmética desses valores (Tabela I). Para o cálculo da área foi multiplicado cada um desses valores obtidos na tabela I por d^2 (98,67 μ m)², obtendo-se a área ocupada pelo tecido ósseo (Figura 2F).

Também foi determinada a porcentagem relativa de osso neoformado (Vv) em relação ao defeito ósseo. Esta relação foi determinada pela relação entre os pontos que recaiam sobre o tecido ósseo neoformado (Pp) e o total de pontos da grade teste (Pt=100), sendo representada pela seguinte fórmula: $Vv = Pp/Pt$ (%).

A quantidade de tecido conjuntivo (medula óssea) foi determinada pelo total de pontos menos os pontos que recaiam sobre o tecido ósseo neoformado (Tabela II).

Avaliação da osteoindutividade do material

Teste em 3 ratos Wistar machos (350g) para a verificação da atividade osteoindutora da proteína morfogenética rhBMP-2, sendo que para isso 15µg de rhBMP-2 foi dissolvida em quantidade suficiente de solução aquosa de tampão fosfato (pH=7,0) e incorporada em uma matriz de colágeno que foi envolvida em uma cápsula gelatinosa de quitosano. Esse material foi inserido na região subcutânea abdominal dos animais e aguardou-se 2 semanas até o sacrifício por perfusão, sendo removido o tecido muscular e a pele adjacente a região trabalhada cirurgicamente, submetendo-os a processamento histológico convencional e análise ao microscópio de luz para a verificação de indícios de formação de osso novo.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

A caracterização eletroforética da proteína foi feita em gel de poliacrilamida desenvolvida em um sistema para eletroforese Sigma (St. Louis, MO, USA), segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de separação apresentando 12% de acrilamida e o gel de empilhamento preparado com 5% de acrilamida foram preparados de acordo com protocolo descrito a seguir:

Soluções	Gel de empilhamento (5%)	Gel de corrida (10%)
Acrilamida 30,0% / bis-acrilamida 0,8%	340 μ L	3,2 mL
Tampão TRIS - HCl 1,5 mol/L pH 8,8	---	3,0 mL
Tampão TRIS - HCl 0,5 mol/L pH 6,8	500 μ L	---
H ₂ O deionizada	1,1 mL	1,56 mL
SDS 10%	40 μ L	160 μ L
TEMED 10%	10 μ L	40 μ L
Persulfato de amônio 10%	10 μ L	40 μ L

Um volume de 10,0 μ L da rhBMP-2 foi diluído em 10,0 μ L de tampão de amostra 2X concentrado. A amostra foi aplicada diretamente no gel de poliacrilamida, em duplicatas. A eletroforese foi desenvolvida sob corrente constante de 10 mA, a 4°C, utilizando-se o tampão de corrida tris-glicina. Após a eletroforese, metade do gel de poliacrilamida foi corado pela solução de Coomassie e descorado por lavagens em solução descolorante. Como padrão de massa molecular foi utilizado o "Rainbow Molecular Weight Markers da Amersham

Biosciences” cujas bandas e respectivas massas moleculares estão descritas a seguir:

PROTEÍNA	Massa Molecular (Daltons)
Ovoalbumina.....	45.000
Anidrase Carbônica.....	30.000
Inibidor de Tripsina.....	20.100
Lisozima.....	14.300
Aprotinina.....	6.500
Insulina - cadeia b.....	3.500
Insulina - cadeia a.....	2.500

A outra metade do gel, correspondente à duplicata das amostras analisadas, foi utilizada para o Teste de Western Blotting.

Western Blotting

As proteínas removidas eletroforicamente foram transferidas para membrana de nitrocelulose segundo Towbin et al. (1979), através de um sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad). A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada montando-se o gel de SDS-PAGE e a membrana em um sistema “sanduíche” entre filtros protetores. Este sistema foi colocado em uma cuba eletroforética, contendo tampão de transferência a 4°C, posicionada sobre um agitador magnético para homogeneização do tampão e aplicou-se uma corrente de 350mA por 60 minutos.

Após transferência, as membranas de nitrocelulose contendo as proteínas aderidas foram incubadas com tampão TBS-T contendo 5% de leite desnatado por 12 horas a 4°C. As membranas foram lavadas rapidamente com tampão TBS-T e incubadas com o anticorpo primário (monoclonal de cabra) anti-rhBMP-2, na diluição de 1:1.000, por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação constante. Após este período, as membranas foram lavadas rapidamente por duas vezes, uma vez por 15 minutos e 3 vezes por 5 minutos com o mesmo tampão a uma razão de 4 mL por cm² de membrana.

O anticorpo secundário marcado com peroxidase (anti-anticorpo de cabra), na diluição de 1:2.000, foi incubado com a membrana por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação constante e um novo processo de lavagem foi realizado como anteriormente. Após as lavagens, volumes iguais das soluções de revelação contidas no Kit “ECL Western blotting detection reagents and analysis system” (Amersham Biosciences) foram misturadas, de modo que o volume final mantivesse uma razão de 0,123mL/ cm² de membrana. A membrana foi incubada com esta mistura por 60 segundos e o excesso de solução foi seco em papel absorvente. A membrana foi embrulhada com papel filme e colocada em um cassete de autoradiografia para exposição. A marcação do anticorpo primário foi visualizada em filme fotográfico.

Leitura do gel em espectrofotômetro

Foi realizada a leitura do gel corado em espectrofotômetro para a obtenção o cálculo da pureza da amostra. O gel foi cortado verticalmente e colocado em um

suporte acoplado em um espectrofotômetro Beckman-DU-70. Esse suporte foi desenvolvido pelo Prof. Dr. Augusto César C. Spadaro no laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, que consiste de uma barra de alumínio devidamente adaptada para se prender ao carrinho do “Scan” com presilhas para acoplar uma placa de vidro com o gel devidamente cortado (Figura 1). O espectrofotômetro fornece um gráfico padronizado da faixa eletroforética do gel, indicando através dos picos a localização das proteínas e pelo cálculo da área a estimativa da porcentagem de pureza da amostra.

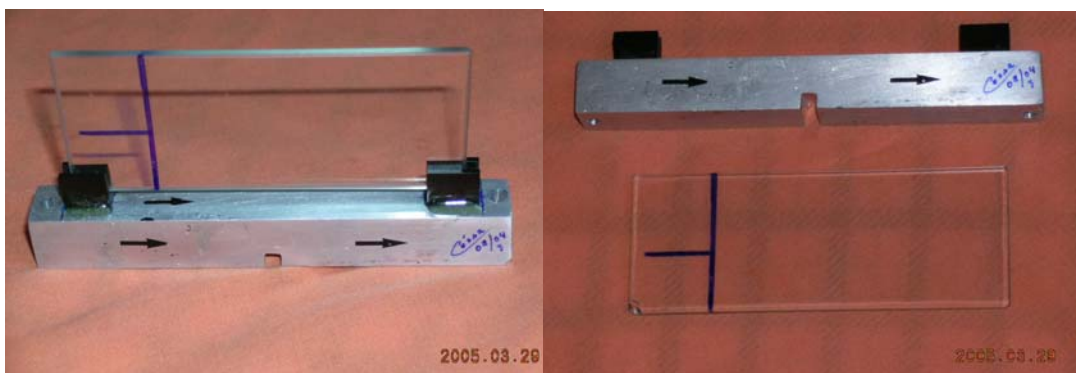


Figura 1: Suporte desenvolvido para receber o gel cortado e ser levado ao espectrofotômetro.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas estatísticos SAS e JMP (SAS Institute Inc., NC, USA), ao nível de significância de 5%, aplicando-se a análise de Variância baseada em modelo linear geral (GLM ANOVA) e o Teste de Tukey (Tukey’s Studentized Range – HSD – Test).

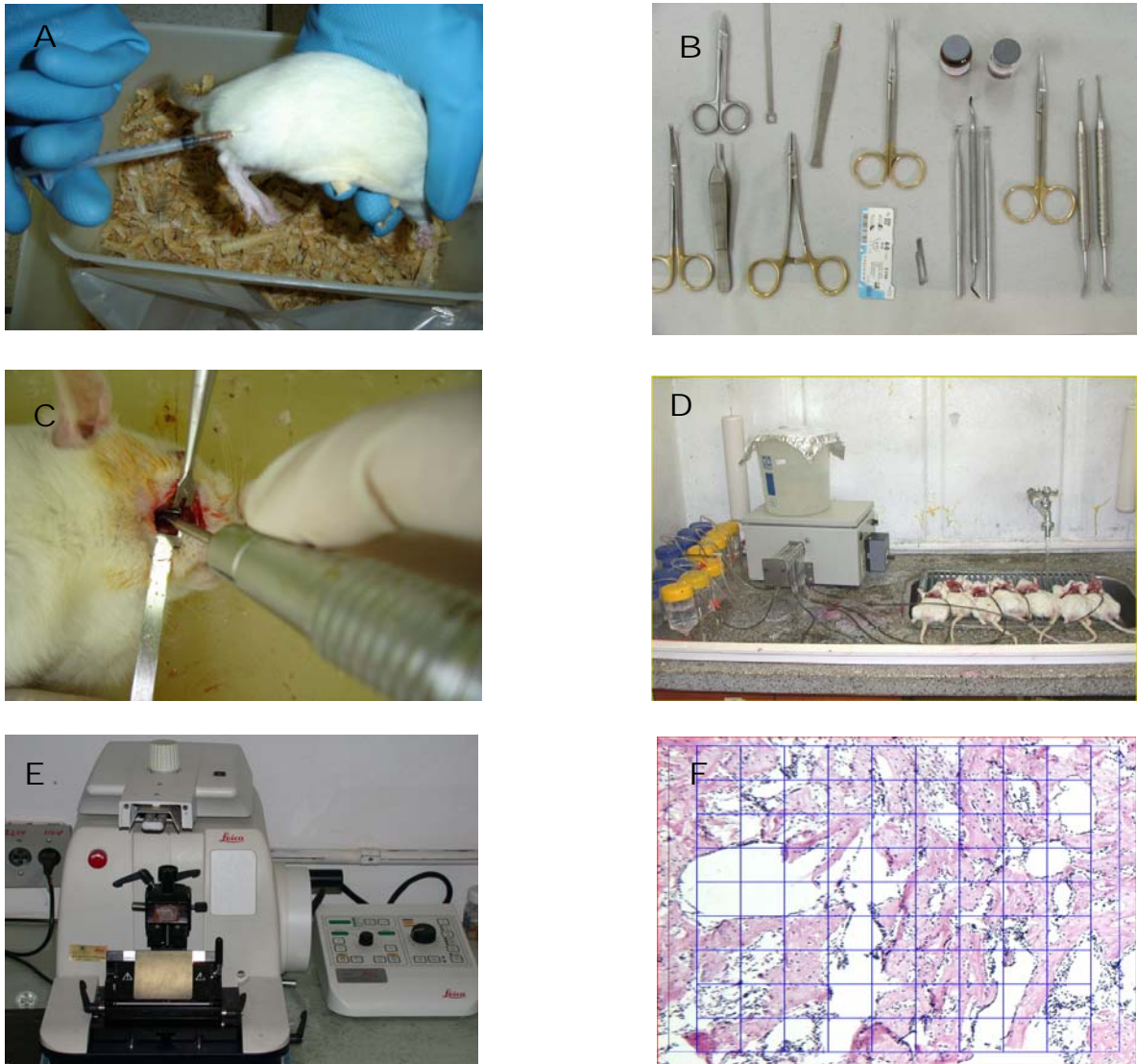


Figura 2: Seqüência de procedimentos realizados neste trabalho. A- Anestesia intramuscular. B- Instrumentais utilizados na cirurgia. C- Defeito ósseo crítico sendo realizado com a peça reta adaptada ao motor de implante e auxílio do guia-cirúrgico de inox. D- Eutanásia dos animais por perfusão intra-cardíaca; E- Processamento histológico; F- Imagem histológica capturada, após inserção da grade para contagem de pontos sobre tecido ósseo.

RESULTADOS

A- Teste piloto, com utilização do gel de monoleína

Com o teste-piloto realizado em 4 animais, foi possível concluir que a dimensão do defeito ósseo que anteriormente era de 3x3x1mm e o tempo de espera até o sacrifício de 4 semanas eram inadequados, pois o animal apresentou substancial formação óssea, levando a alteração da dimensão do defeito para 5x5mm, sem parede óssea de fundo e redução do tempo de espera para o sacrifício de 4 semanas para 2 semanas.

B- Avaliação do potencial de osteoindutividade da rhBMP-2

Os dados histológicos obtidos neste teste, revelaram pontos de formação de osso novo no tecido mole adjacente à área de inserção da cápsula gelatinosa, observados tanto na coloração de Hematoxilina-Eosina quanto na de Tricrômio de Masson (Figura 3).

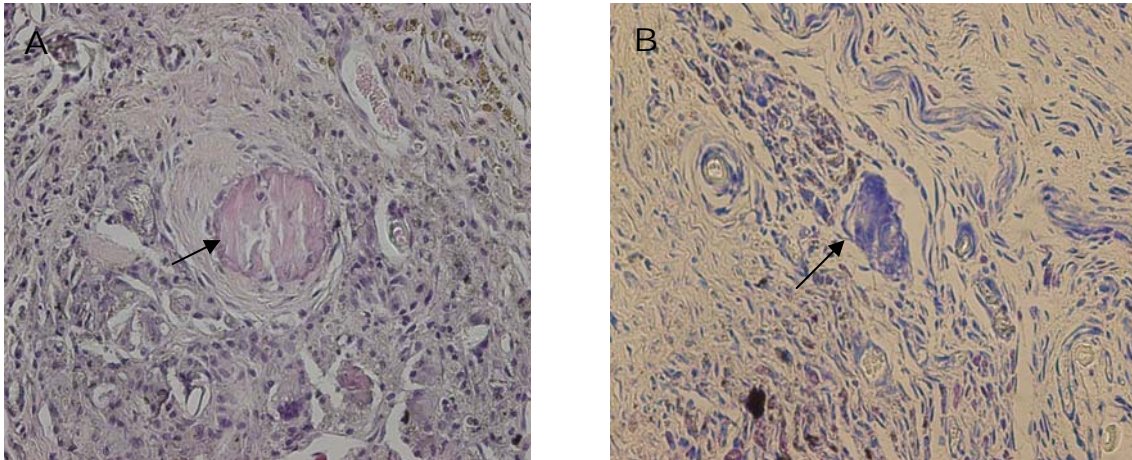


Figura 3: Seta indicando o núcleo de formação óssea, circundado por tecido conjuntivo. A- Coloração em H.E- 20X. B- Coloração em Tricrômio de Masson- 20X

C- Teste de Eletroforese e Western Blotting

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da proteína rhBMP-2 encontra-se representada na Figura 4. A amostra avaliada apresentou uma massa molecular estimada em 10.500 daltons, com uma banda menos densa em torno de 45.000 daltons. Esses resultados obtidos confirmam que a amostra utilizada neste estudo é realmente a proteína morfogenética do tipo 2 (rhBMP-2).

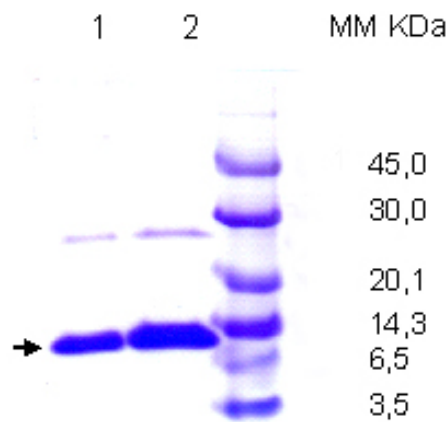


Figura 4: Análise eletroforética da proteína morfogenética do tipo 2 (rhBMP-2) em SDS-PAGE 12%. Coloração com Coomassie brilliant blue R-250. Linhas 1e 2 representando a amostra da proteína morfogenética; linha 3, representando os padrões de massa molecular (45 - 3,5 KDa) (Amersham Biosciences).

A Figura 5 mostra o gráfico que relaciona o fator de retenção (Rf) com a massa molecular de padrões submetidos ao processo eletroforético. A reta obtida nesta figura, representa a equação $\text{Log } y = 2,149 - 2,259.Rf$, com $r = -0.99441$, sendo adequada para a caracterização da proteína de interesse neste estudo.

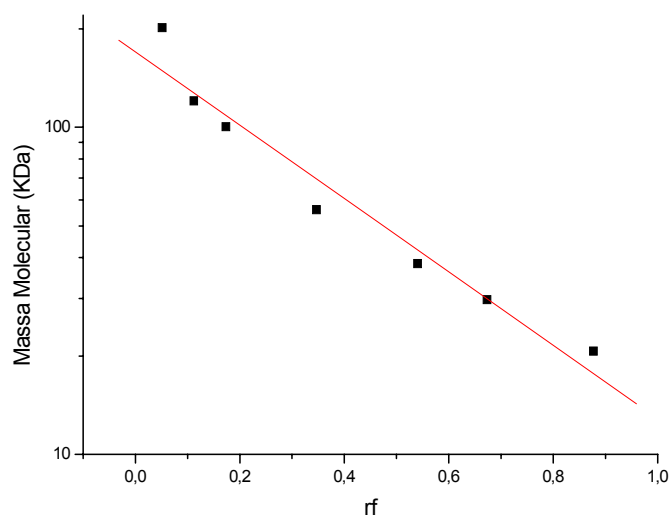


Figura 5: Gráfico do fator de retenção (Rf) em função da massa molecular relativa de padrões.

D- Avaliação pelo espectrofotômetro

A porcentagem de pureza da proteína estudada foi calculada pela leitura do gel de eletroforese em espectrofotômetro indicando um índice 99,9% como podemos observar na Figura 6, onde o gráfico mostra de uma forma quantificada as faixas de proteínas existentes no gel analisado.

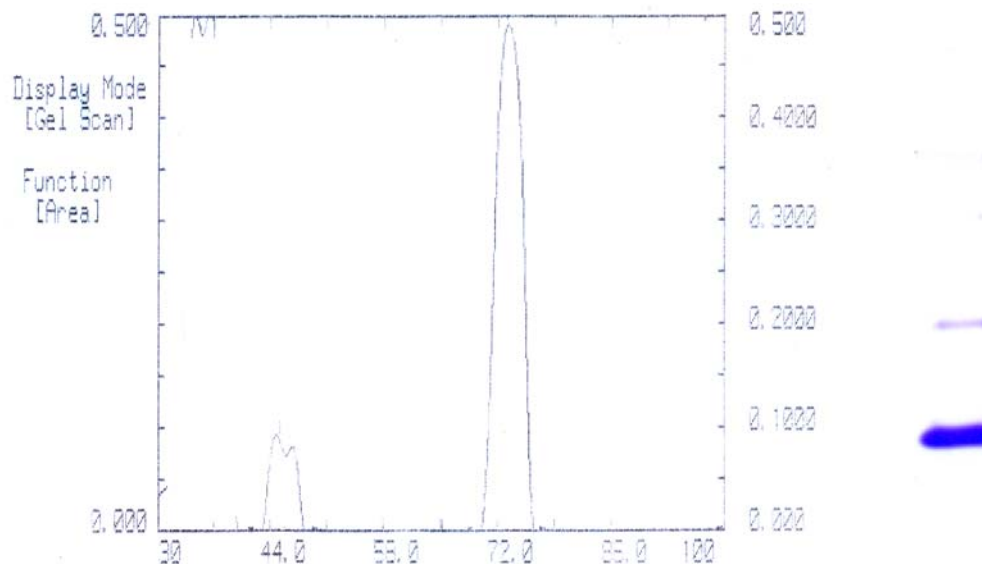


Figura 6: Corte vertical do gel de eletroforese na faixa correspondente rhBMP-2 e leituras a 600nm.

E- Contagem de pontos sobre tecido ósseo (Pp)

Foram analisados 5 campos por animal, considerando-se as três regiões (basal, média e oclusal) em um total de 15 animais em cada um dos 4 grupos considerados neste estudo (Figuras 7 e 8).

No grupo 1 em que foi realizado simplesmente a confecção do defeito ósseo crítico, sem a colocação de qualquer material, foram obtidos respectivamente os seguintes valores para a porcentagem relativa de tecido ósseo neoformado (Vv em %) e para a área em mm²: 26,6 e 259,9 (região basal), 26,1 e 254,5 (região média), 34,7 e 338,5 (região oclusal).

No grupo 2 em que foi realizado o defeito ósseo crítico e a inserção de 15 µg rhBMP-2 em solução aquosa de tampão fosfato (pH=7,0), foram obtidos respectivamente os seguintes valores para a porcentagem relativa de tecido ósseo neoformado (Vv em %) e para a área em mm²: 58,9 e 573,5 (região basal), 57,7 e 562,5 (região média), 64,2 e 625,4 (região oclusal).

No grupo 3 em que foi realizado o defeito ósseo crítico e a colocação do gel de monoleína puro em quantidade suficiente para preenchimento do defeito, foram obtidos respectivamente os seguintes valores para a porcentagem relativa de tecido ósseo neoformado (Vv em %) e para a área em mm²: 29,6 e 288,5 (região basal), 25,0 e 243,6 (região média), 34,2 e 333,8 (região oclusal).

No grupo 4 em que foi realizado o defeito ósseo crítico e a inserção de 15 µg rhBMP-2 combinada ao gel de monoleína, foram obtidos respectivamente os seguintes valores para a porcentagem relativa de tecido ósseo neoformado (Vv em %) e para a área em mm²: 59,7 e 581,4 (região basal), 58,1 e 565,9 (região média), 71,8 e 699,1 (região oclusal).

Assim, na comparação entre os quatro grupos estudados, foi observado que nos grupos que continham a rhBMP-2, ou seja, nos grupos 2 e 4, não ocorreu

diferença significativa entre si, assim como na comparação entre os dois grupos que não continham a rhBMP-2, ou seja, entre os grupos 1 e 3, mas na comparação entre grupos com e sem a rhBMP-2, os resultados apontaram diferença estatística, com uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado no grupo 4, ou seja, no grupo em que a proteína morfogenética foi combinada a uma matriz carreadora ($p < 0,05$).

Considerando agora as três regiões analisadas (basal, média e oclusal), independentemente de cada um dos quatro grupos considerados neste estudo, foram observados respectivamente os seguintes valores médios para a porcentagem relativa de osso neoformado (Vv em %) e para a área em mm²: região basal (43,7 e 425,4), região média (41,7 e 405,9) e região oclusal (51,2 e 498,4). Portanto a região oclusal apresentou um padrão de recuperação mais rápido, observado pela maior quantidade de pontos sobre tecido ósseo, seguida pela região basal e por fim a região média.

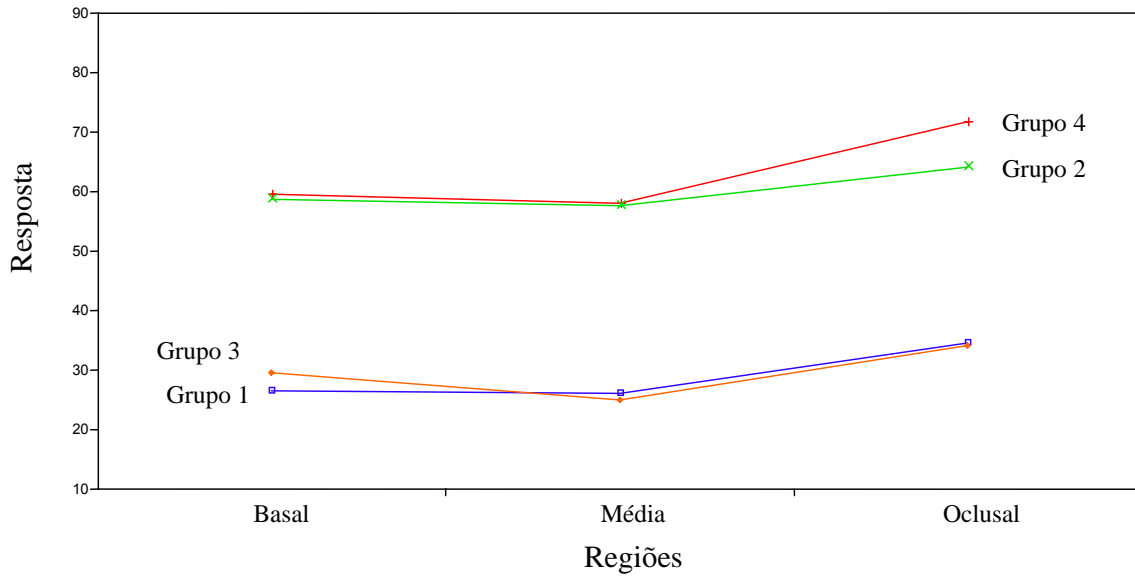


Figura 7: Gráfico representativo da quantidade de tecido ósseo entre as três regiões, nos quatro grupos estudados.

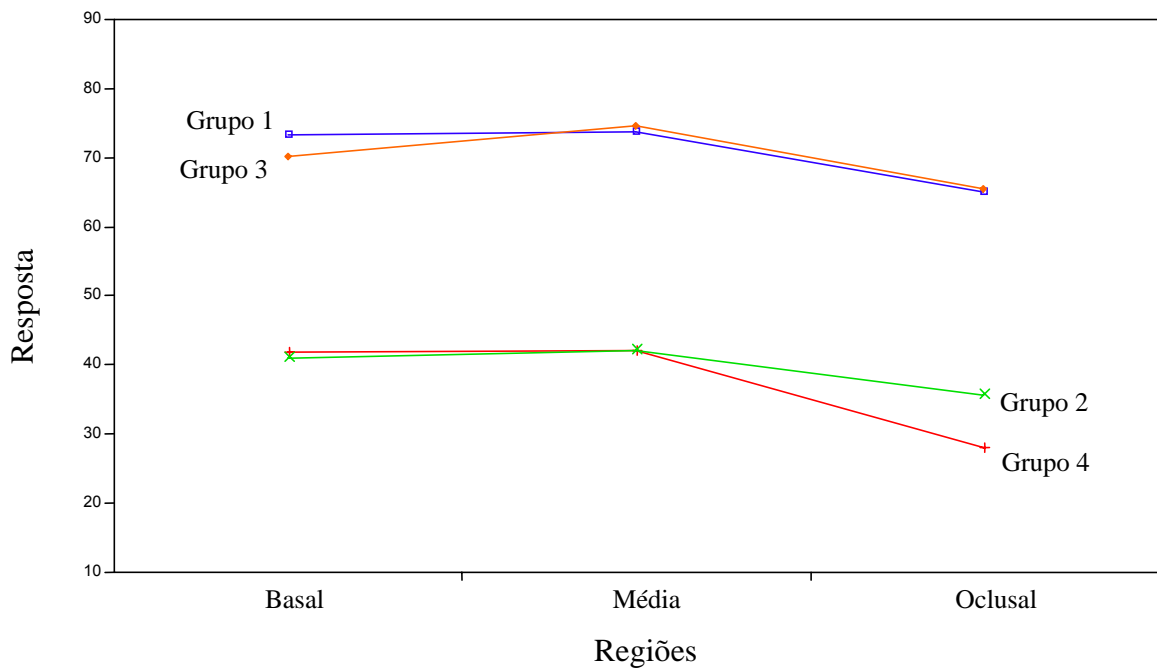


Figura 8: Gráfico representativo da quantidade de tecido conjuntivo entre as três regiões, nos quatro grupos estudados.

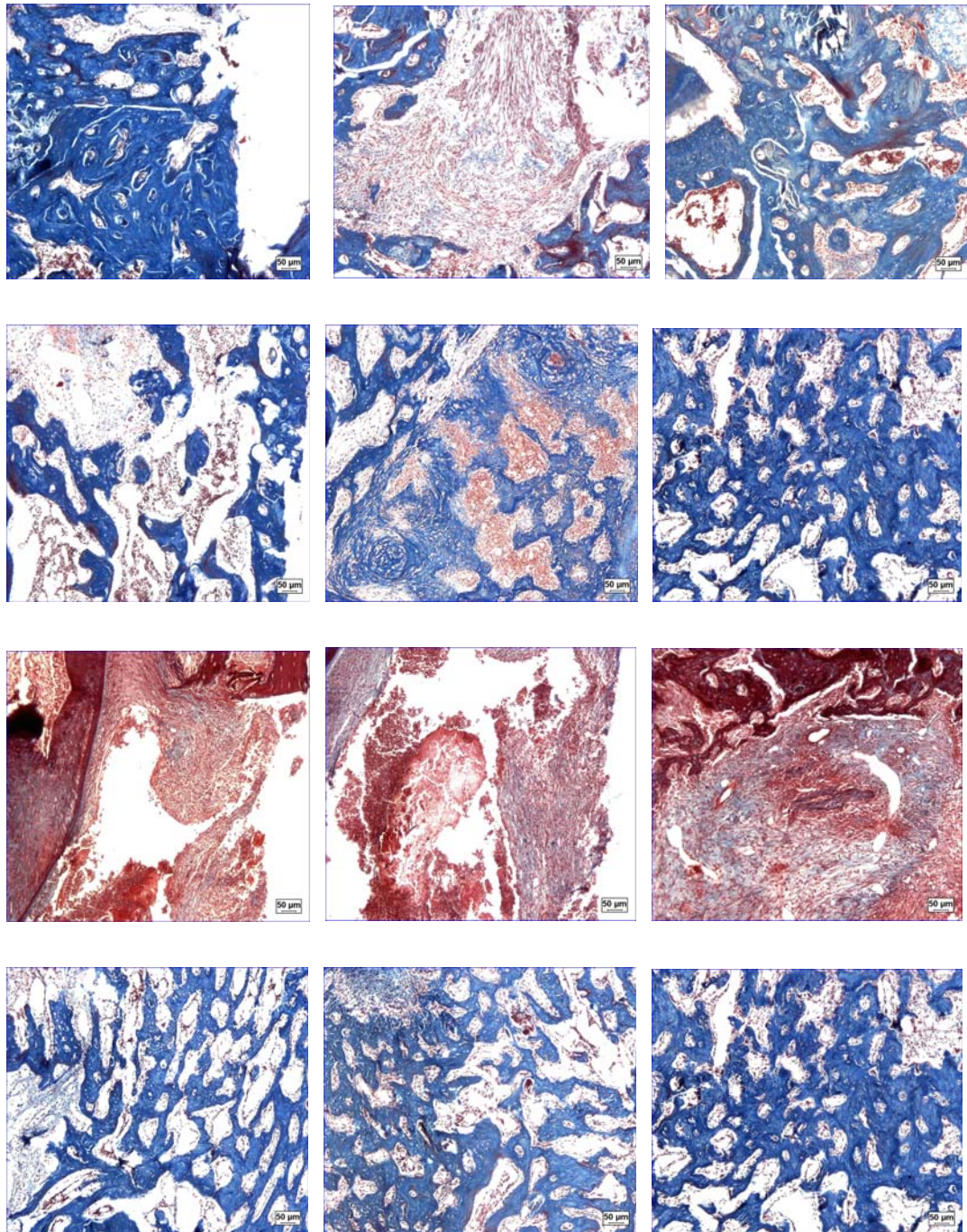


Figura 9: Lâminas histológicas coradas em Tricrômio de Masson (10X aumento), respectivamente dos grupos 1, 2, 3 e 4, considerando a seqüência de regiões: basal, média e oclusal.

Tabela I: Média, desvio padrão e erro padrão dos pontos coincidentes com o tecido ósseo neoformado nas regiões basal (b), média (m) e oclusal (o) dos quatro grupos analisados (1, 2, 3 e 4)

Grupos	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
1 b	26,68	4,45	1,15
1 m	26,16	4,58	1,18
1 o	34,77	5,58	1,44
2 b	58,91	12,31	3,18
2 m	57,79	12,06	3,11
2 o	64,24	11,40	2,94
3 b	29,64	11,15	2,88
3 m	25,03	7,01	1,81
3 o	34,29	8,13	2,10
4 b	59,73	13,79	3,56
4 m	58,13	8,80	2,27
4 o	71,81	8,30	2,14

Tabela II: Média, desvio padrão e erro padrão dos pontos coincidentes com o tecido conjuntivo nas regiões basal (b), média (m) e oclusal (o) dos quatro grupos analisados (1, 2, 3 e 4)

Grupos	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
1 b	73,32	4,45	1,15
1 m	73,84	4,58	1,18
1 o	65,23	5,58	1,44
2 b	41,09	12,31	3,18
2 m	42,21	12,06	3,11
2 o	35,76	11,40	2,94
3 b	70,33	11,15	2,88
3 m	74,84	6,96	1,80
3 o	65,71	8,13	2,10
4 b	42,07	12,58	3,25
4 m	42,20	8,85	2,28
4 o	28,19	8,30	2,14

DISCUSSÃO

A qualidade e a quantidade do tecido ósseo neoformado sob estímulo da associação rhBMP-2/monoleína, em defeitos ósseos críticos criados no osso mandibular de ratos Wistar, foram avaliados neste trabalho.

O modelo experimental em ratos Wistar foi especificamente idealizado para o estudo proposto, e a escolha desse animal baseou-se nas vantagens observadas em testes-piloto, como um processo de cicatrização rápido, padrão tecidual ósseo semelhante ao humano, facilidade de alojamento e alimentação, resistência a variações climáticas, baixo custo, além de sua utilização rotineira em outros modelos experimentais envolvendo cicatrização. Quando se busca um dimensionamento apropriado do defeito ósseo para a avaliação de biomateriais com potencialidades para aplicações em humanos, a escolha do modelo experimental é relevante e dependente da taxa de recuperação do animal (Genetics Institute, Cambridge, Mass, unpublished reports, 1995).

Nesse modelo, a região inferior mediana do corpo mandibular foi o alvo de maior interesse para a avaliação da capacidade osteoindutora da rhBMP-2, por apresentar osso cortical e trabeculado, além de volume suficiente para a observação do processo cicatricial nos planos sagital, frontal e transversal. O volume mandibular nessa região, permitiu a criação de defeitos com três ou quatro paredes, o que favoreceu a estabilização do material testado. Em modelos como o usado por Higuchi et al. (1999), que avaliaram a cicatrização na região do ângulo mandibular de ratos, isso não ocorre, pois o volume ósseo naquela região é mínimo e fundamentalmente constituído por uma lâmina cortical. O modelo experimental desenvolvido foi considerado particularmente apropriado por envolver osso craniofacial, de interesse portanto para a Odontologia, que depende

freqüentemente da recuperação desse tipo de tecido para a reabilitação oral de pacientes.

Como a proposta inicial deste estudo foi a de avaliar o processo de recuperação óssea na região média do corpo mandibular de ratos Wistar, optou-se pelo uso das proteínas morfogenéticas, especificamente a recombinante do tipo 2 (rhBMP-2), pois são proteínas reconhecidamente osteoindutoras que por ação quimiotática, fazem com que células mesenquimais indiferenciadas se diferenciem em osteoblastos e passem a sintetizar osso (Lyon et al., 1990; Song et al., 1995; Lee, 1997; Ripamonti & Reddi, 1997; Wozney, 1998; Ripamonti & Duneas, 1998; Ducy & Karsenty, 2000; Schilephake, 2002; Arosarena & Collins, 2005). É sabido que esta proteína morfogenética, por si só, é capaz de promover a osteoindução (Desilets et al., 1990), no entanto, a busca por um material carreador que otimize a aplicação desta proteína, biodisponibilizando-a lenta e gradualmente, tem sido objeto de estudo em quase todas as pesquisas que envolvem a aplicação de proteínas morfogenéticas no processo de recuperação óssea.

Portanto, objetivando-se alcançar essa liberação sustentada da proteína morfogenética, utilizou-se neste estudo o gel de fase cúbica de monoleína, que já vem sendo estudado na literatura como sistema liberador de diferentes fármacos e substâncias, incluindo moléculas protéicas e peptídicas (Geraghty et al., 1997; Nielsen et al., 1998; Lee & Kellaway et al., 2000b, Lee et al., 2001; Bonacucina et al., 2005), pois esses géis são dotados de características favoráveis, tais como, consistência adequada após a implantação permitindo manter a rhBMP-2 *in situ*, alta viscosidade o que permite sua forte aderência as paredes do defeito ósseo, biocompatibilidade para com os tecidos circunjacentes, custo reduzido e rapidez

de sintetização pois é um material à base de glicídios (Nylander et al., 1996; Geraghty et al., 1997; Lee & Kellaway 2000b; Shah et al., 2001; Lee et al., 2005; Boyd et al., 2006). Além disso, os géis de monoleína representam uma alternativa aos materiais carreadores comumente utilizados nas pesquisas, entre eles, as esponjas de colágeno e fibrina e materiais à base de hidroxiapatita com propriedades biológicas excelentes mas, nem sempre com propriedades farmacocinéticas suficientes para permitir a biodisponibilização da BMP e os materiais sintéticos e copolímeros, em que possivelmente possibilitem uma liberação sustentada da BMP, mas com alguns inconvenientes com relação a biocompatibilidade (Desilets et al., 1990).

A dosagem aplicada em nossa pesquisa foi de 15µg de rhBMP-2, para um defeito ósseo de 5x5mm de dimensão de três paredes ósseas e um período de espera até o sacrifício de 2 semanas. Em trabalhos semelhantes, Yasko (1992) revelou que uma dosagem de 11µg de rhBMP-2 para a recuperação de um defeito ósseo de 5mm em fêmur de ratos, resultou em significativa formação de tecido ósseo, com evidências mecânicas, radiográficas e histológicas, enquanto que uma dosagem de 1,4 µg produziu novo tecido ósseo mas sem essas evidências de união. Doses maiores de 20 µg de rhBMP-2, em defeitos ósseos supra-alveolares de 5mm de extensão, em cães da raça Beagle resultaram em substancial recuperação óssea após 8 semanas (Sigurdsson et al. 1995), enquanto doses extremas de 50µg de rhBMP-2 combinadas a matriz de colágeno, em defeito de 4mm na calvária de ratos, embora tenha resultado também em formação abundante de osso (Inoda et al. 2004), não demonstraram vantagens em relação à doses menores mas sustentadas como relatado no trabalho de

Wang et al. 1990, em que foram testadas dosagens de 0,5 a 115 de μg de rhBMP-2. Em nosso estudo, foi encontrada maior quantidade de tecido ósseo neoformado nos grupos que envolviam a aplicação da rhBMP-2, mais acentuada quando essa proteína foi incorporada ao gel de monoleína, nas 3 regiões analisadas. Aparentemente, a rhBMP-2 sozinha tem a capacidade por si só de induzir a neoformação tecidual, porém quando associada a um material carreador que a imobilize demonstra ação potencializada, por tempo suficiente para que ocorra resposta celular, o que está de acordo com os resultados encontrados por Wang et al., 1990 e Wozney et al., 1990. A atividade osteoindutiva significativamente maior da associação BMP/monoleína observada em nosso trabalho está de acordo com relatos prévios de outros pesquisadores e, provavelmente relacionada à capacidade de retenção do carreador no local (Winn et al., 1998; Uludag et al., 2000; Uludag et al., 2001; Kamakura et al. 2004; Maire et al., 2005). No trabalho de Kamakura et al. (2004) não houve diferença significativa para a recuperação óssea entre as dosagens de 1 μg e 10 μg de rhBMP-2 combinadas ao carreador fosfato octacálcico (OCP), devido a alta reabsorção por este apresentada, ressaltando portanto a importância da matriz carreadora em permanecer no local e proporcionar uma biodisponibilização lenta e gradual da proteína morfogenética.

A pureza da proteína morfogenética utilizada em um trabalho é um fator de extrema importância, pois ela refletirá diretamente na taxa de tecido ósseo neoformado. Em nosso trabalho, após as análises de Eletroforese, Western Blotting e leitura de gel em espectrofotômetro, foi constatado que a rhBMP-2 apresentou um alto índice de pureza, aproximadamente 99,9%, o que explica a grande quantidade de tecido ósseo neoformado encontrado nos dois grupos

experimentais em que foi aplicada essa proteína. Wang et al. 1988 confirmam esse conceito, ao afirmarem que para se obter uma determinada quantidade de tecido ósseo e cartilaginoso a partir de 600ng de BMP-2 com 50% de pureza seria necessário uma quantidade aproximadamente 10 vezes maior com o uso de 50ng da não-recombinante bovina BMP-2, 100% pura, para se obter a mesma quantidade de tecido ósseo e cartilaginoso, além do mais, uma amostra de BMP-2 altamente pura aceleraria o processo de neoformação óssea ou pelo menos diminuiria o tempo necessário para que novo osso formado fosse observado. Wang et al. 1990, em outro trabalho, afirmaram também que a pureza da amostra além de influenciar na taxa de neoformação tecidual, pode também influenciar na presença ou não de tipos celulares específicos.

Durante a execução dos defeitos ósseos críticos em nosso trabalho, o perióstio, camada membranosa rica em células osteoprogenitoras, foi mantido e desempenhou um papel importante de servir de arcabouço para deposição de células osteoprogenitoras, auxiliando assim a rhBMP-2 no processo de diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em células de linhagem osteoblástica, fato este também relatado nos trabalhos de Ueno et al. 1999 e Inoda et al. 2004, sendo o perióstio também capaz, por si só, de induzir o processo de recuperação óssea (Ueno et al. 1999), como foi observado em nosso trabalho no grupo experimental em que simplesmente foi confeccionado o defeito ósseo crítico, sem a colocação de qualquer material e obteve-se o fechamento integral do defeito ósseo, embora com menor proporção de tecido ósseo neoformado após a quantificação pela análise histomorfométrica.

Neste trabalho foi utilizado como método histomorfométrico para análise, um sistema-teste de 100 pontos acoplado a um microscópio de luz Leica, para quantificação do tecido ósseo neoformado. Os Métodos por Contagem Diferencial têm sido propostos na literatura por serem de fácil execução, pois o sistema-teste pode ser sobreposto durante ou após a captura da imagem da estrutura a ser quantificada, serem de baixo custo pois não exigem o uso de recursos eletrônicos sofisticados e grande acurácia, pois permitem abranger toda a extensão da imagem a ser considerada e a posterior aplicação de fórmulas para cálculo estereológico caso seja necessário (Gundersen et al., 1988b; Cruz-Orive & Weibel 1990; Mandarim-de-Lacerda, 1999). A contagem de pontos por grades apresenta como principal vantagem em relação ao uso de softwares, o fato de que não é possível confundir estruturas no momento da quantificação pelo primeiro método, pois ao se estabelecer parâmetros ao computador, como diferença de cor ou forma de estruturas como é utilizado no segundo método, existe sempre o risco do software reconhecer na contagem uma estrutura não desejada (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

Na comparação entre as regiões mandibulares, basal, média e oclusal, independentemente do grupo estudado, a maior quantidade de tecido ósseo neoformado foi encontrada na região oclusal, seguida da região basal e por fim a região média. Este fato é explicado pela literatura, considerando que o número de paredes ósseas é um fator crítico no processo de recuperação óssea (Blumenthal et al. 2003; Kim et al. 2004; Araújo & Lindhe, 2005), tendo muitas vezes um papel mais importante do que o biomaterial a ser colocado neste local (Simon et al. 2003). Assim, a presença de um remanescente ósseo como é visto na região

oclusal, facilita o processo de recuperação óssea, pois neste caso já existe uma superfície em que as células ósseas presentes, osteoblastos, atuarão na diferenciação celular de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos que passarão a sintetizar osso, fenômeno este classificado como osteoindução e este remanescente ósseo servirá como um arcabouço para a deposição do tecido ósseo neoformado, processo este classificado como osteocondução. Deste modo, após a análise quantitativa por contagem de pontos que recaem sobre tecido ósseo e qualitativa, pela diferença morfológica tecidual pela presença de um tecido ósseo mais cortical ou mais trabeculado, é de se esperar que sejam encontrados valores mais altos para a contagem de tecido ósseo neoformado, sendo este mais organizado na região oclusal, seguido da região basal e por último da região média, com mínimo contato com o tecido ósseo remanescente e portanto com características histológicas que revelam um tecido ósseo mais trabeculado, com amplas lacunas e vasos calibrosos, caracterizando o processo de neoformação óssea como centrípeto (Kusumoto et al. 2005).

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que:

1- O rato Wistar representa um modelo experimental viável para avaliação do processo de cicatrização óssea após a criação de defeitos ósseos críticos;

2- Devido a semelhanças anatômicas e histológicas entre a mandíbula do ser humano e do rato, os resultados encontrados neste estudo poderão contribuir para com as pesquisas relacionadas ao reparo de fraturas maxilares, cicatrização de alvéolos, implantes odontológicos e técnicas de levantamento do seio maxilar, dentre outras;

3- A proteína morfogenética recombinante do tipo 2 (rhBMP-2) utilizada neste estudo, contribuiu enormemente no processo de regeneração óssea, não só pela sua reconhecida atividade osteoindutora, mas também pelo seu alto grau de pureza;

4- A manutenção do periósteo, camada membranosa rica em células osteoprogenitoras, durante a confecção do defeito ósseo crítico, contribuiu para uma recuperação óssea mais rápida;

5- A manutenção de um tecido ósseo remanescente, como visto na região oclusal, facilitou o processo de recuperação óssea, como foi observado na análise histomorfométrica por contagem de pontos;

6- O gel de monoleína pode ser usado como um carreador eficiente para a rhBMP-2 na estimulação da cicatrização óssea, além de apresentar consistência conveniente para o preenchimento de defeitos ósseos e propriedades que facilitam uma liberação controlada da proteína.

REFERÊNCIAS

ALFONS, K.; ENGSTRÖM, S. Drug compatibility with sponge phases formed in monoolein, water and propyleneglycol or poly(ethylene glycol). **J. Pharm. Sci.**, v. 87, p. 1527-1530, 1998.

ARAUJO, M.G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, p. 212-218, 2005.

ARNANDER, C.; WESTERMARK, A.; VELTHEIM, R.; DOCHERTY-SKOGH, A.C.; HILBORN, J.; ENGSTRAND, T. Three-Dimensional Technology and Bone Morphogenetic Protein in Frontal Bone Reconstruction. **J. Craniofac. Surg.**, v. 17, p. 275-279, 2006.

AROSARENA, O.; COLLINS, W. Comparison of BMP-2 and -4 for rat mandibular bone regeneration at various doses. **Orthod. Craniofac. Res.**, v. 8, p. 267-276, 2005.

AROSARENA, O.A.; COLLINS, W.L. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. **Otolaryngol. Head. Neck. Surg.**, v. 132, p. 592-597, 2005.

BESSHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Purification of bone morphogenetics protein derived from bovine matrix. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 165, p. 595-601, 1989.

BESSHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Analysis of bone morphogenetic protein (BMP) derived from human and bovine bone matrix. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 268, p. 226-234, 1991.

BESSHO, K.; IIZUKA, T. The possibility of application of bone morphogenetic proteins (BMPs) for reconstruction of jaw bones. **Oral. Oncology.**, v. 4, p. 304-307, 1995.

BESSHO, K.; CARNES, D.L.; CAVIN, R.; ONG, J.L. Experimental studies on bone induction using low-molecular-weight poly (DL-lactide-co-glycolide) as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 61, p. 61-65, 2002.

BLUMENTHAL, N.M.; ALVES, M.E.; AL-HUWAIS, S.; HOFBAUER, A.M.; KOPERSKI, R.D. Defect-determined regenerative options for treating periodontal intrabony defects in baboons. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 10-24, 2003.

BOLANDER, M.E.; BALIAN, G. The use of demineralized bone matrix in repair of segmental defects. **J. Bone. Joint. Surg.**, v. 68A, p. 1264-1274, 1986.

BOLANDER, M. E. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 200, p.165-170, 1992.

BONACUCINA, G.; PALMIERI, G.F.; CRAIG, D.Q. Rheological and dielectric characterization of monoolein/water mesophases in the presence of a peptide drug. **J. Pharm. Sci.**, v. 94, p. 2452-2462, 2005.

BOSTROM, M.P.G.; LANE, J.M.; BERBERIAN, W.S. et al. Immunolocalization and expression and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. **J. Orthop. Res.**, v. 13, p. 357-367, 1995.

BOUXSEIN, M.L.; TUREK, T.J.; BLAKE, C.A.; AUGUSTA, D.D.; LI, X.; STEVENS, M.; SEEHERMAN, H.J.; WOZNEY, J.M. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. **J. Bone. Joint. Surgery.**, v. 83A, n. 8, p. 1219-1230, 2001.

BOYD, B.J.; WHITTAKER, D.V.; KHOO, S.M.; DAVEY, G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. **Int. J. Pharm.**, v. 309, p. 218-226, 2006.

BOYNE, P.J. Reconstruction of discontinuity mandibular defects in rhesus monkeys using rhBMP-2. **J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v. 53, p. 92, 1995.

BOYNE, P.J. Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. **Bone.**, v. 19, p. 83s-92s, 1996.

BOYNE, P.J.; NATH, R.; NAKAMURA, A. Human recombinant BMP-2 in osseous reconstruction of simulated cleft palate defects. **Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v. 36, p. 84-90, 1998.

BURROWS, R.; COLLETT, J.H.; ATTWOOD, D. The release of drugs from monoglyceride-water liquid crystalline phases. **Int. J. Pharm.**, v. 111, p. 283-293, 1994.

CANALIS, E. **Bone (NY)**, v. 14, p. 273-276, 1993.

CARR, M.G.; CORISH, J.; CORRIGAN, O.I. Drug delivery from a liquid crystalline base across visking and human stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, v. 157, p. 35-42, 1997.

CELESTE, A.J.; IANNAZZI, J.A.; TAYLOR, R.C.; Hewick, R.M.; et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, p. 9843-9847, 1990.

CELESTE, A.J.; SONG, J.J.; COX, K.; ROSEN, V.; WOZNEY, J.M. Bone morphogenetic protein-9, a new member of TGF- β superfamily. **J. Bone. Miner. Res.**, v. 9, p. S136, 1994.

CHANG, C.M.; BODMEIER, R. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems. **J. Pharm. Sci.**, v. 86, p. 747-752, 1997a.

CHANG, C.M., BODMEIER, R. Effect of dissolution media and additives on the drug release from cubic phase delivery systems. **J. Control. Release.**, v. 46, p. 215-222, 1997b.

CHANG, C.M.; BODMEIER, R. Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase. **Int. J. Pharm.**, v. 173, p. 51-60, 1998.

CHAUDHARI, A.; RON, E.; RETHMAN, M.P. Recombinant human morphogenetic protein-2 stimulates differentiation in primary cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 167, p. 31-39, 1997.

COUMOUL, X.; DENG, C.X. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases. **Birth. Defects. Res. C. Embryo. Today.**, v. 69, p. 286-304, 2003.

COX, K.; HOLTROP, M.; D'ALESSANDRO, J.S.; WANG, E.A.; WOZNEY, J.M.; ROSEN, V. Histological and ultrastructural comparison of the *in vivo* activities of rhBMP-2 and rhBMP-5. **J. Bone. Miner. Res.**, v. 6, p. S155, 1991.

CRUZ-ORIVE, L.M.; WEIBEL, E.R. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. L148-156, 1990.

D'ALESSANDRO, J.S.; COX, K.A.; ISRAEL, D.I.; LAPAN, P.; MOUTSATSOS, I.K.; NOVE, J.; ROSEN, V.; RYAN, M.C.; WOZNEY, J.M.; WANG, E.A. Purification, characterization and activities of recombinant bone morphogenetic protein 5. **J. Bone. Miner. Res.**, v. 6, p. S153, 1991.

DAMIEN, C.J.; PARSONS, J.R.; PREWETT, A.B.; RIETVELD, D.C.; ZIMMERMAN, M.C. Investigation of an organic delivery system for demineralized bone matrix in a delayed-healing cranial defect model. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 28, p. 553-561, 1994.

D'ÁNTONA, P.; PARKER, J.R.W.O.; ZANIRATO, M.C.; ESPOSITO, E.; NASTRUZZI, C. Rheologic and NMR characterization of monoglyceride-based formulations. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 52, p. 40-52, 2000.

DESILETS, C.P.; MARDEN, L.J.; PATTERSON, A.L.; HOLLINGER, J.O. Development of synthetic bone-repair materials for craniofacial reconstruction. **J. Craniofac. Surg.**, v. 1, p. 150-153, 1990.

DEUEL, T.F., HUANG, H.S. Platelet derived growth factor. Structure, function and roles in normal and transformed cells. **J. Clin. Invest.**, v. 74, p. 669-676, 1984.

DOLL, B.A.; TOWLE, H.J.; HOLLINGER, J.O.; REDDI, A.H.; MELLONING, J.T. The osteogenic potential of two composite graft systems using osteogenin. **J. Periodontol.**, v. 61, p. 745-750, 1990.

DUCHEYNE, P.; EL-GHANNAM, A.; SHAPIRO, I. Effect of bioactive glass templates on osteoblast proliferation and in vitro synthesis of bone-like tissue. **J. Cell. Biochem.**, v. 56, p. 162-167, 1994.

DUCY, P.; KARSENTY, G. The family of bone morphogenetic proteins. **Kidney. Int.**, v. 57, p. 2207-2214, 2000.

EINHORN, T.A. Clinical applications of recombinant gene technology: Bone and cartilage repair. **Cells. Materials.**, v. 2, p.1-11, 1992.

FERGUSON, D.; DAVIS, W.L.; URIST, M.R.; HURT, W.C.; ALLEN, E.P. Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction-induce repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*). **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 219, p. 251-258, 1987.

FRANCESCHI, R.T. Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. **J. Dent. Res.**, v. 84, p. 1093-1103, 2005.

FRITZ, M.E.; JEFFCOAT, M.K.; REDDY, M.; KOTH, D.; BRASWELL, L.D.; MALMQUIST, J.; LEMONS, J. Guided bone regeneration of large mandibular defects in a primate model. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1484-1491, 2000.

FUJIMURA, K.; BESSHO, K.; KUSUMOTO, K.; OGAWA, Y.; IIZUKA, T. Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelopeptide type collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 208, p. 316-322, 1995.

GALGUT, P.N. Biodegradable dressing material used in guided tissue regeneration of periodontal tissues: a case report. **Quintessence. Int.**, v. 24, p. 25-27, 1993.

GAO, Y.; YANG, L.; FANG, Y.; MORI, R.; KAWAHARA, K.; TANAKA, A. The inductive effect of bone morphogenetic protein (BMP) on human periodontal fibroblast-like cells *in vitro*. **J. Osaka. Dent. Univ.**, v. 29, p. 9-17, 1995.

GAO, T.J.; LINDHOLM, T.J.; KOMMONEN, B.; RAGNI, P.; PARONZINI, A.; LINDHOLM, T.C.; JALOVAARA, P.; URIST, M.R. The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep. **Int. Orthop.**, v. 21, p. 194-200, 1997.

GERAGHTY, P.B.; ATTWOOD, D.; COLLETT, J.H.; DANDIKER, Y. The *in vitro* release of some antimuscarinic drugs from monoolein/water lyotropic crystalline gels. **Pharm. Res.**, v. 13, p. 1265-1271, 1996.

GERAGHTY, P.G.; ATTWOOD, D.; COLLETT, J.H.; SHARMA, H.; DANDIKER, Y. An investigation of the parameters influencing the bioadhesive properties of Myverol 18-99/water gels. **Biomaterials.**, v. 18, p. 63-67, 1997.

GERHART, T.N.; KIRKER-HEAD, C.A.; KRIZ, M.J., et al. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. **Clin. Orthop.**, v. 293, p. 317-326, 1993.

GENETICS INSTITUTE, Cambridge, Mass, unpublished reports, 1995. **The creation of rhBMP**- An overview of the recombinant technology process.

GUNDERSEN, H.J.; BENDTSEN, T.F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F.B.; VESTERBY, A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS.**, v. 96, p. 379-394, 1988b.

HIGUCHI, T.; KINOSHITA, A.; TAKAHASHI, K.; ODA, S.; ISHIKAWA, I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. **J. Periodontol.**, v. 70, p. 1026-1031, 1999.

HOGAN, B.L. Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. **Genes. Dev.**, v. 10, p. 1580-1594, 1996.

HOLLINGER, J.O.; BATTISTONE, G.C. Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 207, p. 290-305, 1986.

HOLLINGER, J.O.; SCHMITZ, J.P.; MIZGALA, J.W.; HASSLER, C. An evaluation of two configurations of tricalcium phosphate for treating craniotomies. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 23, p. 17-29, 1989.

HOLLINGER, J.O. Factors for osseous repair and delivery: Part II. **J. Craniofac. Surg.**, v. 4, p. 135-141, 1993.

HOLLINGER, J.O.; JAMIOLKOWSKI, D.; SHALABY, S.W. **Poly (α -hydroxy acids) and bone repair**, in: J.O. Hollinger (Ed.), *Biomedical Applications of Synthetic Biodegradable Polymers*, CRC Press, Inc., Boca Raton, 1995.

HOLLINGER, J.O.; LEONG, K. Poly (α -hydroxy acids): Carriers for bone morphogenetic proteins. **Biomaterials.**, v. 17, p. 187-194, 1996.

INODA, H.; YAMAMOTO, G.; HATTORI, T. Histological investigation of osteoinductive properties of rhBMP-2 in a rat calvarial bone defect model. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 32, p. 365-369, 2004.

ISRAEL, D.I.; NOVE, J.; KERNS, K.M.; MOUTSATSOS, I.K.; KAUFMAN, R.F. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. **Growth Factor.**, v. 7, p. 139-150, 1992.

JOHNSON, E.E.; URIST, M.R.; FINERMAN, G.A.M. Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions: A preliminary report. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 230, p. 257-265, 1988a.

JOHNSON, E.E.; URIST, M.R.; FINERMAN, G.A.M. Repair of segmental defects of the tibia with cancellous bone grafts augmented with human bone morphogenetic protein. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 236, p. 249-257, 1988 b.

JOHNSON, E.E.; URIST, M.R.; FINERMAN, G.A.M. Distal metaphyseal tibial nonunion: Deformity and bone loss treated by open reduction, internal fixation, and human bone morphogenetic protein (hBMP). **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 250, p. 234-240, 1990.

KAMAKURA, S.; NAKAJO, S.; SUZUKI, O.; SASANO, Y. New scaffold for recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 71, p. 299-307, 2004.

KATAGIRI, T.; YAMAGUCHI, A.; IKEDA, T.; YOSHIKI, S.; WOZNEY, J.M.; ROSEN, V.; WANG, E.A.; TANAKA, H.; OMURA, S.; SUDA, T. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 172, p. 295-299, 1990b.

KAWAMURA, M.; IWATA, H.; SATO, K.; MIURA. Chondroosteogenetic response to crude bone matrix proteins bound to hydroxyapatite. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 217, p. 281-292, 1987.

KAYALI, I.; SUHERY, T.; FRIEBERG, S.E.; SIMION, F.A.; RHEIN, L.D. Lyotropic liquid crystals and the structural lipids of the stratum corneum. **J. Pharm. Sci. Washington.**, v. 80, p. 428-431, 1991.

KENLEY, R.; MARDEN, L.; TUREK, T.; JIN, L.; RON, E.; HOLLINGER, J.O. Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 28, p. 1139-1147, 1994.

KENLEY, R.A.; YIM, K.; ABRAMS, J.; RON, E.; TUREK, T.; MARDEN, L.J.; HOLLINGER, J.O. Biotechnology and bone graft substitutes. **Pharm. Res.**, v. 10. p. 1393-1401, 1993.

KESKIN, D.S.; TEZCANER, A.; KORKUSUZ, P.; KORKUSUZ, F.; HASIRCI, V. Collagen-chondroitin sulfate-based PLLA-SAIB- coated rhBMP-2 delivery system for bone repair. **Biomaterials.**, v. 26, p. 4023-4034, 2005.

KIM, C.S.; CHOI, S.H.; CHAI, J.K.; CHO, K.S.; MOON, I.S.; WIKESJO, U.M.; KIM, C.K. Periodontal repair in surgically created intrabony defects in dogs: influence of

the number of bone walls on healing response. **J. Periodontol.**, v. 75, p. 229-235, 2004.

KINGSLEY, D.M. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. **Genes and Development.**, v. 8, p. 133-146, 1994.

KIRKER-HEAD, C.A.; GERHART, T.N.; SCHELLING, S.H.; HENNING, G.E.; WANG, E.; HOLTROP, M.E. Long-term healing of bone using human bone morphogenetic protein 2. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 318, p. 222-230, 1996.

KUSUMOTO, K.; BESSHO, K.; FUJIMURA, K.; KONISHI, Y.; OGAWA, Y.; IIZUKA, T. Comparative study of bone marrow induced by purified BMP and recombinant human BMP-2. **Biochemical Biophysical Research Communications.**, v. 215, p. 205-211, 1995.

KUSUMOTO, K.; BESSHO, K.; FUJIMURA, K.; OKUBO, Y.; WANG, Y.; KAKUDO, N.; OGAWA, Y. Tissue reaction at the implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 into the skeletal muscle. **Int. J. Tissue. React.**, v. 27, p.181-188, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARA, M.G.; BENTLEY, M.V.; COLLETT, J.H. *In vitro* drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. **Int. J. Pharm.**, v. 293, p. 241-250, 2005.

LEE, S.C.; SHEA, M.; BATTLE, M.A., et al. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by rhBMP-2 in PLGA matrix. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 28, p. 1149-1156, 1994.

LEE, M.B. Bone morphogenetic proteins: Background and implications for oral reconstruction. A review. **J. Clin. Periodontol.**, v. 24, p. 355-365, 1997.

LEE, J.; KELLAWAY, I.W. *In vitro* peptide release from liquid crystalline buccal delivery systems. **Int. J. Pharm.**, v. 195, p. 29-33, 2000a.

LEE, J.; KELLAWAY, I.W. Buccal permeation of [D-Ala², D-Leu⁵] enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **Int. J. Pharm.**, v. 195, p. 35-38, 2000b.

LEE, J.; KELLAWAY, I.W. Combined effect of oleic acid and polyethylene glycol 200 on buccal permeation of [D-Ala², D-Leu⁵] enkephalin from a cubic phase of glyceryl monooleate. **Int. J. Pharm.**, v. 204, p. 137-144, 2000c.

LEE, J.; YOUNG, S.A.; KELLAWAY, I.W. Water quantitatively induces the mucoadhesion of liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 53, p. 629-636, 2001.

LEE, S.J.; KIM, S.W.; CHUNG, H.; PARK, Y.T.; CHOI, Y.W.; CHOI, Y.W.; CHO, Y.H.; YOON, M.S. Bioadhesive drug delivery system using glyceryl monooleate for the intravesical administration of paclitaxel. **Chemotherapy.**, v. 51, p. 311-318, 2005.

LESLIE, S.B.; PUVVADA, S.; RATNA, B.A.; RUDOLPH, A.S. Encapsulation of hemoglobin in a bicontinuous cubic phase lipid. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1285: 246-254, 1996.

LINDHOLM, T.C.; LINDHOLM, T.S.; ALITALO, I.; URIST, M.R. Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) induced repair of skull trephine defects in sheep. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 277, p. 265-268, 1988.

LINDHOLM, T.A.; GAO, T.J. Functional carriers for bone morphogenetic proteins. **Ann. Chir. Gynaecol.**, v. 82, p. 3-12, 1993.

LI, S. **Collagen biotechnology and its medical applications**, in: C.G. Gebelein (Ed.), *Biotechnological Polymers: Medical, Pharmaceutical and Industrial Applications*, 1993, 66-81p.

LYONS, K.M.; PELTON, R.W.; HOGAN, B.L. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein- 2A (BMP-2A). **Development.**, 109: 833-844, 1990.

MAIRE, M.; CHAUBET, F.; MARY, P.; BLANCHAT, C.; MEUNIER, A.; LOGEART-AVRAMOGLU, D. Bovine BMP osteoinductive potential enhanced by functionalized dextran-derived hydrogels. **Biomaterials.**, v. 26, p. 5085-5092, 2005.

MALLONE, H.; FONTAINE, J.; MOES, A. *In vitro/in vivo* characterization of a tramadol HCl depot system composed of monoolein and water. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 23, p. 627-631, 2000.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. **Métodos quantitativos em morfologia**. 1 edição, Ed. UERJ, 1995.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. What is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The example of the stereology. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 16, p. 131-139, 1999.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Stereological tools in biomedical research. **Ann. Braz. Acad. Sci.**, v. 75, p. 469-486, 2003.

MANOLAGAS, S.C.; JILKA, R.L. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 305-311, 1995.

MARUKAWA, E.; ASAHINA, L.; ODA, M.; SETO, I.; ALAM, M.D.J.; ENOMOTO, S. Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Int. J. Periodontics. Restorative. Dent.**, v. 16, p. 9-19, 1996.

MASSAGUE, J. Transforming growth factor-beta modulates the high affinity receptors for epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha. **J. Cell. Biol.**, v. 100, p. 1508-1514, 1985.

MARDEN, L.J.; HOLLINGER, J.O.; CHAUDHARI, A.; TUREK, T.; SCHAUB, R.G.; RON, E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 28, p. 1127-1138, 1994.

MARK DE, HOLLINGER, J.O.; HASTINGS, C.J.R.; CHEN, G.; MARDEN, L.J.; REDDI, A.H. Repair of calvarial nonunions by osteogenin, a bone inductive-protein. **J. Plastic. Reconstr. Surg.**, v. 86, p. 623-630, 1990.

MATSUO, T.; SUGITA, T.; KUBO, T.; YASUNAGA, Y.; OCHI, M.; MURAKAMI, T. Injectable magnetic liposomes as a novel carrier of recombinant human BMP-2 for bone formation in a rat bone-defect model. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 66, p. 747-754, 2003.

MCCARTHY, T.L.; CENTRELLA, M.; CANALIS, E. Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. **Endocrinology.**, v. 124, p. 301-309, 1989.

MILLER, E.J.; RHODES, R.K. Preparation and characterization of different types of collagen. **Methods. Enzymol.**, v. 82A, p. 33-64, 1982.

MIYAMOTO, S.; TAKAOKA, K.; OKADA, T.; YOSHIKAWA, H.; HASHIMOTO, J.; SUZUKI, S.; ONO, K. Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein. **Clin. Orthop.**, v. 278, p. 274-285, 1992.

MOORE, J.C.; MATUKAS, V.J.; DEATHERAGE, J.R.; MILLER, E.J. Craniofacial osseous restoration with osteoinductive proteins in a collagenous delivery system. **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v. 19, p. 172-176, 1990.

NAWATA, M.; WAKITANI, S.; NAKAYA, H.; TANIGAMI, A.; SEKI, T.; NAKAMURA, Y.; SAITO, N.; SANO, K.; HIDAKA, E.; TAKAOKA, K. Use of bone morphogenetic protein 2 and diffusion chambers to engineer cartilage tissue for the repair of defects in articular cartilage. **Arthritis. Rheum.**, v. 52, p. 155-163, 2005.

NEVINS, M.; KIRKER-HEAD, C.; NEVINS, M.; WOZNEY, J.A.; PALMER, R.; GRAHAM, D. Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Int. J. Periodontics. Restorative. Dent.**; v. 16, p. 9-19, 1996.

NIELSEN, L.S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems. I. Characterization of muco adhesive properties of systems based on glyceryl monooleate and glyceryl monolinoleate. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 6, p. 231-239, 1998.

NILSSON, O.S.; URIST, M.R. Immune inhibition of repair of canine skull trephine defects implanted with partially purified bovine morphogenetic protein. **Int. Orthop.**, v. 15, p. 256-263, 1991.

NODA, M. & RODAN, G.A. Type- β transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblastic-like cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 140, p. 56-65, 1986.

NORLING, T.; LADING, P.; ENGSTRÖM, S.; LARSSON, K.; KROG, N.; NISSEN, S.S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 19, p. 687-692, 1992.

NUNES, A.B.; TAMES, D.R.; VALCANAIA, T.D.C. Potencial osteogênico do transplante autógeno de osso imaturo. **Rev. Bras. Cirurg. Impl.**, v. 4, p. 19-23, 1997.

NYLANDER, T.; MATTISSON, C.; RAZUMAS, V.; MIEZIS, Y.; HAKANSSON, B. A study of entrapped enzyme stability and substrate diffusion in a monoglyceride-based cubic liquid crystalline phase. **Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects.**, v. 114, p. 311-320, 1996.

OGISO, T.; MASAHIRO, I.; PAKU, T. Effect of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea and relationship between penetration parameters and enhancement factors. **J. Pharm. Sci.**, v. 84, p. 482-488, 1995.

OHGUSHI, H.; OKUMURA, M.; TAMAI, S.; SHORS, E.C.; CAPLAN, A.I. Marrow cell-induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: A comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 24, p. 1563-1570, 1993.

ONG, J.L.; CARDENAS, H.L.; CAVIN, R.; CARNES, D.L. JR. Osteoblast responses to BMP-2 treated titanium *in vitro*. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.**, v. 12, p. 649-654, 1997.

PARALKAR, V.M.; NANDEDKAR, A.K.N.; POINTER, R.H.; KLEINMAN, H.K.; REDDI, A.H. Interaction of osteogenin, a heparin binding bone morphogenetic protein, with type IV collagen. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 17281-17284, 1990.

PETERSON, B.; ZHANG, J.; IGLESIAS, R.; KABO, M.; HEDRICK, M.; BENHAIM, P.; LIEBERMAN, J.R. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. **Tissue. Eng.**, v. 11, p. 120-129, 2005.

PFEILSCHIFTER, J.; MUNDY, G.R. TGF- β stimulates osteoblast activity and is released during the bone resorption process. **Calcium Regulation and Bone Metabolism: Basic and Clinical Aspects.**, v. 9, p. 450-454, 1987.

PURI, V.; BANSAL, A.K. *In vitro* - *in vivo* characterization of release modifying agents for parenteral sustained-release ketorolac formulation. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, v. 30, p. 619-626, 2004.

RAMANATHAN, R.; GEARY, R.S.; BOURNE, D.W.A.; PUTCHA, L. Bioavailability of intranasal promethazine dosage forms in dogs. **Pharmacol. Res.**, v. 38, p. 35-39, 1998.

RAUCH, F.; LAUZIER, D.; CROTEAU, S.; TRAVERS, R.; GLORIEUX, F.H.; HAMDY, R. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, 4 e 7 during distraction osteogenesis in rabbits. **Bone.**, v. 27, p. 453-459, 2000.

REDDI, A.H. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 4, p. 850-855, 1992.

REDDI, A.H. AND CUNNINGHAM, N.S. Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetics proteins. **J. Bone. Miner. Res.**, v. 8, p. S499-S502, 1993.

REDDI, A.H. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. **Cytokine and Growth Factor Reviews.**, v. 8, p. 11-20, 1997.

RENIER, M.L.; KOHN, D.H. Development and characterization of a biodegradable polyphosphate. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 34, p. 95-104, 1997.

RICHARDS, M.; DAHIYAT, B.I.; ARM, D.M.; BROWN, P.R.; LEONG, K.W. Evaluation of polyphosphates and polyphosphonates as degradable biomaterials. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 25, p. 1151-1167, 1991.

RILEY, E.H.; LANE, J.M.; URIST, M.R. LYONS, K.M.; LIEBERMAN, J.R. Bone morphogenetic protein-2: Biology and applications. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 324, p. 39-46, 1996.

RIPAMONTI, U. The morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeleton of coral. **J. Bone. Joint. Surg.**, v. 73-A, p. 692-703, 1991.

RIPAMONTI, U.; DUNEAS, N.; VAN DEN HEEVER, B.; BOSCH, C.; CROOKS, J. Recombinant transforming growth factors- β 1 induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) to initiate rapid bone formation. **J. Bone. Miner. Res.**, v. 12, p. 1584-1595, 1997.

RIPAMONTI, U.; DUNEAS, N. Tissue engineering of bone by osteoinductive biomaterials. **MRS. Bull.**, v. 11, p. 36-39, 1996.

RIPAMONTI, U.; DUNEAS, N. Tissue morphogenesis and regeneration by morphogenetic proteins. **Plastic. Reconst. Surg.**, v. 101, p. 227-239, 1998.

RIPAMONTI, U.; MA, S.; REDDI, A.H. The critical role of geometry of porous hydroxyapatite delivery system in induction of bone by osteogenin, a bone morphogenetic protein. **Matrix.**, v. 12, p. 202-212, 1992.

RIPAMONTI, U.; REDDI, A.H. Periodontol Regeneration: Potential role of bone morphogenetic proteins. **J. Periodontol. Res.**, v. 29, p. 225-235, 1994.

RIPAMONTI, U.; REDDI, A.H. Tissue engineering, morphogenesis and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v. 8, p. 154-163, 1997.

ROBERTS, A.B.; ANZANO, M.A.; WAKEFIELD, L.M.; ROCHE, N.S.; STERN, D.F.; SPORN, M.B. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. **Proc Nat Acad Sci USA.**, v. 82, p. 119-123, 1985.

ROSEN, V.; COX, K.; HATTERSLEY, G. **Bone morphogenetic proteins.** In: Bilezikian J.P., Raisz LG, and Rodan GA., Eds. Principles of bone biology. San Diego: Academic; 1996; 661-671.

SADHALE, Y.; SHAH, J.C. Stabilization of insulin against agitation-induced aggregation by GMO cubic phase gel. **Int. J. Pharm.**, v. 191, p. 51-64, 1999a.

SADHALE, Y.; SHAH, J.C. Biological activity of insulin in GMO gels and the effect of agitation. **Int. J. Pharm.**, v. 191, p. 65-74, 1999b.

SAMPATH, T.K.; REDDI, A.H. Dissociative extraction and reconstruction of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 78, p. 7599-7603, 1981.

SAMPATH, T.K.; MALIAKAL, J.C.; HAUSCHKA, P.V.; JONES, W.K.; SASAK, H.; TUCKER, R.F.; WHITEKH-COUGHILIN, J.E.; TUCKER, M.M.; PANG, R.H.; et al.

Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation *in vivo* with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation *in vitro*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 20352-20362, 1992.

SATO, K. & URIST, M.R. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 197, p. 301-311, 1985.

SATO, T.; KAWAMURA, M.; SATO, K.; IWATA, H.; MIURA, T. Bone morphogenesis of rabbit bone morphogenetic protein-bound hydroxyapatite-fibrin composite. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 263, p. 254-262, 1991.

SCHAUB, R. **Pharmacology and toxicology of a recombinant human bone morphogenetic protein two/bioerodable particle device for bone healing.** Food and Drug Administration Symposium on Wound Healing Agents, April 23, 1993.

SCHILEPHAKE, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction [Review]. **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v. 31, p. 469-484, 2002.

SCHRÖDER, U.; SVENSON, S.B. Nasal and parenteral immunizations with diphtheria toxoid using monoglyceride/fatty acid lipid suspensions as adjuvants. **Vaccine.**, v. 17, p. 2096-2113, 1999.

SHAH, J.C.; DADHALE, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 47, p. 229-250, 2001.

SHAH, M.H.; PARADKAR, A. Cubic liquid crystalline glyceryl monooleate matrices for oral delivery of enzyme. **Int. J. Pharm.**, v. 294, p. 161-171, 2005.

SIGURDSSON, T.J.; LEE, M.B.; KUBOTA, K.; TUREK, T.J.; WOZNEY, J.M.; WIKESJO, U.M. Periodontal repair in dogs: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. **J. Periodontol.**, v. 66, p. 131-138, 1995.

SIGURDSSON, T.J.; NYGAARD, L.; TATAKIS, D.N.; FU, E.; TUREK, T.J.; JIN, L.; WOZNEY, J.M.; WIKESJO, U.M.E. Periodontal repair in dogs: Evaluation of rhBMP-2 carriers. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v. 16, p. 524-537, 1996.

SI, X.; JIN, Y.; YANG, L. Induction of new bone by ceramic bovine with recombinant human bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor β . **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v. 27, p. 310-314, 1998.

SIMON, J.L.; ROY, T.D.; PARSONS, J.R.; REKOW, E.D.; THOMPSON, V.P.; KEMNITZER, J.; RICCI, J.L. Engineered cellular response to scaffold architecture in a rabbit trephine defect. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 66, p. 275-282, 2003.

SONG, J.J.; CELESTE, J.A.; KONG, F.; JIRTLE, R.L.; ROSEN, V.; THIES, R.S. Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. **Endocrinology.**, v. 136, p. 4293-4297, 1995.

SPECTOR, J.A.; LUNCHS, J.S.; MEHRARA, B.J.; GREENWALD, J.A.; SMITH, L.P.; LONGAKER, M.T. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 107, p. 124, 2001.

STOLTZE, K. Elimination of Elyzol[®] 25% Dentalgel matrix from periodontal pockets. **J. Clin. Periodontol.**, v. 22, p. 185-187, 1995.

STUPP, S.L.; CIEGLER, G.W. Organoapatites: Materials for artificial bone. I: Synthesis and microstructure. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 26, p. 169-183, 1992.

TAGA, R.; CESTARI, T.M.; SILVA, T.L.; STIPP, A.C.M. Reparo de defeitos ósseos perene em crânio de cobaia pela aplicação de ossebond. **Rev. Bras. Implant.**, v. 13, p. 13-20, 1997.

TAKAOKA, K.; NAKAHARA, H.; YOSHIKAWA, H.; MASUHARA, K.; TSUDA, T.; ONO, K. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 234, p. 250-254, 1988.

TAKAOKA, K.; KOEZUKA, M.; NAKAHARA, H. Telo peptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. **J. Orthop. Res.**; v. 9, p. 902-907, 1991.

TANOJO, H.; BOUWSTRA, J.A.; JUNGINGER, H.E.; BODDÉ, H.E. *In vitro* human skin barrier modulation by fatty acids: skin permeation and thermal analysis studies. **Pharm. Res.**, v. 14, p. 42-49, 1997.

TORIUMI, D.M.; LARRABEE, W.F.J.; WALIKE, J.W.; MILLAY, D.J.; EISELE, D.W. Eisele, Demineralized bone. Implant resorption with long-term follow-up. **Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.**, v. 116, p. 676-680, 1990.

TORIUMI, D.M.; KOTLER, H.S.; LUXENBERG, D.P.; HOLTROP, M.E.; WANG, E.A. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. **Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surgery.**, v. 117, p. 1101-1112, 1991.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

UENO, T.; MIZUKAWA, N.; SUGAHARA, T. Experimental study of bone formation from autogenous periosteal graft following insulin-like growth factor I administration. **J. Cranio. Maxillofac. Surg.**, v. 27, p. 308-313, 1999.

ULUDAG, H.; D'AUGUSTA, D.; PALMER, R.; TIMONY, G.; WOZNEY, J.M. Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. **J. Biomed. Mat. Res.**, v. 46, p. 193-202, 1999.

ULUDAG, H.; D'AUGUSTA, D.; GOLDEN, J.; LI, J.; TIMONY, G.; REIDEL, R.; WOZNEY, J.M. Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterials carriers: A correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. **J. Biomed. Mat. Res.**, v. 50, p. 227-238, 2000.

ULUDAG, H.; GAO, T.; PORTER, T.J.; FRIESS, W.; WOZNEY, J.M. Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site. **J. Bone. Joint. Surg. Am.**, v. 83-A, p. S128-S135, 2001.

URIST, M. Bone: Formation by autoinduction. **Science.**, v. 150, p. 893-899, 1965.

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

URIST, M.R.; IWATA, H.; CECCOTTI, P.L.; DORFMAN, R.L., et al. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 70, p. 3511-3515, 1973.

URIST, M.R.; MIKULSKI, A.; LIETZE, A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, p. 1828-1832, 1979.

URIST, M.R.; NILSSON, O.; RASMUSSEN, J.; HIROTA, W.; LOVELL, T.; SCHMAZREID, T.; FINERMAN, G.A.M. Bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dog. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 214, p. 295-304, 1987b.

URIST, M.R. Bone morphogenetic protein: The molecularization of skeletal system development. **J. Bone. Minerv. Res.**, v. 12, p. 343, 1997.

VUKICEVIC, S.; PARALKAR, V.M.; REDDI, A.H. Extracellular matrix and bone morphogenetic proteins in cartilage and bone development and repair. **Adv. Mol. Cell. Biol.**, v. 6, p. 207-224, 1993.

WAHLGREN, S.; LINDSTROM, A.L.; FRIBERG, S.E. Liquid crystals as a potential ointment vehicle. **J. Pharm. Sci.**, v. 73, p. 1484-1486, 1984.

WANG, E.A.; ROSEN, V.; CORDES, P.; HEWICK, R.M.; KRIZ, M.J.; LUXENBERG, D.P.; SIBLEY, B.S.; WOZNEY, J.M. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 85, p. 9484-9488, 1988.

WANG, E.A.; ROSEN, V.; D'ALESSANDRO, J.S.; BAUDUY, M.; CORDES, P.; HARADA, T.; ISRAEL, D.; HEWICK, R.M.; KERNS, K.; LAPAN, P.; LUXENBERG,

D.P.; MCQUAID, D.; MOUTSATSOS, I.; NOVE, J.; WOZNEY, J.M. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, p. 2220-2224, 1990.

WINN, S.; ULUDAG, H.; HOLLINGER, J.O. Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 31, p. 303-318, 1998.

WOZNEY, J.M.; ROSEN, V.; CELESTE, A.J.; MITSOCK, L.M.; WHITTERS, M.J.; KRIZ, R.W.; et al. Novel regulators of bone formation molecular clones and activities. **Science.**, v. 242, p. 1528-1534, 1988.

WOZNEY, J.M. Bone morphogenetic proteins. **Prog. Growth. Factor. Res.**, v. 1, p. 267-280, 1989.

WOZNEY, J.M.; ROSEN, V.; BYRNE, M.; CELESTE, A.J.; MOUTSATSOS, I.; WANG, E.A. Growth factors influencing bone development. **J. Cell. Sci.**, v. 13, p. 149-156, 1990.

WOZNEY, J.M. **BMPs: roles in bone development and repair.** Portland Bone Symposium; Aug 2-5, 1995; Portland, Ore.

WOZNEY, J.M. The bone morphogenetic protein family: Multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. **Eur. J. Oral. Sci.**, v. 106, p. 160-166, 1998.

WYATT, D.M.; DORSCHER, D.A. Cubic-phase delivery system composed of glyceryl monooleate and water for sustained release of water-soluble drugs. **Pharm. Technol.**, v. 16, p. 116, 118, 120, 122 e 130, 1992.

XIANG, W.; BAOLIN, L.; YAN, J.; YANG, X. The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants. **J. Oral. Maxillofac. Surg.**, 51: 647-651, 1993.

YAMAGUCHI, A.; KATAGIRI, T.; IKEDA, T.; WOZNEY, J.M.; ROSEN, V.; WANG, E.A.; KAHN, A.J.; SUDA, T.; YOSHIKI, S. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation *in vitro*. **J. Cell. Biol.**, v. 113, p. 681-687, 1991.

YAMAMOTO, M.; TAKAHASHI, Y.; TABATA, Y. Enhanced Bone Regeneration at a Segmental Bone Defect by Controlled Release of Bone Morphogenetic Protein-2 from a Biodegradable Hydrogel. **Tissue. Eng.**, May 1, 2006 [Epub ahead of print].

YAMAZAKI, Y.; OIDA, S.; AKIMOTO, Y.; SHIODA, S. Response of the mouse femoral muscle to an implant of a composite of a bone morphogenetic protein and plaster of Paris. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 234, p. 240-249, 1988.

YASKO, A.W.; LANE, J.M.; FELLINGER, E.J.; ROSEN, V.; WOZNEY, J.M.; WANG, E.A. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological and biomechanical study in rats. **J. Bone. Joint. Surg.**, v. 74-A, p. 659-671, 1992.

ZELLIN, G.; LINDE, A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors with osteopromotive membranes. An experimental study using a mandibular defects. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 35, p. 181-190, 1997.

ZELLIN, G.; LINDE, A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. An experimental study in rabbits. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg.**, v. 31, p. 97-104, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)