

RAFAEL DA SILVA BONATO

**Avaliação do potencial osseoindutor da BMP-7
recombinante humana no reparo de defeitos
ósseos em crânios de ratos, e na osseointegração
de implantes de titânio em fêmures de coelhos**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Ciências Médicas

Orientador: José Mauro Granjeiro

Niterói

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RESUMO

Os avanços no campo da engenharia tecidual tem permitido desenvolver processos e materiais com o intuito de mimetizar o osso autógeno. Neste cenário as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) têm um papel importante graças à sua capacidade osseointegradora. A associação da BMP a biomateriais visa reduzir, ou mesmo evitar, a necessidade de um segundo leito cirúrgico, sítio doador como fonte de osso autógeno, o que minimiza a morbidade e a dor pós-operatória, superando a limitação quanto a disponibilidade e qualidade do enxerto freqüentemente observada nos sítios doadores. Assim como os enxertos, os implantes de titânio, tanto ortopédicos como dentários, têm sido amplamente utilizados nos últimos anos, com altas taxas de sucesso, porém o foco atual das pesquisas é minimizar o tempo da reabilitação com implantes osseointegráveis introduzindo diferentes tratamentos de superfícies. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da proteína morfogenética óssea recombinante humana-7 (rhBMP-7) no reparo ósseo. Como modelos experimentais foram utilizados defeitos em crânio de ratos tratado com xenoenxerto de origem bovina e a osseointegração de implantes de titânio recobertos com filme fino (nanométrico) de hidroxiapatita em fêmures de coelhos. Foram utilizados Ratos Wistar (n=20) nos experimentos em defeitos ósseos (5mm), sendo avaliados nos períodos de 7 e 42 dias. E foram instalados dois implantes (n=24) em cada fêmur de coelhos brancos Nova Zelândia (n = 6). Os implantes instalados no fêmur direito foram colocados após instrumentação padrão (A e B), enquanto o fêmur esquerdo (C e D), após uma sobre-instrumentação, não permitindo o contato osso-implante; implantes instalados na distal do fêmur foram associados à BMP (B e D). Após 4 semanas os animais foram sacrificados. No experimento em defeitos ósseos aos 7 dias foi possível constatar menor formação óssea no grupo que recebeu o xenoenxerto + rhBMP-7 (5,48%), em relação aos grupos coágulo (24,05%) e autógeno (24,62%). Porém, após 42 dias, a densidade de volume de novo osso foi maior ($p < 0,01$) no grupo com rhBMP-7 (39,05%) em comparação com o grupo que recebeu somente xenoenxerto (9,43%); também observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo autógeno (26,85%). Os implantes de titânio do grupo A apresentaram uma formação óssea média de 35,6%, similar ao Grupo B (48,6%, $p > 0,05$). Nestes dois grupos (A e B) a densidade de área de tecido conjuntivo foi de, respectivamente, 39,3% e 28,3%. Nos grupos sobre-instrumentados, a presença de BMP (Grupo D) proporcionou um aumento significativo na formação do osso, em comparação com o grupo sem BMP (Grupo C). Assim, concluímos que a associação de rhBMP-7 ao xenoenxerto e ao implante revestido com filme nanométrico de hidroxiapatita promoveu maior densidade de área de osso neoformado comparado aos respectivos controles sem rhBMP-7.

Palavras Chave: Biomaterial, Biocompatibilidade, Implantes Dentários, Fator de crescimento, Xenoenxerto.

ABSTRACT

Advances in the field of tissue engineering have allowed developing processes and materials in order to mimic autologous bone. In this scenario, the bone morphogenetic proteins (BMPs) have an important role through its osseinductor ability. The association of the BMP and biomaterials tend to reduce or even avoid the necessity a second surgical sites, a donor site as a source of autologous bone, which minimizes the morbidity and postoperative pain. Moreover, there is no limitation on the availability of the graft, which occurs at sites donors. The titanium implants, like the grafts, have been widely used in recent years with high success rates and the recent researches intend to reduce the osseointegration time through different surface treatments. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7) on bone healing. As experimental models were used the bone defect in the skull of rats, treated with bovine xenograft, and osseointegration of titanium implants coated with thin film (nanometer scale) of hydroxyapatite in femurs of rabbits. In the Wistar rats (n=20) evaluation of the repair of bone defects (5 mm) occurred after 7 and 42 days. Two titanium implants were installed (n=24) in each femur of New Zealand white rabbits (n=6). In the right femur, the implants were placed after standard instrumentation (A and B), while the left femur (C and D) after an over-instrumentation, preventing the bone-implant contact. Implants installed at the distal portion of femur were associated to BMP (groups B and D). After 4 weeks, the animals were sacrificed and the pieces harvested. In the experiment of bone defects, after 7 days it was established less bone formation in the group with rhBMP-7 + xenograft (5.48%), compared to clot (24.05%) and autologous groups (24.62%). However, after 42 days, the volume density of new bone was greater ($p < 0.01$) in the group with rhBMP-7 (39.05%) compared with the group that received only xenograft (9.43%) and autologous group (26.85%). Osseointegration of titanium implants in the group A (35.6%) were similar to group B (48.6%, $p > 0.05$). In both groups (A and B) the connective tissue density of area were, respectively, 39.3% and 28.3%. In the over-instrumented groups, the presence of BMP (Group D) induced a significant increase in bone formation, compared to group without BMP (Group C). Thus, we conclude that the association of rhBMP-7 to xenograft and HA-coated implants promoted greater new bone area than the control groups.

Key words: Biomaterials, Biocompatibility, Dental Implant, Growth Factor, Xenograft.

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas
Nível: Mestrado

Linha de Pesquisa: Bioengenharia, Biomateriais e Mineralização Biológica

RAFAEL DA SILVA BONATO

**Avaliação do potencial osseoindutor da BMP-7
recombinante humana no reparo de defeitos ósseos
em crânios de ratos, e na osseointegração de
implantes de titânio em fêmures de coelhos**

Niterói, 2010

RAFAEL DA SILVA BONATO

**Avaliação do potencial osseoindutor da BMP-7
recombinante humana no reparo de defeitos
ósseos em crânios de ratos, e na osseointegração
de implantes de titânio em fêmures de coelhos**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Ciências Médicas

Orientador: José Mauro Granjeiro

Niterói

2010

RAFAEL DA SILVA BONATO

**Avaliação do potencial osseoindutor da BMP-7
recombinante humana no reparo de defeitos ósseos em
crânios de ratos, e na osseointegração de implantes de
titânio em fêmures de coelhos**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Médicas da Universidade Federal
Fluminense, como requisito parcial para obtenção do
Grau de Mestre. Área de Concentração: Ciências
Médicas

Aprovado em _____ de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Professor Associado Beni Olej

Universidade Federal Fluminense

Professora Associado Mônica Diuana Calasans Maia

Universidade Federal Fluminense

Pesquisador Alexandre Mello de Paula Silva

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades e pessoas que colocou em minha vida e também pelos obstáculos que me ajudou a superar.

Aos meus pais, Néa e Luiz, pela educação, dedicação e amor, além do grande incentivo em minha formação profissional. Sempre me dando forças nos momentos difíceis.

Ao meu orientador José Mauro Granjeiro, pela confiança, apoio e amizade. Pelas reuniões e e-mails nas “madrugadas virtuais”, cada segundo de convivência contribuiu para o grande aprendizado profissional e pessoal.

À Mônica Calasans, pelo apoio e amizade em todos os momentos de ensinamento, desde a graduação.

Ao amigo Gustavo Fernandes, por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho, desde o projeto até as análises estatísticas finais.

Aos amigos Flávio Gasperini e Fabio Mitri pela ajuda nas cirurgias e desenvolvimento do trabalho.

Ao Igor Castro, pela ajuda nas análises das lâminas e diluição das BMPs.

À Adriana Terezinha, pela ajuda nas descrições das lâminas histológicas.

À Aline Muniz, pela ajuda e orientação nas cirurgias com os ratos.

Aos veterinários Fabinho, Alice e Maria Lúcia, pelo carinho com os coelhos, permitindo o sucesso dos procedimentos cirúrgicos.

Aos amigos Rodrigo Resende e Cristina Jardelino, pela ajuda nas cirurgias e momentos de descontração.

Ao Professor Marcos Farina do Laboratório de Biomineralização da UFRJ, pela ajuda na preparação e análise das lâminas histológicas.

Aos amigos do Grupo de Biomineralização – UFF, Gutemberg, Etyene, Driely, Juliana Hasse, Letícia Castro, Érika Kuchler, Ingrid Russoni, Andréa Pintor, Bruno Melo, Rafael Bittencourt, Carolina Spiegel, Ana Carolina Bergman, Callinca, Josiel, Neusa Motta, Débora Yassuda, José Calasans, todos de alguma forma contribuíram para o meu aprendizado.

À Mari Sogayar e ao Erik Halcsik, do Núcleo de Terapia Celular e Molecular da USP, pelo fornecimento da rhBMP-7.

Aos veterinários do NAL, Maria Lúcia e Carlos Augusto, pela ajuda em todos os momentos, possibilitando as cirurgias em ratos e camundongos.

À SIN – Sistema de Implantes Nacional, pelos implantes de titânio e biomateriais fornecidos para a realização deste trabalho.

Ao Alexandre Mello e Alexandre Rossi, do CBPF, pelo tratamento de superfície dos implantes.

À CAPES pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| <u>1- INTRODUÇÃO</u> | 16 |
| <u>2 – REVISÃO DE LITERATURA</u> | 18 |
| 2.1 - ESTRUTURA, FISIOLOGIA E HOMEOSTASE ÓSSEA | 18 |
| 2.2 – MATERIAIS OSTEOSUBSTITUTIVOS | 22 |
| 2.3 – PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPS) | 27 |
| 2.3.1 – <i>História e desenvolvimento das Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs)</i> | 27 |
| 2.3.1.1 – Formação óssea ectópica | 27 |
| 2.3.1.2 – Primeiras Descrições sobre as Proteínas Ósseas Morfogenéticas | 34 |
| 2.3.1.3 – Isolamento das Proteínas Ósseas Morfogenéticas | 35 |
| 2.3.1.4 – Difusão transmembrana | 36 |
| 2.3.1.5 – Purificação | 37 |
| 2.3.2 – <i>Mecanismo de ação e sinalização</i> | 38 |
| 2.3.3 – <i>Aplicação clínica</i> | 40 |
| 2.4 – IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS | 41 |
| <u>3 – OBJETIVOS</u> | 50 |
| 3.1 – OBJETIVO GERAL | 50 |
| 3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 50 |
| <u>4 – MATERIAL E MÉTODOS</u> | 51 |
| 4.1 – BIOMATERIAL | 51 |
| 4.1.1 – <i>Xenoinxerto bovino inorgânico</i> | 51 |
| 4.1.2 – <i>Implantes de titânio</i> | 51 |
| 4.1.3 – <i>rhBMP-7</i> | 55 |
| 4.2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS | 55 |
| 4.2.1 – <i>Experimento 1 – Enxerto ortotópico</i> | 55 |
| 4.2.1.1 – Procedimentos de anestesia e cirurgia | 55 |
| 4.2.1.2 – Obtenção das amostras e procedimento laboratorial | 59 |
| 4.2.2 – <i>Experimento 2 – Instalação de implantes</i> | 59 |
| 4.2.2.1 - Procedimentos de anestesia e cirurgia | 60 |
| 4.2.2.2 - Obtenção das amostras e procedimento laboratorial | 63 |
| 4.3 – ANÁLISE DOS DADOS | 66 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1 – <i>Experimento 1 – Reparo ósseo em crânio de ratos</i> | 66 |
| 4.3.2 - <i>Experimento 2 – Implantes revestidos com filme fino de HA</i> | 66 |
| <u>5 – RESULTADOS</u> | 69 |
| 5.1 - EXPERIMENTO 1 – REPARO ÓSSEO EM CRÂNIO DE RATO | 69 |
| 5.2 - EXPERIMENTO 2 - IMPLANTES REVESTIDOS COM FILME FINO DE HA | 77 |
| <u>6 – DISCUSSÃO</u> | 79 |
| <u>7 – CONCLUSÃO</u> | 85 |
| <u>8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> | 86 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------------|---|
| AFM | Microscopia de força atômica |
| BG | Biovidros cerâmicos |
| BMP | Proteína morfogenética óssea |
| BMPRII | Receptores de BMP do tipo II |
| BMPRI-IA | Receptores de BMP do tipo IA |
| BMPRI-IB | Receptores de BMP do tipo IB |
| CBPF | Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas |
| CEPA | Comitê de Ética em Pesquisa Animal |
| CMs | Células mesenquimais |
| COBEA | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal |
| DRX | Difração de Raios X |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetracético |
| EGF | Fator de crescimento epidermal |
| FGF | Fator de crescimento fibroblástico |
| FTIR | Infravermelho com transformada de Forrier |
| FTIRM-ATR | Microscopia de Reflectância Atenuada no Infravermelho por Transformada de Fourier |
| GIXRD | Difração de raios-X de incidência rasante |
| G4Ti | Titânio Grau 4 |
| G5Ti | Titânio Grau 5 |
| HA | Hidroxiapatita |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HF | Ácido fluorídrico |
| HNO ₃ | Ácido nítrico |
| HUAP | Hospital Universitário Antônio Pedro |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| IBAD | Feixe de íons de deposição assistida |
| IFM | Interferometria de luz |

| | |
|------------------|---|
| IGF | Fator de crescimento semelhante à insulina |
| LNLS | Laboratório Nacional de Luz Síncrotron |
| LPC | Laboratório de Produção de Coelhos |
| MAPK | <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| MMP | Metaloproteinase |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| ODF | Fator de diferenciação de osteoclastos |
| OPG | Osteoprotegerina |
| OP-1 | Proteína osteogênica -1 |
| PDGF | Fator de crescimento derivado de plaquetas |
| PGE | Prostaglandina E |
| PGF2 α | Prostaglandina F 2 alfa |
| PSHA | Pulverização de plasma de hidroxiapatita |
| RAMS | Pulverização catódica em ângulo reto– <i>right-angle magnetron sputtering</i> |
| SIN | Sistema de Implantes Nacional |
| TCP | Fosfato tricálcico |
| TGF- β | Fator de crescimento transformador beta |
| TiO | Óxido de titânio |
| TiO ₂ | Dióxido de titânio |
| TPS | <i>titanium plasma-spraying</i> |
| USP | Universidade de São Paulo |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Início da ossificação intramembranosa. Células do mesênquima se tornam arredondadas e formam um blastema no qual, por diferenciação, originam-se os osteoblastos que produzem tecido ósseo primário. (*Livro: Histologia Básica; Junqueira e Carneiro, 2004*).....**28**
- Figura 2: Formação de um osso longo a partir de um modelo cartilaginoso. Cartilagem hialina, pontilhado; cartilagem calcificada, negro; tecido ósseo, traços oblíquos. As cinco figuras da fileira horizontal do centro representam cortes transversais da parte media das figuras da fileira superior. Notar a formação do cilindro (ou colar) ósseo na parte media do modelo de cartilagem hialina, onde se inicia o processo de ossificação. O desenho mostra que a fusão da diáfise com as epífises, que determina a parada do crescimento do osso, ocorre em momentos diferentes, no mesmo osso. (*Livro: Histologia Básica; Junqueira & Carneiro, 2004*)**29**
- Figura 3: A- Gráfico representando a difração de raios X identificando a composição das fases na fina camada de HA depositada; B – Aparelho para a utilização da técnica de difração de raios-X de incidência rasante (GIXRD); C – Difração de raios-X com radiação de luz Síncrotron em incidência rasante; D - Gráfico representando as bandas vibracionais de HA, através da Microscopia de Reflectância Atenuada no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIRM-ATR)**53**
- Figura 4: Caracterização das superfícies dos implantes através do MEV. A e C – Implante sem tratamento de superfície; B e D – Implante após o recobrimento com filme fino de hidroxiapatita (300nm)**54**
- Figura 5: A – Descolamento mucoperiostal; B – Espaços parietais onde serão realizadas as perfurações com as brocas trefinas de 5mm; C - Delimitação dos espaços com a trefina de 5mm, antes da remoção das corticais; D – Remoção das corticais; E – Grupo experimental, com colocação dos biomateriais; F – Após sutura**58**

| | |
|--|-----------|
| Figura 6: Procedimentos Cirúrgicos. A – Tricotomia; B – Incisão de aproximadamente 40 mm e afastamento da pele; C – Descolamento muscular; D – Perfurações para a instalação dos implantes; E – Implante imerso em rhBMP-7; F – Implantes instalados | 62 |
| Figura 7: Processamento histológico em resina. A – Bloco incluído em resina; B e C – Bloco de resina sendo seccionado; D – Bloco seccionado no longo eixo do implante | 65 |
| Figura 8: Determinação da área para análise morfométrica. Padronização de duas espiras abaixo da região cortical | 67 |
| Figura 9. A - Imagem original através de microscopia de luz polarizada; B – Segmentação de imagem realizada pelo Image-Pro Plus®, mostrando implante (preto), tecido conjuntivo (vermelho) e osso neoformado (amarelo) | 68 |
| Figura 10: Fotomicrografias do grupo coágulo aos 7 dias. A e B: Neoformação óssea (seta) próximo a margem do defeito ósseo (o). A barra interna = 50 µm; coloração de HE | 70 |
| Figura 11: Fotomicrografias do grupo autógeno aos 7 dias. A e B: Osso neoformado (seta) em íntimo contato com o enxerto (*) e osso nativo (o). A barra interna = 50 µm; coloração de HE | 70 |
| Figura 12: Fotomicrografias do grupo xenoenxerto aos 7 dias. A: grânulo de HA (*) envolto por tecido conjuntivo frouxo. B: sugestiva ossificação intramembranosa (seta) próxima à margem do defeito (o). A barra interna = 50 µm; coloração de HE | 71 |
| Figura 13: Fotomicrografias do grupo xenoenxerto + rhBMP-7 aos 7 dias. A: rearranjo vascular adjacente às partículas do material (setas). B: partícula do biomaterial (*) circundadas por células inflamatórias, hemácias e fibroblastos. C e D: grânulo do biomaterial(*) e processo de ossificação intramembranosa (setas) próximo a margem do defeito (o). A barra interna = 50 µm; coloração de HE | 71 |
| Figura 14: Fotomicrografias do grupo coágulo aos 42 dias. A e B: Osso neoformado (setas) associado a margem do defeito ósseo (o). A barra interna = 50 µm; coloração de HE | 72 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 15: Fotomicrografias do grupo autógeno aos 42 dias. A e B: Neoformação óssea (setas) em contato com o enxerto (*) e osso nativo (o). A barra interna = 50 μ m; coloração de HE | 72 |
| Figura 16: Fotomicrografias do grupo xenoenxerto aos 42 dias. A e B: células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (seta) adjacentes ao biomaterial (*).A barra interna = 50 μ m; coloração de HE | 73 |
| Figura 17: Fotomicrografias do grupo xenoenxerto + rhBMP-7 aos 42 dias. A, B, C e D: osso neoformado (seta) em íntimo contato com biomaterial (*). A barra interna = 50 μ m; coloração de HE | 73 |
| Figura 18: Análise estatística da densidade de volume de osso neoformado nos períodos de 7 e 42 dias (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; AxB = $p < 0,001$) | 75 |
| Figura 19: Análise estatística da densidade de volume de tecido conjuntivo nos períodos de 7 e 42 dias (** = $p < 0,01$; AxB = $p < 0,05$; CxD = $p < 0,01$) | 75 |
| Figura 20: Análise estatística da densidade de volume de biomaterial residual nos períodos de 7 e 42 dias (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; AxB = $p < 0,01$) | 76 |
| Figura 21: Imagem original da lamina e segmentação de cada grupo. A e B: instrumentação padrão sem rhBMP-7; C e D: instrumentação padrão com rhBMP-7; E e F: sobreinstrumentação sem rhBMP-7, G e H: sobreinstrumentação com rhBMP-7. Cores: Preto - implante; Vermelho - tecido conjuntivo; Amarelo – osso neoformado | 77 |
| Figura 22: Análise estatística de densidade de volume de tecido conjuntivo e osso neoformado ao redor de implantes com instrumentação padrão e sobreinstrumentados; e ainda com e sem a adição de rhBMP-7 | 78 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1: Origem e principais funções de fatores de crescimento relacionados ao reparo e formação óssea | 32 |
| Tabela 2: Distribuição dos grupos experimentais nas perfurações do crânio | 57 |
| Tabela 3: Seqüência de processamento da amostra não desmineralizada | 64 |

RESUMO

Os avanços no campo da engenharia tecidual tem permitido desenvolver processos e materiais com o intuito de mimetizar o osso autógeno. Neste cenário as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) têm um papel importante graças à sua capacidade osseointegradora. A associação da BMP a biomateriais visa reduzir, ou mesmo evitar, a necessidade de um segundo leito cirúrgico, sítio doador como fonte de osso autógeno, o que minimiza a morbidade e a dor pós-operatória, superando a limitação quanto a disponibilidade e qualidade do enxerto freqüentemente observada nos sítios doadores. Assim como os enxertos, os implantes de titânio, tanto ortopédicos como dentários, têm sido amplamente utilizados nos últimos anos, com altas taxas de sucesso, porém o foco atual das pesquisas é minimizar o tempo da reabilitação com implantes osseointegráveis introduzindo diferentes tratamentos de superfícies. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da proteína morfogenética óssea recombinante humana-7 (rhBMP-7) no reparo ósseo. Como modelos experimentais foram utilizados defeitos em crânio de ratos tratado com xenoenxerto de origem bovina e a osseointegração de implantes de titânio recobertos com filme fino (nanométrico) de hidroxiapatita em fêmures de coelhos. Foram utilizados Ratos Wistar (n=20) nos experimentos em defeitos ósseos (5mm), sendo avaliados nos períodos de 7 e 42 dias. E foram instalados dois implantes (n=24) em cada fêmur de coelhos brancos Nova Zelândia (n = 6). Os implantes instalados no fêmur direito foram colocados após instrumentação padrão (A e B), enquanto o fêmur esquerdo (C e D), após uma sobre-instrumentação, não permitindo o contato osso-implante; implantes instalados na distal do fêmur foram associados à BMP (B e D). Após 4 semanas os animais foram sacrificados. No experimento em defeitos ósseos aos 7 dias foi possível constatar menor formação óssea no grupo que recebeu o xenoenxerto + rhBMP-7 (5,48%), em relação aos grupos coágulo (24,05%) e autógeno (24,62%). Porém, após 42 dias, a densidade de volume de novo osso foi maior ($p < 0,01$) no grupo com rhBMP-7 (39,05%) em comparação com o grupo que recebeu somente xenoenxerto (9,43%); também observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo autógeno (26,85%). Os implantes de titânio do grupo A apresentaram uma formação óssea média de 35,6%, similar ao Grupo B (48,6%, $p > 0,05$). Nestes dois grupos (A e B) a densidade de área de tecido conjuntivo foi de, respectivamente, 39,3% e 28,3%. Nos grupos sobre-instrumentados, a presença de BMP (Grupo D) proporcionou um aumento significativo na formação do osso, em comparação com o grupo sem BMP (Grupo C). Assim, concluímos que a associação de rhBMP-7 ao xenoenxerto e ao implante revestido com filme nanométrico de hidroxiapatita promoveu maior densidade de área de osso neoformado comparado aos respectivos controles sem rhBMP-7.

Palavras Chave: Biomaterial, Biocompatibilidade, Implantes Dentários, Fator de crescimento, Xenoenxerto.

ABSTRACT

Advances in the field of tissue engineering have allowed developing processes and materials in order to mimic autologous bone. In this scenario, the bone morphogenetic proteins (BMPs) have an important role through its osseinductor ability. The association of the BMP and biomaterials tend to reduce or even avoid the necessity a second surgical sites, a donor site as a source of autologous bone, which minimizes the morbidity and postoperative pain. Moreover, there is no limitation on the availability of the graft, which occurs at sites donors. The titanium implants, like the grafts, have been widely used in recent years with high success rates and the recent researches intend to reduce the osseointegration time through different surface treatments. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7) on bone healing. As experimental models were used the bone defect in the skull of rats, treated with bovine xenograft, and osseointegration of titanium implants coated with thin film (nanometer scale) of hydroxyapatite in femurs of rabbits. In the Wistar rats (n=20) evaluation of the repair of bone defects (5 mm) occurred after 7 and 42 days. Two titanium implants were installed (n=24) in each femur of New Zealand white rabbits (n=6). In the right femur, the implants were placed after standard instrumentation (A and B), while the left femur (C and D) after an over-instrumentation, preventing the bone-implant contact. Implants installed at the distal portion of femur were associated to BMP (groups B and D). After 4 weeks, the animals were sacrificed and the pieces harvested. In the experiment of bone defects, after 7 days it was established less bone formation in the group with rhBMP-7 + xenograft (5.48%), compared to clot (24.05%) and autologous groups (24.62%). However, after 42 days, the volume density of new bone was greater ($p < 0.01$) in the group with rhBMP-7 (39.05%) compared with the group that received only xenograft (9.43%) and autologous group (26.85%). Osseointegration of titanium implants in the group A (35.6%) were similar to group B (48.6%, $p > 0.05$). In both groups (A and B) the connective tissue density of area were, respectively, 39.3% and 28.3%. In the over-instrumented groups, the presence of BMP (Group D) induced a significant increase in bone formation, compared to group without BMP (Group C). Thus, we conclude that the association of rhBMP-7 to xenograft and HA-coated implants promoted greater new bone area than the control groups.

Key words: Biomaterials, Biocompatibility, Dental Implant, Growth Factor, Xenograft.

1 – INTRODUÇÃO

A enxertia óssea utilizada em reconstruções, tanto em ortopedia, como em odontologia, tem como primeira escolha o enxerto autógeno. Porém, este apresenta uma inconveniente morbidade oriunda da região doadora (por exemplo, crista ilíaca ou calota).

Os avanços no campo da engenharia tecidual tem permitido desenvolver processos e materiais com o intuito de mimetizar o osso autógeno. Neste cenário, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) têm um papel importante graças à sua capacidade osseointegradora. BMPs são citocinas presentes no organismo, pertencentes a superfamília TGF- β (fator de crescimento transformador beta) capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais e as estimular a formar osso (Buser, 2009; Gautschi et al., 2007; Granjeiro et al., 2005). A associação da BMP a biomateriais tende a reduzir, ou mesmo evitar, a necessidade de dois locais cirúrgicos, um sítio doador e um receptor, o que minimiza a morbidade e a dor pós-operatória. Além disso, não há limitação na disponibilidade do enxerto, o que ocorre nos sítios doadores.

Assim como os enxertos, os implantes de titânio, tanto ortopédicos como dentários, têm sido amplamente utilizados nos últimos anos, com altas taxas de sucesso (Gokcen-Rohlig et al., 2009). No entanto, estudos longitudinais e dados histológicos têm demonstrado que o sucesso de implantes osseointegráveis variam com as condições sistêmicas do paciente, a qualidade e quantidade óssea local (Orsini et al., 2007). E para se obter condições favoráveis no sítio cirúrgico, o implante deve ser inserido com baixo trauma e deve ser alcançada uma suficiente estabilidade primária (Buser, 2009). Na reabilitação oral com implantes dentários, por exemplo, o período de osseointegração é um fator desfavorável, onde vários meses são esperados entre a colocação do implante e da prótese, logo, diminuir o tempo de tratamento é de grande interesse para o profissional e para os pacientes (Albrektsson & Wennerberg, 2004).

A fim de minimizar este período entre a colocação do implante e da prótese, e aumentar a resposta inicial osso-implante, várias alterações no

design do implante foram testadas (Coelho et al, 2009). Alterações comuns no *design* do implante incluem modificações na instrumentação cirúrgica e textura de superfície e / ou alterações químicas (Leonard et al, 2009). A pesquisa atual tem se concentrado na obtenção do sinergismo entre fatores de crescimento e modificações de superfície, como as modificações químicas, pela adição de hidroxiapatita (HA) (Torensma et al., 2003; Hall et al., 2007; Marin et al, 2008; Coelho et al. 2009), lavagem ácida (Trisi et al., 2003), lavagem ácida associada com jateamento de dióxido de titânio ou alumínio [TiO₂] (Buser et al. 1991; Buser et al., 1997).

Inúmeras pesquisas são baseadas em novos conceitos de textura e de superfície. O tratamento destas superfícies podem ser por adição (*titanium plasma-spraying* - TPS e HA) ou subtração, por lavagem ácida e / ou polimento (TiO, HF, HNO₃, HCl, H₂SO₄) (Cho & Jung, 2003; Le Guehenec e al., 2007). A adição de BMP a implantes de titânio é possível e procura minimizar o período de osseointegração, possibilitando uma rápida recuperação para o paciente (Hall et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da proteína morfogenética óssea recombinante humana-7 (rhBMP-7) no reparo ósseo. Como modelos experimentais utilizou-se o defeito em crânio de ratos tratado com xenoenxerto de origem bovina e a osseointegração de implantes de titânio recobertos com filme fino (nanométrico) de hidroxiapatita em fêmures de coelhos.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – ESTRUTURA, FISIOLOGIA E HOMEOSTASE ÓSSEA

O tecido ósseo é uma forma de tecido conjuntivo, altamente especializado, pois apresenta uma matriz extracelular mineralizada, o que confere rigidez e também algum grau de elasticidade. Além da função de suporte, o osso é a maior reserva de cálcio do organismo, sendo o cálcio um íon essencial para a vida, por participar da manutenção do pH interno do corpo, assim como na transmissão e condução do impulso elétrico em nervos e músculos. Com o objetivo de responder às necessidades metabólicas do organismo e a manter a calcemia estável, ocorre uma renovação, que é denominada de remodelação óssea. (Marx & Garg, 1998.) O osso tem a função de suporte, proteção dos órgãos internos e em conjunto com os músculos promovem a movimentação dos seres (Dorozhkin, 2010).

Em nível molecular, o osso é constituído, basicamente, de uma matriz orgânica colagênica (colágeno tipo I), contendo proteoglicanas de baixo peso molecular e proteínas não colagênicas, que correspondem a 25% de seu peso; uma parte mineral (principalmente hidroxiapatita) correspondente a 65% e água (10%). Sua função geral está relacionada com a constituição do esqueleto, sustentação e fixação dos músculos e depósito para íons cálcio para manutenção da calcemia (Junqueira & Carneiro, 2004; Rubin, 2006).

Macroscopicamente há duas formas de osso: cortical (compacto) e esponjoso (medular). No osso compacto, a matriz de colágeno está organizada em forma de lamelas de 3 a 7 μm de espessura, que podem ser paralelas ou concêntricas, isto é, geralmente ao redor de um canal vascular central, constituindo o sistema de Harvers ou ósteons. Os canais centrais contendo nervos e vasos sanguíneos se comunicam entre si e com a cavidade medular óssea através dos canais de Volkmann. As lacunas, contendo osteócitos, estão em geral situadas entre as lamelas ósseas. Tais osteócitos são as células que ficaram “enclausuradas” por tecido calcificado e estão conectadas entre si por canalículos (Rubin, 2006). Já no osso esponjoso há uma matriz mais porosa, organizada em trabéculas. As diferenças entre osso cortical e esponjoso não são apenas estruturais, mas

também funcionais. Assim, o osso cortical atua na resistência e proteção, enquanto que o esponjoso é responsável pelas funções metabólicas. Nas diáfises dos ossos longos e na superfície externa de ossos chatos, encontra-se osso cortical ou compacto. Já o osso esponjoso ou medular delimita espaços intertrabeculares que são preenchidos por medula óssea vermelha, onde há a produção ativa de células sanguíneas a partir de células mesenquimais, ou, com o envelhecimento, por medula óssea amarela, um sítio de reserva de gordura (Marx & Garg, 1998).

Externamente ao osso, há uma fina camada protetora de tecido conjuntivo com grande potencial osteogênico, denominada periósteo; e recobrendo a superfície interna existe um tecido equivalente, o endósteo. Histologicamente classifica-se o tecido ósseo em quatro tipos: o trabeculado ou entrelaçado, o composto, o lamelar e o fasciculado. O osso trabeculado desempenha um papel primordial durante o reparo ósseo, sendo o primeiro tecido ósseo a ser formado, apresentando uma velocidade de formação muito rápida (30-50µm ao dia ou mais); sua matriz de colágeno é desorganizada e sem uma estrutura lamelar dos sistemas harvesianos, sendo frágil, exibindo pouca resistência biomecânica. É o tecido ósseo predominante durante o desenvolvimento pré-natal, por isso é referido como “osso embrionário”, um termo incorreto, visto que todos os adultos têm habilidade de formar este tipo de osso. Também é o tecido que caracteriza a primeira fase da regeneração óssea, e apesar de formar-se muito rapidamente, sofre absorção e substituição pelo osso lamelar. Este, por sua vez, apresenta alta resistência mecânica, sendo denominado como um tecido ósseo maduro. Sua formação é bem lenta, com velocidade próxima de 0,6µm por dia; apresenta suas fibras colágenas e cristais de minerais altamente organizados estruturalmente. Existe um estágio intermediário durante a fase de remodelação entre o osso trabeculado e lamelar, denominado de “tecido ósseo composto”. O quarto tipo histológico é o tecido ósseo fasciculado, o qual é encontrado na zona de inserção de ligamentos das articulações, sendo de grande importância particular na odontologia, pois encontra-se adjacente ao ligamento periodontal (Melcher, 1970).

Quanto às células presentes no tecido ósseo, temos:

1. **Osteoblastos:** células cubóides organizadas em uma camada contínua sobre o osteóide, ou seja, camada não mineralizada de matriz, que recobre a superfície óssea mineralizada. Estas células são responsáveis pela osteogênese, atuando na síntese e secreção da matriz orgânica, maturação e mineralização. O osteoblasto além de sintetizar e secretar o colágeno tipo I, que corresponde a 90% da matriz orgânica, é responsável também pela produção de outras proteínas não colagênicas encontradas na matriz, como: sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), proteoglicanas e outras (Misch, 2006). É uma célula muito rica em fosfatase alcalina, enzima essencial para o processo de mineralização da matriz (Marx & Garg, 1998). Fatores sistêmicos e locais regulam o número, a diferenciação e atividade, incluindo fatores autócrinos, que se dá pela presença de receptores para hormônios sistêmicos (paratormônio, estrógenos, glicocorticóides, insulina, hormônios tireoideanos), vitamina D3 e fatores locais como prostanoídes (PGE, PGF2 α), citocinas (TGF- β s, BMPs, FGFs, IGF-1, PDGF) e interleucinas (Clarke & Khosla, 2010). A diferenciação em osteoblasto acontece a partir de células mesenquimais indiferenciadas, e a sua diferenciação em osteoblastos depende de estímulos externos, como fatores de crescimento, hormônios e/ou interações celulares.

2. **Osteócitos:** são osteoblastos incorporados à matriz óssea mineralizada, durante a osteogênese. Apresentam longas projeções citoplasmáticas, as quais delimitam canálculos intercomunicantes, constituindo assim uma rede de comunicação entre as células e a superfície óssea.

3. **Osteoclastos:** são células grandes multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleares. Quando ativo é polarizado, onde parte da membrana está envolvida na absorção, por uma forte aderência à superfície óssea, delimitando a zona absorvente da célula, denominada “borda em escova” ou “borda franjada”. Com o início da absorção forma-se uma depressão na superfície óssea junto à borda em escova, que é conhecida como lacuna de Howship (Junqueira & Carneiro, 2004, Marx & Garg, 1998).

A interação da atividade de osteoblasto-osteoclasto será responsável pela remodelação óssea, ou seja, a absorção e a neoformação óssea contínua que ocorre em todos os ossos (Rodan & Martin, 1982). Deste modo, os osteoblastos produzem fatores que irão influenciar a diferenciação e função dos osteoclastos, dos quais alguns são depositados e armazenados na matriz e outros secretados localmente em resposta a hormônios ou fatores locais.

Segundo Rodan & Martin (1982), os receptores para a maioria dos fatores osteolíticos são encontrados nos osteoblastos e não nos osteoclastos. *In vitro*, os osteoclastos absorvem osso como resposta a fatores liberados por osteoblastos que são estimulados (McSheehy & Chambers, 1986), e os componentes da matriz óssea atuam na atração e ativação dos osteoclastos (Thesingh & Burger, 1983). Com a finalidade de equilíbrio, a absorção óssea libera fatores que irão recrutar e ativar os osteoblastos (Amadei et al., 2006).

Um destes fatores que controlam o comportamento osteoclástico, é a osteoprotegerina (OPG), descrita em 1997 por Simonet et al. Os autores observaram que a sua superexpressão em camundongos transgênicos resultava em osteopetrose, pelo bloqueio da diferenciação de osteoclastos. A OPG foi identificada e estudada funcionalmente, e observaram que, além de esteróides e outros hormônios, novas moléculas secretadas podem atuar sistemicamente no controle da diferenciação de osteoclastos. Pela identificação de um receptor solúvel que controla a osteoclastogênese sugeriu que deveria existir um fator associado a este receptor, o qual foi chamado de RANKL, ou fator de diferenciação de osteoclastos (ODF). RANKL está presente na membrana de precursores de osteoclastos, bem como solúvel no microambiente ósseo. A deficiência em RANKL leva a osteopetrose (Karsenty, 1999)

2.2 – MATERIAIS OSTEOSUBSTITUTOS

O organismo está sujeito a inúmeras perdas, como por exemplo dental e óssea, podendo levar a uma substituição tecidual indesejável ou ineficiente, quando se pensa em reabilitação com implantes. O tecido ósseo como visto anteriormente apresenta importante dinamicidade e versatilidade, com diversas funções, dentre elas: proteção de órgãos, reserva de cálcio e sustentação do corpo. Em situações específicas, como em doenças osteodestrutivas ou acidentes com grandes perdas ósseas, nem sempre é possível restabelecer forma e função adequadas pela regeneração do tecido perdido. Outros distúrbios podem interferir no crescimento craniofacial, como em casos de crânio-sinostose (Mardas et al., 2002), onde o organismo não consegue oferecer reparação adequada, o que prejudica o crescimento do indivíduo. Segundo Service (2000), anualmente são realizadas aproximadamente 450000 enxertos ósseos nos Estados Unidos principalmente em casos de fraturas com perda tecidual.

Na odontologia, inúmeras são as situações onde a função dental é prejudicada por perdas ósseas, como na doença periodontal, ou até mesmo inviabilizam a reabilitação bucal, como em casos de pacientes edentados totais que necessitam de reabilitação com implantes osteointegrados, porém não apresentam quantidade ou qualidade óssea favoráveis para a instalação dos mesmos. Boyne, em 1971, foi o pioneiro no estudo de enxertos ósseos com fins protéticos, o que possibilitou alguns anos depois a instalação de implantes osseointegrados.

É importante distinguir enxertos de implantes. O enxerto ou transplante é um tecido ou órgão vivo, por conter células do doador, o que leva a acreditar que sobreviva na região receptora. Já o implante, ao contrário, é um material sem células viáveis (Bauer & Muschler, 2000).

Os biomateriais utilizados com o objetivo de restabelecer ou aumentar os tecidos biológicos devem apresentar propriedades físicas, químicas, biomecânicas e biológicas apropriadas para serem utilizados em pacientes, após serem caracterizados em testes *in vitro* e *in vivo*. Tais materiais devem prover sítios de ancoragem celular, apresentar estabilidade mecânica,

proporcionar uma interface para a resposta a mudanças fisiológicas e biológicas e remodelar a matriz extracelular, objetivando a integração com o tecido nativo adjacente (Ge et al., 2004). Deseja-se com a utilização de um material ideal, estimulação da função das células osteoprogenitoras e a expressão do fenótipo osteoblástico (Ohtsuki, 2009). Estes biomateriais ganharam aceitação e são utilizados em aplicações médico-odontológicas para regeneração, substituição ou aumento de tecido ósseo. Na odontologia, sua utilização visa a regeneração óssea em preenchimento de defeitos periodontais, aumento de rebordo alveolar, implantes imediatos pós exodontia, reconstrução maxilofacial, preenchimento de alvéolos pós exodontia e fenestração ou deiscência associados à instalação de implantes orais (Indovina & Block, 2002).

Em 1988, o Instituto Nacional de Saúde Americano (The National Institute of Health Consensus Development Conference on Dental Implants) classificou os materiais para implante ósseo de acordo com sua origem em três grandes famílias: autógeno, alógeno e aloplástico. Na atualidade outra categoria vem sendo abundantemente empregada, o implante xenogênico (Bunyaratavej & Wang, 2001; Ciani et al., 2006; Herculani et al., 2000; Oliveira et al., 1999, Sicca et al., 2000, Zambuzzi et al., 2006).

O osso autógeno é obtido a partir de áreas doadoras do próprio indivíduo. O implante alógeno já é obtido de indivíduos de espécie semelhante ao receptor; e os implantes aloplásticos são os sintéticos, podendo ser de natureza metálica, cerâmica ou polimérica. Os implantes xenogênicos são obtidos de indivíduos de espécies diferentes do receptor, sendo o mais comumente utilizado de origem bovina (Carvalho et al., 2004).

O material autógeno tem sido preferido pelos profissionais devido as suas excelentes propriedades osteogênica, osteocondutora e osteoindutora, porém apresentam limitações quanto ao seu uso no que diz respeito à morbidade do sítio doador, quantidade e qualidade do osso doador, problemas de absorção durante a regeneração, problemas estruturais e anatômicos e prolongamento do tempo cirúrgico (Carvalho et al., 2004, Ducheyne & Qiu, 1999; Silva et al., 2005; Su-Gwan et al., 2001). É conhecido

que o processo de remodelamento que o enxerto autógeno sofre, gera resultados imprevisíveis normalmente associados a uma intensa absorção periférica (Araújo et al., 2002). Tal absorção pode estar associada à ausência de células osteoprogenitoras viáveis após o transplante, por apresentar uma menor quantidade de osso cortical, visto que este osso tem uma elevada concentração de proteínas de osso morfogenético (Misch, 2006) e pela limitada revascularização do enxerto, oriundas do osso receptor (Muramatsu & Bishop, 2002).

Os biomateriais podem também ser classificados de acordo com algumas de suas propriedades, sendo divididos em: osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores.

Os osteogênicos são os materiais orgânicos com capacidade de estimular diretamente os osteoblastos a formar osso; os osteoindutores, por sua vez, são materiais capazes de induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em pré-osteoblasto, e posteriormente osteoblastos, aumentando assim o crescimento ósseo ou, até mesmo, formando osso ectópico, e os osteocondutores (geralmente inorgânicos, materiais desproteinizados) favorecem a migração, proliferação e maturação das células progenitoras, além de conduzirem a aposição do novo osso em sua superfície a partir de tecido ósseo preexistente nas bordas da lesão (Urist, 1965; Cypher, 1996; Granjeiro, 2005).

Tais substitutos ósseos podem sofrer modificações no seu processamento, interferindo assim nas características do material, com relação a osteoindução, osteocondução, e estes são focos de interesse da bioengenharia.

Outra classificação pode ser utilizada em função das características físico-químicas resultantes do processamento dos biomateriais, sendo divididos em orgânicos e inorgânicos. O osso bovino sofre um processo de desmineralização em condições controladas de pH e temperatura, para a remoção dos componentes inorgânicos e celulares, deixando como resíduo predominantemente colágeno tipo I e, em algumas vezes, resíduos de fatores de crescimento. O osso passa por um processo de desproteínização por meio

de processos termo-químicos, os quais removem a porção orgânica, restando fundamentalmente hidroxiapatita (HA), obtendo assim um material inorgânico. Tanto os biomateriais orgânicos como os inorgânicos podem ser encontrados em blocos ou particulados em diferentes granulações (macro ou micro partículas) (Carvalho et al., 2004).

Nas últimas três décadas, inúmeros biomateriais foram desenvolvidos, buscando-se derivados inorgânicos para serem utilizados como preenchedores e substitutos para ossos, por serem materiais biocompatíveis, bioativos e com capacidade osteocondutora em relação ao tecido hospedeiro (De Groot, 1980; Granjeiro et al., 1992; Bonachella et al., 1992; Burstein et al., 1997; Dorozhkin, 2010,). Além de fornecer uma estrutura de suporte para a osteocondução, proverão também um alto conteúdo de cálcio e fósforo, que são primordiais para a neoformação óssea (Sciadini et al., 1997).

A hidroxiapatita apresenta estrutura similar entre as espécies (Le Geros, 1991), fato este que foi comprovado em inúmeros estudos quanto a biocompatibilidade da matriz inorgânica bovina como material para enxerto ósseo (Masters, 1988; Oliveira et al., 1999).

O Bio-Oss® (Osteohealth Co.) é um material proveniente de osso bovino inorgânico, e com larga utilização no mercado. Tal material é uma matriz óssea mineral obtida após a remoção de componentes orgânicos do osso bovino medular. Por ter semelhança estrutural é física e quimicamente comparável à matriz mineral do osso humano.

Hislop et al. (1993) observaram diferentes resultados na utilização do Bio-Oss® em reconstruções ósseas humanas, com melhores resultados em pacientes submetidos à cirurgia ortognática, e os piores em pacientes com necessidade de aumento de rebordo alveolar. Já em pacientes com defeitos hipoplásicos (sindrômicos) e em pacientes que necessitavam de correção pós-trauma, obtiveram resultados medianos.

As propriedades do material poderiam ser melhoradas acrescentando-se alguns fragmentos de osso autógeno. Entretanto, diversos estudos demonstraram as possíveis variações de utilização para o osso inorgânico

bovino (Bio-Oss), e que são obtidos resultados satisfatórios quando são bem indicados.

Os materiais aloplásticos são produzidos com grande controle na composição e propriedades, sendo otimizados para aplicações específicas. As cerâmicas bioativas são importantes materiais de implantes ósseos sintéticos, como a hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico (TCP) e biovidros cerâmicos (BG) (Ducheyne & Qiu, 1999; Misch, 2006). De acordo com as propriedades (absorvíveis ou não, densos ou porosos, cristalinos ou amorfos), tais biomateriais podem modificar o resultado clínico final de sua aplicação (Conz et al., 2005, Misch, 2006).

Quanto à cristalinidade, as hidroxiapatitas altamente cristalinas apresentam maior resistência às alterações e absorções em longo prazo, enquanto que aquelas com menor cristalinidade são mais suscetíveis à decomposição, sendo assim absorvidas mais rapidamente (Aoki, 1994).

O tamanho de partículas dos materiais implantados é outro fator que influencia diretamente no sucesso da reparação óssea (Sicca et al., 2000). Sugere-se que partículas com tamanhos em escala nanométricas e cristalina de materiais de fosfato de cálcio podem favorecer a promoção de adesão de osteoblastos (Balasundaram et al., 2006). Observou-se também que partículas com dimensões maiores permaneceram mais tempo no local implantado sem ser absorvida (Misch, 2006). Em materiais particulados encontra-se uma melhor formação óssea numa região pós-exodontia quando comparado com um material sólido (Indovina & Block, 2002).

Outra característica de extrema importância da hidroxiapatita é a porosidade, que está relacionado, quando os poros estão presentes, com o aumento da área de superfície, proporcionando assim um maior contato do material com os tecidos e células (Aoki, 1994). A rede de interconexão de poros é favorável para a circulação dos fluidos teciduais e sanguíneos, os quais transportam nutrientes e íons minerais essenciais para o processo funcional e biológico. Quando os poros apresentam pequenas dimensões e em quantidade diminuída irão dificultar a circulação dos fluidos através dos

grânulos, o que conseqüentemente pode restringir o crescimento tecidual e formação óssea, reduzindo a bioperformance dos grânulos (Liu, 1996).

2.3 –PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs)

2.3.1 – *História e desenvolvimento das Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs)*

2.3.1.1 – Formação e reabsorção óssea

O início da formação do tecido ósseo humano se dá durante o desenvolvimento embrionário, já o crescimento e o desenvolvimento ósseo seguem até a idade adulta. Ao longo da embriogênese, a formação óssea ocorre através de dois processos, que envolvem a transformação de um tecido mesenquimal, previamente formado, em tecido ósseo, podendo ser uma diferenciação direta de células mesenquimais em osteoblastos, ossificação intramembranosa, dando origem aos ossos chatos (ossos do crânio) (Opperman, 2000). Ou ainda uma substituição de um molde cartilaginoso por osso, ossificação endocondral, originando a maioria dos ossos do corpo (fêmur, úmero, tibia) (Ornitz & Marie, 2002).

Ao longo da ossificação intramembranosa (Figura 1), ocorre uma proliferação das células mesenquimais da crista neural, que posteriormente condensam-se em nódulos compactos, e algumas delas se desenvolvem em capilares, enquanto outras se transformam em osteoblastos. Estes últimos, secretam uma matriz composta de proteoglicanas e colágeno, a qual se calcifica pela ligação de sais de cálcio. Em geral, os osteoblastos são separados da região de calcificação por uma camada de matriz óssea secretada por eles, podendo ocorrer o aprisionamento nesta camada calcificada, sendo chamado de osteócito. Com o desenvolvimento da calcificação, espículas ósseas são formadas para fora da região inicial da ossificação. Esta zona de espículas calcificadas é envolta por uma densa camada de células mesenquimais, que formam a membrana que reveste o osso, o perióstio. As células da superfície interna do perióstio também se tornam osteoblastos, que depositam matriz osteóide paralelamente às espículas existentes, resultando, assim, na formação de diversas camadas de osso. As proteínas morfogenéticas ósseas (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs) e o fator de transcrição Runx2 participam neste tipo de ossificação. Particularmente, BMP2, BMP4 e BMP7 induzem, diretamente, a

diferenciação osteoblástica de células mesenquimais. Tem sido demonstrado que estas proteínas ativam a expressão de Runx2, e que seu mRNA se encontra nas condensações de células mesenquimais, as quais formam osso (Ducy et al., 1997).

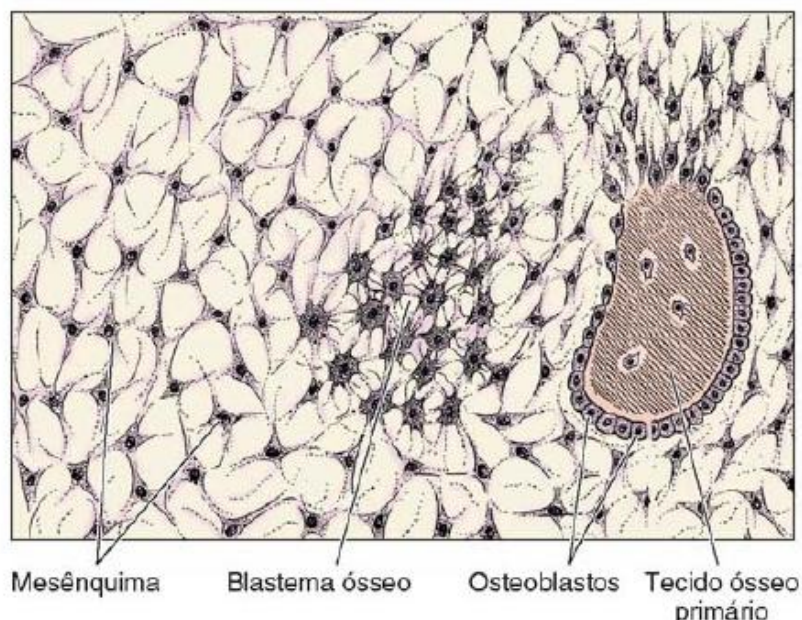


Figura 1: Início da ossificação intramembranosa. Células do mesênquima se tornam arredondadas e formam um blastema no qual, por diferenciação, originam-se os osteoblastos que produzem tecido ósseo primário. (*Livro: Histologia Básica; Junqueira e Carneiro, 2004*).

Durante a ossificação endocondral (Figura 2) há a formação de cartilagem a partir de agregados de células mesenquimais, que posteriormente são substituídas por osso. Tal ossificação é dividida em cinco fases. Primeiro ocorre a diferenciação das células mesenquimais em condrócitos, com liberação de fatores parácrinos que induzem a expressão dos fatores de transcrição Pax1 e Scleraxis por parte das células mesenquimais (Cserjesi et al., 1995; Susic et al., 1997). Durante a segunda fase, as células se condensam em nódulos, detectando-se a expressão do gene Sox9 nas condensações cartilagosas. Na terceira fase, há uma proliferação acelerada dos condrócitos, formando um modelo para o osso, e durante sua divisão, secretam matriz celular de cartilagem. Na quarta fase, tais condrócitos param a proliferação e aumentam seu volume celular,

tornando-se condrócitos hipertróficos. Assim, estas células alteram a composição da matriz que secretam, permitindo sua mineralização. Na última fase, o cartilagem é invadida por vasos sanguíneos, ocorrendo a apoptose dos condrócitos hipertróficos (Rajpurohit et al., 1999). Nos ossos longos, este tipo de ossificação começa no centro do osso e se estende para as extremidades. As áreas cartilaginosas nas extremidades destes ossos são denominadas de placas de crescimento epifisárias, as quais contêm três regiões: uma com condrócitos em proliferação, outra com condrócitos maduros e outra com condrócitos hipertróficos (Chen et al., 1995).

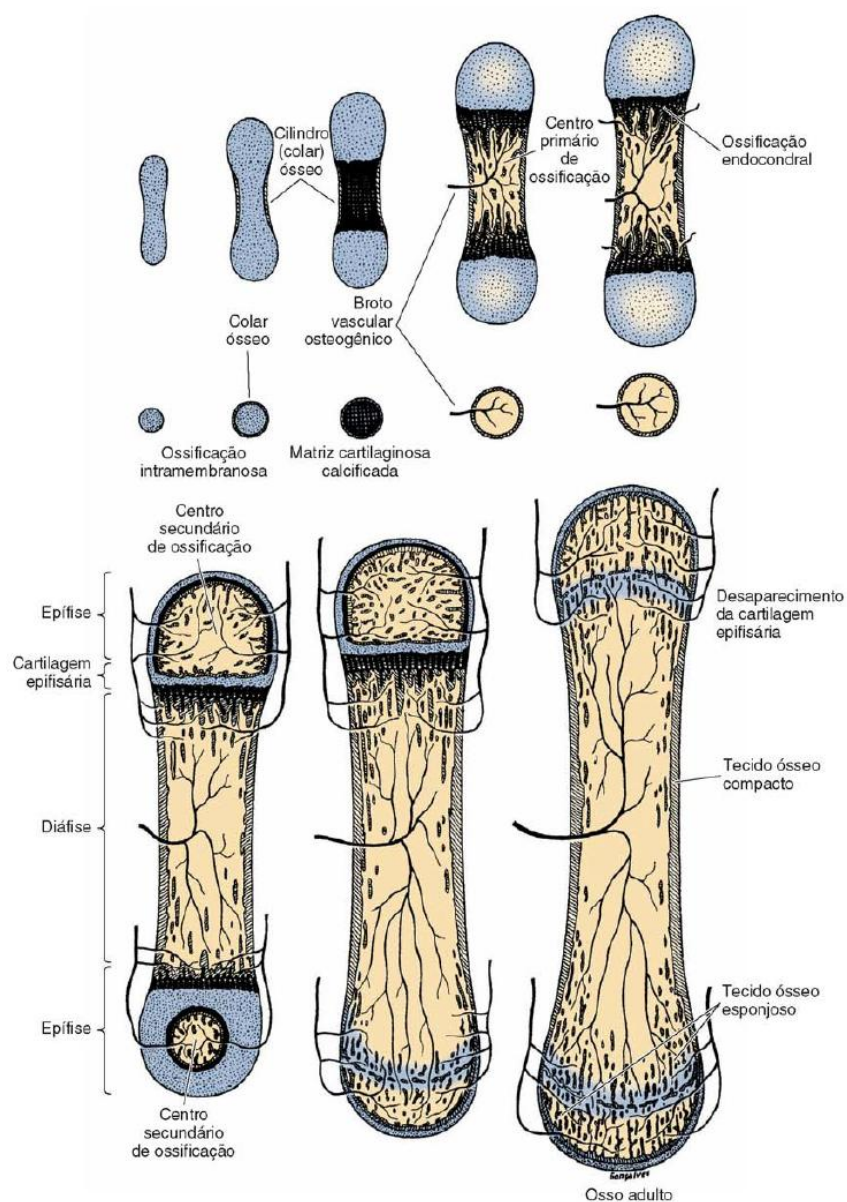


Figura 2: Formação de um osso longo a partir de um modelo cartilaginoso.

Cartilagem hialina, pontilhado; cartilagem calcificada, negro; tecido ósseo, traços oblíquos. As cinco figuras da fileira horizontal do centro representam cortes transversais da parte media das figuras da fileira superior. Notar a formação do cilindro (ou colar) ósseo na parte media do modelo de cartilagem hialina, onde se inicia o processo de ossificação. O desenho mostra que a fusão da diáfise com as epífises, que determina a parada do crescimento do osso, ocorre em momentos diferentes, no mesmo osso. (*Livro: Histologia Básica; Junqueira & Carneiro, 2004*).

Por ser um sistema dinâmico, o tecido ósseo, mesmo no indivíduo adulto, apresenta-se ativo metabolicamente e a manutenção da matriz se dá pelo balanço entre as atividades de síntese e de reabsorção óssea, as quais refletem, respectivamente, as atividades antagonistas de osteoblastos e osteoclastos (Hadjidakis & Androulakis, 2006). Este processo é determinado pela carga genética individual, sendo dependente de regulação endócrina, bioquímica e ambiental. A remodelação óssea ocorre em quatro etapas distintas, ocorrendo, em primeiro lugar, a ativação dos pré-osteoclastos, que se diferenciam em osteoclastos maduros (etapa de ativação) e secretam prótons, acidificando a lacuna de reabsorção, o que causa a desmineralização do osso e expõe a matriz orgânica à ação de metaloproteinases (MMPs). Quando a cavidade atinge certa profundidade, a reabsorção cessa (inversão) e ocorre o recrutamento dos pré-osteoblastos para a cavidade óssea recém formada. Sob a ação de hormônios e fatores de crescimento, estes pré-osteoblastos se diferenciam em osteoblastos, que formam novo osso na cavidade. Desta forma, o osso é continuamente absorvido e formado, a fim de manter constante o volume ósseo e a homeostase de cálcio nos vertebrados (Teitelbaum, 2000). Apesar de ter uma grande capacidade regenerativa, em alguns casos, a resposta do organismo é insuficiente para a reparação completa de uma lesão, como em lesões extensas, infecções (originadas de procedimentos incorretos, cistos ou doença periodontal), tumores e defeitos congênitos. Devido a esses fatores, inúmeros trabalhos têm procurado alternativas para auxiliar e/ou estimular a regeneração óssea, desenvolvendo, assim, diversos materiais

osteosubstitutos e técnicas alternativas de tratamento (Rose & Oreffo, 2002; Gamradt & Lieberman, 2004).

O campo da Engenharia de Tecidos surgiu como consequência da combinação dos princípios de Engenharia, Química e Ciências Biológicas para o desenvolvimento de substitutos naturais que permitissem restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos (Nerem, 1992; Langer & Vacanti, 1993). Tal área da engenharia utiliza células isoladas para substituir funções específicas, substâncias que induzem a proliferação de células e tecidos (fatores de crescimento), ambas combinadas a matrizes, que atuam como suportes (carreadores) para células ou proteínas. Inúmeros trabalhos têm descrito o potencial da Engenharia de Tecidos aplicados na reparação óssea. Para o sucesso desta reparação, é fundamental a utilização de um arcabouço osteocondutor, para adesão e funcionamento das células osteoprogenitoras, bem como o uso de fatores de crescimento que irão atuar na osteoindução (Rose & Oreffo, 2002). Tais fatores são citocinas (proteínas extracelulares ou peptídeos) responsáveis pela sinalização celular.

Os fatores de crescimento apresentam potenciais aplicações clínicas podendo ser utilizados na formação e reparo ósseo, e em outros tecidos conjuntivos, podem ser agrupados de acordo com suas atividades biológicas, onde incluem-se as proteínas da superfamília “transforming growth factor- β (TGF- β)”, os fatores de crescimento semelhantes à insulina (“insulin-like growth factors”, IGFs), fator de crescimento derivado de plaquetas (“platelet-derived growth factor”, PDGF), fatores de crescimento fibroblásticos (“fibroblast growth factors”, FGFs) e o fator de crescimento epidermal (“epidermal growth factor”, EGF) (Long, 2001; Lieberman et al., 2002). A origem e as principais funções destas proteínas estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1: Origem e principais funções de fatores de crescimento relacionados ao reparo e formação óssea.

| Citocina | Símbolo | Fonte | Funções |
|--|----------------|--|---|
| Fator transformador de crescimento beta | TGF β | Matriz extracelular de cartilagem e osso; plaquetas. | Inicia diferenciação de células mesenquimais pluripotenciais. Produz proliferação de condro e osteoblastos; regula síntese de colágeno e proteoglicanas. |
| Proteínas morfogenéticas ósseas | BMPs | Matriz extracelular de osso; osteoblastos; osteoprogenitores | Inicia formação óssea pela diferenciação de células mesenquimais pluripotenciais em condro e osteoblastos; inicia diferenciação de osteoprogenitores em osteoblastos; influencia diversos aspectos durante "patterning" no esqueleto e desenvolvimento. |
| Fator de crescimento semelhante à insulina | IGFs | Condrócitos, osteoblastos, matriz extracelular óssea. | Induzem proliferação e diferenciação de osteoprogenitores. |
| Fator de crescimento derivado de plaquetas | PDGF | Plaquetas, células endoteliais, monócitos. | Estimula a proliferação de osteoblastos e condrócitos; atua como mitógeno em osteoblastos e células mesenquimais; é um fator quimiotático para macrófagos. |
| Fator de crescimento fibroblástico | FGFs | Osteoblastos, condrócitos, macrófagos, células mesenquimais. | Estimulam crescimento de osteoblastos, condrócitos e células mesenquimais; estimulam diferenciação de células pluripotentes; participam em angiogênese. |
| Fator de crescimento epidermal | EGF | Células epiteliais e fibroblastos. | Induz o desenvolvimento de células endoteliais; estimula angiogênese. |

O conhecimento da atuação destes fatores de crescimento é de extrema importância para abrir caminhos para sua utilização no tratamento de diversas doenças relacionadas à reparação tecidual, fraturas, entre outros. Por exemplo, no reparo ósseo em fraturas, tem sido proposto que este processo reflete o fenômeno de ossificação endocondral que acontece durante a embriogênese, sendo isto confirmado por diversas evidências, que dirigem esforços para o estudo e utilização destas proteínas no reparo ósseo (Linkhart et al., 1996; Le et al., 2001). Dentre as proteínas citadas na Tabela 1, principalmente as BMPs, têm um importante potencial biotecnológico e terapêutico, relacionado principalmente, ao reparo ósseo e dental.

O tecido ósseo endocondral e intramembranoso apresentam síntese de BMPs. No entanto, cerca de 60% do mRNA total no osso intramembranoso codifica BMP-2, 5, 6 e 7, enquanto a codificação da BMP-3, 4, 8 e 9, somam menos de 10% do total. Estes dados destacam o papel crescente do BMP-2 e 7 (proteína osteogênica-1, OP-1), estando diretamente empenhados em regular a proliferação, diferenciação e apoptose das células ósseas (Wei et al. 2008), além disso aumentam a atividade da fosfatase alcalina *in vitro*, observadas em células pré-osteoblásticas da calvária de rato (MC3T3-E1) (Yamaguchi et al., 2000).

A seqüência de aminoácidos da OP-1 apresenta aproximadamente 60% de similaridade com BMP-2 e, durante as fases iniciais; a OP-1 mostra uma resposta condrogênica intensa e estimula, então, a resposta osteoblástica. As investigações foram conduzidas para verificar os efeitos biológicos da OP-1, principalmente em relação à osteogênese, e tem sido demonstrado que estimula a proliferação celular, síntese de colágeno e diferenciação dos osteoblastos. Estudos em animais mostraram que esta proteína é capaz de induzir a ossificação endocondral em defeitos no segmento osteoperiosteal (Sampath et al., 1993).

2.3.1.2 – Primeiras Descrições sobre as Proteínas Ósseas Morfogenéticas

Na década de 60, vários pesquisadores investigaram o mecanismo de calcificação em tecidos extra ósseos. Urist e cols. em seus experimentos visando testar sua teoria da calcificação, observou que a matriz óssea desmineralizada que implantava em sítios subcutâneos e intramusculares de ratos e coelhos resultaram na formação de nova cartilagem e osso, elucidando assim o funcionamento de fatores protéicos, que deu base para estudos de isolamento das BMPs, ampliando seus conhecimentos. Tais glicoproteínas ósseas apresentam baixo peso molecular e se mostraram empenhadas na formação óssea ectópica (Urist et al., 1976). Neste cenário, a matriz óssea passou a ser o material de escolha para o isolamento e purificação de BMPs (Bessho et al., 1991).

Em 1938, Levander realizou experimentos em série conduzidos para o estudo da reparação óssea, relatando inicialmente a implantação de fragmentos ósseos vivos de 1,0 a 1,5 cm de comprimento tanto subcutaneamente quanto intramuscularmente. Tais fragmentos tinham o perióstio removido, e em alguns casos uma camada óssea superficial também era removida. Com a obtenção do osso formado ectopicamente, demonstrou que nem o perióstio e nem as células da superfície ou do interior do enxerto, eram as responsáveis pelo crescimento ósseo. Por ser evidente que o novo osso era formado no tecido mesenquimal circundante ao enxerto, foi proposto que deveria haver algum agente estimulante originado do enxerto, que possivelmente seria uma substância solúvel no tecido linfático. Em experimentos subseqüentes, extratos alcoólicos de osso eram injetados intra-muscularmente, resultando em 22% de sítios com formação cartilaginosa ou óssea. No grupo controle foi realizada injeção alcoólica de similar concentração e volume, não resultando em desenvolvimento de osso e capaz de ativar células mesenquimais a formar tecido ósseo. Este raciocínio seria uma razoável explicação para a formação de osso após trauma muscular, assim como a possibilidade desta substância estar no sangue e causar outras formas de osteogênese ectópica (Levander, 1938)

Em 1945 estudo com implantação de cartilagem e extratos alcoólicos de epífises cartilaginosas de ossos longos de coelhos, constatou que a formação óssea observada era decorrente de um fenômeno de indução originado de uma substância ou de um grupo delas dentro da cartilagem que foi denominada de osteogenina (Lacroix, 1945).

Já em 1949, desafiando a hipótese da existência de uma substância osteogênica específica, descobriu-se que um número de animais desenvolvia osso e cartilagem após a injeção de álcool puro. Posteriores investigações com outras substâncias irritantes revelaram algumas situações interessantes. A quantidade de osso e cartilagem formada era aumentada nos animais que se exercitavam e as maiores quantidades de osso eram formadas em animais jovens comparativamente aos animais mais velhos. Tais evidências não eram suficientes para provar a hipótese sobre essa substância osteogênica, e que infelizmente as investigações anteriores eram realizadas em coelhos, animais que manifestam alta incidência de formação cartilaginosa e de osso ectópico, após vários tipos de experimentos (Heinen et al., 1949).

Mais de 20 tipos de BMPs foram identificadas. BMPs, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 8-B podem ser produzidos por pré-osteoblastos (Van der Horst et al., 2002).

2.3.1.3 – Isolamento das Proteínas Ósseas Morfogenéticas

Apesar de não ter sido Urist o primeiro a especular sobre a existência de uma substância osteoindutora, este foi o responsável pela maior parte do trabalho precoce envolvido no isolamento da proteína óssea morfogenética. Como não sabia o caminho, nem o que procurar, ficou envolvido em pesquisas durante muitos anos, o que resultou em muitas informações com relação a métodos e procedimentos para a obtenção de resultados positivos para a formação óssea, mas pouco em relação sobre o que especificamente induzia esta formação (Urist, 1965).

Baseado em relatos conflitantes de pesquisadores sobre o uso de matriz óssea descalcificada com o objetivo de preencher defeitos ósseos

cirúrgicos, induziu ao pensamento de que para avaliação da capacidade osteoindutora de um implante de osso desmineralizado, tal implante deveria ser enxertado longe do osso ortotópico, subcutaneamente ou intramuscularmente (Van de Putte & Urist, 1966).

Baseado em observações e literatura prévia sobre matriz óssea descalcificada, pode-se observar que implantes de osso descalcificado tanto em ácido cítrico como em EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) geravam resultados negativos, já osso descalcificado em ácido hidrocloreídrico induzia a osteogênese. Quando era descalcificado em ácido nítrico promovia intensa reação inflamatória, rápida desintegração do implante sem sinais de formação óssea. Utilizando baixas concentrações de EDTA a 4°C e pH neutro era produzida uma formação óssea limitada em ratos e coelhos, porém nenhuma formação em porcos (Van de Putte & Urist, 1966).

Melhores resultados positivos foram obtidos quando utilizou-se ácido clorídrico (HCl) diluído (0,6N) a 2°C em um período menor que 3 a 5 dias seguindo da lavagem em 0,15M cloreto de sódio (NaCl) ou álcool a 70%. Algumas modificações neste método de preparo ajudaram na localização de componentes presentes no osso que continham propriedades morfogenéticas.

No final da década de 60, estavam presentes evidências da substância responsável pela indução óssea intimamente relacionada ao colágeno do osso. Entretanto era incerto o funcionamento da propriedade indutora, se estava relacionada às características químicas ou se a estrutura física do colágeno de alguma maneira direcionava o mecanismo de diferenciação das células mesenquimais (Urist, 1977)

2.3.1.4 – Difusão transmembrana

A inativação do substrato indutor era promovida pela pulverização da matriz óssea, supostamente tanto pela desnaturação da estrutura protéica (Urist, 1977) quanto pela alteração da sua geometria (Sampath & Reddi, 1984). Então, foi proposto um experimento para analisar a atividade morfogenética de vários tamanhos de partículas ósseas, onde utilizava-se

preparações de matriz óssea pulverizada em um moedor por congelamento à -199°C com o objetivo de minimizar a possível desnaturação protéica resultante do aquecimento. Câmeras de difusão confeccionadas de membrana de acetilcelulose com $15\mu\text{m}$ de espessura e possuindo poros de $0,45\mu\text{m}$ também eram utilizadas para o propósito de determinar se as características físicas das partículas por si próprias seriam um importante fator, ou se a inatividade observada pelas menores partículas era um fator de rápida difusão e desaparecimento do substrato indutor antes das células capazes de indução chegarem ao local. Câmeras de difusão com espessura variando de uma a cinco membranas eram utilizadas para este experimento. Implantes controle eram colocados do lado de fora das membranas, e nestes, as partículas com tamanho variando entre $400-1000\mu\text{m}$ resultaram na formação de novo osso, enquanto que partículas variando entre $79-149$ e $44-74\mu\text{m}$ não produziam novo osso.

Em câmeras com apenas uma membrana, partículas de $44-74\mu\text{m}$ não produziam novo osso, e em câmeras duplas os sítios de teste produziam osteogênese por meio da membrana. Também demonstrou-se que, com maior tamanho de partícula, $400-1000\mu\text{m}$, a quantidade de novo osso formado no lado externo das membranas diminuía da membrana mais próxima para a membrana mais distante. Portanto, a quantidade de novo osso formado era inversamente proporcional à distância que a propriedade morfogenética óssea deveria percorrer. Tal experimento embasou a evidência de uma propriedade morfogenética de rápida difusão quando previamente não se acreditava em sua existência (Urist & Dowell, 1968). Por meio da retenção desta propriedade de difusão por meio de várias membranas, até as menores partículas que são mais solúveis e teriam sua desintegração mais rápida eram capazes de induzir a formação de novo osso. Um estudo posterior (Syftestad & Urist, 1979) revelou que a pulverização das partículas ósseas em menos de $44\mu\text{m}$ levava à inativação da propriedade morfogenética óssea, muito provavelmente pela formação de radicais livres da absorção de energia e quebra da cadeia molecular, ambas levando à desnaturação protéica. Estes estudos auxiliaram a confirmar que a

propriedade osteoindutora na matriz óssea era o resultado de uma proteína óssea morfogenética não colagênica.

2.3.1.5 – Purificação

O isolamento e a purificação das BMPs tem sido difícil pelo fato da baixa disponibilidade desta no osso quando comparada com outras proteínas não colagênicas e também devido à sua relativa insolubilidade. No início da década de 80, métodos que utilizavam grandes quantidades de osso e um número de passos para separar diferentes frações das proteínas não colagênicas produziu um grupo de componentes com baixo peso molecular que demonstraram capacidade osteoindutora. Estudos preliminares indicaram que o peso molecular da BMP bovina varia entre 12 e 30 kDa com fortes evidências para um BMP com 17 a 18kDa. (Urist & Strates, 1971).

Objetivando determinar quais frações ou subfrações estavam envolvidas na formação óssea, utilizou-se um método de reconstituição (Sampath & Reddi, 1984), onde a proteína a ser testada era reconstituída com matriz óssea colágena desprovida de BMP, e implantada subcutaneamente. Se houvesse formação óssea, era indicativo de uma resposta positiva para a proteína implantada.

Em 1988 ocorreu um dos principais avanços nas pesquisas com BMP, através de SDS-poliacrilamida gel de eletroforese, onde um grupo de proteínas de 30kDa de osso bovino foram identificadas e desenvolvidos clones recombinantes para cada uma. Utilizaram sequências de aminoácidos de 16, 18 e 30kDa para desenvolver sondas para varreduras de bibliotecas de DNA complementar (cDNA) bovino. Tais clones recombinantes obtidos foram então utilizados para a varredura de cDNA humanas correspondentes. Portanto, foram obtidas as BMP-1, BMP-2A e BMP-3 recombinantes humanas e determinadas as características bioquímicas e biológicas, incluindo suas sequências de aminoácidos (Wozney et al., 1988).

2.3.2 – Mecanismo de ação e sinalização

A formação óssea estimulada a partir de implantes de matriz óssea desmineralizada obedece a uma sequência de eventos fundamentais, como: proliferação e migração de células mesenquimais (CMs) ao sítio do implante, diferenciação destas CMs em condroblastos seguida da formação de cartilagem e, finalmente, a substituição do molde cartilaginoso pelo tecido ósseo. Antes deste processo há a deposição de fibronectina plasmática na superfície da matriz óssea desmineralizada implantada, que completa-se após 3 dias em contato com os tecidos e vasos sanguíneos. A deposição de fibronectina, junto a outras proteínas, forma um filme delgado na superfície da matriz óssea, favorecendo a adesão de CMs. Seqüencialmente, a condrogênese é observada após 5 dias, atingindo o seu pico entre 7-8 dias. Após 9 dias observa-se a hipertrofia dos condrócitos e processos iniciais de mineralização, que culminam com o início da osteogênese, com a substituição do molde cartilaginoso. O início da deposição óssea se dá com a diferenciação das CMs em osteoblastos maduros, que são os responsáveis pela deposição da matriz óssea. Além de mecanismos próprios de diferenciação (Zambuzzi et al., 2008; Zambuzzi et al., 2009), a diferenciação de osteoblastos é estimulada por fatores indutores provenientes da vascularização local, a qual ocorre entre 10-11 dias (Pacicca et al., 2003). E por fim, o osso endocondral neoformado sofre remodelação, onde sua nova arquitetura biológica favorece a diferenciação de células hematopoiéticas.

Assim como outros mecanismos de transdução de sinal que traduzem estímulos externos ao núcleo, a sinalização de BMP também envolve receptores específicos, na superfície celular. Tais receptores são proteínas transmembranas que conectam o compartimento extracelular ao compartimento citoplasmático. Neste, os sinais chegam à proteínas específicas responsáveis em conduzir o sinal ao núcleo, onde modulam a atividade de fatores de transcrição. Desta forma, as BMPs interagem com receptores de BMP do tipo II (BMPRII) induzindo a sua ativação. Estando ativado, o BMPRII promove o recrutamento e a fosforilação dos receptores de BMP do tipo IA (BMPRI-IA ou ALK3) ou IB (BMPRI-IB ou ALK6). A interação entre estes receptores induz a fosforilação de mensageiros

intracelulares (Rosenzweig et al., 1995; Kawabata et al., 1995; Miyazono et al., 2010), chamados de R-Smads, os quais dimerizam com Smad4 (também conhecida como mediador comum, ou co-Smad) e são deslocados para o núcleo, onde regulam a expressão de genes específicos.

Por sua vez, Smads são componentes de uma família de mensageiros citoplasmáticos cuja atividade depende diretamente da ativação de receptores na superfície celular (Attisano & Lee-Hoeflich, 2001; Cao & Chen, 2005; Sieber et al., 2009). Os membros da família de moléculas Smad são agrupados em 3 classes: Smads associadas ao receptor (R-Smads), que incluem Smad1, 2, 3, 5 e 8; o mediador comum (co-Smad) Smad-4; e Smads com características antagônicas ou inibitórias (I-Smads), as Smads 6 e 7. Quando ativado pela interação com seu ligante, neste caso uma BMP, o receptor fosforila R-Smads. A R-Smad fosforilada se dissocia do receptor e forma um complexo heterodimérico com o co-Smad (Smad4), permitindo sua translocação para o núcleo (Whitman, 1998). Uma vez no núcleo, Smads podem ativar uma grande variedade de fatores de transcrição, regulando a ativação de genes específicos (Attisano & Lee-Hoeflich, 2001; Cao & Chen, 2005; Sieber et al., 2009).

Ainda no compartimento citoplasmático, sabe-se atualmente que o mecanismo de sinalização gerado pelos receptores de BMP pode interferir em vias clássicas, como aquelas reguladas pela ativação de MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), culminando em respostas específicas, como o controle da proliferação celular (Nohe et al., 2004). De um modo geral, o sistema de transdução de sinais disparados pelo complexo BMP/receptor controla processos de diferenciação celular e apoptose. Enquanto mecanismos que levam à diferenciação utilizam-se da atividade de Smads, os demais que levam a apoptose necessitam de ativação de MAPK.

2.3.3 – *Aplicação clínica*

Inúmeros estudos mostram a aplicação das BMPs em fusão da coluna vertebral, e quase a totalidade dos trabalhos concordam sobre os benefícios da utilização deste fator de crescimento. Sua utilização vem mostrando resultados superiores significativamente em comparação com os

tratamentos-padrão, com relação a necessidade de intervenções secundárias, aceleração no reparo de fraturas e cicatrização de feridas, além de taxas reduzidas de infecção (Carreon et al 2009; Garrison et al. 2007).

Diferentes áreas da Odontologia têm pesquisado a aplicação de BMPs, como a Periodontia (buscando a regeneração do tecido ósseo perdido em função da doença periodontal), a Implantodontia (em casos de aumento do volume ósseo e levantamento do seio maxilar) e a Endodontia (em capeamento pulpar direto e pulpotomias). (Nakashima, 2005).

2.4 –IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS

Os implantes osseointegráveis vêm sendo utilizados em larga escala na odontologia (Albrektsson et al., 2008; Coelho et al., 2009), e com menor frequência em cirurgias ortopédicas (Albrektsson et al., 1998; Carlsson et al., 1986; Carlsson et al., 2006; Sundfeldt et al., 2003; Palmquist et al., 2008). A osseointegração é definida experimentalmente como um contato entre o osso e o implante, visto em cortes histológicos (Albrektsson & Johansson, 2001) e, clinicamente como uma anquilose e estabilidade do implante no osso (Albrektsson & Zarb, 1993).

A osseointegração observada em implantes com superfícies de titânio, foi considerada o resultado de uma resposta do tipo corpo estranho: o trauma cirúrgico decorrente da implantação induz a um forte estresse oxidativo, e resulta no aumento da produção de radicais livres e derivados oxigenados na superfície de titânio, levando assim a um espessamento da camada de superfície de dióxido de titânio (TiO₂). Íons cálcio e fósforo da matriz óssea são então incorporados na camada porosa de TiO₂, tornando a interface osso/implante altamente dinâmica. No entanto, quando há a contaminação ou destruição da camada de TiO₂ ocorre a perda patológica desta osseointegração, denominada de periimplantite (Mouhyi, et al., 2009). Atualmente, o termo osseointegração é usado também para superfícies não-metálicas (Wenz, et al., 2008), embora os mecanismos bioquímicos subjacentes sejam diferentes, pois não ocorre a oxidação do titânio.

Muitos avanços nas pesquisas têm sido direcionados para melhoria da interface osso / implante, objetivando acelerar a reparação óssea e melhorar a ancoragem do implante no osso, que normalmente seguem-se duas abordagens diferentes (Albrektsson & Wennerberg, 2004).

Na primeira estratégia, a interface é melhorada quimicamente mediante a incorporação de fases inorgânicas, tais como o fosfato de cálcio, sobre ou na camada de TiO₂. Esta modificação química inorgânica pode estimular a regeneração óssea e aumentar a interação bioquímica entre proteínas da matriz óssea e a superfície dos materiais (Coelho et al., 2009). Modificação bioquímica da superfície é uma variante desta primeira

estratégia e, especificamente, refere-se à incorporação de moléculas orgânicas, como proteínas, enzimas e peptídeos, para induzir células específicas e respostas do tecido (Puleo & Nanci, 1999; Morra, 2007; Morra et al., 2006; Morra, et al. 2009; Bussy et al., 2008)

Na segunda estratégia, a interface é melhorada fisicamente pela arquitetura da topografia da superfície. Micrometricamente, o raciocínio para tal abordagem é que uma superfície rugosa apresenta uma área mais desenvolvida do que uma superfície lisa e, assim, aumenta a ancoragem óssea e reforça a interação biomecânica do osso com o implante, pelo menos até um determinado nível de rugosidade (Coelho et al., 2009).

A nível nanométrico, a rugosidade aumenta a energia da superfície, melhorando a adsorção de proteínas da matriz, migração de células ósseas e proliferação celular e, finalmente osteointegração (Wennerberg & Albrektsson, 2010).

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas durante os últimos 30 anos com o objetivo de melhorar a osseointegração de um ponto de vista físico ou químico (Coelho et al., 2009). As primeiras superfícies osseointegráveis foram produzidas por usinagem industrial de um implante de titânio em massa, o que levou a superfícies minimamente ásperas com alguns microsulcos residuais sequenciais. Apesar do sucesso clínico dessas superfícies usinadas, mais processos foram desenvolvidos para melhorar a microtopografia da superfície, usando, por exemplo pulverização com plasma de titânio, ataque ácido ou aspersão de abrasivos. Ataque ácido é muitas vezes realizado com ácido fluorídrico, nítrico ou sulfúrico e suas combinações. Aspersão é realizada por projeção de sílica (jateamento de areia), hidroxiapatita, alumina ou partículas de TiO_2 , e é seguida geralmente por ataque ácido para homogeneizar o microperfil do implante e remover o máximo possível de partículas residuais.

Muitos processos de engenharia podem combinar as modificações químicas e físicas da superfície. Por exemplo, anodização eletroquímica da superfície de titânio (Sul et al., 2006; Sul et al., 2005; Sul et al., 2009), pode promover um espessamento em escala micrométrica e uma impregnação

iônica da camada de TiO₂, considerando que o colapso da superfície do material resulta em estruturas porosas e associando à micro- ou nano topografia (Sul et al., 2001; Sul et al., 2002).

Revestimento de superfície com diferentes tipos de cerâmica é outra tendência nesta área. Pulverização de plasma de hidroxiapatita (PSHA) com revestimento de 20-50 µm de espessura podem ser aplicadas às superfícies micro-rugosas, fortalecendo as propriedades osteocondutoras; entretanto, a resistência mecânica da interface entre o revestimento e o titânio é considerada um ponto fraco, e as falhas de implantes têm sido relatadas.

A fim de melhorar revestimento PSHA, uma série de técnicas têm sido desenvolvidos com o objetivo de produzir um revestimento com filme fino (<5 µm), tais como deposição de sol-gel, técnicas de revestimento por aspersão (Yang et al., 2005), ou feixe de íons de deposição assistida (IBAD) (Granato et al., 2009; Coelho & Lemons, 2009). Alternativas à continuação dos revestimentos finos também foram desenvolvidos, tais como a incorporação de nanopartículas de fosfato de cálcio usando discreta deposição cristalina (DCD) para uma superfície de duplo ataque ácido (Mendes et al., 2009) ou baixa impregnação de fosfato de cálcio dentro do camada de óxido (Bucci-Sabattini et al., 2009).

Existem atualmente inúmeros processos de preparação de superfície, como: temperatura; pressão; tempo; tipo e tamanho das partículas de aspersão; tipo e concentração dos ataques ácidos. Tais processos podem ainda ser modificados, o que aumenta ainda mais o número de tipos de superfícies.

A caracterização precisa das superfícies é um pré-requisito para que seja possível comparar e avaliar os resultados que foram obtidos.

Cada superfície do implante pode ser definida pelo constituição do seu material de fabricação. Esta última pode ser alterada por modificações químicas (ou bioquímicas) que introduzem íons específicos, cristais ou moléculas, sobre ou dentro da constituição do material.

Atualmente os principais materiais de implantes osseointegráveis no mercado são: predominantemente titânio, e com menor utilização a zircônia.

O titânio que é usado na maioria dos casos são os de grau 4 ou 5, por apresentarem excelentes propriedades químicas e mecânicas. O titânio Grau 4 (G4Ti), também chamado comercialmente de titânio puro, tem menos de 1% de impurezas, como ferro e oxigênio. O titânio Grau 5 (G5Ti), também chamado Ti-6Al-4V, é uma liga de titânio, que incorpora 6% alumínio e 4% de vanádio, apresentando assim, maior resistência mecânica. Os implantes de zircônia são feitos de zircônia policristalina de ítrio- estabilizado tetragonal (Y-TZP) ou zircônia de ítrio- parcialmente estabilizado (PSZ-Y) (Wenz et al., 2008).

Uma questão importante é definir qual a espessura da parte periférica do material do implante que pode ser considerada como a superfície. Em termos físicos, a superfície poderia ser definida como a camada externa, aquela que apresenta poucos nanômetros de espessura. Em muitos implantes de titânio, a antiga espessura da camada de TiO₂ varia de 10 a 100 nm (Jarmar et al., 2008) e poderia aumentar para micrómetros em implantes anodizados (Sul et al., 2001; Sul et al., 2008).

São necessários diferentes ferramentas para que seja possível realizar a análise de superfícies de implantes. Diferentes técnicas de espectroscopia são usadas, para que seja definida com precisão a composição atômica da superfície, a qual apresenta uma topografia irregular em escala micro e nanométrica.

As modificações das superfícies podem ser por: impregnação, revestimento ou poluição.

As modificações químicas ou bioquímicas no material da superfície podem ser superficiais ou integradas, que podem ainda ser subdivididas nas modificações de categorias modificação de impregnação (residual, alta ou baixa) e revestimento (contínuas, descontínuas ou aspergido).

Impregnação aqui implica que a química ou bioquímica adjuvante é totalmente integrada dentro do material. Por exemplo, cristais de fosfato de

cálcio dentro da camada de TiO_2 da superfície podem ser considerados como impregnados (Bucci-Sabattini et al., 2009). Diferente graus de impregnação podem ser distinguidos. O limite máximo de 1% e 5% de modificação química do material para impregnação, respectivamente, residual e baixa, parecem relevantes (Bucci-Sabattini et al., 2009; Kang et al., 2009; Morra et al., 2003).

Revestimento, por outro lado, significa que o produto químico ou bioquímico adjuvante permanece apenas superficialmente associado com o material (mesmo que a impregnação parcial possa ser inevitável) (Coelho et al., 2009).

A questão final é como classificar a contaminação ou poluição das superfícies. Esta forma de poluição pode ter um impacto significativo sobre os resultados biológicos. Se o CO_2 do ambiente e contaminações de nitrogênio do ar são inevitáveis e normais para um nível razoável (Kang et al., 2009; Morra et al., 2003), o tratamento de superfície inadequada e manipulação do implante (durante o acondicionamento, por exemplo) pode levar à contaminação orgânica grave (indicado por uma espessa camada de carbono sobre o implante) ou de alta poluição inorgânica com íons inesperados (magnésio, enxofre, silício, cálcio, zinco) (Morra et al., 2003). Este tipo de poluição de superfície é tipicamente homogênea em todo o implante, e não deve ser confundido com modificações químicas ou bioquímica controladas.

A maioria dos materiais usados em implantes (TiO_2 , zircônia, HA), todos mostram uma arquitetura cristalina específica. O TiO_2 , por exemplo, pode ser encontrada na fase amorfa ou em três principais formas cristalinas sobre uma superfície de implante, com proporções muito diferentes (Jarmar et al., 2008).

Quanto a sua topografia, a superfície é caracterizada geralmente por um sucessão de picos e vales, que podem ser quantificados usando perfis 2D ou parâmetros 3D, embora a avaliação 3D seja mais exaustiva do que a 2D (Albrektsson & Wennerberg, 2004; Wennerberg & Albrektsson, 2000). Superfícies micro e nanométricas devem ser caracterizadas separadamente.

Na microescala, a topografia de uma superfície de implante pode aumentar a superfície de contato entre o osso e o implante e, conseqüentemente, a conexão biomecânica entre o osso e implante (Albrektsson & Wennerberg, 2004). No entanto a biologia óssea baseia-se num *turn-over* anabolismo/catabolismo, com uma taxa de formação óssea e remodelação óssea superiores a 50 μm (Bobyn et al., 1980).

As microestruturas são definidas pelo seu número de dimensões. Superfícies microrugosas apresentam uma dimensão micrométrica (alturas dos picos). Micropadrões têm duas dimensões micrométricas (dimensões dos padrões repetitivos), como os microporos criados por anodização. Micropartículas têm três dimensões micrométricas.

A rugosidade dos implantes osseointegrados é classificada geralmente em quatro categorias com base na amplitude do desvio da altura média (S_a) de uma superfície (Albrektsson & Wennerberg, 2004; Wennerberg & Albrektsson, 2010). A categoria de rugosidade deve ser sempre complementada com os parâmetros que descrevem a natureza exata das microestruturas (rugosa, padronizada, particulada), bem como a densidade espacial (achatado, robusto).

Na escala nanométrica, a topografia da superfície texturizada aumenta a energia de superfície. Uma alta energia de superfície aumenta a sua molhabilidade em sangue, e na propagação e ligação de fibrina e proteínas da matriz. Deste modo, favorece a adesão celular e cicatrização de tecidos, especialmente imediatamente após implantação, que é um ponto importante no processo de osseointegração. Nanotopografia pode também diretamente influenciar a proliferação e diferenciação celular, pois tem sido sugerido que estruturas nanométricas podem modular o comportamento celular (Mendonça et al., 2008; Mendonça et al., 2009; Vetrone et al., 2009; Dalby et al., 2006).

Por definição, todas as superfícies mostram nanotopografia, mas não todas apresentam nanoestruturas significativas. A nanoestrutura é um objeto de tamanho intermediário entre estruturas moleculares e micrométricas, e muitas vezes definida entre 1 e 100 nm. Quando descreve-se nanoestruturas é necessário diferenciar entre o número de dimensões em nanoescala.

Superfícies nanotexturizadas têm uma dimensão de escala nanométrica (altura de pico), que também pode aparecer em formas repetitivas e homogêneas, como nanorugosidade (Bucci-Sabattini et al., 2009). Padrões nanométricos têm duas dimensões em nanoescala, isto é, as dimensões de padrão repetitivo são nanométricas. Exemplos destes são os nanotubos produzidos por anodização (Bjursten et al., 2009; Kodama et al., 2009), ou superfícies nanopadronizadas produzidas quimicamente (Vetrone et al., 2009; de Oliveira et al., 2007). As nanopartículas têm três dimensões em nanoescala, ou seja, cada uma das suas três dimensões espaciais são na faixa de nanômetros.

Repetitividade e homogeneidade são parâmetros fundamentais para definir a nanoestrutura de uma superfície de implante, mas estes são difíceis de quantificar e são considerados parâmetros morfológicos qualitativos.

Pelo menos três métodos analíticos são comumente utilizados para avaliar a topografia de uma superfície do implante. Microscopia de força atômica (AFM) pode, em teoria, resolver a topografia da superfície com resolução atômica próxima, mas é menos útil para as superfícies osseointegráveis que são microrugosas, pois sua microtopografia interfere significativamente com a sonda de varredura vertical, que torna incerta qualquer avaliação quantitativa (Wennerberg & Albrektsson, 2000). No entanto, a AFM nos permite diferenciar superfícies com diferentes graus de nanotextura e pode ser valiosa se utilizada como um método qualitativo (Marin et al., 2008).

Interferometria de luz (IFM) é uma ferramenta eficiente para a avaliação dos parâmetros quantitativos da microtopografia de grandes áreas, mas requer um método de avaliação normalizado e técnicas de filtragem (Wennerberg & Albrektsson, 2000). As microrugosidades da superfície podem interferir com os feixes de luz e lançam uma sombra sobre sua nanotopografia, semelhante ao AFM, assim, o uso de IFM para uma avaliação da nanotopografia requer uma abordagem original de filtragem (Wennerberg & Albrektsson, 2010; Melin Svanborg et al., 2009). Além disso, as superfícies de implantes osseointegráveis comercialmente disponíveis

muitas vezes não são homogêneas na totalidade, e portanto, foi sugerido o uso de medições repetitivas com IFM para definir os valores globais médios relacionados com a microtopografia de um implante dentário (Wennerberg & Albrektsson, 2000).

MEV (microscopia eletrônica de varredura) é o padrão-ouro para a caracterização da morfologia ao nível micrométrico (MEV com fonte de tungstênio). Emissão de campo (FE)-MEV é necessária para aumentar a análise de resolução e de observar e caracterizar a nanotopografia e nanoestruturas associadas (Bucci-Sabattini et al., 2009; Melin Svanborg, et al., 2009). Acoplado a um detector de EDX auxiliar, esta técnica também permite identificar de forma eficiente a composição elementar das estruturas observadas. Acoplado com um software de metrologia, esta ferramenta permite realizar tanto caracterização da morfologia e da topografia (por exemplo, morfologia quantitativa), tanto micro como nanométrica.

As três técnicas acima são complementares. Durante a caracterização de uma topografia, a questão fundamental é a seleção das ferramentas adequadas e métodos para avaliação padrão de parâmetros qualitativos e quantitativos.

Vários recursos também devem ser considerados no sistema de codificação, tais como a presença de fissuras ou a heterogeneidade da topografia através do implante (Kang et al., 2009). A arquitetura fractal deve também ser avaliada, uma vez que este conceito é particularmente interessante na superfície e ciência dos materiais (Ma et al., 2009). Fractais naturais são padrões repetitivos que são auto-similares através de um intervalo finito de escalas.(Brown et al., 2002). Sua influência e relevância biológica na resposta do tecido é desconhecida, mas as superfícies dos implantes podem revelar este tipo de padrão repetitivo na escala micro, nano e cristalina, durante a morfologia quantitativa.

Apesar da uma extensa literatura na área de superfícies osseointegráveis, a falta de uma abordagem hierárquica e parâmetros padronizados torna difícil avaliar a significância do efeito que as numerosas topografias e modificações químicas desempenham sobre os implantes

(Albrektsson, T. et al., 2008; Coelho, P.G. et al., 2009; Wennerberg & Albrektsson, 2009). Apesar disso, algumas informações básicas podem ser retiradas sobre os principais resultados biológicos das diferentes características de superfície.

Em superfícies de titânio, os efeitos biológicos da superfície química estão relacionadas principalmente à arquitetura da camada de TiO_2 (Sul et al., 2002). Como a osseointegração está diretamente relacionada com o espessamento da camada dinâmica TiO_2 , em implantes com camadas de TiO_2 espessas, tais como implantes anodizado, apresentam uma forte resposta óssea na medida em que aumenta a deposição de matriz óssea mineral sobre superfície do implante. Contudo, modificações químicas também podem induzir fortes respostas ósseas. O objetivo da impregnação ou revestimento com elementos inorgânicos é estimular interligações bioquímicas entre matriz óssea e a camada de TiO_2 , através da precipitação de componentes inorgânicos ou proteínas na superfície e, talvez, através da estimulação direta de células. Impregnação (Bucci-Sabattini et al., 2009) e revestimento com fosfato de cálcio (Mendes et al., 2009) têm sido amplamente investigados e têm demonstrado boa resposta óssea, mas os mecanismos exatos e os níveis ótimos de cálcio e fosfato, e os métodos de incorporação não parecem ser consensuais. Alta impregnação com fósforo (Sul, 2003) ou magnésio (Sul et al., 2005; Sul et al., 2009) também aumenta significativamente a resposta do osso, e baixa impregnação de flúor (Lamolle et al., 2009; Monjo et al., 2008) aparece para estimular a diferenciação de células ósseas através de vias de sinalização celular diretas, no entanto, os mecanismos exatos permanecem obscuros. Por fim, os resultados biológicos da arquitetura cristalina também podem ser altamente significantes (He et al., 2008; Sollazzo et al., 2007).

Assim, parece que há muitas maneiras de melhorar quimicamente a resposta óssea, mas os resultados biológicos exatos de uma modificação individual nem sempre são claros, pois os parâmetros físicos e químicos são freqüentemente inter-relacionados, mas não estão completamente caracterizados (Cassinelli et al., 2003).

Existe um maior consenso no campo que diz respeito à pertinência das modificações físicas, porque presume-se que os resultados biológicos relacionados com a microtopografia de um implante tem sido amplamente investigados para implantes disponíveis comercialmente, apesar da falta de padronização da terminologia, métodos ou parâmetros de análise (Wennerberg & Albrektsson, 2009).

Os efeitos da nanotopografia sobre a resposta biológica é quase totalmente desconhecido para implantes comercialmente disponíveis (Wennerberg & Albrektsson, 2010). Características nanométricas dos implantes dentários mais importantes comercialmente disponíveis têm sido avaliados (Melin Svanborg et al., 2009), e todos os dados obtidos não consideram o potencial impacto dessas nanoestruturas no desempenho dos implantes. Alguns estudos experimentais já demonstraram que a modulação da nanotopografia de uma superfície de implante tem um impacto significativo sobre o comportamento de células ósseas (Mendonça et al., 2009; Vetrone et al., 2009; Dalby et al., 2006).

3 - OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da proteína morfogenética óssea recombinante humana-7 (rhBMP-7) no reparo ósseo. Como modelos experimentais utilizaram-se o defeito em crânio de ratos tratado com xenoenxerto de origem bovina e a osseointegração de implantes de titânio recobertos com filme fino (nanométrico) de hidroxiapatita em fêmures de coelhos.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar no defeito ósseo se a associação da rhBMP-7 ao xenoenxerto foi capaz de induzir uma maior reparação e mais rápida em relação aos animais que receberam apenas o biomaterial ou osso autogeno ou coágulo.

Avaliar se a associação da rhBMP-7 ao implante de titânio atuou na aceleração do processo de osseointegração, em casos de instrumentação padrão e sobreinstrumentação.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – BIOMATERIAIS

4.1.1 – *Xenoenxerto bovino inorgânico*

Ossos longos de bovinos foram processados por meios mecânicos, químicos e térmicos, resultando em grânulos de matriz óssea bovina inorgânica e acelular. A obtenção de hidroxiapatita carbonatada de cristalinidade intermediária à hidroxiapatita sinterizada foi confirmada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Forrier, difração de Raios X, termogravimetria e calorimetria diferencial exploratória. O xenoenxerto foi produzido e fornecido pela empresa SIN (Sistema de Implantes Nacional).

4.1.2 – *Implante de titânio*

A SIN (Sistema de Implante Nacional ®, São Paulo – Brasil) forneceu os implantes de titânio (Ti) de 3,25 x 10.0mm (n = 24) para este estudo, os quais foram utilizados para produção de um revestimento fino (300nm) de hidroxiapatita (Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, CBPF / RJ). Resumidamente, o pó de HA estequiométrica (Ca / P = 1,67) foi sintetizado a partir da adição do gotejamento de nitrato de cálcio e de soluções de fosfato de amônio. Os alvos para pulverização (“sputtering”), com diâmetro de 25 mm, foram preparadas por prensagem uniaxial da HA sob 30MPa, seguido de sinterização a 1100°C. Os implantes de titânio comercial e placas de Ti (1 x 1 cm, preparadas exatamente como os implantes) foram limpos por ultrassom com 10% de ácido fluorídrico e acetona antes da oxidação superficial. Recobrimentos de hidroxiapatita foram produzidos por pulverização catódica em ângulo reto (RAMS – *right-angle magnetron sputtering*) à temperatura ambiente e sem tratamento térmico. O revestimento nanométrico de HA sobre o implante de Ti e as placas de Ti foi produzido com taxa de deposição de 5,2 nm / minuto e RF de 13,56 MHz de frequência. A pressão parcial de Ar e O₂ na câmara de deposição foi de 5 e 1 mTorr, respectivamente. Após a deposição, as amostras foram caracterizadas por DRX (placa de Ti), FTIR e

MEV (implantes dentários). A técnica de difração de raios X foi usada para identificar a composição de fases na fina camada de HA depositada (Figura 3A) (Mello et al 2007;. Hong et al 2010). As amostras de superfície da placa foram caracterizadas por DRX e pela técnica de difração de raios-X de incidência rasante (GIXRD - *grazing-incidence X-ray diffraction*), realizado com a operação de radiação síncrotron para a energia de 9000eV, comprimento de onda de 0,137nm, ângulo teta fixo incidente = 0,5 ° e 1°, dois teta na faixa de 9 a 50 °, a uma taxa de 0,04 ° / ponto / Segundo (Figura 3B e C). Estes métodos, com uma maior densidade de fótons de raios-X, leva a uma melhor resolução de que os obtidos com as máquinas comerciais. As análises de DRX foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Além disso, as bandas vibracionais de HA e, principalmente, a banda OH (Figura 3D) para o revestimento nanométrico de HA foram obtidos por Microscopia de Reflectância Atenuada no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIRM-ATR, Shimadzu IR-Prestígio-21 / AIM-880 operação 700-4000 cm^{-1}). Antes e depois da deposição de HA, a morfologia da superfície de implantes de titânio foi caracterizada por MEV utilizando um Jeol JSM-5800 operando a 20 kV (Figura 4).

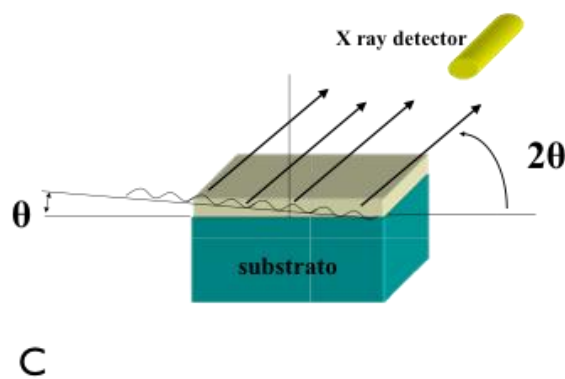
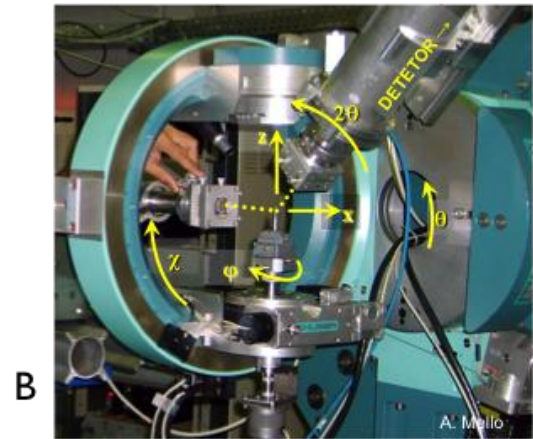
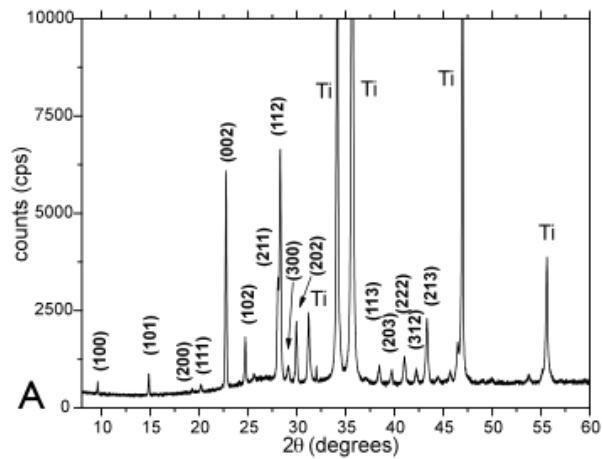


Figura 3: A- Gráfico representando a difração de raios X identificando a composição das fases na fina camada de HA depositada; B – Aparelho para a utilização da técnica de difração de raios-X de incidência rasante (GIXRD); C – Difração de raios-X com radiação de luz Síncrotron em incidência rasante; D - Gráfico representando as bandas vibracionais de HA, através da Microscopia de Reflectância Atenuada no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIRM-ATR)

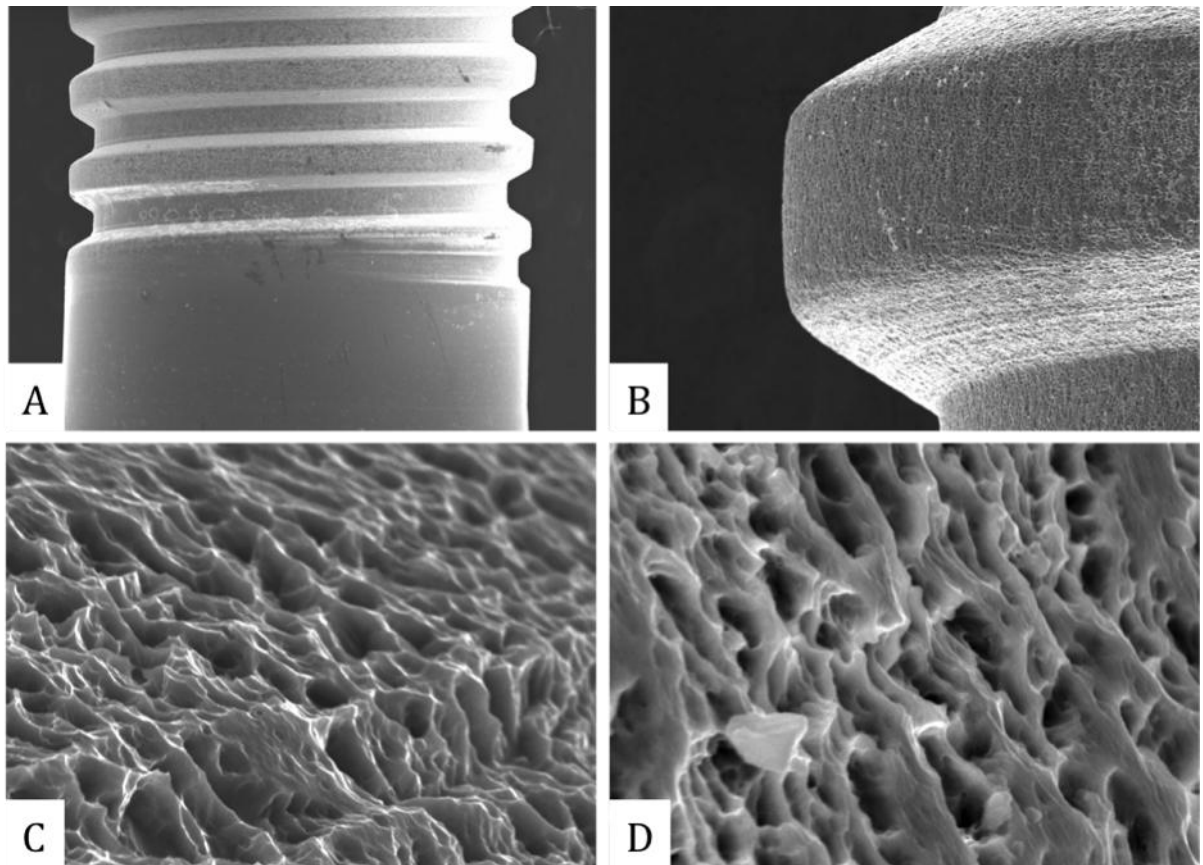


Figura 4: Caracterização das superfícies dos implantes através do MEV. A e C – Implante sem tratamento de superfície; B e D – Implante após o recobrimento com filme fino de hidroxiapatita (300nm).

4.1.3 – *rhBMP-7*

A *rhBMP-7* foi fornecida pelo Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química – Universidade de São Paulo (USP). Para o experimento ortotópico, foi utilizada *rhBMP-7* purificada na concentração de 200 µg/ml, separada em microtubo. E para o experimento de instalação de implantes de titânio esta proteína encontrava-se na concentração de 43mg/ml, sendo diluída à concentração de 2,0mg/ml, com volume final de 1,0 ml, e armazenada em eppendorf estéril.

4.2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 – *Experimento 1 – Enxerto ortotópico*

Foram utilizados Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos adultos com 3 meses (n= 20), sendo divididos aleatoriamente em 2 grupos, os quais foram eutanasiados aos 7 e 42 dias após os procedimentos cirúrgicos, totalizando 5 animais em cada grupo/período. Este experimento segue as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), sob o n° 0005/07.

4.2.1.1 – Procedimentos de anestesia e cirurgia

Em todos os animais a mesma seqüência operatória foi seguida, sendo que, inicialmente, os animais foram anestesiados com uma mistura 1:1 de Dopalen e Anasedan (Agribands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil), sendo aplicado 0,5 mL por Kg de peso, via intramuscular. Após ficarem imóveis, os animais foram colocados sobre um campo operatório esterilizado e imobilizados, para início do procedimento cirúrgico.

Na área frontoparietal dos animais foi realizada a tricotomia, expondo a pele, seguida da anti-sepsia com gaze embebida em álcool iodado. Utilizando bisturi com lâmina n° 15C (Becton-Dickson, São Paulo) realizou-se um incisão semilunar, em seguida com auxílio de um descolador mucoperiosteal de Molt e cinzel de Ohsenbein n°1, os retalhos foram lateralmente levantados expondo amplamente a cortical óssea da região (Figura 5A). A

seguir, com a trefina cirúrgica de 5mm de diâmetro (Figura 5 B) e irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, foi realizada em cada região parietal uma perfuração com remoção das tábuas corticais externa e interna, totalizando duas perfurações por crânio, onde foi colocado o material de preenchimento (Figura 5C e D).

Para o controle negativo (coágulo), foi reservado o defeito no parietal esquerdo. Já no controle positivo (osso autógeno) foi obtido a partir do osso retirado com a trefina e foi reservado o defeito no parietal direito. A distribuição dos grupos experimentais nos defeitos do crânio está exemplificada na Tabela 2.

A rhBMP-7 que estava aliqüotada na concentração desejada no eppendorf, recebeu a adição do xenoenxerto, o qual adsorveu totalmente o fator de crescimento, sendo posteriormente inserido no defeito cirúrgico.

No grupo experimental, houve preenchimento do defeito parietal esquerdo com o biomaterial, estando embebido com o sangue do leito receptor; e o defeito direito recebeu o xenoenxerto com a adição da rhBMP-7 (Figura 5E).

Tabela 2: Distribuição dos grupos experimentais nas perfurações do crânio.

| Grupos | Perfuração Parietal Esquerda | Perfuração Parietal Direita |
|-------------------|-------------------------------------|---|
| I - Controle | A - Coágulo (Controle negativo) | B - Osso autógeno (Controle positivo) |
| II - Experimental | A - Xenoenxerto (0,1 g) | B - Xenoenxerto (0,1 g) + rhBMP-7 (200 µg/ml) |

Após colocação do enxerto, o retalho foi reposicionado e suturado com fio de mononylon nº 5-0 (Ethicon, Johnson & Johnson) (Figura 5F).

Durante todo o período experimental os animais receberam dieta normal "ad libitum" composta de ração e água, sendo mantidos em gaiolas com forragem de maravalha, a qual era substituída regularmente.

Decorridos os períodos experimentais particulares a cada grupo de animais, estes foram novamente anestesiados, e mortos por dose excessiva de anestésico, seguindo as normas do COBEA. Foi realizada nova tricotomia na região frontoparietal, assim como a anti-sepsia da pele, e dessecação do crânio, o qual foi fixado em formol 10% tamponado.

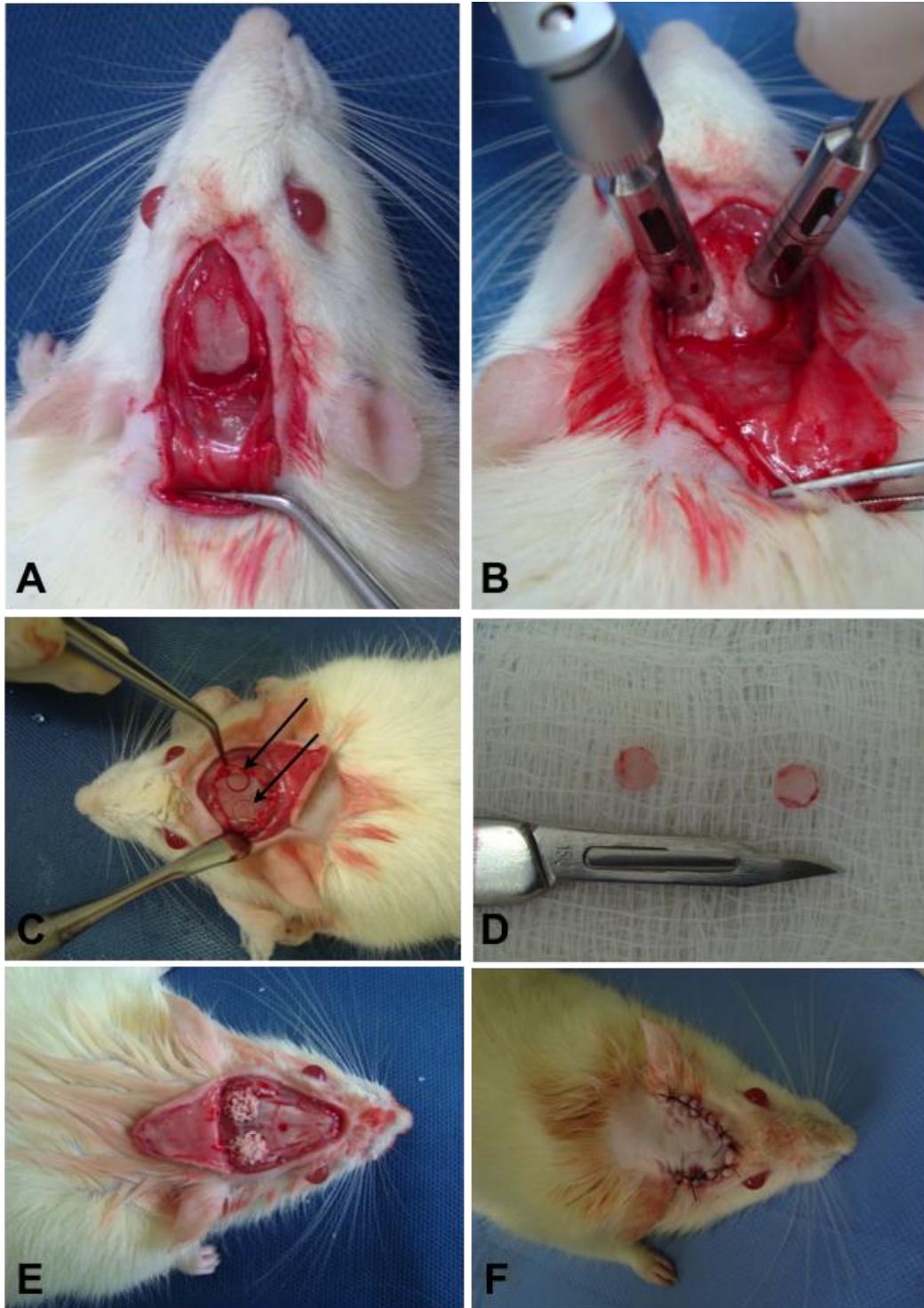


Figura 5: A – Descolamento mucoperiosteal; B – Espaços parietais onde serão realizadas as perfurações com as brocas trefinas de 5mm; C - Delimitação dos espaços com a trefina de 5mm, antes da remoção das corticais; D – Remoção das corticais; E – Grupo experimental, com colocação dos biomateriais; F – Após sutura.

4.2.1.2 – Obtenção das amostras e processamento laboratorial

Após a fixação das peças (n=5) por um período de 48 horas, estas foram lavadas em água corrente por 5 horas; desmineralizadas em solução desmineralizadora (Alkimia); os grupos separados, cortando os parietais com o auxílio de um lâmina de bisturi nº15; e diafanizadas para inclusão em parafina, com cortes de 5 µm de espessura e coloração com hematoxilina-eosina (HE) segundo a técnica convencional.

4.2.2 – Experimento 2 – Instalação de implantes

Foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia Branca (n=6), de ambos os sexos, pesando entre 2.5000 e 3.500g, provenientes do Laboratório de Produção de Coelhos (LPC) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense localizada na Fazenda Escola, em Cachoeiras de Macacu. Tal experimento seguiu as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), sob o nº 0005/07.

Durante todo o período experimental os animais foram mantidos no LPC, em gaiolas tradicionais e individuais em malha galvanizada medindo 0,90x0,60x0,45m, suspensas a 0,80m do chão. Após 30 dias de vida os coelhos foram desmamados e transferidos do Setor Maternidade para o Setor de Recria e mantidos durante todo o experimento em gaiola individual.

A dieta padrão após o desmame foi constituída por 150 gramas/dia de ração balanceada na forma peletizada (Coelhil R, da Socil), fornecida diariamente obedecendo a horários e quantidades regulares para evitar a formação e proliferação de fungos por exposição do alimento. Durante todo o experimento a água foi fornecida *ad libitum*, através de bebedouros tipo bico. Os animais foram pesados semanalmente e operados após adquirir o peso entre 2500 e 3500g e em torno de 18 a 20 semanas de idade, que caracteriza a maturidade sexual. Os animais antes e durante o período experimental foram avaliados por um médico veterinário, quanto às patologias comuns a essa espécie como sarnas ou zoonoses.

Os animais foram avaliados no período pós-operatório diariamente quanto à alimentação e comportamento dentro das gaiolas. Uma vez por semana os animais foram pesados e avaliados quanto ao ganho de peso.

4.2.2.1 – Procedimentos de anestesia e cirurgia

Todos os procedimentos realizados nos animais e que poderiam resultar em ansiedade e/ou dor foram conduzidos sob anestesia. Os animais foram privados de ração seis horas antes do ato operatório, mas não de água, e, no momento da cirurgia, pesados em balança digital de precisão.

Os coelhos foram operados sob anestesia geral e monitorizados através de monitor digital com informações sobre pressão arterial, frequência cardíaca e eletrocardiograma trans-operatório e receberam também hidratação venosa em veia periférica. Após a completa monitorização, os animais receberam como medicação pré-anestésica 20mg/kg de Quetamina IM (Francotar® – Virbac) e 1 mg/kg de Xilazina (Sedazine® – Fort Dodge), por via intramuscular trinta minutos antes do procedimento para diminuir o tônus vagal. Após observar ausência de reflexos à dor, os animais receberam como medicação anestésica geral a inalação de Isoflurano 1% através de máscara inalatória (Isoflurane® - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda) para manutenção durante todo o tempo cirúrgico e 0,3 mg/Kg de Lidocaína (Xylestesin®- Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda) e 0,1 mg/Kg de Morfina por via raqui-medular. Durante todo o procedimento cirúrgico, os animais também foram monitorizados quanto à saturação de O₂.

Após a realização da tricotomia (Figura 6A), degermação e antissepsia nas patas dos coelhos, os mesmos foram instalados na mesa operatória em decúbito dorsal, com rotação lateral cervical para manter livres as vias aéreas superiores. Foi realizada a colocação dos campos cirúrgicos esterilizados, isolando-se as regiões operatórias.

Uma incisão de aproximadamente 40 mm de comprimento (Figura 6B) foi realizada sobre cada fêmur através do uso de cabo de bisturi n°3 (Bard Parker®) e lâmina n°15 C (Becton-Dickinson®), com descolamento muscular

(Figura 6C) para instalação de 2 implantes (3,25x10,0mm), sendo a perfuração proximal sem BMP, e a perfuração distal com BMP (Figura 6D). No fêmur direito foi realizado uma instrumentação padrão (até a broca 3.0) para a instalação do implante desejado. Já no fêmur esquerdo, foi feita uma sobreinstrumentação (até a broca 4.0), não permitindo um contato justaposto do osso-implante em todo comprimento do defeito cirúrgico. Os implantes que receberam a rhBMP-7 ficaram imersos no microtubo contendo este fator de crescimento (Figura 6E) durante 15 minutos antes da inserção na perfuração.

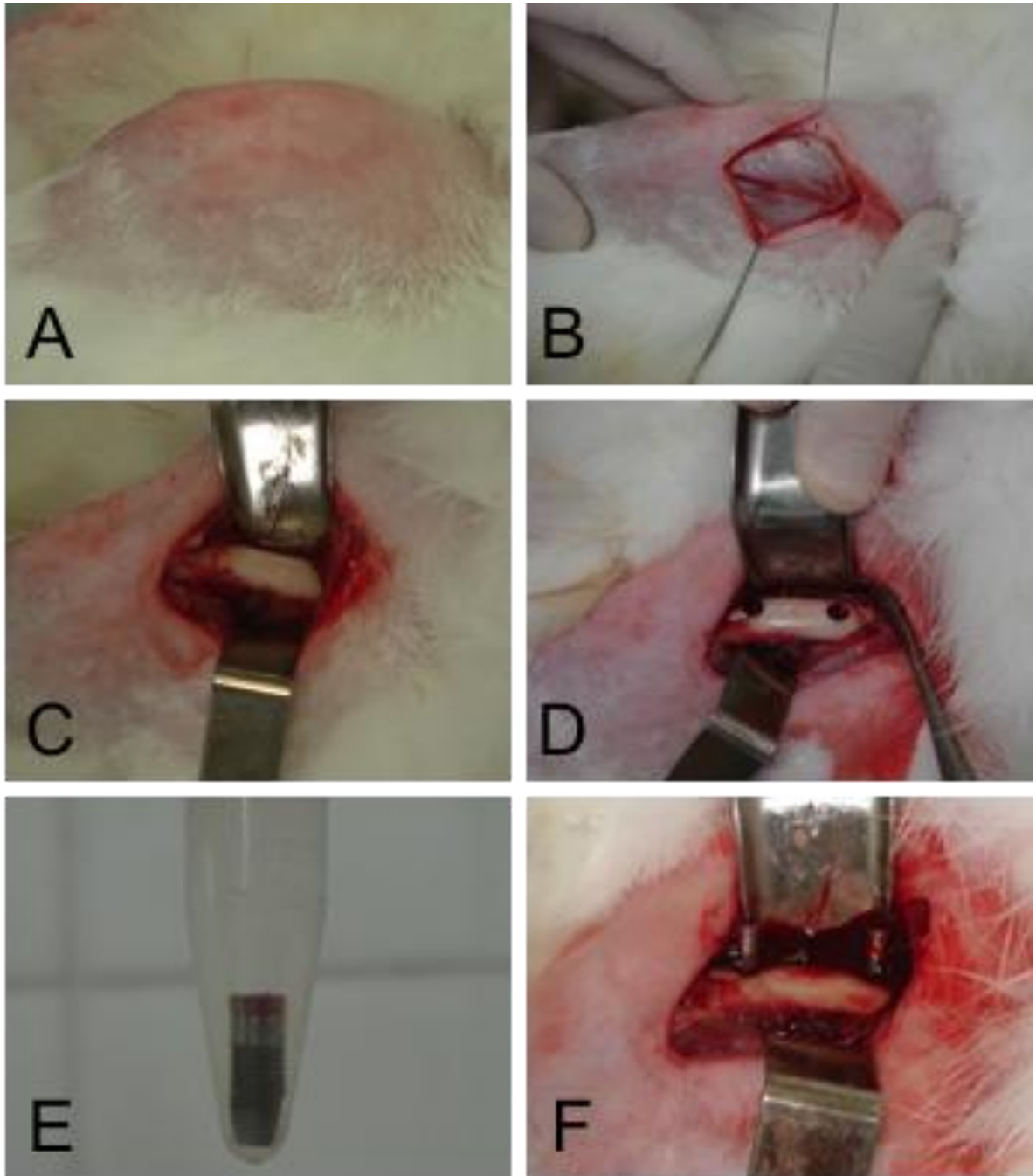


Figura 6: Procedimentos Cirúrgicos. A – Tricotomia; B – Incisão de aproximadamente 40 mm e afastamento da pele; C – Descolamento muscular; D – Perfurações para a instalação dos implantes; E – Implante imerso em rhBMP-7; F – Implantes instalados.

Após a colocação dos implantes (Figura 6F) , o plano muscular e a tela subcutânea foram suturados em plano único com pontos simples e separados com fio Mononylon Ethicon 5.0 (Johnson & Johnson, Brasil). A pele foi suturada com o mesmo fio, sendo os pontos simples e separados. Foi feita nova anti-sepsia para evitar posterior contaminação. Após o procedimento todos os animais receberam antibioticoterapia por meio de injeção intramuscular de 1ml/Kg de Pentabiótico Veterinário pequeno porte (Pentabiótico Reforçado®- Fort Dodge Saçede Animal Ltda) e antiinflamatório Maxicam® (Ourofino pet) 1ml/kg, ambos em dose única.

Para a recuperação anestésica, os coelhos foram devolvidos às suas gaiolas permanecendo envoltos pelos campos operatórios para evitar perda de calor corporal. Foi permitido aos coelhos ração e água à vontade e apoio imediato dos membros operados.

Decorridas 4 semanas, os coelhos foram anestesiados como descrito para os procedimentos operatórios e mortos com injeção intramuscular de pentobarbital sódico (Penta-Hypnol® -Agrovet Market®) na dose de 60mg/Kg de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2.2.2 - Obtenção das amostras e processamento laboratorial

Os blocos ósseos contendo os implantes de titânio foram removidos com 5 mm de margem de segurança de cada lado, através de cortes transversais ao longo eixo das tíbias com discos diamantados montados em mandril (K. G. Sorensen®) para peça reta (Kavo®) acoplado a micro motor elétrico (Driller BLM 600 Plus), sob baixa e intermitente rotação, com irrigação constante de solução salina fisiológica 0,9% para evitar a desidratação dos blocos. Foram obtidos quatro blocos de cada animal, dois provenientes da pata direita e dois da pata esquerda, sendo fixados em álcool 70° por 48 horas, depois submetidos aos procedimentos de inclusão em resina padrão (Figura 7A), do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) da UFF, descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Seqüência de processamento da amostra não desmineralizada

| Soluções | Tempo | Temperatura |
|--------------------------------|--------|-------------|
| Álcool 70% | 2 dias | 16°C |
| Álcool 95% | 2 dias | 16°C |
| Álcool 100% | 2 dias | 16°C |
| Xilol | 1 dia | 16°C |
| 7,5 ml de metil-metacrilato | 2 dias | 16°C |
| 2,5 ml de di-butil-ftalato | | |
| 0,1g de peróxido de benzoíla | 2 dias | 16°C |
| 7,5 ml de metil-metacrilato | | |
| 2,5 ml de di-butil-ftalato | | |
| 0,25 g de peróxido de benzoíla | 7 dias | 39°C |
| 7,5 ml de metil-metacrilato | | |
| 2,5 ml de di-butil-ftalato | | |

Os blocos de resina foram fixados em torno mecânico e serrados com serra de ourives para cortar a resina até o limite do osso e polidos, em presença de água abundante, com lixa de carbetto de silício n° 600, n°800, n°1000 e n°1200. Os blocos com as laterais polidas e lisas foram adaptados no micrótomo Isomet®, para uma secção no longo eixo do implante (Figura 5 B-D) e posterior obtenção de cortes com 200 µm utilizando disco diamantado sob irrigação constante de água.

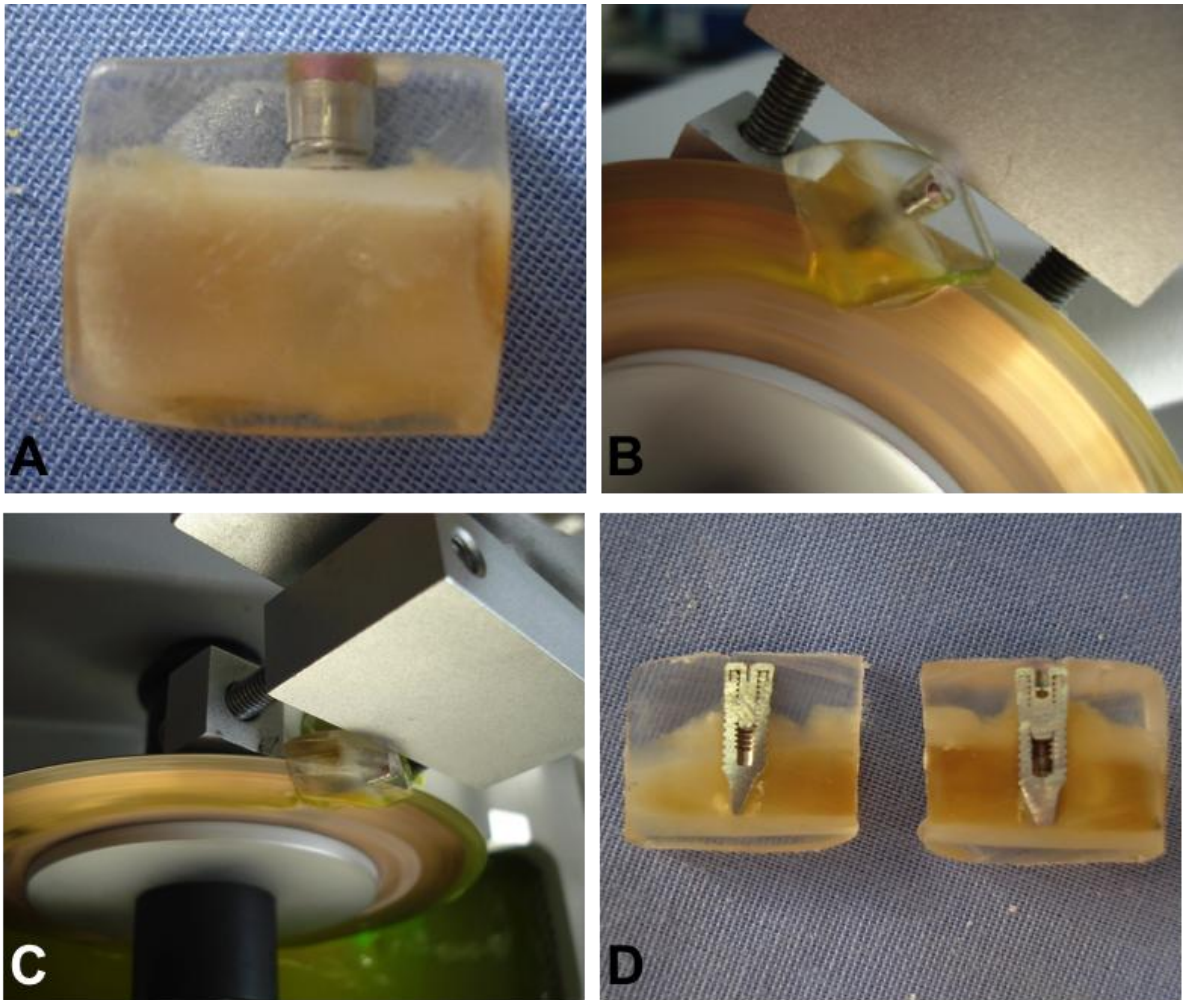


Figura 7: Processamento histológico em resina. A – Bloco incluído em resina; B e C – Bloco de resina sendo seccionado; D – Bloco seccionado no longo eixo do implante.

4.3 – ANÁLISE DOS DADOS

4.3.1 – *Experimento 1 – Reparo ósseo em crânio de rato*

As peças coradas em HE foram analisadas morfometricamente ao microscópio para determinação da densidade de volume por pontos (%) do remanescente de material implantado, tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo. A densidade de volume por unidade de área ocupada pelas estruturas citadas foi determinada usando uma objetiva de 10X. Imagens não sobrepostas que comportem toda a área do defeito foram capturadas por câmera digital (7.0 MPixel) e analisadas no programa ImagePro-Plus com uma grade de composta de 10 linhas paralelas e 100 pontos numa área quadrangular, sendo anotados os números de pontos (P_i) que cairão sobre cada estrutura em particular (i). Tendo esses dados e conhecendo-se previamente a quantidade total de pontos (P) da área examinada (A), calcula-se a densidade de volume (V_{vi}) pela relação $V_{vi} = P_i/P$, que será expressa em porcentagem por unidade de área.

As médias e desvios padrão obtidos foram utilizados para uma interpretação paramétrica (Análise de Variância) utilizando o programa InStat®, definindo diferenças significantes se $p < 0,05$.

4.3.2 – *Experimento 2 – Implantes revestidos com filme fino de HA*

Após os cortes das lâminas, foi realizada análise histomorfométrica através das imagens digitais, sem coloração, que foram capturadas por uma câmera digital de alta resolução (Evolution® MP color; 5.0 mega pixels; Media cybernetics, Silver Spring, EUA), através de um microscópio de luz polarizada (Nikon Eclipse E400, Tóquio, Japão) e lente acroplan com 10x de objetiva.

Então, selecionou-se aleatoriamente uma lâmina de cada grupo para análise. Padronizou-se duas espiras abaixo da região cortical para verificar o crescimento de tecido ósseo advindo da região endosteal (Figura 6) Foi realizada segmentação da imagem através do programa Image-Pro Plus® v.4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA), onde segmentou-se o implante (preto), tecido conjuntivo (vermelho) e osso neoformado (amarelo),

conforme mostrado na Figura 9. Após a segmentação, as áreas evidenciadas foram contadas e transportada para o software Excel 2007 (Microsoft Office®), onde foi obtido um percentual de cada área/imagem.

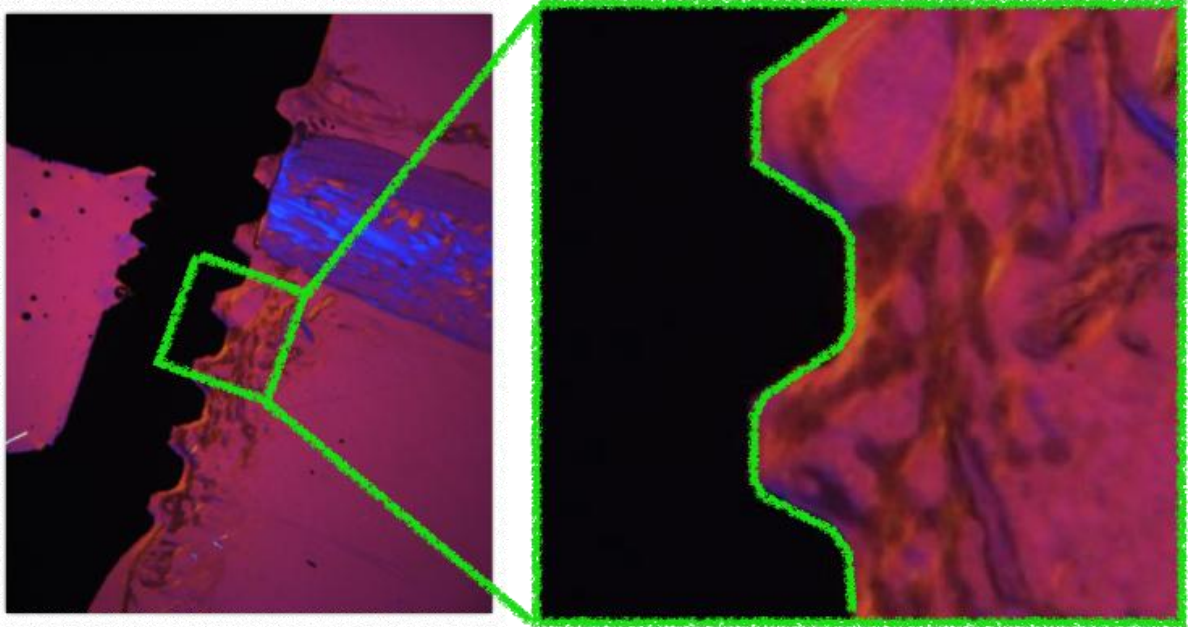


Figura 8: Determinação da área para análise morfométrica. Padronização de duas espiras abaixo da região cortical.

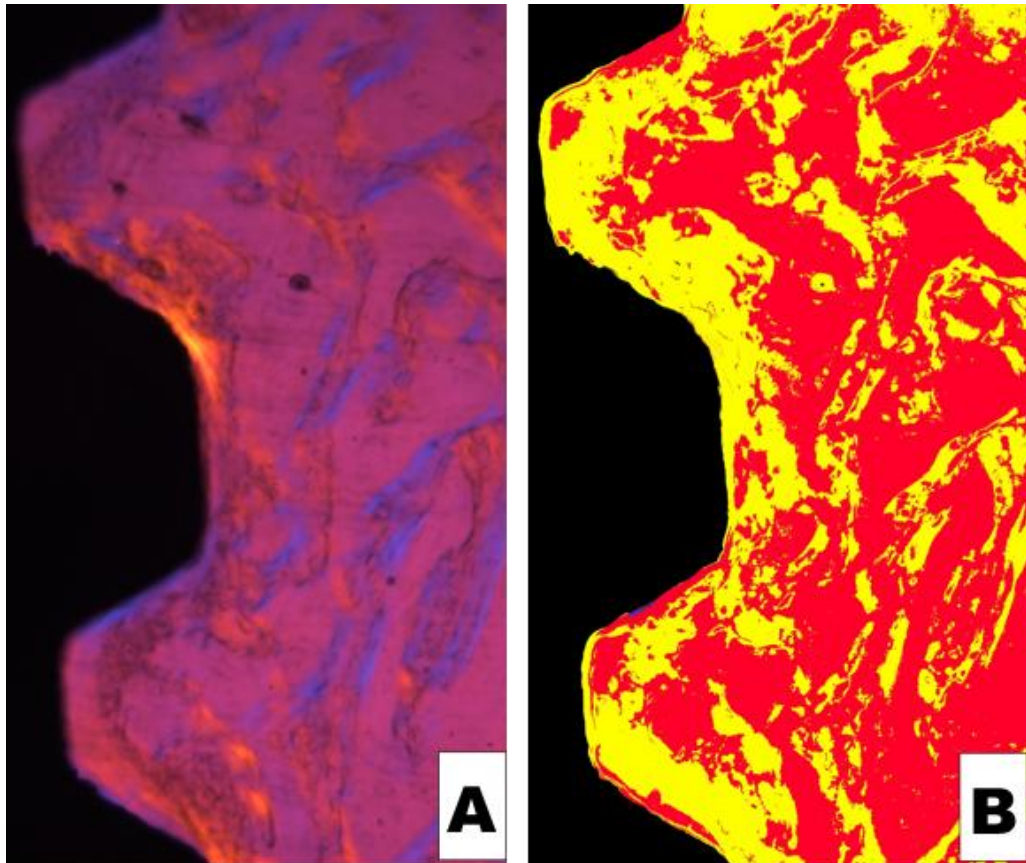


Figura 9. A - Imagem original através de microscopia de luz polarizada; B – Segmentação de imagem realizada pelo Image-Pro Plus®, mostrando implante (preto), tecido conjuntivo (vermelho) e osso neoformado (amarelo).

5 – RESULTADOS

5.1 – EXPERIMENTO 1 – REPARO ÓSSEO EM CRÂNIO DE RATOS

No período de 7 dias, o grupo coágulo apresentou neoformação óssea próxima a margem do defeito ósseo (Figura 10), assim como no grupo autógeno, que notou-se novo osso em íntimo contato com o enxerto e osso nativo (Figura 11). O grupo experimental tratado apenas com xenoenxerto apresentou tecido conjuntivo frouxo envolvendo os grânulos do biomaterial (Figura 12A) e sugestiva ossificação intramembranosa próxima a margem do defeito ósseo (Figura 12B). Já no grupo tratado com xenoenxerto e rhBMP-7, foi observado um rearranjo vascular adjacente ao biomaterial (Figura 13A), sendo rodeado por células inflamatórias, hemácias e fibroblastos (Figura 13B), e quando estava próximo a margem do defeito ósseo, tal biomaterial apresentou uma ossificação intramembranosa mais evidente que no grupo que não recebeu a rhBMP-7 (Figuras 13C e D).

Aos 42 dias, no grupo IA foi possível observar uma neoformação óssea associada a margem do defeito (Figura 14). Já no grupo IB notou-se a presença de novo osso em interposto por enxerto e osso nativo (Figura 15). O grupo IIA, apresentou células gigantes do tipo corpo estranho adjacentes ao grânulo do biomaterial, circundados por tecido conjuntivo frouxo e vasos congestos (Figura 16). Por outro lado, no grupo xenoenxerto associado à rhBMP-7 (IIB), foi possível observar ilhotas de tecido ósseo neoformado em íntimo contato com o biomaterial (Figuras 17).

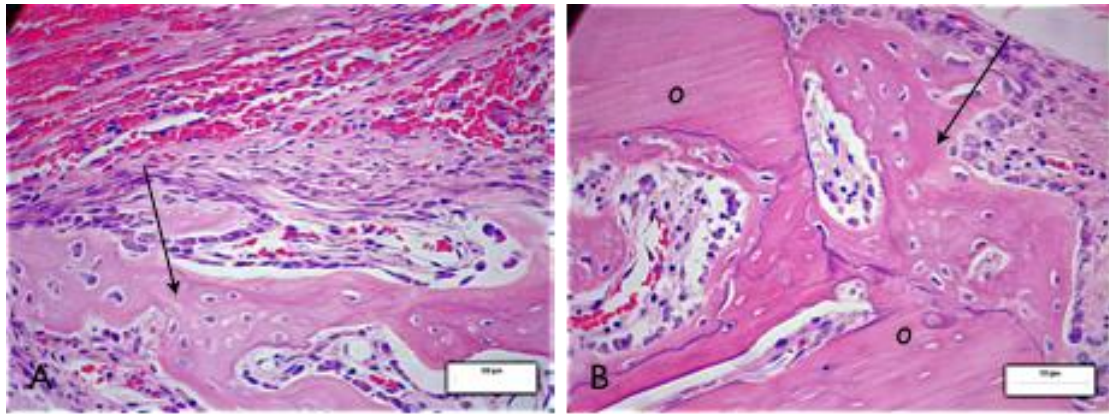


Figura 10: Fotomicrografias do grupo coágulo aos 7 dias. A e B: Neoformação óssea (seta) próximo a margem do defeito ósseo (o). A barra interna = 50 µm; coloração de HE.

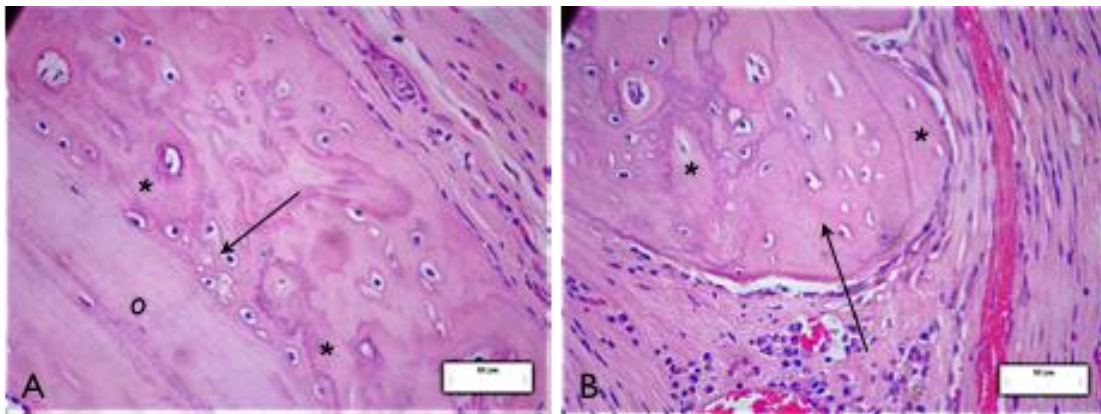


Figura 11: Fotomicrografias do grupo autógeno aos 7 dias. A e B: Osso neoformado (seta) em íntimo contato com o enxerto (*) e osso nativo (o). A barra interna = 50 µm; coloração de HE.

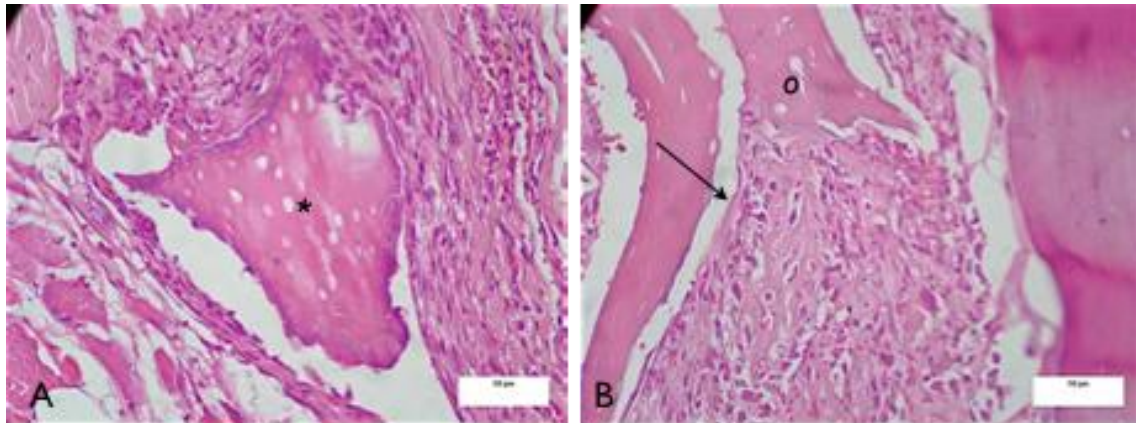


Figura 12: Fotomicrografias do grupo xenoenxerto aos 7 dias. A: grânulo de HA (*) envolto por tecido conjuntivo frouxo. B: sugestiva ossificação intramembranosa (seta) próxima à margem do defeito (o). A barra interna = 50 µm; coloração de HE.

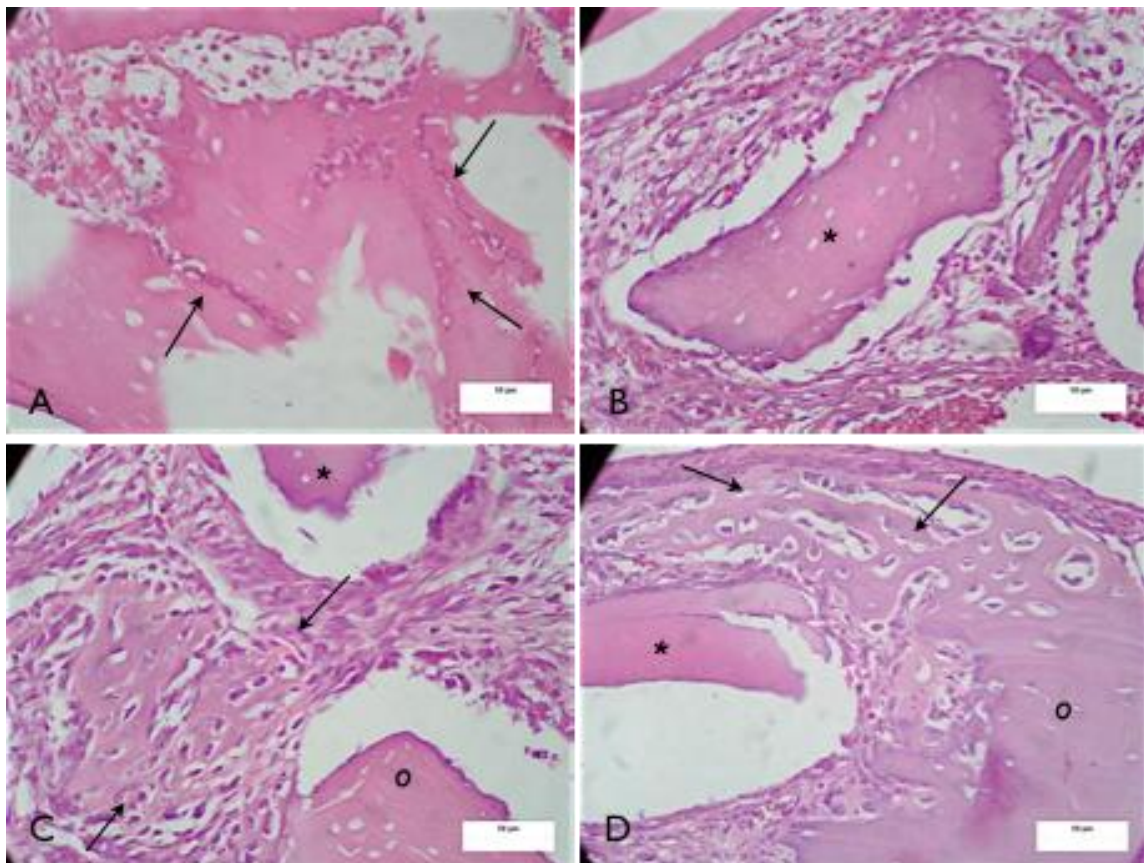


Figura 13: Fotomicrografias do grupo xenoenxerto + rhBMP-7 aos 7 dias. A: rearranjo vascular adjacente às partículas do material (setas). B: partícula do biomaterial (*) circundadas por células inflamatórias, hemácias e fibroblastos.

C e D: grânulo do biomaterial(*) e processo de ossificação intramembranosa (setas) próximo a margem do defeito (o). A barra interna = 50 μm ; coloração de HE.

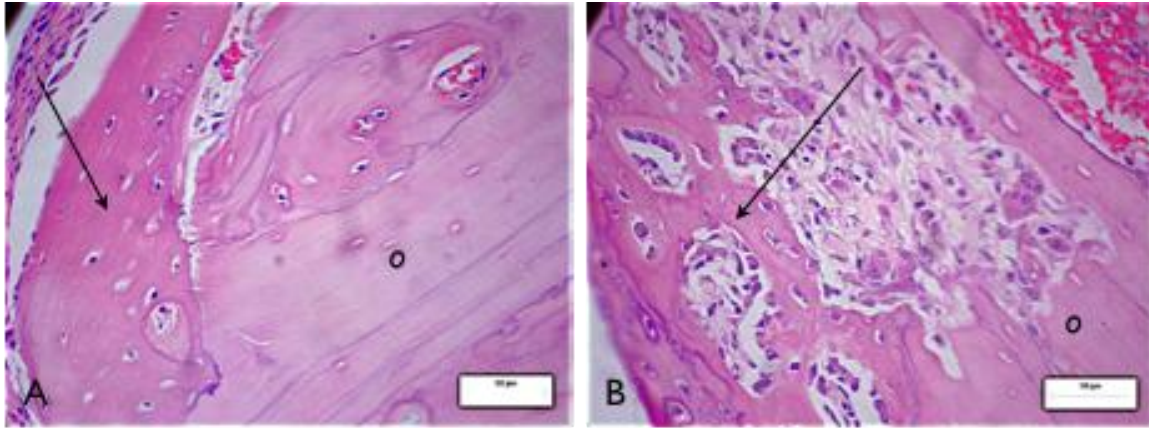


Figura 14: Fotomicrografias do grupo coágulo aos 42 dias. A e B: Osso neoformado (setas) associado a margem do defeito ósseo (o). A barra interna = 50 µm; coloração de HE.

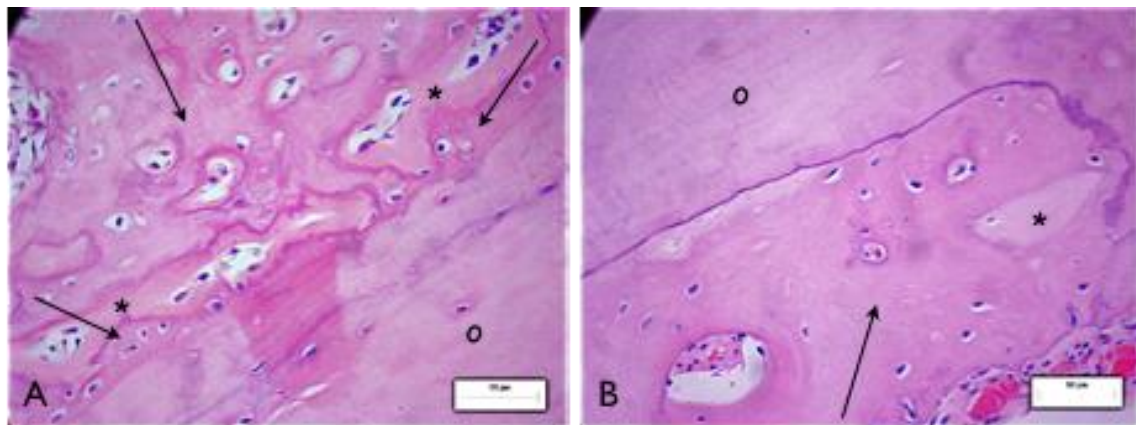


Figura 15: Fotomicrografias do grupo autógeno aos 42 dias. A e B: Neoformação óssea (setas) em contato com o enxerto (*) e osso nativo (o). A barra interna = 50 µm; coloração de HE.

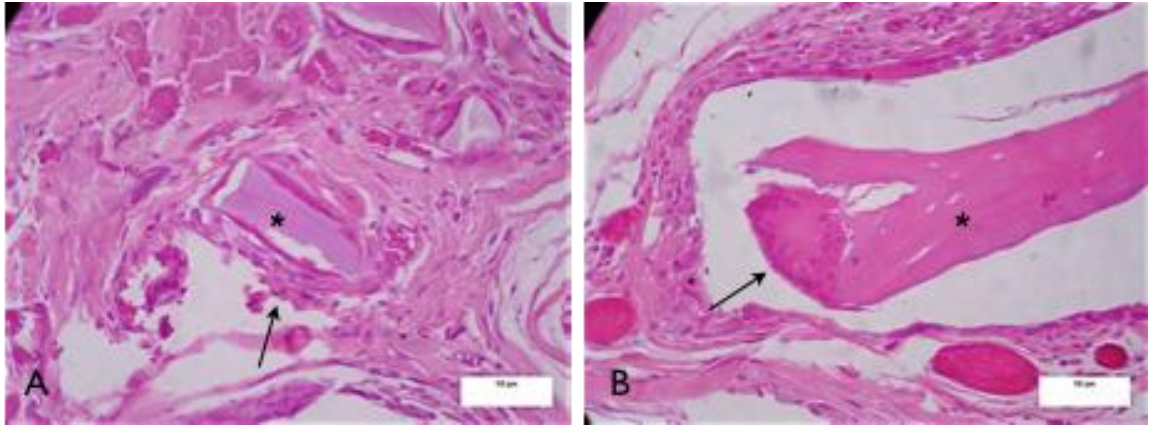


Figura 16: Fotomicrografias do grupo xenoenxerto aos 42 dias. A e B: células gigantes multinucleados tipo corpo estranho (seta) adjacentes ao biomaterial (*). A barra interna = 50 µm; coloração de HE.

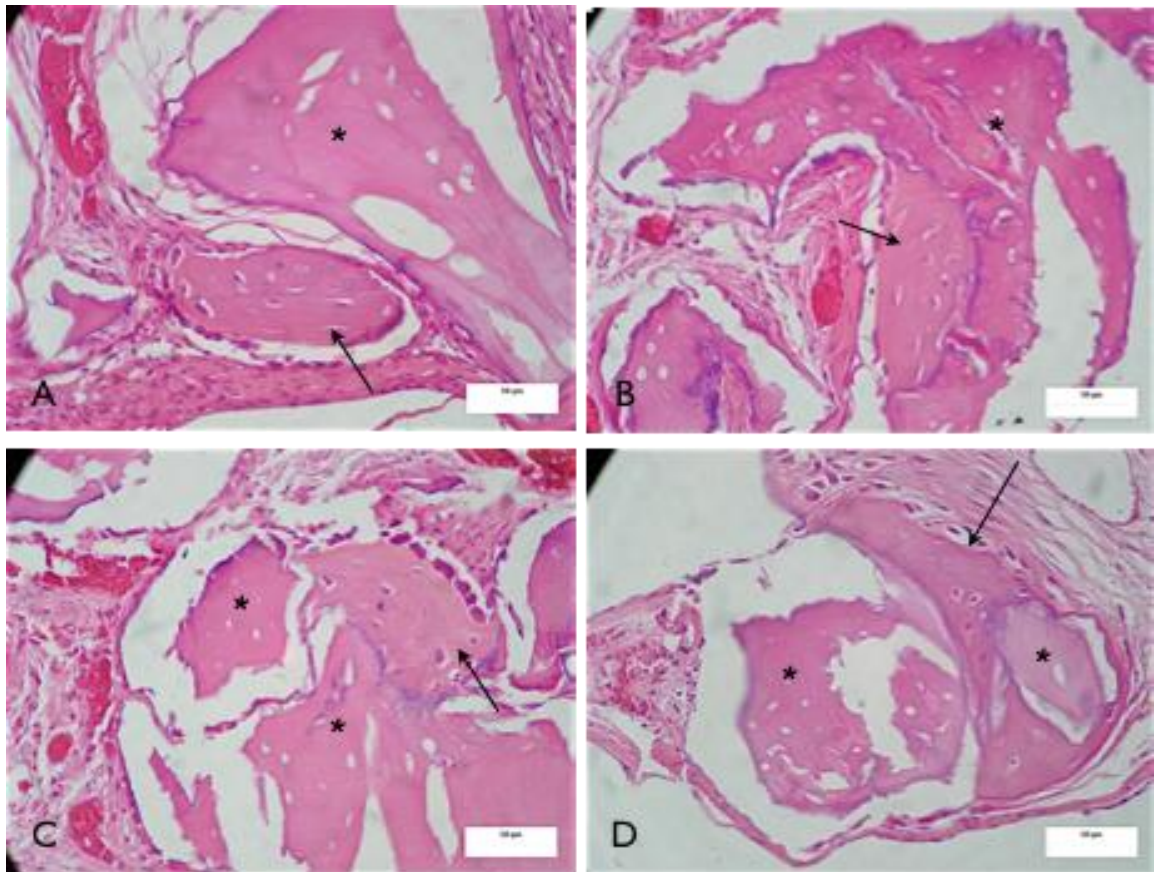


Figura 17: Fotomicrografias do grupo xenoenxerto + rhBMP-7 aos 42 dias. A, B, C e D: osso neoformado (seta) em íntimo contato com biomaterial (*). A barra interna = 50 µm; coloração de HE.

A análise histomorfométrica permitiu determinar as densidades de volume relativas para tecido conjuntivo; biomaterial e osso neoformado.

A densidade de volume de tecido ósseo no período de 7 dias foi menor ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn) no grupo xenoenxerto + rhBMP-7 (5,48%) que nos grupos coágulo (24,05%) e autógeno (24,62%). Por outro lado, após 42 dias, a densidade de volume de novo osso foi maior ($p < 0,01$, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn) no grupo com rhBMP-7 (39,05%) em comparação com o grupo que recebeu somente xenoenxerto (9,43%); também observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo autógeno (26,85%). Avaliando-se o efeito do tempo, notamos que não houve diferença significativa nos grupos coágulo, autógeno e xenoenxerto, enquanto que o aumento na densidade de volume ósseo foi 7 vezes maior após 42 dias ($p < 0,001$, teste *t de student*).

A análise da densidade de volume do tecido conjuntivo no período de 7 dias não mostrou diferença significativa entre os grupos avaliados, porém, aos 42 dias, o grupo tratado com xenoenxerto mostrou a maior ($p < 0,01$, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn) densidade de volume de tecido conjuntivo (53,10%) em relação aos grupos coágulo (31,61%) e autógeno (24,9%), mas não houve diferença em relação ao grupo xenoenxerto-rhBMP-7. Notou-se uma diminuição na densidade de tecido conjunto nos grupos autógeno (de 45,24% para 24,9%, $p < 0,01$) e no grupo com rhBMP-7 (de 43,46% para 33,12%, $p < 0,05$).

No período de 7 dias constatou-se diferença na densidade de volume do enxerto autógeno utilizado (8,71%) em relação à do xenoenxerto associado à rhBMP-7 (33,94%, $p < 0,001$) e xenoenxerto apenas (25,05%, $p < 0,01$). A densidade de volume do xenoenxerto quando associado à rhBMP-7 reduziu significativamente após 42 dias em relação ao período de 7 dias ($p < 0,01$).

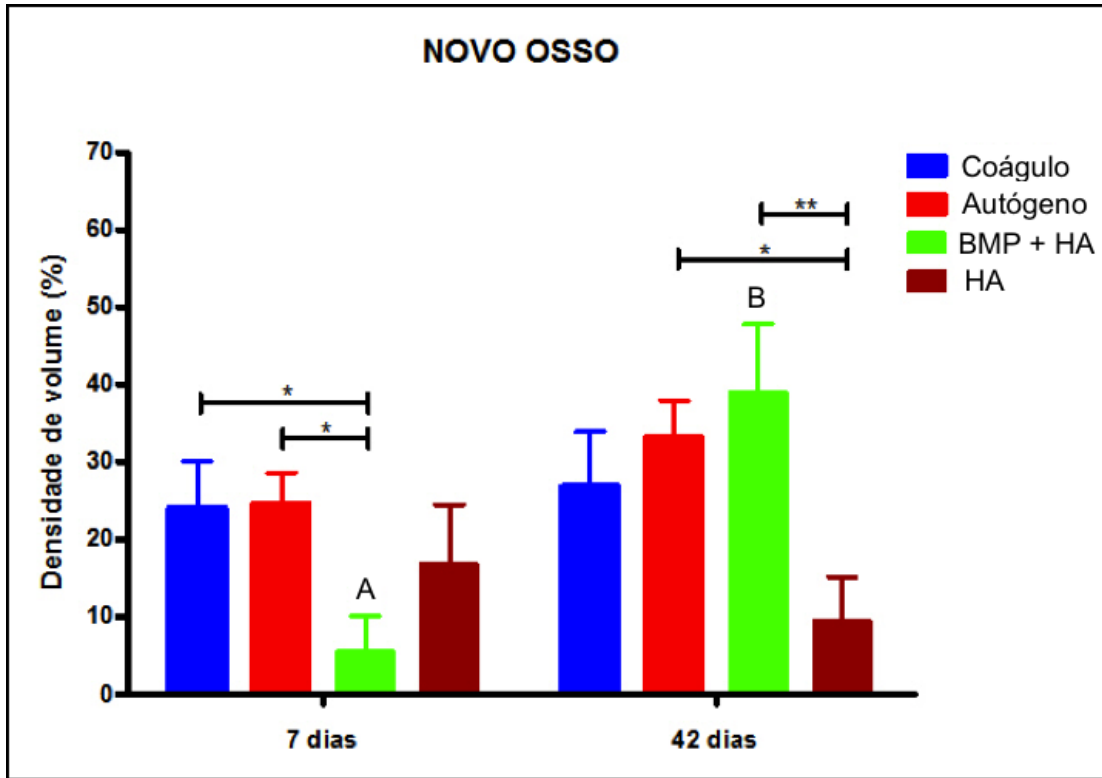


Figura 18: Análise estatística da densidade de volume de osso neoformado nos períodos de 7 e 42 dias (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; AxB = $p < 0,001$).

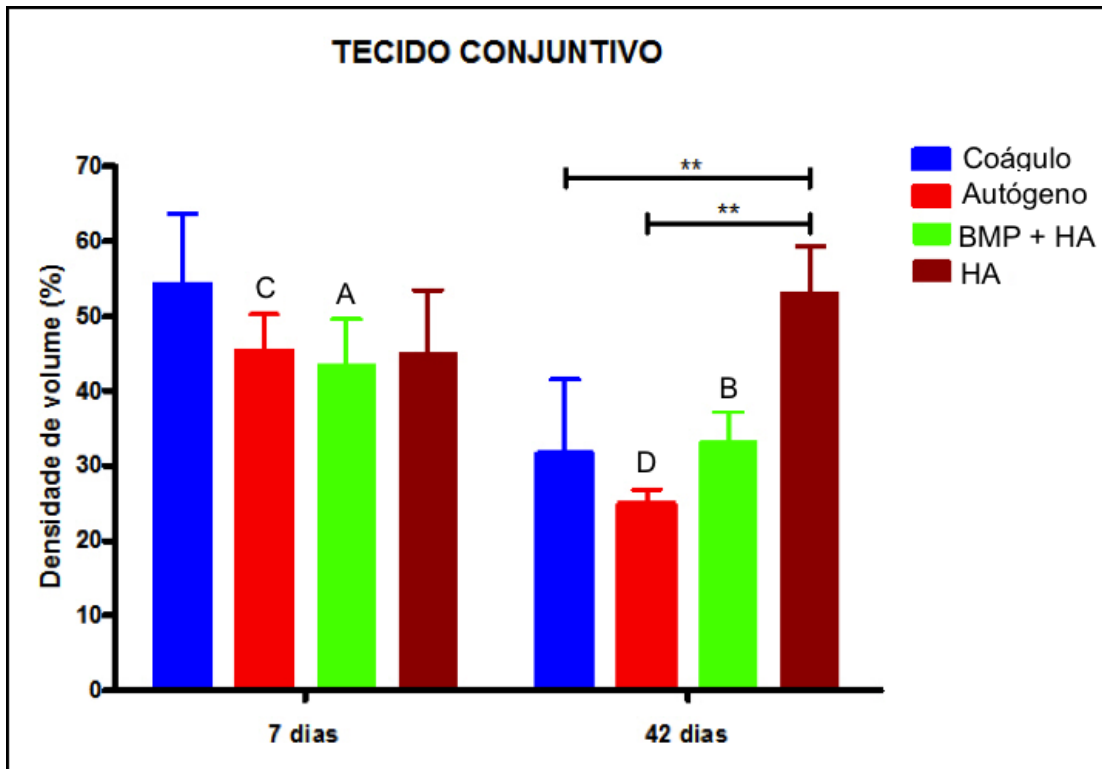


Figura 19: Análise estatística da densidade de volume de tecido conjuntivo nos períodos de 7 e 42 dias (** = $p < 0,01$; AxB = $p < 0,05$; CxD = $p < 0,01$).

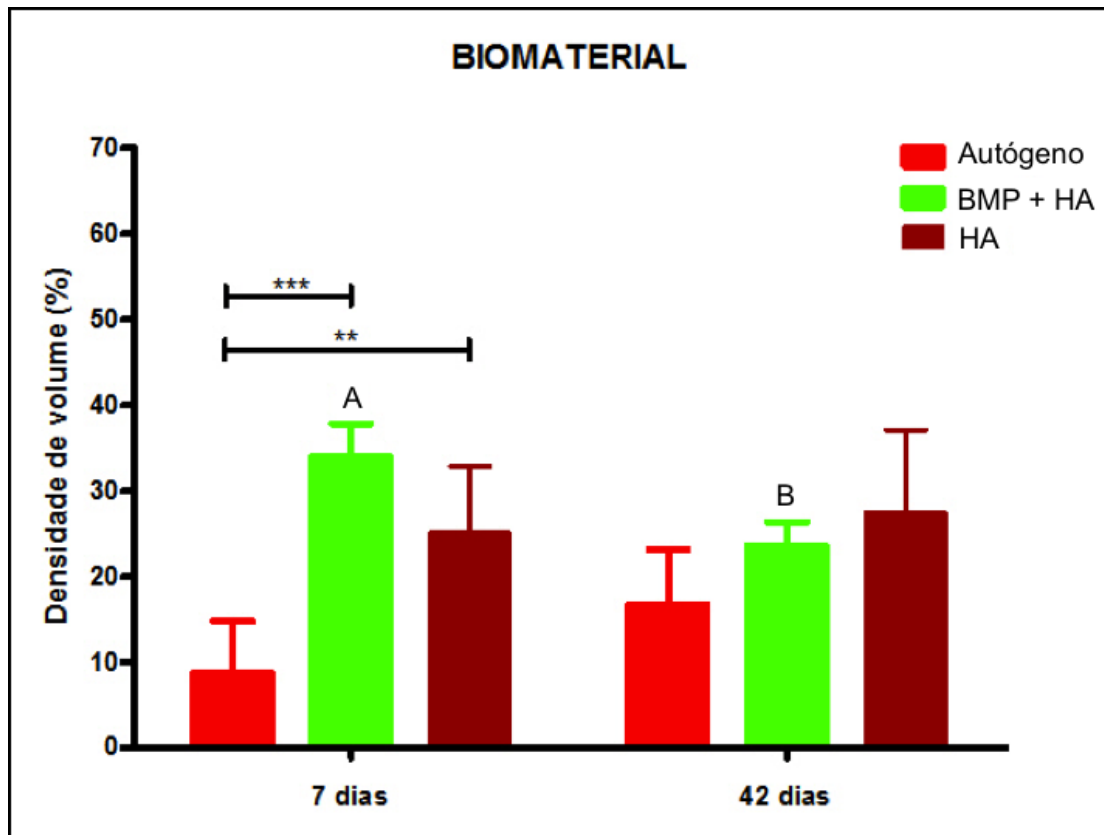


Figura 20: Análise estatística da densidade de volume de biomaterial residual nos períodos de 7 e 42 dias (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; AxB = $p < 0,01$).

5.2 – EXPERIMENTO 2 - IMPLANTES REVESTIDOS COM FILME FINO DE HA

Após a análise histomorfométrica das lâminas (Figura 21), observou-se que a formação de novo osso foi maior nos grupos que receberam BMP (B e D) em comparação aos grupos que não receberam esta proteína (A = 35,6%, B = 48,6%; C = 19,7% D = 55,3%). Além disso, o grupo D apresentou mais osso que o grupo C ($p < 0,01$). Em oposição, a área de tecido conjuntivo foi menor nos grupos B e D (A = 39,3%, B = 28,3 C = 48,23%, D = 23,3%), mas não foi observada diferença significativa entre os grupos B e D ($p < 0,05$) (Figura 22).

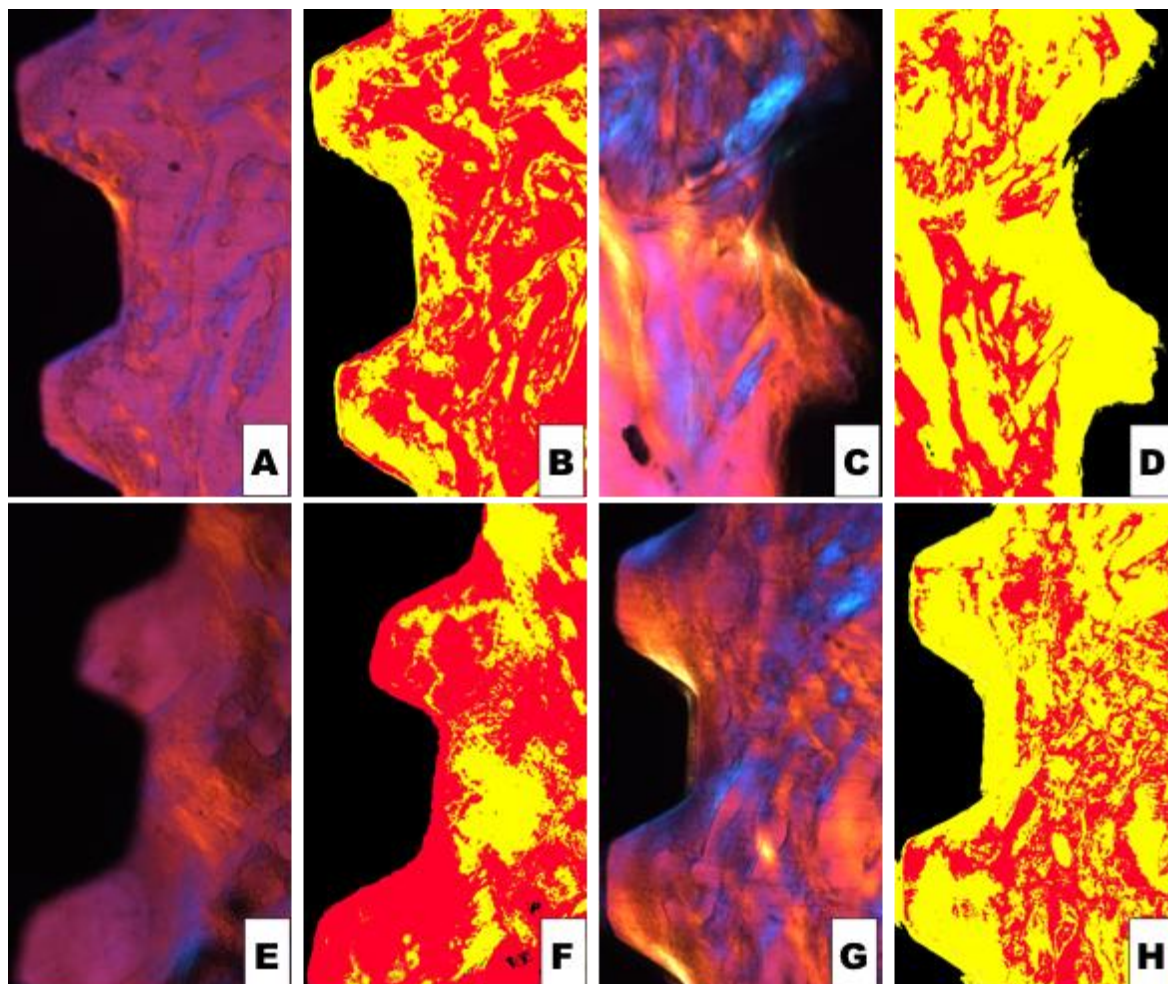


Figura 21: Imagem original da lamina e segmentação de cada grupo. A e B: instrumentação padrão sem rhBMP-7; C e D: instrumentação padrão com rhBMP-7; E e F: sobreinstrumentação sem rhBMP-7, G e H:

sobreinstrumentação com rhBMP-7. Cores: Preto - implante; Vermelho - tecido conjuntivo; Amarelo – osso neoformado.

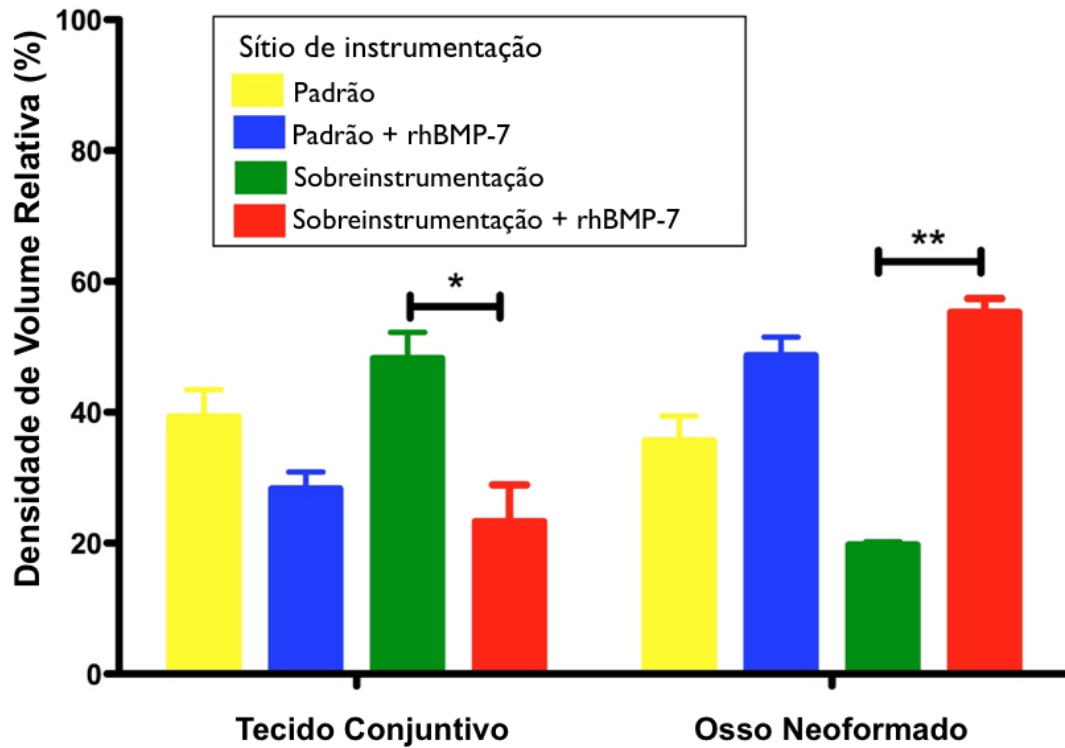


Figura 22: Análise estatística de densidade de volume de tecido conjuntivo e osso neoformado ao redor de implantes com instrumentação padrão e sobreinstrumentados; e ainda com e sem a adição de rhBMP-7.

6 – DISCUSSÃO

As BMPs, em especial BMP-2 e 7, estão envolvidas diretamente na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose das células ósseas (Sampath et al., 1993 e Wei et al. 2008), sendo amplamente aplicadas em casos de grandes reconstruções ósseas, como por exemplo, em cirurgias maxilo-faciais (Herford & Boyne, 2008) e fusão de coluna vertebral (Dimar et al, 2009). Em 2002, Rose & Oreffo, relataram a importância de um arcabouço osteocondutor para a adesão e efetividade das células osteoprogenitoras, bem como o uso de fatores de crescimento, responsáveis pela sinalização celular, que irão atuar na osteoindução.

Com os avanços na área de engenharia tecidual, inúmeros materiais vêm sendo desenvolvidos, buscando-se aquele com características biomiméticas do osso autógeno. Atualmente, estão disponíveis diferentes sistemas carreadores para os fatores de crescimento, como as BMPs (Block et al., 2006): polímeros (Li et al., 2009), gel de colágeno, membrana de colágeno (King et al., 1998), esponja de colágeno absorvível.

Em 2007, Zhou et al., mostraram o mecanismo de adsorção de BMP-7 em HA, a qual tem afinidade para sítios COO⁻ (através de ligações eletrostáticas) e NH₂/NH₃ (a interação intermolecular entre pontes de hidrogênio e o nitrogênio e os grupos fosfato da superfície da hidroxiapatita).

Diferentes modelos experimentais vêm sendo utilizados para estudos *in vivo* com BMPs, como teste em subcutâneo de camundongos *nude* (Gavenis et al, 2010), defeito ósseo segmentar em ratos (Burastero et al, 2010), fratura de soalho de órbita em cães (Asamura et al, 2010), defeitos supra-alveolares em cães (Wikesjö et al, 2008; Susin et al, 2010) e coelhos (Calasans-Maia, 2009).

No presente estudo (Experimento 1) foi avaliado o comportamento biológico da associação de rhBMP-7 (200mg/ml) a uma HA de origem bovina no tratamento de defeitos ósseos em crânios de ratos nos períodos de 7 e 42 dias. Embora não seja um defeito de tamanho crítico, o modelo experimental

utilizado é adequado para avaliar a velocidade e intensidade do reparo ósseo, bem como a biocompatibilidade dos materiais (Jones et al, 2007).

Estudos anteriores demonstraram a biocompatibilidade de xenoenxertos bovinos quando adequadamente processados (Zambuzzi et al., 2006), mostrando, também, propriedade osteocondutora (Calasans-Maia et al, 2009). Em 2004, um *pool* de proteínas morfogenéticas ósseas de origem bovina foi associada a uma hidroxiapatita sintética, sendo utilizada em defeitos críticos (8 mm) em crânio de ratos e observaram a inibição da formação óssea, sugerindo que este tipo de HA microgranular não representava um bom carreador para BMP bovina (Ferreira et al, 2004). Baseado nestas evidências, incentivou-se o uso de uma HA de origem bovina na associação a um tipo específico de BMP, a BMP-7, que atua ativamente na diferenciação osteogênica (Lavery et al., 2009; Zhang et al., 2009), podendo ter um aumento nestas propriedades quando combinada com a BMP-2 (Basmanav et al., 2008). Esta associação indica um efeito sinérgico, sendo bastante promissor na engenharia de tecidos ósseos. (Yilgor et al., 2009).

Quando associada a HA, a rhBMP-2 proporcionou um efeito favorável na formação óssea, aumentando a atividade da fosfatase alcalina (Schuessele et al., 2009), e mostrando aumentar significativamente a formação óssea, caracterizando assim efeitos osteoindutivos (Schnettler et al., 2009). No presente estudo foi possível constatar um efeito positivo na associação da rhBMP-7 ao xenoenxerto, com maior formação óssea que no grupo tratado somente com o xenoenxerto, porém em níveis similares ao osso autógeno.

Assim como nos enxertos ósseos, fatores de crescimento têm sido associados a implantes de titânio com diferentes tipos de superfícies e modelos experimentais. Neste trabalho, o experimento com implantes de titânio (Experimento 2), teve como objetivo avaliar o efeito de rhBMP-7 sobre a osseointegração de implantes recobertos com filme fino de hidroxiapatita, em casos de instrumentação padrão e sobreinstrumentação, sendo este uma

simulação de instalação imediata pós-exodontia, onde há um *gap* entre osso-implante.

O revestimento utilizado foi realizado pelo método de RAMS (Right Angle Magnetron Sputtering), que permite a produção de uma HA estequiométrica, a qual não pode ser produzida por outros métodos de revestimento. Estudos anteriores, usando esse método, *in vitro*, mostraram crescimento de osteoblastos (Mello et al. 2007, Hong et al., 2010). O uso de revestimentos de sputtering mostrou-se capaz de eliminar alguns dos problemas associados ao processo de spray de plasma, aumentando assim a resistência óssea e a taxa inicial de osseointegração de implantes revestidos com HA e CaP (fosfato de cálcio) (Yang et al., 2005). A deposição da HA como uma cobertura pela técnica de spray de plasma ou eletroquimicamente, aumenta a fixação mecânica e o crescimento ósseo, mas não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as aplicações individuais de HA. A adição de colágeno à fase mineralizada do revestimento visando produzir uma superfície óssea mais natural não aumentou o efeito osteocondutor de HA (Daugaard et al., 2010).

Nos últimos anos, estudos *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos para verificar a eficácia dos tratamentos de superfície dos implantes, associando propriedades, com o objetivo de melhorar a atividade celular (Mello et al., 2007), a cura e aposição óssea (Misch, 1990; Esposito et al. 2007; Hsu et al, 2007). Superfícies de titânio recobertos com HA associada a BMP-2 promoveram a formação óssea (Piskounova et al, 2009).

As células ósseas são conhecidas por serem sensíveis à morfologia do material, resultando em corpos celulares com diferentes formas, orientações e processos de adesão (Anselme et al. 2000; Matsuzaka et al. 2003). Nos implantes de titânio com superfícies ásperas, os osteoblastos não se espalham completamente e adquirem uma morfologia poligonal. Além disso, diminuem a taxa de proliferação celular na incubação inicial (Sader et al., 2005).

Dentre as modificações da superfície de implantes ortopédicos e odontológicos, a adição de material à base de fosfato de cálcio (CaP) para

revestimento, tem tido grande destaque para as modificações biomiméticas (Lemons & Misch, 1999, Ong et al. 2004, Yang et al ., 2005; Coelho et al, 2009), por apresentarem similaridade aos componentes básicos do osso natural. Quando integradas à estrutura do material, as moléculas sofrem uma liberação gradual, proporcionalmente à degradação das camadas, aumentando assim o sistema de sinalização de potenciais para os agentes osteogênicos no sítio do implante (Liu et al., 2001).

Quanto à osseointegração, diferentes tipos de superfícies foram testadas, incluindo os implantes de titânio óxido poroso e não foram observadas diferenças significativas (Sul et al. 2009; Gedrange et al. 2009). Estudos recentes em cães (Lee et al., 2010; Susin et al., 2010) utilizaram rhBMP-2 e rhBMP-7, respectivamente, com os implantes revestidos de óxido de titânio, obtendo resultados satisfatórios em aumento de rebordo alveolar e atuando na remodelação do osso residente.

A rhBMP-2 tem um grande potencial no aumento do osso alveolar, obtendo bons resultados na osseointegração de implantes em função a longo prazo. A inclusão deste tipo de BMP para aumentar a integração do implante ao osso alveolar proporciona maior previsibilidade ao protocolo clínico utilizado, mudando assim os paradigmas atuais de tratamento (Wikesjo et al., 2009).

A combinação de fatores de crescimento a implantes de titânio com revestimentos de HA, mostrou o crescimento ósseo em todas as dimensões do implante, quando associada à ng/rhBMP-2 (Proteína morfogenética óssea-2 não glicosilada), mas sem diferença estatística entre os grupos em termos de altura óssea e o contato osso-implante, observando-se uma maior densidade óssea, quando não havia nenhuma revestimento de HA, indicando que este tipo de revestimento pode não ser necessário quando se utiliza BMP-2 não-glicosiladas (Freilich et al., 2008). No presente estudo, o sistema de expressão de rhBMP-7 usada permitiu um correto processamento pós-transdução, produzindo uma rhBMP-7 glicosilada efetivamente capaz de induzir a diferenciação de células C2C12 e a osteogênese ectópica em subcutâneo de camundongos *nude* (Bustos-Valenzuela et al. 2010).

Confirmando os resultados de Bustos-Valenzuela (2010), o presente estudo demonstrou maior formação óssea no grupo contendo rhBMP-7 nos defeitos sobreinstrumentados.

Vale a pena, ainda, mencionar que a rhBMP-7 utilizada apresenta uma capacidade de osteoindução muito alta, pois apenas 15 minutos de contato com os implantes revestidos foram suficientes para produzir um aumento significativo na área do osso neoformado. Este tempo de manuseio foi significativamente menor do que o registrado anteriormente (Leknes et al. 2008; Lee et al. 2010; Susin et al. 2010), nos quais foi necessário um período de, no mínimo, seis horas de preparação do implante com rhBMP e posterior instalação do mesmo, o que dificulta sua utilização clínica no dia-a-dia.

Estudos anteriores testaram diferentes concentrações de BMP, e mostraram que a formação de osso trabecular novo foi encontrada apenas com 380 μ g de BMP-2 (Sachse et al., 2005). Já estudos usando implantes com superfície de óxido de titânio poroso embebidos em altas concentrações de rhBMP-2 (3.0mg/ml) não apresentaram aumento na formação óssea em comparação com os grupos que receberam as concentrações mais baixas (0,75 e 1,5 mg / ml) em 8 semanas (Wikesjo et al. 2008b). Apesar de no presente trabalho não ser possível quantificar a concentração adsorvida de rhBMP-7, poderíamos supor, que essa concentração tenha sido menor que 2,0 mg / ml, pois esta era a concentração da rhBMP-7 na solução.

Stenport et al. 2003, mostraram que 10 mg de BMP-7 associado ao colágeno como o carreador não contribuiu significativamente para o aumento da fixação do implante de titânio no osso. Por outro lado, a associação de rhBMP-7 (1,5 e 3,0 mg / ml) a implantes em defeitos supra-ósseos, melhorou a formação óssea, estendendo-se acima da plataforma do implante após 8 semanas. Desta forma, a superfície de óxido de titânio poroso atuou como uma efetiva superfície carreadora de rhBMP-7, indicando uma potencial importância clínica na estimulação da formação óssea local, obtendo um ganho vertical do rebordo alveolar (Leknes et al., 2008; Susin et al. 2010). Entretanto, não foi possível comparar as diferenças no modelo experimental, devido à falta de um grupo controle sem rhBMP-7.

É possível inferir que o processo inflamatório associado aos procedimentos de instalação do implante proporcionem uma atividade proteolítica inerente ao processo, capaz de destruir parte das moléculas de BMP associadas ao material. Destarte, concentrações maiores de BMP acabam por serem necessárias. Esta hipótese sugere que futuras formulações para disponibilização da BMP engendrem mecanismos capazes de controlar o momento de sua liberação, mais precisamente, promovendo a liberação em fase posterior à inflamatória.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram um estudo prévio (Susin et al, 2010), que utilizou também a rhBMP-7, mas com uma diferente superfície de implante e desenho experimental (defeito supra-alveolar). Portanto, sugere que o osso recém-formado foi atribuído aos efeitos osteoindutivos da proteína e não ao tamanho do local do implante. Na verdade, a proteína associada à sobreinstrumentação pode contribuir para acelerar a formação óssea, uma vez que foi possível observar uma neoformação óssea três vezes maior ao redor dos implantes em locais de sobreinstrumentação do que no grupo controle (sem rhBMP-7). Tal modelo experimental quando transferido para a vivência clínica em implantodontia é de extrema importância, pois simula os casos de instalação imediata pós-exodontia, onde há um espaço entre a parede óssea do alvéolo dentário e o implante, podendo assim proporcionar ao paciente um menor tempo de recuperação.

7 – CONCLUSÃO

Conclui-se que a associação da rhBMP-7 ao xenoenxerto promoveu reparação óssea em crânio de ratos semelhante ao grupos autógeno e coágulo, porém maior que no grupo tratado apenas com xenoenxerto. Ainda, conclui-se que a associação da rhBMP-7 a implantes de Ti revestidos com filmes nanométricos de HA resultam em maior formação óssea que nos implantes sem BMP, sendo mais evidente nos casos onde houve uma sobreinstrumentação do sítio cirúrgico. Pode-se inferir que a associação da rhBMP-7 aos implantes poderá acelerar o processo de osseointegração.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrektsson T, Zarb GA. Current interpretations of the osseointegrated response: clinical significance. *Int. J. Prosthodont.* 1993; 6, 95–105

Albrektsson T, Carlsson LV, Jacobsson M, Macdonald W. Gothenburg osseointegrated hip arthroplasty. Experience with a novel type of hip design. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1998; 352, 81–94

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* 2001; 10 (Suppl 2), S96–101

Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1—review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int. J. Prosthodont.* 2004; 17, 536–543

Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2—review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int. J. Prosthodont.* 2004; 17, 544–564

Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg, A. State of the art of oral implants. *Periodontol 2000*, 2008; 47, 15–26

Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42(1):5-12.

Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P, Hildebrand HF, Iost A & Leroy JM. (2000b) The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior. *Biomaterials* , 2000b; 21: 1567–1577.

Aoki H. Medical applications of hydroxyapatite, 1a. ed., Tokyo, Takayama Press System Center Co., Inc. 1994

Araújo MG, Sonohara M, Hayacibara R, Cardaropoli G, Lindhe J. Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a

biomaterial. An experiment in the dog. *J Clin Periodontol.* 2002 Dec;29(12):1122-31.

Asamura S, Mochizuki Y, Yamamoto M, Tabata Y, Isogai N. Bone regeneration using a bone morphogenetic protein-2 saturated slow-release gelatin hydrogel sheet: evaluation in a canine orbital floor fracture model. *Ann Plast Surg.* 2010 Apr;64(4):496-502.

Attisano L, Lee-Hoeflich ST. The Smads. *Genome Biol* 2001;2:REVIEWS3010.

Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials.* 2006 May;27(14):2798-805. Epub 2006 Jan 23.

Basmanav FB, Kose GT, Hasirci V, Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering, *Biomaterials* 2008;(29)4195–4204

Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Feb;(371):10-27.

Bessho K, Tagawa T, Murata M. Analysis of bone morphogenetic protein (BMP) derived from human and bovine bone matrix. *Clin Orthop Relat Res* 1991;226-234.

Bjursten LM, Rasmusson L, Oh S, Smith GC, Brammer KS, Jin S. Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2009 (in press)

Block MS, Achong R. Bone Morphogenetic Protein for Sinus Augmentation. *Atlas of the Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* 2006,14(1)99-105.

Bobyn JD, Pilliar RM, Cameron HU, Weatherly GC. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1980; 150, 263–270

Bonachela WC, Mollo Júnior FA, Taga EM, Granjeiro JM. Manutenção do rebordo alveolar com hidroxiapatita microgranular. *Revista Gaúcha de Odontologia*, 1992; v.40, n.3, pp.212-214.

Boyne PJ. Transplantation, implantation, and grafts. *Dent Clin North Am.* 1971 Apr;15(2):433-53.

Brown JH, Gupta VK, Li BL, Milne BT, Restrepo C, West GB. The fractal nature of nature: power laws, ecological complexity and biodiversity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2002; 357, 619–626

Bucci-Sabattini V, Cassinelli C, Coelho PG, Minnici A, Trani A, Dohan-Ehrenfest DM. Effect of titanium implant surface nanoroughness and calcium phosphate low impregnation on bone cell activity in vitro. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2009 (in press).

Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol.* 2001 Feb;72(2):215-29.

Burastero G, Scarfi S, Ferraris C, Fresia C, Sessarego N, Fruscione F, Monetti F, Scarfò F, Schupbach P, Podestà M, Grappiolo G, Zocchi E. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. *Bone.* 2010 Jul;47(1):117-26. Epub 2010 Apr 1.

Burstein FD, Cohen SR, Hudgins R, Boydston W. The use of porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 1997 Sep;100(4):869-74.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1991; 25:889.

Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, Belser UC, Lang NP. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part I. 8-Year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res.* 1997; 8:161.

Buser,D. 20 years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry, 2nd edition, Quintessence books, 2009.

Bussy C, Verhoef R, Haeger A, Morra M, Duval JL, Vigneron P, Bensoussan A, Velzenberger E, Cascardo G, Cassinelli C, Schols H, Knox JP, Nagel MD. Modulating in vitro bone cell and macrophage behavior by immobilized enzymatically tailored pectins. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2008; 86, 597–606

Bustos-Valenzuela JC, Halcsik E, Bassi EJ, Demasi MA, Granjeiro JM, Sogayar MC. Expression, Purification, Bioactivity, and Partial Characterization of a Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-7 Produced in Human 293T Cells. *Mol Biotechnol*, 2010 May 25. [Epub ahead of print]

Calasans-Maia MD, Ascoli FO, Novellino ATNA, Rossi AM, Granjeiro JM. Comparative histological evaluation of tibial bone repair in rabbits treated with xenografts. *Acta Ortop Bras.* 2009; 17(6):340-3.

Calasans-Maia MD, Monteiro ML, Ascoli FO, Granjeiro JM. The rabbit as an animal model for experimental surgery. *Acta Cir Bras.* 2009 Jul-Aug;24(4):325-8.

Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* 2005;357:1-8.

Carlsson L, Röstlund T, Albrektsson B, Albrektsson T, Brånemark PI. Osseointegration of titanium implants. *Acta Orthop. Scand.* 1986; 57, 285–289

Carlsson LV, Albrektsson T, Albrektsson BE, Jacobsson CM, Macdonald W, Regnér L, Weidenhielm LR. Stepwise introduction of a bone-conserving osseointegrated hip arthroplasty using RSA and a randomized study: II.

Clinical proof of concept—40 patients followed for 2 years. *Acta Orthop.* 2006; 77, 559–566

Carlsson LV, Albrektsson BE, Albrektsson BG, Albrektsson TO, Jacobsson CM, Macdonald W, Regnér L, Röstlund T, Weidenhielm LR. Stepwise introduction of a bone-conserving osseointegrated hip arthroplasty using RSA and a randomized study: I. Preliminary investigations—52 patients followed for 3 years. *Acta Orthop.* 2006; 77, 549–558

Carreon LY, Glassman SD, Djurasovic M, Campbell MJ, Puno RM, Johnson JR, Dimar JR. RhBMP-2 versus iliac crest bone graft for lumbar spine fusion in patients over 60 years of age: a cost-utility study. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009;34:238-243.

Carvalho PSP, Bassi APF, Pereira LAVD. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais, *Implant news*, 2004; v. 1, n. 3, pp. 255-259.

Cassinelli C, Morra M, Bruzzone G, Carpi A, Di Santi G, Giardino R, Fini M. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 2. In vitro experiments. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2003; 18, 46–52

Chen Q, Johnson DM, Haudenschild DR, Goetinck PF. Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. *Dev Biol*, 1995; v.172, n.1, Nov, p.293-306.

Cho SA, Jung SK: A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials* 2003; 24:4859.

Ciani RB, Rahal SC, Volpi RS, Taga R, Granjeiro JM, Cestari TM, Mamprim MJ. Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2006; v. 58, n. 1, pp. 59-67.

Clarke BL, Khosla S. Physiology of bone loss. *Radiol Clin North Am.* 2010 May;48(3):483-95.

Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NRF, Cardaropoli G, Thompson VP, Lemons JE. Review: Basic Research Methods and Current Trends of Dental Implant Surfaces. *J Biomed Mater Res Part B. Appl Biomater.* 2009; 88B: 579–596.

Coelho PG, Cardaropoli G, Suzuki M, Lemons JE. Early healing of nanothickness bioceramic coatings on dental implants. An experimental study in dogs. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2009; 88, 387–393

Coelho PG, Lemons JE. Physico/chemical characterization and in vivo evaluation of nanothickness bioceramic depositions on alumina-blasted/acid-etched Ti-6Al-4 V implant surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2009; 90, 351–361

Conz MB, Granjeiro JM, Soares GA. Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft, *J. Appl Oral. Sci.*, 2005; v. 13, n. 2, pp. 136-140.

Cserjesi P, Brown D, Ligon KL, Lyons GE, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Olson EN. Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development*, 1995; v.121, n.4, Apr, p.1099-110.

Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg.* 1996 Sep-Oct;35(5):413-7.

Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Agheli H, Sutherland D, Affrossman S, Oreffo RO. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials.* 2006; 27, 2980–2987

Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Wilkinson CD, Oreffo RO. Osteoprogenitor response to defined topographies with nanoscale depths. *Biomaterials.* 2006; 27, 1306–1315.

Daugaard H, Elmengaard B, Bechtold JE, Jensen T, Soballe K. The effect on bone growth enhancement of implant coatings with hydroxyapatite and collagen deposited electrochemically and by plasma spray J Biomed Mater Res. 2010; 92A: 913–921.

de Groot K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. Biomaterials. 1980 Jan;1(1):47-50.

de Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. J. Biomed. Mater. Res. A. 2007; 80, 554–564

Dimar JR 2nd, Glassman SD, Burkus JK, Pryor PW, Hardacker JW, Carreon LY. Clinical and radiographic analysis of an optimized rhBMP-2 formulation as an autograft replacement in posterolateral lumbar spine arthrodesis. J Bone Joint Surg Am. 2009 Jun;91(6):1377-86.

Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. Biomaterials. 2010 Mar;31(7):1465-85.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell, 1997; v.89, n.5, May 30, p.747-54

Esposito M, Murray-Curtis L, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. Cochrane Database Syst Rev. 2007;17:CD003815. Review.

Ferreira GR, Cestari TM, Granjeiro JM, Taga R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. Braz Dent J. 2004;15(3):175-80.

Freilich M, Patel CM, Wei M, Shafer D, Schleier P, Hortschansky P, Kompali R, Kuhn L, Growth of new bone guided by implants in a murine calvarial model. Bone. 2008; 43, 781–788.

Gamradt SC & Lieberman JR. Genetic modification of stem cells to enhance bone repair. *Ann Biomed Eng.* 2004; v.32, n.1, Jan, p.136-47.

Garrison KR, Donell S, Ryder J, Shemilt I, Mugford M, Harvey I, Song F. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review. *Health Technol Assess.* 2007 Aug;11(30):1-150, iii-iv

Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg.* 2007; 77:626–31.

Gavenis K, Schneider U, Groll J, Schmidt-Rohlfing B. BMP-7-loaded PGLA microspheres as a new delivery system for the cultivation of human chondrocytes in a collagen type I gel: the common nude mouse model. *Int J Artif Organs.* 2010 Jan;33(1):45-53.

Ge Z, Baguenard S, Lim LY, Wee A, Khor E. Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials.* 2004; Mar;25(6):1049-58.

Gedrange T, Gredes T, Gredes M, Allegrini MR, Borsos G, Vegh A, Salles MB, Heinemann F, Dominiak M, Allegrini S Jr. Comparative animal study on hard tissue integration and bone formation of different Nobel Biocare implants. *J Physiol Pharmacol.* 2009; Dec;60 Suppl 8:117-21.

Gokcen-Rohlig B, Yaltirik M, Ozer S, Tuncer ED, Evlioglu G. Survival and Success of ITI Implants and Prostheses: Retrospective Study of Cases with 5-Year Follow-Up. *Eur J Dent.* 2009; Jan;3(1):42-9.

Granato R, Marin C, Suzuki M, Gil JN, Janal MN, Coelho PG. Biomechanical and histomorphometric evaluation of a thin ion beam bioceramic deposition on plateau root form implants: an experimental study in dogs. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2009; 90, 396–403

Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38: 1463-1473.

Hadjidakis DJ, Androulakis, li. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, 2006; v.1092, Dec, p.385-96.

Hall J, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjö UM. Bone formation at rhBMP-2-coated titanium implants in the rat ectopic model. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(5):444-51.

He J, Zhou W, Zhou X, Zhong X, Zhang X, Wan P, Zhu B, Chen W. The anatase phase of nanotopography titania plays an important role on osteoblast cell morphology and proliferation. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2008; 19, 3465–3472

Herculani PP, Cestari TM, Taga EM, Taga R., Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. *Rev. Bras. Implant*, 2000; v.7, n.2, pp.7-14.

Heinen JH, Dabb GH, Mason HA. The experimental production of ectopic cartilage and bone in muscle of rabbits. *J. Bone Joint Surg*. 1949; 31^A, p.765-75.

Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Apr;66(4):616-24.

Hislop WS, Finlay PM, Moos KF. A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1993; Jun;31(3):149-53.

Hong Z, Mello A, Yoshida T, Luan L, Stern PH, Rossi A, Ellis DE, Ketterson JB. Osteoblast proliferation on hydroxyapatite coated substrates prepared by right angle magnetron sputtering. *J Biomed Mater Res A*. 2010; Jun 1;93(3):878-85

Hsu SH, Liu BS, Lin WH, Chiang HC, Huang SC, et al. Characterization and biocompatibility of a titanium dental implant with a laser irradiated and dual-acid etched surface. *Biomed Mater Eng*. 2007;17:53-68.

Indovina A Jr, Block MS. Comparison of 3 bone substitutes in canine extraction sites. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; Jan;60(1):53-8.

Jarmar T, Palmquist A, Brånemark R, Hermansson L, Engqvist H, Thomsen P. Characterization of the surface properties of commercially available dental implants using scanning electron microscopy, focused ion beam, and high-resolution transmission electron microscopy. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2008; 10, 11–22

Jones L, Thomsen JS, Mosekilde L, Bosch C, Melsen B. Biomechanical evaluation of rat skull defects, 1, 3, and 6 months after implantation with osteopromotive substances. *J Craniomaxillofac Surg.* 2007 Dec;35(8):350-7. Epub 2007 Oct 24.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 2004; 10^a. ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan.

Kang BS, Sul YT, Oh SJ, Lee HJ, Albrektsson T. XPS, AES and SEM analysis of recent dental implants. *Acta Biomater.* 2009; 5, 2222–2229

Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* 1999; Dec 1;13(23):3037-51.

Kawabata M, Chytil A, Moses HL. Cloning of a novel type II serine/threonine kinase receptor through interaction with the type I transforming growth factor-beta receptor. *J Biol Chem* 1995; 270:5625-5630.

King GN, King N, Hughes FJ. Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo *Journal of Periodontal Research* 1998; 33(4),226-236

Kodama A, Bauer S, Komatsu A, Asoh H, Ono S, Schmuki P. Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO₂ nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite. *Acta Biomater.* 2009; 5, 2322–2330

Lacroix, P. Recent investigations on the growth of bone. *Nature.* 1945; N.15656. p576.

Lamolle SF, Monjo M, Rubert M, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE. The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*. 2009; 30, 736–742

Langer, R. e J. P. Vacanti. *Tissue engineering*. Science, v.260, n.5110, May 14, p.920-6. 1993.

Lavery K, Hawley S, Swain P, Rooney R, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. New insights into BMP-7 mediated osteoblastic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *Bone*. 2009;45(1):27-41.

Le, A. X., T. Miclau T, Hu D, Hems JA. Molecular aspects of healing in stabilized and nonstabilized fractures. *J Orthop Res*. 2001; v.19, n.1, Jan, p.78-84

Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials* 2007; 23(7):844-54.

Lee J, Decker JF, Polimeni G, Cortella CA, Rohrer MD, Wozney JM, Hall J, Susin C, Wikesjö UM. Evaluation of implants coated with rhBMP-2 using two different coating strategies: a critical-size supraalveolar peri-implant defect study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2010 Jun;37(6):582-90. Epub 2010 Mar 23.

LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci*. 1991;15:1-201.

Leknes KN, Yang J, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Wikesjö UME. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7/rhOP-1): radiographic observations. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 914–919.

Lemons J, Dietch-Misch F. *Biomaterials for dental implants*. In: CE M, editor. *Contemporary Implant Dentistry*. Saint Louis: Mosby, Inc.; 1999. p 271–302.

Leonard G, Coelho P, Polyzois I, Stassen L, Claffey N. A study of the bone healing kinetics of plateau versus screw root design titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Mar;20(3):232-9.

Levander, G. A study of bone regeneration. *Surgery, Gynecology and Obstetrics.* 1938; V.67, p.705-14.

Li B, Yoshii T, Hafeman AE, Nyman JS, Wenke JC, Guelcher SA. The effects of rhBMP-2 released from biodegradable polyurethane/microsphere composite scaffolds on new bone formation in rat femora. *Biomaterials* 2009; 30(35),6768-6779

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; v.84-A, n.6, Jun, p.1032-44.

Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone,* 1996; v.19, n.1 Suppl, Jul, p.1S-12S.

Liu DM. Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite granules. *Biomaterials.* 1996 Oct;17(20):1955-7.

Liu Y, Layrolle P, de Bruijn J, van Blitterswijk C, de Groot K. Biomimetic coprecipitation of calcium phosphate and bovine serum albumin on titanium alloy. *J Biomed Mater Res.* 2001; 57:327-35.

Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2001; v.27, n.3, May-Jun, p.677-90.

Ma D, Stoica AD, Wang XL. Power-law scaling and fractal nature of mediumrange order in metallic glasses. *Nat. Mater.* 2009; 8, 30–34

Mardas N, Kostopoulos L, Karring T. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. *J Craniofac Surg.* 2002 May;13(3):453-62; discussion 462-4.

Marin C, Granato R, Suzuki M, Gil JN, Piattelli A, Coelho PG. Removal torque and histomorphometric evaluation of bioceramic grit-blasted/acid-etched and dual acidetched implant surfaces: an experimental study in dogs. *J. Periodontol.* 2008; 79, 1942–1949

Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology. *Implant. Dent.* 1998; v.7, n.4, p.267-76.

Masters DH. Implants. Bone and bone substitutes. *Calif. Dent. Ass. J.*, 1988; Jan;16(1):56-65.

Matsuzaka, K., Walboomers, X.F., Yoshinari, M., Inoue, T. & Jansen, J.A. (2003). The attachment and growth behavior of osteoblast-like cells on microtextured surfaces. *Biomaterials* 24: 2711– 2719.

McSheehy PM, Chambers TJ. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology.* 1986 Feb;118(2):824-8.

Melcher AH. Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Arch Oral Biol.* 1970 Dec;15(12):1183-204.

Mello A, Hong Z, Rossi AM, Luan L, Farina M, Querido W, Eon J, Terra J, Balasundaram G, Webster T, Feinerman A, Ellis DE, Ketterson JB, Ferreira CL. Osteoblast proliferation on hydroxyapatite thin coatings produced by right angle magnetron sputtering. *Biomed Mater.* 2007 Jun;2(2):67-77.

Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. Discrete calcium phosphate nanocrystalline deposition enhances osteoconduction on titanium-based implant surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2009; 90, 577–585

Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology—from micron- to nanotopography. *Biomaterials.* 2008; 29, 3822–3835

Mendonça G, Mendonça DB, Simões LG, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, Aragão FJ, Cooper LF. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials*. 2009; 30, 4053– 4062

Misch CE. Density of bone: effect on treatment plans, surgical approach, healing, and progressive bone loading. *Int J Oral Implantol*. 1990;6:23-31.

Misch CE. *Implantes dentários contemporâneos*. 2006; 2ª ed., São Paulo, Ed. Santos.

Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 2010;147:35-51.

Monjo M, Lamolle SF, Lyngstadaas SP, Rønold HJ, Ellingsen JE. In vivo expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implants. *Biomaterials*. 2008; 29, 3771–3780

Morra M, Cassinelli C, Bruzzone G, Carpi A, Di Santi G, Giardino R, Fini M. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*. 2003; 18, 40–45

Morra M. Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins. *Eur. Cell Mater*. 2006; 12, 1–15

Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Mazzucco L, Borzini P, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Collagen I-coated titanium surfaces: mesenchymal cell adhesion and in vivo evaluation in trabecular bone implants. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2006; 78, 449–458

Morra M. Biomolecular modification of implant surfaces. *Expert Rev. Med. Devices*. 2007; 4, 361–372

Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Covalently-linked hyaluronan promotes bone formation around Ti implants in a rabbit model. *J. Orthop. Res*. 2009; 27,657–663

Mouhyi J, Dohan Ehrenfest DM, Albrektsson T. The Peri-implantitis: implant surfaces, microstructure and physico-chemical aspects. Clin. Implant Dent. Relat. Res. 2009 (in press)

Muramatsu K, Bishop AT. Cell repopulation in vascularized bone grafts. J Orthop Res. 2002 Jul;20(4):772-8.

Nakashima, M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy Cytokine & Growth Factor Reviews,2005, Volume 16, Issue 3, Pages 369-376.

Nerem, R. M. Tissue engineering in the USA. Med Biol Eng Comput, v.30, n.4, Jul, p.CE8-12. 1992.

Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. Cell Signal 2004;16:291-299.

Ohtsuki C, Kamitakahara M, Miyazaki T. Bioactive ceramic-based materials with designed reactivity for bone tissue regeneration. J R Soc Interface. 2009; Jun 6;6 Suppl 3:S349-60. Epub 2009 Jan 20.

Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos”, Rev. FOB, 1999; v. 7, pp. 85-93.

Ong JL, Carnes DL, Bessho K. Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. Biomaterials 2004; 25:4601–4606.

Opperman LA. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. Dev Dyn. 2000; v.219, n.4, Dec, p.472-85.

Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. Genes Dev. 2002; v.16, n.12, Jun 15, p.1446-65.

Orsini G, Piattelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piattelli A, Caputi S. Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol.* 2007; 78:209.

Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone* 2003;33:889-898.

Palmquist A, Jarmar T, Emanuelsson L, Brånemark R, Engqvist H, Thomsen P. Forearm bone-anchored amputation prosthesis: a case study on the osseointegration. *Acta Orthop.* 2008; 79, 78–85

Piskounova S, Forsgren J, Brohede U, Engqvist H, Strømme M. In vitro characterization of bioactive titanium dioxide/hydroxyapatite surfaces functionalized with BMP-2. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 Nov;91(2):780-7.

Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials.* 1999; 20, 2311–2321

Rajpurohit RK, Mansfield, Ohyama K, Ewert D, Shapiro IM. Chondrocyte death is linked to development of a mitochondrial membrane permeability transition in the growth plate. *J Cell Physiol,* 1999; v.179, n.3, Jun, p.287-96.

Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 1982 May;34(3):311.

Rose FR, Oreffo RO. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Mar 22;292(1):1-7.

Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten DP, Heldin CH, Miyazono K. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7632-7636.

Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene*. 2006 Feb 15;367:1-16.

Sachse A, Wagner A, Keller M, Wagner O, Wetzel WD, Layher F, Venbrocks RA, Hortschansky P, Pietraszczyk M, Wiederanders B, Hempel HJ, Bossert J, Horn J, Schmuck K, Mollenhauer J. Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone*. 2005; 37. 699–710.

Sader MS, Balduino A, Soares GA, Borojevic R. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. *Clin. Oral Impl. Res.* 16, 2005; 667–675

Sampath, T.K.; Reddi, A.H. Importance of geometry of the extracellular matrix in endochondral bone differentiation. *J. Cell Biol.* 1984; v.98. p.2191-7

Sampath TK, Rashka KE, Doctor JS, Tucker RF, Hoffmann FM. Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1993; 90: 6004-6008.

Schuessele A, Mayr H, Tessmar J, Goepferich A. Enhanced bone morphogenetic protein-2 performance on hydroxyapatite ceramic surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Sep 15;90(4):959-71.

Schnettler R, Knöss PD, Heiss C, Stahl JP, Meyer C, Kilian O, Wenisch S, Alt V. Enhancement of bone formation in hydroxyapatite implants by rhBMP-2 coating. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Jul;90(1):75-81.

Sciadini MF, Dawson JM, Johnson KD. Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res*. 1997 Nov;15(6):844-57.

Service RF. Tissue engineers build new bone. *Science*. 2000 Sep 1;289(5484):1498-500.

Sicca CM, Oliveira RC, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM, Kina JR., Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula, Rev. FOB, 2000; v. 8, n. 1/2, pp. 1-10.

Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. Cytokine Growth Factor Rev 2009;20:343-355.

Silva RV, Camilli JA, Bertran CA, Moreira NH. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. Int J Oral Maxillofac Surg. 2005 Mar;34(2):178-84.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 1997 Apr 18;89(2):309-19.

Sollazzo V, Pezzetti F, Scarano A, Piattelli A, Massari L, Brunelli G, Carinci F. Anatase coating improves implant osseointegration in vivo. J. Craniofac. Surg. 2007; 18, 806–810

Sosić D, Brand-Saberi B, Schmidt C, Christ B, Olson EN. Regulation of paraxis expression and somite formation by ectoderm- and neural tube-derived signals. Dev Biol. 1997 May 15;185(2):229-43.

Su-Gwan K, Hak-Kyun K, Sung-Chul L. Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats. J Craniomaxillofac Surg. 2001 Oct;29(5):282-8.

Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Albrektsson T. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. Med. Eng. Phys. 2001; 23, 329–346

Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, Albrektsson T. Characteristics of the surface oxides on turned and

electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials*. 2002; 23, 491–501

Sul YT, Johansson CB, Röser K, Albrektsson T. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants. *Biomaterials*. 2002; 23, 1809–1817

Sul YT. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. *Biomaterials*. 2003; 24, 3893–3907

Sul YT, Johansson C, Byon E, Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and nonbioactive titanium implants. *Biomaterials*. 2005; 26, 6720–6730

Sul YT, Johansson C, Albrektsson T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. *Int. J. Prosthodont*. 2006; 19, 319–328

Sul YT, Byon E, Wennerberg A. Surface characteristics of electrochemically oxidized implants and acid-etched implants: surface chemistry, morphology, pore configurations, oxide thickness, crystal structure, and roughness. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*. 2008; 23, 631–640

Sul YT, Kang BS, Johansson C, Um HS, Park CJ, Albrektsson T. The roles of surface chemistry and topography in the strength and rate of osseointegration of titanium implants in bone. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2009; 89, 942–950

Sul YT, Jönsson J, Yoon GS, Johansson C. Resonance frequency measurements in vivo and related surface properties of magnesium-incorporated, micropatterned and magnesium-incorporated TiUnite, Osseotite, SLA and TiOblast implants. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Oct;20(10):1146-55. Epub 2009 Aug 30.

Sundfeldt M, Johansson CB, Regnér L, Albrektsson T, Carlsson LV. Long-term results of a cementless knee prosthesis with a metal-backed patellar

component: clinical and radiological follow-up with histology from retrieved components. *J. Long Term Eff. Med. Implants.* 2003; 13, 341–354

Susin C, Qahash M, Polimeni G, Lu PH, Prasad HS, Rohrer MD, Hall J, Wikesjö UM. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7/rhOP-1): histological observations. *J Clin Periodontol.* 2010 Jun;37(6):574-81. Epub 2010 Mar 23.

Svanborg LM, Andersson M, Wennerberg A. Surface characterization of commercial oral implants on the nanometer level. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2009; 92B, 462–469

Syftestad G, Urist MR. Degradation of bone matrix morphogenetic activity by pulverization. *Clin Orthop Relat Res.* 1979 Jun;(141):281-5.

Teitelbaum, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000; v.289, n.5484, Sep 1, p.1504-8.

Thesingh CW, Burger EH. The role of mesenchyme in embryonic long bones as early deposition site for osteoclast progenitor cells. *Dev Biol.* 1983 Feb;95(2):429-38.

Torensma R, Ter Brugge PJ, Jansen JA, Figdor CG. Ceramic hydroxyapatite coating on titanium implants drives selective bone marrow stromal cell adhesion. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14:569.

Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS. Bone–implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol.* 2003; 74:945.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 4-10.

Urist MR, Dowell TA. Inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix. *Clin Orthop Relat Res.* 1968 Nov-Dec;61:61-78.

Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.* 1971; v.50, p.1392-1406,.

Urist MR, Nogami H, Mikulski A. A bone morphogenetic polypeptide. *Calcif Tissue Res* 1976;21 Suppl:81-87.

Urist MR, Granstein R, Nogami H, Svenson L, Murphy R. Transmembrane bone morphogenesis across multiple-walled diffusion chambers. New evidence for a diffusible bone morphogenetic property. *Arch Surg.* 1977 May;112(5):612-9.

Van de Putte KA, Urist MR. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop Relat Res.* 1965 Nov-Dec;43:257-70.

van der Horst G, van Bezooijen RL, Deckers MM, Hoogendam J, Visser A, Löwik CW, Karperien M. Differentiation of murine preosteoblastic KS483 cells depends on autocrine bone morphogenetic protein signaling during all phases of osteoblast formation. *Bone.* 2002 Dec;31(6):661-9.

Vetrone F, Variola F, Tambasco de Oliveira P, Zalzal SF, Yi JH, Sam J, Bombonato-Prado KF, Sarkissian A, Perepichka DF, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. *Nano. Lett.* 2009; 9, 659–665

Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(24):9484-8.

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

Wei AQ, Brisby H, Chung SA, Diwan AD. Bone morphogenetic protein-7 protects human intervertebral disc cells in vitro from apoptosis. *Spine J* 8:466–74, 2008
Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the

topographic evaluation of implant surfaces. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2000; 15, 331–344

Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin. Oral Implants Res.* 2009; 20 (Suppl 4), 172–184

Wennerberg A, Albrektsson T. A review of current knowledge, opinions and suggestions for possible common mechanisms behind the increased bone response reported to different types of modern oral implant surfaces. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2010 (in press)

Wenz HJ, Bartsch J, Wolfart S, Kern M. Osseointegration and clinical success of zirconia dental implants: a systematic review. *Int. J. Prosthodont.* 2008; 21, 27–36

Whitman M. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev* 1998;12:2445-2462.

Wikesjö UM, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Shanaman RH, Rohrer MD, Wozney JM, Hall J. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *J Clin Periodontol.* 2008 Nov;35(11):1001-10.

Wikesjö UME, Qahash M, Huang Y-H, Xiropaidis A, Polimeni G, Susin C: Bone morphogenetic proteins for periodontal and alveolar indications; biological observations –clinical implications. *Orthod Craniofac Res* 2009;12:263–270.

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

Yang Y, Kim KH, Ong JL. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process—an alternative to plasma spraying. *Biomaterials* 2005;26:327–337.

Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev.* 2000; 21:393–411.

Yilgor P, Tuzlakoglu K, Reis RL, Hasirci N, Hasirci V. Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2009;30(21):3551-9.

Zambuzzi, WF. Oliveira, RC. Pereira, FL. Cestari, TM. Taga, R. Granjeiro, JM. Rat Subcutaneous Tissue Response to Macrogranular Porous Anorganic Bovine Bone Graft. *Braz Dent J* 2006;17(4):274-278

Zambuzzi WF, Granjeiro JM, Parikh K, Yuvaraj S, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. Modulation of Src activity by low molecular weight protein tyrosine phosphatase during osteoblast differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2008;22:497-506.

Zambuzzi WF, Yano CL, Cavagis AD, Peppelenbosch MP, Granjeiro JM, Ferreira CV. Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. *Mol Cell Biochem* 2009;322:143-150

Zhang Y, Shi B, Li C, Wang Y, Chen Y, Zhang W, Luo T, Cheng X. The synergetic bone-forming effects of combinations of growth factors expressed by adenovirus vectors on chitosan/collagen scaffolds. *J Control Release.* 2009;19;136(3):172-8.

Zhou H., Wu T, Dong X, Wang Q, Shen J. Adsorption mechanism of BMP-7 on hydroxyapatite (001) surfaces. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;361:91–96.

B699 Bonato, Rafael da Silva

Avaliação do potencial osseoindutor da BMP-7 recombinante humana no reparo de defeitos ósseos em crânios de ratos, e na osseointegração de implantes de titânio em fêmures de coelhos / Rafael da Silva Bonato. - Niterói: [s.n.], 2010.

107 f.:il., 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal Fluminense, 2010.

1. Proteínas morfogenéticas ósseas.
2. Transplante heterólogo. 3. Materiais biocompatíveis. I. Título.

CDD 617.471059

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](#)