

**UNIVERSIDADE DE UBERABA**  
**PROPEPE – PRO-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO**  
**MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

*Análise radiográfica, histológica e histomorfométrica da administração local do fator  
de crescimento*

*Epidérmico (EGF), carregado por lipossomas, durante o reparo ósseo alveolar em ratos*

**UBERABA (MG)**

**2011**

**UNIVERSIDADE DE UBERABA**  
**PROPEPE – PRO-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO.**  
**MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

*Análise radiográfica, histológica e histomorfométrica da administração local do fator  
de crescimento*

*Epidérmico (EGF), carregado por lipossomas, durante o reparo ósseo alveolar em ratos*

**UBERABA (MG)**

**2011**

**MARIANA DA S. CASSIMIRO DE ARAÚJO**

***Análise histológica e histomorfométrica da administração local do fator de  
crescimento  
Epidérmico (EGF), carregado por lipossomas, durante o reparo ósseo alveolar em ratos***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba - UNIUBE, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração biopatologia.

Orientador: Prof. Dr. José Bento Alves

Co-orientadora: Profa. Dra. Elisângela Ribeiro da Silva

Uberaba (MG), 18, de fevereiro de 2011.

## BANCA EXAMINADORA

Maria Angélica Hueb de Menezes

Profa. Dra.

André Jerônimo

Prof. Dr.

José Bento Alves

Prof. Dr.

**FICHA CATALOGRÁFICA**

**“I’ll spread my wings and I’ll learn to fly...”**

*Kelly Clarkson*

*Dedico esse trabalho aos maiores  
amores da minha vida, minha mãe  
**Nilma** e meu pai **Dalmo**.*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela vida, saúde, paz, sorte, proteção, segurança, harmonia, castidade, amor, humildade, filantropia, altruísmo, prosperidade, diligência e temperança.

À **Universidade de Uberaba** na pessoa do Magnífico reitor **Dr. Marcelo Palmério**

Ao Professor **Dr. José Bento Alves** por esta formação, orientada com amor, valores éticos, paciência e conhecimentos infinitos.

À Professora **Dra Elisângela Ribeiro da Silva** pela cooperação, conhecimento, atenção e dedicação inigualável.

À **Fapemig** pelo financiamento dos meus estudos.

Às minhas alunas de iniciação científica **Paula** e **Ana Paula** pela colaboração.

Ao meu esposo **Marco Fábio** e meu filho **Breno** pelo amor, companheirismo, compreensão, apoio e amor incondicional.

À minha mãe **Nilma** pelas orações e amor único.

Ao meu pai **Dalmo** pelo exemplo de trabalho e força de vontade.

À minha avó **Iraci de Almeida (in memorian)**, por sempre guiar e iluminar meus caminhos.

Às minhas irmãs **Juliana** e **Eliana** pela motivação, companheirismo, carinho e ajuda.

Aos meus melhores amigos **Karla Kelly, Rogério, Marcelo, Adejair, Karina, Roberta Finzi e Ricardo Canato (in memorian)** pelo carinho, apoio incondicional, e alegria constante.

À técnica do laboratório **Cristiane Rufato** pela ajuda e enriquecimento intelectual.

Ao funcionário do biotério **Luís Fernando** pela amizade e colaboração de sempre.

Aos **professores do mestrado** pelo conhecimento abundante.

Aos **colegas de mestrado**, pela energia positiva e auxílio diário.

Aos **companheiros de laboratório** pelas dicas valiosas.

A **todos** que diretamente ou indiretamente contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.



## RESUMO

O processo de reparo ósseo dos maxilares é mediado por uma cascata de eventos moleculares, na qual participam fatores de crescimento e seus receptores. O conhecimento das moléculas sinalizadoras durante a dinâmica da cicatrização alveolar e remodelação dos tecidos periodontais, pode tornar o tratamento mais rápido e permitir, por meio da modulação biológica, o alcance dos objetivos clínicos, estéticos e funcionais, com maior qualidade e menor comprometimento dos tecidos envolvidos. Este trabalho propôs-se a avaliar o efeito da administração local de EGF (Fator de Crescimento epidérmico) veiculado às vesículas de lipossomas, no processo cicatricial em alvéolos dentários de ratos, após exodontia de segundos molares superiores. Foram utilizados 48 ratos machos *Wistar* com peso corporal entre 250-300g. Após exodontia, os animais foram distribuídos em 3 grupos, os quais receberam microinjeções de: I)- PBS, II)- lipossomas vazios; III)- EGF 20ng/μL-Lipossoma. Os animais foram sacrificados após 03, 07, 14 e 21 dias. Fragmentos de maxilas foram fixados em FNT 10% por 48 horas, desmineralizados em EDTA 10% e incluídos em parafina. Os fragmentos foram processados para análise histológica (coloração de hematoxilina-eosina-HE). A administração de EGF em lipossoma proporcionou um aumento significativo no reparo ósseo com 14 e 21 dias, observando um aumento na densidade radiográfica e na quantidade de osso neoformado para o lado experimental, quando comparado ao lado controle.

**Palavras chaves:** Fatores de crescimento. Lipossoma. Reparo ósseo. EGF.

## ABSTRACT

The repair process of the jaw bone is mediated by a cascade of molecular events, involving growth factors and their receptors. The knowledge of signaling molecules during the cellular dynamics of wound healing and remodeling of periodontal tissues, may make the treatment more quickly and allow, through the biological modulation, the range of clinical objectives, aesthetic and functional, with better quality and less involvement of the tissues involved. This study aimed to evaluate the effect of local administration of EGF (Epidermal Growth Factor) conveyed the vesicles of liposomes in the healing process in the dental alveoli of rats after extraction of second molars. We used 48 male Wistar rats weighing between 250-300g. After extraction, the animals were divided into three groups, which received infusions of: 1 - PBS. 2 - empty liposomes; 3 - EGF 20ng/μL-Liposome. The animals were sacrificed after 03, 07, 14 and 21 days. Jaw fragments were fixed in 10% NBF for 48 hours, demineralized in 10% EDTA and embedded in paraffin. The fragments were processed for histological (hematoxylin-eosin-HE). The administration of EGF in liposomes provided a significant increase in bone repair with 14 and 21 days, an observable increase in radiographic density and the amount of new bone formation for the experimental side when compared to the control side.

**Keywords:** growth factors. Liposome. Bone repair. EGF

**LISTA DE ABREVIATURAS**

aFGF	-	Fator de Crescimento Fibroblástico ácido
bFGF	-	Fator de Crescimento Fibroblástico básico
BIO OSS	-	Osso desproteinizado liofilizado bovino
BMP	-	Bone morphogenetic proteins
CDPM	-	Proteínas morfogenéticas derivadas de cartilagem 1
FGF	-	Fator de crescimento do fibroblasto
GDF	-	Fator de crescimento e diferenciação
HE	-	Hematoxilina e eosina
HNa	-	Hialuronato de sódio
IGF- I	-	Fator de crescimento insulínico I
IGF-II	-	Fator de crescimento insulínico II
kDA	-	Kilo daltons
KDR	-	Kinase domain region
MMPs		Metaloproteinases de matriz
MDDA	-	Matriz dentinária desmineralizada autógena
MDHD	-	Matriz dentinária humana desmineralizada
MEC	-	Matriz extracelular
PTFE	-	Politetrafluoretileno
NCP	-	Proteínas não colagenosas
PDG-F	-	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PRP	-	Plasma rico em plaquetas
ROG	-	Reparo ósseo guiado
RTK	-	Receptor tirosina quinases
TGF- $\beta$ -I	-	Fator transformador beta I
TGF- $\beta$ -II	-	Fator transformador beta II
VEGF	-	Fator de crescimento vascular endotelial
Vgr	-	Gene do grupo transformador de fator de crescimento
VPF	-	Fator de permeabilidade vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>19</b>
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
<b>3</b>	<b>Material e métodos.....</b>	<b>20</b>
3.1	Animais.....	20
3.2	Procedimento cirúrgico.....	20
3.3	Distribuição das amostras.....	21
3.4	Preparação dos lipossomas e citocinas.....	22
3.5	Vias de administração.....	22
3.6	Eutanásia dos animais.....	23
3.7	Processamento radiográfico dos espécimes para análise.....	23
3.8	Processamento histológico dos espécimes para análise.....	24
3.9	Análise histológica.....	25
3.10	Análise histomorfométrica.....	25
3.11	Análise estatística.....	27
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>28</b>
4.1	Análise radiográfica da neoformação óssea.....	28
4.2	Análise microscópica descritiva da resposta tecidual.....	28
4.2.1	Análise histológica 03 dias.....	29
4.2.2	Análise histológica 7 dias.....	29
4.2.3	Análise histológica 14 dias.....	31

4.3	Análise histomorfométrica da resposta tecidual.....	33
5	<b>Discussão.....</b>	<b>34</b>
6	<b>Conclusão.....</b>	<b>40</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Cada vez a odontologia tem buscado aprimorar técnicas que objetivam devolver funcionalidade e estética ao sistema estomatognático, nesse contexto é importante que consideremos a importância do osso alveolar, visto que o elemento dental encontra-se ancorado nessa estrutura, e todos os procedimentos odontológicos dependem da integridade óssea dos processos alveolares.

Denomina-se de processo alveolar a porção da maxila ou da mandíbula que sustenta e protege os dentes. Assim como o osso em outros sítios, o osso alveolar também funciona como um tecido mineralizado de suporte, oferecendo inserção aos músculos e promovendo um arcabouço para a medula óssea. Possui grande resistência como propriedade biológica devido a sua plasticidade, permitindo que seja remodelado conforme suas demandas funcionais. Requer estímulos funcionais para manter a massa óssea, dependendo da presença de dentes para seu desenvolvimento e manutenção (BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAM, 2004b).

Apesar do alto poder de reparo do tecido ósseo, algumas feridas não conseguem a reconstrução do defeito de forma satisfatória, demandando investigações continuadas na natureza da osteogênese e em métodos de controlá-la. A compreensão dos eventos básicos do processo de reparo ósseo constitui a base para o desenvolvimento de novas técnicas para estimulá-lo. Terapias para reconstrução óssea são pré-requisitos essenciais para a reabilitação do sistema estomatognático, especialmente na correção de perdas traumáticas ou mudanças atróficas do processo alveolar da maxila ou mandíbula (WILTFANG *et al.*, 2004).

Tem sido notável o desenvolvimento dos Biomateriais utilizados em cirurgia ortopédica, traumatológica e maxilofacial, particularmente dos substitutos ósseos. Esses podem ser definidos como “todo o material de origem humana, animal, vegetal ou sintético, destinado à implantação no homem com a perspectiva de uma reconstituição do tecido ósseo, para o reforço de uma estrutura óssea ou para o preenchimento de uma perda de substância óssea de origem traumática ou ortopédica (MARINARD, FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, 1997)

O desenvolvimento de novas tecnologias e biomateriais para auxiliar nos complexos processos de reparo ósseo dependem do conhecimento das vias moleculares que cercam a

formação óssea, e, em particular, da relação existente entre as células progenitoras e o ambiente específico, no qual irão diferenciar-se em suas células de destino, bem como da interação com biomateriais que sejam usados no preenchimento de tais defeitos

Particularmente com relação ao estudo do reparo ósseo, tem se buscado entender a regulação da aposição e reabsorção óssea via identificação de proteínas sinalizadoras responsáveis por estes processos (DUCY, SCHINKE KARSENTY, 2000; RODAN & MARTIN, 2000; TEITELBAUM 2000; ALVES *et al.*, 2009). O avanço nesta área poderá contribuir para o desenvolvimento ou melhoria do tratamento de perdas ósseas, minimizando o tempo de reparo. Não só a Odontologia almeja por esse avanço mais também outras áreas como: medicina, medicina veterinária, fisioterapia entre outras.

Várias moléculas sinalizadoras como membros dos fatores de crescimento fibroblásticos (FGF), fatores de crescimento epidérmico(EGF), fator de crescimento transformante (Beta)  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), proteína morfogenética óssea (BMP), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são expressos e ativos durante o desenvolvimento e reparo ósseo, cada qual com sua função específica. A aposição e reabsorção óssea são então eventos dinâmicos, dependentes da ação de fatores de crescimento como o EGF e as Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs), metaloproteinases de matriz (MMPs), fosfatase alcalina, fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e óxido nítrico (NO) (MANDRACCHIA, NELSON, BARP, 2001; STREET *et al.*, 2002; ZELZER, 2002; GERSTENFELD *et al.*, 2003; AROSARENA & COLLINS 2005; LIZUKA *et al.*, 2005).

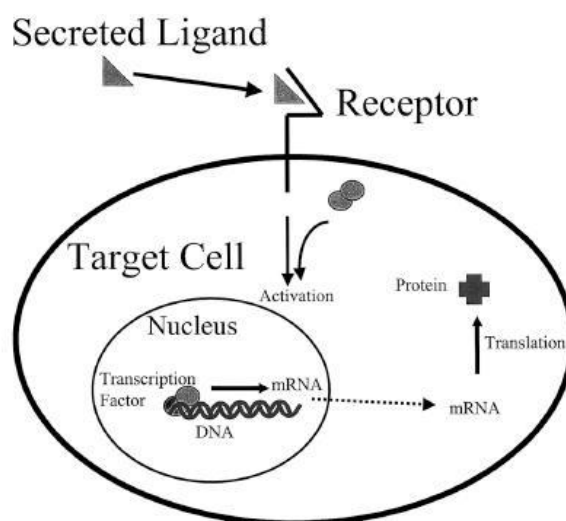
Muitas estratégias têm sido desenvolvidas para acelerar o reparo ósseo em ferimentos, incluindo fatores de crescimento exógenos, enxertos ósseos, além da evolução e desenvolvimento de novas vias de administração de agentes indutores e drogas osteogênicas (BAGI *et al.*, 1994; LINKHART *et al.*, 1996). Um dos objetivos das terapias teciduais esqueléticas é acelerar o processo de cicatrização, diminuindo o período de maturação óssea, focalizando uma ou mais fases do processo de reparo: inflamação, revascularização, osteoindução, osteocondução e remodelação (COLNOT *et al.*, 2005; GIAVARESI *et al.*, 2005).

Fatores de crescimento podem ativar ou regular uma grande variedade de funções celulares, estimulando a diferenciação, proliferação, migração, adesão celular e expressão de genes (LUGINBUEHL *et al.*, 2004; KRISHNAN, 2006). Possuem efeitos sobre as células

da mesma classe (fatores autócrinos) ou sobre as células de outra classe dentro do tecido (fatores parácrinos), e estão presentes na circulação, podendo agir localmente ou como reguladores sistêmicos do metabolismo esquelético. Possui ação direta e importante tanto no crescimento celular, como na aposição e reabsorção óssea e, possivelmente na patofisiologia das disfunções ósseas (HILL, 1998).

O termo Fator de Crescimento (GF) refere-se a uma classe de proteínas sinalizadoras que possui ação direta e importante tanto no crescimento como na diferenciação para determinadas linhagens celulares. Uma indução celular efetiva depende de vários parâmetros, os quais incluem a concentração dos GFs no meio extracelular, o tempo e duração da exposição, o tipo de célula alvo e seu estado de diferenciação, a expressão de receptores específicos e a presença de outros GFs, os quais podem promover efeitos sinérgicos ou antagonistas (GIANNOBILE, WHITSON, LYNCH, 1997; SCHMIDMAIER *et al.*, 2003; CHAUDHARY *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005).

O efeito dos fatores de crescimento é mediado por receptores de superfície das células alvo pela ativação intracelular de enzimas fosforiladas, as quais induzem uma via de sinalização intracelular pela agregação de co-fatores e outras proteínas, os quais migram para o núcleo(fig.1). Juntos com outros fatores de transcrição eles ativam um sítio de genes, os quais então exercem trocas específicas na atividade celular ou fenótipo (SCHLIEPHAKE, 2002).



**Figura 1** – Complexo Ligante-receptor para fatores de crescimento e fatores de transcrição Fonte: Adaptado de Lieberman et al .(2002).



Devido ao conhecimento do efeito individual dos GFs nas atividades de diferentes tipos celulares, cada proteína/peptídeo tem sido utilizada pelos pesquisadores, numa série de estratégias para promover a cicatrização tecidual, normalmente em conjunto com sistemas de entrega, ou seja, veículos para disponibilização de drogas para controlar a velocidade, tempo e quantidade de liberação (LIEBERMAN *et al.*, 2002; LUGINBUEHL *et al.*, 2004; ROSE *et al.*, 2004; ANITUA *et al.*, 2007; LEE & SHIN, 2007).

No tecido ósseo, as terapias com os GFs têm sido aplicadas na promoção e, em alguns casos, na indução da formação de novo osso em defeitos ósseos, nos sítios de reparo de fraturas e, também, em áreas adjacentes de implantes metálicos. (BESSHO *et al.*, 1999; RAMOSHEBI, 2002; SCHLIEPHAKE, 2002; KLOEN *et al.*, 2003).

Durante o processo de reparo ósseo a angiogênese tem um papel importante para a formação de novos vasos sanguíneos, a partir de capilares pré-existentes (CHAIN, JONES, TARNAWSKI, 2004). O fator de crescimento epidérmico(EGF) estimula a angiogênese e a permeabilidade vascular, bem como induz o crescimento de tecido epitelial. Este fator também tem um efeito proliferativo em fibroblastos periosteais e osteoblastos (HUDSON-GOODMAN, GIRARD, JONES, 1990; TONZUM & DEMIRALP, 2003). Fibroblastos, queratinocitos, macrófagos e células endoteliais respondem produzindo e liberando MMPs mediante estímulos de mediadores catabólicos como EGF (WAHL & CORCORAN, 1993).

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um polipeptídeo de 6100 Da ou 6 kDa, uma cadeia polipeptídica de 53 aminoácidos residuais que contêm três cadeias dissulfídicas, as quais são importantes na sua atividade biológica. Mitógeno potente, tem sido detectado no plasma, líquido amniótico, urina, saliva, epitélio juncional da gengiva e trato gastrointestinal (LAATO,1988 ).

O EGF atua pela ligação a receptores específicos na membrana celular, estabelecendo uma cascata de eventos que levam à indução, ao favorecimento ou à inibição de inúmeros genes citocina-regulados no núcleo celular. O EGF regulará a proliferação, a diferenciação e a transformação celular *in vitro* e tem importante papel nos processos de desenvolvimento *in vivo* (CAM, NEUMANN, RUCH, 1990; SZACHOWICZ, 1995; TROWBRIDGE & EMLING, 1996).

A disponibilização local de fatores de crescimento no alvéolo do dente extraído pode favorecer os procedimentos clínicos no reparo ósseo. Para tanto, seria necessário um

sistema capaz de liberar o composto terapêutico de forma gradual e constante durante o processo de cicatrização alveolar. Os lipossomas têm sido os carreadores de escolha como veículo de distribuição para compostos biologicamente ativos. São partículas esféricas microscópicas, cujas membranas, desenvolvidas com uma ou mais bicamadas lipídicas, encapsulam uma fração de solvente que ficam suspensos em seu interior(fig.2). Em comparação com outros carreadores, os lipossomas têm algumas vantagens, como degradabilidade biológica e relativa segurança toxicológica e imunológica (LASIC, 1993).



**Figura 2** – Estrutura unilamelar do lipossoma. FONTE: Adaptado de *Chorilli et al., 2004.*

Refinamentos nas técnicas de engenharia tecidual ao longo da década passada possibilitaram a regeneração óssea *in vivo* em muitos modelos animais e a transmissão destas técnicas para aplicações ortopédicas. Enquanto esses avanços são promissores para uma eventual regeneração óssea guiada nos maxilares, muito ainda precisa ser compreendido sobre a interação de biomoléculas envolvidas na cicatrização óssea e sobre o melhor método de administração destes fatores (AROSARENA & COLLINS, 2005, WONG & RABIE, 2005).

O método mais empregado na avaliação do reparo ósseo é o histológico, seguido da análise das imagens por algum sistema computacional que possa quantificar, por exemplo, o tecido ósseo neoformado (SASAKI, T.; WATANABE 1995). O acompanhamento radiográfico tem sido utilizado como um importante meio de avaliação do nível ósseo (Reddy & Wang, 1999; Tavano *et al.* 1999). Sendo assim a associação desses métodos apresenta

alto grau de precisão, podendo determinar pequenas alterações ósseas que possam ocorrer durante um determinado período de tempo (Frederiksen,1995).

Considerando o potencial do uso dos Fatores de Crescimento (GFs) carregados por lipossomas, este estudo teve como objetivo a avaliação radiográfica, histológica e histomorfométrica, durante o processo de reparo de feridas alveolares de ratos, preenchidas ou não com EGF carregado por lipossomas, no reparo ósseo alveolar.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o processo de reparo ósseo em alvéolos dentais de ratos após administração de EGF carreado por lipossoma.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar por meio de análise radiográfica digital a densidade do processo de reparo ósseo neoformado em alvéolos dentais de ratos, tratados ou não com EGF carreado por lipossoma, com 03, 07, 14 e 21 dias após a exodontia.
- Avaliar histológica e histomorfométricamente o efeito da administração de EGF carreado por lipossoma na neoformação óssea. Caracterizar as alterações durante o processo de reparo ósseo em alvéolos dentais de ratos, 03, 07, 14 e 21 dias após a exodontia.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

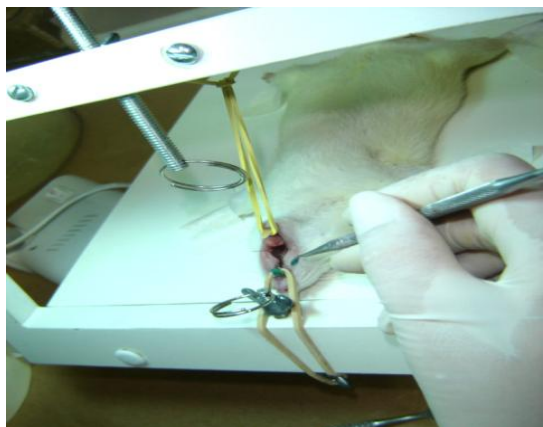
#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 36 *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar* adultos machos, com peso médio entre 250 e 300 gramas e idade média de 03 meses, provenientes do Biotério da Universidade de Uberaba (UNIUBE), campus aeroporto.

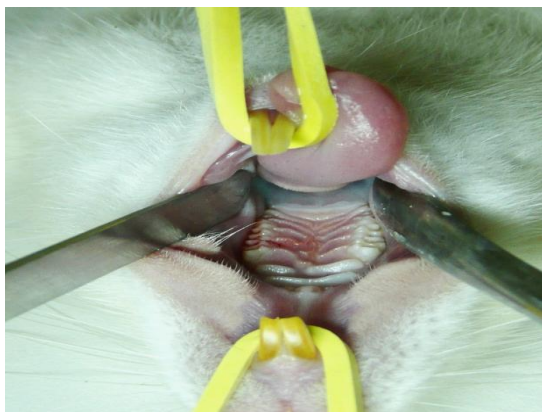
Durante o período experimental os animais foram mantidos em biotério apropriado, acondicionados em gaiolas plásticas contendo um número máximo de 04 animais, sob temperatura ambiente e controle de luz automática (07h-19h). Os animais foram alimentados com ração comercial granulada para roedores (Labina, Purina) e água *ad libitum*. O manuseio dos animais seguiu as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o projeto de pesquisa avaliado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade de Uberaba (UNIUBE), com protocolo número 082/2009.

#### 3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para a realização das cirurgias, os animais foram anestesiados através de injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (Rompun®, Bayer) (0,1ml/100g), utilizado como sedativo e relaxante muscular, e cloridrato de Ketamina 10% (Ketalar®, Parke-Davis) (0,1ml/100g), como anestésico geral. Utilizando-se um instrumento de Holleback para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação,(Fig.3a) foram extraídos os dentes segundos molares superiores direitos e esquerdos. No lado direito das arcadas os alvéolos foram utilizados como controle do processo de reparo ósseo, tendo sido naturalmente preenchido com coágulo. No lado esquerdo, experimental, foram administrados; PBS, lipossomas vazios, EGF em lipossomas (20 ng/ml).(fig3b)



**Figura 3a:** Utilizando-se um instrumento de Hollemback para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação, (Fig.3a)



**Figura 3b :** No lado direito das arcadas os alvéolos foram utilizados como controle do processo de reparo ósseo, tendo sido naturalmente preenchido com coágulo. No lado esquerdo, experimental, foram administrados; PBS, lipossomas vazios, EGF em lipossomas (20 ng/ml). (fig3b)

### 3.3 Distribuição das amostras

Todos os animais foram submetidos a exodontia dos segundos molares superiores direito e esquerdo. O lado direito constitui o lado controle, preenchido com o coágulo. No lado esquerdo, experimental, foram administrados: GRUPO I: PBS; GRUPO II: Lipossomo vazio; GRUPO III: 20ng/ $\mu$ L de EGF em lipossomas. Os animais foram sacrificados aos 03, 07, 14 e 21 dias após os procedimentos cirúrgicos. Quatro animais por período, para cada grupo, foram utilizados totalizando 48 animais (Quadro I)

GRUPOS	TRATAMENTO		PERIODOS			
	DIREITO	ESQUERDO	3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
I	Coagulo	PBS	4 animais	4 animais	4 animais	4 animais
III	Coagulo	EGF 20ng/ $\mu$ L- Lipossoma	4 animais	4 animais	4 animais	4 animais
II	Coagulo	20ng/ $\mu$ L Lipossoma vazio	4 animais	4 animais	4 animais	4 animais

Quadro I: Distribuição das amostras

### 3.4 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS E CITOCINAS – LIPOSSOMAS

As soluções foram preparadas no Laboratório de Biopatologia e Biologia Molecular da Universidade de Uberaba, sob a orientação do professor Dr. Tony Paiva Paulino.

Seguindo as normas pré estabelecidas:

Os lipossomas foram preparados por sonicação, empregando-se 12,0 mg de dipalmitoil fostatidil colina (DPPC) e 1,2 mg de lisofosfatidil colina (LPC), os quais foram dissolvidos conjuntamente em 4 mL de clorofórmio (em um tubo de ensaio 120 X 12 mm). Em seguida, esta solução foi seca sob uma atmosfera de nitrogênio. Após secagem, 4 mL de tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) foram adicionados ao filme obtido e, em seguida, incubados a 60°C durante 1 hora, com intervalos de uma vigorosa agitação a cada 10 minutos. Após este período de incubação, a mistura foi sonicada por 4 minutos com um sonicador de ponta (VibraCell, modelo VC 600). O preparo dos fatores de crescimento – lipossoma, ocorreu da mesma maneira, sendo que a proteína (10 µL da solução estoque) foi adicionada à fase aquosa (990 µL) antes da incubação.

Ambas as misturas (lipossomas e fatores de crescimento-lipossomas) foram centrifugadas a 100.000xg durante 20 minutos (Ultracentrífuga Hitachi Himac 70 MX). O sobrenadante corresponde às vesículas unilamelares relativamente homogêneas, as quais foram avaliadas através de medidas de espalhamento de luz.

### 3.5 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

A administração foi realizada dentro dos alvéolos logo após a extração dos segundos molares superiores, utilizando para este procedimento, uma seringa de precisão, graduada em microlitros (Fig.4) da marca HAMILTON COMPANY®. As microinjeções foram aplicadas dentro do coágulo, com volume de 1µL, com seringa posicionada verticalmente, paralela ao primeiro e terceiros molares.



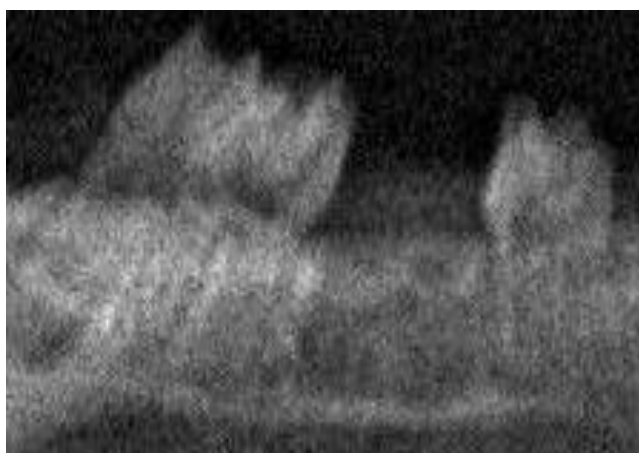
**Figura 4:** Seringa Hamilton Company®

### 3.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, conforme protocolo padrão do comitê de ética. Em seguida, foram decapitados, as maxilas dissecadas, e fixadas por 48 hs à temperatura ambiente em solução de formalina neutra tamponada a 10%. Após fixação, as maxilas foram rapidamente lavadas em água corrente, separadas na linha mediana, radiografadas e transferidas para solução desmineralizadora.

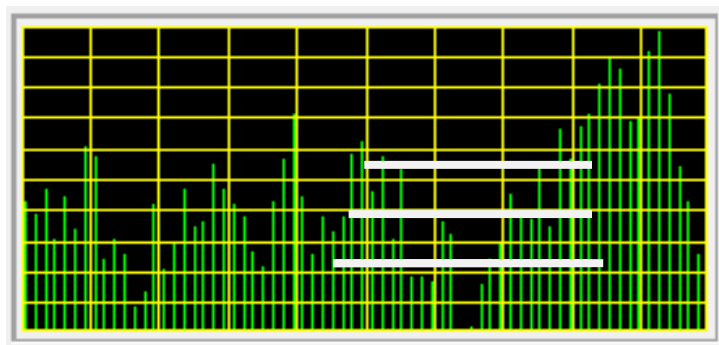
### 3.7 PROCESSAMENTO RADIOGRÁFICO DOS ESPÉCIMES PARA ANÁLISE

As hemi-maxilas, direitas (controle) e esquerdas (teste) foram radiografadas utilizando-se um filme radiográfico periapical e um aparelho radiográfico (Dabi-Atlante). Os filmes foram revelados de forma padronizada, dentro da câmara escura por 2 minutos à temperatura ambiente. As imagens (Fig 5) radiograficas foram capturadas e armazenadas em um banco de dados até o momento da avaliação. Para determinar a densidade óssea, utilizamos o programa SIDEXIS. Em cada imagem, foram traçadas linhas na região apical, na região média e na região cervical dos alvéolos dos diferentes grupos de animais. Os pontos obtidos em cada uma das regiões, representados no gráfico (Fig 6) foram convertidos em valores numéricos. Na figura 6 com um **click em copy** é possível copiar os dados e salvá-los em uma planilha do Excel. Pode-se então determinar as médias e os desvios padrão representando as áreas do alveolo. Os dados foram analisados estatisticamente (Teste Tukey seguido teste de Dun).

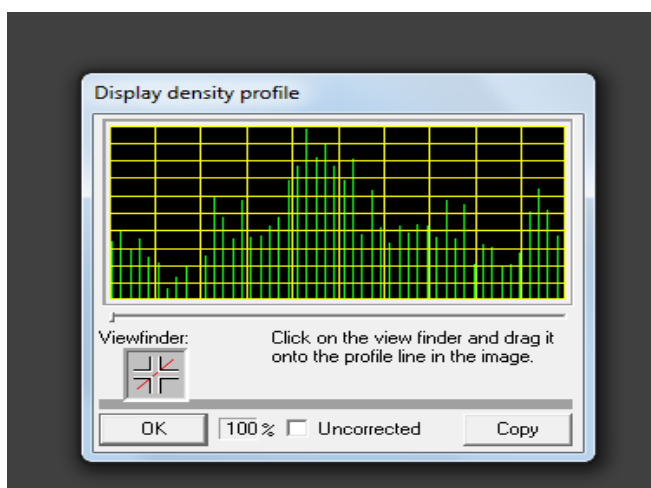




**Figura 5:** Foram traçadas linhas na região apical, na região média e na região cervical dos alvéolos dos diferentes grupos de animais



**Figura 6:** Os pontos obtidos em cada uma das regiões, representados no gráfico



**Figura 7:** Com um **click em copy** é possível copiar os dados e salvá-los em uma planilha do Excel.

### 3.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS ESPÉCIMES PARA ANÁLISE

Após a fixação, as maxilas foram desmineralizadas em solução tamponada de EDTA (Ácido diaminotetracético) a 10%, (ph entre 7,2 e 7,4) à temperatura ambiente, com trocas a cada 2 dias, durante um período de 40 dias. Após a desmineralização as maxilas foram lavadas em H<sub>2</sub>O corrente por uma noite e separadas em metades direita e esquerda. Os fragmentos foram então, processados para análise histológica e histomorfométrica, conforme protocolo a seguir:

- Desidratação: os tecidos foram mergulhados em uma série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II, absoluto III), com um tempo de 30 minutos em cada banho;
- Diafanização: os tecidos foram mergulhados em três banhos de xilol, durante 30 minutos em cada banho;
- Infiltração: foram realizados três banhos em parafina a 58°C, durante 90 minutos em cada. Após o último banho, as peças foram incluídas em blocos de parafina.

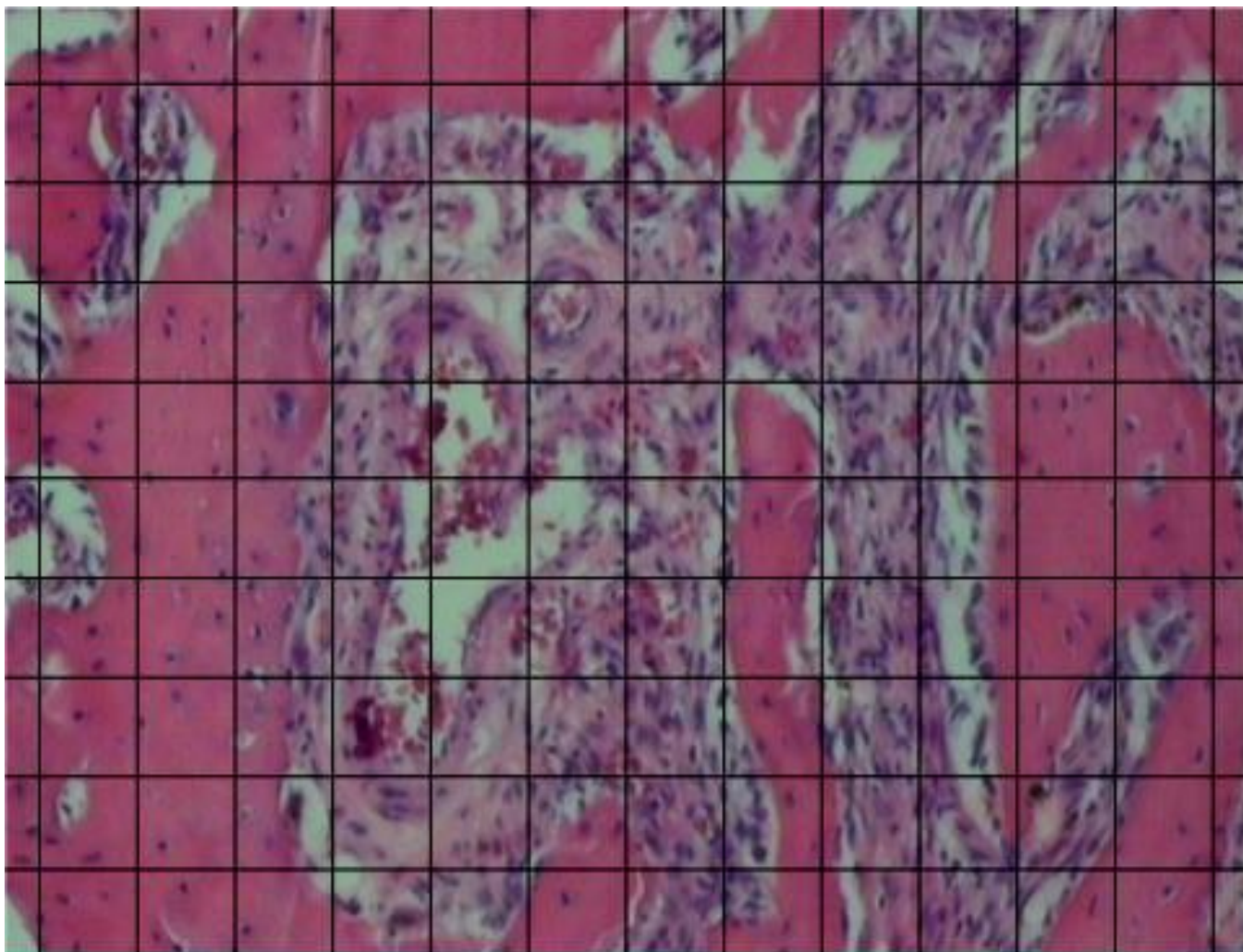
Os blocos de parafina de todos os animais foram cortados no sentido longitudinal antero-posterior, em um micrótomo, obtendo-se cortes seriados de seis micrômetros de espessura. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro e deixados secar durante um dia. Em seguida, foram realizados os procedimentos de coloração de hematoxilina-eosina (HE) para análises histológicas.

### 3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes foram feitos com 6µm de espessura coletadas em as lâminas histológicas e coradas com hematoxilina-eosina (HE). Em seguida as lâminas foram analisadas pela microscopia de luz convencional para estudo histológico. Os cortes foram analisados procedendo-se à leitura em varredura longitudinal, utilizando-se um microscópio (Carl Zeiss ICS KF2). Os critérios para análise histológica foram: 1- característica do tecido conjuntivo que preenche o alvéolo, sua organização e maturação; 2- presença de células ósseas, bem como a presença de tecido ósseo neoformado, vasos sanguíneos e; 3- presença de reação inflamatória nas áreas experimental e controle.

### 3.10 - ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para análise quantitativa da neoformação óssea utilizou-se um retículo milimetrado (LACERDA, 1995), construído no programa Power Point ® 2002 (Figura 6). Este retículo foi elaborado a partir de um sistema de linhas, dividindo a imagem em quadrados espaçados por um intervalo de 1cm, que foi superposto às fotomicrografias utilizando-se o programa Confocal Assistance© evitando assim, distorção durante superposição de imagens. A avaliação das trabéculas foi feita considerando as estruturas localizadas na interseção das linhas do retículo. Para as contagens foi utilizado o software UTHSCSA Image Tool© 2.03. Os resultados são apresentados como médias e os desvios padrão.



**Figura 8** – Lamina histológica mostrando a colocação de retículo milimetrado utilizado para contagem de vasos, osteoclastos e osso neoformado. Fonte: Lacerda, 1995.

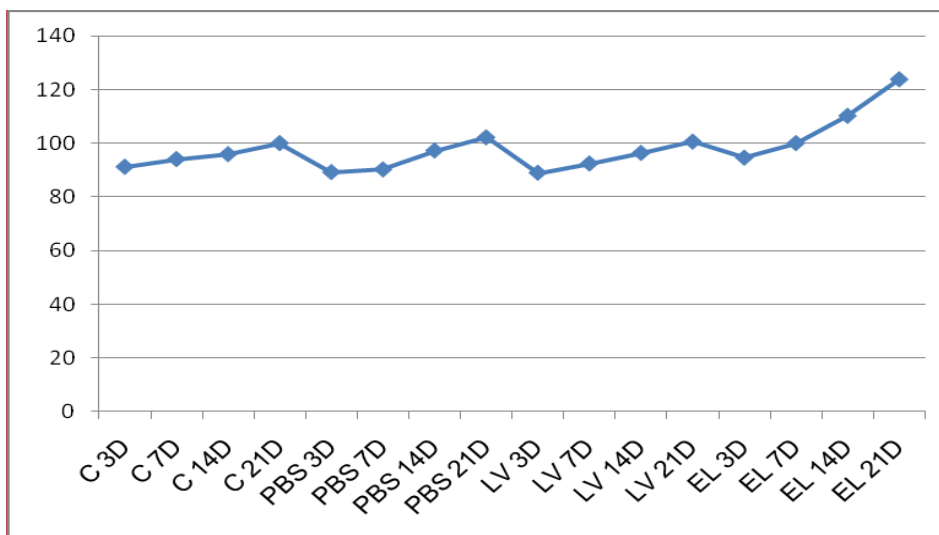
### 3.11 – Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente, pelo teste de Tukey, seguido do teste de Dun. Foram considerados estatisticamente significantes valores com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1-Análise radiográfica da neoformação óssea

Utilizando o software SIDEXIS, avaliamos a densidade do processo de reparo dos alvéolos em três diferentes níveis, apical médio e cervical. Os resultados representam as médias dos diferentes pontos obtidos. Observamos sempre valores maiores para a região apical, seguida da média e cervical onde os valores foram menores. Optamos por utilizar a média dos valores, para a densidade do processo de reparo e comparar com dados histológicos da neoformação óssea dos alvéolos nos diferentes grupos. Os dados estão expressos no gráfico 1. A análise do gráfico mostra que o lado direito (controle) de todos os grupos apresentou um padrão de densidade crescente, sendo menor aos 3 dias, alcançando índices mais elevados aos 21 dias após os procedimentos cirúrgicos. Resultados semelhantes foram observados nos alvéolos do lado esquerdo aos 3, 7, 14 e 21 dias nos animais tratados com PBS e Lipossomo vazio. Nos animais tratados com EGF em lipossomos, os valores foram maiores aos 14 e 21 dias, com uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )



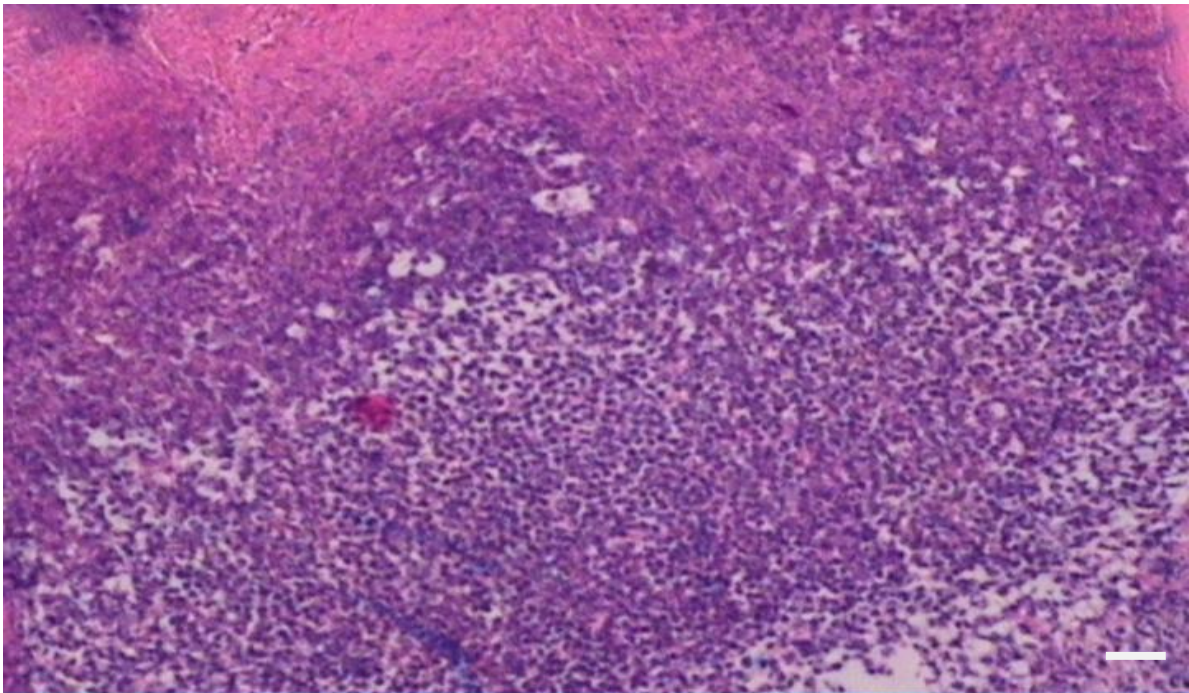
**Gráfico 1.** Médias dos valores de densidade do processo de reparo alveolar no lado direito (controle) e esquerdo, com diferentes tratamentos e intervalos de tempo. Teste Tukey  $p < 0,05$ .

### 4.2-Análise microscópica descritiva da resposta tecidual.

Tanto o lado direito (controle), quanto lado esquerdo (experimental), em todos os períodos, apresentaram aspecto histológico com os eventos clássicos da reparação óssea: inflamação, formação do tecido de granulação, formação de tecido ósseo primário e substituição deste por osso lamelar.

#### 4.2.1-Análise Histológica Período de 3 dias:

Aos três dias a área do defeito ósseo cirúrgico tanto do lado direito (controle) quanto do lado esquerdo (experimental), apresentou organização tecidual semelhante, caracterizada por tecido conjuntivo vascularizado e intenso processo inflamatório nos animais dos três grupos. Não foram observadas neoformação óssea (Figura 09).



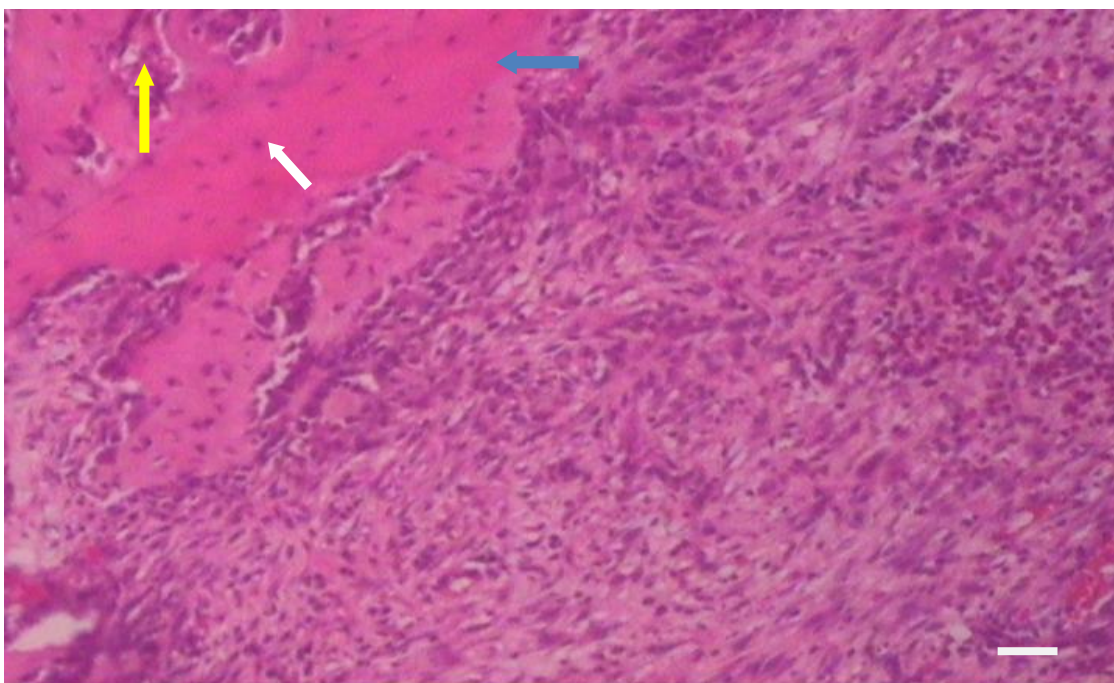
**Figura 09**-Aspecto histológico do alvéolo três (3) dias após os procedimentos cirúrgicos. A figura representa tanto o lado direito como o esquerdo. Não foram observadas diferenças no padrão histológico. Hematoxilina e Eosina. Barra 20  $\mu$ m.

#### 4.2.2-Análise Histológica Período de 7 dias:

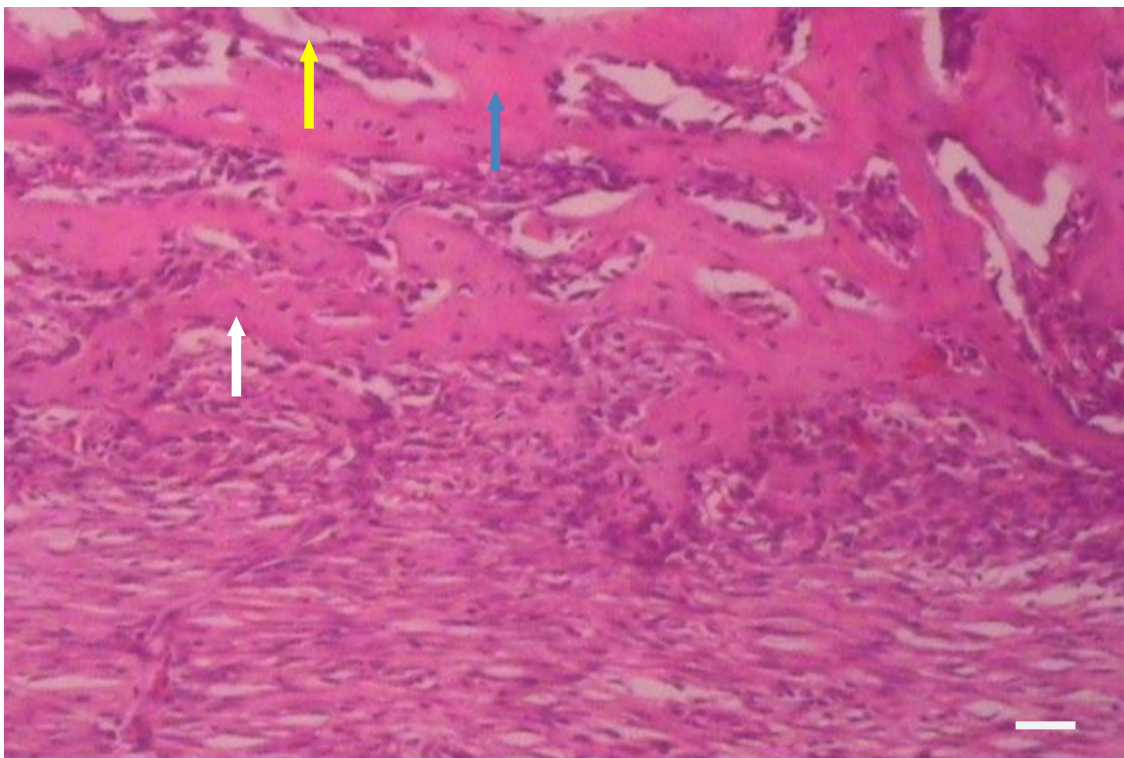
Aos sete dias, a organização tecidual do processo de reparo foi semelhante no lado controle e experimental nos grupos I (tratados com PBS) e II (tratados com Lipossomos vazios). A área do defeito ósseo cirúrgico, apresentou-se preenchida por tecido conjuntivo

vascularizado, bem mais organizado em relação ao período anterior. Na porção superior do alvéolo existe tecido conjuntivo menos organizado associado a infiltrado inflamatório. Este período foi caracterizado pela formação das primeiras trabéculas ósseas a partir do fundo do alvéolo (Figura 10).

A análise do processo de reparo nos alvéolos do lado esquerdo do grupo III (tratados com EGF em lipossomos), mostrou, além de tecido conjuntivo mais organizado agrupamentos de osteoblastos intimamente associados à neoformação óssea, sugerindo maior quantidade de trabéculas do que nos grupo I e II (Figura 10).



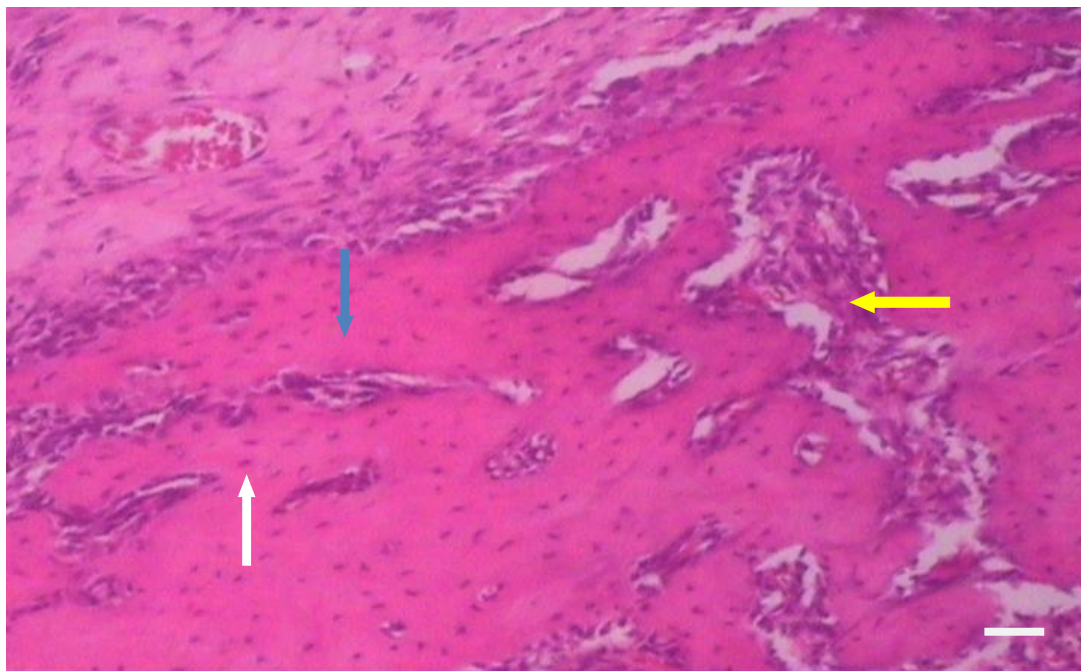
**Figura 10-** Aspecto histológico dos alvéolos controles e tratados com PBS e com Lipossomos vazios. Seta amarela Espaços medulares. Seta azul trabécula óssea. Seta branca osteócito. Hematoxilina e Eosina. Barra 20 µm.



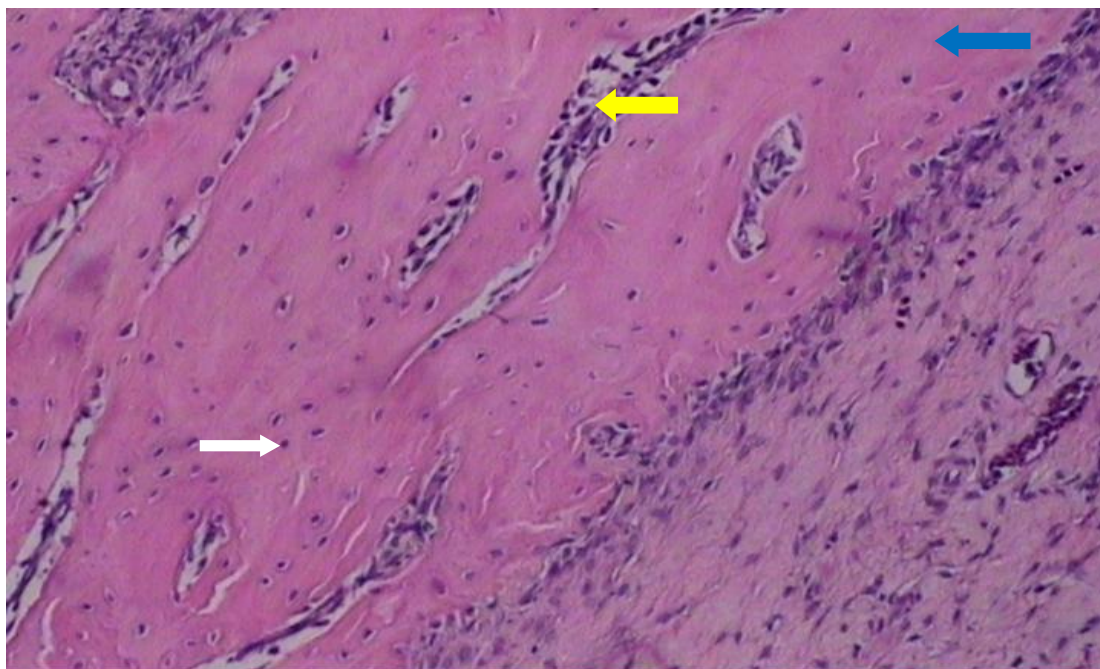
**Figura 11-** Aspecto histológico dos alvéolos tratados com EGF em Lipossomos. Seta amarela Espaços medulares. Seta azul trabécula óssea. Seta branca osteócito. Hematoxilina e Eosina. Barra 20  $\mu$ m.

#### 4.2.3-Análise Histológica Período de 14 dias:

Aos quatorze e 21 dias a organização tecidual em todos os grupos eram muito semelhantes. Grande parte dos alvéolos estavam preenchidos com trabéculas ósseas neoformadas a partir do fundo do alvéolos. Nota-se todavia, diferenças na organização e distribuição dos componentes teciduais envolvidos no processo de reparo alveolar. Enquanto nos alvéolos controle e tratados com PBS e Lipossomos vazios as trabéculas exibiam um padrão mais imaturo com amplos espaços medulares (Fig. 12), nos alvéolos dos animais tratados com EGF em Lipossomos, os espaços medulares eram menores e as trabéculas apresentam menor número de osteócitos (Fig 13).



**Figura 12** - Aspecto histológico dos alvéolos 14 dias lado direito (controle) e lado esquerdo (tratados com PBS ou com Lipossomos vazios). Seta amarela Espaços medulares. Seta azul trabécula óssea. Seta branca osteócito. Hematoxilina e Eosina. Barra 20  $\mu$ m.



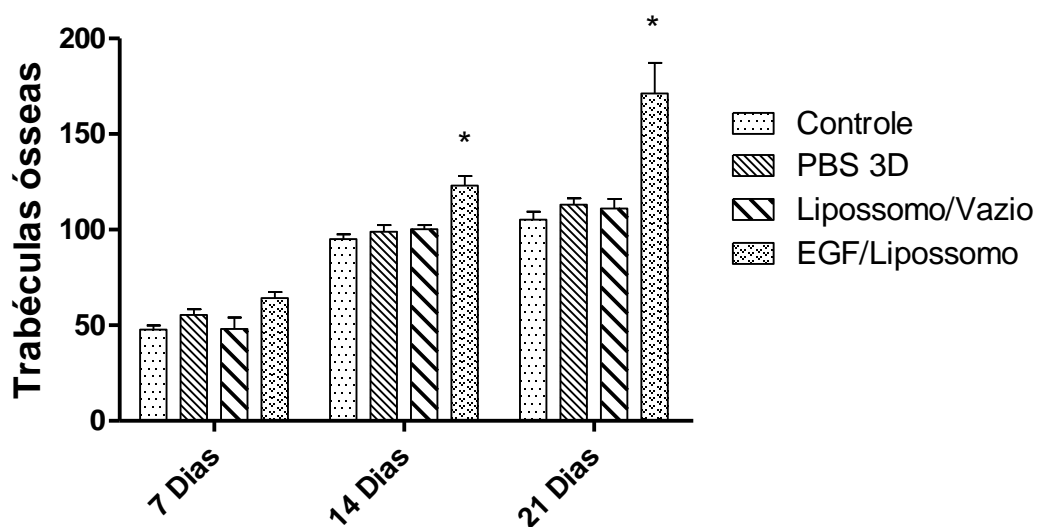
**Figura 13** - Aspecto histológico dos alvéolos 14 dias tratados com EGF em Lipossomos. Hematoxilina e Eosina. Seta amarela Espaços medulares. Seta azul trabécula óssea. Seta branca osteócito. Barra 20  $\mu$ m



#### 4.3-Análise histomorfométrica da resposta tecidual.

Os resultados da análise histomorfométrica, relativa ao tecido ósseo neoformado (trabéculas ósseas) encontra-se no gráfico abaixo. Podemos observar que aos 7 dias, o número de trabéculas tende a ser maior no grupo tratado com EGF/lipossomo, contudo não há diferença estatística entre os alvéolos do lado direito e esquerdo.

Aos 14 e 21 dias, não há diferença entre a quantidade de trabéculas ósseas nos alvéolos tratados com PBS e com lipossomo vazio, quando comparados aos do lado direito (controles). Nos animais tratados com EGF carregados por lipossomos a quantidade de trabéculas ósseas foi estatisticamente maior nos alvéolos do lado esquerdo, quando comparados com alvéolos esquerdos e direitos dos animais tratados com PBS e com Lipossomos vazio ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 2.** Quantificação de trabéculas ósseas, nos alvéolos do lado direito (controle) e esquerdo com diferentes tratamentos e intervalos de tempo. Teste Tukey  $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

Fraturas complexas, de difícil tratamento, ainda são grandes desafios dentro da Odontologia. Os métodos cirúrgicos envolvendo enxertos ósseos podem trazer bons resultados, porém, elevam o tempo cirúrgico, além de não estarem livres de complicações. A utilização de substitutos ósseos tem sido objeto de intensa investigação a nível mundial, com vista a ultrapassar as limitações do uso de enxertos para preencher defeitos ósseos. Além disso, a utilização de substâncias com capacidade osteogénica abre novas perspectivas no tratamento de fraturas, perda óssea por doenças periodontais e ressecção de tumores. Levando em consideração a importância do esqueleto e as condições para sua regeneração, principalmente do esqueleto facial, justifica-se a busca por materiais que preencham falhas dessa estrutura e estimulam o processo de regeneração óssea.

Acredita-se que em defeitos não reparáveis espontaneamente os fatores de crescimento (FC) não alcançariam o centro do defeito ou não estariam presentes em quantidades suficientes. Muitas células mesenquimais embora presentes não seriam alvos dos FCs e conseqüentemente não seriam ativadas para proliferação e diferenciação para células produtoras de tecido ósseo, o que determinaria o preenchimento do defeito por tecido fibroso ou invasão por tecido muscular (SZACHOWICZ, 1995; ZELLIN & LINDE, 1997).

Porém pouco se sabe sobre o papel de Fatores de Crescimentos exógenos no processo de reparo ósseo. Acreditamos que o entendimento da atuação de moléculas como o EGF no processo de reparo ósseo, poderá proporcionar diretrizes mais seguras no desenvolvimento de biomateriais para enxertos ósseos, bem como contribuir para a elucidação da cascata molecular que rege esse reparo.

Em geral o melhor modelo é aquele capaz de mimetizar a situação clínica para o qual a técnica cirúrgica ou o material de enxerto ósseo foi desenvolvido. Para tanto, vários sistemas testes tem sido utilizados, entre eles, o reparo de fraturas, a perda segmental em osso longo, o defeito de tamanho crítico em crânio, defeitos pos-exodontia e varias outras formas de não união. O modelo experimental utilizado nesse trabalho foi selecionado por oferecer condições adequadas para estudos de reparação óssea e por se prestar, desta forma, como ferramenta útil para o entendimento dos processos moleculares que regulam a reparação.

A utilização de modelos animais para embasamento científico deve ser etapa fundamental no processo de pesquisa. Dentre os diversos modelos animais utilizados, como gatos (LI, REINISCH & VAN DE MERVE 1992), coelhos (STEIN *et al.*, 1990) e ratos, estes são os mais utilizados (AOKI *et al.*, 1996). Concordamos com KARAHARJU-SUVANTO (1994) que os ratos são animais de baixo custo, fácil manutenção e enquadram-se nos conceitos de bioética.

A escolha dos períodos experimentais de 03, 07, 14 e 21 dias se mostrou adequada, uma vez que o processo de reparo em feridas de extração dental em ratos dura aproximadamente 21 dias, período no qual o alvéolo é preenchido totalmente por trabeculado ósseo neoformado (CARVALHO, *et al.* 1983)

A utilização de animais de pequeno porte (ratos) como proposto por Waldo e Rothblatt (1954) para pesquisas em laboratório, também se mostrou adequada, uma vez que elimina problemas tais como o controle genético e outras variáveis. Além disso, permite que o experimento seja realizado com um número maior de animais num intervalo de tempo menor entre o experimento e a análise dos resultados tendo em vista seu metabolismo mais acelerado em relação a outros animais de grande porte (cães, coelhos, macacos).

Segundo CHESMEL e colaboradores (1998), o potencial osteoindutor varia em relação a posição ocupada pelo hospedeiro na escala filogenética, sendo que os seres vivos mais inferiores (p. ex. roedores) possuem uma maior capacidade tanto de induzir quanto de responder a um estímulo osteoindutor, o que torna o implante de EGF carregado por lipossomas em ratos um modelo experimental para estudos do processo de reparo ósseo.

A análise do peso dos animais encontra justificativa pelo fato de que o osso, sendo um tecido metabolicamente dinâmico é influenciado pelo fator nutricional e deficiências protéico-nutricionais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2003).

Apesar de nenhum procedimento de anti-sepsia intrabucal ter sido realizado como procedimento pré-operatório não foi observado qualquer sinal de infecção nos dias seguintes a inserção do material. Desta maneira, parece que a eliminação de tal procedimento não comprometeu o processo de reparo. Tal afirmativa encontra subsídios no estudo realizado por Magro Filho *et al.*, (1996) os quais concluíram que o uso prévio de clorexedina (0,2%) para a exodontia do incisivo superior direito em 45 ratos de raça *Wistar* não interferiu na cronologia da reparação das feridas de extração dental.

Não foi utilizada sutura após a exodontia, o que não comprometeu a formação do coágulo e o reparo ósseo. Provavelmente esse achado foi possível pelo tempo da anestesia e relaxamento muscular proporcionado pela medicação aplicada, ter sido suficiente para manter o animal imóvel até a completa estabilização do coágulo.

O diagnóstico radiográfico possui duas principais fontes de incerteza: a qualidade dos procedimentos necessários para a produção da radiografia e a interpretação subjetiva da imagem. O software SIDEXIS utiliza a densidade das estruturas na imagem radiográfica de acordo com os tons das áreas alteradas e das áreas normais, calculada para cada linha traçada na região de interesse. Permite, portanto determinar os valores quantificadores da reprodutibilidade, especificidade e confiabilidade deste método para detectar alterações ósseas (KULLENDORF; PETERSSON, ROHLIN, 1997, MOL & VAN DER STELT, 1993).

As avaliações radiográficas de cirurgias experimentais, em geral, servem apenas de referenciais para os exames pré e trans-operatórios, porém, quando valorizadas quantitativamente pela densidade radiográfica, tornam-se informações relevantes, para viabilizarem hipóteses diagnósticas mais confiáveis a serem comparadas aos achados microscópicos. No presente estudo utilizamos o software SIDEXIS para determinar o padrão de densidade do processo de reparo nos alvéolos e encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Nossos resultados estão de acordo com aqueles obtidos por CHEN *et al.*, 1997, indicando a validade da utilização de métodos radiográficos para a avaliação de neoformação e regeneração óssea.

Recentemente, demonstramos que implantes de matriz dentinária humana desmineralizada em alvéolos de ratos, acelerou o processo de reparo ósseo aos 14 e 21 dias após os procedimentos cirúrgicos. Esses resultados foram interpretados como decorrentes da liberação de BMP, pela matriz dentinária. No presente estudo, demonstramos com técnicas histológicas, aceleração do processo de reparo ósseo nos alvéolos tratados com EGF carregados por lipossomos aos 14 e 21 dias após os procedimentos cirúrgicos. Os dados histométricos mostraram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no número de trabéculas ósseas aos 14 e 21 dias, confirmando assim nossos dados histológicos. Embora, no presente estudo nenhuma avaliação sistematizada tenha sido feita para quantificar o processo de angiogênese nos alvéolos tratados com EGF carregado por lipossomos, grande número de vasos foram observados.

O EGF é uma proteína encontrada em vários tecidos (BENNETT NEIL E SCHULTZ GREGORY, 1993) e possui o poder de estimular a síntese celular de DNA e está

diretamente associada à rápida regeneração dos tecidos após as agressões (SAROSIEK J & MCCALLUM, 1995, OLSEN *et al*, 1984). Este fator tem uma ampla ação biológica e está envolvido com a indução do crescimento epitelial e da angiogênese. Entre suas ações biológicas, podem-se destacar ainda os efeitos mitogênicos e quimiotáticos nos fibroblastos e a diferenciação e proliferação de células mesenquimais e epiteliais (SERRANO E CASAS, 1997, SKOV OLSEN, 1988, SKOV OLSEN, 1988), além de estimular a formação de tecido de granulação (GARCÍA, CORRAL, BASCONES, 2004). Por outro lado, fibroblastos e pré-osteoblastos do ligamento periodontal expressam alta quantidade de receptores para o EGF em suas membranas (SERRANO E CASAS, 1997, ARPORNMAEKLONG *et al*, 2004).

A angiogênese é um processo dinâmico, finamente regulado por sinais presentes, tanto no soro, quanto na matriz extracelular local (RISAU, 1997) e ocorre na matriz do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica das células endoteliais (ARNOLD e WEST, 1991). Este constitui, portanto, um complexo processo, que envolve mediadores solúveis, interações célula-célula e célula-matriz extracelular, bem como forças biomecânicas (PAPETTI e HERMAN, 2002). A invasão de vasos sanguíneos tem um papel decisivo no reparo tecidual e sugere-se que o EGF seja um mecanismo pelo qual a angiogênese e osteogênese estão interligados ou dependentes durante o reparo ósseo.

Estudos realizados utilizando o EGF demonstraram que esse fator de crescimento estimula a angiogênese e a permeabilidade vascular, induzindo o crescimento de tecidos. EGF e TGF- $\alpha$  são participantes na formação do tecido de granulação, nome dado principalmente, pela característica granular desse tecido devido à presença de capilares neoformados (FRADE, 2003). Este fator tem um efeito proliferativo celular nos fibroblastos periosteais e células endoteliais, afetando funções como diferenciação, síntese de macromoléculas e reabsorção óssea, além da divisão celular (TÖNZÜM & DEMIRALP, 2003, HUDSON-GOODMAN, GIRARD, JONES, 1990). O processo tecidual é estimulado pela presença do fator de crescimento epidérmico (EGF) e do fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) que é produzido por macrófagos ativados na ferida, plaquetas e queratinócitos (HUNT *et al*, 1984; SCHULTZ *et al.*, 1991). Nossos achados estão de acordo com dados anteriores e sugerem que EGF carregado por lipossomos atua nas células remanescentes do ligamento periodontal e via seu receptor, acelera o reparo ósseo seja aumentando a angiogênese ou tecido de granulação ou por ambos os mecanismos.

Os recentes avanços tecnológicos na biologia celular e molecular têm trazido esperança no que diz respeito ao completo conhecimento da cascata molecular envolvida

no reparo ósseo, o que promete possibilidades para desenvolvimento de novas abordagens como terapias com fatores de crescimento e soluções de problemas clínicos hoje insolúveis.

Os fatores de crescimento são expressos nos tecidos em dosagens-tempo-dependente e a utilização dessas proteínas para a estimulação da osteogênese, em última instância, supera as limitações atualmente encontradas no que diz respeito ao reparo ósseo, como por exemplo, a necessidade de sítio doador e a imunogenicidade dos materiais (CHEN *et al.*, 2002). Porém, como qualquer tratamento com fatores de crescimento, o tempo, a dose e o contexto celular podem afetar a atividade da proteína (Eckardt *et al.*, 2003, Peng *et al.*, 2002)

A administração de moléculas estimuladoras do reparo ósseo tem por objetivo tornar possível a ação a que ela se destina. No entanto, muitas vezes uma grande fração do medicamento é eliminada sem exercer nenhuma atividade. Sendo assim, atualmente, há o desenvolvimento de várias alternativas para tornar o medicamento mais disponível para determinados alvos e com taxas de liberação mais adequadas a fim de produzir o efeito pretendido. Tais alternativas visam aumentar a eficácia, diminuir os efeitos colaterais, direcionar os fármacos a locais específicos do organismo, reduzir sua toxicidade, liberar o fármaco de maneira controlada, melhorar sua biodisponibilidade, alterar sua farmacocinética e aumentar a solubilidade do fármaco em sistemas aquosos (HARPER & JULIANO, 1981; RANSON *et al.*, 1996; SILER-MARINKOVIC *et al.*, 1997).

Dentre as novas alternativas terapêuticas propostas nas últimas décadas, o estudo com lipossomas encontra-se em destaque. Estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que a encapsulação de fármacos em lipossomas fornecem todas as vantagens mencionadas, atuando, então como um sistema de liberação controlada (RANSON *et al.*, 1996; SILER-MARINKOVIC *et al.*, 1997).

Nesse contexto os lipossomas como carreadores de fatores de crescimento no reparo ósseo têm a intenção de modificar a cinética de liberação da citocina, propiciando uma liberação lenta e gradual no sítio cirúrgico, assemelhando assim a liberação dos fatores de crescimento endógenos. Não só a liberação prolongada do fator de crescimento quando encapsulado é importante, mas também a proteção da proteína de possíveis degradações no tecido. Assim, sua eliminação pode ser retardada, permanecendo em níveis pequenos durante um período mais prolongado no tecido (FRÉZARD & MELO, 1997).

Assim, o tratamento dos alvéolos com EGF em lipossomas, poderia acelerar o reparo e a osteointegração, trazendo enormes benefícios à reabilitação protética, facilitando a colocação de implantes e próteses dentárias, devolvendo a função mastigatória aos pacientes, restabelecendo as áreas edêntulas.

A análise histomorfométrica utilizada mostrou aumento significativo na quantidade de trabéculas ósseas nos alvéolos tratados com EGF carregados por lipossomos especialmente aos 14 e 21 dias. A importância da análise histomorfométrica é confirmada nos estudos de MARZOUK e colaboradores (2007) e ESKIL e colaboradores (2007), que relatam ser a análise quantitativa essencial para estudos que objetivam avaliar a efetividade de novas modalidades terapêuticas na neoformação óssea.

Em consonância com o fato do EGF endógeno ser muito importante para a angiogênese e o reparo do osso normal, o EGF exógeno pode promover a angiogênese e a formação óssea.

Considerando as características acima mencionadas, verificamos propriedades relevantes do emprego de EGF carregado por lipossomas neste estudo, uma vez que se evidenciou significativo potencial osteoindutor desse material. Essas características favoráveis contribuem para a indicação de EGF carregado por lipossoma como material de enxerto em feridas ósseas, com resultados extremamente positivos e grandes perspectivas de sucesso em sua aplicação nas mais variadas áreas das ciências biomédicas e, sobretudo na Odontologia. Futuros estudos utilizando marcadores de tecido ósseo poderão complementar os resultados obtidos neste experimento, elucidando melhor a cascata molecular do reparo ósseo.

## 6. CONCLUSÃO

Em conformidade com os objetivos propostos, os resultados obtidos dentro das condições experimentais desta pesquisa demonstraram que:

- A utilização de lipossoma como carreador de proteínas no reparo ósseo guiado se mostrou bastante adequada, favorecendo o reparo ósseo,
- O tecido ósseo neoformado no lado experimental apresentou, além da superioridade quantitativa, notória superioridade qualitativa quando comparado ao grupo controle.



## REFERÊNCIAS

- ALVES, J. B. *et al.* Local delivery of EGF-liposome mediated bone modeling in orthodontic tooth movement by increasing RANKL expression. **Life Sci**, v. 4;85, n. 19-20, p. 693-699, nov. 2009.
- ANITUA, E. *et al.* The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. **Biomaterials**, v. 28, p. 4551-4560, 2007.
- AOKI K, Nishimura G, Haga N, Ikeuchi S, Yamaguchi T, Yamato M. Review. Fragile bone syndrome associated with craniognathic fibro-osseous lesions and abnormal modeling of the tubular bones: report of two cases and review of the literature **Skeletal Radiol.** Nov;25(8):717-22. 1996.
- ARNOLD, WEST Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol ther** 52,407-422 1991
- ARPORNMAEKLONG. P, KOCHER M, DEPPE R, *et al.* Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bonemarrow stromal cells. An in vitro study. **Int. J Oral Maxillofac Surger** 2004
- BAGI, C. M *et al.* Benefit of systemically administered rhIGF-I and rhIGF-I/IG-FBP-3 on cancellous bone in ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**, v. 9, p. 1301, 1994.
- BENNETT NEIL T, SCHULTZ GREGORY S. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. **Am J Surg** 165(6):728-37.1993;
- CARVALHO, A. A. *et al.* Healing of tooth extraction wounds in rats with renal hypertension. A histological study. **J Nihon Univ Sch Dent.**, v. 25, n. 3, p. 214-220, sep. 1983.
- CHAIN, J.; JONES; M. K.; TARNAWSKI, A. S. Serum response factor is a critical requirement for VEGF signaling in endothelial cells and VEGF-induced angiogenesis. **Faseb Journal**, v. 18, n. 11, p. 1264-1266, aug. 2004.
- CHEN, D. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB e IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. **J Cell Biol**, v. 142, p. 295-305, 2002.
- CHESMEL, K. D. *et al.* Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 56, n. 7, p. 857, 863, jul. 1998.
- CHAUDHARY, L. R. *et al.* Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. **Bone**, v. 34, p.402-411, 2004.
- CHORILLI, M., LEONARDI, G.R., OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V., Lipossomas em formulações dermocosméticas, **Infarma**, v.16, nº 7-8, p.75-79, 2004.
- COLNOT, C. *et al.* Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 435, p. 69-78, 2005.

ECKAROT *et al* 2003. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 21, nov. p. 4368-4380, 2002.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, june, 1992.

FRADE, I.; RISAU, W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. **Development.**, v. 116, n. 2, p. 435-439, oct. 1992.

FREDERIKSEN NL, Benson BW, Sokolowski TW .Effective dose and risk assessment from computed tomography of the maxillofacial complex. **Dentomaxillofac Radiol** 24:55-58. (1995).

GARCÍA GV, Corral L, Bascones MA. Plasma Rico en Plaquetas y su utilización en implantología dental. **Av Periodon Implanto** 16(2): 81-92. 2004

GEIGER, F. *et al.* Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. **J Bone Miner Res.**, v. 20, n. 11, p. 2028-2035, nov. 2005.

GIANNOBILE, W. V.; WHITSON, S.W.; LYNCH, S. E. Non-coordinate control of bone formation displayed by growth factor combinations with IGF-I. **J Dent Res**, v. 76, p. 1569-1578, 1997.

GIAVARESI, G. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. **Biomaterials**, v. 26, p. 3001-3008, 2005.

HARPER, P. A.; JULIANO, R. L. Two distinct mechanisms of fibroblast adhesion. **Nature**, London, v. 12, n. 290, p. 136-138, mar. 1981.

HILL, P. A. Bone remodelling. **Br J Orthod**, v. 25, p. 101-107, 1998

HUANG, Y. C. *et al.* Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. **J Bone Miner Res**, v. 20, p. 848-857, 2005.

HUDSON-GOODMAN,GIRARD,JONES Wound repair and the potential use of growth factors.**Pubmed** V.34 pg379-84 1990

ITUNT *et al* Bone morphogenetic proteins and osseointegration: current knowledge – future possibilities. **Periodontology** 2000, v.47, p. 206-223, 1984.

LIZUKA, T. *et al.* Oral rehabilitation after mandibular reconstruction using an osteocutaneous fibula free flap with endosseous implants - factors affecting the functional outcome in patients with oral cancer. **Clinical of Oral Implants Research**, v. 16, n. 1, p. 69-79, 2005.

Karaharju-Suvanto<sup>b</sup>Jyri Hukki<sup>a, f1</sup> , Kirsti Hurmerinta<sup>a</sup> and Pelle Sahlin<sup>c</sup>

Pinhole osteotomy in distraction osteogenesis – a technical note **Archives of Oral Biology**, v. 48, p. 723-730, 2003.

KLOEN, P. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. **Bone**, v. 33, p. 362-371, 2003.

KRISHNAN, V. D. Z. Cellular, molecular and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 129, n. 469, p. 460-460, 2006.

KULLENDORFF.B,PETERSON.K,ROHLIN,M.Diret digital radiogray for detection of periapical bone lesions:a clinical study.**Endo dent, traumatic** v.13,n.4,p.183-9.Aug 1997

LACERDA D.A, Warman ML, Beier DR, Yoshioka H, Ninomiya Y, Oxford JT, Morris NP, Andrikopoulos K, Ramirez F, et al.A fibrillar collagen gene, Col11a1, is essential for skeletal morphogenesis. **Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115**. p. 293-300, nov 1995

LAATO, Z. *et al.* Spatial and temporal localization of EGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model.**Nature**, v. 63, p. 1500-1508, 1988.

LASIC, D. **Liposomes: From Physics to Applications**. Rio de Janeiro: Elsevier, 1993.

LEE, S. H.; SHIN, H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, p. 339-359, 2007.

LEUNG, J. W. *et al.* Endothelial cell-specific over-expression of endothelin-1 leads to more severe cerebral damage following transient middle cerebral artery occlusion. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 44, (Supl. 1), p. 293-300, nov. 2004.

LI ,REINISCH ,VAN DE MERWE . Bone ablation with Er:YAG and CO2 laser: study of thermal and acoustic effects. **Lasers Surg Med** 1992;12:79–85. 1992

LIEBERMAN, J. R. *et al.* The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84, p. 1032-1044, 2002.

LINKHART, T. A. *et al.* Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta e BMP. **Bone**, v. 19, (Supl. 1), p. 1-12, 1996.

MAGRO-FILHO, O. *et al.* Influência da anti-sepsia intra-bucal com clorexidina 0,2% na reparação do alvéolo dental. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 50, p. 243-246, 1996.

MANDRACCHIA V J: Nelson S C; Barp E A **Current concepts of bone healing** Clinics in podiatric medicine and surgery 2001;18(1):55-77. **2001**

MARINARD,FERRARAN,DAVIS-SMYTH. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 8, p. 638-646, 1997.

MARZOUK,K.M,AY,GAMA *et al.*Osteocondutive effects of vinyl styene microbeads in rat calvarial defects.**Journal Maxillo facial sugery** v.65,n.8,Aug,p 1508-16-2007

MOL,A,VAN DER STELD,P.F Locating the periapical region in dental radiographs using digital image analysis.**Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod**,St Louis v.75,n.3.p.373-382 mar 1993

MOOREN, R. E. The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, p. 626-631, 2007.

OLSEN PS, POULSEN SS, KIRKEGAARD P, NEXO E. Role of Submandibular Saliva and Epidermal Growth Factor in Gastric Cytoprotection. **Gastroenterol** 87:103-8. 1984;

PAPETTI, HERMAN Mechanisms of normal and tumor derived angiogenesis. **American journal of physiology** v.132, p 267-276 may 2002

PENG HAIRONG,<sup>1,2</sup> VONDA WRIGHT,<sup>2</sup> ARVYDAS USAS,<sup>1,2</sup> BRIAN GEARHART,<sup>1</sup> HSAIN-CHUNG SHEN,<sup>2,3</sup> JAMES CUMMINS,<sup>1</sup> AND JOHNNY HUARD<sup>1,2</sup>, protein-4 Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic **J Clin Invest**. 110(6): 751–759 2002 September 15; 2002

RAMOSHEBI, L. N. Tissue engineering: TGF- $\beta$  superfamily members and delivery systems in bone regeneration. **Expert Rev Mol Med**, v. 4, p. 1-11, 2002.

RANSON, M. *et al*. Liposomal drug delivery. **Cancer Treat Rev.**, v. 22, n. 5, p. 365-379, sep. 1996.

REDY & WANG. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. **Neurosurgery Focus**, v. 13, p.1-6, 1999.

RISAU . Cell Growth Differ **Nature** 386, 671-674 1997

ROSE, F. R. *et al*. Delivery systems for bone growth factors: the new players in skeletal regeneration. **J Pharm Pharmacol**, v. 56, p. 415-427, 2004.

RODAM & MARTIN. Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation. **Clin Oral Implants Res.**, v. 18, n. 5, p. 639-648, 2000.

SASAKI, T.; WATANABE, C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. **Bone**, v. 16, p. 9-15, 1995.

SAROSIEIL J, MC CALLUM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 36770-36778, 1995.

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

SCHULTZ, *et al* Crystal structure of a CAP–DNA complex: the DNA is bent by 90°. **Science**, 253, 1001–1007. 1991

SERRANO E CASAS, O. *et al*. Relationship between bone marrow angiogenesis and plasma cell infiltration and serum beta2-microglobulin levels in patients with multiple myeloma. **Ann Hematol.**, v. 80, n. 10, p. 598-601, oct.1997.

SILER-MARINKOVIC, S. *et al*. Liposomes as carriers of antimicrobial drugs **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 23, n. 5, p. 483-488, 1997.

SKOV OLSEN. Role of Epidermal Growth Factor in Gastroduodenal Mucosal Protection  
**Journal of Clinical Gastroenterology**: v.44, p. 751-757 Dec 1988

STEIN GS, LIAN JB, OWEN TA: Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. **FASEB J** 4:3111-3123, 1990.

SZACHOWICZ EH - Facial bone wound healing. An overview. **Otolaryngol Clin North Am** 28(5): 865-8001-OCT-1995;

TAVANO, O. Estudo da densidade radiográfica digital do tecido ósseo face ao implante do polímero de mamona em coelhos. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v.7, n.3-4, p.53-58, jul/dez. 1999.

TEITELBAUM, S.L. Bone Resorption by Osteoclasts. **Science**: v. 289, p. 1504-1508, 2000.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. **Inflamação: uma revisão do processo**. 4. ed. São Paulo: Quintessence, 1996.

WAHL,LM,CORCORAN,ML Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytolines **J.Periodontol** v.64,p.467-75 may 1993

WALDO, C. M.; ROTHBLATT, J. M. Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations. **J Dent Res.**, v. 33, n. 4, p. 481-486, aug. 1954.

WILTFANG, J. *et al.* Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects – an animal experiment. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, p. 187-193, 2004.

WONG, R. W. K.; RABIE, A. B. M. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, p. 46-50, 2005.

ZELZER, E. Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. **Curr Topics Dev Biol.**, v. 65, p. 169-187, 2002

ZELLIN, LINDE Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects **Journal of Biomedical** v. 13, p. 92-96, dec 1997