

Avaliação histológica da dentina de dentes de ratos submetida à ação da BMP – proteína morfogenética associada à hidroxiapatita e colágeno*

Histological evaluation of Wistar rats' dentin teeth through the acting of the BMP – morphogenetic protein associated to the hydroxyapatite and collagen

Isabella Maria Porto de Araujo**
Cintia Helena Coury Saraceni***
Arnaldo Santos Júnior****
Linda de Fátima Marques Duarte*****
José Barbosa*****

Resumo

Introdução – O objetivo deste projeto de pesquisa foi avaliar histologicamente os efeitos da colocação da BMP associada à hidroxiapatita em dentina de dentes de ratos. **Material e Método** – Foram utilizados 20 dentes de ratos machos tipo Wistar com peso entre 300 e 350 gramas. O piloto foi constituído de quatro destes dentes para padronização da profundidade do preparo. O Grupo 1 – controle – quatro dentes foram extraídos para observação do aspecto histológico da dentina hígida. No Grupo 2, quatro dentes receberam preparo+BMP+ hidroxiapatita+ colágeno seguido de selamento com CIV resino-modificado (Vitrebond-3M) e após 48 horas, foram extraídos. No Grupo 3, quatro dentes receberam preparo e tratamento iguais aos realizados no Grupo 2 e após cinco dias foi realizada a extração. No Grupo 4, quatro dentes receberam o mesmo preparo e tratamento do Grupo 2 e foram extraídos após 20 dias. Após as extrações, os dentes dos Grupos 2, 3 e 4 foram analisados histologicamente. **Resultados** – O aspecto histológico observado nas lâminas mostra que há biocompatibilidade evidente entre o material e o tecido dentinário porque foi observado que não houve alteração degenerativa nos túbulos dentinários envolvidos no processo de preparo em contato com o material utilizado. Em alguns casos, foi possível observar aspectos semelhantes a calcificação distrófica sugestiva de um processo de proteção frente à agressão do material. **Conclusões** – Os resultados permitiram concluir que a BMP associada à hidroxiapatita é um material biocompatível, podendo ser utilizado em dentina. É necessária observação da ação do material por um período maior a fim de se certificar da indução de formação de dentina reparadora.

Palavras-chave: Proteínas morfogenéticas ósseas; Dentina

Abstract

Introduction – The objective of this research project was to evaluate histologically the effects of the BMP application associated to hydroxyapatite in the rats' dentin teeth. **Material and Method** – Twenty male Wistar rats' teeth weighting between three hundred and three hundred fifty grams, were used into this research. The pilot was constituted of four teeth from all these ones, They have a pattern of the preparation depth. In the Group 1 – control – four teeth were extracted to be observed through the histological aspect of natural dentin; in the Group 2, four teeth had received preparation + BMP + hydroxyapatite + collagen followed by sealing with CIV modified-resin (Vitrebond-3M) and after forty-eight hours, they were extracted. In the Group 3, four teeth had received the same preparation and treatment as well as, the ones from the second group. After five days, the extraction was performed. In the Group 4, four teeth had received the same preparation and treatment, as well as, the second group and were extracted after twenty days. After the extractions, the teeth from the second, third and fourth groups, were histologically analysed. **Results** – The histologic aspect observed in laminas had shown that there is biocompatibility evidence between the material and the dentin tissue, because it was observed that there wasn't degenerative alteration in dentin tubules involved in the process on how to prepare its use with the used material. In some cases, it was possible to observe the aspects like dystrophic calcification suggestive of a protection process to face the aggressive material. **Conclusions** – The results had concluded that the BMP associated to hydroxyapatite is a biocompatible material, that may be used in dentin. It will be necessary to observe about the acting of its material for a longer period in order to certify about the induction of the repaired dentin formation.

Key words: Bone morphogenetic proteins; Dentin

* Pesquisa financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

** Aluna do Curso de Odontologia da Universidade Paulista (UNIP). E-mail: isabella_pab@hotmail.com

*** Professora Doutora em Dentística pela Universidade de São Paulo. Coordenadora do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIP. Titular da Disciplina de Dentística da UNIP. E-mail: cintiasaraceni@uol.com.br

**** Mestre em Farmacologia. Professor Adjunto das Disciplinas de Fisiologia e Farmacologia da UNIP.

***** Professor Titular da Disciplina de Patologia da UNIP.

Introdução

A Odontologia atual tende a ser altamente conservadora e voltada à manutenção dos princípios biológicos necessários à preservação da vitalidade do órgão pulpar.

Assim, para atingir esse objetivo, há a necessidade de se promover o selamento biológico da estrutura dentinária, que é a estrutura que primeiramente recebe os estímulos patológicos e os transmite, através de seus túbulos, ao órgão pulpar. O selamento dos túbulos impediria a passagem de estímulos e, indiretamente, contribuiria para a reparação pulpar.

O selamento dentinário normalmente é realizado através da colocação de substâncias químicas, como cimentos ou sistemas adesivos, que podem através da sua ação seladora, induzir a formação de uma dentina reparadora.

Algumas pesquisas tentaram descobrir se havia algum componente orgânico que pudesse induzir uma reparação dentinária frente a estímulos patológicos. Estudando fraturas ósseas, os pesquisadores observaram que, em todos os casos de reparação óssea, encontrava-se uma proteína denominada BMP (proteína morfo-genética) que parecia ser a indutora de neoformação óssea. A partir de estudos em bovinos, fabricantes conseguem obter esta proteína em pó, para os mais diversos fins.

Seria, portanto, interessante avaliar se esta proteína poderia ter uma ação na indução da formação de dentina reparadora.

Porém, há a dificuldade de se avaliar *in vitro* a ação desta indução, pois haveria a necessidade de se acompanhar por um período de tempo essa neoformação.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar histologicamente os efeitos da colocação da BMP associada à hidroxiapatita em dentina de dentes de ratos. Uma vez constatada alguma interação positiva, novos testes poderão ser realizados a fim de se viabilizar a utilização dessa proteína em dentes humanos.

Material e Método

Neste trabalho foram utilizados 20 dentes de ratos machos tipo Wistar com peso entre 300 e 350 gramas. Para realização dos preparos cavitários, os ratos foram anestesiados com Hidrato de cloral a 10% (injetou-se 0,4 ml para cada 100 g do rato) e acompanhados durante todo o período do experimento, sendo devidamente alimentados com polenta (para que fosse evitado um desgaste excessivo dos dentes) e mantidos em ambiente adequado.

Os preparos foram realizados em incisivos inferiores, na região cervical, uma vez que o crescimento contínuo dos dentes poderia interferir no tempo necessário para análise histológica. O tempo máximo conseguido antes das extrações foi de 20 dias.

Foram utilizados quatro dentes como piloto para padronização da profundidade dos preparos. Após o teste, foi padronizado um preparo com profundidade de 1,5 mm, largura de 2 mm e comprimento de 2 mm, obtido através da utilização de ponta diamantada esférica nº 1011 em alta rotação. Os procedimentos de todos os grupos foram realizados no mesmo dia, realizando-se a contagem do tempo a partir desta data.

O Grupo 1 – controle – consistiu de quatro dentes que foram extraídos para observação do aspecto

histológico da dentina hígida, sem intervenção, para a obtenção de parâmetros a serem comparados com os demais grupos.

O Grupo 2 consistiu de quatro dentes que receberam preparos cavitários padronizados conforme resultado do piloto. Em seguida, foi feita a aplicação da BMP (lote 006882) + hidroxiapatita (lote 006952) + colágeno (lote 006823) – marca Genius – diluídos em soro fisiológico a 0,9% que foi recoberto com CIV resino-modificado (Vitrebond-3M). Após 48 horas, os dentes foram extraídos e preparados para análise histológica da dentina

O Grupo 3 consistiu de quatro dentes que receberam o mesmo preparo e tratamento realizados no Grupo 2 e após cinco dias foi realizada extração seguida de preparo para análise histológica.

O Grupo 4 consistiu de quatro dentes que receberam o mesmo preparo e tratamento realizados no Grupo 2 e após 20 dias foi realizada extração seguida de preparo para análise histológica.

Para o preparo das amostras para análise histológica, as mesmas foram submetidas a: descalcificação em solução de ácido fórmico a 5% durante 10 dias; exame macroscópico e modelação do material (remover excesso de tecido mole) para inclusão em parafina histológica (marca Synth. Ponto de fusão 56°-58°C); utilizando o autotecnico (marca Oma CM69), o material foi tratado numa série crescente de álcoois 50%, 80% e absoluto de 1 hora cada, para remover a água do tecido. A seguir, foi feito o clareamento com xilol histológico P.A. (marca Synth) em três etapas de 1 hora cada e a impregnação com parafina líquida a 59°C (2 passagens de 1 hora e 30 minutos cada); inclusão em parafina; cortes com 5 micra de espessura realizados com micrótomo (marca Leica modelo RM 2125 RT) e montagem em lâmina; os cortes foram desparafinados (os cortes) e corados em hematoxilina-eosina e montados com lamínula (24 x 32 espessura 0,13-0,16 mm; marca Glass-tecnica) e entellan (marca Merck); a seguir, foram observados em microscópio óptico (Fotomicroscópio Olympus BX60); todos os equipamentos utilizados pertencem ao Laboratório de Histologia da UNIP.

Resultados

Houve certa dificuldade no decorrer da pesquisa devido à pouca espessura do dente do rato que, além de favorecer a fratura com perda do material, dificultou a observação histológica. As lâminas obtidas do grupo controle mostraram dentina com túbulos dentinários (Figuras 1-A e 2) e presença de odontoblastos (Figuras 1-B e 2), sugerindo dentina passível de reparação. Nos demais grupos, no que foi possível observar, há sugestão de resposta positiva de reação pulpar, o que pode ser observado nas Figuras 3, 4, 5, 6-A e 7-A, onde aparece zona de calcificação (distrófica) na dentina, sugerindo processo de proteção pulpar à colocação do material.

O aspecto histológico observado nas lâminas mostra que há biocompatibilidade evidente entre o material e o tecido dentinário. Isto porque foi observado que não houve evidente alteração (degenerativa) nos processos citoplasmáticos dos odontoblastos (fibrilas de Tomes) dos canalículos da dentina envolvidos no processo de preparo em contato com o material BMP (Figuras 6-B e 7-B).

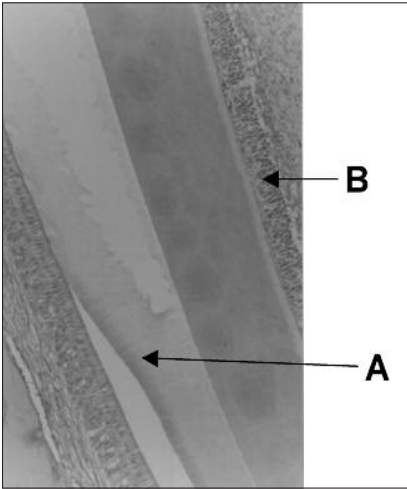


Figura 1. Grupo Controle – Dentina com túbulos dentinários (A) e presença de odontoblastos (B)

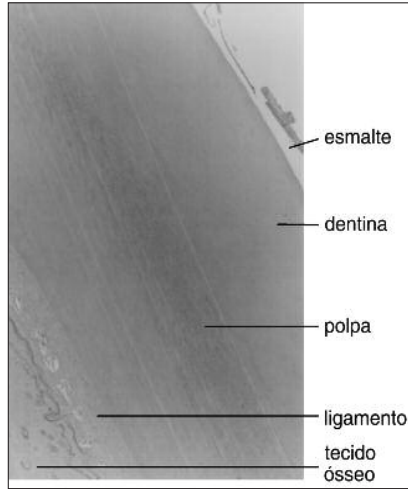


Figura 2. Grupo Controle – Aspecto histológico da dentina hígida

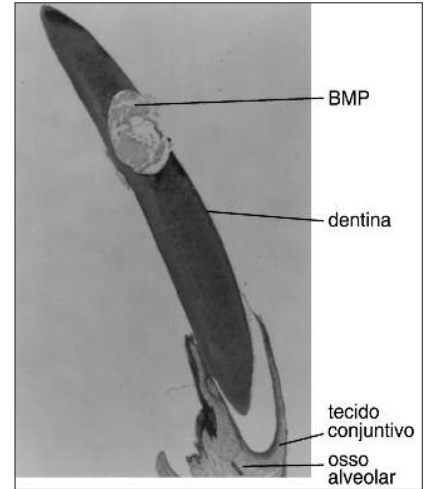


Figura 3. Dente em que foi realizado o preparo e aplicação da BMP (Aumento 12,5x)



Figura 4. Zona de calcificação distrófica na dentina adjacente ao preparo e em contato com o material BMP (Aumento 40x)

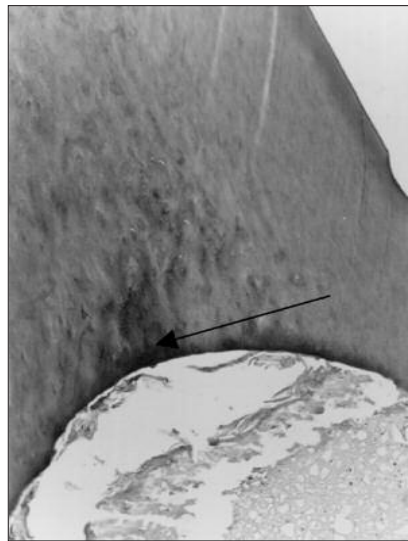


Figura 5. Zona de calcificação distrófica (Aumento 100x)

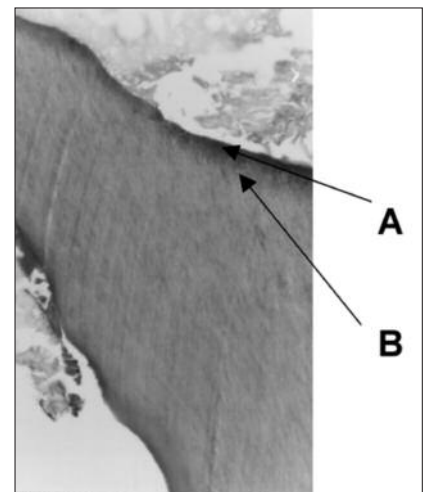


Figura 6. Zona de calcificação distrófica (A) e ausência de alteração degenerativa nos processos citoplasmáticos dos odontoblastos (B) (Aumento 200x)

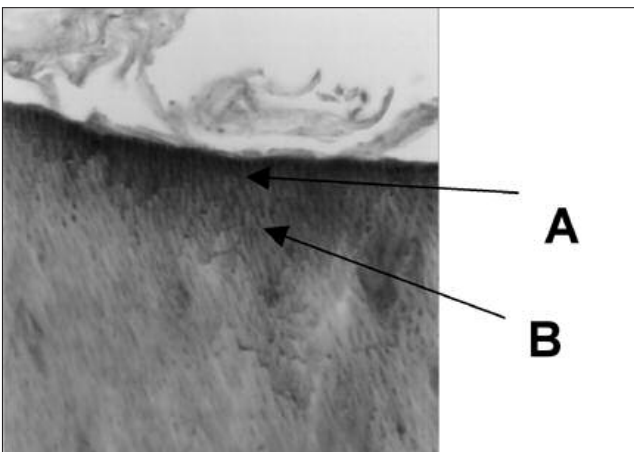


Figura 7. Zona de calcificação distrófica (A) e ausência de alteração degenerativa nos processos citoplasmáticos dos odontoblastos (B) (Aumento 400x)

Discussão

Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) ou Proteínas Osteogênicas (OP), integram um subgrupo da Superfamília de Fatores de crescimento- β , originalmente isoladas de matriz óssea desmineralizada e inicialmente caracterizada pela habilidade de induzir formação óssea *in vivo*¹. Os fatores responsáveis pela atividade indutora óssea formam a subfamília da proteína morfogenética da superfamília TGF- β (Transforming Growth Factor-B)⁶.

Estas proteínas são uma família de moléculas sinalizadoras criticamente envolvidas em vários estágios na formação de uma variedade de tecidos e órgãos, incluindo ossos e dentes. BMP-2, BMP-4 e BMP-7 são osteogênicas, dentinogênicas e cementogênicas quando aplicadas diretamente em derme de adulto, em músculo, em osso, polpa dentária ou no periodonto⁹.

A proteína óssea morfogenética (BMP) tem sido extensivamente estudada pelas possibilidades de aplicação clínica desde Urist, em 1965, quando foi feito um experimento com indução óssea em osso desmineralizado. Depois disto, estudos têm mostrado que a BMP existe na matriz óssea, em tecido de osteossarcoma, em matriz de dentina e em tecido envolvido após extração dentária. Ele age em tipos de células mesenquimais imaturas iniciando indução óssea através de diferenciação óssea endocondral².

Estas proteínas são implicadas em diversas atividades biológicas incluindo diferenciação celular e estímulo de secreção de matriz extracelular. Células derivadas da polpa dentária diferencialmente expressam alguns genes de proteínas ósseas morfogenéticas. Em trabalho feito por Sloan *et al.*¹¹ (2000) foi mostrado que a BMP-7 é capaz de estimular reparação do tecido *in vivo* e a natureza deste processo é importante para determinar as bases moleculares da ação da BMP-7 nas células dentro do tecido dentário durante uma reparação. Assim sendo, foi comprovado que esta proteína estimula um crescimento localizado de secreção de matriz extracelular pelos odontoblastos no sítio da aplicação, com efeitos estimulatórios maiores em concentrações mais altas do que em concentrações mais baixas.

Os efeitos da BMP na proliferação, produção de matriz extracelular e função biológica das células da polpa foram examinadas na cultura primária de células de polpa de dente permanente. Foi observado que a BMP tem atividade mitogênica e na regulação da diferenciação das células da polpa em odontoblastos⁸.

Portanto, BMP pode ser usada em Dentística como um agente bioativo de capeamento pulpar para induzir formação de dentina reparadora. Observação radiográfica mostrou que um grau ótimo de mineralização ocorreu nas cavidades dentárias com BMP-2 e BMP-4. Quando na ausência delas, a radioluscência era muito maior comparada com a radioluscência obtida quando as cavidades eram preenchidas com BMP-2 e BMP-4⁷.

Bessho *et al.*² (1991) determinaram a composição e a seqüência parcial de aminoácidos das BMPs a partir de extratos purificados de matriz de dentina humana. A pesquisa indicou que a proteína estudada é composta

por 191 aminoácidos em sua formação e os autores concluíram que a estrutura da BMP derivada da matriz dentinária é semelhante à proteína originária da matriz óssea e ambas apresentam a mesma ação *in vivo*. No entanto, *in vitro* ele induz somente cartilagem. Estes achados indicam que a BMP está envolvida na diferenciação de células mesenquimais imaturas da cartilagem e que os processos subseqüentes de diferenciação óssea endocondral são regulados por outros fatores de crescimento.

Todos os componentes da BMP são capazes de induzir ectopicamente cartilagem e formação de osso *in vivo*. Existem evidências de que BMPs, mais que indução óssea, são sinalizadoras de moléculas durante a formação de tecido extraesquelético⁶. Uma simples molécula de BMP, como a BMP-2, é capaz de promover formação de osso e cartilagem quando implantadas em um sítio ectópico⁵.

BMP-7 forma dentina reparadora na parte coronal da polpa e uma mineralização homogênea na estrutura do canal radicular. Estes achados indicam que a parte coronária e a parte radicular da polpa têm sua própria especificidade³. Em um trabalho feito, também foi comparada a ação da BMP-7, Sialoproteína e Hidróxido da Cálcio, demonstrando-se uma superioridade das duas primeiras na indução de mineralização⁴.

Em um estudo feito nas áreas coronal e radicular da polpa exposta em molares de rato, com espécies tratadas com BMP-7, demonstrou-se que a inflamação inicial tinha sido resolvida após oito dias e que, após 28 dias, mineralização heterogênea ou osteodentina fechou a polpa coronária mesial. Eles perceberam que tinha tido um preenchimento da polpa radicular por uma mineralização homogênea na raiz mesial. Estes resultados enfatizam as diferenças biológicas entre as partes radicular e coronária da polpa e o potencial das moléculas bioativas como a BMP-7 para ser uma alternativa ao tratamento endodôntico convencional¹⁰.

Neste experimento, foram observadas áreas de calcificação distrófica na dentina em contato com o material, o que faz prever a possibilidade de indução de formação de dentina reparadora.

Suwa *et al.*¹² (1993) examinaram a formação e diferenciação de células pulpares sob a influência do complexo HAP/BMP. Este foi implantado em polpas expostas de pré-molares e defeitos ósseos alveolares de cães. Duas semanas após o procedimento, células de fibroblastos proliferaram logo abaixo do complexo implantado e após três semanas, dentina incluindo túbulos proliferaram na polpa. Após quatro semanas uma ponte de dentina composta de dentina osteóide foi encontrada e após oito semanas esta dentina calcificada cobriu a superfície defeituosa da raiz e aderiu ao novo osso circundando os grânulos de HAP. Os resultados indicaram que a dentina induzida pelo complexo HAP/BMP pode ser de dois tipos: dentina tubular e osteodentina. Este complexo exibiu habilidade de induzir dentinogênese e osteogênese.

Várias pesquisas observaram que as BMPs podem ser também estimuladoras efetivas nos processos de

reparação em tecidos dentários maduros^{1,5}.

Com a formação de dentina, níveis expressivos de BMP-7 foram encontrados em odontoblastos funcionais, enquanto que durante a diferenciação em ameloblastos constatou-se baixas quantidades de proteína⁶.

Experimentos realizados com BMPs compararam o padrão de deposição dentinária de proteína com o padrão de tecido induzido pelo hidróxido de cálcio, comprovando a superioridade da BMP¹⁰. Rutherford e Gu⁹ (2000) observaram que células da polpa em tecidos inflamados mantêm a capacidade de responder à BMP-7 e é possível que a atividade da proteína recombinante seja avaliada para induzir a formação de tecido em experimentos com polpas dentárias inflamadas.

Embora os artigos citados tenham aplicado BMP diretamente sobre a polpa, seja de animais, seja de seres humanos, com resultados satisfatórios no que diz respeito à reparação, neste experimento a proposta foi aplicar a BMP sobre dentina na tentativa de induzir reparação sem que tivesse exposição pulpar.

Essa condição simularia preparos de grande profundidade sem exposição pulpar e a BMP agiria como material de proteção pulpar. Nesse aspecto, pode-se

observar que a BMP foi biocompatível, sendo passível de ser utilizada para este fim.

Um grande problema observado no transcorrer da pesquisa foi o curto espaço de tempo para observação da formação de dentina reparadora frente à indução do material. Isto devido ao crescimento contínuo e rápido do dente do rato que, mesmo alimentando-se com polenta para que o desgaste não fosse grande, impediu que fosse observado num período de tempo maior. É possível que, se deixado por mais tempo em contato com o dente, o material pudesse induzir a formação de dentina reparadora, já que reações de calcificação puderam ser observadas num curto espaço de tempo.

Conclusões

Os resultados observados permitem concluir que:

1. A BMP associada à hidroxiapatita é um material biocompatível.
2. A BMP associada à hidroxiapatita foi capaz de produzir zonas de calcificação sugestivas de futura reparação dentinária.

Referências

1. Benneth JH, Hunt P, Thorogood P. Bone morphogenetic protein-2 and -4 expression during murine orofacial development. *Arch Oral Biol.* 1995;40:847-54.
2. Bessho K, Tanaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M. Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1991;70:171-6.
3. Goldberg M, Six N, Decup F, Buch D, Soheili ME, Lasfargues JJ, *et al.* Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res.* 2001;15:91-5.
4. Goldberg M, Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Tompkins K, *et al.* Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *Am J Dent.* 2003;16(1):66-75.
5. Heikinheimo K. Stage-specific expression of decapentaplegic-Vg-related genes 2,4,6 (bone morphogenetic proteins 2, 4 and 6) during human tooth morphogenesis. *J Dent Res.* 1994;73:590-7.
6. Helder MN, Karg H, Bervoets YJM, Vukicevic S, Burger EH, D'Souza RN, *et al.* Bone morphogenetic protein - 7 (osteogenic protein - 1, OP-1) and tooth development. *J Dent Res.* 1998;54:545-54.
7. Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic protein (BMP) -2 and -4. *J Dent Res.* 1994;9(73):1515-22.
8. Nakashima M. Mitogenic and dentin-inductive effects of crude bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;73(4):484-9.
9. Rutherford MB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. *Eur J Oral Sci.* 2000;108:202-6.
10. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Biol.* 2002;47:177-87.

11. Sloan AJ, Rutherford RB, Smith AJ. Stimulation of the rat dentine-pulp complex by bone morphogenetic protein-7 *in vitro*. Arch Oral Biol. 2000; 45(2):173-7.
12. Suwa F, Yang L, Ohta Y, Fang YR, Ike H, Deguchi T. Ability of hydroxyapatite-bone morphogenetic protein (BMP) complex to induce dentin formation in dogs. Okajimas Folia Anat Jpn. 1993;70(5):195-201.

Recebido em 18/6/2007

Aceito em 10/8/2007