**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

MILIANE GONÇALVES GONZAGA

**Estudo qualitativo e quantitativo da interação entre a proteína morfogenética
rhBMP-2 e diferentes tipos de enxertos ósseos**

Ribeirão Preto
2014

MILIANE GONÇALVES GONZAGA

**Estudo qualitativo e quantitativo da interação entre a proteína morfogenética
rhBMP-2 e diferentes tipos de enxertos ósseos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
pelo Programa Ciências da Saúde
Aplicadas ao Aparelho Locomotor.

Área de concentração
Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação

Orientador
Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto)

Ribeirão Preto
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Gonzaga, Miliane Gonçalves.

Estudo qualitativo e quantitativo da interação entre a proteína morfogenética rhBMP-2 e diferentes tipos de enxertos ósseos. Ribeirão Preto, 2014.

80 f. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação.

Orientador: Issa, João Paulo Mardegan

1. rhBMP-2 2. Enxerto. 3. Reparo ósseo 4. Histomorfometria.

Miliane Gonçalves Gonzaga

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
pelo Programa Ciências da Saúde
Aplicadas ao Aparelho Locomotor.

Área de concentração
Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico esta dissertação a Deus por seu amor que redundou em misericórdia, provisão e fidelidade e também à minha mãe, Nelmair, com amor e gratidão pelo apoio e carinho que me fortaleceram a fé e alentaram o coração.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa pela oportunidade e instruções concedidas e também pelo exemplo de engajamento e amor pela pesquisa e docência.

À Prof^a. Dr^a Mamie Mizusaki Iyomasa pela parceria, amizade e pelo imensurável carinho.

Aos colegas de laboratório Bruna Kotake, Bianca, Marina, Fellipe, Éder, Daniela, Yamba, Rodrigo, Ricardo e Bruna Maria pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino pelas orientações e parceria.

À técnica de laboratório Nilce Wolga pelas orientações e parceria.

Aos familiares e aos amigos pelo carinho pelas palavras de ânimo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro ao projeto.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa

RESUMO

GONZAGA, M. G. **Estudo qualitativo e quantitativo da interação entre a proteína morfogenética rhBMP-2 e diferentes tipos de enxertos ósseos.** 2014. 80 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

As proteínas com potencial osteoindutor, com destaque a rhBMP-2, possuem amplos efeitos sobre o crescimento e a diferenciação celular. Este estudo, teve o objetivo avaliar a relação entre diferentes enxertos ósseos e a rhBMP-2 no reparo de defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos. Foram utilizados 56 ratos Wistar albinos, machos, aproximadamente 250g, com um período de espera de 6 semanas desde a criação do defeito até o sacrifício, divididos em 8 grupos (n=7): enxerto autólogo (AUT); enxerto homólogo (HOM); enxerto heterólogo (HET); enxerto autólogo e 5 µg rhBMP-2 (AUT BMP); enxerto homólogo e 5 µg rhBMP-2 (HOM BMP); enxerto heterólogo e 5 µg rhBMP-2 (HET BMP); 5 µg rhBMP-2 (BMP) e defeito ósseo crítico apenas (DOC). Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste ANOVA e pós-teste de TUKEY com múltiplas comparações (nível de significância de $p < 0,05$), após o emprego de metodologias de análise histológica qualitativa, histomorfometria e micro CT. Na quantificação do volume ósseo neoformado, todos os grupos obtiveram melhores resultados que DOC com diferença significativa. Os grupos HOM e HET apresentaram diferença significativa de AUT BMP, HOM BMP e HET BMP que tiveram maior formação óssea enquanto que AUT apresentou diferença significativa de HOM BMP e HET BMP. O grupo BMP não teve diferença significativa em relação a AUT, HOM, HET, AUT BMP, HOM BMP e HET BMP. Os grupos AUT, HOM e HET não tiveram diferença significativa entre si da mesma forma que os grupos AUT BMP, HOM BMP e HET BMP também não o tiveram. Quanto à quantificação de osteoclastos, não houve diferença significativa entre os grupos; porém, HET BMP teve mais células osteoblásticas que DOC com diferença significativa. Considerando os osteócitos, DOC e AUT apresentaram poucas células. Assim, DOC teve diferença significativa de BMP, HET, HOM BMP e HET BMP e AUT teve diferença significativa de BMP, HET, HOM BMP e HET BMP. Da mesma forma, AUT BMP teve diferença significativa em relação a HET que apresentou mais células. Na quantificação de fibras colágenas, não houve diferença significativa entre os grupos. A neoformação óssea progrediu das bordas para o centro do defeito e no grupo BMP o osso neoformado ocupou mais de 2/3 do defeito. No grupo DOC, foi constatada uma faixa estreita de tecido ósseo neoformado nas bordas e o restante do defeito foi preenchido por tecido conjuntivo. Nas imagens de micro CT, todos os grupos apresentaram maior formação óssea que o grupo DOC; sendo que AUT superou HOM e HET. Além disso, os diferentes enxertos associados à rhBMP-2 apresentaram maior formação óssea que os respectivos enxertos usados sem a proteína, com destaque para AUT BMP. Diante disso, foi possível concluir que a rhBMP-2 auxiliou o reparo ósseo quando administrada isoladamente ou associada aos diferentes enxertos ósseos, conferindo neste caso melhores resultados.

Palavras-chave: rhBMP-2. Enxerto. Reparo ósseo. Histomorfometria.

ABSTRACT

GONZAGA, M. G. **Qualitative and quantitative study of the interaction between bone morphogenetic protein rhBMP-2 and different types of bone grafts.** 2014. 80 p. Master degree thesis - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Proteins with osteoinductive potential, particularly the rhBMP-2, have great effects on growth and cell differentiation. This study aimed to evaluate the relationship between different bone grafts and rhBMP-2 on the repair of critical bone defects in rat skulls. Fifty six Wistar rats, male, approximately 250g of body weight were used, sacrificed six weeks after surgical experiment, and divided into 8 groups(n=7): autograft (AUT); homograft (HOM); xenograft (HET); autograft and 5 µg rhBMP-2 (AUT BMP); homograft and 5 µg rhBMP-2 (HOM BMP); xenograft and 5 µg rhBMP-2 (HET BMP); 5 µg rhBMP-2 (BMP) and critical bone defect only (DOC). The results were analyzed statistically by ANOVA and Tukey post-test with multiple comparisons ($p < 0.05$ of significance level), after the use of qualitative methodologies, micro CT morphology and histological analysis. According to the quantification of newly formed bone volume, all groups had better results than DOC group with a significant difference. The HOM and HET groups showed significant difference than AUT BMP, HOM BMP and HET BMP, that had higher bone formation, while AUT group was significantly different from HOM BMP and HET BMP. The BMP group had no significant difference in relation to AUT, HOM, HET, AUT BMP, HOM BMP and HET BMP. The AUT, HOM and HET groups had no significant difference between them, and also the groups AUT BMP, HOM BMP and HET BMP between them. Regarding the quantification of osteoclasts, there was no significant difference between groups; however, HET BMP had more osteoblastic cells than DOC group, with significant difference. For osteocytes quantification, AUT and DOC showed few cells. Thus, DOC had significant difference in relation to BMP, HET, HOM BMP and HET BMP; and AUT had significant difference in relation to BMP, HET, HOM BMP and HET BMP. Likewise, AUT BMP had significant difference compared to HET group, which showed more cells. Regarding to collagen fibers quantification, there was no significant difference between groups. New bone formation progressed from the edges to the center of the defect and for BMP group the newly formed bone occupied more than two thirds of the defect. DOC group showed a narrow band of newly formed bone at the edges and the remainder of the defect was filled by connective tissue. For micro CT analysis, all groups showed greater bone formation than the DOC group, being greater in AUT group than HOM and HET. Furthermore, the various grafts associated with rhBMP-2 showed greater bone formation than the isolated grafts, highlighting the AUT BMP. Therefore, it was concluded that rhBMP-2 helped bone repair when administered alone or associated with different bone grafts, giving better results when combined to the grafts.

Keywords: rhBMP-2. Graft. Bone repair. Histomorphometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Procedimentos operatórios e pós-operatórios imediatos	33
Figura 2 - Demarcação da área de tecido ósseo neoformado para a quantificação do volume através do programa Stereo Investigator ...	35
Figura 3 - Seleção das áreas de interesse previamente demarcadas em cada corte histológico inserido na lâmina	35
Figura 4 - Quantificação celular através do programa Image J	36
Figura 5 - Marcação das células concomitante à quantificação	37
Figura 6 - Coloração em Picrosirius red sob luz polarizada na área de tecido ósseo neoformado.....	38
Figura 7- Análise da região de interesse através do programa Data Viewer com a perspectiva em três dimensões.....	39
Figura 8 - Seleção da imagem de referência a partir da qual foram estabelecidas posteriormente as imagens dos extremos da região de interesse para a análise dos parâmetros ósseos através do programa CTAn.....	40
Figura 9 - Estabelecimento da imagem do extremo superior para análise através do programa CTAn.....	40
Figura 10 - Estabelecimento da imagem do extremo inferior para análise através do programa CTAn.....	40
Figura 11 - Binarização das imagens através do programa CTAn.....	41
Figura 12 - Obtenção dos resultados da análise dos parâmetros ósseos através do programa CTAn.....	41
Figura 13 - Gráfico da média do volume de tecido ósseo neoformado.....	47
Figura 14 - Gráfico da média do número de osteoclastos.....	48
Figura 15 - Gráfico da média do número de células osteoblásticas.....	49
Figura 16 - Gráfico da média do número de osteócitos.....	49
Figura 17 - Prancha histológica: AUT, HOM e HET.....	52
Figura 18 - Prancha histológica: AUT BMP, HOM BMP e HET BMP.....	53
Figura 19 - Prancha histológica: BMP e DOC.....	54

Figura 20 - Gráfico da média de fibras colágenas quantificadas pelo somatório das áreas identificadas em pixel ²	55
Figura 21 - Reconstrução da região de defeito ósseo através de micro CT	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa corporal dos animais (gramas)	45
Tabela 2 - Média e desvio padrão da quantificação do volume ósseo (μm^3).....	46
Tabela 3 - Média e desvio padrão da quantificação de células ósseas.....	48
Tabela 4 - Média e desvio padrão da quantificação de colágeno (pixel^2).....	54
Tabela 5 - Médias dos parâmetros ósseos (Micro CT) - Primeira parte.....	56
Tabela 6 - Médias dos parâmetros ósseos (Micro CT) - Segunda parte.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Reparo ósseo.....	19
2.2 Proteínas morfogenéticas ósseas.....	20
2.3 Enxertos ósseos.....	22
3 OBJETIVO.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Obtenção das formulações.....	28
4.2 Seleção dos animais.....	28
4.3 Planejamento experimental.....	29
4.4 Técnica Cirúrgica.....	30
4.4.1 Anestesia.....	30
4.4.2 Incisão e divulsão dos tecidos.....	30
4.4.3 Criação dos defeitos ósseos críticos e administração de materiais.....	31
4.4.4 Sutura dos tecidos e medicação.....	31
4.5 Controle pós-operatório.....	32
4.6 Sacrifício dos animais.....	32
4.7 Processamento histológico.....	33
4.8 Análise ao microscópio de luz.....	34
4.8.1 Volume de tecido ósseo neoformado.....	34
4.8.2 Quantificação de células ósseas.....	36
4.8.3 Análise qualitativa da região de neoformação óssea.....	37
4.8.4 Quantificação das fibras de colágeno analisadas sob microscopia polarizada.....	38
4.9 Análise da região de neoformação através da microtomografia computadorizada (Micro CT)	38
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6 RESULTADOS	44

6.1 Massa corporal dos animais.....	45
6.2 Análise do volume de tecido ósseo neoformado.....	46
6.3 Quantificação de células ósseas.....	47
6.4 Análise qualitativa da região de neoformação óssea.....	50
6.5 Quantificação das fibras de colágeno analisadas sob microscopia po- larizada.....	54
6.6 Análise da região de neoformação óssea através da microtomografia computadorizada (Micro CT)	55
7 DISCUSSÃO.....	58
8 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO.....	79

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A regeneração óssea é um processo que ocorre ao longo da vida para que os ossos possam desempenhar bem suas funções como proteção de órgãos, sustentação e movimentação do organismo. Contudo, existem condições clínicas em que a demanda deste processo aumenta substancialmente seja por lesões locais como traumas e fraturas, cirurgias ou por má formação, tumores e fatores sistêmicos como osteoporose ou por disfunções hormonais (AMADEI et al., 2006; DIMITRIOU et al., 2011; INODA; YAMAMOTO; HATTORI, 2007). A limitação do reparo tecidual pode levar o organismo à perda de membros e, conseqüentemente, à incapacidade funcional atrapalhando as atividades de vida diária (GIANNOUDIS; POUNTOS, 2005).

Segundo Alencar e Vieira (2010), há grande necessidade de reposição do tecido musculoesquelético decorrente da maior expectativa de vida da população e do fato de ser cada vez mais comum pacientes jovens necessitarem de intervenções cirúrgicas com a aplicação de materiais que proporcionem uma solução duradoura.

Chenard et al. (2012) e Peres e Lamano (2011) apontam que grandes defeitos ósseos causados por fatores congênitos, traumas ou cirurgias podem não se curar espontaneamente. Por isso, é relevante estudar os fatores envolvidos na neoformação óssea como o uso de biomateriais e fatores de crescimento, incluindo proteínas morfogenéticas e enxertias de diversas naturezas. A busca por materiais que favoreçam a formação óssea e que interajam bem com o organismo constitui, portanto, um desafio. Muitos dos fatores de crescimento que estimulam o reparo ósseo precisam de um carreador para que não sejam rapidamente degradados pelo organismo, mas possam ser liberados de maneira gradativa e sustentada. A preocupação com a segurança do organismo também é um fator importante a ser considerado na escolha dos biomateriais e fatores de crescimento. Assim, dentre as propriedades mais visadas, destacam-se: a biocompatibilidade, a osseointegração, a osteocondução, osteoindução, a osteogênese.

O uso de fatores de crescimento nesse processo de recuperação é importante devido à possibilidade de minimizar a morbidade e as complicações associadas ao

procedimento cirúrgico uma vez que eles facilitam o reparo. Neste cenário, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), especialmente a BMP-2, merecem destaque por possibilitarem a recuperação óssea em fraturas e defeitos de diferentes origens e sítios, além dos casos de fusão espinhal (EKROL et al., 2008; FRIEDLAENDER et al., 2001; VACCARO et al., 2004).

As BMPs são glicoproteínas osteoindutoras encontradas abundantemente nos ossos, fazem parte da superfamília de fatores de crescimento transformante beta (TGF- β) e são sintetizadas por células osteoprogenitoras, osteoblastos, condrócitos e plaquetas presentes nestes órgãos. Elas são capazes de promover a diferenciação de células mesenquimais em células especializadas, inclusive em células ósseas; além disso, atraem células osteoprogenitoras para o sítio de formação óssea por quimiotaxia e favorecem a mitose das células ósseas, contribuindo para a neoformação e o reparo ósseo. Apesar de existirem mais de vinte tipos de BMPs, nem todas possuem a capacidade de formar tecido ósseo. Essas proteínas foram identificadas e purificadas partir de matriz óssea humana. Técnicas de DNA recombinante permitem a síntese das proteínas morfogenética ósseas recombinantes humanas (rhBMPs) em larga escala em relação à quantidade de proteína extraída diretamente do tecido ósseo (BESSHO; TAGAWA; MURATA, 1989; LISSENBERG-THUNNISSEN et al., 2011; LOUREIRO, 2010; SANTOS et al., 2005).

Em estudos com defeitos ósseos de tamanho crítico em ratos, a BMP mostrou promover a regeneração tecidual (CHEN; DENG; LI, 2012). Além disso, estima-se que mais de um milhão de pessoas no mundo foram tratadas com BMPs para fusões vertebrais, restabelecimento de fraturas e reconstrução maxilofacial (PECINA; VUKICEVIC, 2007). Apesar dos custos elevados vinculados ao tratamento com BMPs, a aceleração do reparo ósseo proporciona a redução do tempo de internação e retorno mais rápido às atividades de trabalho do paciente além de diminuir a necessidade de cirurgias de revisão (LISSENBERG-THUNNISSEN et al., 2011). Assim, o uso de BMPs associadas a enxertos ósseos de diferentes naturezas tem sido apontado como uma conduta apropriada para o tratamento de muitas situações envolvendo o reparo ósseo (SCHMIDMAIER et al., 2007).

O autoenxerto tem se apresentado como uma boa opção para viabilizar o reparo ósseo, sendo considerado padrão ouro dentre os enxertos; porém apresenta

desvantagens como morbidade e limitação quanto à disponibilidade de material. O enxerto homólogo pode ser obtido de bancos de ossos ou de doadores vivos. Neste caso, há necessidade de submeter o doador a uma cirurgia, mas ainda pode ser considerado uma boa opção dependendo da conjuntura do tratamento. Deve ser considerado ainda que este tipo de enxerto pode oferecer riscos de rejeição devido à menor histocompatibilidade e ser proveniente de outro indivíduo. O enxerto heterólogo passa por um processo de tratamento e conservação para ser utilizado em indivíduos de outra espécie e pode ser encontrado na forma desmineralizada. Esse enxerto se sobressai por não requerer um procedimento cirúrgico secundário e não incorrer no problema de quantidade de material disponível (CHENARD et al., 2012; DIMITRIOU et al., 2011).

Com o aumento da expectativa de vida, evidenciado pelo envelhecimento da população, os custos com a saúde tendem a elevar, inclusive com gastos relacionados a doenças ósseas como a osteoporose e as fraturas a ela relacionadas. Desta forma, a área biomédica tem feito esforços para compreender os mecanismos envolvidos no reparo ósseo e desenvolver materiais que o auxiliem (CHEN; DENG; LI, 2012). Neste contexto, estudos em modelos animais têm auxiliado na compreensão de mecanismos envolvidos nos processos de regeneração (PECINA; VUKICEVIC, 2007).

Existem vários métodos para a análise do tecido ósseo neoformado; dentre eles, estão: as imagens radiológicas e as análises histológicas e histomorfométricas com avaliações qualitativas e quantitativas (BESSHO et al., 2002; BOUXSEIN et al., 2001; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Revisão da literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Reparo ósseo

O osso é um tipo de tecido conjuntivo mineralizado, com uma matriz extracelular rica em colágeno, que recebe grande influência hormonal, nutricional e de fatores moleculares locais para sua constante remodelação (BEZERRA et al., 2012; SODEK; MCKEE, 2000). O tecido ósseo é constituído por células que interagem durante a remodelação como os osteoblastos e os osteoclastos; sendo estes responsáveis pela reabsorção óssea enquanto aqueles realizam a formação óssea. O equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea é indispensável para garantir a integridade do tecido e minimizar os riscos de fraturas (CANALIS, 2005, 2009). Além disso, a função osteoclástica parece influenciar o papel dos osteoblastos na formação óssea, porém os mecanismos ainda precisam ser elucidados (KREJA et al., 2010). Desta forma, os osteoblastos desempenham sua função de acordo com a conjuntura de sinais moleculares de diferenciação celular e produção de matriz. A regulação local da formação óssea influencia a morfologia esquelética tanto no aspecto qualitativo quanto no quantitativo (WURTZ; BERDAL, 2003).

O reparo tecidual compreende três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelagem. Estas fases envolvem mecanismos moleculares e celulares desencadeados desde o extravasamento de plasma, a coagulação, a agregação plaquetária, a proliferação celular e o remodelamento. Estes eventos ocorrem de maneira sucessiva e com etapas de transição entre as fases, inclusive com situações peculiares à fase anterior e posterior ocorrendo concomitantemente (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

A fase inflamatória começa logo após a lesão tecidual com a liberação de substâncias vasoativas e de substâncias que desencadeiam a cascata de

coagulação com a atuação de fatores de crescimento que agem através da quimiotaxia para atrair as células que participarão do reparo. O coágulo formado é constituído por colágeno, plaquetas e trombina que propiciam a produção de citocinas e fatores de crescimento além da atração de células de defesa para o local da lesão. As células de defesa, dentre elas neutrófilos e macrófagos, auxiliam na angiogênese, na fibroplasia e na produção de matriz extracelular. Na fase proliferativa, há a epitelização, a angiogênese, a granulação e o início da deposição de fibras colágenas (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006a, 2006b). Durante a fase de remodelamento, ocorre grande deposição de fibras colágenas. No princípio, são sintetizadas fibras mais finas; depois, estas fibras são reabsorvidas e substituídas por fibras mais espessas e mais organizadas (WITTE; BARBUL, 1997). Os fibroblastos produzem colágeno tipo I o qual predomina em tecidos conjuntivos como ossos e tendões que estão mais expostos a cargas e tensões. Já o colágeno tipo III predomina em tecidos mais moles e no tecido de granulação (ROBSON; STEED; FRANZ, 2001).

O aumento da formação óssea, especificamente, pode se basear em três mecanismos: o aumento da replicação celular, a inibição da morte celular e a indução da diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos (CANALIS, 2009). As células mesenquimais possuem a capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares, estão presentes nas situações de reparação do tecido lesado e são tão importantes quanto os fatores biomoleculares neste contexto (GUO; DIPIETRO, 2010; SOCARRÁS-FERRER et al., 2013).

2.2 Proteínas morfogenéticas ósseas

A literatura tem descrito alguns tipos de proteínas com capacidade osteoindutora, ou seja, com capacidade de promover a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em células sintetizadoras de osso. Dentre essas proteínas, destacam-se as proteínas morfogenéticas dos tipos 2, 4 e 7. As BMPs foram identificadas e purificadas a partir da matriz óssea humana (BESSHO;

TAGAWA; MURATA, 1989). Até então, foram identificadas diversas proteínas da mesma família, ou seja, proteínas com estruturas similares; algumas delas sintetizadas por meio de técnicas biológicas moleculares e são denominadas proteínas morfogenéticas ósseas recombinantes humanas ou rhBMP (CELESTE et al., 1994; URIST, 1997; WOZNEY, 1989).

As BMPs fazem parte da superfamília TGF- β , que engloba polipeptídeos com características estruturais comuns (KINGSLEY, 1994). Além disso, possuem um importante papel na migração de células progenitoras, proliferação de células mesenquimais, diferenciação de células osteogênicas ou condrogênicas, invasão vascular e remodelação óssea (RAUCH et al., 2000; REDDI, 1997; SPECTOR et al., 2001). Estas proteínas são capazes de estimular osteoblastos e osteoclastos (BOSEMARK et al., 2013).

A atividade de osteoindução das rhBMPs foi avaliada em estudos *in vivo* (FUJIMURA et al., 1995; ISSA et al., 2010; KUSUMOTO et al., 1995). Devido à potente ação osteoindutora observada nestes estudos, torna-se evidente o potencial dessas proteínas para uma grande variedade de aplicações clínicas como cirurgias reconstrutivas, defeitos ósseos provocados por doenças, perdas ósseas devido a alterações fisiológicas, dentre outras situações que requerem o reparo ósseo (BOYNE, 1995; MARDEN et al., 1994).

A proteína morfogenética óssea recombinante humana tipo 2 (rhBMP-2) tem despertado interesse para aplicações clínicas devido a sua capacidade diferenciada de induzir a ossificação e por estar disponível comercialmente. Entretanto, *in vivo*, a rhBMP-2 se difunde rapidamente a partir do local de implantação quando depositada em solução, o que abrevia seu efeito osteoindutor; além disso, é um material de alto custo (FUJIMURA et al., 1995). Estudos recentes têm demonstrado que a aplicação de doses elevadas da rhBMP-2 diretamente sobre os tecidos é praticamente ineficaz quanto à indução de osteogênese devido à rápida metabolização proteica; entretanto, doses menores, mas sustentadas, parecem produzir resultados satisfatórios (BOSTROM et al., 1995; LEE et al., 1994; YASKO et al., 1992). Para que isto ocorra, é indispensável um sistema carreador como, por exemplo, os enxertos ósseos que apresentam potencial osteogênico (SANTOS et al., 2005).

A via de sinalização das BMPs é capaz de desencadear a transmissão de informações do meio extracelular para o citoplasma e o núcleo, promovendo a

regulação de genes responsáveis pela função óssea devido à ligação destas proteínas em receptores da membrana celular. Nesta conjuntura, atuam também antagonistas e moduladores intra e extracelulares de BMPs que permitem o equilíbrio entre os mecanismos de reparo (CANALIS, 2009; LISSENBURG-THUNNISSEN et al., 2011; ZAKIN; ROBERTIS, 2010).

Devido a essas características funcionais, as BMPs permitem inúmeras aplicações na ortopedia, na traumatologia, na odontologia e em outros campos que trabalham com perdas ou defeitos ósseos desencadeados por anomalias do desenvolvimento, traumas e doenças que envolvem o tecido ósseo (SANTOS et al., 2005).

2.3 Enxertos ósseos

O uso de enxertias ósseas na prática clínico-cirúrgica têm possibilitado nos últimos anos a reconstrução da anatomia de um sítio ósseo perdido por diferentes causas, congênitas ou adquiridas, devolvendo a funcionalidade parcial ou total ao paciente. Assim, promovem a recuperação óssea por três meios: osteogênese, osteoindução e osteocondução (ABRAHAMS; HAYT; ROCK, 2000). Osteogênese é o termo utilizado para quando o próprio enxerto ósseo apresenta em sua composição, se bem preservado, células com potencial de formar osso como fazem os osteoblastos. A osteoindução se refere à situação em que células mesenquimais indiferenciadas se diferenciam em células sintetizadoras de osso. Já a osteocondução acontece quando se tem uma estrutura que favorece a migração de células osteogênicas para o local desejado (RAGHOEBAR et al., 2005).

Considerando esta variedade de opções para as enxertias ósseas, alguns parâmetros devem ser seguidos para a adequada seleção do material, sendo alguns deles: potencial de osteogênese, osteocondução e osteoindução, capacidade de estabilizar materiais associados ao enxerto, não promover ou facilitar processo infecciosos, ser de fácil acesso e baixo custo além de não promover morbidade ao

doador (YILDIRIM et al., 2000). Assim, como opções para a realização do enxerto ósseo, têm-se osso autólogo, homólogo e heterólogo.

O enxerto autólogo é aquele em que o material ósseo, particulado ou em bloco, é transplantado de uma área doadora para outra área receptora em um mesmo indivíduo (WEIGEL, 1996). Este tipo de enxerto é um dos mais utilizados na prática médica, sendo possível obter uma resposta osteogênica mais rápida e eficiente e sem rejeição ao tecido receptor (ALEXANDER, 1987). Todavia, sua obtenção é feita durante o procedimento cirúrgico o que aumenta o tempo e o risco pós-operatório além da quantidade poder ser insuficiente para o preenchimento do leito receptor (PERMATTEI; FLO, 1999). O enxerto autólogo é rapidamente incorporado pelo leito receptor e não difere quanto à histocompatibilidade (MARTINEZ, 1999). Ele é considerado o padrão ouro por possuir as propriedades de osteocondução, osteopromoção e osteogenicidade; embora possa falhar devido ao método de coleta e implantação ou devido às condições próprias do paciente e da amostra coletada (GRAZIANI et al., 2004; KANAKARIS et al., 2007).

Outro tipo de enxerto é o homólogo, aloenxerto ou enxerto alógeno em que a relação entre leito ósseo doador e receptor envolve dois indivíduos de mesma espécie, porém sem parentesco. Esse tipo de enxerto pode ser rapidamente transplantado a fresco, ou pode ser conservado em um banco de ossos (PERMATTEI; FLO, 1999). Quando conservado, esse material pode ser tratado por congelamento, secagem, autoclave, preservação química ou irradiação (FOSSUM et al., 2002). O enxerto homólogo representa uma boa alternativa para o sítio doador em termos de dor e morbidade, mas representa um risco para infecção viral ou bacteriana, além de ser susceptível ao ataque do sistema imune (CALORI et al., 2011).

Há também o enxerto heterólogo ou xenoenxerto que é utilizado em procedimentos cirúrgicos; suas propriedades com relação à osteogênese dependerão do tamanho das partículas e do método como foram obtidos. Os xenoenxertos bovinos são muito utilizados devido à disponibilidade e ao menor custo (PERES; LAMANO, 2011). A maior característica do xenoenxerto é a osteocondução. O processamento do osso bovino resulta em perdas nas porções orgânicas, principalmente colágeno, e substâncias inorgânicas. As proteínas podem ser retiradas por procedimentos térmicos em altas temperaturas, mas o tratamento

com solventes orgânicos e temperaturas controladas permite a eliminação de células, de várias proteínas não colágenas e também de minerais, deixando um pouco de fatores de crescimento como BMPs e colágeno (CALASANS-MAIA et al., 2009).

Os bancos de ossos existem no Brasil desde a década de 50, mas a regulamentação de normas práticas durante os anos 90 limitou o número desses bancos. Diversas considerações técnicas devem ser seguidas como a seleção dos doadores com base na idade, no sexo, na causa da morte, na história clínica pregressa e em testes laboratoriais; sendo que existe um risco considerável do enxerto ser um canal de transmissão de agentes causadores de doenças. Por isso, é necessário haver uma coleta adequada do tecido e métodos de esterilização e estocagem eficientes (ALENCAR; VIEIRA, 2010).

Objetivo

3 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a relação de integração entre diferentes enxertos ósseos e a rhBMP-2 no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das formulações

A proteína morfogenética utilizada neste estudo foi obtida junto ao Professor Doutor Walter Sebold, do Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften (Biozentrum) der Universität Würzburg, Alemanha, que é o autor do método de produção industrial da rhBMP-2 em cultura de *E. coli* e colaborador deste estudo.

A rhBMP-2 foi dissolvida na proporção de 1:1 em solução neutra de tampão fosfato em pH 7,2. A solução final foi aplicada na concentração de 5µg de rhBMP-2 com o auxílio de uma micropipeta (Eppendorf, Hamburg, Germany) previamente calibrada sobre a área de estudo.

O enxerto heterólogo usado foi mineral, de origem bovina e na forma liofilizada com granulação fina de 425-300 µm (Lumina-Bone[®], São Carlos-SP).

4.2 Seleção dos animais

Neste estudo, foram selecionados 56 ratos Wistar albinos, jovens, machos, pesando aproximadamente 250 gramas (45 dias), oriundos do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, USP. Esses animais foram separados em 8 grupos, n=7, cada um deles com um período de espera de 6 semanas desde a criação do defeito ósseo até o sacrifício. Foram alojados em caixas com no máximo 5 animais, com livre acesso a água e alimento, temperatura controlada (23 ±1°C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, sendo o início do período de claro às 7 horas. Os protocolos experimentais abordados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, protocolo

número 082/2011, e seguem os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

4.3 Planejamento experimental

Os 56 animais foram divididos em oito grupos, $n=7$, de acordo com o tipo de tratamento após a criação do defeito ósseo crítico:

Grupo AUT: defeito ósseo crítico preenchido com enxerto ósseo autólogo particulado.

Grupo HOM: defeito ósseo crítico preenchido com enxerto ósseo homólogo particulado.

Grupo HET: defeito ósseo crítico preenchido com enxerto ósseo heterólogo (osso bovino liofilizado).

Grupo AUT BMP: defeito ósseo crítico preenchido com enxerto ósseo autólogo particulado + 5 μg rhBMP-2.

Grupo HOM BMP: defeito ósseo crítico preenchido com enxerto ósseo homólogo particulado + 5 μg rhBMP-2.

Grupo HET BMP: defeito ósseo crítico preenchido com enxerto ósseo heterólogo (osso bovino liofilizado) + 5 μg rhBMP-2.

Grupo BMP: defeito ósseo crítico preenchido com 5 μg rhBMP-2.

Grupo DOC: defeito ósseo crítico preenchido apenas com coágulo sanguíneo.

4.4 Técnica Cirúrgica

4.4.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados com a solução anestésica de Coopazine (Xylazina) - sedativo, analgésico e relaxante muscular; e Dopalen (Ketamina) - anestésico geral, fornecido pela Agibrands do Brasil LTDA - Campinas, SP, Brasil, na proporção de 75 mg/Kg de Ketamina e de 10mg /Kg de Xylazina, injetada por via intraperitoneal. Quando necessário, houve uma complementação de 20-30% da dose inicial. Também foi aplicada nos olhos dos animais, durante a cirurgia, uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% para prevenir o ressecamento das córneas.

4.4.2 Incisão e divulsão dos tecidos

Depois de anestesiados, os animais foram submetidos a uma incisão sagital de aproximadamente 1 cm de extensão na região central da calvária, com lâmina de bisturi estéril número 15, montada em cabo de bisturi número 3, de modo a expor a região óssea desejada para a criação do defeito ósseo (DOC) (Figura 1a-1b).

4.4.3 Criação dos defeitos ósseos críticos e administração de materiais

Na calvária exposta, foram criados os defeitos ósseos críticos no osso parietal nos lados direito e esquerdo usando uma broca cirúrgica tipo trefina, 6 mm de diâmetro externo e 5 mm de diâmetro interno, adaptada em contra-ângulo (Kavo, São Paulo, Brasil) e com o auxílio de um motor elétrico para implantes, ajustado em 3000 rpm, com constante e abundante irrigação com soro fisiológico 0,9% (Figura 1c).

Em relação ao leito doador dos enxertos, o bloco ósseo foi removido da calota craniana, particulado com o auxílio de um particulador de osso e o tecido triturado foi colocado no leito ósseo receptor na calvária de acordo com a divisão dos grupos (Figura 1d). Os animais correspondentes aos grupos com enxerto autólogo receberam o próprio bloco ósseo que fora removido e triturado enquanto que os animais correspondentes aos grupos com enxerto homólogo receberam o bloco ósseo retirado e triturado que pertencera a outro animal. Já os animais correspondentes aos grupos com enxerto heterólogo receberam o enxerto bovino liofilizado (Figura 1e). A rhBMP-2 foi administrada nos grupos AUT BMP, HOM BMP, HET BMP e BMP (Figura 1f).

4.4.4 Sutura dos tecidos e medicação

Após a cirurgia, foi realizada a sutura dos tecidos, sendo a pele do animal, juntamente com o periósteo, recolocada em sua posição original e suturada com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) de modo a fechar devidamente as margens do retalho (Figura 1g). Em seguida, cada animal recebeu 24 000 IU do antibiótico Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge[®], Campinas, SP, Brasil) (Figura 1h).

4.5 Controle pós-operatório

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

4.6 Sacrifício dos animais

Após o período pré-determinado de 6 semanas de criação do defeito ósseo crítico (DOC), os animais foram anestesiados com a solução anestésica de Coopazine (Xylazina) - sedativo, analgésico e relaxante muscular; e Dopalen (Ketamina) - anestésico geral, fornecido pela Agibrands do Brasil LTDA - Campinas, SP, Brasil, na proporção de 75 mg/Kg de Ketamina e de 10 mg/Kg de Xylazina. A solução foi injetada por via intraperitoneal. Na sequência, os animais foram guilhotinados e a cabeça dissecada para a obtenção da amostra de interesse (Figura 1i).

Figura 1 - Procedimentos operatórios e pós-operatórios imediatos. a) incisão, b) divulsão, c) criação do defeito ósseo, d) trituração do enxerto autólogo ou homólogo, e) aplicação do enxerto heterólogo, f) aplicação da rhBMP-2, g) sutura, h) aplicação do Pentabiotic, i) corte do bloco ósseo de interesse.

4.7 Processamento histológico

A calvária foi removida com tesouras e pinças adequadas. Os tecidos moles presentes foram separados do tecido ósseo para a obtenção do fragmento ósseo contendo o defeito com margem de segurança. A região de defeito ósseo foi dividida ao meio, os fragmentos obtidos ficaram imersos em solução fixadora de formaldeído a 4% em solução tampão fosfato por 48 horas e, posteriormente, foram descalcificados em EDTA a 10%, trocando-se as soluções a cada 2 dias durante 20 dias. As peças passaram por diafanização, sendo os fragmentos desidratados em série crescente de álcoois: 70% (*overnight*) e 90%, 95% e 100% (1 hora em cada concentração). Por fim, os fragmentos ósseos foram colocados em partes iguais de álcool e xilol (*overnight*) e diafanizados em xilol, com trocas a cada 1 hora, sendo

executadas 3 trocas de xilol. Logo após, os fragmentos de cada defeito foram incluídos em parafina juntos e realizados cortes semisseriados de 5µm de espessura, em toda a extensão de defeito ósseo presente no fragmento de calvária. Os cortes foram corados por Picrosirius red, Tricrômico de Masson e hematoxilina-eosina e observados em microscopia de luz.

4.8 Análise ao microscópio de luz

4.8.1 Volume de tecido ósseo neoformado

A quantificação do volume de osso neoformado (μm^3) de cada animal foi feita utilizando princípios de estereologia com o uso do programa Stereo Investigator (MBF Bioscience, USA) juntamente com o auxílio de um microscópio óptico Axio Imager Z2 (Zeiss, Germany) acoplado a uma Câmara digital (Zeiss). Ao longo de um dos defeitos ósseos, foram selecionados aleatoriamente 16 cortes histológicos de cada animal, abrangendo toda área cirúrgica, corados com hematoxilina-eosina, valor definido durante o plano piloto. Os cortes foram analisados com a objetiva de 20X com o uso do microscópio dotado de “Z motorizado”. O programa permite calcular o volume pelo método de Cavalieri através da aplicação de um sistema teste, composto por 150 µm de distância sobre o contorno da área desejada. Os resultados foram obtidos pela somatória de pontos do sistema teste sobre a área de interesse do tecido ósseo neoformado demarcado, tomando a espessura de 5µm do corte histológico como referência (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Demarcação da área de tecido ósseo neoformado para a quantificação do volume através do programa Stereo Investigator.

Figura 3 - Seleção das áreas de interesse previamente demarcadas em cada corte histológico inserido na lâmina. Pelo método de Cavalieri, o programa calcula o resultado do número de pontos dentro da área demarcada e multiplica pela espessura do corte ($5\text{ }\mu\text{m}$) para fornecer o volume ósseo.

4.8.2 Quantificação de células ósseas

Os cortes corados com Tricrômico de Masson, relativos a um dos defeitos ósseos criados em cada animal, foram fotografados com o auxílio do programa AxioVision (Zeiss, Germany) e do microscópio óptico Axio Imager Z2 (Zeiss, Germany) acoplado a uma Câmara digital (Zeiss). Foram selecionados aleatoriamente, ao longo da região de defeito ósseo, 8 cortes histológicos e 4 imagens de cada corte foram capturadas, totalizando 32 imagens por animal conforme valor definido durante o plano piloto. As imagens foram obtidas com objetiva de 40X para facilitar a identificação das células de interesse.

A análise das imagens e consequente quantificação de osteoclastos, osteócitos e células osteoblásticas foi realizada por intermédio do programa “Image J 1,48” (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Quantificação celular através do programa Image J.

Figura 5 - Marcação das células concomitante à quantificação.

4.8.3 Análise qualitativa da região de neoformação óssea

Para a análise microscópica, as amostras foram colocadas em parafina e cortes semisseriados de 5 μ m de espessura foram realizados, percorrendo um dos defeitos. Esses cortes foram corados em hematoxilina-eosina e, posteriormente, analisados através de um microscópio óptico Axio Imager Z2 (Zeiss, Germany) acoplado a uma câmera digital (Zeiss).

4.8.4 Quantificação das fibras de colágeno analisadas sob microscopia polarizada

Também foi avaliado quantitativamente o teor de colágeno com o auxílio do programa AxioVision (Zeiss, Germany) e do microscópio óptico Axio Imager Z2 (Zeiss, Germany) acoplado a uma Câmara digital (Zeiss). Foram selecionadas aleatoriamente, ao longo da região de defeito ósseo, 16 lâminas histológicas, de um dos defeitos ósseos de cada animal, coradas com Picrosirius red que é apropriado para a observação das fibras colágenas no microscópio sob luz polarizada. O programa utilizado quantificou a somatória das áreas em pixel² (Figura 6).

Figura 6 - Coloração em Picrosirius red sob luz polarizada na área de tecido ósseo neoformado.

4.9 Análise da região de neoformação através da microtomografia computadorizada (Micro CT)

Em um dos animais de cada grupo foi realizada a análise e a reconstrução da região dos defeitos ósseos através do micro CT. As amostras coletadas foram

previamente armazenadas em solução fixadora de formaldeído a 10% para serem conservadas até a realização da microtomografia computadorizada no equipamento SkyScan 1172, Bruker, Belgium, Software version 1.5, tensão 59 kV, corrente 165 μ A, câmera pixel size 8.70 μ m. As imagens foram analisadas usando os programas Data Viewer v.1.5.1 e CTAn v.1.14.4 com pixel size de 20 μ m.

Através do programa Data Viewer, que oferece a perspectiva em nas dimensões coronal, transaxial e sagital, as imagens foram visualizadas e o plano coronal foi escolhido para salvar aquelas que seriam utilizadas nas medições. Isso porque este plano ofereceu qualidade e facilidade para proceder com a posterior análise da região de reparo ósseo no CTAn, um programa que permite a obtenção dos parâmetros peculiares à análise de micro CT.

Usando o programa CTAn, foi identificada a imagem a partir da qual fora escolhido o plano coronal para que servisse de referência para marcar as imagens de início e término para a análise dos parâmetros ósseos. Posteriormente, as imagens foram binarizadas e a região de defeito ósseo foi demarcada com um retângulo (1mm na direção horizontal por 6mm na direção vertical). Como parâmetro de binarização (threshold) foram utilizados 80 a 160 na escala para a identificação de tecido ósseo e 160 a 255 para a identificação do enxerto heterólogo. Por fim, as imagens foram processadas para a obtenção dos parâmetros ósseos dos dois defeitos presentes em cada animal (Figuras 7 a 12).

Figura 7 - Análise da região de interesse através do programa Data Viewer com a perspectiva em três dimensões.

Figura 8 - Seleção da imagem de referência a partir da qual foram estabelecidas posteriormente as imagens dos extremos da região de interesse para a análise dos parâmetros ósseos através do programa CTAn.

Figura 9 - Estabelecimento da imagem do extremo superior para análise através do programa CTAn.

Figura 10 - Estabelecimento da imagem do extremo inferior para análise através do programa CTAn.

Figura 11 - Binarização das imagens através do programa CTAn.

Figura 12 - Obtenção dos resultados da análise dos parâmetros ósseos através do programa CTAn.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste estatístico utilizado foi ANOVA com o pós-teste de TUKEY com múltiplas comparações. Todas as amostras foram verificadas quanto à distribuição normal e também quanto à presença de *outliers* mediante teste de Grubbs. O nível de significância estatística foi $p < 0,05$.

Resultados

6 RESULTADOS

Todos os animais do experimento sobreviveram ao procedimento cirúrgico e, apesar da exposição das meninges na confecção dos DOC, durante o período pós-operatório não foram observados sinais de infecção ou complicações neurológicas, sendo que todos os animais permaneceram alertas, conscientes e movimentando-se normalmente.

Não foi observado crescimento ósseo na face ventral das meninges, em contato com o tecido nervoso. Além disso, o preenchimento iniciou-se de maneira centrípeta e do fundo para a superfície do DOC, apresentando aspecto típico de tecido osteóide, menos compacto que o tecido ósseo vizinho.

6.1 Massa corporal dos animais

A tabela a seguir mostra a massa corporal dos animais no dia do sacrifício.

Tabela 1: Massa corporal dos animais (gramas)							
AUT	HOM	HET	AUT BMP	HOMO BMP	HET BMP	BMP	DOC
354	288	289	322	306	338	288	278
336	301	308	300	312	306	319	304
306	306	318	300	306	307	335	312
282	298	306	312	299	322	306	300
302	314	302	350	289	300	300	289
299	322	288	302	302	298	299	278
314	326	300	301	300	303	304	301

6.2 Análise do volume de tecido ósseo neoformado

Os resultados para a neoformação óssea demonstraram que os grupos AUT, HOM e HET foram diferente estatisticamente de DOC. Além disso, estes dois últimos grupos foram diferentes estatisticamente de AUT BMP, HOM BMP e HET BMP; sendo que o grupo AUT não diferiu estatisticamente de AUT BMP, mas HOM e HET foram diferentes, respectivamente, de HOM BMP e HET BMP.

Os grupos que receberam a rhBMP-2 isoladamente (grupo BMP) ou associados aos enxertos (AUT BMP, HOM BMP e HET BMP) apresentaram diferença estatística em relação ao DOC. Foi demonstrado também que o grupo BMP não foi diferente estatisticamente de AUT, HOM, HET, AUT BMP, HOM BMP e HET BMP.

Os grupos AUT, HOM e HET não foram estatisticamente diferentes entre si quando comparados; sendo que o mesmo ocorreu entre os grupo AUT BMP, HOM BMP e HET BMP (Tabela 2; Figura 13).

Tabela 2: Média e desvio padrão da quantificação do volume ósseo (μm^3)	
AUT	34020000 $\pm$ 5181000
HOM	32490000 $\pm$ 9023000
HET	33540000 $\pm$ 8944000
AUT BMP	53780000 $\pm$ 7611000
HOM BMP	56200000 $\pm$ 16970000
HET BMP	55650000 $\pm$ 9814000
BMP	41670000 $\pm$ 7093000
DOC	66850000 $\pm$ 8019000

Figura 13 - Gráfico da média do volume de tecido ósseo neoformado. *(p<0,05), ***(p<0,001), ****(p<0,0001).

6.3 Quantificação de células ósseas

A quantificação das células ósseas demonstrou que não houve diferença estatística quanto ao número de osteoclastos entre os grupos. Quanto ao número de células osteoblásticas, houve diferença apenas entre HET BMP e DOC. Porém, quanto ao número de osteócitos, houve diferença entre BMP e DOC, HET e DOC, HOM BMP e DOC, HET BMP e DOC, BMP e AUT, HET e AUT, AUT e HOM BMP, AUT e HET BMP e entre HET e AUT BMP, conforme mostram a tabela 3 e as figuras 14 a 16.

Tabela 3: Média e desvio padrão da quantificação de células ósseas

	Osteoclastos	Células osteoblásticas	Osteócitos
AUT	16,71 ± 12,35	1396 ± 541,5	904,2 ± 77,33
HOM	50,00 ± 57,04	1528 ± 622,8	1451 ± 646,8
HET	42,86 ± 36,65	1216 ± 260,4	2211 ± 908,3
AUT BMP	24,00 ± 15,21	1377 ± 192,2	1225 ± 246,0
HOM BMP	32,57 ± 31,61	1402 ± 497,1	2044 ± 672,6
HET BMP	36,71 ± 35,42	1871 ± 742,3	1946 ± 303,8
BMP	33,00 ± 21,18	1666 ± 542,7	1901 ± 134,3
DOC	22,57 ± 29,39	824,9 ± 398,5	864,1 ± 293,6

Figura 14 - Gráfico da média do número de osteoclastos.

Figura 15 - Gráfico da média do número de células osteoblásticas. *($p < 0,05$).

Figura 16 - Gráfico da média do número de osteócitos. *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$).

6.4 Análise qualitativa da região de neoformação óssea

As respostas teciduais de AUT, HOM e HET foram muito semelhantes entre si. Nestes grupos, foi constatado tecido ósseo nas bordas da ferida cirúrgica, avançando consideravelmente em direção ao centro do defeito na maioria dos espécimes. O centro do defeito ósseo mostrou-se ocupado por um tecido conjuntivo que abrigou as partículas ósseas remanescentes dos enxertos. Na superfície de alguns remanescentes dos enxertos ósseos, foi constatada a aposição de uma camada de tecido ósseo imaturo. Todavia, nos remanescentes dos enxertos que não exibiram aposição de tecido ósseo foram constatadas com frequência lacunas de reabsorção ocupadas por osteoclastos ativos, especialmente no grupo HET.

Um tecido conjuntivo fibroso ocupou as superfícies do defeito ósseo e circunscreveu as partículas ósseas remanescentes do enxerto. Este tecido mostrou-se composto por grande quantidade de fibras colágenas entre as quais se observou a presença de moderada quantidade de fibroblastos, grande quantidade de vasos sanguíneos e raros focos isolados de células inflamatórias, especialmente nos locais onde a reabsorção óssea das partículas dos enxertos estava ocorrendo ativamente (Figura 17).

Nos grupos cujos defeitos foram preenchidos com diferentes enxertos ósseos e rhBMP-2 (AUT BMP, HOM BMP e HET BMP), as características histológicas dos tecidos que ocuparam a ferida cirúrgica mantiveram-se similares entre si. Estes grupos exibiram os dois padrões de neoformação óssea, os quais contribuíram igualmente para que o tecido ósseo recém-formado ocupasse grande extensão da ferida cirúrgica. A neoformação óssea que progrediu das bordas da ferida em direção ao seu centro foi significativamente maior que a constatada nos grupos cujos defeitos foram preenchidos exclusivamente com os enxertos ósseos. Houve significativa aposição de tecido ósseo imaturo sobre a maioria dos remanescentes dos enxertos. Poucos foram os focos de reabsorção óssea ativa presentes sobre as partículas de osso provenientes dos enxertos, exceto no grupo com osso heterólogo, onde foram mais frequentes.

Um tecido conjuntivo intensamente vascularizado recobriu as superfícies da ferida cirúrgica e as adjacências das partículas ósseas remanescentes dos enxertos. Este tecido mostrou-se composto por grande quantidade de fibras colágenas entre as quais se observou uma moderada quantidade de fibroblastos (Figura 18).

Na maioria dos espécimes do grupo BMP o osso neoformado ocupou mais de 2/3 da ferida cirúrgica. As vertentes ósseas voltadas para o centro do defeito mostraram-se repletas de osteoblastos, demonstrando características morfológicas de intensa atividade. No grupo BMP, as trabéculas ósseas estavam mais espessas e os pequenos espaços medulares apresentaram um tecido hematopoético bem organizado. Nestes casos, o pequeno remanescente do defeito foi ocupado por um tecido conjuntivo bem estruturado. Este tecido foi composto por grande quantidade de fibras colágenas, entre as quais estava presente uma moderada quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos (Figura 19).

No grupo DOC, foi constatada uma faixa muito estreita de tecido ósseo neoformado confinada exclusivamente as bordas da ferida cirúrgica. Quase toda a extensão alusiva ao defeito foi preenchida por um tecido conjuntivo apresentando grande quantidade de fibras colágenas, orientadas paralelamente à superfície da ferida, entre as quais se observou a presença de moderada quantidade de fibroblastos, muitos vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias (Figura 19).

Figura 17 - Prancha histológica: AUT, HOM e HET. A e B) defeito ósseo preenchido com enxerto autólogo, C e D) defeito ósseo preenchido com enxerto homólogo, E e F) defeito ósseo preenchido com enxerto heterólogo; sendo: eo - enxerto ósseo, on - osso neoformado, tc - tecido conjuntivo.

Figura 18 - Prancha histológica: AUT BMP, HOM BMP e HET BMP. A e B) defeito ósseo preenchido com enxerto autólogo associado à rhBMP-2, C e D) defeito ósseo preenchido com enxerto homólogo associado à rhBMP-2, E e F) defeito ósseo preenchido com enxerto heterólogo associado à rhBMP-2; sendo: eo - enxerto ósseo, on - osso neoformado, tc - tecido conjuntivo.

Figura 19 - Prancha histológica: BMP e DOC. A e B) defeito ósseo preenchido com rhBMP-2, C e D) defeito ósseo preenchido apenas com coágulo sanguíneo (controle); sendo: on - osso neoformado, tc - tecido conjuntivo.

6.5 Quantificação das fibras de colágeno analisadas sob microscopia polarizada

Os resultados da quantificação de fibras colágenas mostram que não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 4; Figura 20).

Tabela 4: Média e desvio padrão da quantificação de colágeno (pixel ²)	
AUT	412322 ± 64150
HOM	457174 ± 44876
HET	419548 ± 121022
AUT BMP	585926 ± 527209
HOM BMP	404223 ± 51855
HET BMP	652140 ± 538800
BMP	136435 ± 179774
DOC	222457 ± 233037

Figura 20 - Gráfico da média de fibras colágenas quantificadas pelo somatório das áreas identificadas em pixel².

6.6 Análise da região de neoformação óssea através da microtomografia computadorizada (Micro CT)

As imagens obtidas pelo micro CT foram reconstruídas conforme mostram a figura 21.

Figura 21 – Reconstrução da região de defeito ósseo através de micro CT.

A análise das imagens permite observar que todos os grupos apresentaram maior formação óssea em relação ao DOC; sendo que AUT se destacou em relação aos grupos HOM e HET. Além disso, os diferentes enxertos quando associados à rhBMP-2 apresentaram maior formação óssea em relação aos respectivos enxertos usados sem a proteína; com destaque para o grupo AUT BMP que mostrou maior área de formação óssea em relação a HOM BMP e HET BMP.

As tabelas 5 e 6 mostram a média para cada parâmetro ósseo analisado dos dois defeitos presentes no animal utilizado em cada grupo, possuindo apenas efeito representativo e sem submissão a testes estatísticos. Os parâmetros analisados foram: fração de volume ósseo (BV/TV), relação entre superfície e volume ósseo (BS/BV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e separação trabecular (Tb.Sp).

Tabela 5: Médias dos parâmetros ósseos (Micro CT) - Primeira parte

	BV/TV (%)	BS/BV (mm ⁻¹)
AUT	18,26	15,67
HOM	16,06	11,74
HET	13,42	21,76
AUT BMP	24,72	16,35
HOM BMP	44,17	12,66
HET BMP	25,61	23,09
BMP	41,74	14,91
DOC	19,65	13,31
HET BIOMATERIAL	1,16	53,69
HET BMP BIOMATERIAL	1,49	64,04

Tabela 6: Médias dos parâmetros ósseos (Micro CT) - Segunda parte

	Tb.Th (mm)	Tb.N (mm ⁻¹)	Tb.Sp (mm)
AUT	0,19	0,94	1,06
HOM	0,23	0,68	1,05
HET	0,19	0,67	0,88
AUT BMP	0,12	1,88	1,00
HOM BMP	0,15	2,79	0,20
HET BMP	0,08	2,73	1,08
BMP	0,13	3,08	0,18
DOC	0,22	0,86	0,86
HET BIOMATERIAL	0,10	0,10	1,08
HET BMP BIOMATERIAL	0,03	0,49	8,16

É possível observar que nos grupos BMP, AUT BMP, HOM BMP e HET BMP há maior fração de volume ósseo em relação ao volume da região de defeito que nos grupos AUT, HOM, HET e DOC. Além disso, os grupos HET e HET BMP apresentam maior relação entre superfície e volume ósseo mesmo desconsiderando o biomaterial, os grupos BMP, AUT BMP, HOM BMP e HET BMP apresentaram maior número de trabéculas ósseas. Todavia, os resultados alusivos à espessura trabecular e à separação trabecular foram bastante próximos entre os grupos.

Discussão

7 DISCUSSÃO

Diversos biomateriais têm sido usados para favorecer o reparo ósseo como: cerâmicas, matriz óssea desmineralizada, compostos ricos em colágeno, fibrina, fosfato de cálcio, ácido hialurônico, proteína extraída da *Hevea brasiliensis*, polímeros derivados da mamona, assim como BMPs e enxertos ósseos (BEZERRA et al., 2012; BURG; PORTER; KELLAM, 2000; FIGUEIREDO et al., 2004; ISSA et al., 2010).

O estudo realizado buscou analisar o reparo ósseo em defeitos críticos em calvária de ratos Wistar tratados ou não com a rhBMP-2 isolada ou associada a enxertos ósseos autólogo, homólogo ou heterólogo após 6 semanas da cirurgia de criação do defeito e administração dos biomateriais. Para tanto, foi realizado um defeito ósseo por meio de uma trefina de 5mm de diâmetro interno e 6mm de diâmetro externo para a análise do reparo ósseo; pois o modelo de DOC é bastante utilizado para estudos que visam avaliar a atuação de materiais que podem interferir no reparo ósseo, favorecendo a neoformação.

A princípio, o DOC era definido como um defeito que não é reparado independente do tempo usado para a observação. Porém, os estudos não se estendem ao longo da vida do animal, por isso cogita-se a redefinição de DOC ou até mesmo a extinção do termo. Além disso, outros fatores como técnica cirúrgica interferem no reparo ósseo e dificultam a definição do termo. O DOC não se cura sem intervenção e constitui um desafio para a reconstrução óssea (CHENARD et al., 2012; COOPER et al., 2010).

Gomes e Fernandes (2010) salientam que a experimentação *in vivo* em animais é muito importante, pois contribui para a obtenção de dados úteis para o estabelecimento de intervenções mais adequadas na prática clínica. Os roedores são apontados como um dos tipos de animais mais usados na experimentação assim como os cães e alguns primatas. Todavia, o uso destes animais não roedores normalmente está associado a custo elevado para o experimento e a questões culturais que envolvem forte envolvimento emocional com eles. Os roedores são muito utilizados porque permitem maior reprodutividade do experimento e possuem

condições biológicas que permitem correlações com o ser humano. Não há um modelo animal ideal, mas ele deve ser escolhido de acordo com as condições experimentais existentes, incluindo as limitações do estudo e os objetivos a serem alcançados. O modelo de DOC em calvária de ratos é adequado para testar materiais, principalmente quando se trata de abordagens para intervenções craniofaciais. Os defeitos realizados em crânios são bons para a análise histológica e de imagens porque a região é biomecanicamente estável, não necessitando do uso de fixadores. Não obstante, o modelo não é adequado para a avaliação do reparo envolvendo situações de sobrecarga mecânica.

Foi utilizada a rhBMP-2 neste estudo uma vez que as proteínas morfogenéticas ósseas se ligam a receptores de membrana celular e desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares que favorecem a formação óssea, atuando na diferenciação de células mesenquimais, regulação de osteoblastos, quimiotaxia e mitose durante o reparo ósseo (CANALIS, 2009). Dentre os fatores que influenciam a capacidade osteoindutora das BMPs, destacam-se a dose e o uso de carreadores capazes de liberar a proteína de maneira gradual e prolongada. Estudos com essas proteínas têm utilizados diversos animais como coelhos, ratos e cães (ISSA et al., 2010; SCHMOEKEKEL et al., 2004; SMITH et al., 2008).

Nos diversos estudos, há diferença na dosagem da proteína, nos carreadores, nos locais e no tamanho de defeito ósseo ou fratura e também no tempo de tratamento. Além disso, eles se baseiam prioritariamente na combinação das proteínas morfogenéticas com outros tipos de abordagens terapêuticas (ABDALA et al., 2010; BISHOP; EINHORN, 2007; GROENEVELD; BURGER, 2000; ISSA et al., 2012; MURAKAMI et al., 2003; STEPHAN et al., 2010).

Neste estudo, foi avaliada a relação entre formação óssea e organização da matriz extracelular a partir da aplicação de uma proteína reconhecidamente osteoindutora e de enxertias ósseas de diferentes origens. O enxerto ósseo autólogo, embora relacionado à morbidade e restrição da quantidade de material, tem sido uma das alternativas mais cogitadas no tratamento de fraturas, fusões espinhais e defeitos ósseos secundários a outras doenças. Vários estudos buscam comparar a aplicação deste tipo de enxerto isoladamente ou associado à BMP. O enxerto homólogo e o heterólogo também são opções bastante usadas em procedimentos que visam propiciar o reparo ósseo, sendo que eles normalmente

não estão associados à restrição de materiais; embora exista o risco grande de infecções quando não há condições adequadas de tratamento prévio desses enxertos. Questões como vascularização e a reabsorção dos enxertos podem comprometer a eficácia dos enxertos ósseos (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; INODA; YAMAMOTO; HATTORI, 2007; KHAN et al., 2005; MARTINEZ; WALKER, 1999; PERES; LAMANO, 2011; POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEZ; RAMIREZ-VICK, 2014).

Enxertos aplicados no defeito são capazes de aumentar a reparação óssea local (GRAZIANI et al., 2004, ALEXANDER, 1987). Neste estudo, os grupos AUT, HOM, HET apresentaram maior neoformação que DOC. Os resultados obtidos através da análise do volume ósseo neoformado também mostraram que a rhBMP-2 isolada ou associada aos enxertos autólogo, homólogo ou heterólogo foi capaz de favorecer o reparo ósseo em comparação ao DOC. Os melhores resultados foram obtidos quando a proteína foi associada aos diferentes enxertos. Além disso, associação da rhBMP-2 ao enxerto autólogo melhorou o reparo ósseo em relação ao tratamento apenas com o enxerto autólogo.

Issa et al. (2010, 2012) demonstraram que esta proteína é um potente osteoindutor que aumenta e melhora a neoformação óssea. Estes efeitos são ainda maiores quando estão presentes carreadores da proteína, disponibilizando-a lentamente ao meio como foi o caso dos resultados obtidos neste estudo nos grupos em que houve a associação da proteína rhBMP-2 com os diferentes enxertos ósseos.

Wang et al. (1990) mostraram que a formação óssea é diretamente relacionada à dosagem de BMP-2. Não obstante, Abdala et al. (2010) não encontraram diferença significativa entre diferentes dosagens de rhBMP-2 (1, 3 e 7 µg) isolada ou associada a diferentes carreadores em relação ao defeito ósseo crítico em ratos. Desta forma, no presente estudo foi escolhida a dosagem de 5µg da proteína que mostrou contribuição significativa, mesmo sem carreador, para o reparo ósseo crítico em calvária de ratos. Isto condiz com os resultados obtidos por Kotake (2012) que analisou DOC de proporção parecida (5 mm) tratados com a mesma dosagem da proteína em 4 e 6 semanas. Da mesma forma, Rosa et al. (2012) constataram que a dosagem de 7µg de rhBMP-2 apenas também foi capaz de causar

neoformação óssea significativa em relação ao DOC de 5mm em calvárias de ratas após 15 dias de tratamento.

Pereira et al. (2012) também analisaram o reparo ósseo em defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos e observaram que a rhBMP-2 isolada ou associada a um carreador foi capaz de promover o reparo ósseo de maneira significativa quando analisado o percentual de osso neoformado em relação ao defeito ósseo preenchido apenas com coágulo, sem que houvesse diferença significativa entre o grupo tratado só com rhBMP-2 e o grupo tratado com rhBMP-2 associada ao carreador em um período experimental de 30 dias.

Os resultados alusivos à quantificação de colágeno mostraram que não houve diferença entre os grupos. Além disso, a análise qualitativa revelou que em todos os grupos a deposição das fibras estava presente marcando o período proliferativo concomitante ao processo remodelação em que atuam osteoblastos e osteoclastos. A análise do processo de reparo mostra que este importante componente orgânico da matriz extracelular se faz presente desde a fase proliferativa - que sucede a fase inflamatória - até a fase de remodelamento, constituindo também o tecido ósseo maduro (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006a, 2006b). Sendo considerado, portanto, imprescindível ao reparo ósseo no qual fibras finas de colágeno são substituídas por fibras mais espessas e organizadas (WITTE; BARBUL, 1997).

Diferente da quantificação do volume ósseo, a quantificação de osteoclastos e de células osteoblásticas mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos, exceto para HET BMP que obteve maior quantidade de células osteoblásticas que o DOC. Isso demonstra que, no período estudado, apesar das diferentes quantidades de tecido ósseo estabelecido, as atividades de reabsorção são semelhantes entre os grupos bem como a atividade de deposição de tecido ósseo, considerando o número dessas células no tecido ósseo neoformado. Além disso, segundo Polo-Corrales, Latorre-Esteves e Ramirez-Vick (2014), a diferenciação dos osteoblastos a partir dos pré-osteoblastos ocorre nos diferentes períodos de reparo, incluindo as fases de proliferação, maturação e mineralização. Portanto, nos resultados obtidos neste estudo, mesmo diante das diferentes fases envolvidas ou até mesmo concomitantes ao longo da região de defeito ósseo, o número de osteoblasto é semelhante entre os grupos.

Convém considerar, todavia, que esses resultados representam um recorte temporal do reparo ósseo e a população dessas células pode sofrer alterações consideráveis ao longo do processo considerando suas atuações sobre o osso neoformado. Delaisse (2014) discorre que durante a remodelação óssea há unidades multicelulares básicas compostas por osteoblastos e osteoclastos; sendo que a inversão de fase corresponde ao intervalo temporal de várias semanas entre a atuação do osteoclasto e a atuação do osteoblasto. Estas células distam entre si por células de reversão que estão susceptíveis a fatores osteogênicos, formando uma ponte entre os osteoclastos e os osteoblastos. Além disso, as células de revestimento podem se transformar em osteoblastos mediante estímulos químicos ou físicos, sendo positivas para marcadores de osteoblastos e negativas para marcadores de osteoclastos.

Considerando a dinâmica do tecido ósseo durante os processos de reparo e remodelação, não se deve desconsiderar a influência das diferentes etapas ao longo do defeito, considerando toda sua extensão, bem como o tempo de reparo. Este estudo mostra que após seis semanas, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos para a quantificação de osteoclastos e também de células osteoblásticas, houve diferença entre o volume ósseo estabelecido; sendo que a rhBMP-2 isolada ou associada aos diferentes tipos de enxertos foi um importante fator na neoformação óssea.

Interessante notar que diferente da análise quantitativa de osteoclastos no tecido ósseo neoformado, nas adjacências das partículas de enxerto heterólogo que não foram consideradas nesta abordagem, a análise qualitativa apontou grande atividade de osteoclastos. Estas células são imprescindíveis no processo de integração dos enxertos, principalmente considerando que este tipo de material é obtido de outra espécie.

A quantificação de osteócitos revelou que os grupos BMP, HET, HOMO BMP e HET BMP possuem ao longo da região de defeito uma quantidade significativamente maior destas células em relação ao DOC; da mesma forma, os grupos BMP, HET, HOM BMP e HET BMP em relação ao AUT e o grupo HET em relação ao grupo AUT BMP. Estas células provêm da diminuição da atividade de osteoblastos, são circundadas pelo tecido ósseo formado e possuem a função de manter a integridade tecidual, contribuir na adaptação óssea a estímulos químicos e

mecânicos e também de participar da remodelação, ativando um sistema de comunicação que é transmitido para a superfície do osso onde atuam os osteoblastos e os osteoclastos (DE BAAT P.; HEIJBOER; DE BAAT C., 2005; KOMORI, 2013). Possivelmente estes resultados obtidos estejam relacionados à maior taxa de mineralização nestes grupos; todavia, esta análise não compõe os métodos de avaliação quantitativos deste estudo.

Polo-Corrales, Latorre-Esteves e Ramirez-Vick (2014) salientam que as células do osso representam apenas 10% de seu volume total, sendo que proteínas, principalmente o colágeno, minerais como a hidroxiapatita, estruturas vasculares além de outros componentes representam a parte restante de seu volume. Assim, mesmo não havendo diferença significativa entre muitos dos grupos estudados quanto ao número das diferentes células ósseas, o volume ósseo dos diferentes grupos tratados com rhBMP-2 foi superior se comparado com o volume encontrado nos demais grupos.

De modo geral, foi observado neste estudo que os enxertos autólogo, homólogo e heterólogo são capazes de aumentar a neoformação, principalmente o enxerto autólogo. Estes enxertos associados à rhBMP-2 aceleram ainda mais este reparo, independente do tipo de enxerto utilizado como pôde ser observado inclusive na análise por micro CT.

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, na impossibilidade de se utilizar o enxerto autólogo, a utilização de enxertias de diferentes origens podem igualmente atuar no reparo ósseo. Os resultados obtidos demonstram a efetividade dos enxertos homólogo e heterólogo associados a rhBMP-2, assim como o autólogo associado a ela. Portanto, uma cirurgia para a obtenção do leito doador pode ser evitada, propiciando menor tempo cirúrgico e redução das dores e do risco de infecções.

Diferentes tipos de enxertos são empregados para induzir a cicatrização de defeitos ósseos associados a diversos procedimentos ortopédicos; contudo, este enxerto deve ser biocompatível, poroso, capaz de ancorar as células hospedeiras e ser reabsorvível. O osso autólogo continua sendo o tipo de enxerto que fornece todas estas características, demonstrando ser superior às outras enxertias (ATHANASIOU et. al., 2010; LEDFORD et. al., 2013).

Embora ocorram grandes efeitos dos enxertos autólogos na reparação óssea, foi observado que o grupo AUT, ao ser comparado com HOM BMP e HET BMP, demonstrou possuir menor capacidade reparadora, sendo estatisticamente significativa. Deste modo, foi possível observar que a proteína morfogenética associada ao uso de enxerto foi capaz de aumentar ainda mais a neoformação óssea, resultando em valores ainda maiores de volume tecido ósseo neoformado. Na comparação do grupo AUT com o grupo BMP, não houve diferença significativa entre os grupos, mas a associação do enxerto com a proteína (AUT BMP) demonstrou ser muito efetiva na reparação.

Monteiro et al. (2007) analisaram o preenchimento ósseo em calvárias de coelhas comparando o DOC com a administração de enxerto autólogo esponjoso, oriundo da crista ilíaca dos animais, e a associação deste enxerto com diferentes doses de BMP. O estudo demonstrou que os resultados do uso de BMP, associada ao enxerto ósseo, foram muito superiores aos observados quando somente o enxerto foi usado e também ao DOC apenas. Além disso, não houve diferença entre o uso do enxerto isoladamente e o DOC em nenhum dos tempos observados (7, 15, 35, e 60 dias). Esses resultados, portanto, corroboram os resultados encontrados no que se refere ao êxito da associação entre BMP e enxerto autólogo.

De forma similar, o grupo HOM apresentou aumento da neoformação óssea quando comparado com o DOC, não diferenciando estatisticamente de AUT e HET, e demonstrou ser diferente dos grupos AUT BMP, HOM BMP e HET BMP que receberam a rhBMP-2 e apresentaram maior volume de tecido ósseo neoformado. Este tipo de enxerto tem demonstrado resultados positivos na reconstrução óssea (D'ALOJA et al., 2008) o que condiz com este estudo uma vez que o enxerto homólogo foi capaz de abrigar as partículas ósseas remanescentes com a aposição de uma camada de tecido ósseo imaturo, com raros focos de inflamação.

Quanto ao volume ósseo neoformado, o HET diferiu do DOC apesar deste tipo de enxerto empregado apresentar menor grau de compatibilidade e poder necessitar de maior tempo para ser reabsorvido e incorporado (LEDFORD et al., 2013). Na análise histológica, os remanescentes deste enxerto não exibiam aposição de tecido ósseo, mas foi observada a presença de lacunas de reabsorção ocupadas por osteoclastos ativos. Assim, este grupo ao ser comparado com AUT BMP, HOM BMP e HET BMP, apresentou diferença estatística com menor formação

óssea para HET. Apesar de terem estudos que relatam seus efeitos benéficos na cicatrização (ATHANASIOU et al., 2010), outros estudos demonstram que este enxerto deve ser melhor investigado, tendo em vista seus resultados pouco promissores ou negativos frente à cicatrização óssea (LEDFOORD et al., 2013), principalmente em grandes reconstruções (ATHANASIOU et al., 2010).

Assim, os resultados demonstraram que os enxertos ósseos foram diferentes do grupo controle e aumentaram a neoformação óssea principalmente quando associados a rhBMP-2. Na relação de comparação entre os grupos AUT, HOM e HET, eles não demonstraram diferir estatisticamente, assim como AUT BMP, HOM BMP e HET BMP também não diferiram estatisticamente entre si. No entanto, a comparação entre os enxertos isolados e associados à rhBMP-2 demonstrou que a aplicação da proteína associada ao enxerto foi capaz de aumentar a neoformação óssea, independente do tipo de enxerto empregado. Deste modo, podemos observar que, isoladamente, a proteína foi eficaz na neoformação, mas sua associação aos enxertos elevou ainda mais estes valores. Isto pode ser devido ao fato do enxerto atuar não só como osteocondutor, osteoindutor e osteopromotor, mas por ser um carreador capaz de manter a proteína atuante por mais tempo no meio, aumentando a sua atuação no reparo ósseo local.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

A rhBMP-2 e os diferentes tipos de enxertos, autólogo, homólogo e heterólogo, foram capazes de promover o reparo em defeitos ósseos críticos em calvária de ratos quando administrados isoladamente; porém os melhores resultados foram obtidos quando a proteína foi associada aos enxertos.

Na impossibilidade de usar enxerto autólogo para associá-lo à rhBMP-2, os enxertos homólogos ou heterólogos associados à proteína também apresentam bons resultados na neoformação óssea.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDALA, P. M. et al. Osteoinductivity potential of rhBMP-2 associated with two carriers in different dosages. **Anatomical Science International**, v. 85, n. 4, p. 181-188, 2010.
- ABRAHAMS, J. J.; HAYT, M.W.; ROCK, R. Sinus lift procedure of the maxilla in patients with inadequate bone for dental implants: radiographic appearance. **American Journal of Roentgenology**, v. 174, n.5, p.1289-1292, 2000.
- ALENCAR, P. G. C.; VIEIRA, I. F. V. Banco de ossos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 6, p. 524-528, 2010.
- ALEXANDER, J. W. Bone grafting. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 17, n. 4, p.811-819, 1987.
- AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p.5-12, 2006.
- ATHANASIOU, V. T. et al. Histological compararison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. **Medical Science Monitor**, v. 16, n.1, p. 24-31, 2010.
- BESSHO, K. et al. Experimental studies on bone induction using low-molecular-weight poly (DL-lactide-co-glycolide) as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Journal Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 1, p. 61-65, 2002.
- BESSHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Purification of bone morphogenetics protein derived from bovine matrix. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 165, n. 2, p. 595-601, 1989.
- BEZERRA, B. B. et al. Association of hyaluronic acid with a collagen scaffold may improve bone healing in critical-size bone defects. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, n. 8, p. 938-942, 2012.
- BISHOP, G. B.; EINHORN, T. A. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. **International Orthopaedics**, v. 31, n. 6, p. 721-727, 2007.

BOSEMARK, P. et al. Augmentation of autologous bone graft by a combination of bone morphogenetic protein and bisphosphonate increased both callus volume and strength. **Acta Orthopaedica**, v. 84, n. 1, p. 106-111, 2013.

BOSTROM, M. P. G. et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v.13, n. 3, p. 357-367, 1995.

BOUXSEIN, M. L. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 83A, n. 8, p. 1219-1230, 2001.

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

BROUGHTON II, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117, p. 12S-34S, 2006a. Supplement 7.

BROUGHTON II, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117, p. 1eS-32eS, 2006b. Supplement 7.

BURG, K. J.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2347-2359, 2000.

CALASANS-MAIA, M. D. et al. Comparative histological evaluation of tibial bone repair in rabbits treated with xenografts. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 340-343, 2009.

CALORI, G. M. et al. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? **Injury**, v.42, p. 56-63, 2011. Supplement 2.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arquivos Brasileiros Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CANALIS, E. The fate of circulating osteoblasts. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 19, p. 2014-2016, 2005.

CANALIS, E. Prospect - Growth factor control of bone mass. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 108, n.4, p. 769-777, 2009.

CELESTE, A. J. et al. Bone morphogenetic protein-9, a new member of TGF- β superfamily. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 3, p. 136, 1994.

CHEN, G.; DENG, C.; LI, Y. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. **Internation Journal Biological Sciences**, v.8, n. 2, p. 272-288, 2012.

CHENARD, K. E. et al. Bone morphogenetic proteins in craniofacial surgery: current techniques, clinical experiences, and the future of personalized stem cell therapy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-14, 2012.

COOPER, G. M. et al. Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD). **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 125, n. 6, p. 1685-1692, 2010.

D'ALOJA, E. et al. Fresh frozen homologous bone in oral surgery: case reports. **Cell Tissue Banking**, v. 9, p. 41-46, 2008.

DE BAAT, P.; HEIJBOER, M. P.; DE BAAT, C. Development, physiology and cell activity of bone. **Nederlands tijdschrift voor tandheelkunde**, v. 12, n.7, p. 258-263, 2005.

DELAISSE, M. The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. **BoneKEY Reports**, v. 3, p.1-8, 2014.

DIMITRIOU, R. et al. Bone regeration: current concepts and future directions. **BMC Medicine**, v. 9, n. 66, p.1-10, 2011.

EKROL, I. et al. A comparison of RhBMP-7 (OP-1) and autogenous graft for metaphyseal defects after osteotomy of the distal radius. **Injury**, v.39, p. 73-82, 2008. Supplement 2.

FIGUEIREDO, A. S. et al. Osteointegração de osso desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de manona e enxerto autógeno em coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 370-382, 2004.

FOSSUM, T. W. et al. **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, p.792-799 e p. 848-853, 2002.

FRIEDLAENDER, G. E. *et al.* Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.83 A, p. 151-158, 2001.

FUJIMURA, K. et al. Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelopeptide type collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. **Biochemical Biophysical and Research Communications**, v. 208, p. 316-322, 1995.

GIANNOUDIS, P. V.; POUNTOS, I. Tissue regeneration: the past, the present and the future. **Injury**, v. 36, n. 4, p. 2-5, 2005. Supplement.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 1, p.14-24, 2010.

GRAZIANI, F. et al. Comparison of implant survival following sinus floor augmentation procedures with implants placed in pristine posterior maxillary bone: a systematic review. **Clinical Oral Implants Research**, v.15, p. 677-682, 2004.

GROENEVELD, E. H. J.; BURGER, E. H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. **European Journal of Endocrinology**, v. 142, p. 9-21, 2000.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

INODA, H.; YAMAMOTO, G.; HATTORI, T. rh-BMP2-induced ectopic bone for grafting critical size defects: a preliminary histological evaluation in rat calvariae. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 36, n. 1, p. 39-44, 2007.

ISSA, J. P. M. et al. Evaluation of rhBMP-2 and Natural Latex as Potential Osteogenic Proteins in Critical Size Defects by Histomorphometric Methods. **Anatomical Record**, v. 293 p.794-801, 2010.

ISSA, J. P. M. et al. Bone repair investigation rhBMP-2 and angiogenic protein extracted from látex. **Microscopy Research and Tecchnique**, v. 15, n. 2, p.145-52, 2012.

KANAKARIS, N. K. et al. Biological enhancement of tibial diaphyseal aseptic non-unions: the efficacy of autologous bone grafting BMPs and reaming by-products. **Injury**, v.38, p. 65-75, 2007.

KHAN, S. N. et al. The biology of bone grafting. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 13, n. 1, p. 77-86, 2005.

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

KOMORI, T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. **Cell and Tissue Research**, v. 352, n. 2, p. 191-198, 2013.

KOTAKE, B. G. S. **Avaliação da reparação óssea em defeitos ósseos críticos após a aplicação da proteína morfogenética rhBMP-2 pura e/ou combinada em animais normais e sob efeito do alcoolismo crônico**. 2012. 79f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

KREJA, L. et al. Non-resorbing osteoclasts induce migration and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cell. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.109, p.347-355, 2010.

KUSUMOTO, K. et al. Comparative study of bone marrow induced by purified BMP and recombinant human BMP-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.215, p. 205-211, 1995.

LEDFORD, C. K. et al. Bovine xenograft failures in pediatric foot reconstructive surgery. **Journal of Pediatric Orthopedics**, v. 33, n. 4, p. 458-463, 2013.

LEE, S. C.; SHEA, M.; BATTLE, M. A. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by rhBMP-2 in PLGA matrix. **Journal Biomedical Materials Research**, v. 28, p. 1149-1156, 1994.

LISSENBERG-THUNNISSEN, S. N. et al. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. **International Orthopaedics**, v. 35, p.1271-1280, 2011.

LOUREIRO, C. C. S. PRP ou BMPs: qual a melhor opção para enxertia e aceleração de osseointegração nas reabilitações com implantes? Revisão de literatura. **Innovations Implant Journal: Biomaterials and Esthetics**, v.5, n.2, p.45-50, 2010.

MARDEN, L.J. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 28, p. 1127-1138, 1994.

MARTINEZ, S. A. Bone Grafts. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 29, n. 5, p.1207-1219, 1999.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MONTEIRO, B. S. et al. Proteínas morfogenéticas ósseas associadas a osso esponjoso autógeno na reparação de falhas experimentais na calota craniana de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1451-1461, 2007.

MURAKAMI, N. et al. Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and synthetic polymer carrier. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2153-2159, 2003.

PECINA, M.; VUKICEVIC, S. Biological aspects of bone, cartilage and tendon regeneration. **International Orthopaedics**, v. 31, n. 6, p. 719-720, 2007.

PEREIRA, N. T. et al. Effect of alveolex on the bone defects repair stimulated by rhBMP-2: histomorphometric study. **Microscopy Research and Technique**, v.75, n.1, p. 36-41, 2012.

PERES, J. A.; LAMANO, T. Strategies for stimulation of new bone formation: a critical review. **Brazilian Dental Journal**, v.22, n. 6, p.443-448, 2011.

PERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. **Manual de Ortopedia e Tratamento das Fraturas dos Pequenos Animais**. São Paulo: Manole, v. 3, p. 139-145, 1999.

POLO-CORRALES, L.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; RAMIREZ-VICK, J. E. Scaffold design for bone regeneration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n.1, p.15-56, 2014.

RAGHOEBAR, G. M. et al. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? **Clinical Oral Implants Research**, v.16, p. 349-356. 2005.

RAUCH, F. et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, 4 e 7 during distraction osteogenesis in rabbits. **Bone**, v. 27 p. 453-459, 2000.

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

ROBSON, M. C.; STEED, D. L.; FRANZ, M. G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Current Problems Surgery**, v. 38, n. 2, p. 72-140, 2001.

ROSA, A. P. et al. Effects of the combination of low-level laser irradiation and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone repair. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 5, p. 971-977, 2012.

SANTOS, A. A. et al. O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.13, n. 4, p. 194-195, 2005.

SCHMIDMAIER, G. et al. Use of bone morphogenetic proteins for treatment on non-unions and future perspectives. **Injury**, v. 38, p. 35-41, 2007. Supplement 4.

SCHMOEKEL, H. et al. Bone healing in the rat and dog with nonglycosylated BMP-2 demonstrating low solubility in fibrin matrices. **Journal Orthopaedic Research**, v. 22, n. 2, p. 376-381, 2004.

SMITH. D. M. et al. BMP-2-based repair of large-scale calvarial defects in an experimental model: regenerative surgery in cranioplasty. **Journal Craniofacial Surgery**, v. 19, n. 5, p. 1315-1322, 2008.

SOCARRÁS-FERRER, B. B. et al. Células madre mesenquimales: aspectos relevantes y aplicación clínica em La medicina regenerativa. **Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 29, n.1, p.16-23, 2013.

SODEK, J.; MCKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology**, v. 24, p. 99-126, 2000.

SPECTOR, J.A. et al. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 107 p. 124-128, 2001.

STEPHAN, S. J. et al. Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. **Laryngoscope**, v. 120, n. 5, p. 895-901, 2010.

URIST, M. R. Bone morphogenetic protein: The molecularization of skeletal system development. **Journal Bone Mineral Research**, v. 12 p. 343-347, 1997.

VACCARO, A. R. et al. A pilot study evaluating the safety and efficacy of OP-1 Putty (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis. **Spine**, v. 29, p. 1885-1892, 2004.

WANG, E. A. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v. 87, n. 6, p. 2220-2224, 1990.

WEIGEL, J. P. Enxerto Ósseo. In: BORJAB, M. J. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Manole, v. 2, p. 791-798, 1996.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **The Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997.

WOZNEY, J. M. Bone morphogenetic proteins. **Progress in Growth Factor Research**, v. 1, n. 4, p. 267-280, 1989.

WURTZ, T.; BERDAL, A. Osteoblast precursors at different anatomic sites. **Eukaryotic Gene Expression**, v. 13, n. 2, p. 147-161, 2003.

YASKO, A. W. et al. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological and biomechanical study in rats. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 74 A, p. 659-71, 1992.

YILDIRIM, M. et al. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood: a histologic and histomorphometric study in humans. **Clinical Oral Implants Research**, v. 11, p. 217-229, 2000.

ZAKIN, L.; ROBERTIS, E. M. Extracellular regulation of BMP signaling. **Current Biology**, v. 20, n.3, p. 1-8, 2010.

Anexo

ANEXO

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 082/2011, sobre o projeto intitulado “*Estudo qualitativo e quantitativo da interação entre a proteína morfogenética rhBMP-2 e diferentes tipos de enxertos ósseos*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor João Paulo Mardegan Issa** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 29 de agosto de 2011.

(We certify that the protocol nº 082/2011, about “*Qualitative and quantitative study of the interaction between the morphogenetic protein rhBMP-2 and different types of bone grafts*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 08/29/2011.

Ribeirão Preto, 29 de agosto de 2011.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal