CRISTIANE IBANHES POLO

**A utilização da proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 com
carreadores adicionais: análise histomorfométrica e
por microtomografia computadorizada 3D**

São Paulo

2013

CRISTIANE IBANHES POLO

**A utilização da proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 com
carreadores adicionais: análise histomorfométrica e
por microtomografia computadorizada 3D**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem

São Paulo

2013

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.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Polo, Cristiane Ibanhes.

A utilização da proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 com carreadores adicionais: análise histomorfométrica e por microtomografia computadorizada 3D / Cristine Ibanhes Polo; orientadora Maria da Graça Naclério-Homem. -- São Paulo, 2013.

163 p.: il. : fig. , tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original.

1. Proteínas morfogenéticas ósseas. 2. Regeneração óssea. 3. Engenharia tecidual. 4. Biomateriais. 5. Osteogênese. I. Naclério-Homem, Maria da Graça. II. Título.

Polo CI. A utilização da proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 com carreadores adicionais: análise histomorfométrica e por microtomografia computadorizada 3D. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus Pais Clamados Polo Romero e Ignes Ibanhes Polo, meus modelos de vida, pelo amor incondicional e por permanecerem sempre ao meu lado, em todos os momentos de minha vida, incentivando-me e apoiando-me com carinho e paciência.

Ao meu filho, Steffanno Polo da Silva, cuja existência dá sentido a minha vida, me fortalece e inspira minhas realizações, pois - ao final - tudo que faço, é por você!

A vocês eu dedico este trabalho e minha vida

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus,
pelas bênçãos concedidas,
pela fé que me impulsiona e me dá forças,
pela esperança que me faz crer e me fortalece para
construir mais.*

*Aos meus pais e meus irmãos
pelo carinho, incentivo e conforto
nos momentos de desespero...*

*Ao meu filho, Stefano Polo da Silva,
pela paciência e compreensão que sempre teve
e pelo amor e carinho com que sempre me apoiou.*

*À querida Prof.^a Maria da Graça Naclério-Homem,
que me orientou com competência, sabedoria e paciência,
agradeço especialmente por me apoiar e incentivar, com
doçura e firmeza nos momentos mais difíceis.*

*Obrigada por acreditar em mim, quando nem eu mesma
acreditava, e por me abrir as portas deste Curso de Doutorado,
tornando possível a realização de um sonho.*

Espero corresponder à confiança depositada em mim.

*Agradeço ao meu irmão, Eduardo Ibanhes Polo,
pela ajuda preciosa na análise da microtomografia,
tornando possível a realização deste estudo.*

Obrigada por estar sempre disponível, com carinho e paciência!

*Ao Professor Wilson Roberto Sendyk, meu querido mestre,
quem primeiro me mostrou os caminhos da pesquisa científica,
inspirando-me e incentivando com seu entusiasmo pelo ensino
e pela ciência, você é um modelo a seguir.*

Obrigada por possibilitar mais esta conquista!

*À Professora Maria Cristina Zindel Deboni,
pela dedicação e amor com que desempenha esse importante
papel na nossa formação, com mãos firmes, porém generosas!*

*À Professora Luciana Correa,
pela ajuda valiosa e imprescindível na análise histológica.
Obrigada pela sua disponibilidade,
e por dividir, tão generosamente, seus conhecimentos.*

*À Professora Vera Regina Pozzani,
pela amizade e pelas importantes orientações e ensinamentos
da área da medicina, complementando nossos conhecimentos
e ampliando nossos horizontes no campo da saúde.*

*Aos queridos funcionários do Departamento de Cirurgia:
Edison Henrique Vicente, Roseli de Andrade, Nathalia Conceição,
e Aparecida Conceição de Souza,
pelo carinho e apoio, ajudando-nos diariamente no desempenho
de nosso trabalho. Meus sinceros agradecimentos!*

*A todas minhas amigas
pela compreensão por meu afastamento e pelo amor e carinho
que me dedicam de forma incondicional.*

*À amiga Cristiane Costa, em especial,
pela colaboração no trabalho e por todo carinho e apoio.*

*Aos amigos e colegas de curso:
Júlio Leonardo Oliveira Lima, Alexandre Borba,
Mariana Brozoski, Ana Carolina Junqueira,
Gabriel Franchin, Rafael Burim, Daniel Falbo,
Fabiana Ferreira Alves, Michelle Bianchi e Daniel Sendyk.
Obrigada pela convivência prazerosa,
pela troca de experiências, pelo carinho e amizade
que sempre me dedicaram.*

*Agradeço às minhas dedicadas amigas,
Carmen Lucía Ríbas e Rosana Gomes Barbosa,
por serem meu apoio em casa e no consultório,
por todo apoio, carinho e paciência.
Sem vocês eu não conseguiria....*

*À querida Mariana Brozowski,
sempre me socorrendo e ajudando nas horas de necessidade.
Sua amizade foi uma feliz descoberta...*

Ao Daniel Sendyk, pela preciosa ajuda no preparo das lâminas.

*E, ao final, porém não menos importante, agradeço à Vaní, Glauci e
Cláudia, quem, na reta final, deram o toque final à obra,
de forma minuciosa, com amor e dedicação,
finalizando e valorizando o árduo trabalho!*

*A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram-me
durante a realização deste trabalho,
tornando possível sua conclusão. Muito obrigada!*

A todos vocês meus mais sinceros agradecimentos e meu amor.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
Não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

Polo CI. A utilização da proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 com carreadores adicionais: análise histomorfométrica e por microtomografia computadorizada 3D [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

A utilização de osteoindutores como a proteína morfogenética óssea recombinante humana tipo 2 (rhBMP-2) em cirurgia oral e maxilofacial para reparação e regeneração óssea tem aumentado progressivamente. Porém, suas indicações ainda estão limitadas a preenchimento de cavidades e pequenas reconstruções. Este estudo teve como objetivo analisar e comparar, por meio da microtomografia computadorizada tridimensional (Micro-TC 3D) e histomorfometria, a arquitetura óssea, a taxa de osso neoformado e a taxa de biodegradação do β -Tricálcio Fostato (β -TCP), Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP) e Osso Mineral Bovino (BBM), utilizados como carreadores adicionais à rhBMP-2/esponja de colágeno (ACS) em um modelo de regeneração óssea guiada (ROG) vertical em calvária de coelhos. Quatro cilindros de titânio foram fixados à calvária de 20 coelhos da raça Nova Zelândia. No Grupo 1 ($n = 10$), 3 cilindros foram aleatoriamente preenchidos com um dos materiais teste utilizados como carreadores e um cilindro foi preenchido com coágulo sanguíneo (CO). No Grupo 2 ($n = 10$), os cilindros foram aleatoriamente designados para os mesmos materiais e coágulo sanguíneo, com a adição da rhBMP-2/ACS. Após 14 semanas de reparação, as amostras foram coletadas e enviadas para a aquisição de imagens da Micro-TC e processamento histológico. De acordo com a análise histomorfométrica, a área óssea média para o Grupo 2 (com rhBMP-2) foi maior do que no Grupo 1 (sem rhBMP-2) para os materiais BCP e β -TCP ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos para BBM e CO ($p > 0,05$). Em relação às taxas de reabsorção, a área média dos materiais remanescentes no Grupo 2 foi menor do que no Grupo 1 para todos os materiais ($p < 0,001$) e BBM e β -TCP obtiveram a maior taxa de reabsorção nos dois grupos (BBM = β -TCP > BCP). A análise da micro-TC revelou que no Grupo 2, BCP e β -TCP apresentaram maior volume ósseo médio (BV) do que no Grupo 1 ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos para os materiais BBM e CO ($p > 0,05$). O volume médio de materiais restantes (MV) para

o Grupo 2 foi menor do que no Grupo 1 para BBM e β -TCP ($p < 0,05$), sem diferença significativa entre os grupos para BCP ($p = 0,848$). A análise dos parâmetros Fator Padrão Trabecular (Tb.Pf) e Índice de Modelo Estrutural (SMI) mostrou no Grupo 2 valores negativos para BCP e β -TCP, indicando melhor interconectividade e presença de arquitetura trabecular mais achatada e côncava, indicadores de melhor qualidade e resistência óssea. Pelos resultados apresentados concluiu-se que a utilização da rhBMP-2/ACS associada aos materiais carreadores BCP (Fosfato de Cálcio Bifásico) e β -TCP (β -Fosfato Tricálcio) aumentou significativamente a formação óssea neste modelo de ROG em calvária de coelhos além de acelerar a biodegradação dos materiais BBM (Osso Mineral Bovino) e β -TCP (β -Fosfato Tricálcio) neste modelo de ROG.

Palavras-chave: Proteína morfogenética do osso 2. Regeneração óssea. Engenharia de tecidos. Substitutos ósseos. Materiais biocompatíveis. Osteogênese.

ABSTRACT

Polo CI. The use of the human recombinant bone morphogenetic protein 2 with additional carriers: Histomorphometric and 3D Micro-computed tomography analysis [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

The use of osteoinductors as the human recombinant bone morphogenetic protein 2 type 2 (rhBMP-2) in oral and maxillofacial surgery for bone regeneration and repair has progressively increased. However, indications are still limited to filling of cavities and small reconstructions. However, its indications are still limited to filling of cavities and small reconstructions. This study aimed to analyze and compare, by means of three-dimensional microtomography (Micro-CT 3D) and histomorphometry, the bone architecture, the rate of newly formed bone and the biodegradation rate of beta tricalcium phosphate (β -TCP), biphasic calcium phosphate (BCP), and mineral bovine bone mineral (BBM) used as additional carriers to rhBMP-2/absorbable collagen sponge (ACS) in a vertical guided bone regeneration model (GBR) in rabbit calvarium. Four titanium cylinders were fixed to the calvarium of 22 New Zealand rabbits. In Group 1 ($n = 10$), 3 cylinders were randomly filled with one of the test materials and 1 cylinder was filled with a blood clot (CL). In Group 2 ($n = 10$), the cylinders were randomly assigned to the same materials and blood clot, with the addition of rhBMP-2. After 14 weeks of healing the samples were collected and sent to 3D Micro-CT image acquisition and histological processing. According to histomorphometric analysis, the mean bone area in Group 2 (with rhBMP-2) was greater than in Group 1 (without rhBMP-2) to materials BCP and β -TCP ($p < 0.001$). There was no difference between groups to BBM and CL ($p > 0.05$). Regarding the resorption rates, the mean area of remaining materials in Group 2 was lower than in Group 1 to all materials ($p < 0.001$) and BBM and β -TCP had the greater resorption rate in both groups (BBM = β -TCP > BCP). The Micro-CT analysis revealed that in Group 2, BCP and β -TCP had greater mean bone volume (BV) than in Group 1 ($p < 0.05$). There was no difference between groups to materials BBM and CL ($p > 0.05$). The mean volume of remaining materials (MV) in Group 2 was lower than in Group 1 to BBM and β -TCP ($p < 0.05$). There was no difference between groups to

BC ($p=0.848$). The analysis of the parameters Trabecular Pattern Factor (Tb.Pf) and Structure Model Index (SMI), in Group 2 showed negative values for BCP and β -TCP, indicating better interconnectivity and presence of more plate-like and trabecular architecture more flattened and concave, indicators of better quality and bone strength. By presented results it was concluded that the use of rhBMP-2/ACS associated with the carriers materials biphasic calcium phosphate (BCP) and beta tricalcium phosphate (β -TCP) used as additional carriers, significantly increased bone formation in addition to accelerate the resorption of the materials BO (bovine bone mineral) and β -TCP in this guided bone regeneration model in rabbit calvaria.

Keywords: Bone morphogenetic protein 2. Bone regeneration. Tissue engineering. Bone substitutes. Osteogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Exposição do osso parietal e frontal (a). Cilindros fixadas no osso parietal (b). Em detalhe, aspecto visual após decorticalização (c). Inserção dos materiais (d). Fechamento dos cilindros com as tampas (e). Sutura contínua com nylon 4.0 (f).....60
- Figura 4.2 - Inserção da rhBMP-2/ACS (a). rhBMP-2/ACS em contato com a base da calvária (b). Materiais inseridos acima da rhBMP-2, sendo, da esquerda para a direita no sentido do relógio, BBM (osso mineral bovino), BCP (fosfato de cálcio bifásico), CO (coágulo) e β -TCP (beta tricálcio fosfato) (c). Fechamento com as tampas rosqueáveis (d).62
- Figura 4.3 - Esquema ilustrativo das áreas mensuradas pela histometria64
- Figura 4.4 - Imagem do porta amostras no interior do equipamento, preparado para a aquisição das imagens (a). Detalhe do dispositivo artesanal utilizado como porta amostras contendo os espécimes hidratados em álcool 70° separados por EPS (b).....67
- Figura 4.5 - Visualização 2D das imagens reconstruídas das amostras.69
- Figura 4.6 - Delimitação do limite superior da amostra.69
- Figura 4.7 - Delimitação do limite inferior da amostra.70
- Figura 4.8 - Determinação da região de interesse (ROI) (vermelho).....70
- Figura 4.9 - Adaptação da região de interesse (ROI) com forma circular de mesmo diâmetro ósseo aplicada a todas as secções do limite delimitado pelas linhas vermelhas71
- Figura 4.10 - Determinação do valor médio dos coeficientes de atenuação dos voxels da VOI.71
- Figura 4.11 - Determinação do intervalo correspondente a parte óssea. Visualização de amostra de BCP (fosfato de cálcio bifásico).....72

Figura 4.12 - Determinação do intervalo correspondente ao material carreador BCP (fosfato de cálcio bifásico).....	72
Figura 4.13 - Determinação do intervalo correspondente a parte óssea em uma amostra contendo coágulo (CO).	73
Figura 5.1 - Reabertura após 14 semanas de reparação do Grupo 1 (sem adição de rhBMP-2). Exposição dos cilindros (a). Vista do interior dos cilindros (b). Formação óssea após remoção dos cilindros, detalhe da vascularização (setas) (c). Amostra do Grupo 1 após remoção com trefina, mostrando o tecido formado e base da calvária (d, e).	76
Figura 5.2 - Reabertura após 14 semanas de reparação do Grupo 2 (com adição de rhBMP-2). Exposição dos cilindros (a). Vista do interior dos cilindros (b). Formação óssea após remoção dos cilindros (c). Amostra do Grupo 2 após remoção com trefina mostrando o tecido formado e base da calvária (d, e).....	77
Figura 5.3 - Supercrescimento ósseo após 14 semanas de reparação em animais do Grupo 2 (com rhBMP-2). Vista externa dos cilindros cobertos de osso (a, b). Imagem da μ TC do supercrescimento com de seromas – setas brancas (c). Animal correspondente à imagem anterior que apresentou a formação óssea mais exuberante (d). Imagem histológica da mesma amostra do Grupo 2, (seroma - seta negra). H.E. - Aumento Original de 400X (e). Fotomicrografia do supercrescimento. H.E. - Aumento Original de 1000X (f). TC = tecido conjuntivo, MO = medula óssea, TO = trabécula óssea.....	78
Figura 5.4 - Imagem do aumento de espessura da porção da calvária compreendida entre os cilindros do Grupo 2 (com adição de rhBMP-2) (a). Medição da espessura da calota com paquímetro centesimal (b). Macrofotografia de duas amostras do Grupo 2 mostrando presença de vasos sanguíneos (c, d - setas)	79
Figura 5.5 - Amostras do Grupo 1 (sem rhBMP-2). Coágulo (CO) (a). Beta Tricálcio Fosfato (β -TCP). Observamos pequenos pontos brancos onde estava presente o material β -TCP (b). Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP). Aqui observamos lacunas de formato irregular deixadas pelo BCP (c). Osso Mineral Bovino (BBM). As partículas remanescentes do BBM aparecem mais coradas e sem osteócitos (lacunas vazias) (d). As setas indicam os materiais remanescentes. H.E. Aumento original de 25X	82

Figura 5.6 - Amostras do Grupo 2 (com rhBMP-2). Coágulo (CO) (a). Beta Tricálcio Fosfato (β -TCP). quase não se nota material remanescente (b). Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP). Aqui observamos lacunas de formato irregular deixadas pelo BCP (c). Osso Mineral Bovino (BBM). Também observamos pouco material remanescente (d). As setas indicam os materiais remanescentes. H.E. Aumento original de 25X.....	83
Figura 5.7 - Amostras do Grupo 1 (sem rhBMP-2): Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP) (a), Beta Tricálcio Fosfato (β -TCP) (b). Osso Mineral Bovino (BBM) (c), Coágulo (CO) (d). Amostras do Grupo 2 (com rhBMP-2): Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP) (e), Beta Tricálcio Fosfato (β -TCP) (f). Osso Mineral Bovino (BBM) (g), Coágulo (CO) (h). H.E. Aumento original de 400X. M= material, TO= trabécula óssea, Oc= osteoclasto, TC= Tecido conjuntivo, On= Osteon, Ad= células adiposas, M = material.....	84
Figura 5.8 - Média da variável Ob (mm ²) por material e grupo.....	85
Figura 5.9 - Média da variável Os (mm ²) por material e grupo.....	88
Figura 5.10- Média da variável Ot (mm ²) por material e grupo.....	90
Figura 5.11 - Média da variável Mb (mm ²) por material e grupo	92
Figura 5.12 - Média da variável Ms (mm ²) por material e grupo.....	94
Figura 5.13 - Média da variável Mt (mm ²) por material e grupo	96
Figura 5.14 - Média da variável AT (mm ²) por material e grupo.....	98
Figura 5.15 - Imagem 2D de amostras do Grupo 1 (sem rhBMP-2) (a, b) e de amostras do Grupo 2 (com rhBMP-2) (c, d), visualizando-se tecido formado e base da calvária	100
Figura 5.16 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras de coágulo (CO) de animais do Grupo 1 (sem rhBMP-2). Cortes axiais (A1, A2, A3) e longitudinais (B1, B2, B3).....	101

Figura 5.17 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras de coágulo (CO) de animais o Grupo 2 (com rhBMP-2). Cortes axiais (a1, a2, a3) e longitudinais (b1, b2, 3).....	102
Figura 5.18 - Imagens microtomográficas 3D de amostras de coágulo (CO) de animais do Grupo 1 (C1, C2, C3) e do Grupo 2 (c1, c2, c3) mostrando todo o volume ósseo do cilindro	103
Figura 5.19 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo fosfato de cálcio bifásico (BCP) de animais do Grupo 1 (sem rhBMP-2). Cortes axiais (A1, A2, A3) e longitudinais (B1, B2, B3). Visualização das partículas de BCP na cor azul	104
Figura 5.20 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo fosfato de cálcio bifásico (BCP) de animais do Grupo 2 (sem rhBMP-2). Cortes axiais (a1, a2, a3) e longitudinais (b1, b2, b3). Visualização das partículas de BCP na cor azul.....	105
Figura 5.21 - Imagens microtomográficas 3D de amostras contendo fosfato de cálcio bifásico (BCP) de animais do Grupo 1 (C1, C2, C3) e do Grupo 2 (c1, c2, c3) mostrando todo o volume ósseo do cilindro e material remanescente de BCP visualizado por transparência na cor azul	106
Figura 5.22 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo beta tricálcio fosfato (β -TCP) de animais do Grupo 1 (sem rhBMP-2). Cortes axiais (A1, A2, A3) e longitudinais (B1, B2, B3). Visualização das partículas de β -TCP na cor amarela	107
Figura 5.23 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo beta tricálcio fosfato (β -TCP) de animais do Grupo 2 (com rhBMP-2). Cortes axiais (a1, a2, a3) e longitudinais (b1, b2, b3). Visualização das partículas de β -TCP na cor amarela	108
Figura 5.24 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo beta tricálcio fosfato (β -TCP) de animais do Grupo 1 (C1, C2, C3) e do Grupo 2 (c1, c2, c3) mostrando todo o volume ósseo do cilindro e material remanescente de β -TCP visualizado na cor amarela.....	109
Figura 5.25 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo osso mineral bovino (BBM) de animais do Grupo 1 (sem rhBMP-2). Cortes axiais (A1, A2, A3) e longitudinais (B1, B2, B3). Visualização das partículas de BBM na cor branca.	110

Figura 5.26 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo osso mineral bovino (BBM) de animais do Grupo 2 (com rhBMP-2). Cortes axiais (a1, a2, a3) e longitudinais (b1, b2, b3). Visualização das partículas de BBM na cor branca	111
Figura 5.27 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo osso mineral bovino (BBM) de animais do Grupo 1 (C1, C2, C3) e do Grupo 2 (c1, c2, c3) mostrando todo o volume ósseo do cilindro e material remanescente de BBM visualizado por transparência na cor branca	112
Figura 5.28 - Média da variável TV (mm^3) por material e grupo	114
Figura 5.29 - Média da variável BV (mm^3) por material e grupo	115
Figura 5.30 - Média da variável BV/TV (%) por material e grupo	117
Figura 5.31 - Média da variável Tb.Pf (1/mm) por material e grupo	119
Figura 5.32 - Média da variável SMI por material e grupo	121
Figura 5.33 - Média da variável Tb.Th (mm) por material e grupo	123
Figura 5.34 - Média da variável Tb.N (1/mm) por material e grupo	125
Figura 5.35 - Média da variável Tb.Sp (mm) por material e grupo	127
Figura 5.36 - Média da variável DA por material e grupo	129
Figura 5.37 - Média da variável Conn,Dn ($1/\text{mm}^3$) por material e grupo	130
Figura 5.38 - Média da variável MV (mm^3) por material e grupo	132
Figura 5.39 - Média da variável MV/TV (%) por material e grupo	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Especificações do Microtomógrafo	66
Tabela 5.1 - Estatísticas descritivas para a variável Ob (mm ²).	85
Tabela 5.2 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Ob (mm ²) sob os diferentes pares de materiais, por grupo	86
Tabela 5.3 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Ob (mm ²) sob os dois grupos, para cada material	87
Tabela 5.4 - Tabela 5.4 - Estatísticas descritivas para a variável Os (mm ²)	87
Tabela 5.5 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Os (mm ²) sob os dois grupos, para cada material	88
Tabela 5.6 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Os (mm ²) sob os diferentes pares de materiais, por grupo	89
Tabela 5.7 - Valor P do teste t-Student para a diferença entre as médias da variável Formação óssea (mm ²) sob os dois locais (válido os dois grupos e todos os materiais).....	89
Tabela 5.8 - Estatísticas descritivas para a variável Ot (mm ²)	90
Tabela 5.9 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Ot (mm ²) sob os dois grupos, para cada material	91
Tabela 5.10 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Ot (mm ²) sob os diferentes pares de materiais, por grupo	91
Tabela 5.11 -Estatísticas descritivas para a variável Mb (mm ²).	92
Tabela 5.12 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Mb (mm ²) entre os dois grupos	93

Tabela 5.13 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Mb (mm ²) sob os diferentes pares de materiais	93
Tabela 5.14 -Estatísticas descritivas para a variável Ms (mm ²)	93
Tabela 5.15 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médiasda variável variável Ms (mm ²) entre os dois grupos	94
Tabela 5.16 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Ms (mm ²) sob os diferentes pares de materiais	94
Tabela 5.17 -Valor P do teste t-Student para a diferença entre as médias da variável Formação óssea (mm ²) sob os dois locais (válido os dois grupos e todos os materiais).....	95
Tabela 5.18 -Valor P do teste F-Snedecor para a diferença entre as médias da variável Quantidade de material remanescente (mm ²) sob os dois locais, para o grupo G1 (válido para todos os materiais)	94
Tabela 5.19 -Estatísticas descritivas para a variável Mt (mm ²)	96
Tabela 5.20 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de média da variável variável Mt (mm ²) entre os dois grupos.....	96
Tabela 5.21 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Mt (mm ²) sob os diferentes pares de materiais	97
Tabela 5.22 -Estatísticas descritivas para a variável AT (mm ²).	97
Tabela 5.23 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável AT (mm ²) entre os dois grupos.....	98
Tabela 5.24 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável AT (mm ²) sob os diferentes pares de materiais	99
Tabela 5.25 -Estatísticas descritivas para a variável TV (mm ³)	113

Tabela 5.26 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável TV (mm^3) entre os dois grupos.....	114
Tabela 5.27 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável TV (mm^2) sob os diferentes pares de materiais	114
Tabela 5.28 -Estatísticas descritivas para a variável BV (mm^3).	115
Tabela 5.29 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável BV (mm^3) entre os dois grupos, para cada material.....	116
Tabela 5.30 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável BV(mm^3) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo	116
Tabela 5.31 -Estatísticas descritivas para a variável BV/TV (%).	117
Tabela 5.32 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável V/TV (%) entre os dois grupos, para cada material.....	118
Tabela 5.33 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável BV/TV (%) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo....	118
Tabela 5.34 -Estatísticas descritivas para a variável Tb.Pf (1/mm).....	119
Tabela 5.35 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Pf (1/mm) entre os dois grupos, para cada material	120
Tabela 5.36 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Pf (1/mm) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo	120
Tabela 5.37 -Estatísticas descritivas para a variável SMI	121
Tabela 5.38 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável SMI entre os dois grupos, para cada material.....	122

Tabela 5.39 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável SMI dos diferentes pares de materiais, para cada grupo	122
Tabela 5.40 -Estatísticas descritivas para a variável Tb.Th (mm).....	123
Tabela 5.41 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Th (mm) entre os dois grupos, para cada material	124
Tabela 5.42 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Th (mm) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo	124
Tabela 5.43 -Estatísticas descritivas para a variável Tb.N (1/mm).....	125
Tabela 5.44 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.N(1/mm) entre os dois grupos, para cada material	126
Tabela 5.45 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.N (1/mm) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo	126
Tabela 5.46 -Estatísticas descritivas para a variável Tb.Sp (mm).....	127
Tabela 5.47 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Sp(mm) entre os dois grupos.....	128
Tabela 5.48 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Sp (mm) sob os diferentes pares de materiais.....	128
Tabela 5.49 -Estatísticas descritivas para a variável DA.....	128
Tabela 5.50 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável DA entre os dois grupos.....	129
Tabela 5.51 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável DA sob os diferentes pares de materiais.....	129

Tabela 5.52 -Estatísticas descritivas para a variável Conn,Dn ($1/\text{mm}^3$).....	130
Tabela 5.53 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Conn,Dn (mm^3) entre os dois grupos	131
Tabela 5.54 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Conn,Dn (mm^2) sob os diferentes pares de materiais.....	131
Tabela 5.55 -Estatísticas descritivas para a variável MV (mm^3).....	131
Tabela 5.56 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável MV (mm^3) entre os dois grupos, para cada material	132
Tabela 5.57 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável MV (mm^3) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo.....	133
Tabela 5.58 -Estatísticas descritivas para a variável MV/TV (%)	133
Tabela 5.59 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável MV/TV (%) entre os dois grupos, para cada material.....	134
Tabela 5.60 -Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável MV/TV (%) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo ...	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABB	osso bovino inorgânico
ACS	Espanja de colágeno absorvível
AT	área total de tecido
BBM	Osso mineral bovino
BIC	contato osso implante
BIP	princípio da indução óssea
BMP-3	Proteína Morfogenética Óssea tipo3
BMP-4	Proteína Morfogenética Óssea tipo4
BMP-5	Proteína Morfogenética Óssea tipo5
BMP-6	Proteína Morfogenética Óssea tipo6
BMP-7	Proteína Morfogenética Óssea tipo7
BMP-8	Proteína Morfogenética Óssea tipo 8
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
BV	Volume ósseo
CaP	cimento de fosfato de cálcio
CEP	comitê de ética em pesquisa
CHO	ovário de hamster chinês
CO	Coágulo
COBEA	colégio brasileiro de experimentação animal
Conn.D	densidade de conectividade
DA	grau de anisotropia
DBB	osso bovino desmineralizado
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EPS	poliestireno expandido
FGFs	Fatores de crescimento de fibroblastos
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
H.E.	hematoxilina e eosina
HA	Hidroxiapatita

ICLAS	International Council of Laboratory Animal Science
IGF	fatores de crescimento semelhantes a insulina
kV	kilovolts
Mb	área de material remanescente presente na base
Micro-TC 3D	Microtomografia Computadorizada Tridimensional
Ms	área de material remanescente presente na porção superior
MSC	células tronco mesenquimais
Mt	área total de material remanescente
MV	Volume de material remanescente
MV	volume total de material remanescente
Ob	área de tecido ósseo da base
OP1	proteína ósteo indutiva tipo 1
OP2	proteína ósteo indutiva tipo 2
OP3	proteína ósteo indutiva tipo 3
Os	área de tecido ósseo da porção superior
Ot	área total de tecido ósseo
PDGFs	fatores de crescimento derivados de plaquetas
PLA	ácido polilático
PP	polipropileno
PRP	plasma rico em plaquetas
PTFe	poli tetra-fluor etileno
rhBMP-2	Proteína Morfogenética Óssea recombinante humana tipo 2
rhBMP-7	Proteína Morfogenética Óssea recombinante humana tipo 7
rhGDF-5	fatores de crescimento recombinantes humano tipo 5
rhVEGFs	Fatores de crescimento vasculares endoteliais recombinantes humano
ROG	Regeneração óssea guiada
ROI	região de interesse
SD	desvio padrão
Si TCP	fosfato de cálcio sintético multifásico
SMI	índice do modelo estrutural
Tb.N	número de trabéculas
Tb.Pf	fator padrão trabecular
Tb.Sp	separação de trabéculas

Tb.Th	espessura trabecular
TE	engenharia tecidual
TGF-B	fatores de crescimento transformadores beta
TV	Volume total de tecido formado
VEGFs	Fatores de crescimento vasculares endoteliais
VOI	volume de interesse
β -TCP	Beta Fosfato Tricálcio
μ^3	micra cúbica
μA	micro-amper
μTC	microtomografia computadorizada
0	grau
mg	miligramas
cm	centímetro
E. coli	bactéria escherichia coli
μg	micrograma
mL	mililitros
μm	micrometro
kg	kilograma
mm^2	milímetros quadrados

LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	beta fosfato tricálcico
Ca	cálcio
O	oxigênio
P	fósforo
CaSO ₄	sulfato de cálcio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISÃO DA LITERATURA	31
2.1 Substitutos Ósseos	31
2.1.1 Beta- tricálcio fosfato (β -TCP)	32
2.1.2 Fosfato de Cálcio Bifásico – BCP	34
2.1.3 Osso mineral bovino – BBM	36
2.2 Engenharia Tecidual	39
2.2.1 Células	40
2.2.2 Moléculas sinalizadoras	41
2.2.3 Carreadores	42
2.3 Proteínas Morfogenéticas Ósseas – BMPs	44
2.3.1 Proteína morfogenética óssea recombinante humana tipo 2 (rhBMP-2)	46
2.4 Microtomografia Computadorizada Tridimensional – Micro-TC 3D – μTC	53
3 PROPOSIÇÃO	56
4 MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 Anestesia e Preparo dos Animais	57
4.2 Procedimento Cirúrgico	58
4.3 Controle Pós-operatório	61
4.4 Eutanásia e Remoção das Amostras	62
4.5 Procedimento Histológico	63
4.6 Métodos de Análise	63
4.6.1 Estudo histológico e histomorfométrico	63
4.6.2 Estudo pela micro-TC	65
4.6.2.1 aquisição das imagens	65
4.6.2.2 análise das imagens reconstruídas	67
4.6.3 Análise estatística	73
4.6.3.1 análise estatística da histomorfometria	73
4.6.3.2 análise estatística da microtomografia 3D	74
5 RESULTADOS	75
5.1 Resultado Clínico	75

5.2 Histomorfometria	79
5.2.1 Descrição histológica	80
5.2.1.1 grupo 1 – sem adição de rhBMP-2	80
5.2.1.2 grupo 2 – com adição de rhBMP-2	80
5.2.2 Histometria	85
5.2.2.1 variável Ob (mm ²) - tecido ósseo formado na base da calvária	85
5.2.2.2 variável Os (mm ²) - tecido ósseo formado na porção superior	87
5.2.2.3 variável Ot (mm ²) - tecido ósseo total formado no cilindro	90
5.2.2.4 variável Mb (mm ²) - material remanescente na base da calvária	92
5.2.2.5 variável Ms (mm ²) - material remanescente na porção superior	93
5.2.2.6 variável Mt (mm ²) - material remanescente total	95
5.2.2.7 variável AT (mm ²) - área total do tecido formado	97
5.3 Microtomografia Computadorizada	99
5.3.1 Visualização 2D do cilindro ósseo	99
5.3.2 Visualização 3D do cilindro ósseo	100
5.3.3 Análise morfométrica	113
5.3.3.1 variável TV (mm ³) - volume total de tecido formado	113
5.3.3.2 variável BV (mm ³) - volume ósseo total formado	115
5.3.3.3 variável BV/TV (%) - percentual de volume ósseo por tecido total formado	117
5.3.3.4 variável Tb.Pf (1/mm) - fator de padrão trabecular	119
5.3.3.5 variável SMI - índice de modelo estrutural	121
5.3.3.6 variável Tb.Th (mm) - espessura de trabéculas	123
5.3.3.7 variável Tb.N (1/mm) - número de trabéculas	125
5.3.3.8 variável Tb.Sp (mm) - separação de trabéculas	127
5.3.3.9 variável DA - grau de anisotropia	128
5.3.3.10 variável Conn,Dn (1/mm ³) - densidade de conectividade	130
5.3.3.11 variável MV (mm ³) - volume do material	131
5.3.3.12 variável MV/ TV (%) - percentual de material remanescente por tecido total formado	133
6 DISCUSSÃO	136
7 CONCLUSÕES	147
REFERÊNCIAS	148
ANEXOS	163

1 INTRODUÇÃO

A reparação de extensos defeitos ósseos na área de cirurgia buco-maxilo-facial constitui-se em um dos grandes desafios para cirurgiões, clínicos e pesquisadores. Os defeitos ósseos de tamanho crítico nos maxilares podem decorrer de traumas, cirurgias ablativas ou ainda por malformações congênitas. Na maioria das vezes, o organismo não é capaz de regenerar o tecido ósseo espontaneamente, restituindo a forma e a função adequadas. Por esse motivo, temos de repor o tecido ósseo perdido por meio de enxertos e reconstruções.

Apesar do enxerto ósseo autógeno ainda ser considerado o padrão ouro para qualquer tipo de aumento ósseo, o procedimento possui algumas desvantagens como: complicações relativas à cirurgia, dor crônica pós-operatória, suprimento limitado em alguns pacientes, alto custo, mais tempo transoperatório, mais possibilidade de infecções, necessidade de internação e limitações de ordem sistêmica e/ou local, fatos que, na maioria das vezes superam suas vantagens iniciais (Calori et al., 2011; Zimmermann; Moghaddam, 2011).

Além disso, mesmo sem apresentar nenhuma reação imunológica e não oferecer risco de transmissão de doenças, o enxerto autógeno sofre reabsorções expressivas, e é diminuída a vantagem das propriedades osteocondutoras, osteogênicas e osteoindutoras, considerando-se que as células no interior do enxerto não sobrevivem mais do que 2h (Samartzis et al., 2005; Zimmermann; Moghaddam, 2011).

Um substituto ósseo ideal deve ser biocompatível, biodegradável, possuir propriedades osteocondutivas, osteogênicas e preferivelmente osteoindutivas (Urist, 1965).

Embora sejam considerados primariamente osteocondutores, tem sido relatada a propriedade osteoindutiva de algumas cerâmicas como o β -tricálcio fosfato (β -TCP), Hidroxiapatita (HA) e Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP). Acredita-se que a osteoindução se deva às características físico-químicas desses materiais, que favorecem a migração de proteínas morfogenéticas ósseas endógenas (BMPs) em quantidades suficientes para induzir a diferenciação osteogênica (Yuan et al., 2010).

Os enxertos de Osso Mineral Bovino (BBM) também estão consagrados na literatura científica mundial, como material de preenchimento e aposicional, por

possuírem resultados satisfatórios na quantidade e na qualidade de tecido ósseo formado, embora possuam lenta reabsorção (Komlev et al., 2010; Busenlechner et al., 2012; Choi et al., 2013; Liu et al., 2013; Schmitt et al., 2013).

Porém as substâncias que efetivamente promovem maior quantidade de osso neoformado, em qualquer tipo de defeito ósseo, são os fatores de crescimento osteoindutivos, mais conhecidos como proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Dentre as recombinantes humanas as proteínas morfogenéticas tipo 2 (rhBMP-2) e tipo 7 (rhBMP-7) são as mais estudadas e as que apresentam resultados clínicos mais satisfatórios e promissores nas áreas de ortopedia e outras áreas da medicina que envolvam reparação óssea, incluídas as indicações craniofaciais (Schmidmaier et al., 2008, Kinsella et al., 2011, Hart; Bowles, 2012).

A proteína morfogenética óssea mais utilizada atualmente tem sido a recombinante humana tipo 2 (rhBMP-2), resultante de um processo de engenharia genética da proteína natural humana, reproduzida na *Escherichia coli*.

Dentre os procedimentos cirúrgicos de reconstrução e reparação óssea minimamente invasivos, a abordagem terapêutica por meio de indutores ósseos como a rhBMP-2 utilizada neste estudo, está de acordo com a nova concepção de engenharia tecidual utilizando o novo “conceito diamante” (Giannoudis et al., 2007; Schmidmaier et al., 2008; Zimmermann; Moghaddam, 2011).

Este estudo preenche todos os pré-requisitos desse conceito uma vez que estão presentes: 1) células indiferenciadas (células tronco mesenquimais) e células ósseas viáveis (osteoblastos) provenientes do leito receptor da calvária, 2) indutor/morfógeno ósseo (rhBMP-2- Infuse), 3) matrizes (materiais substitutos ósseos utilizados como carreadores: β -TCP, BCP e BBM e 4) estabilidade mecânica, obtida com os cilindros de titânio.

Nosso objetivo neste estudo foi avaliar a atuação da rhBMP-2/ACS associada ao β -Fosfato Tricálcio (β - TCP), Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP) e Osso Mineral Bovino (BBM) utilizados como carreadores adicionais em um modelo de crescimento vertical aposicional, analisando e comparando a arquitetura e a formação óssea obtida, bem como a taxa de biodegradação dos biomateriais utilizados com e sem a adição da rhBMP-2, dentro de parâmetros quantitativos e qualitativos da Microtomografia computadorizada tridimensional (Micro-TC 3D) e da histomorfometria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Considerando-se a complexidade do estudo e a variedade de materiais utilizados, a descrição da revisão da literatura foi realizada em tópicos.

2.1 Substitutos Ósseos

O organismo está sujeito a doenças e traumas por acidentes que podem levar a perda total ou parcial de um órgão, tecido ou função, interferindo no bom funcionamento desses mesmos órgãos ou de outros, causam dor, sofrimento, e má qualidade de vida para o indivíduo. Isso é especialmente verdadeiro no que se refere ao tecido ósseo. E, na maioria das vezes, o organismo não é capaz de regenerar espontânea e completamente o tecido perdido nem de devolver-lhe a forma e a função adequadas.

No caso da Odontologia, inúmeras são as situações em que perdas ósseas e dentais prejudicam a função mastigatória e fonética e, a depender da extensão do defeito, levam o paciente à exclusão social com consequentes traumas psicológicos.

A busca por procedimentos alternativos ou complementares ao enxerto ósseo autógeno tem demandado um aumento de pesquisas na área da engenharia tecidual em busca de substâncias osteoindutoras, materiais substitutos ósseos, carreadores e aprimoramento de técnicas que possam auxiliar o organismo na reparação e regeneração desses defeitos ósseos por meio de procedimentos minimamente invasivos.

As alternativas mais comuns para o enxerto autógeno são o enxerto homogêneo (humano), xenógeno (animal, ex. bovino), e o enxerto sintético ou aloplástico (metal, plástico ou cerâmico). Os materiais homogêneos e xenógenos preenchem os quesitos biocompatibilidade e osteocondução, porém o risco de reações imunológicas ou transmissão de infecções e doenças não pode ser totalmente descartado. Em contrapartida, a disponibilidade de materiais sintéticos para substituição óssea é ilimitada e eles não são transmissores de infecção ou

doenças (Samartzis et al., 2005; Calori et al., 2011; Zimmermann; Moghaddam, 2011).

O desempenho biológico de um material sintético depende de alguns parâmetros fundamentais: composição química, morfologia e biodegradabilidade (Tadic; Epple, 2004).

Os materiais substitutos ósseos utilizados nesse estudo possuem comprovada característica osteocondutora, porém nenhuma ou mínima característica osteoindutora (Le Ninhouannen et al., 2007; Torres et al., 2010).

Esses materiais têm sido utilizados em engenharia tecidual sob a forma de grânulos e/ou matrizes rígidas. Para indicações clínicas específicas, os blocos de biocerâmicas podem ser moldados no leito cirúrgico. Entretanto, os grânulos de fosfato de cálcio são preferidos para preenchimento de defeitos ósseos, apesar da dificuldade de manuseio e de manutenção no sítio cirúrgico, o que resulta muitos espaços vazios entre os grânulos e o tecido ósseo, o que ocasiona instabilidade mecânica ao conjunto (Le Ninhouannen et al., 2007).

Será relatada a seguir uma síntese da literatura científica existente sobre esses substitutos ósseos avaliados para as diversas indicações crânio maxilofaciais e que foram utilizados neste estudo com a função de carreadores adicionais à rhBMP-2.

2.1.1 Beta- Tricálcio Fosfato (β -TCP)

A descoberta do β -tricálcio fosfato por Driskell et al. (1973) foi um importante salto no desenvolvimento de materiais cerâmicos bioativos.

Desde então tem sido estudado em preenchimento de cavidades (Mathai et al., 1989; Palti; Hoch, 2002; Nienhuijs et al., 2010) mostrando completa conversão do material em osso vital com excelentes resultados estatísticos e funcionais, provendo as melhores condições para instalação de implantes. Além disso, nenhuma reação imunológica ou efeito tóxico ocorreu, provando sua biocompatibilidade.

Em 1997 foi lançado no mercado internacional o β - tricálcio fosfato na sua fase mais pura, >99%, com uma fórmula balanceada, totalmente estequiométrica, $\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, que contém 38,76% de Ca, 41,26% de O, e 19,97% de P. A partir desse

ano, iniciou-se uma nova etapa nas pesquisas do β -TCP, especialmente em ortopedia e odontologia. Sua fórmula permanece igual até hoje.

Bateman et al. (2005), em um estudo in vitro, trataram o β -TCP (β - tricálcio fosfato) e CaSO_4 (Sulfato de Cálcio) com fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs) para melhorar as capacidades osteogênicas desses materiais. A proliferação de células osteoblásticas humanas foi maior nos dois materiais quando houve a associação do PDGF nas culturas, o que evidencia afinidades entre as células osteoblásticas e fator de crescimento com matriz de material sintético.

Um novo grão poroso de β -TCP foi avaliado quanto à biocompatibilidade in vitro e a formação óssea in vivo em coelhos. Defeitos ósseos foram feitos no fêmur das coelhas, um com o material teste e outro vazio para controle. As imagens 3D da micro-TC mostraram que a formação de osso novo foi 3x maior que o do osso trabecular original (BV/TV). O resultado histomorfométrico foi compatível com os resultados da micro-TC (Kim et al., 2010).

Yamada et al. (2008) analisaram a angiogênese observada no osso recém formado em experimento realizado em calvária de coelhos, utilizando dois casquetes de titânio: sendo um vazio e outro com β -TCP. Após 1 mês de reparação, foi injetado um composto vermelho denominado MICROFIL, nas carótidas direita e esquerda, para possibilitar a visualização da rede tridimensional de vasos penetrando os tecidos neoformados nos dois lados. No lado com preenchimento, foi possível visualizar vasos sanguíneos recém formados entre os grânulos de β -TCP. Também foi observada mais quantidade de tecido ósseo formado quando utilizado o preenchimento com β -TCP.

O β -TCP foi comparado com o Bio-Oss® (Kato et al., 2012) em um modelo de defeitos críticos em calvária de ratos de forma a analisar crescimento vertical. Foram colocadas 2 matrizes rígidas, sendo 1 de cada material, de cada lado da calvária. Após seis e dez semanas, as amostras foram coletadas e os resultados mostraram maior formação óssea, maior preenchimento do defeito e maior reabsorção de material remanescente no implante rígido de β -TCP.

Outro trabalho recente (Lim et al., 2013) utilizou defeitos críticos unicorticais em calvária de coelhos para comparar a utilização de uma matriz de β -TCP associada à rhBMP-2, ao PRP e matriz sozinha com o objetivo de observar crescimento vertical de tecido ósseo recém formado em dois tempos de reparação. Embora a matriz de β -TCP com rhBMP-2 tenha formado mais quantidade de tecido

ósseo em oito semanas, não houve crescimento vertical significativo em nenhum grupo, após 16 semanas, sob a análise histológica e por meio da micro-TC. Os autores creditaram o ocorrido à possibilidade de que a degradação da matriz ocorresse ao mesmo tempo que a formação óssea.

O β -TCP foi, por diversas vezes, comparado ao osso autógeno em procedimentos de preenchimento do seio maxilar em humanos, haja visto terem sido encontrados resultados semelhantes quanto à quantidade de aumento ósseo obtido entre os dois materiais, bem como a densidade óssea sempre maior no osso autógeno, embora a quantidade de osteóide no tecido neoformado tenha sido maior com o β -TCP. Portanto, embora o enxerto autógeno continue sendo o padrão ouro, o β -TCP mostrou ser uma opção viável, quando utilizado em seio maxilar uma vez que ele não induz inflamação, favorece a osteocondução e é altamente degradado por macrófagos e osteoclastos (Zerbo et al., 2004; Steigmann; Garg, 2005; Zijdeveld et al., 2005; Szabó et al., 2005; Suba et al., 2006; Chappard et al., 2010).

Dentro desse modelo de estudo, Wiltfang et al., em 2003, em estudo clínico investigaram se a combinação de β -TCP com PRP aumenta a regeneração óssea e reabsorção do β -TCP quando utilizados em seios maxilares. Após 6 meses, o estudo histológico e estatístico realizado determinou que nos enxertos com PRP, a neoformação óssea foi de 8 a 10% maior que naqueles sem PRP: em contrapartida, a degradação de β -TCP não foi acelerada, e foram mais evidentes células gigantes, tipo corpo estranho, ao redor dos grânulos de β -TCP, na presença de PRP.

Em outro estudo mais recente (Stavropoulos et al., 2011), a utilização do β -TCP, associado ao fator de crescimento rhGDF-5, foi comparado com sua associação ao osso autógeno em cirurgia de levantamento de seio maxilar, em um estudo clínico que encontrou resultados similares das duas associações, tanto em quantidade de osso neoformado como na qualidade óssea obtida.

2.1.2 Fosfato de Cálcio Bifásico – BCP

Em revisão realizada por Legeros et al., em 2003, constatou-se que o termo Fosfato de Cálcio Bifásico foi utilizado primeiramente por Nery et al. (1990), para descrever uma biocerâmica que consistia de uma mistura de HA e β -TCP, baseado

na análise de difração por raios-x. De acordo com as análises, o BCP é obtido quando uma apatita cálcio-deficiente biológica ou sintética é sintetizada a temperaturas em torno de 700⁰. Determina-se a proporção HA/ β -TCP pela deficiência de cálcio da apatita não sintetizada e a temperatura da síntese. As cerâmicas de BCP, como outros materiais de enxerto ósseo biorreativos (HA, β -TCP, Bioglass, HA bovina) são osteocondutivas mas não osteoindutivas.

Várias pesquisas têm demonstrado o uso potencial da cerâmica de BCP em diferentes funções como matriz em engenharia tecidual, em sistema de liberação de drogas e carreadores de fatores de crescimento e BMPs.

Nos últimos anos, estudos *in vitro* e *in vivo* no campo de engenharia de materiais têm avaliado diferentes compostos de cerâmica de fosfato de cálcio bifásico (BCP) com a intenção de investigar suas propriedades osteogênicas e mecânicas, muitas vezes comparando-os com outros materiais cerâmicos (β -TCP, HA) ou xenógenos (BBM) (Le Ninhouannen et al., 2007; Alcaide et al., 2009; Castellani et al., 2009; Humber et al., 2010; Park et al., 2010). Em todos esses estudos foram relatadas alta bioatividade, osteocondutividade e biocompatibilidade, o que comprova a viabilidade dessas cerâmicas em diversas aplicações clínicas.

A eficiência do fosfato de cálcio bifásico utilizado como carreador adicional à rhBMP-2/ACS tem sido analisada em pesquisas recentes.

Em um modelo experimental de defeitos críticos em calvária de cães foi analisada a utilização da rhBMP-2/ACS separadamente ou associada a partículas alógenas de osso canino, fosfato de cálcio bifásico em forma de grânulos ou na forma de uma matriz resistente à compressão, comparados a um controle negativo (coágulo). A micro-TC *in vivo* foi realizada após a cirurgia, nos períodos correspondentes a 0, 8, 16 e 24 semanas. A associação da rhBMP-2/ACS com o BCP em grânulos foi a associação que proporcionou uma formação óssea mais compacta e com espessura mais homogênea ao longo do defeito, além de mostrar menor taxa de formação óssea ectópica (Kinsella et al., 2011).

Em outro estudo (Jang et al., 2012) avaliou-se a formação óssea resultante da associação do fosfato de cálcio bifásico (BCP) com rhBMP-2 e a resposta dose dependente da rhBMP-2 em defeitos críticos em calvária de ratos. O tempo de reparação óssea observado foi de duas e oito semanas. O BCP usado como carreador foi impregnado com 0,1mL de quatro diferentes concentrações de rhBMP-2. As amostras foram avaliadas histologicamente e por micro-TC. Os resultados

revelaram uma reparação óssea significativamente maior em todos os grupos com rhBMP-2, independente da concentração, nos dois tempos analisados. O BCP remanescente foi significativamente menor em oito semanas do que em duas semanas, em todos os grupos nos quais esteve presente, e mostrou-se bom carreador para a rhBMP-2.

O impacto osteogênico de diferentes formulações de fosfato de cálcio bifásico (BCP) associados à membrana de colágeno/hidroxiapatita para reconstrução de defeitos nos processos alveolares foi realizado em cães por Nevins et al. (2013). Observaram para as três diferentes formulações de BCP, íntimo contato entre partículas de enxerto e osso novo, bem como quantidades suficientes de osso novo para a instalação de implantes de titânio.

Frenken et al. (2010), por meio de um estudo clínico, multicêntrico e não comparativo em humanos, avaliaram quantitativa e qualitativamente a formação óssea obtida em procedimento de elevação do seio maxilar, utilizando-se o fosfato de cálcio bifásico (BCP- Straumann Bone Ceramic®). Tecido mineralizado recém formado foi observado, com íntimo contato osso-material. A relação volume ósseo / volume total foi na média de 27,3% (SD 4,9). Os autores concluíram que o material avaliado provou ser adequado para preenchimento vertical da maxila atrófica utilizando-se o procedimento de levantamento do seio maxilar.

No mesmo ano e no mesmo modelo de estudo, Lindgren et al. (2010), compararam o grau de reabsorção do Fosfato de Cálcio Bifásico (BoneCeramic®) sintético com o osso bovino desmineralizado (Bio-Oss®), em preenchimento de seio maxilar. Os resultados mostraram baixo grau de reabsorção para os dois materiais. Por outro lado, o contato osso-enxerto foi significativamente maior no osso bovino ($P = 0,007$).

2.1.3 Osso mineral bovino - BBM

O osso mineral bovino (BBM) ou osso bovino inorgânico é uma hidroxiapatita bovina osteocondutiva, usada extensivamente para preenchimento ósseo. BBM apresenta semelhanças químicas e estruturais com a hidroxiapatita humana

(proporção cálcio/fosfato de 1,67 e tamanho médio do cristal de aproximadamente $100\mu^3$ (von Arx et al., 2001).

Jensen et al. (1996) testou em mandíbulas de miniporcos a utilização do osso mineral bovino comparando com dois tipos de cerâmica e observou que a osseointegração do Bio-Oss® foi maior do que a de outros materiais, porém com baixo índice de biodegradação. Nesse estudo os autores mostraram que o Bio-Oss® possui a estrutura cristalina igual ao do osso natural (dimensão do cristal 400 X 100 Å).

Terheyden et al., em 1999 analisaram em miniporcos a associação da proteína osteoindutiva OP1 (rhBMP-7) com osso mineral bovino (Bio-Oss®) no aumento da ossificação e no contato ossoimplante (BIC) em preenchimento de seio maxilar com instalação imediata de implantes. Os resultados mostraram que, no lado teste, a porcentagem de BIC na área enxertada foi de 80% contra 38,6% no lado controle. Concluiu-se, portanto, que a aplicação de proteínas morfogenéticas ósseas promove uma osseointegração mais rápida e melhor dos implantes instalados simultaneamente ao enxerto bovino.

O Bio-Oss® é considerado material não reabsorvível, pois leva de 3 a 6 anos para iniciar uma lenta reabsorção por meio de atividade osteoclástica (Piattelli et al., 1999; Tamini et al., 2006; Jensen et al., 2007; Tachi et al., 2010; Busenlechner et al., 2012).

Slotte et al. (2003), realizaram um experimento com cilindros de titânio em calvária de coelhos utilizando osso mineral bovino (BBM) e enxerto autógeno, comparando-os com coágulo sanguíneo. Os resultados mostraram que quantidades semelhantes de tecido ósseo neoformado foram encontradas nos dois grupos teste (autógeno e BBM); na análise de fluorescência, a intensidade do corante foi maior no enxerto autógeno que no osso bovino.

Torres et al. (2010) avaliaram em calvária de ratos a combinação de osso bovino anorgânico (ABB) com plasma rico em plaquetas (PRP) em enxerto ósseo vertical, comprovando o efeito positivo da adição de fatores de crescimento aos substitutos ósseos. Relataram também que a topografia rugosa da hidroxiapatita favorece a proliferação de osteoblastos e ainda promove a síntese da matriz óssea na sua superfície. Afirmam entretanto, que o osso mineral bovino não possui propriedades osteoindutivas e sim osteocondutivas.

Komlev et al. (2010), compararam a biodegradação de materiais cerâmicos e osso mineral bovino em calvária de ratos, utilizando-se a microtomografia computadorizada. Foram analisados a hidroxiapatita 100% sintética (Engipore®), fosfato de cálcio sintético multifásico (Si TCP – Skelite), e osso mineral bovino (Bio-Oss®), enriquecido com células-tronco mesenquimais (MSC) aspiradas da crista ilíaca. A aquisição de imagens por micro-TC permitiu uma comparação a imagem 3D das matrizes, antes e após a implantação, mostrando que após 8 semanas ocorreu significativa biodegradação no Skelite, mínima reabsorção ocorreu no Bio-Oss® e nenhuma no Engipore.

A taxa de formação óssea vertical e osseointegração de bloco mineral bovino (Bio-Oss ®) associado aos fatores de crescimento rhBMP-2 e/ou rhVEGF, foi avaliada (Schmitt et al., 2013) utilizando-se um modelo de defeitos críticos em calvária de porcos. Todos os blocos ósseos apresentaram formação óssea tanto no contato com o osso nativo, como no seu interior, sendo portanto considera-se viável para procedimentos de ganho em altura independentemente da adição dos fatores de crescimento (BMP-2 e VEGF).

Estudo mais recente (Liu et al., 2013) avaliou a incorporação de rhBMP-2 aos grãos de osso bovino (DBB- Bio-Oss®) cobertos por fosfato de cálcio que supostamente ajudaria na liberação da rhBMP-2. Oito grupos foram comparados em defeitos críticos realizados em úmero e fêmur de ovelhas: (i) nenhum enxerto, (ii) osso autógeno, (iii) DBB sozinho, (iv) DBB + autógeno, (v) DBB com rhBMP-2 adsorvida, (vi) DBB coberta com CaP e sem rhBMP-2, (vii) DBB coberta com CaP e com rhBMP-2 adsorvida, (viii) DBB coberta com CaP e com rhBMP-2 incorporada. Após 4 e 8 semanas de reparação os grupos com DBB + autógeno (iv) e o grupo de DBB coberta com CaP e com rhBMP-2 incorporada foram os que obtiveram maior formação óssea.

Como nas cerâmicas, muitos estudos clínicos sobre o osso mineral bovino em humanos têm sido realizados, utilizando-se a técnica de preenchimento de seio maxilar como modelo.

O processo de reabsorção do Bio-Oss® foi demonstrado em estudo clínico longitudinal de 10 anos de Sartori et al. (2003), realizado em seio maxilar que revelou que, até o segundo ano de reparação, a taxa de reabsorção (SR) era de 3,55% ao mês, caindo nos oito anos seguintes para 0,58% ao mês, que significa uma diminuição de mais de seis vezes da taxa de reabsorção inicial. Concluiu-se

portanto que o biomaterial não é reabsorvido totalmente e sim incorporado ao tecido ósseo.

Artzi et al. (2005), avaliaram em humanos a quantidade de osso neoformado ao redor de 2 tipos de enxerto ósseo: osso mineral bovino e dentro da cavidade do seio maxilar e concluíram que ambos os materiais são adequados para promover formação óssea. Contudo, 12 meses após enxerto, a quantidade de tecido ósseo neoformado nos enxertos de BBM foi significativamente maior que nos enxertos de β -TCP (médias de 45% e 32% respectivamente).

Tetsch et al. (2010) realizaram estudo longitudinal retrospectivo de 15 anos em humanos, mostrando o resultado da instalação de implantes em áreas de levantamento de seio maxilar com osso mineral bovino (Bio-Oss®), β - tricálcio fosfato (Cerasorb®) e autógeno. Foram instalados 2190 implantes, com taxa de sobrevivência de 97,3% para autógeno, 95,5% para BBM e 94,1% para β -TCP.

2.2 Engenharia Tecidual

Engenharia Tecidual (TE) é uma nova disciplina científica que aplica princípios da biologia, química e engenharia, em áreas interdisciplinares como medicina, odontologia e biologia para o desenvolvimento de substitutos funcionais para o tecido ou órgão ausente, danificado, ou perdido.

Segundo Bell (2000), a abordagem da engenharia tecidual para a regeneração óssea combina 3 elementos-chaves, chamados de Tríade da Engenharia Tecidual: 1-Células; 2-Moléculas Sinalizadoras (IGFs, TGF- β , PDGFs, FGFs, VEGFs, BMPs); 3-Matrizes Condutoras.

Um estudo conceitual, sobre reparação óssea em fraturas, introduziu um quarto elemento ao já conhecido e estabelecido modelo triangular de pré-requisitos na abordagem de engenharia tecidual. Além da tríade fatores de crescimento, células osteogênicas e matrizes e/ou carreadores, os autores acrescentam um quarto elemento que é identificado como “ambiente mecânico”, relacionado à estabilidade mecânica do conjunto, denominando-se de “conceito diamante” o termo a ser utilizado em engenharia tecidual e que seriam pré-requisitos para a reparação óssea e tratamento de defeitos ósseos (Giannoudis et al., 2007).

Esse conceito foi abonado e referido em estudos posteriores por Schmidmaier et al. (2008) e Zimmermann; Moghaddam (2011).

2.2.1 Células

O reparo e a regeneração óssea por engenharia tecidual ocorrem por meio de uma sequência ordenada de eventos celulares que são afetados por muitos fatores biológicos e mecânicos. Em termos de fatores biológicos, o primeiro princípio é que todo tecido ósseo neoformado requer a presença de células osteoprogenitoras capazes de formar osso. Elas podem vir do próprio leito receptor, coletadas de vários sítios, ou ainda cultivadas in vitro (células-tronco) e levadas ao local, dentro de uma matriz ou arcabouço idealizado de forma adequada a fim de permitir a adesão, proliferação e diferenciação celular.

As células-tronco estão presentes em todos nós, e, provavelmente, em todos os tecidos. Elas podem ser:

- 1- Totipotentes: podem se diferenciar em qualquer tecido (óvulo fecundado);
- 2- Pluripotentes: podem se diferenciar em muitos tecidos diferentes - uma das três camadas germinativas (ectoderma, endoderma, mesoderma - células-tronco embrionárias);
- 3- Multipotentes: podem se diferenciar em alguns tecidos (células-tronco mesenquimais);
- 4- Unipotentes/Células Progenitoras: podem se diferenciar em um tecido, como as células osteoprogenitoras do periósteo que podem se diferenciar em osteoblastos (Kakar; Einhorn, 2005).

O osso medular contém células indiferenciadas (MSC) e células precursoras osteogênicas (unipotentes) que têm sido usadas na engenharia tecidual óssea e em reparos de defeitos ósseos. Esse efeito pode ser potencializado com a adição de agentes osteoindutivos. (Caplan, 2007).

2.2.2 Moléculas sinalizadoras

É sabido que uma variedade de proteínas bioativas (moléculas sinalizadoras) está naturalmente presente no osso, nas plaquetas, e em várias outras células e tecidos. Dois tipos de fatores que têm recebido mais atenção são:

1- Fatores de crescimento: que são primariamente mitogênicos (proliferativos celulares) e quimiotáticos (recrutadores de células);

2- Morfógenos ou BMPs: que atuam alterando o fenótipo celular, por ex. causando a diferenciação de células-tronco em células formadoras de osso em um processo conhecido por osteoindução (Reddi, 2007).

Considera-se, dentre os fatores de crescimento, os mais citados pela literatura: 1- Fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs); 2- Fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFs); 3- Fator de crescimento transformador β (TGF β); 4-Fatores de crescimento vasculares endoteliais (VEGFs); 5-Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs).

Os materiais que são naturalmente osteogênicos contém fatores de crescimento (ex: TGF-B, IGFI, IGFII, PDGF, etc.), os quais regulam a proliferação celular de tecidos diferenciados, enquanto os materiais osteoindutivos são aqueles que contêm morfógenos (ex: proteínas morfogenéticas ósseas), substâncias que iniciam o desenvolvimento de sistema de órgãos e tecidos pela estimulação de células indiferenciadas para convertê-las fenotipicamente (ex: células-tronco mesenquimais - células osteoprogenitoras ou condroprogenitoras) (Lee, 1997). Segundo o autor, a utilização de morfógenos em lugar de fatores de crescimento na regeneração de tecido ósseo é mais vantajosa porque a pré-existência de células osteoprogenitoras na área é desnecessária. Assim, a utilização de fatores de crescimento, em grandes defeitos ósseos, é limitada, devido à falta de células osteoprogenitoras do osso remanescente.

2.2.3 Carreadores

São matrizes ou arcabouços, utilizadas como veículos para determinada substância ou cultura de células, como condutores na formação óssea, e/ou mantenedores de espaço em engenharia tecidual, podendo exercer todas essas funções ao mesmo tempo. A sua macro e micro arquitetura, bem como composição química e estrutura molecular podem influenciar seu desempenho, dependendo do objetivo desejado.

A matriz ideal deve estimular a adesão celular por meio de porosidade adequada, promover e suportar a angiogênese, e resistir às forças do tecido mole. Também deveria ser biocompatível, osteocondutora e biodegradável, além de ser convenientemente esterilizável, de fácil manuseio, estável ao longo do tempo e ser passível de ser produzida em larga escala (Seeherman; Wosney, 2005; Kim et al., 2011; Lo et al., 2012; Lu et al., 2013).

Wang et al. (1990) reconheceram a importância dos carreadores, definidos como um sistema de liberação, para a rápida difusão das proteínas morfogenéticas.

As vantagens da utilização desses carreadores em conjunto com a BMP-2 já foram descritas por Wozney (2002), como: 1- Facilidade de aplicação e retenção no sítio onde foi implantada a BMP, impedindo que haja calcificação em locais indesejados; 2- Facilidade para a infiltração das células mesenquimais; 3- Provisão de substrato para as células de crescimento e diferenciação; 4- Arcabouço para ajudar a definir a forma do novo osso.

A BMP-2 tem sido liberada com diferentes carreadores para regeneração óssea ectópica e ortotópica, incluindo materiais inorgânicos como HA, TCP, e cimentos a base de fosfato de cálcio, polímeros sintéticos (ex: poliláticos, poliglicólicos, e polilático glicólicos), polímeros naturais (ex. colágeno e hialuran) e compostos desses 3 materiais. A desvantagem associada com carreadores sintéticos e inorgânicos para BMP-2 são a pobre biodegradabilidade e a possível resposta inflamatória. Atualmente, um dos carreadores para liberação de BMP mais utilizado é a esponja de colágeno bovino tipo I absorvível (ACSI), que possui boa biocompatibilidade com os tecidos. Esse material possui, entretanto, alguns problemas inerentes ao controle da taxa de liberação de BMP-2, frequentemente

resultando em alta explosão de liberação inicial seguida da incapacidade de prover uma liberação de BMP-2 a longo prazo (Zhang et al., 2009).

Estudos mostram que a concentração ideal da proteína para ser aplicada no carreador, bem como o volume e a forma desse carreador, para que retenha a droga e permita uma formação óssea adequada são questões que ainda não estão totalmente solucionadas. Super-dosagens têm sido empregadas clinicamente com efeitos a longo prazo ainda não desvendados (Yamaguchi, 1996).

Diferentes doses de rhBMP-2 foram testadas associadas ao fosfato de cálcio bifásico (BCP) por Alam et al. (2001), em um experimento em crânio de ratos Wistar, após 8 semanas de reparação. Os implantes de cerâmica impregnados com doses de 1, 5 e 10µg de rhBMP-2 foram inseridos no pericrânio dos animais. Nesse estudo, a formação de osso novo foi dose-dependente e a bioreabsorção da cerâmica produziu condições favoráveis para a formação óssea induzida pela rhBMP-2.

Roshan-Ghias et al. (2011) avaliaram sob o ponto de vista de resistência mecânica, matrizes para formação óssea feitas de ácido polilático e beta-tricálcio fosfato (PLA/β-TCP) inseridos em fêmur de ratos, analisando por meio de micro-TC in vivo o estresse mecânico resultante da carga aplicada no lado teste. Os resultados mostraram que o lado submetido à carga obteve maior formação e rigidez óssea que o lado controle.

De certa forma, carreadores ou arcabouços constituem, muitas vezes, o quarto elemento do conceito diamante quando possuem forma e resistência adequadas às forças de tração e compressão exigidas clinicamente, ou pelo modelo de estudo. Devem, para isso, permitir sua fixação e promover a imobilidade do conjunto. Exemplos desse tipo de carreador/arcabouço são os blocos de osso xenógeno ou cerâmicos, os cilindros, as malhas ou as placas de titânio e outros materiais.

Embora existam muitas pesquisas que avaliem carreadores adequados e viáveis para transportar e liberar a rhBMP-2, o carreador ideal para essa proteína indutora ainda não foi definido; e, portanto, existe a necessidade de novas pesquisas translacionais, devido à influência dessas matrizes na determinação de dose, estabilidade e bioatividade do fator osteoindutor.

2.3 Proteínas Morfogenéticas ósseas - BMPs

As BMPs (Proteínas Morfogenéticas Ósseas) são os únicos fatores de crescimento osteoindutores conhecidos até hoje. Elas foram descobertas e identificadas por Marshall Urist, em 1965, após um experimento com osso desmineralizado que, colocado em tecido subcutâneo e muscular de ratos, induzia a formação óssea nesse local, por meio de um extrato protéico por ele denominado de proteína morfogenética óssea (BMP) (Lo et al., 2012).

As proteínas morfogenéticas ósseas são membros da superfamília TGF- β e desempenham um papel crítico no desenvolvimento embrionário além de regularem diversas atividades celulares como proliferação, diferenciação e apoptose celular (Sfeir, 2005).

Segundo Lee (1997), embora tenha sido creditada a Urist a descoberta das BMPs, em 1965, Leevander G., em 1938, já indagava sobre a existência de uma substância indutora óssea e reportou uma série de experimentos em que ele implantou fragmentos ósseos vivos de 1,0 a 1,5 cm, de forma subcutânea ou intramuscular. Lee (1997) ainda relatou que Leevander foi capaz de mostrar que nem o perióstio nem as células da superfície ou do interior do enxerto foram responsáveis pelo crescimento ósseo.

Desde o início de 1970, e durante mais de 20 anos, estudos sobre isolamento, identificação, clonagem e purificação das proteínas ósseas morfogenéticas revelaram a chave para o entendimento de distintos eventos biológicos e moleculares que ocorrem durante a formação óssea (Urist; Craven, 1970; Urist; Strates, 1971; Sampath; Reddi, 1981; Wozney et al., 1988; Wozney, 1989; Celeste et al., 1990; Wang et al., 1990; Rosen; Thies, 1992; Wozney, 1992; Reddi, 1997).

De acordo com estudo clássico (Urist; Craven, 1970), os níveis de estabilidade dos padrões morfogenéticos na matriz óssea, denominada de competência osteogênica, considerando-se a produção de osso novo de implantes intramusculares em vertebrados são os seguintes: coelhos > ratos > porco da índia > camundongos > gatos > cães = babuíños = macaco > humanos > galinhas > rãs.

O princípio da indução óssea (BIP) foi definido em estudo de Urist e Strates, 1971, e desenvolve-se de uma reação entre as secreções celulares e a estrutura

interligada da matriz óssea, e serve como substrato para a diferenciação de células mesenquimais em osso e medula óssea.

Pela facilidade de manipulação, o sistema de pesquisa in vivo de escolha é a implantação subcutânea de BMP em rato ou camundongo. Nesse sistema de análise, a formação de cartilagem ocorre dentro de cinco a sete dias de implantação da BMP, a formação óssea é evidente aproximadamente entre os dias 10 e 14, e a remodelação óssea continua após o dia 21, quando é observado a existência de um ossículo (Wozney et al., 1988, Wozney, 1989, 1992).

Wozney (1989) observou que o tempo em que esses eventos transcorrem é dependente da quantidade de BMP, implantada. Por exemplo, em quantidades limitadas de rhBMP-2 de 0,5 mg, a formação óssea é vista aos 14 dias, enquanto 30 mg de rhBMP-2 antecipa a formação óssea para 7 dias. Com implantação de grandes quantidades de rhBMP-2, como > 100 mg, extensa formação óssea pode ser observada aos 5 dias. Esse foi o primeiro estudo a comprovar que a relação entre a rhBMP-2 e a formação óssea resultante é dose-dependente.

Quando identificadas, as proteínas foram nomeadas com o prefixo BMP: BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8 (Wozney et al., 1988, Wozney, 1989). Ao mesmo tempo, Sampath e colegas, no Creative Biomolecules, identificaram uma proteína que eles chamaram OP-1, que corresponde à BMP-7. Logo após, identificaram também a OP-2, que corresponde à BMP-8 e depois a OP-3 (Alper, 1994).

Após a identificação das BMPs, a BMP-2 foi a primeira a mostrar capacidade de induzir a formação de nova cartilagem e tecidos ósseos, demonstrando que essa classe de moléculas são suficientes para osteoindução (Wosney, 2002).

Segundo Reddi (1997) a indução óssea por matriz óssea desmineralizada é uma cascata de vários estágios sequenciais cujas fases chave são: quimiotaxia, mitose e diferenciação.

Até 2012, mais de 20 BMPs foram identificadas, das quais 7 parecem capazes de iniciar crescimento ósseo (Lo et al., 2012).

Desde 1988, Wozney e colaboradores do Instituto de Genética produziram material de pesquisa por mais uma década. Os avanços obtidos com as pesquisas em engenharia molecular e genética possibilitaram identificação, formas de purificação e clonagem dos genes de BMP humanos, até o processo de obtenção das recombinantes humanas.

Wang et al. (1990) descreveram a purificação e caracterização da rhBMP-2 produzida por linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO), e sua atividade na formação óssea ectópica. A produção de rhBMP-2 foi analisada dentro de *Escherichia coli*.

O imediato desenvolvimento de BMPs recombinantes e vários métodos de distribuição fizeram com que as BMPs estejam atualmente disponíveis para uso clínico. (Dimitriou; Giannoudis, 2005).

Para ser eficiente, a BMP deve ser utilizada na dose apropriada, e liberada localmente durante um período de tempo suficiente por uma matriz biocompatível e biodegradável, cuja estrutura tridimensional permita sua invasão por novo osso e células vasculares (Solofofalala et al., 2007).

2.3.1 Proteína morfogenética óssea recombinante humana tipo 2 (rhBMP-2)

A recombinação é a inserção de fragmentos de DNA humanos responsáveis pela seqüência das BMPs dentro do núcleo de bactérias ou células (Ex. bactéria *Escherichia coli* ou células CHO- ovário de hamster chinês).

As sequências específicas de DNA são introduzidas em um vetor apropriado que contém potencializadores e marcadores específicos para essa determinada sequência. Este vetor é transferido para a célula hospedeira, normalmente células CHO (Chinese Hamster Ovaria) ou bactéria *Escherichia coli*. A reprodução de *Escherichia coli* é mais rápida que as células de CHO, por isso a primeira tem sido mais utilizada, porque também influencia o valor final do produto (Cochran et al., 1997; Bessho et al., 1999).

As BMP-2 e BMP-7 ou Proteína Osteogênica 1 (OP-1) são normalmente produzidas por meio de recombinação genética, e passam a ser denominadas recombinante humana da proteína morfogenética óssea: rhBMP-2 e rhBMP-7 (Wozney, 1992, 2002).

A expressão recombinante da rhBMP-2 e rhBMP-7 possui vantagens em termos de fornecimento de proteínas osteoindutivas bem caracterizadas, com elevada pureza, consistência e atividade, ao mesmo tempo que assegura a ausência de agentes adventícios (Wozney, 2002).

Desde então, inúmeros estudos com pesquisa *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados com o intuito de avaliar a ótima dosagem da droga, melhor veículo de entrega e liberação, e também testar a aplicabilidade clínica para diversos tipos de indicações terapêuticas no que se refere à formação e regeneração óssea.

Visser et al. (2009), realizaram estudo *in vitro* para avaliar a afinidade da rhBMP-2 pela esponja de colágeno absorvível (ACS) e concluíram que essa pode ser uma combinação segura e viável para os propósitos de reparação óssea.

Em 2007, Cowan et al. tiveram como objetivo validar o uso da microtomografia como ferramenta de análise sobre as técnicas convencionais para avaliar a resposta de dose efetiva da rhBMP-2 em um sistema de cultura *in vitro* tridimensional e em um modelo *in vivo* pré-estabelecido de defeito crítico em calvária de ratos. A micro-CT mostrou diferenças na forma e na organização espacial das áreas mineralizadas, além de mostrar as diferenças em área, volume e densidade óssea em que elevado grau de regeneração óssea foi obtido de forma dose-dependente.

Vários estudos em animais (Cochran et al., 1997; Fiorellini et al., 2001; Wikesjö et al., 2004; Leknes et al., 2008; Wikesjö et al., 2008a,b; Decker et al., 2010; Hunziker et al., 2012) avaliaram em defeitos ao redor de implantes de titânio, o efeito da rhBMP-2 associada à esponja de colágeno ou a outros tipos de carreadores e/ou incorporada à superfície dos implantes. Em todos os estudos os resultados mostraram que a utilização da rhBMP-2 acelera e aumenta o grau e extensão da formação óssea em defeitos peri-implantares, muitas vezes de forma dose-dependente e a resposta osteogênica pode ser mais eficaz quando a liberação da rhBMP2 é gradual.

Um experimento conduzido em calvária de miniporcosp (Wang et al., 2012) comparou a micro arquitetura dinâmica do osso induzido por baixa-dose de proteína morfogenética óssea, BMP-2/7 heterodimérica com BMP2 e BMP7 homodiméricas, em defeitos ósseos peri-implantares. Para isso utilizou-se a esponja de colágeno como carreador. Por meio da micro-TC, os resultados mostraram que, após 6 semanas, a BMP2/7 heterodimérica obteve significativamente maior porcentagem de BV/TV e significativamente menor SMI que a BMP2/7 homodiméricas. Concluiu-se que baixa-dose de proteína morfogenética óssea (BMP-2/7) heterodimérica promoveu regeneração óssea mais rápida e de melhor qualidade que as BMP2 e BMP7 homodiméricas.

O relato de que a reabsorção óssea transitória ocorreria antes da subsequente formação óssea com a administração de rhBMP-2 foi inicialmente relatada por Rodeo et al. (1999) e posteriormente comprovado em outros estudos de Seeherman e Wosney (2005), Seeherman et al. (2010) e Kim et al. (2011), que afirmam que com o aumento da dose da droga, há um aumento da atividade osteoclástica, que algumas vezes pode ser desencadeado por um desequilíbrio entre a relação osteoblastos /osteoclastos, induzidos pela rhBMP-2.

Além disso, os osteoclastos expressam receptores de BMP-2, uma vez que a BMP-2 aumenta a sua diferenciação pela hiper-regulação do receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL). Porém um ajuste preciso da dose de rhBMP-2 otimizaria o equilíbrio entre as atividades de formação e reabsorção óssea. (Jensen et al., 2007; Tachi et al., 2010; Hunziker et al., 2012).

Também foram avaliados defeitos críticos em rebordos alveolares em mandíbula de cães (Barboza et al., 2004; Jovanovic et al., 2007) utilizando-se a rhBMP-2/ACS associada a outros biomateriais, ou sozinha, e também a rhBMP-2/ACS, com ou sem cobertura de membranas não reabsorvíveis. Os resultados mostraram que a rhBMP-2/ACS, associada a biomateriais, forma significativamente mais osso do que quando utilizada sozinha; e a rhBMP-2/ACS sozinha obteve melhores resultados quando comparada à membrana de PTFe.

Lu et al. (2013), testou uma matriz de fosfato de cálcio bifásico/colágeno resistente à compressão (CRM) como carreador para a rhBMP-2, em defeitos periimplantares de mandíbula de cães, comparando-a contralateralmente com o conjunto rhBMP-2/ACS. O lado que recebeu rhBMP-2/CRM mostrou densidade e área óssea significativamente maiores que o lado oposto, que recebeu apenas o conjunto rhBMP-2/ACS.

Miranda et al. (2005), avaliaram em macacos o aumento do rebordo alveolar por meio de implantação de rhBMP-2 utilizaram dois tipos de carreadores. Os defeitos ósseos foram preenchidos com rhBMP-2 e esponja de colágeno absorvível de tricálcio fosfato e hidroxiapatita (TCP/HA/ACS), ou com cimento de fosfato de cálcio (α -BSM). Os grupos controle foram os mesmos materiais sem rhBMP-2. Os resultados mostraram que a associação de rhBMP-2 aos carreadores induziu um aumento de duas vezes a largura do rebordo alveolar, com grande porcentagem de osso trabecular e maior densidade óssea, se comparada aos grupos controle, independente do carreador.

Matsuschita et al. (2006) compararam diferentes concentrações de rhBMP-2 associadas ao β -TCP e a um bloco sintético de co-polímero (PLA-DX-PEG) implantado em fêmur de coelho. Nesse estudo, analisou-se a biodegradação do β -TCP, aliado às suas propriedades osteoindutivas. Os defeitos foram preenchidos com β -TCP + rhBMP-2 a 0,0025% (BMP-H), β -TCP + rhBMP-2 a 0,00625% (BMP-L), controle A (β -TCP sozinho) e controle B, vazio. O reparo de osso cortical e esponjoso ocorreu predominantemente no grupo BMP-H, e apenas pequena formação foi encontrada no grupo BMP-L e controle A. A maior parte do β -TCP foi reabsorvida no grupo BMP-H após 6 meses da cirurgia.

Hoshino et al. (2007) investigaram o uso da rhBMP2 na regeneração óssea em cirurgia de implantação de próteses de quadril em cães, simulando-se defeitos ósseos no osso femoral e no acetábulo do íliaco. Nos defeitos cobertos com rhBMP-2/ β -TCP, o material foi completamente reabsorvido e substituído por novo osso numa relação tempo-dependente.

Estudo de Maus et al. (2008) testou, em fêmur de ovelhas, o cimento de β -TCP como carreador da rhBMP-2, em lugar de esponja de colágeno (ACS). Quatro defeitos ósseos por trepanação foram feitos no fêmur dos animais e preenchidos com: 200 μ g de rhBMP-2/cm³ de TCP, enxerto autógeno, TCP puro ou defeitos vazios para controle. Embora os defeitos tratados com TCP puro mostrassem um conteúdo ósseo significativamente aumentado em comparação aos outros, a adição de rhBMP-2 ao TCP levou a uma remodelação mais rápida do defeito, comparáveis aos enxertos autógenos, enquanto os defeitos tratados apenas com TCP não estavam completamente remodelados. O grupo com rhBMP-2 mostrou maior biodegradação do TCP remanescente.

Jung et al. (2008) testaram em calvária de coelhos a utilização de uma matriz sintética de polietileno glicol (PEG) contendo rhBMP-2 combinada com (HA/ β -TCP) em grânulos, para avaliar a regeneração óssea comparada com enxertos sozinhos e coágulo. Foram instalados 4 cilindros de titânio na calvárias dos animais. O estudo concluiu que a adição de rhBMP-2 a uma matriz sintética com HA/ β -TCP aumentou significativamente a qualidade e quantidade do tecido ósseo formado.

Por et al. (2008) avaliaram a combinação de biomateriais com uma fôrma utilizada de suporte para reconstruir abóbada da calvária de cães. Os biomateriais testados foram matriz óssea desmineralizada (DBM), rhBMP-2 e plasma rico em plaquetas autógeno (PRP). Os suportes usados foram cromo-cobalto e placa

reabsorvível de co-polímero de ácidos L-lático e glicólico. Nas associações realizadas com rhBMP-2, houve completa regeneração óssea, enquanto que, no outro grupo, houve mínimo crescimento ósseo. O PRP não melhorou a regeneração óssea.

Gutwald et al. (2010) avaliaram os efeitos da rhBMP-2 na formação óssea e na osseointegração de 3 tipos de implantes dentários na elevação do seio maxilar de ovelhas em cirurgias de um e dois estágios, comparando com osso autógeno da crista ilíaca. Os resultados mostraram um contato ósseo-implante (BIC) maior no grupo da rhBMP-2 após 12 semanas de reparação, no protocolo de inserção imediata do implante. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os 3 sistemas de implantes, nos dois grupos. Observou-se uma relação tempo-dependente na formação óssea em ambos os grupos.

Em outro estudo em seio maxilar de miniporcos (Lee et al., 2013), os autores compararam a formação óssea local e a osseointegração de implantes instalados imediatamente ao preenchimento do seio maxilar, utilizando de um lado, rhBMP-2/ACS e, do outro, osso autógeno particulado esponjoso removido da crista ilíaca do animal. Os resultados mostraram que o lado com rhBMP-2/ACS induziu a formação óssea com qualidade significativamente maior que o preenchido com osso autógeno. No entanto, não houve significantes diferenças na altura do osso formado nem no contato osso-implante entre os dois lados.

Estudo recente de Choi et al. (2013) avaliaram em seios maxilares de coelhos, o efeito osteocondutivo da rhBMP-2 associada ao fosfato de cálcio bifásico (BCP). Em um dos lados, foi colocado rhBMP-2 com fosfato de cálcio (BCP), no outro lado, BCP sozinho. Amostras foram coletadas após 2 e 8 semanas, e foram realizados exames radiográficos e histométricos. Com 2 semanas de reparação, observou-se volume ósseo maior no grupo teste do que no grupo controle. Concluíram que uma adequada manutenção do espaço na técnica de levantamento de seio pode ser suficiente com utilizando-se apenas o BCP, mas o potencial osteocondutivo da membrana sinusal é ativada desde os primeiros momentos após aplicação de rhBMP-2.

Dois tipos de carreadores foram testados em primatas (Herford et al., 2012), em duas dosagens de rhBMP-2 em defeitos de continuidade em mandíbula. Foram avaliados cinco grupos: grupo A, rhBMP-2/ACS (1,5 mg/mL); grupo B, rhBMP-2/ACS com grânulos de cerâmica (15% HA/ 85% β -TCP) a 1,5mg/mL; grupo C, rhBMP-2

(2,0 mg/mL) com matriz resistente à compressão (CRM); grupo D, rhBMP-2 (0,75mg/mL) com CRM; e grupo E, CRM sozinho. Após análise histológica e por microtomografia computadorizada, os resultados mostraram neoformação óssea significativamente maior nos animais tratados com rhBMP-2 (2,0 mg/mL) e CRM (grupo C), mostrando a vantagem de um carreador adicional para esse tipo defeito.

Em modelo de estudo semelhante ao nosso, em calvária de coelhos, o crescimento vertical foi analisado utilizando-se blocos de BCP com e sem a adição de rhBMP-2 e com e sem a adição da esponja de colágeno (ACS). Os grupos, que utilizaram a rhBMP-2, mostraram resultados significativamente melhores em relação à formação óssea; enquanto que o bloco de BCP com colágeno mostrou melhor integração entre o osso neoformado e a base da calvária, além de mais facilidade de manipulação e excelentes propriedades de remodelação (Kim et al., 2012).

Boyne et al. (1997), em um estudo pioneiro, avaliaram reações locais e sistêmicas de 12 pacientes submetidos a preenchimento de seio maxilar com rhBMP-2/ACS. Significante crescimento ósseo foi documentado através de tomografias computadorizadas. Não houve nenhuma reação séria ou inesperada e nenhuma alteração clínica importante nos exames hematológicos e de urina. Os efeitos pós-operatórios mais frequentes foram edema facial, eritema, dor e rinite. As biopsias ósseas, retiradas no momento da instalação dos implantes, mostraram excelente qualidade óssea, confirmando sua indicação em substituição aos enxertos autógenos.

Quatro anos depois, o mesmo autor (Boyne, 2001) estudou em diversas situações clínicas a eficácia da utilização da rhBMP-2, como indutor ósseo em regeneração de defeitos maxilo-faciais de grande extensão e submetidos à carga funcional. Em todas as situações foi observada completa regeneração óssea, com relatos de aumento na densidade óssea, no volume ósseo, e na espessura da trabécula óssea. Uma das situações mostrou também que a idade parece não ser um fator limitante para a utilização da terapia com rhBMP-2.

Em 2009, Triplette et al. avaliaram a segurança e eficiência da rhBMP-2 em esponja de colágeno absorvível (ACS), comparada com enxerto ósseo autógeno, em cirurgia de preenchimento de seio maxilar com instalação de implantes em 2 estágios. Significante quantidade de osso formou-se após seis meses, com altura óssea de $7,83 \pm 3,52$ mm no grupo com rhBMP-2 e $9,46 \pm 4,11$ mm no grupo com

osso autógeno. Aos 6 meses após função, o osso formado pela indução de rhBMP-2 era significativamente mais denso que o grupo de auto enxerto.

Recente estudo (Kao et al., 2012) comparou a utilização da rhBMP-2/ACS (Infuse, Medtronic) associada à xenoenxerto de osso bovino (Bio-Oss, Geistlich) em procedimento de elevação do seio maxilar bilateral em 22 pacientes. Foram comparados, de um lado, o uso do Bio-Oss sozinho e, do outro, a associação da rhBMP-2/ACS com Bio-Oss na proporção 80/20. Os resultados mostraram que, embora a associação da proteína tenha aumentado a reabsorção do material (Bio-Oss), quando utilizados em conjunto, o uso do Bio-Oss sozinho obteve formação óssea significativamente maior que com a associação da rhBMP-2 (24,85% +- 5,82% e 16,04% +- 7,45% respectivamente).

Nos últimos três anos, foram publicados alguns relatos de casos clínicos bem sucedidos, utilizando indicações não prescritas pelo fabricante da rhBMP-2, em que os autores mostram os resultados da utilização da rhBMP-2 em várias indicações clínicas, desde pequeno preenchimento do seio maxilar e alveolar até grandes reconstruções de maxila e mandíbula. Nas pequenas reconstruções, a rhBMP-2/ACS foi utilizada sozinha ou associada a um substituto ósseo como o DFDBA. Na reconstrução da maxila e mandíbula atrófica foi idealizada uma moldeira feita de malha de titânio utilizada como contenção do conjunto rhBMP-2/ACS, associada à osso alógeno particulado ou osso bovino granulado. Moldeiras de titânio foram estabilizadas com mini parafusos. Após o tempo de reparação os implantes foram instalados em todos os pacientes sem necessidade de enxertos complementares (Misch, 2011; Spagnoli; Marx, 2011; Zétola et al., 2011; Hart; Bowles, 2012; Herford et al., 2013).

Com essa série de casos os autores relataram a facilidade e a viabilidade das técnicas que podem ser utilizadas em tempo cirúrgico reduzido e com mínimo trauma, demonstrando a aplicabilidade clínica de complexos estudos de engenharia tecidual também denominada “pesquisa translacional”.

2.4 Microtomografia Computadorizada Tridimensional - Micro-TC 3D - μ TC

As microtomografias permitem uma análise não destrutiva de espécimes ósseos, semelhantes à tomografia computadorizada, porém com alta resolução. Além disso, tem a vantagem de permitir a análise completa da total sequência de cortes de uma amostra, permitindo assim, um estudo morfométrico completo do osso neoformado (Draenert et al., 2012).

Feldkamp et al. (1989) foram responsáveis pelo estudo pioneiro nesse campo, por utilizarem um sistema microtomográfico baseado em um feixe cônico de raios-x para criar objetos 3D com uma resolução de 50 a 70 μ m. O feixe cônico é utilizado em microtomógrafos de raios-x disponíveis comercialmente.

Para as aplicações em engenharia tecidual óssea, as imagens de μ TC fornecem ferramenta eficiente, rápida e conservadora para mensurar quantitativamente a taxa e a distribuição de formação de matriz mineralizada por meio de construções 3D (Oliveira et al., 2007).

A micro-TC também é considerada uma ferramenta conveniente para avaliar a microarquitetura óssea em regeneração óssea intramembranosa, pois estudo de Yeom et al. (2008) mostrou que existe forte correlação entre o parâmetro BV/TV histomorfométrico e o mesmo parâmetro em 2D ou 3D da μ TC.

Além da determinação de parâmetros quantitativos, presentes também na histomorfometria, a μ TC permite a avaliação da microarquitetura óssea, por meio de parâmetros qualitativos além de possibilitar a visualização por meio dos modelos 3D.

- **Parâmetros Morfométricos 3D**

Todos os cálculos são realizados em relação a uma região selecionada da amostra. A seleção consistente e acurada das regiões ou volumes de interesse é de importância fundamental para a obtenção de dados significativos e precisos. O termo região de interesse (ROI), refere-se a uma região selecionada da imagem 2D de uma secção transversal. O volume de interesse (VOI) refere-se a soma coletiva de todos ROIs de uma série contínua de secções transversais do objeto escaneado.

As análises morfométricas 3D são realizadas em um Volume de Interesse (VOI) (CT-Analyser manual, 2010).

Os principais índices morfométricos utilizados são:

Volume de Tecido - TV (mm^3) - refere-se ao volume total do volume de interesse (VOI), também denominado Volume de Tecido, ou volume da amostra (CT-Analyser manual, 2010).

Volume Ósseo - BV (mm^3) - é o volume ósseo total, ou o volume de objetos binários dentro do volume da região de interesse - VOI (Villanueva-Alcojol et al., 2013).

Percentual de Volume Ósseo dentro do Volume de Tecido - BV/TV (%) - É a porcentagem de volume ósseo (BV) encontrado dentro do volume total da amostra (TV) (Borah et al., 2001).

Fator Padrão do Osso Trabecular - Tb.Pf (mm^{-1}) - o fator padrão do osso trabecular é uma medida de conectividade trabecular. A conectividade trabecular foi definida por Hahn et al. em 1992, a partir de imagens bidimensionais do osso, pelas quais o autor calculava o índice de concavidade e convexidade relativo à superfície óssea, onde a concavidade indicava conectividade, e a convexidade indicava estruturas isoladas e desconectadas. Baixos índices de Tb.Pf indicam melhor conectividade da estrutura trabecular e relacionam-se com a qualidade óssea (CT-Analyser manual, 2010; Monje et al., 2013).

Espessura Trabecular - Tb.Th (mm) - é uma medida estimada da espessura trabecular. Tradicionalmente, Tb.Th é derivada indiretamente do volume e superfície óssea, assumindo-se que a forma da trabécula é achatada ou arredondada. Também descrito como o diâmetro da maior esfera delimitada dentro da superfície sólida (Borah et al., 2001; Marinozzi et al., 2012).

Separação Trabecular - Tb.Sp (mm) - é a medida da distância entre as trabéculas compreendida pelo espaço que contém a medula óssea (CT-Analyser manual, 2010).

Número de Trabéculas - Tb.N (mm^{-1}) - é o número de travessas que cortam uma trabécula ou estrutura sólida por unidade de comprimento determinado espaço linear dentro do volume de interesse (VOI) (Marinozzi et al., 2012; Monje et al., 2013).

Índice de Modelo Estrutural - SMI - o SMI indica a prevalência de trabéculas ósseas em forma de “rods” (cilíndricas) e “plates” (achatadas). Os valores de SMI 0 e 3 correspondem a trabéculas idealmente achatadas (plate) e cilíndricas (rod) respectivamente. Para uma estrutura com trabéculas tanto cilíndrica quanto achatadas de igual volume, o SMI deverá estar entre 0 e 3 (Hildebrand et al., 1999; Villanueva-Alcojol et al., 2013).

Grau de Anisotropia - DA - Isotropia é a medida da simetria 3D ou a presença ou ausência de alinhamento de estruturas ao longo de uma direção axial determinada. Além do percentual de volume ósseo, DA é provavelmente um dos parâmetros mais importantes na determinação da resistência mecânica. O valor é 0 para total isotropia e 1 para total anisotropia (CT-Analyser manual, 2010; Villanueva-Alcojol et al., 2013).

Densidade de Conectividade - ConnD (mm^{-3}) - é o número estimado de conexões trabeculares/ mm^3 . É definida como o número de elementos trabeculares que poderiam ser removidos sem separar a estrutura (Borah et al., 2001).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa é avaliar por meio da histomorfometria e microtomografia computadorizada tridimensional a atuação da rhBMP-2/ACS associada ao β -Fosfato Tricálcio (β - TCP), Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP) e Osso Mineral Bovino (BBM), utilizados como carreadores adicionais em um modelo de crescimento vertical aposicional.

Especificamente pretende-se responder às seguintes questões:

1. A adição da rhBMP-2 aumenta a formação óssea quando associada aos três materiais e ao coágulo?
2. A associação dos materiais testados atuando como carreadores adicionais aumentou a eficiência do conjunto rhBMP-2/ACS?
3. Qual material foi considerado o melhor carreador?
4. A adição de rhBMP-2 afeta a biodegradação dos biomateriais?
5. Existe diferença na arquitetura óssea entre os grupos e entre materiais sob a análise da microtomografia?

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santo Amaro sob parecer nº 094/2009, com registro no β-TCPP N.º 003/09 e realizada mediante os princípios éticos de experimentação animal, elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS), segundo normas internacionais para utilização de animais em pesquisas embasadas na tríade “sensibilidade, bom senso e boa ciência” (ANEXO A).

Foram utilizados 20 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, fêmeas, pesando entre 3,5 a 4 kg e idade entre 11 e 15 meses. Os animais foram inicialmente mantidos em observação por um período de sete dias após a chegada para que fossem descartadas quaisquer alterações no estado geral de saúde e passaram por um período de climatização com ventilação e temperaturas controladas ($22 \pm 2^\circ \text{C}$). Após esse tempo de adaptação permaneceram em local apropriado e foram alimentados com ração Nutríara (Paulínia, São Paulo- Brasil) e água administrada ad libitum. Os coelhos foram divididos experimentalmente em dois grupos de 10 animais cada.

4.1 Anestesia e Preparo dos Animais

Para os dois grupos o procedimento anestésico foi realizado pela equipe veterinária do biotério segundo o seguinte protocolo: Cetamina (Virbac do Brasil, Roseira, SP, Brasil) - 30 mg/kg/IM, Xilasina (Agener União, São Paulo, SP, Brasil) - 5 mg/kg/IM, Meperidina (Cristália, São Paulo, SP, Brasil) - 5 mg/kg/IM.

Os coelhos receberam oxigenoterapia por máscara durante todo procedimento.

4.2 Procedimento Cirúrgico

Após a anestesia e verificação do plano anestésico, a tricotomia foi realizada na área a ser operada (calvária). Por fim, foi realizada antissepsia de campo com auxílio de uma escova embebida em solução degermante de clorexidina a 2% (Rioquímica, São José do Rio Preto- Brasil) sendo delimitada a área a ser operada com campos cirúrgicos estéreis.

Após infiltração anestésica local com anestésico do tipo mepivacaína a 2% com noradrenalina 1:100.000 (Scandicaíne-Septodont- Distribuidora DFL Ind. Com. Ltda - Rio de Janeiro – RJ) a incisão cutânea da região receptora foi realizada na linha sagital, seguida da incisão do periósteo. A exposição dos ossos parietal esquerdo e direito e o frontal foi realizada por meio de divulsão dos tecidos subcutâneos e do periósteo (Figura 4.1a).

No primeiro grupo (G1), foram instaladas na calvária de cada animal quatro cilindros de titânio comercialmente puro da marca Conexão® Sistemas de Prótese Ltda (Arujá, São Paulo, Brasil) medindo 5mm de altura por 5mm de diâmetro interno, contendo uma aleta lateral de 2 mm com dois orifícios para fixação nos ossos cranianos por meio de miniparafusos de titânio de 1,5 x 5 mm da mesma marca. Dispositivos semelhantes foram utilizados por Schmid et al. (1994), Slotte et al. (2003), Slotte et al.(2005) e Pelegri et al. (2010) Esses cilindros foram distribuídos lateralmente à sutura parietal (dois de cada lado) (Figura 4.1b). Após a fixação dos cilindros, foram realizadas pequenas perfurações na cortical óssea com brocas 700 e 701 para ponta reta (Kawo do Brasil) em rotação de 1500 rpm, com a finalidade de promover a nutrição sanguínea para o enxerto, a fim de favorecer a migração de células osteoprogenitoras no local (Figura 4.1c). A área foi abundantemente refrigerada com irrigação à base de soro fisiológico estéril a 0,9%. Em seguida os cilindros foram preenchidos aleatoriamente com os materiais Beta tricálcio fosfato - β -TCP (Cerasorb®, Curasan AG, Alemanha), grânulos de 500 a 1000 μ m, Fosfato de Cálcio Bifásico - BCP (Straumann® BoneCeramic, Institut Straumann AG, Basel, Suíça) grânulos de 500 a 1000 μ m, Osso Mineral Bovino - BBM (Bio-Oss®, Geistlich, Wolhusen, Suíça) grânulos de 250 a 1000 μ m e o quarto cilindro com coágulo sanguíneo (CO) proveniente das perfurações (Figura 4.1d). Após a inserção dos biomateriais e do coágulo, esses cilindros foram vedados por uma tampa rosqueada

externamente de maneira a isolar todo o material dos tecidos adjacentes e manter a imobilidade dos enxertos (Figura 4.1e). A síntese das feridas cirúrgicas foi realizada com fio mononylon 4-0 (Brasuture, São Paulo, Brasil), por meio de sutura contínua (Figura 4.1f).

Figura 4.1 - Exposição do osso parietal e frontal (a). Cilindros fixadas no osso parietal (b). Em detalhe, aspecto visual após decorticalização (c). Inserção dos materiais (d). Fechamento dos cilindros com as tampas (e). Sutura contínua com nylon 4.0 (f)

No segundo grupo (G2), como no Grupo 1 (G1), foram instalados quatro cilindros que receberam a adição da proteína morfogenética óssea recombinante humana 2/ esponja de colágeno absorvível (rhBMP-2/ACS, Infuse® Medtronic, Memphis, EUA), que foi inserida antes dos mesmos biomateriais utilizados no G1, de modo que a solução indutora ficasse em contato direto com a região decorticalizada e com o aporte nutricional de sangue rico em células viáveis para a diferenciação (Figura 4.2 a,b,c). O último cilindro foi preenchido apenas com coágulo e rhBMP-2/ACS.

A rhBMP-2 foi utilizada seguindo rigorosamente as preconizações de uso do fabricante. O conjunto estéril contendo 4,2 mg de rhBMP-2 liofilizada, 2 frascos de 1,6 ml de água destilada e 2 esponjas de colágeno foi dividido em duas porções iguais. Cada esponja foi dividida em 20 pedaços, totalizando 40 pedaços, hidratados na solução da proteína reconstituída. Nos dois grupos foi realizada uma rotação na posição dos materiais na calvária no sentido horário.

Todos os cilindros foram fechados com as respectivas tampas (Figura 4.2d). As suturas foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito para o G1.

Após o procedimento cirúrgico, os coelhos se movimentaram livremente em gaiolas individuais.

4.3 Controle Pós-operatório

Após as cirurgias, os coelhos foram medicados com analgésicos, antibióticos e antiinflamatórios e acompanhados até a sua total recuperação.

A medicação utilizada foi: 1. Antibiótico: Enrofloxacina (Baytril®, Bayer Brasil, São Paulo, SP, Brasil) – 5-10mg/kg SC/7dias; 2. Antiinflamatório: Meloxicam (Maxican®, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) – 0,2mg/kg SC/7dias; 3. Antisséptico: Rifomicina (Rifocina®, Sanofi Aventis, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (spray) duas vezes ao dia.

Os animais foram observados e acompanhados diariamente pelos funcionários do Biotério e monitorados semanalmente pelo pesquisador e pela equipe de veterinários, a fim de atender a qualquer alteração de saúde ou de comportamento dos animais.

Figura 4.2 - Inserção da rhBMP-2/ACS (a). rhBMP-2/ACS em contato com a base da calvária (b). Materiais inseridos acima da rhBMP-2, sendo, da esquerda para a direita no sentido do relógio, BBM (osso mineral bovino), BCP (fosfato de cálcio bifásico), CO (coágulo) e β -TCP (beta tricálcio fosfato) (c). Fechamento com as tampas rosqueáveis (d)

4.4 Eutanásia e Remoção das Amostras

Após 14 semanas os animais dos dois grupos foram submetidos à eutanásia com solução endovenosa de cloreto de potássio a 19,1% sob anestesia geral.

Após os procedimentos de eutanásia, a coleta das amostras foi realizada por brocas trefinas de 8mm (INP, São Paulo, SP, Brasil) contendo o material enxertado e parte do leito receptor (calvária).

4.5 Procedimento Histológico

As amostras foram fixadas em solução tamponada de paraformaldeído a 4% por 48H e encaminhadas para o Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP- São Paulo), para a realização da lavagem na solução tampão. Após esse procedimento, as amostras foram encaminhadas para a análise de micro TC e logo após para o processo desidratação gradual em alcoóis, descalcificação em EDTA a 4,13% e inclusão em parafina (Paraplast®, West Chester, PA, USA).

Posteriormente, foram obtidos seis cortes histológicos de 5 μ seriados de cada espécime, distribuídos em três lâminas com dois cortes em cada uma, corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.) para a análise histomorfométrica.

4.6 Métodos de análise

Com o objetivo de obter um estudo completo dos espécimes ósseos, utilizamos como ferramentas de análise a histomorfometria e a microtomografia 3D.

4.6.1 Estudo histológico e histomorfométrico

Foram realizadas análises histomorfométricas comparativas quanto à quantidade de tecido ósseo formado e remanescentes de materiais não reabsorvidos. Considerando-se que a formação óssea aconteceu de maneira diferente ao longo do cilindro, foram tomadas duas medidas de áreas, sendo uma na região próxima à base da calvária e outra na porção superior da formação óssea, conforme ilustração a seguir (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Esquema ilustrativo das áreas mensuradas pela histometria

A área total de tecido ósseo formado e de material remanescente foi obtida somando-se as áreas das porções superior e da base. Os parâmetros histomorfométricos foram mensurados com aumento original de 25X de maneira a abranger toda a área do cilindro ósseo formado e os parâmetros morfológicos foram observados e analisados com aumento original de 400X e 1000X.

Para a quantificação dos parâmetros histomorfométricos estruturais, de formação do tecido ósseo e reabsorção do material enxertado foram utilizadas imagens de três cortes de cada espécime obtidas das lâminas histológicas, que foram capturadas por câmera tipo CCD (Sony®) acoplada a microscópio Jeol® e placa de digitalização de imagens (Captivator®) e transferidas para software de morfometria digital (ImageJ®). As imagens do campo histológico (aumento original de 25x) foram digitalizadas e analisadas pelo software após serem manualmente identificados e contornados o tecido ósseo formado, as partículas de enxerto e o tecido total formado.

A histometria contemplou os seguintes parâmetros: área de tecido ósseo formado na base ($Ob - mm^2$), área de tecido ósseo formado na porção superior do cilindro ($Os - mm^2$), área total de tecido ósseo formado ($Ob + Os = Ot - mm^2$), área de material remanescente na base ($Mb - mm^2$), área de material remanescente na porção superior ($Ms - mm^2$), área total de material remanescente ($Mb + Ms = Mt - mm^2$) e área total de tecido formado ($AT - mm^2$).

Também foram observados os seguintes parâmetros morfológicos: vascularização, reação a corpo estranho, fibrose, medula óssea gordura, trabéculas neoformadas, conectividade, maturação do tecido e medula óssea hematopoiética.

4.6.2 Estudo pela Micro-TC

Foram selecionados cinco animais de cada grupo, totalizando 20 amostras dos dois Grupos experimentais para a análise de Micro-TC que foi realizada na Universidade Federal de Curitiba, no Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR) do Departamento de Geologia, utilizando-se o microtomógrafo por raio-X de alta resolução Skyscan 1172 (Bélgica).

4.6.2.1 aquisição das imagens

Para a realização do procedimento, as amostras hidratadas foram inseridas em um dispositivo artesanalmente confeccionado com polipropileno (PP) que é material de baixa densidade de modo a não interferir no processo de escaneamento dos espécimes. No processo de aquisição de imagens foram inseridos quatro espécimes ósseos por vez, correspondentes a um animal. As amostras permaneceram hidratadas durante o procedimento e foram separadas verticalmente por esferas de poliestireno expandido (EPS), que também possui baixa densidade (Figura 4.4).

As aquisições de imagem foram obtidas por meio de escaneamento microtomográfico das amostras ósseas seguindo as especificações contidas na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Especificações do Microtomógrafo

Especificações	Unidade	Valor
Voltagem da Fonte de Raio-X	kV	80
Corrente da Fonte de Raio-X	µA	120
Distância da Fonte ao Objeto	mm	73 390
Distância da Fonte ao Detector de Radiação	mm	213 267
Tamanho do Pixel das Secções Transversais	µm	12,07
Resolução das Secções Transversais	pixel	1000 x 1000
Tamanho do Pixel da Câmera	µm	8,77
Resolução Tomográfica	µm	12,08
Filtro de Alumínio	mm	0,5
Passo de Rotação	graus	0,7
Angulo de Rotação	graus	360
Quantidade média de Secções Transversais	-	3500

Em seguida foi feita a reconstrução 3D das amostras pelo software NRecon fornecido pelo fabricante.

Após a reconstrução das imagens, utilizaram-se os softwares CT-Analyser, CT-Vol (Skyscan, Belgica) e InVesalius (CTI, Brasil), cujos dados morfométricos possibilitaram a análise e a interpretação dos resultados além de fornecer imagens e vídeos 3D para comparação da arquitetura óssea resultante dos diversos materiais e do coágulo.

Figura 4.4 - Imagem do porta amostras no interior do equipamento, preparado para a aquisição das imagens (a). Detalhe do dispositivo artesanal utilizado como porta amostras contendo os espécimes hidratados em álcool 70° separados por EPS (b)

4.6.2.2 análise das imagens reconstruídas

Após a reconstrução das imagens, as mesmas foram analisadas utilizando-se os softwares CT-Analyser, CT-Vol (Skyscan, Belgica) e InVesalius (CTI, Brasil), que nos forneceram os dados morfométricos dos seguintes parâmetros: volume ósseo (BV, mm^3), volume total do tecido (TV, mm^3), Percentual de volume ósseo sobre volume total de tecido (BV/TV, %), volume de material remanescente (MV, mm^3), Percentual de volume de material sobre volume total de tecido (MV/TV, %), espessura trabecular (Tb.Th, mm), número de trabéculas (Tb.N, 1/mm), separação de trabéculas (Tb.Sp, mm), fator do padrão trabecular ósseo (Tb.Pf, 1/mm), índice do modelo estrutural (SMI), Densidade da Conectividade (Conn,Dn, $1/\text{mm}^3$) e grau de anisotropia (DA,°) além de fornecer imagens 2D e 3D e vídeos 3D para comparação da arquitetura óssea resultante dos diversos materiais e do coágulo.

Sequência para as análises de dados utilizando-se o CT-An:

1. Abertura do arquivo e visualização 2D da reconstrução microtomográfica das quatro amostras ósseas (Figura 4.5).
2. Separação da região de interesse: a) delimitação dos limites inferior e superior (linhas vermelhas) das secções transversais de cada amostra analisada para determinação do volume de interesse (VOI) do cilindro ósseo (Figuras 4.6 e 4.7); b) Determinação da região de interesse (ROI) de cada secção transversal da VOI do cilindro. Adaptou-se uma forma circular de mesmo diâmetro ósseo que foi aplicado a todas as secções do espaço delimitado pelas linhas vermelhas (Figuras 4.8 e 4.9), correspondente somente ao volume compreendido no cilindro de interesse.
3. Binarização das imagens utilizando-se um limiar dos tons de cinza para determinação do valor médio dos coeficientes de atenuação dos voxels da VOI (Figura 4.10).
5. Definição dos níveis correspondentes às áreas ósseas e aos materiais carreadores. Definiram-se dois tipos de intervalos de valores. Um intervalo correspondente a parte óssea (Figura 4.11), e outro correspondente ao material enxertado (Figura 4.12), sempre mais denso.

Assim, os valores foram definidos manualmente, comparando-se as imagens binárias resultantes da seleção do intervalo, com a imagem original e com as imagens da histologia correspondente à mesma amostra.

Para a parte óssea, tomou-se como referência sempre a amostra contendo apenas coágulo (CO) ou, no grupo G2, coágulo com rhBMP-2 (Figura 4.13). Para o tecido ósseo foi definido o intervalo correspondente à escala de Hounsfield de 1076 a 2347, enquanto que para os materiais enxertados temos:

- BBM: 2426 em diante
- BCP: 2930 em diante
- β -TCP: 2650 em diante

6. Análise morfométrica 3D para a aferição de todos os parâmetros descritos utilizando-se o “plugin” 3D do CT-Analyser para o intervalo

correspondente à parte óssea e novamente para o intervalo correspondente ao material.

Figura 4.5 - Visualização 2D das imagens reconstruídas das amostras

Figura 4.6 - Delimitação do limite superior da amostra

Figura 4.7 - Delimitação do limite inferior da amostra

Figura 4.8 - Determinação da região de interesse (ROI) (vermelho)

Figura 4.9 - Adaptação da região de interesse (ROI) com forma circular de mesmo diâmetro ósseo aplicada a todas as seções do limite delimitado pelas linhas vermelhas

Figura 4.10 - Determinação do valor médio dos coeficientes de atenuação dos voxels da VOI

Figura 4.11 - Determinação do intervalo correspondente a parte óssea. Visualização de amostra de BCP (fosfato de cálcio bifásico)

Figura 4.12 - Determinação do intervalo correspondente ao material carreador BCP (fosfato de cálcio bifásico)

Figura 4.13 - Determinação do intervalo correspondente a parte óssea em uma amostra contendo coágulo (CO)

4.6.3 Análise estatística

A análise estatística está dividida por histomorfometria e microtomografia 3d, para melhor especificar a análise.

4.6.3.1 análise estatística da histomorfometria

A análise dos dados foi realizada em duas etapas: descritiva e inferencial.

Na análise descritiva, foram calculados valores de estatísticas descritivas para as variáveis Ob (mm²), Os (mm²), Ot (mm²), Mb (mm²), Ms (mm²), Mt (mm²) e AT (mm²), sob os materiais BCP, BBM, β -TCP e CO e sob os grupos G1 e G2. As médias das variáveis analisadas por grupo e material, foram representadas graficamente.

Na análise inferencial, foi adotado um modelo de análise de variância em dois fatores (Grupo e Material) com medidas repetidas no fator Material, para o qual supomos que os efeitos dos coelhos (amostras) são aleatórios e os efeitos dos dois grupos e dos quatro materiais são fixos. O uso de um modelo de medidas repetidas para a análise dos dados pode ser justificado ao notarmos que os quatro materiais são avaliados no mesmo coelho (amostra) (Winer et al., 1991; Kutner et al., 2004, por exemplo)

A verificação da adequação do ajuste dos modelos foi realizada por meio da construção de gráficos de probabilidades para os resíduos minimamente confundidos, conforme sugerido em Nobre e Singer (2007). Todos os modelos mostraram-se bem ajustados.

4.6.3.2 análise estatística da microtomografia 3d

A análise dos dados foi realizada em duas etapas: descritiva e inferencial.

Na análise descritiva, foram calculados valores de estatísticas descritivas para as variáveis TV (mm^3), BV (mm^3), BV/TV (%), Tb.Pf (1/mm), SMI, Tb.Th (mm), Tb.N (1/mm), Tb.Sp (mm), DA, Conn,Dn (1/ mm^3), MV (mm^3), MV/TV (%), sob os materiais BCP, BBM, β -TCP e CO e sob os grupos G1 e G2. As médias das variáveis analisadas por grupo e material, foram representadas graficamente.

Na análise inferencial, foi adotado o mesmo modelo utilizado na análise de dados da histomorfometria e, para as comparações múltiplas entre médias, utilizamos o método de Bonferroni (ver Neter et al., 2005, por exemplo) adotando um coeficiente de confiança global igual a 95%.

Todos os modelos mostraram-se bem ajustados.

5 RESULTADOS

Os resultados são apresentados de acordo com as variáveis das respectivas análises descritas na metodologia.

5.1 Resultado Clínico

No pós-operatório de todos os animais não houve intercorrência. Não houve nenhuma deiscência de sutura, nem exposição dos cilindros. Durante o processo de reparação e no momento da eutanásia não foi observado nenhum processo inflamatório ou infeccioso na área enxertada.

O tecido formado reproduziu a forma interna das paredes do cilindro de titânio, em que as amostras do Grupo G1 (Figura 5.1) foram menores e mais irregulares que as do Grupo G2, mais uniformes e lisas (Figura 5.2). A diferença na quantidade de tecido formado, visualizado macroscopicamente, foi evidente e incontestável.

Pudemos observar, no momento de remoção das amostras, a formação de supercrescimento ósseo que se estendeu sobre as abas dos cilindros e em alguns casos sobre as tampas de cobertura. Esse crescimento ósseo exacerbado ocorreu em 4 animais do Grupo G2 (com rhBMP-2), e dificultou muito a remoção e separação das amostras dos cilindros e da base da calvária (Figura 5.3).

Foi observado também um aumento na espessura dessas calotas que receberam adição de rhBMP-2 no espaço compreendido entre os cilindros de titânio. Considerando-se a espessura média da calvária de 2mm, nesses animais a espessura média encontrada na região entre os cilindros foi de 4,5mm (Figura 5.4 a, b).

Em duas peças, pudemos visualizar vasos sanguíneos no corpo do cilindro ósseo, indicando vasta vascularização (Figura 5.4 c, d).

Figura 5.1 - Reabertura após 14 semanas de reparação do Grupo 1 (sem adição de rhBMP-2). Exposição dos cilindros (a). Vista do interior dos cilindros (b). Formação óssea após remoção dos cilindros, detalhe da vascularização (setas) (c). Amostra do Grupo 1 após remoção com trefina, mostrando o tecido formado e base da calvária (d, e)

Figura 5.2 - Reabertura após 14 semanas de reparação do Grupo 2 (com adição de rhBMP-2). Exposição dos cilindros (a). Vista do interior dos cilindros (b). Formação óssea após remoção dos cilindros (c). Amostra do Grupo 2 após remoção com trefina mostrando o tecido formado e base da calvária (d, e)

Figura 5.3 - Supercrescimento ósseo após 14 semanas de reparação em animais do Grupo 2 (com rhBMP-2). Vista externa dos cilindros cobertos de osso (a, b). Imagem da μ TC do supercrescimento com de seromas – setas brancas (c). Animal correspondente à imagem anterior que apresentou a formação óssea mais exuberante (d). Imagem histológica da mesma amostra do Grupo 2, (seroma - seta negra). H.E. - Aumento Original de 400X (e). Fotomicrografia do supercrescimento. H.E. - Aumento Original de 1000X (f). TC = tecido conjuntivo, MO = medula óssea, TO = trabécula óssea

Figura 5.4 - Imagem do aumento de espessura da porção da calvária compreendida entre os cilindros do Grupo 2 (com adição de rhBMP-2) (a). Medição da espessura da calota com paquímetro centesimal (b). Macrofotografia de duas amostras do Grupo 2 mostrando presença de vasos sanguíneos (c, d - setas)

5.2 Histomorfometria

As lâminas foram mensuradas no menor aumento (25X) de modo a conter todo o cilindro ósseo para facilitar a obtenção da área óssea total e a visualização do cilindro em duas partes - Base e Porção Superior (Figuras 5.5 e 5.6).

5.2.1 Descrição Histológica

5.2.1.1 grupo 1 – sem adição de rhBMP-2

Observando as lâminas coradas por hematoxilina e eosina em aumento original de 400x (Figura 5.7 a, b, c, d), visualizamos nesse grupo predominância de trabéculas ósseas com lacunas esparsas, contendo osteócitos em seu interior, sugerindo tecido ósseo maduro na porção inferior, próximo da base da calvária e lateralmente, acompanhando as paredes do cilindro de titânio. Trabéculas ósseas com grande quantidade de lacunas e abundante quantidade de osteócitos, apresentando uma matriz orgânica mais basofílica foi visualizado na porção mais superior da formação óssea, sugerindo presença de tecido ósseo imaturo. Nesse grupo, a formação óssea em altura, em geral, não ultrapassou dois terços da altura do cilindro de titânio. Foram observadas grandes quantidades de material remanescente nas amostras com o fosfato de cálcio bifásico (BCP), β -Fosfato Tricálcio (β -TCP) e Osso Mineral Bovino (BBM).

Todos os materiais desse grupo mostraram semelhantes resultados na análise histomorfológica e apresentaram moderada vascularização, pouca presença de medula óssea gordurosa e fibrose, pouca quantidade de trabéculas e medula óssea hematopoiética, baixa conectividade trabecular, baixo índice de maturação do tecido ósseo. O único material que apresentou reação a corpo estranho foi o Osso Mineral Bovino (BBM).

5.2.1.2 grupo 2 – com adição de rhBMP-2

Em aumento original de 400x (Figura 5.7 e, f, g, h), visualizamos nesse grupo predominância de trabéculas ósseas com lacunas esparsas, contendo osteócitos em seu interior, sugerindo tecido ósseo maduro na porção inferior e superior do cilindro, desde a base da calvária até a parte superior, acompanhando as paredes do cilindro de titânio. Nesse grupo, a formação óssea em altura, em geral, chegou até o ápice

do cilindro de titânio. Apenas o fosfato de cálcio bifásico (BCP) mostrou grandes quantidades de material remanescente. O aumento da vascularização foi visualizado nas lâminas de β -Fosfato Tricálcio (β -TCP). Todos os materiais e o coágulo aumentaram o número de trabéculas e a quantidade de medula óssea hematopoiética e diminuíram a quantidade de fibrose. O Osso Mineral Bovino apresentou menos reação a corpo estranho com a adição a rhBMP-2 e o Coágulo mostrou menor conectividade.

Figura 5.5 - Amostras do Grupo 1 (sem rhBMP-2). Coágulo (CO) (a). Beta Tricálcio Fosfato (β -TCP). Observamos pequenos pontos brancos em que estava presente o material β -TCP (b). Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP). Aqui observamos lacunas de formato irregular deixadas pelo BCP (c). Osso Mineral Bovino (BBM). As partículas remanescentes do BBM aparecem mais coradas e sem osteócitos (lacunas vazias) (d). As setas indicam os materiais remanescentes. H.E. Aumento original de 25X

Figura 5.6 - Amostras do Grupo 2 (com rhBMP-2). Coágulo (CO) (a). Beta Tricálcio Fosfato (β -TCP). quase não se nota material remanescente (b). Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP). Aqui observamos lacunas de formato irregular deixadas pelo BCP (c). Osso Mineral Bovino (BBM). Também observamos pouco material remanescente (d). As setas indicam os materiais remanescentes. H.E. Aumento original de 25X

Figura 5.7 - Amostras do Grupo 1 (sem rhBMP-2): Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP) (a), Beta Tricálcio Fosfato (β -TCP) (b). Osso Mineral Bovino (BBM) (c), Coágulo (CO) (d). Amostras do Grupo 2 (com rhBMP-2): Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP) (e), Beta Tricálcio Fosfato (β -TCP) (f). Osso Mineral Bovino (BBM) (g), Coágulo (CO) (h). H.E. Aumento original de 400X. M= material, TO= trabécula ósea, Oc= osteoclasto, TC= Tecido conjuntivo, On= Osteon, Ad= células adiposas, M = material

5.2.2 Histometria

A seguir são apresentadas as áreas ósseas e de material remanescente calculadas para todos os materiais e coágulo nos dois grupos experimentais.

5.2.2.1 variável Ob (mm²) - tecido ósseo formado na base da calvária

A tabela 5.1 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável Ob (mm²), sob cada material e grupo. A figura 5.8 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.1 - Estatísticas descritivas para a variável Ob (mm²)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	8	2,419 ±	1,305	3,792 ±	1,150
BBM	8	2,182 ±	1,535	2,340 ±	0,680
β-TCP	8	2,220 ±	1,156	3,311 ±	1,076
CO	8	2,198 ±	1,009	1,756 ±	0,663

Figura 5.8 - Média da variável Ob (mm²) por material e grupo

No grupo G1 (sem rhBMP-2), não há evidência estatística de que a média da variável Ob difira entre os quatro materiais. No grupo G2 (com rhBMP-2), a média da variável Ob, sob o material BCP, é maior do que sob o material BBM ($P = 0,004$) e de que sob o material CO ($p < 0,001$). Além disso, a média da variável Ob sob o material β -TCP é maior do que sob o material CO ($P = 0,002$). Para os demais pares de materiais, não há evidência de diferença entre as médias da variável Ob (Tabela 5.2). Apenas para o material BCP, há diferença entre as médias da variável Ob sob os grupos G1 e G2, sendo que a média é maior no grupo G2 ($P = 0,017$) (Tabela 5.3).

Tabela 5.2 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Ob (mm^2) sob os diferentes pares de materiais, por grupo

Grupo	Diferença de médias	Valor P
G1	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,624
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,681
	Média _{BCP} - Média _{CO}	0,648
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,937
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,974
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	0,964
G2	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,004
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,322
	Média _{BCP} - Média _{CO}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,051
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,231
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	0,002

Tabela 5.3 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Ob (mm²) sob os dois grupos, para cada material

Material	Diferença de médias	Valor <i>P</i>
BCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,017
BBM	Média _{G2} – Média _{G1}	0,776
β-TCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,055
CO	Média _{G2} – Média _{G1}	0,428

5.2.2.2 variável Os (mm²) - tecido ósseo formado na porção superior

A tabela 5.4 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável Os (mm²), sob cada material e grupo. A figura 5.9 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.4 - Estatísticas descritivas para a variável Os (mm²)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	8	0,358 ±	0,521	2,047 ±	1,052
BBM	8	0,218 ±	0,369	1,197 ±	0,655
β-TCP	8	0,269 ±	0,237	2,028 ±	0,720
CO	8	0,196 ±	0,436	0,840 ±	0,508

Figura 5.9 - Média da variável Os (mm²) por material e grupo

Há evidência de que no grupo G2 a média da variável Os é maior do que no grupo G1 para todos os materiais (Tabela 5.5).

No grupo G1, não há evidência estatística de que a média da variável Os difira entre os quatro materiais. No grupo G2, não há evidência de diferença entre as médias da variável Os, sob os materiais BCP e β -TCP ($P = 0,943$) nem sob os materiais BBM e CO ($P = 0,184$). Assim, a média da variável Os obedece a seguinte relação: BCP = β -TCP > BBM = CO (Tabela 5.6).

Tabela 5.5 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Os (mm²) sob os dois grupos, para cada material

Material	Diferença de médias	Valor P
BCP	Média _{G2} – Média _{G1}	<0,001
BBM	Média _{G2} – Média _{G1}	0,002
β -TCP	Média _{G2} – Média _{G1}	<0,001
CO	Média _{G2} – Média _{G1}	0,040

Tabela 5.6 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Os (mm^2) sob os diferentes pares de materiais, por grupo

Grupo	Diferença de médias	Valor P
G1	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,599
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,738
	Média _{BCP} - Média _{CO}	0,543
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,847
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,934
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	0,784
G2	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,003
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,943
	Média _{BCP} - Média _{CO}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,003
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,184
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001

Em relação à área de tecido ósseo formado, podemos concluir que não há evidência de efeito de interação entre Local e Grupo ($P = 0,052$), Local e Material ($P = 0,414$) e Local, Grupo e Material ($P = 0,563$). Assim o comportamento da média da variável Formação óssea sob os quatro materiais é o mesmo para cada grupo e é o mesmo sob os dois grupos para cada material. Logo, compararamos as médias da variável Formação óssea, sob a base e a porção superior (os resultados valem para os dois grupos e os quatro materiais). Pela tabela 5.7, observa-se que há evidência de que a média da variável Formação óssea é maior na Base ($P < 0,001$).

Tabela 5.7 - Valor P do teste t-Student para a diferença entre as médias da variável Formação óssea (mm^2) sob os dois locais (válido os dois grupos e todos os materiais)

Diferença de médias	Valor P
Média _{Base} – Média _{Superior}	<0,001

5.2.2.3 variável Ot (mm²) - tecido ósseo total formado no cilindro

Essa variável foi calculada somando-se a área do tecido ósseo formado na base com a área do tecido ósseo formado na porção superior do cilindro ósseo.

A tabela 5.8 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável Ot (mm²), sob cada material e grupo. A figura 5.10 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.8 - Estatísticas descritivas para a variável Ot (mm²)

Material	No. de amostras	G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	8	2,777 ±	1,737	5,885 ±	2,186
BBM	8	2,399 ±	1,813	3,537 ±	1,043
β-TCP	8	2,489 ±	1,267	5,339 ±	1,632
CO	8	2,394 ±	1,068	2,589 ±	1,130

Figura 5.10 - Média da variável Ot (mm²) por material e grupo

Para os materiais BCP e β-TCP, há evidência de que no grupo G2 a média da variável Ot é maior do que no grupo G1 (valores P < 0,001 para ambos). Já para os materiais BBM e CO, não há evidência de diferença entre as médias da variável Ot, sob os grupos G1 e G2 (Tabela 5.9). No grupo G1, não há evidência estatística de que a média da variável Ot difira entre os quatro materiais. No grupo G2, não há

evidência de diferença entre as médias da variável Ot, sob os materiais BCP e β -TCP ($P = 0,423$), nem sob os materiais BBM e CO ($P = 0,167$). Assim, a média da variável Ot obedece à seguinte relação: $BCP = \beta\text{-TCP} > BBM = CO$ (Tabela 5.10).

Tabela 5.9 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Ot (mm^2) sob os dois grupos, para cada material

Material	Diferença de médias	Valor P
BCP	Média _{G2} – Média _{G1}	<0,001
BBM	Média _{G2} – Média _{G1}	0,145
β -TCP	Média _{G2} – Média _{G1}	<0,001
CO	Média _{G2} – Média _{G1}	0,801

Tabela 5.10 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Ot (mm^2) sob os diferentes pares de materiais, por grupo

Grupo	Diferença de médias	Valor P
G1	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,578
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,672
	Média _{BCP} - Média _{CO}	0,573
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,894
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,994
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	0,889
G2	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,001
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,423
	Média _{BCP} - Média _{CO}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,010
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,167
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001

5.2.2.4 variável Mb (mm²) – material remanescente na base da calvária

A tabela 5.11 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável Mb (mm²), sob cada material e grupo. A figura 5.11 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.11 - Estatísticas descritivas para a variável Mb (mm²)

Material	No. de amostras	G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	8	2,869 ±	0,867	2,043 ±	0,417
BBM	8	1,935 ±	0,969	0,439 ±	0,432
β-TCP	8	1,749 ±	0,403	0,536 ±	0,234

Figura 5.11 - Média da variável Mb (mm²) por material e grupo

Há evidência de que no grupo G2 a média da variável Mb é menor do que no grupo G1 para todos os materiais (Tabela 5.12). Não há evidência estatística de que a média da variável Mb difira entre os materiais BBM e β-TCP ($P = 0,841$). Além disso, a média da variável Mb obedece à seguinte relação: $BCP > BBM = \beta\text{-TCP}$ (Tabela 5.13).

Tabela 5.12 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Mb (mm²) entre os dois grupos

Diferença de médias	Valor P
Média _{G1} – Média _{G2}	<0,001

Tabela 5.13 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Mb (mm²) sob os diferentes pares de materiais

Diferença de médias	Valor P
Média _{BCP} – Média _{BBM}	<0,001
Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	<0,001
Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,841

5.2.2.5 variável Ms (mm²) - material remanescente na porção superior

A tabela 5.14 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável Ms (mm²), sob cada material e grupo. A figura 5.12 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.14 - Estatísticas descritivas para a variável Ms (mm²)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	8	1,597 ±	0,913	1,365 ±	0,597
BBM	8	1,181 ±	0,985	0,632 ±	0,347
β-TCP	8	1,064 ±	0,976	0,746 ±	0,239

Figura 5.12 - Média da variável Ms (mm²) por material e grupo

Não há evidência de efeito de Grupo (valor $P = 0,188$), ou seja, a média da variável Ms não difere entre os grupos G1 e G2 (Tabela 5.15).

Pela tabela 5.16, observa-se que não há evidência estatística de que a média da variável Ms difira entre os materiais BBM e β -TCP ($P = 0,996$). Além disso, a média da variável Mb obedece à seguinte relação: $BCP > BBM = \beta$ -TCP.

Tabela 5.15 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Ms (mm²) entre os dois grupos

Diferença de médias	Valor P
Média _{G1} – Média _{G2}	0,188

Tabela 5.16 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Ms (mm²) sob os diferentes pares de materiais

Diferença de médias	Valor P
Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,016
Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,016
Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,996

Em relação ao material remanescente (mm²), podemos concluir que há evidência de efeito de interação entre Local e Grupo ($P = 0,039$) e entre Local e Material ($P = 0,036$), mas não há efeito de interação entre Local, Grupo e Material (P

= 0,821). Assim podemos supor que os perfis de médias sob a base e a porção superior não têm o mesmo comportamento nos dois grupos e podem não ter o mesmo comportamento sob os três materiais. Logo, compararamos as médias da variável Formação óssea, sob os dois locais, em cada grupo e para os três materiais. Pela tabela 5.17, observa-se que no grupo G1, há evidência de que a média da variável Quantidade de material remanescente é maior na Base ($P < 0,001$), para os três materiais. Já, para o grupo G2, a tabela 5.18 mostra que não há evidência estatística de que a média da variável Quantidade de material remanescente difira entre a Base e o local Superior para os materiais BBM e β -TCP. Já, sob o material BCP, a média da variável Quantidade de material remanescente é maior na Base ($P < 0,001$).

Tabela 5.17. Valor P do teste t-Student para a diferença entre as médias da variável Formação óssea (mm^2) sob os dois locais (válido os dois grupos e todos os materiais)

Diferença de médias	Valor P
$\text{Média}_{\text{Base}} - \text{Média}_{\text{Superior}}$	<0,001

Tabela 5.18. Valor P do teste F-Snedecor para a diferença entre as médias da variável Quantidade de material remanescente (mm^2) sob os dois locais, para o grupo G1 (válido para todos os materiais)

Grupo	Diferença de Médias	Valor P
G1	$\text{Média}_{\text{Base}} - \text{Média}_{\text{Superior}}$	0,001

5.2.2.6 variável Mt (mm^2) - material remanescente total

A tabela 5.19 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável Mt (mm^2), sob cada material e grupo. A figura 26 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.19 - Estatísticas descritivas para a variável Mt (mm²)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	8	4,466 ±	0,574	3,378 ±	0,663
BBM	8	3,116 ±	1,360	1,071 ±	0,678
β-TCP	8	2,812 ±	1,362	1,281 ±	0,423

Figura 5.13 - Média da variável Mt (mm²) por material e grupo

Observa-se que há evidência de que no grupo G2 a média da variável Mt é menor do que no grupo G1 para todos os materiais (Tabela 5.20). Não há evidência estatística de que a média da variável Mt difira entre os materiais BBM e β-TCP ($P = 0,889$). Além disso, a média da variável Mt obedece à seguinte relação: $BCP > BBM = \beta\text{-TCP}$ (Tabela 5.21). Essa observação é válida para os dois grupos.

Tabela 5.20 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de média da variável variável Mt (mm²) entre os dois grupos

Diferença de médias	Valor P
Média _{G1} – Média _{G2}	< 0,001

Tabela 5.21 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Mt (mm²) sob os diferentes pares de materiais

Diferença de médias	Valor P
Média _{BCP} – Média _{BBM}	<0,001
Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	<0,001
Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,889

5.2.2.7 variável AT (mm²) - área total do tecido formado

A área total foi calculada contornando-se todo o tecido formado dentro do cilindro, o que inclui tecido ósseo, material remanescente, tecido conjuntivo e medula óssea. Considerando que a área total do cilindro de titânio é 25 mm² (A= altura X diâmetro, para altura = 5mm, diâmetro = 5mm)

A tabela 5.22 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável AT (mm²), sob cada material e grupo. A figura 5.14 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.22 - Estatísticas descritivas para a variável AT (mm²)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	8	14,709 ±	1,641	18,231 ±	2,760
BBM	8	13,654 ±	2,786	17,236 ±	2,361
β-TCP	8	12,976 ±	2,166	17,672 ±	1,250
CO	8	9,080 ±	3,770	13,180 ±	5,890

Figura 5.14 - Média da variável AT (mm²) por material e grupo

Podemos observar que há evidência de que no grupo G2 a média da variável AT é maior do que no grupo G1 ($p < 0,001$) (Tabela 5.23). Não há evidência estatística de que a média da variável AT difira entre os materiais BCP, BBM e β -TCP. Além disso, a média da variável AT obedece à seguinte relação: BCP = BBM = β -TCP > CO (Tabela 5.24).

Tabela 5.23 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável AT (mm²) entre os dois grupos

Diferença de médias	Valor <i>P</i>
Média _{G1} – Média _{G2}	< 0,001

Tabela 5.24 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável AT (mm²) sob os diferentes pares de materiais

Diferença de médias	Valor P
Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,340
Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,287
Média _{BCP} - Média _{CO}	<0,001
Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,910
Média _{BBM} – Média _{CO}	<0,001
Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001

5.3 Microtomografia Computadorizada

A seguir são apresentadas os volumes ósseos e de material remanescente calculados para todos os materiais e coágulo nos dois grupos experimentais e os parâmetros qualitativos referentes à microarquitetura óssea.

5.3.1 Visualização 2D do cilindro ósseo

O software Dataviewer foi utilizado para a visualização 2D das reconstruções microtomográficas dos cilindros ósseos contendo o material remanescente e dos cilindros ósseos preenchidos pelo coágulo. Nessas imagens, ainda não estava definido o ROI (região de interesse), portanto foi possível a visualização da base da calvária e uma visão completa do cilindro de tecido formado, do tecido ósseo e material remanescente (Figura 5.15).

Figura 5.15 - Imagem 2D de amostras do Grupo 1 (sem rhBMP-2) (a, b) e de amostras do Grupo 2 (com rhBMP-2) (c, d), visualizando-se tecido formado e base da calvária

5.3.2 Visualização 3D do cilindro ósseo

Para a visualização 3D das reconstruções microtomográficas dos cilindros ósseos contendo o material remanescente e dos cilindros ósseos preenchidos por coágulo, foi utilizado o software CT-Analyser e CT-Vol. Por meio dessas imagens, foi possível analisar e comparar parâmetros estruturais e de arquitetura óssea dos dois grupos e entre os materiais e o coágulo.

Nos cortes axiais e longitudinais das amostras contendo apenas coágulo, ou coágulo acrescido de rhBMP-2/ACS pudemos observar uma formação óssea de forma mais concêntrica, com trabéculas mais paralelas comparando-se com as demais amostras com quaisquer dos materiais utilizados (Figuras 5.16 a 5.18). Observamos também, por meio dessas imagens, a diferença na quantidade de material remanescente entre os três materiais e entre as duas porções do cilindro

(visto nos cortes longitudinais) (Figuras 5.19 a 5.27). As imagens a seguir são mais bem visualizadas com óculos 3D.

Figura 5.16 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras de coágulo (CO) de animais do Grupo 1 (sem rhBMP-2). Cortes axiais (A1, A2, A3) e longitudinais (B1, B2, B3)

Figura 5.17 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras de coágulo (CO) de animais o Grupo 2 (com rhBMP-2). Cortes axiais (a1, a2, a3) e longitudinais (b1, b2, 3)

Figura 5.18 - Imagens microtomográficas 3D de amostras de coágulo (CO) de animais do Grupo 1 (C1, C2, C3) e do Grupo 2 (c1, c2, c3) mostrando todo o volume ósseo do cilindro

Figura 5.19 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo fosfato de cálcio bifásico (BCP) de animais do Grupo 1 (sem rhBMP-2). Cortes axiais (A1, A2, A3) e longitudinais (B1, B2, B3). Visualização das partículas de BCP na cor azul

Figura 5.20 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo fosfato de cálcio bifásico (BCP) de animais do Grupo 2 (sem rhBMP-2). Cortes axiais (a1, a2, a3) e longitudinais (b1, b2, b3). Visualização das partículas de BCP na cor azul

Figura 5.21 - Imagens microtomográficas 3D de amostras contendo fosfato de cálcio bifásico (BCP) de animais do Grupo 1 (C1, C2, C3) e do Grupo 2 (c1, c2, c3) mostrando todo o volume ósseo do cilindro e material remanescente de BCP visualizado por transparência na cor azul

Figura 5.22 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo beta tricálcio fosfato (β -TCP) de animais do Grupo 1 (sem rhBMP-2). Cortes axiais (A1, A2, A3) e longitudinais (B1, B2, B3). Visualização das partículas de β -TCP na cor amarela

Figura - 5.23 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo beta tricálcio fosfato (β -TCP) de animais do Grupo 2 (com rhBMP-2). Cortes axiais (a1, a2, a3) e longitudinais (b1, b2, b3). Visualização das partículas de β -TCP na cor amarela

Figura 5.24 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo beta tricálcio fosfato (β -TCP) de animais do Grupo 1 (C1, C2, C3) e do Grupo 2 (c1, c2, c3) mostrando todo o volume ósseo do cilindro e material remanescente de β -TCP visualizado por transparência na cor amarela

Figura 5.25 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo osso mineral bovino (BBM) de animais do Grupo 1 (sem rhBMP-2). Cortes axiais (A1, A2, A3) e longitudinais (B1, B2, B3). Visualização das partículas de BBM na cor branca

Figura 5.26 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo osso mineral bovino (BBM) de animais do Grupo 2 (com rhBMP-2). Cortes axiais (a1, a2, a3) e longitudinais (b1, b2, b3). Visualização das partículas de BBM na cor branca

Figura 5.27 - Imagens microtomográficas 3D de três amostras contendo osso mineral bovino (BBM) de animais do Grupo 1 (C1, C2, C3) e do Grupo 2 (c1, c2, c3) mostrando todo o volume ósseo do cilindro e material remanescente de BBM visualizado por transparência na cor branca

5.3.3 Análise Morfométrica

Foram analisados os principais parâmetros da micro-TC utilizados em estudos de tecido ósseo.

5.3.3.1 variável TV (mm³) - volume total de tecido formado

A tabela 5.25 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável TV (mm³) sob cada material e grupo. A figura 5.28 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo. Considerando que o volume total do cilindro de titânio é 98,17mm³ ($V = \pi \cdot r^2 \cdot h$, para $r = 2,5\text{mm}$, $h = 5,0\text{ mm}$ e $\pi = 3,1416$).

Tabela 5.25 - Estatísticas descritivas para a variável TV (mm³)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	5	65,17 ±	11,29	80,63 ±	13,31
BBM	5	62,93 ±	16,67	84,57 ±	6,28
β-TCP	5	68,16 ±	10,83	81,01 ±	11,03
CO	5	34,11 ±	18,44	57,39 ±	17,82

Figura 5.28 - Média da variável TV (mm³) por material e grupo

Há evidência de que, no grupo G2 a média da variável TV é maior do que no grupo G1, para todos os materiais ($p < 0,001$) (Tabela 5.26). Percebe-se também que há evidência estatística de que a média da variável TV difira apenas entre os materiais β -TCP e CO ($P = 0,010$), sendo maior sob o material β -TCP (Tabela 5.27). Esse resultado se aplica aos dois grupos.

Tabela 5.26 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável TV (mm³) entre os dois grupos

Diferença de médias	Valor <i>P</i>
Média _{G2} – Média _{G1}	<0,001

Tabela 5.27 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável TV (mm²) sob os diferentes pares de materiais

Diferença de médias	Valor <i>P</i>
Média _{BCP} – Média _{BBM}	>0,999
Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	>0,999
Média _{BCP} - Média _{CO}	0,051
Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	>0,999
Média _{BBM} – Média _{CO}	0,065
Média _{β-TCP} – Média _{CO}	0,010

5.3.3.2 variável BV (mm^3) - volume ósseo total formado

A tabela 5.28 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável BV (mm^3), sob cada material e grupo. A figura 5.29 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.28 - Estatísticas descritivas para a variável BV (mm^3)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média $\pm$	DP	Média $\pm$	DP
BCP	5	16,33 $\pm$	4,42	26,01 $\pm$	7,24
BBM	5	13,42 $\pm$	3,44	15,31 $\pm$	2,53
β -TCP	5	16,93 $\pm$	2,55	23,28 $\pm$	5,16
CO	5	7,47 $\pm$	4,32	8,58 $\pm$	2,63

Figura 5.29 - Média da variável BV (mm^3) por material e grupo

Para os materiais BCP e β -TCP, a média é maior no grupo G2 (Tabela 5.29, Figura 5.29). Já para os materiais BBM e CO, não há diferença entre as médias da variável BV nos grupos G1 e G2. No grupo G1, não há evidência estatística de que a

média da variável BV difira entre os materiais BCP, BBM e β -TCP. Além disso, a média da variável BV para esse grupo obedece à seguinte ordem: BCP = BBM = β -TCP > CO ($P < 0,05$ para as desigualdades). No grupo G2, não há evidência estatística de que a média da variável BV difira entre os materiais BCP e β -TCP ($P = 0,325$). Além disso, a média da variável BV obedece a seguinte ordem: BCP = β -TCP > BBM > CO ($P < 0,05$ para as desigualdades) (Tabela 5.30).

Tabela 5.29- Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável BV (mm^3) entre os dois grupos, para cada material

Material	Diferença de médias	Valor P
BCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,001
BBM	Média _{G2} – Média _{G1}	0,493
β -TCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,026
CO	Média _{G2} – Média _{G1}	0,687

Tabela 5.30- Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável BV(mm^3) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo

Grupo	Diferença de médias	Valor P
G1	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,294
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,827
	Média _{BCP} - Média _{CO}	0,003
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,208
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,037
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	0,002
G2	Média _{BCP} – Média _{BBM}	<0,001
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,325
	Média _{BCP} - Média _{CO}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,006
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,019
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001

5.3.3.3 variável BV/TV (%) - percentual de volume ósseo por tecido total formado

A tabela 5.31 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável BV/TV (%) sob cada material e grupo. A figura 5.30 mostra o comportamento da média amostral dessa variável, sob cada material e grupo.

Tabela 5.31 - Estatísticas descritivas para a variável BV/TV (%)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	5	25,32 ±	5,93	31,85 ±	5,12
BBM	5	22,59 ±	8,07	18,04 ±	2,16
β-TCP	5	25,15 ±	4,68	28,71 ±	4,64
CO	5	22,33 ±	3,55	15,26 ±	2,89

Figura 5.30 - Média da variável BV/TV (%) por material e grupo

Para os materiais BBM e β-TCP, não há diferença entre as médias da variável BV/TV entre os grupos G1 e G2. Para o material BCP, a média é maior no grupo G2 ($P = 0,048$). Para o material CO, a média é maior no grupo G1 ($P = 0,033$) (Tabela 5.32). No grupo G1, não há evidência estatística de que a média da variável BV/TV difira entre os quatro materiais. No grupo G2, não há evidência estatística de que a

média da variável BV/TV difira entre os materiais BCP e β -TCP ($P = 0,226$) e entre os materiais BBM e CO ($P = 0,282$). Além disso, a média da variável BV/TV para esse grupo obedece à seguinte ordem: BCP = β -TCP > BBM = CO (Tabela 5.33).

Tabela 5.32 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável V/TV (%) entre os dois grupos, para cada material

Material	Diferença de médias	Valor <i>P</i>
BCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,048
BBM	Média _{G2} – Média _{G1}	0,159
β -TCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,267
CO	Média _{G2} – Média _{G1}	0,033

Tabela 5.33 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável BV/TV (%) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo

Grupo	Diferença de médias	Valor <i>P</i>
G1	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,291
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,947
	Média _{BCP} - Média _{CO}	0,249
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,321
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,919
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	0,276
G2	Média _{BCP} – Média _{BBM}	<0,001
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,226
	Média _{BCP} - Média _{CO}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,282
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001

5.3.3.4 variável Tb.Pf (1/mm) - fator de padrão trabecular

A tabela 5.34 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável Tb.Pf (1/mm) sob cada material e grupo. A figura 5.31 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.34 - Estatísticas descritivas para a variável Tb.Pf (1/mm)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	5	-14,53 ±	0,90	-9,45 ±	4,77
BBM	5	-10,41 ±	7,35	5,64 ±	1,12
β-TCP	5	-17,48 ±	1,92	-7,65 ±	2,09
CO	5	3,12 ±	4,90	10,03 ±	2,02

Figura 5.31 - Média da variável Tb.Pf (1/mm) por material e grupo

Apenas para o material BCP, não há evidência de diferença entre as médias da variável Tb.Pf sob os grupos G1 e G2 ($P = 0,052$). Para os materiais BBM, β-TCP e CO, a média é maior no grupo G2 (Tabela 5.35). No grupo G1, não há evidência estatística de que a média da variável Tb.Pf difira entre os materiais BCP e BBM (P

= 0,096) e entre os materiais BCP e β -TCP ($P = 0,227$). Assim: $BCP < CO$ e β -TCP $< BBM < CO$. No grupo G2, não há diferença estatística na variável Tb.Pf entre os materiais BCP e β -TCP ($P = 0,457$) e entre os materiais BBM e CO ($P = 0,077$). Assim: $BCP = \beta$ -TCP $< BBM = CO$ (valores $P < 0,05$ para as desigualdades) (Tabela 5.36).

Tabela 5.35 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Pf (1/mm) entre os dois grupos, para cada material

Material	Diferença de médias	Valor P
BCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,052
BBM	Média _{G2} – Média _{G1}	<0,001
β -TCP	Média _{G2} – Média _{G1}	<0,001
CO	Média _{G2} – Média _{G1}	0,007

Tabela 5.36 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Pf (1/mm) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo

Grupo	Diferença de médias	Valor P
G1	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,096
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,227
	Média _{BCP} - Média _{CO}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,007
	Média _{BBM} – Média _{CO}	<0,001
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001
G2	Média _{BCP} – Média _{BBM}	<0,001
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,457
	Média _{BCP} - Média _{CO}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,077
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001

5.3.3.5 variável SMI - índice de modelo estrutural

A tabela 5.37 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável SMI sob cada material e grupo. A figura 5.32 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.37 - Estatísticas descritivas para a variável SMI

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	5	0,089 ±	0,359	-0,470 ±	0,402
BBM	5	-0,008 ±	0,723	1,179 ±	0,234
β-TCP	5	-0,157 ±	0,426	-0,434 ±	0,239
CO	5	1,052 ±	0,601	1,660 ±	0,174

Figura 5.32 - Média da variável SMI por material e grupo

Para os materiais BCP e β-TCP, não há evidência de diferença entre as médias da variável SMI sob os grupos G1 e G2. Para os materiais BBM e CO, a média é maior no grupo G2 (valores $P < 0,05$) (Tabela 5.38). No grupo G1, não há

evidência estatística de que a média da variável SMI difira entre os materiais BCP, BBM e β -TCP (valor $P > 0,05$). Assim, a média da variável SMI obedece a seguinte ordem: $BCP = BBM = \beta\text{-TCP} < CO$ (valores $P < 0,05$) para as desigualdades. No grupo G2, não há evidência estatística de que a média da variável SMI difira entre os materiais BCP e β -TCP entre os materiais BBM e CO. Assim, a média da variável SMI obedece à seguinte ordem: $BCP = \beta\text{-TCP} < BBM = CO$ (Tabela 5.39).

Tabela 5.38 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável SMI entre os dois grupos, para cada material

Material	Diferença de médias	Valor P
BCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,051
BBM	Média _{G2} – Média _{G1}	<0,001
β -TCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,321
CO	Média _{G2} – Média _{G1}	0,035

Tabela 5.39 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável SMI dos diferentes pares de materiais, para cada grupo

Grupo	Diferença de médias	Valor P
G1	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,681
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,302
	Média _{BCP} - Média _{CO}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,529
	Média _{BBM} – Média _{CO}	<0,001
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001
G2	Média _{BCP} – Média _{BBM}	<0,001
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,879
	Média _{BCP} - Média _{CO}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,054
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001

5.3.3.6 variável Tb.Th (mm) - espessura de trabéculas

A tabela 5.40 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável Tb.Th (mm) sob cada material e grupo. A figura 5.33 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.40 - Estatísticas descritivas para a variável Tb.Th (mm)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	5	0,101 ±	0,023	0,099 ±	0,009
BBM	5	0,082 ±	0,014	0,108 ±	0,013
β-TCP	5	0,077 ±	0,011	0,108 ±	0,006
CO	5	0,105 ±	0,015	0,104 ±	0,018

Figura 5.33 - Média da variável Tb.Th (mm) por material e grupo

Para os materiais BBM e β-TCP, há evidência de diferença entre as médias da variável Tb.Th sob os grupos G1 e G2 ($P = 0,012$ e $0,004$ respectivamente).

Para esses materiais, a média sob o grupo G2 é maior do que sob o grupo G1 (Tabela 5.41). Pela tabela 5.39, observa-se que, no grupo G1, não há evidência

estatística de que a média da variável Tb.Th difira entre os materiais BCP e CO e entre os materiais BBM e β -TCP. Além disso, a média da variável Tb.Th obedece à seguinte ordem: BCP = CO > BBM = β -TCP. No grupo G2, não há evidência estatística de que a média da variável Tb.Th difira entre os quatro materiais (Tabela 5.42).

Tabela 5.41 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Th (mm) entre os dois grupos, para cada material

Material	Diferença de médias	Valor <i>P</i>
BCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,831
BBM	Média _{G2} – Média _{G1}	0,012
β -TCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,004
CO	Média _{G2} – Média _{G1}	0,915

Tabela 5.42 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Th (mm) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo

Grupo	Diferença de médias	Valor <i>P</i>
G1	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,004
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	<0,001
	Média _{BCP} - Média _{CO}	0,505
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,406
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,001
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001
G2	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,141
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,141
	Média _{BCP} - Média _{CO}	0,406
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	>0,999
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,505
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	0,505

5.3.3.7 variável Tb.N (1/mm) - número de trabéculas

A tabela 5.43 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável Tb.N (1/mm) sob cada material e grupo. A figura 5.34 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.43 - Estatísticas descritivas para a variável Tb.N (1/mm)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	5	2,52 ±	0,30	3,23 ±	0,50
BBM	5	2,77 ±	0,96	1,67 ±	0,16
β-TCP	5	3,29 ±	0,31	2,66 ±	0,39
CO	5	2,15 ±	0,41	1,48 ±	0,19

Figura 5.34 - Média da variável Tb.N (1/mm) por material e grupo

Para todos os materiais, há evidência de diferença entre as médias da variável Tb.N sob os grupos G1 e G2. Para o material BCP, a média é maior no grupo G2. Para os outros três materiais, a média é maior no grupo G1 (Tabela 5.44).

No grupo G1, não há evidência estatística de que a média da variável Tb.N difira entre os materiais BCP e BBM, entre os materiais BCP e CO e entre os materiais BBM e β -TCP. Já a média da variável Tb.N sob o material β -TCP é maior do que sob os materiais BCP e CO ($P < 0,05$). Além disso, a média sob o material BBM é maior do que sob o material CO ($P < 0,05$). No grupo G2, não há evidência estatística de que a média da variável Tb.N difira entre os materiais BCP e β -TCP e entre os materiais BBM e CO ($P > 0,05$). Assim, $BCP = \beta\text{-TCP} > BBM = CO$ ($P < 0,05$ para as desigualdades) (Tabela 5.45).

Tabela 5.44 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.N(1/mm) entre os dois grupos, para cada matéria

Material	Diferença de médias	Valor P
BCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,022
BBM	Média _{G2} – Média _{G1}	0,001
β -TCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,041
CO	Média _{G2} – Média _{G1}	0,030

Tabela 5.45 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.N (1/mm) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo

Grupo	Diferença de médias	Valor P
G1	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,373
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,010
	Média _{BCP} - Média _{CO}	0,191
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,071
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,034
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001
G2	Média _{BCP} – Média _{BBM}	<0,001
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,054
	Média _{BCP} - Média _{CO}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,001
	Média _{BBM} – Média _{CO}	0,498
	Média _{β-TCP} – Média _{CO}	<0,001

5.3.3.8 variável Tb.Sp (mm) - separação de trabéculas

A tabela 5.46 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável Tb.Sp (mm) sob cada material e grupo. A figura 5.35 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.46 - Estatísticas descritivas para a variável Tb.Sp (mm)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	5	0,196 ±	0,011	0,231 ±	0,026
BBM	5	0,297 ±	0,061	0,377 ±	0,024
β-TCP	5	0,222 ±	0,074	0,307 ±	0,067
CO	5	0,349 ±	0,119	0,394 ±	0,043

Figura 5.35 - Média da variável Tb.Sp (mm) por material e grupo

Pela tabela 5.47, pode-se constatar que a diferença entre as médias da variável Tb.Sp sob os grupos G1 e G2 é estatisticamente significativa, isto é, podemos dizer que a média da variável Tb.Sp no grupo G2 é maior do que no grupo G1 ($P = 0,013$). A média da variável Tb.Sp sob o material BCP é menor do que sob os materiais BBM e CO. No entanto, não há evidência estatística de que a média da variável Tb.Sp difira entre os materiais BCP e β-TCP ($P = 0,441$). Além disso, não há

evidência estatística de que a média da variável Tb.Sp difira entre os materiais BBM, β -TCP e CO (valores $P > 0,05$) (Tabela 5.48).

Tabela 5.47 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Sp(mm) entre os dois grupos

Diferença de médias	Valor P
Média _{G2} – Média _{G1}	0,013

Tabela 5.48 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Tb.Sp (mm) sob os diferentes pares de materiais

Diferença de médias	Valor P
Média _{BCP} – Média _{BBM}	<0,001
Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,441
Média _{BCP} - Média _{CO}	0,002
Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,236
Média _{BBM} – Média _{CO}	>0,999
Média _{β-TCP} – Média _{CO}	0,057

5.3.3.9 Variável DA - Grau de Anisotropia

A tabela 5.49 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável DA sob cada material e grupo. A figura 5.36 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.49 - Estatísticas descritivas para a variável DA

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média $\pm$	DP	Média $\pm$	DP
BC	5	1,28	0,05	1,49	0,07
BO	5	1,44	0,20	1,65	0,13
CE	5	1,50	0,09	1,69	0,13
CO	4	1,37	0,17	1,72	0,14

Figura 5.36 - Média da variável DA por material e grupo

Pela tabela 5.50, observa-se que há evidência de que no grupo G2 a média da variável DA é maior do que no grupo G1 ($P = 0,002$). Pela tabela 5.51, percebe-se que não há evidência estatística de que a média da variável DA difira entre os materiais BO, CE e CO. Além disso, a média da variável DA obedece à seguinte relação: $BC < BO=CE=CO$.

Tabela 5.50 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável DA entre os dois grupos

Diferença de médias	Valor P
$Média_{G2} - Média_{G1}$	0,002

Tabela 5.51. Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável DA sob os diferentes pares de materiais

Diferença de médias	Valor P
$Média_{BC} - Média_{BO}$	0,007
$Média_{BC} - Média_{CE}$	0,001
$Média_{BC} - Média_{CO}$	0,004
$Média_{BO} - Média_{CE}$	0,388
$Média_{BO} - Média_{CO}$	0,779
$Média_{CE} - Média_{CO}$	0,573

5.3.3.10 Variável Conn,Dn ($1/\text{mm}^3$) - Densidade de conectividade

A tabela 5.52 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável Conn,Dn sob cada material e grupo. A figura 5.37 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.52 - Estatísticas descritivas para a variável Conn,Dn ($1/\text{mm}^3$)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média $\pm$	DP	Média $\pm$	DP
BCP	5	214,50 $\pm$	170,80	70,00 $\pm$	21,93
BBM	5	137,30 $\pm$	91,80	34,68 $\pm$	9,36
β -TCP	5	228,90 $\pm$	69,20	64,21 $\pm$	17,31
CO	5	59,20 $\pm$	26,70	28,64 $\pm$	13,01

Figura 5.37 - Média da variável Conn,Dn ($1/\text{mm}^3$) por material e grupo

Observa-se que há evidência de que no grupo G2 a média da variável Conn,Dn é menor do que no grupo G1 ($p < 0,001$) (Tabela 5.53). Percebe-se que há evidência estatística de que a média da variável Conn,Dn difira apenas entre os materiais β -TCP e CO ($P = 0,003$), sendo maior sob o material β -TCP (Tabela 5.54).

Tabela 5.53 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Conn,Dn (mm^3) entre os dois grupos.

Diferença de médias	Valor P
Média _{G2} – Média _{G1}	<0,001

Tabela 5.54 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável Conn,Dn (mm^2) sob os diferentes pares de materiais.

Diferença de médias	Valor P
Média _{BCP} – Média _{BBM}	>0,999
Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	>0,999
Média _{BCP} - Média _{CO}	0,144
Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	>0,490
Média _{BBM} – Média _{CO}	0,630
Média _{β-TCP} – Média _{CO}	0,003

5.3.3.11 variável MV (mm^3) - volume do material

A tabela 5.55 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável MV sob cada material e grupo. A figura 5.38 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.55 - Estatísticas descritivas para a variável MV (mm^3)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média $\pm$	DP	Média $\pm$	DP
BCP	5	13,18 $\pm$	3,92	13,71 $\pm$	5,26
BBM	5	9,12 $\pm$	4,71	2,27 $\pm$	1,72
β -TCP	5	12,08 $\pm$	6,27	3,89 $\pm$	1,79

Figura 5.38 - Média da variável MV (mm^3) por material e grupo

Pela tabela 5.56, observa-se que, apenas para o material BCP, não há evidência de diferença entre as médias da variável MV sob os grupos G1 e G2 ($P = 0,848$). Para os materiais BBM e β -TCP, a média é maior no grupo G1 (valores $P < 0,05$). Pela tabela 5.57, percebe-se que, no grupo G1, não há evidência estatística de que a média da variável MV difira entre os três materiais (valores $P > 0,05$). No grupo G2, a média da variável MV, sob o material BCP, é maior do que sob o material BBM e de que sob o material β -TCP (valores $P < 0,001$). Além disso, a média da variável MV sob o material β -TCP não difere da média sob o material BBM ($P = 0,403$).

Tabela 5.56 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável MV (mm^3) entre os dois grupos, para cada material

Material	Diferença de médias	Valor P
BCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,848
BBM	Média _{G2} – Média _{G1}	0,013
β -TCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,008

Tabela 5.57 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável MV (mm³) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo

Grupo	Diferença de médias	Valor P
G1	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,056
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,568
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,136
G2	Média _{BCP} – Média _{BBM}	<0,001
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	<0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,403

5.3.3.12 variável MV/ TV (%) -percentual de material remanescente por tecido total formado

A tabela 5.58 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável MV/TV sob cada material e grupo. A figura 5.39 mostra o comportamento da média amostral dessa variável sob cada material e grupo.

Tabela 5.58 - Estatísticas descritivas para a variável MV/TV (%)

Material	No. de amostras	Grupo			
		G1		G2	
		Média ±	DP	Média ±	DP
BCP	5	20,05 ±	3,75	16,86 ±	5,08
BBM	5	14,69 ±	6,44	2,81 ±	2,20
β-TCP	5	18,05 ±	8,49	4,92 ±	2,57

Figura 5.39 - Média da variável MV/TV (%) por material e grupo

Pela tabela 5.59, observa-se que, apenas para o material BCP, não há evidência de diferença entre as médias da variável MV/TV sob os grupos G1 e G2 ($P = 0,347$). Para os materiais BBM e β -TCP, a média é maior no grupo G1. Pela tabela 5.60, percebe-se que, no grupo G1, não há evidência estatística de que a média da variável MV/TV difira entre os três materiais. No grupo G2, a média da variável MV/TV, sob o material BCP, é maior do que sob o material BBM e de que sob o material β -TCP. Além disso, a média da variável MV/TV sob o material β -TCP não difere da média sob o material BBM ($P = 0,458$).

Tabela 5.59 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável MV/TV (%) entre os dois grupos, para cada material

Material	Diferença de médias	Valor P
BCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,347
BBM	Média _{G2} – Média _{G1}	0,002
β -TCP	Média _{G2} – Média _{G1}	0,001

Tabela 5.60 - Valores P dos testes t- Student para a diferença de médias da variável MV/TV (%) sob os diferentes pares de materiais, para cada grupo

Grupo	Diferença de médias	Valor <i>P</i>
G1	Média _{BCP} – Média _{BBM}	0,071
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,481
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,243
G2	Média _{BCP} – Média _{BBM}	<0,001
	Média _{BCP} - Média _{β-TCP}	0,001
	Média _{BBM} – Média _{β-TCP}	0,458

6 DISCUSSÃO

Desde a descoberta da BMPs há 48 anos atrás por Marshall Urist, muitos esforços e investimentos em pesquisa básica têm sido realizados para a identificação, extração, purificação, clonagem, e recombinação da BMP-2, sem que ainda tenhamos claramente definidos tópicos importantes como mínima dose efetiva, tempo ideal de liberação da droga e melhor veículo de carregamento da substância indutora.

Considerando-se os resultados promissores dos materiais osteocondutores Beta Tricálcio Fosfato (β -TCP), Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP), e Osso Mineral Bovino - BBM, realizamos este estudo com o objetivo de comprovar a eficiência da associação da rhBMP-2/ACS a esses materiais, aqui utilizados como carreadores adicionais, incrementando a bioatividade e osteogenicidade desses substitutos ósseos, de modo a induzir um crescimento ósseo vertical mais eficiente, dentro do novo conceito de engenharia tecidual (Giannoudis et al., 2007; Schmidmaier et al., 2008; Zimmermann; Moghaddam, 2011).

Nesse conceito, o cilindro de titânio exerce a dupla função de osteocondutor e contenção, evitando a dispersão da proteína e prolongando seu tempo de liberação no local além de promover estabilidade mecânica ao conjunto e isolar os materiais dos tecidos adjacentes, caracterizando o modelo de regeneração óssea guiada (ROG).

A associação da rhBMP-2 com a esponja de colágeno (rhBMP-2/ACS) tem sido utilizada com sucesso em inúmeros estudos de preenchimento ósseo de cavidades como seio maxilar, alvéolos, cavidades císticas e defeitos críticos em animais (Boyne et al., 1997; Cochran et al., 2000; Boyne, 2001; Jovanovic et al., 2007; Choi et al., 2013; Lee et al., 2013). Porém a esponja de colágeno não possui resistência mecânica à compressão e não retém a proteína por muito tempo, limitando ou inviabilizando sua utilização em casos de aumento de altura e espessura, defeitos de continuidade ou em grandes reconstruções (Hart; Bowles, 2012; Hunziker et al., 2012; Lo et al., 2012; Herford et al., 2013). Essas situações clínicas são as que oferecem maior desafio aos cirurgiões buco-maxilo-faciais e pesquisadores, pois são as mais difíceis em se obter um resultado satisfatório quanto à quantidade e qualidade de tecido ósseo formado.

A busca por um carreador ideal para o transporte da rhBMP-2 tem sido o foco de inúmeras pesquisas, não somente para determinação do melhor meio de liberação da droga, mas também para reduzir a mínima dose efetiva para uma regeneração óssea adequada, pois a dose exógena utilizada clinicamente é supra fisiológica, variando entre 10 μ g e 1,5mg/mL, enquanto que a dose endógena presente no osso é de 1 μ g/mL de BMP e a concentração exigida para a indução osteogênica in vivo é de 300 μ g/mL (Yamaguchi et al., 1996).

Além disso, essa grande dosagem pode resultar em inflamação dos tecidos moles, reabsorção do osso nativo, fratura ou deslocamento dos implantes e, em alguns casos, supercrescimento ósseo e formação de seromas (Wikesjö et al., 2008a; Kisiel et al., 2012).

Portanto, a obtenção de um carreador adequado fornecerá dados importantes para a otimização do uso dessa proteína indutora nas diversas aplicações clínicas.

A análise por meio da histomorfometria e da micro-TC nos permitiu um estudo completo, pois além dos parâmetros quantitativos e qualitativos fornecidos, pudemos observar o padrão trabecular e a microarquitetura do tecido ósseo formado, resultante de cada material utilizado, comparando-os entre si e com o coágulo, além de avaliar a taxa de biodegradação dos materiais utilizados com e sem a ação da rhBMP-2.

Podemos afirmar que a μ TC complementa a histomorfometria, pois embora ela forneça dados morfométricos quantitativos e qualitativos, não é possível por meio desta análise, a obtenção de informações de celularidade e índices de remodelação óssea (Wang et al., 2012).

Além disso, a resistência mecânica do osso é resultante da quantidade óssea e da micro arquitetura de sua estrutura, portanto, para a obtenção de uma análise completa do tecido ósseo, ambas características devem ser analisadas (Marinozzi et al., 2012).

Embora não tenhamos feito uma correlação entre os dados da histomorfometria e da μ TC por meio de um coeficiente de correlação como em estudos anteriores (Chappard et al., 2005; Yeom et al., 2008), pudemos observar uma coerência entre os resultados das duas análises.

Pelos resultados obtidos, acreditamos que este estudo valide o uso dessa ferramenta de análise nesse tipo de formação óssea vertical, uma vez que toda formação óssea gerada neste modelo experimental deve ser considerada “osso

novo”. Em outros modelos de estudo em que a formação de osso novo provém de mais de uma parede, como em casos de defeitos críticos ou cavidades, a distinção entre osso nativo e “osso novo” fica mais difícil, pois a μ TC também não permite a diferenciação dos diferentes estágios de mineralização (Draenert et al., 2012).

Para melhor entender o mecanismo de ação dessa proteína e da formação óssea, na análise histomorfométrica, mensuramos separadamente a porção inferior e a porção superior do tecido formado dentro do cilindro de titânio.

Quando analisamos a porção inferior do cilindro (Ob), pudemos observar que há evidência ($P = 0,039$) de efeito de interação entre Grupo e Material; assim, o comportamento da média da variável Ob sob os quatro materiais é diferente nos dois grupos. Enquanto que no Grupo 1 (sem rhBMP-2), os três materiais e o coágulo tiveram formação óssea semelhante ($P = 0,05$); no Grupo 2 (com rhBMP-2) o material BCP foi o único afetado pela associação da rhBMP-2 ($P = 0,017$), tendo sido o que obteve maior formação óssea.

Também pudemos concluir que, nessa porção do cilindro, que está próxima da entrada das células mesenquimais indiferenciadas oriundas da medula e do endóstio, a rhBMP-2/ACS foi significativamente mais eficiente quando utilizada com os materiais carreadores BCP e β -TCP, pois ambas associações foram mais efetivas quando comparadas com o conjunto rhBMP-2/ACS e coágulo. O material BBM foi o único que não melhorou a ação da proteína, comportando-se de maneira semelhante ao controle ($P = 0,231$).

Na porção superior do cilindro (Os), acima de 2,5 mm da base, também houve efeito de interação entre Grupo e Material ($P = 0,010$), observando-se diferentes comportamentos dos materiais nos dois grupos. Como ocorrido na porção inferior (Ob), a diferença entre os materiais e o coágulo ocorreu apenas no Grupo 2, e os materiais BCP e β -TCP foram considerados os carreadores mais eficientes da rhBMP-2. Nessa porção (Os), o Grupo 2 (com rhBMP-2) mostrou formação óssea significativamente maior que o Grupo 1 (sem rhBMP-2) em todos os materiais e no coágulo (para BCP e β -TCP, $p < 0,001$ e para BBM e CO, $P = 0,002$ e $0,040$ respectivamente).

Entretanto, após comparar as formações ósseas da base com as da parte superior do cilindro, pudemos constatar que o tecido ósseo formado na base (Ob) foi significativamente maior que o da porção superior nos dois grupos.

Quando somamos as áreas ósseas das porções inferior e superior do cilindro, tivemos a área total do tecido ósseo formado (O_t), e observamos que existe evidência ($P = 0,010$) de efeito de interação entre Grupo e Material, ou seja, o comportamento dos quatro materiais são diferentes nos dois grupos e os resultados coincidem com os da porção superior do cilindro.

Essa evidência nos permite inferir que a associação do conjunto rhBMP-2/ACS com os materiais carreadores adicionais nesse modelo de ROG possibilita um ganho ósseo vertical acima de 2,5mm.

Adicionalmente observamos um sinergismo entre a rhBMP-2 e os materiais carreadores BCP e β -TCP, uma vez que, quando qualquer um desses materiais foi utilizado com a adição dessa proteína (Grupo 2) a formação óssea foi significativamente maior do que sem a sua adição. Por outro lado, quando a rhBMP-2 foi utilizada apenas com a esponja de colágeno (ACS) e coágulo, a formação óssea obtida foi inexpressiva. Esse fato nos permite afirmar que a ação osteoindutora da rhBMP-2 é incrementada, quando esta é associada a um dos materiais carreadores acima citados (BCP ou β -TCP).

Esse achado contradiz estudos anteriores que obtiveram resultados positivos com essa associação (Visser et al., 2009; Choi et al., 2013; Lee et al., 2013), embora em nenhum deles exista uma comparação com grupos de controle positivo e negativo como o nosso, além de utilizarem diferentes modelos de estudo.

Esse resultado provavelmente é consequência da biodegradação imprevisível da matriz colágena (Lo et al., 2012), uma vez que a falta de resistência à compressão foi solucionada com a proteção do cilindro de titânio.

Ainda analisando quantitativamente o tecido ósseo formado, os resultados revelados pela análise da microtomografia, em geral mostraram uma coerência com os da histomorfometria, embora sejam aferições de diferentes grandezas.

Para a avaliação quantitativa e da micro arquitetura óssea, utilizamos os parâmetros mais comumente observados em pesquisas recentes (Marinozzi et al., 2012; Wang et al., 2012; Monje et al., 2013; Villanueva-Alcojol et al., 2013) sobre indução e regeneração óssea e sobre osso trabecular.

Dentre os parâmetros analisados, o volume ósseo total ($BV - mm^3$), coerentemente com a área óssea total ($O_t - mm^2$), mostrou que os materiais BCP e β -TCP tiveram uma formação óssea significativamente maior no Grupo 2 (com rhBMP-2), enquanto os materiais BBM e CO não mostraram diferença

estatisticamente significativa entre os grupos, ou seja, não foram afetados pela adição da substância indutora, sendo atribuído ao coágulo a menor média encontrada no Grupo 2 pelas duas análises.

Embora sem diferença estatisticamente significativa, o material BCP mostrou maior formação óssea que o β -TCP, tanto na área óssea total (Ot) como no volume ósseo total (BV). Creditamos esse fato à presença da hidroxiapatita (HA) na formulação do fosfato de cálcio bifásico (60% HA e 40% β -TCP), que equilibra a rápida biodegradação do β -TCP, mantendo por mais tempo sua ação osteocondutiva, além de manter a substância indutora por mais tempo no local. Esse fato foi anteriormente observado por Alam et al. (2001), Kim et al. (2012), Lee et al. (2013), e Lu et al. (2013). Segundo Lee et al. (2013), o conceito da formulação do material BCP é baseado em um ótimo balanço entre a estabilidade estrutural da HA e da biodegradabilidade do β -TCP. Provavelmente, enquanto rapidamente o β -TCP é reabsorvido e substituído por osso, a hidroxiapatita (HA) presente mantém a integridade estrutural do conjunto (Lu et al., 2013).

Além disso, tem sido relatado que o fosfato tricálcico (TCP) presente na composição da fórmula se dissolve-se em íons de fósforo e cálcio, que teoricamente poderiam estimular a neoformação óssea. Acredita-se que a dissolução do TCP poderia deixar mais espaços entre as partículas para nova formação óssea (Daculsi, 1998; Jensen et al., 2007).

Já o volume total de tecido formado (TV - mm³) foi significativamente maior no Grupo 2 para todos os materiais e para o coágulo (CO), que também apresentou a menor média de TV nos dois grupos, seguido pelo BBM. As maiores médias nesse parâmetro foram dos materiais β -TCP e BCP. Este achado corrobora e está coerente com nosso estudo anterior, que realizou uma medição macroscópica das mesmas amostras com paquímetro digital com resolução de 0,01 mm, obtendo também o volume total de tecido formado (Polo et al., 2013). A diferença existente quando comparamos os materiais entre si nesses dois estudos pode ser creditada à diferença do número de amostras, uma vez que apenas cinco amostras de cada grupo foram submetidas à análise por meio da microtomografia computadorizada ou ainda pelo fato de que nesse tipo de análise o espécime ósseo é analisado por completo, ou seja, é como se analisássemos na histologia todos os cortes existentes de uma amostra.

A porcentagem de osso novo em relação ao volume total de tecido formado (osso, conjuntivo, medula, material remanescente) - BV/TV % é um dos parâmetros mais importantes e equivale à densidade óssea da histometria, além de ser o principal determinante da resistência óssea, sendo o seu valor abaixo de 100% para osso trabecular e próximo de 100% em osso cortical (Villanueva-Alcojol et al., 2013). Porém, no presente estudo, o BV/TV (%) representa um valor muito mais qualitativo que quantitativo, pois calcula a porcentagem de “osso novo” presente na formação tecidual resultante e não em relação ao volume total do cilindro. Assim, uma amostra com pouca formação em altura pode apresentar um alto percentual de “osso novo”, e não ser muito relevante quando necessitamos de aumento vertical ou em espessura.

Os resultados obtidos mostraram que embora o BCP tenha sido o único material com as proporções BV/TV significativamente maiores no Grupo 2 (com rhBMP-2), o material β -TCP também teve um aumento percentual relevante nesse parâmetro no grupo com adição da proteína. O coágulo, por sua vez, teve nesse grupo sua proporção BV/TV diminuída, pois a rhBMP-2 aumentou o tecido final formado, mas não aumentou a formação óssea, o que explica as características histomorfológicas e arquiteturas que podem ser observadas nas figuras 5.16 e 5.17, nas quais visualizamos grandes espaços medulares, com trabéculas esparsas e mais isotrópicas.

O BBM, embora sem diferença significativa entre os grupos, também teve o percentual BV/TV diminuído como ocorrido com o coágulo.

Relativos à porcentagem BV/TV, analisamos três importantes parâmetros que avaliam a microarquitetura óssea que são a espessura de trabéculas (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e separação trabecular (Tb.Sp). Em geral, esses três parâmetros estão relacionados entre si e refletem a quantidade de tecido ósseo espacial tridimensional.

A espessura das trabéculas (Tb.Th) foi maior no Grupo 2 (com rhBMP-2) apenas para os materiais BBM e β -TCP enquanto que o material BCP e o coágulo não foram significativamente afetados pela proteína. Apesar dessa diferença entre grupos, no Grupo 2 não houve diferença significativa na espessura das trabéculas entre os três materiais e o coágulo. Já no número de trabéculas houve diferença significativa para todos os materiais, porém o BCP foi o único que mostrou maiores

valores no Grupo 2. O β -TCP, BBM e coágulo apresentaram menor número de trabéculas no grupo com a adição da proteína.

Embora o β -TCP tenha menor Tb.N no Grupo 2, não houve diferença significativa em relação ao material BCP. Já a separação entre trabéculas (Tb.Sp) reflete o espaço medular que foi significativamente afetado pela adição da rhBMP-2, pois no Grupo 2 esse espaço foi maior para todos os materiais. Entretanto, o material BCP possui o menor espaço medular. Atribuímos o fato ao maior número de trabéculas apresentado por esse material no Grupo 2.

Analizando os resultados do fator padrão do osso trabecular (Tb.Pf), que reflete a conectividade, observamos que os materiais BBM, β -TCP e o coágulo foram negativamente afetados pela rhBMP-2, e seus valores aumentados no Grupo 2 indicam presença de trabéculas menos côncavas, com consequente perda de conectividade do osso trabecular. Já os valores desse parâmetro para o material BCP não foram significativamente afetados, indicando que esse material possui um osso trabecular mais bem conectado, com menor quantidade de estruturas isoladas, e trabéculas mais côncavas de acordo com a descrição de Villanueva-Alcojol et al. (2013).

Porém, embora com diferença significativa entre grupos, considerando-se os valores negativos do Tb.Pf apresentados pelos três materiais nos dois grupos, observamos uma boa conectividade entre trabéculas, quando qualquer dos materiais foi utilizado. Essa observação não se aplica ao coágulo, com ou sem adição de rhBMP-2, devido aos altos valores apresentados nesse parâmetro.

Os resultados obtidos com a análise do índice de modelo estrutural (SMI), mostram que os materiais cerâmicos BCP e β -TCP não sofreram inferência da rhBMP-2 e apresentaram valores mais próximos a 0, indicando prevalência de trabéculas mais achatadas, que estão associadas a mais rigidez óssea (Monje et al., 2013). Como os valores de BBM e CO encontram-se entre 0 e 3, concluímos que possuam trabéculas achatadas e cilíndricas de volumes semelhantes conforme observado por Monje et al. (2013).

Este parâmetro é de suma importância na análise da estrutura trabecular, uma vez que a deteriorização do osso trabecular, em função do envelhecimento ou doença, é caracterizada pela conversão de trabéculas achatadas em cilíndricas. Assim, o predomínio de trabéculas cilíndricas resulta em um maior valor de SMI e em trabéculas menos resistentes ao estresse mecânico (Hildebrand et al., 1999).

Interpretando os resultados do grau de anisotropia (DA), que reflete as propriedades mecânicas do tecido ósseo pela orientação estrutural das trabéculas, observamos que, embora com diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mostrando perda de resistência com a adição da rhBMP-2, seus valores para os dois grupos são mais próximos de 1 que de 0, o que confere uma característica anisotrópica às estruturas ósseas trabeculares nos dois grupos e em todos os materiais e coágulo. Mesmo na ausência de diferença significativa entre os materiais e o coágulo, esse foi o mais negativamente afetado pela perda de resistência estrutural.

A densidade de conectividade (Conn.Dn), parâmetro qualitativo, também mostrou diferença significativa entre os dois grupos, indicando uma queda nos seus valores com a adição da proteína indutora. Curiosamente, nesse parâmetro, o material mais afetado pela perda da densidade de conectividade foi o BCP, que no Grupo 1 (sem rhBMP-2) apresentou os mais altos valores.

Em relação à quantidade de material remanescente (M), na avaliação histomorfométrica as áreas também foram mensuradas separadamente nas duas porções do cilindro (Mb e Ms), e mostrou-nos que a reabsorção dos materiais BCP, β -TCP e BBM foi maior no Grupo 2 ($p < 0,001$) apenas na porção inferior, próxima à base da calvária. Esse fato mostra os padrões de formação óssea e reabsorção do biomaterial, que são interdependentes e iniciam-se próximos à base. O material BCP foi o que apresentou menor taxa de reabsorção, e os materiais BBM e β -TCP foram os que mais reabsorveram no grupo com a adição da rhBMP-2 nas duas porções do cilindro (base e porção superior).

Ao comparar o material remanescente presente na base com o da parte superior, vimos que no grupo que não utilizou a rhBMP-2 (Grupo 1), a biodegradação foi maior na porção superior dos três materiais. Já no grupo com adição de rhBMP-2 (Grupo 2), os materiais que mais sofreram reabsorção, ou seja, os materiais BBM e β -TCP, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as duas porções, e para o BCP a biodegradação foi maior na porção superior ($P = 0,001$).

Quando somamos as áreas de material remanescente das duas porções do cilindro, observamos o mesmo resultado apresentado na porção inferior para os três materiais. A análise pela μ TC também mostra que o volume total de material remanescente foi menor no grupo com a adição da rhBMP-2 (Grupo 2), sendo que

em relação a esse parâmetro, o material BCP não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, ou seja, sua taxa de reabsorção foi inexpressiva no cálculo volumétrico. Interpretando essas informações, observamos que a ação da rhBMP-2 na formação óssea mostrou-se inversamente proporcional à reabsorção, ou seja, quanto mais lentamente reabsorveu o material carreador, maior foi o sinergismo apresentado entre o mesmo e a proteína indutora rhBMP- 2.

Na porção superior do cilindro, onde a influência da proteína na reabsorção dos materiais foi insignificante, sua ação osteogênica foi significativamente maior, o que nos permitiu concluir que a presença da rhBMP-2 fez com que a formação óssea nessa porção do cilindro tenha sido mais rápida que a reabsorção do carreador, e a permanência do material por mais tempo no local conduziu a formação óssea verticalmente, nesse modelo de ROG. Relatos semelhantes do efeito da aceleração da biodegradação dos enxertos utilizados em conjunto com a rhBMP-2 foram anteriormente observados (Matsushita et al., 2006; Maus et al., 2008; Por et al., 2008; Lim et al., 2013).

Infelizmente não pudemos acompanhar a reabsorção dos materiais ao longo do tempo, pois a administração de fluorocromos em três tempos apresentada na primeira etapa deste estudo (Polo et al., 2013) não permitiu a avaliação dessa variável, uma vez que os materiais cerâmicos não eram visíveis sob a fluorescência.

Uma dificuldade apresentada durante a análise pela μ TC foi a identificação dos limites dos tons de cinza para determinação do valor médio dos coeficientes de atenuação dos “voxels” da VOI para cada material carreador e para o osso. Os limites dos materiais foram determinados após a identificação dos níveis correspondentes ao tecido ósseo, na amostra que continha apenas coágulo. Para minimizar erros, utilizamos a imagem histológica da mesma amostra como referência visual. Acreditamos que esses dados possam ajudar futuras pesquisas com os mesmos materiais que utilizem a microtomografia computadorizada como ferramenta de análise.

No momento da coleta das amostras nos deparamos com formações ósseas exuberantes que se estendiam-se sobre os cilindros de titânio. Duas dessas formações eram muito extensas e volumosas (Figura 5.3a,b,d). Esse supercrescimento ósseo ocorreu em 4 animais do Grupo 2 (com rhBMP-2), correspondente a 25% das amostras do grupo. A maior delas apresentou formação

de seroma em seu interior, visível tanto na histologia como nas imagens da microtomografia (Figura 5.3c,e,f).

Ocorrência semelhante foi relatada em estudos anteriores, porém não de forma tão exacerbada (Jovanovic et al., 2007; Leknes et al., 2008; Wikesjö et al., 2008a; Yuan et al., 2010; Kinsella et al., 2011; Park et al., 2012; Lu et al., 2013). Na maioria desses estudos os autores constataram que essas lacunas foram preenchidas com mais tempo de reparação óssea.

Essas lacunas ósseas parecidas com cisto, são observadas com mais frequência quando altas doses de rhBMP-2 requeridas para regeneração óssea em humanos são administradas (Sciadini; Johnson, 2000). Essa afirmação é condizente com nosso estudo que utilizou em coelhos a dose clínica preconizada pelo fabricante para ser utilizada em humanos (1,5 mg/mL).

O material BBM não foi beneficiado com a associação da rhBMP-2 e tampouco incrementou a ação da proteína como carreador adicional quando comparado ao BCP e β -TCP nesse modelo de ROG. Acreditamos que, após a liberação inicial da droga, houve atividade osteoclástica maior ao redor de suas partículas, fazendo com que a reabsorção acontecesse de forma mais rápida que a formação óssea subsequente nesse processo de remodelação inicial, que também foi afetada pela perda da ação osteocondutora das mesmas partículas tão rapidamente reabsorvidas. Esse efeito negativo ou nulo da associação da rhBMP-2 com o BBM foi anteriormente descrito na literatura (Kim et al., 2010; Kao et al., 2012; Schmitt et al., 2013). Todavia, a despeito do efeito negativo em seus estudos, esses autores não relataram taxa de biodegradação expressiva.

Não podemos deixar de ressaltar as qualidades do osso mineral bovino (BBM) como material osteocondutor quando utilizado sem a associação da rhBMP-2, lembrando que esse material já foi considerado “padrão ouro” em substitutos ósseos com vasta literatura a seu favor (Komlev et al., 2010; Torres et al., 2010; Busenlechner et al., 2012; Choi et al., 2013; Liu et al., 2013).

Reabsorção óssea transitória anterior à formação óssea com a administração de rhBMP-2/ACS em modelos animais já foi anteriormente relatada e em geral está relacionada com altas doses ou rápida liberação da droga (Rodeo et al., 1999; Seeherman; Wozney, 2005; Seeherman et al., 2010, Kim et al., 2011).

Jensen et al. (2007) afirmaram que os osteoclastos expressam receptores de BMP-2, e Tachi et al. (2010) explicam que a BMP-2 aumenta a diferenciação de

osteoclastos pela hiper-regulação do receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL).

Um recente estudo muito bem conduzido concluiu que um ajuste preciso da dose de rhBMP-2 seria necessário para otimizar o equilíbrio entre as atividades de formação e reabsorção óssea. Os autores também relataram que a resposta osteogênica pode ser mais eficientemente obtida pela liberação gradual da droga por um carreador tri-dimensional do que por uma liberação rápida feita por um carreador bi-dimensional (Hunziker et al., 2012).

A análise e a interpretação de todos os parâmetros quantitativos e qualitativos, referentes ao tecido ósseo neoformado nesse modelo experimental permite nos afirmar que as cerâmicas BCP e β -TCP possuem características físico-químicas adequadas a um carreador a ser utilizado para transporte e liberação da proteína osteoindutora rhBMP-2 em aumentos ósseos verticais, tendo em vista os resultados promissores apresentados no presente estudo quando comparamos sua utilização apenas com a esponja de colágeno (ACS). Nossos achados corroboram com estudos anteriores que utilizaram as mesmas associações (Alam et al., 2001; Kinsella et al., 2011; Jang et al., 2012; Kato et al., 2012; Kim et al., 2012; Lim et al., 2013; Lu et al., 2013; Polo et al., 2013).

Ao término do nosso estudo utilizando a rhBMP-2, observamos que algumas importantes lacunas ainda permanecem, e devem ser temas para futuras pesquisas, como a mínima dose efetiva da droga a ser utilizada com os carreadores, efeitos a longo prazo e efeitos à distância decorrentes da utilização da proteína, bem como um meio de contenção adequado para as diferentes aplicações clínicas.

7 CONCLUSÕES

Respondendo às perguntas formuladas na proposição inicial do trabalho, temos:

1. A rhBMP-2 aumentou significativamente a formação óssea apenas quando foi associada aos materiais Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP) e β -Fosfato Tricálcio (β - TCP).
2. Somente os materiais Fosfato de Cálcio Bifásico (BCP) e β -Fosfato Tricálcio (β - TCP) incrementaram a ação da proteína com a esponja de colágeno (rhBMP-2/ACS), atuando como carreadores adequados e viáveis.
3. Sob as análises quantitativas e qualitativas, os materiais BCP e β - TCP foram considerados igualmente adequados para serem utilizados como carreadores da rhBMP-2
4. A adição de rhBMP-2 afetou significativamente a biodegradação dos materiais β -Fosfato Tricálcio (β - TCP) e Osso Mineral Bovino (BBM), acelerando a reabsorção destes materiais.
5. Existe diferença significativa entre a microarquitetura óssea do Coágulo (CO) e a dos três materiais utilizados (β - TCP, BCP e BBM) sob a análise da microtomografia tridimensional.

REFERÊNCIAS¹

Alam MI, Asahina I, Ohmamiuda K, et al. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate ratios as carriers for rhBMP-2. *Biomaterials*. 2001 Jun;22(12):1643-51.

Alcaide M, Serrano M-C, Pagani R, et al. Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. *Biomaterials*. 2009;30(1):45-51.

Alper J. Boning up: newly isolated proteins heal bad breaks. *Science*. 1994 Jan 21;263(5145):324-5.

Artzi Z, Kozlovsky A, Nemcovsky CE, et al. The amount of newly formed bone in sinus grafting procedures depends on tissue depth as well as the type and residual amount of the grafted material. *J Clin Periodontol*. 2005 Feb;32(2):193-9.

Artzi Z, Weinreb M, Givol Nm et al. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(3):357-68.

Barboza EP, Caúla AL, Caúla FO, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in an absorbable collagen sponge with space-providing biomaterials on the augmentation of chronic alveolar ridge defects. *J Periodontol* 2004;75:702-708.

Bateman J, Intini G, Margarone J, et al. Platelet-Derived growth factor enhancement of two alloplastic bone matrices. *J Periodontol*. 2005;73(11):1833-41.

Bell E. Tissue engineering in perspective. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J. *Principles of tissue engineering*. 2.ed. Boston: Academic Press; 2000. p.xxv-xl.

Bessho K, Carnes DL, Cavin R, Chen Y, Ong JL. BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. *Clin Oral Impl Res*. 1999;10:212-18.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Borah B, Gross GJ, Dufresne TE, et al. Three-dimensional microimaging (MRmicrol and microCT), finite element modeling, and rapid prototyping provide unique insights into bone architecture in osteoporosis. *Anat Rec.* 2001 Apr;265(2):101-10.

Boyne PJ. Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S146-50.

Boyne PJ, Marx RE, Nevins MA. Feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1997;17:11-25.

Busenlechner D, Tangl S, Arnhart C, et al. Resorption of deproteinized bovine bone mineral in a porcine calvaria augmentation model. *Clin Oral Impl Res.* 2012; 23:95-99.

Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury.* 2011 Sep;42 (Suppl 2):S56-63.

Caplan AI. Fundamentals of stem cell tissue engineering. In: Fisher JP, Mikos AG, Bronzino JD. *Tissue engineering.* 1.ed. Boca Raton: CRC Press; 2007 chapter 1, p1-10.

Castellani C, Zanoni G, Tangl S, van Griensven M, Readl H. Biphasic calcium phosphate ceramics in small bone defects: potential influence of carrier substances and bone marrow on bone regeneration. *Clin Oral Impl Res.* 2009;20:1367-74.

Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. Identification of transforming growth factor β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci.* 1990 dez;87:9843-47.

Chappard D, Guillaume B, Mallet R, et al. Sinus lift augmentation and β -TCP : a micro- CT and histologic analysis on human bone biopsies. *Mícron.* 2010;41:321-26.

Chappard D, Retaillieu-Gaborit N, Legrand E, et al. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res.* 2005 jul;20(7):1177-84.

Choi SY, Jang YJ, Choi JY, et al. Histomorphometric analysis of sinus augmentation using bovine bone mineral with two different resorbable membranes. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(Suppl A100):68-74.

Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, et al. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein – 2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3 – year results of a pilot study in humans. *J Periodontol.* 2000 Aug;71:(8)1241-57.

Cochran DL, Nummikoski PV, Jones AA, et al. Radiographic analysis of regenerated bone around endosseous implants in the canine using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12:739-48.

Cowan CM, Aghaloo T, Chou Y-F, et al. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Eng.* 2007;13(3):501-512.

CT-Analyser manual. Bone biology user guide. 2010; Skyscan, Bélgica.

Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *J Biomed Mater Res.* 1998 Dec;42(4):530-9.

Decker JF, Lee J, Cortella CA, et al. Evaluation of implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and vacuum-dried using the critical-size supraalveolar peri-implant defect model in dogs. *J Periodontol.* 2010 Dec;81(12):1839-49.

Dimitriou R, Giannoudis PV. Discovery and development of BMPs. *Int J Care Injured.* 2005;36S:28-33.

Draenert ME, Draenert AI, Forriol F, et al. Value and limits of μ -CT for nondemineralized bone tissue processing. *Microsc Res Tech.* 2012 Apr;75(4):416-24.

Driskell TD, Hassler CR, McCoy LR. The significance of resorbable bioceramics in the repair of bone defects. In: *Proceedings of the 26th. Annual Conference of Engineering in Medicine-Biology*;1973.p.199-206.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, et al. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 1989 Feb;4(1):3-11.

Fiorellini JP, Buser D, Riley E, et al. Effect on bone healing of bone morphogenetic protein placed in combination with endosseous implants: a pilot study in beagle dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001 Feb;21(1):41-7.

Frenken JW, Bouwman WF, Bravenboer N, et al. The use of Straumann Bone Ceramic in a maxillary sinus floor elevation procedure: a clinical, radiological, histological and histomorphometric evaluation with a 6-month healing period. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Feb;21(2):201-8.

Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: The diamond concept. *Injury.* 2007 Sep;38 Suppl 4:S3-6. Review.

Gutwald R, Haberstroh J, Stricker A, et al. Influence of rhBMP-2 on bone formation and osseointegration in different implant systems after sinus-floor elevation. An in vivo study on sheep. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010;38:571-9.

Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, et al. Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone.* 1992;13(4):327-30.

Hart KL, Bowles D. Reconstruction of alveolar defects using titanium-reinforced porous polyethylene as a containment device for recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012 Apr;70(4):811-20.

Herford AS, Lu M, Buxton AN, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 combined with an osteoconductive bulking agent for mandibular continuity defects in nonhuman primates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(3):703-16.

Herford AS, Tandon R, Stevens TW, et al. Immediated distraction osteogenesis: the sandwich technique in combination with rhBMP-2 for anterior maxillary and mandibular defects. *J Craniofac Surg.* 2013;24:1383-1387.

Hildebrand T, Laib A, Müller R, et al. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res.* 1999 Jul;14(7):1167-74.

Hoshino M, Namikawa T, Kato M, et al. Repair of bone defects in revision hip arthroplasty by implantation of a new bone-inducing material comprised of recombinant human BMP-2, beta - TCP powder, and a biodegradable polymer: an experimental study in dogs. *J Orthop Res*. 2007 Aug;25(8):1042-51.

Humber CC, Sándor GK, Davis JM, et al. Bone healing with an in situ-formed bioresorbable polyethylene glycol hydrogel membrane in rabbit calvarial defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Mar;109(3):372-84.

Hunziker EB, Enggist L, Küffer A, et al. Osseointegration: the slow delivery of BMP-2 enhances osteoinductivity. *Bone*. 2012 Jul;51(1):98-106.

Jang J-W, Yun J-H, Lee, K-I, et al. Osteoinductive activity of biphasic calcium phosphate with different rhBMP-2 doses in rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 2012;113(4):480-487.

Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, et al. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11:55-66.

Jensen SS, Yeo A, Dard M, et al. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Dec;18(6):752-60.

Jovanovic SA, Hunt DR, Bernard GW, et al. Bone reconstruction following implantation of rhBMP-2 and guided bone regeneration in canine alveolar ridges defects. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Apr;18(2):224-30.

Jung RE, Weber FE, Thoma DS, et al. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalcium phosphate. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:188-95.

Kakar S, Einhorn TA. Tissue engineering of bone. In: Hollinger, JO et al. *Bone Tissue Engineering*. 1.ed. Boca Raton: CRC Press; 2005 chapter 11;p.278-96.

Kao DWK, Kubota A, Nevins M, et al. The negative effect of combining rhBMP-2 and Bio-Oss on bone formation for maxillary sinus augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2012;32:61-67.

Kato E, Lemler J, Sakurai K, et al. Biodegradation Property of Beta-Tricalcium Phosphate-Collagen Composite in Accordance with Bone Formation: A Comparative Study with Bio-Oss Collagen® in a Rat Critical-Size Defect Model. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012 Jul 18. *in press*.

Kim J-W, Choi K-H, Yun J-H, et al. Bone formation of block and particulated biphasic calcium phosphate lyophilized with Escherichia coli- derived recombinant human bone morphogenetic protein 2 in rat calvarial defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112:298-306.

Kim J-W, Jeong I-H, Lee K-II, et al. Volumetric Bone regenerative efficacy of biphasic calcium phosphate-collagen composite block loaded with rhBMP-2 in vertical bone augmentation model of a rabbit calvarium. *J Biomed Mater Res Part A*. 2012;100A:3304-3313.

Kim YH, Jyoti MA, Youn MH, et al. In vitro and in vivo evaluation of a macro porous beta-TCP granule-shaped bone substitute fabricated by the fibrous monolithic process. *Biomed Mater*. 2010 May 11;5(3):035007.

Kinsella CR Jr, Bykowski MR, Lin AY, et al. BMP-2-mediated regeneration of large-scale cranial defects in the canine: an examination of different carriers. *Plast Reconstr Surg*. 2011 May;127(5):1865-73.

Kisiel M, Ventura M, Oommen OP, et al. Critical assessment of rhBMP-2 mediated bone induction: An in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release*. 2012 Sep 28;162(3):646-53.

Komlev VS, Mastrogiacomo M, Pereira RC, et al. Biodegradation of porous calcium phosphate scaffolds in an ectopic bone formation model studied by X-RAY computed microtomography. *Eur Cell Mater*. 2010 Mar 29;19:136-46.

Kutner MH, Nachtsheim CJ, Neter J, et al. *Applied linear statistical models*. Boston:McGraw – Hill; 2004.

Lee J, Susin C, Rodriguez NA, et al. Sinus augmentation using rhBMP-2/ACS in a mini-pig model: relative efficacy of autogenous fresh particulate iliac bone grafts. *Clin Oral Implants Res*. 2013 May;24(5):497-504.

Lee MB. Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction. A review. *J Clin Periodontol*. 1997;24:355-65.

Legeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, et al. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14:201-2.

Leknes KN, Yang J, Qahash M, et al. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7/rhOP-1): radiographic observations. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct;35(10):914-9.

Lim H-P, Mercado-Pagan AE, Yun K-D, et al. The effect of rhBMP-2 and PRP delivery by biodegradable β -tricalcium phosphate scaffolds on new bone formation in a non-through rabbit cranial defect. model. *J Mater Sci: Mater Med*. 2013;24:11895-1903.

Lindgren C, Hallman M, Sennerby L, et al. Back-scattered electron imaging and elemental analysis of retrieved bone tissue following sinus augmentation with deproteinized bovine bone or biphasic calcium phosphate. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21:924-30.

Liu T, Wu G, Wismeijer D, et al. Deproteinized bovine bone functionalized with the slow delivery of BMP-2 for the repair of critical-sized bone defects in sheep. *Bone*. 2013;56:110-8.

Lo KW, Ulery BD, Ashe KM, et al. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012 Sep;64(12):1277-91.

Lu SX, Fiorini T, Lee J, et al. Evaluation of a compression resistant matrix for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Clin Periodontol*. 2013;40:688-97.

Marinozzi F, Marinozzi A, Bini F, et al. Variability of morphometric parameters of human trabecular tissue from coxo-arthritis and osteoporotic samples. *Ann Ist Super Sanità*. 2012;48(1):19-25.

Mathai J, Chandra S, Nair KV, et al. Tricalcium phosphate ceramic as immediate root implants for the maintenance of alveolar bone in partially edentulous mandibular jaws. A clinical study. *Aust Dent J*. 1989 Oct;34(5):421-6.

Matsushita N, Terai H, Okada T. Accelerated repair of a bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant. *J Orthop Sci*. 2006;11:505-11.

Maus U, Andereya S, Gravius S, et al. BMP-2 incorporated in a tricalcium phosphate bone substitute enhances bone remodeling in sheep. *J Biomater Appl.* 2008;22:559-76.

Miranda DAO, Blumenthal NM, Sorensen RG, et al. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the repair of alveolar ridge defects in baboons. *J Periodontol.* 2005;76:210-20.

Misch CM. Bone augmentation of the atrophic posterior mandible for dental implants using rhBMP-2 and titanium mesh. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011 Nov-Dec;31(6):581-9.

Monje A, Monje F, González-García R, et al. Comparison between microcomputed tomography and cone-beam computed tomography radiologic bone to assess atrophic posterior maxilla density and microarchitecture. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Feb 26. doi: 10.1111/cir.12133. [Epub ahead of print].

Nery EB, Lee KK, Czajkowski S, et al. A Veterans Administration Cooperative Study of biphasic calcium phosphate ceramic in periodontal osseous defects. *J Periodontol.* 1990 Dec;61(12):737-44.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, et al. *Applied linear statistical Models.* 5th ed. Chicago: Irwin; 2005.

Nevins M, Nevins ML, Schupbach P, et al. A Prospective, Randomized Controlled preclinical Trial to Evaluate Different Formulations of Biphasic Calcium Phosphate in Combination With a Hydroxyapatite Collagen Membrane to Reconstruct Deficient Alveolar Ridges. *J Oral Implantol.* 2013 Apr;39(2):133-9.

Nienhuijs ME, Walboomers XF, Briest A, et al. Healing of bone defects in the goat mandible, using COLLOSS and β -Tricalcium-Phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 Feb;92(2):517-24.

Le Nihouannen D, Saffarzadeh A, Aguado E. Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Feb;18(2):225-35.

Nobre JS, Singer JM. Residual analysis for linear mixed models. *Biometr J.* 2007;49:863-75.

Oliveira AL, Malafaya PB, Costa SA, et al. Micro-computed tomography (micro-CT) as a potential tool to assess the effect of dynamic coating routes on the formation of biomimetic apatite layers on 3D-plotted biodegradable polymeric scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 Feb;18(2):211-23.

Palti A, Hoch T. A concept for the treatment of various dental bone defects. *Implant Dent*. 2002;11(1):73-8.

Park JC, Kim JC, Kim BK, et al. Dose- and time-dependent effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the osteogenic and adipogenic potentials of alveolar bone-derived stromal cells. *J Periodontal Res*. 2012 Oct;47(5):645-54.

Park J-W, Kim E-S, Jang J-H. et al. Healing of rabbit calvarial bone defects using biphasic calcium phosphate ceramics made of submicron-sized grains with a hierarchical pore structure. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Mar;21(3):268-76.

Pelegrine AA, Sorgi da Costa CE, Sendyk WR, et al. The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:171-84.

Piattelli M, Favero GA, Scarano A, et al. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14:835-40.

Polo CI, Lima JLO, De Lucca L, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein 2 associated with a variety of bone substitutes on vertical guided bone regeneration in rabbit calvarium. *J Periodontol*. 2013;84:360-70.

Por YC, Barceló CR, Salyer KE, et al. Bone generation in the reconstruction of a critical size calvarial defect in an experimental model. *J Craniofac Surg*. 2008;19:383-92.

Reddi HA. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of First mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor*. 1997;8(1):11-20.

Reddi HA. Growth factors and morphogens: signals for tissue engineering. In: Fisher JP, Mikos AG, Bronzino JD. *Tissue engineering*. 1.ed. Boca Raton: CRC Press; 2007. chapter 2, p.2-1/2-5.

Rodeo SA, Suzuki K, Deng XH, et al. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel. *Am J Sports Med.* 1999 Jul-Aug;27(4):476-88.

Rosen V, Thies RS. The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet.* 1992 Mar;8(3):97-102.

Roshan-Ghias A, Lambers FM, Gholam-Rezaee M, et al. In vivo loading increases mechanical properties of scaffold by affecting bone formation and bone resorption rates. *Bone.* 2011 Dec;49(6):1357-64.

Samartzis D, Khanna N, Shen FH, et al. Update on bone morphogenetic proteins and their application in spine surgery. *J Am Coll Surg.* 2005 Feb;200(2):236-48.

Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981 Dec;78(12):7599-603.

Sartori S, Silvestri M, Forni F, et al. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Jun;14(3):369-72.

Schmid J, Hämmerle CH, Olah AJ, et al. Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 1994;5:125-30.

Schmidmaier G, Schwabe P, Strobel C, et al. Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury.* 2008 Sep;39 Suppl 2:S37-43.

Schmitt C, Lutz R, Doering H, et al. Bio-Oss® blocks combined with BMP-2 and VEGF for the regeneration of bony defects and vertical augmentation. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Apr;24(4):450-60.

Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, et al. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2013 May;24(5):576-85.

Sciadini MF, Johnson KD. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res*. 2000 Mar;18(2):289-302.

Seeherman H, Wosney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Jun;16(3):329-45.

Seeherman HJ, Li XJ, Bouxsein ML, et al. rhBMP-2 induces transient bone resorption followed by bone formation in a nonhuman primate core-defect model. *J Bone Joint Surg Am*. 2010 Feb;92(2):411-26.

Sfeir C. Signaling molecules for tissue engineering. In: Hollinger JO. *Bone tissue engineering*. 1. ed. Boca Raton: CRC Press; 2005. chapter 5, p.125-39.

Slotte C, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogeneic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18:795-806.

Slotte C, Lundgren D, Sennerby L. Bone morphology and vascularization of untreated and guided bone augmentation-treated rabbit calvaria: evaluation of an augmentation model. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Apr;16(2):228-35.

Solofomalala GD, Guery M, Lesiourd A, et al. Bone morphogenetic proteins: From their discoveries till their clinical applications. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2007;17:609-15.

Spagnoli DB, Marx RE. Dental implants and the use of rhBMP-2. *Dent Clin North Am*. 2011 Oct;55(4):883-907.

Steigman M, Garg AK. A comparative study of bilateral sinus lifts performed with platelet-rich plasma alone versus alloplastic material reconstituted with blood. *Implant Dent*. 2005 Sep;14(3):261-6.

Stravopoulos A, Becker J, Capsius B, et al. Histological evaluation of maxillary sinus floor augmentation with recombinant human growth and differentiation factor-5-coated β -tricalcium phosphate: results of a multicenter randomized clinical Trial. *J Clin Periodontol*. 2011;38:966-74.

Suba Z, Takacs D, Matusovits D, et al. Maxillary sinus floor grafting with beta-tricalcium phosphate in humans: density and microarchitecture of the newly formed bone. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Feb;17(1):102-8.

Szabó G, Huys L, Coulthard P, et al. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 May-Jun;20(3):371-81.

Szabó G, Suba Z, Hrabak K, et al. Autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations (2- and 3-dimensional computed tomographic, histologic, and histomorphometric evaluations): preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001 Sep-Oct;16(5):681-92.

Tachi K, Takami M, Zhao B, et al. Bone morphogenetic protein 2 enhances mouse osteoclast differentiation via increased levels of receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts. *Cell Tissue Res.* 2010 Nov;342(2):213-20.

Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials.* 2004;25:987-94.

Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, et al. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol.* 2006 Dec;33(12):922-8.

Terheyden H, Jepsen S, Möller B, et al. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res.* 1999 Dec;10(6):510-21.

Tetsch J, Tetsch P, Lysek DA. Long-term results after lateral and osteotome technique sinus floor elevation: a retrospective analysis of 2190 implants over a time period of 15 years. *Clin Oral Implants Res.* 2010 21:497-503.

Torres J, Tamimi F, Tresguerres IF, et al. Effect of combining platelet-rich plasma with anorganic bovine bone on vertical bone regeneration: early healing assessment in rabbit calvariae. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010 Jan-Feb;25(1):123-9.

Triplett RG, Nevins M, Marx RE, et al. Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Sep;67(9):1947-60.

Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.

Urist MR, Craven PL. Bone cell differentiation in avian species: with comments on multinucleation and morphogenesis. *Fed Proc.* 1970 Sep-Oct;29(5):1680-93.

Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1971;50:1392-406.

Villanueva-Alcojol L, Monje F, González-García R, et al. Characteristics of newly formed bone in sockets augmented with cancellous porous bovine bone and a resorbable membrane: microcomputed tomography, histologic, and resonance frequency analysis. *Implant Dent.* 2013;22:380-7.

Visser R, Arrabal PM, Becerra J, et al. The effect of an rhBMP-2 absorbable collagen sponge-targeted system on bone formation in vivo. *Biomaterials.* 2009 Apr;30(11):2032-7.

von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, et al. Lateral ridge augmentation and implant placement: an experimental study evaluating implant osseointegration in different augmentation materials in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001;16:343-54.

Wang EA, Rosen V, Cordes P, et al. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988 Dec;85(24):9484-8.

Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:2220-4.

Wang J, Zheng Y, Zhao J, et al. Low-dose rhBMP2/7 heterodimer to reconstruct Peri-implant bone defects: a micro-CT evaluation. *J Clin Periodontol.* 2012;39(1):98-105.

Wikesjö UME, Huang YH, Xiropaidis AV, et al. Bone formation at recombinant human bone morphogenetic protein-2-coated titanium implants in the posterior maxilla (Type IV bone) in non-human primates. *J Clin Periodontol.* 2008;35:992-1000.

Wikesjö UME, Qahash M, Thomson RC, et al. rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15:194-204.

Wikesjö UME, Qahash M, Polimeni G, et al. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *J Clin Periodontol.* 2008;35:1001-10.

Wiltfang J, Schlegel KA., Nkenke E, et al. Sinus floor augmentation with β -tricalcium phosphate (β -TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation?. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14:213-8.

Winer BJ, Brown DR, Michels KM. Statistical principles in experimental design. New York: McGraw – Hill; 1991.

Wozney JM. Bone morphogenetics proteins. *Prog Growth Factor Res.* 1989;1(4):267-80.

Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev.* 1992 Jun;32(2):160-7.

Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine (Phila Pa 1986).* 2002 Aug 15;27(16 Suppl 1):S2-8.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988 Dec 16;242(4885):1528-34.

Yamada Y, Tamura T, Hariu K, et al. Angiogenesis in newly augmented bone observed in rabbit calvarium using a titanium cap. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19:1003-9.

Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, et al. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Mar 18;220(2):366-71.

Yeom H, Blanchard S, Kim S, et al. Correlation between micro-computed tomography and histomorphometry for assessment of new bone formation in a calvarial experimental model. *J Craniofac Surg.* 2008 Mar;19(2):446-52.

Yuan H, Fernandes H, Habibovic P, et al. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:13614-9.

Zerbo IR, Zijderfeld SA, De Boer A, et al. Histomorphometry of human sinus floor augmentation using a porous beta-tricalcium phosphate: a prospective study. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Dec;15(6):724-32.

Zétola, A, Ferreira, FM, Larson R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in the treatment of mandibular sequelae after tumor resection. *Oral Maxillofac Surg*. 2011;15:169-74.

Zhang S, Doschak MR, Uludag H. Pharmacokinetics and bone formation by BMP-2 entrapped in polyethylenimine-coated albumin nanoparticles. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(28):5143-55.

Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S16-21.

Zijderfeld SA, Zerbo IR, van den Bergh JP, et al. Maxillary sinus floor augmentation using a β -tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 May-Jun;20(3):432-40.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas
Registro CONEP n.º 306
Aprovado em 16/05/2000

PARECER N.º 094/2009**REGISTRO CEP UNISA N.º 003/09**

Projeto de Pesquisa: "Avaliação do efeito da rhBMP 2 associada a substitutos ósseos em um modelo de regeneração óssea guiada em calvária de coelhos. Avaliação histológica e histomorfométrica através de imunofluorescência".

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Wilson R. Sendyk e
Pós-Graduanda: Cristiane Ibanhes Polo

Curso: Mestrado em Implantodontia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais da Lei 6.638, de 8 de maio de 1979, que estabelece as Normas para Prática Didáticas – Científica da Viviseção de Animais e os Princípios Internacionais para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa (**CEP-UNISA**), de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto "Avaliação do efeito da rhBMP 2 associada a substitutos ósseos em um modelo de regeneração óssea guiada em calvária de coelhos. Avaliação histológica e histomorfométrica através de imunofluorescência".

São Paulo, 16 de Setembro de 2009.

PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCI
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
UNISA - Universidade de Santo Amaro