AVALIAÇÃO DA OSTEOGÊNESE COM PROTEÍNAS ÓSSEAS MORFOGENÉTICAS (BMPs):

**Análise em defeitos na calvária e ao redor de
implantes de titânio em coelhos**

EDUARDO JOSÉ VERAS LOURENÇO

**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo, como parte
integrante dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Odontologia, área
de concentração em Periodontia.**

(Edição Revisada)

Bauru

2002

AVALIAÇÃO DA OSTEOGÊNESE COM PROTEÍNAS ÓSSEAS MORFOGENÉTICAS (BMPs):

**Análise em defeitos na calvária e ao redor de
implantes de titânio em coelhos**

EDUARDO JOSÉ VERAS LOURENÇO

**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo, como parte
integrante dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Odontologia, área
de concentração em Periodontia.**

**Orientadores: Prof. Dr. Alberto Consolaro (Brasil)
Prof. Dr. Thor Sam Lindholm (Finlândia)**

Doutorado Sanduíche – CNPq – 200700/9807

(Edição Revisada)

Bauru

2002

Ficha Técnica

Eduardo José Veras Lourenço – concepção original, experimento, interpretação dos resultados, digitalização das imagens, redação e digitação

Alberto Consolaro – orientação geral

T. Sam Lidholm – orientação dos experimentos na Finlândia

Peka Jalovaara - orientação dos experimentos na Finlândia

Oili Hietala – experimentos bioquímicos

Juha Tuukkanen – histotécnica, interpretação e digitalização das imagens

Aguinaldo Campos Júnior – orientação inicial

Valdir João Afonso – revisão final e vernáculo

Valéria – normatização técnica

Marcus Thame – cópias e encadernação

Lourenço, Eduardo José Veras

L934a Avaliação da osteogênese com proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs).

Análise em defeitos na calvária e ao redor de implantes de titânio em coelhos. /

Eduardo José Veras Lourenço - - Bauru, 2002.

174p.:il.; 7,41cm

Tese. (Doutorado) - - Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientadores: Prof. Dr. Alberto Consolaro (Brasil)

Prof. Dr. Thor Sam Lindholm (Finlândia)

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data: Bauru, 28 de setembro de 2002.

Eduardo José Veras Lourenço

16 de março de 1969	Nascimento
Rio de Janeiro –RJ	
1987-1990	Curso de Odontologia – Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro
1991-1993	Curso de Atualização em Periodontia – Hospital de Pesquisas e Reabilitação de Lesões Lábio-Palatais e PROFIS – USP – Bauru, São Paulo.
1994-1996	Curso de Mestrado em Odontologia, área de concentração em Periodontia na Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, SP.
1997-2002	Curso de Doutorado em Odontologia, área concentração em Periodontia, na Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, SP.
Janeiro - Julho 1999	Doutorado Sanduíche – Universidade de Oulu
Janeiro – Março 2000	Pesquisador Convidado – Universidade de Oulu
1999	Professor Assistente do Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
Associações	ABO – RJ – Associação Brasileira de Odontologia SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas IADR – International Association of Dental Research

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais

Almir (in memoriam) e Édia,

Pela educação, dedicação e amor de toda uma vida,

À minha Esposa Simone,

*Pela correção, profissionalismo e amor que me incentivam a buscar sempre
algo mais em tudo que faço,*

Ao meu irmão Antônio,

Exemplo de dedicação a sua família,

Aos meus sobrinhos, Rafael, Bruna e Carolina,

Incentivo de luta por um mundo com menos diferenças e mais amor.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos Professores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo:

Prof. Dr. Eulair Passanezi;

Prof. Dr. Deoclécio Nahás (in memoriam);

Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Greggi

Prof^a Dr^a Adriana Campos Passanezi Sant'ana

Pelos ensinamentos transmitidos, carinho, amizade e confiança que sempre fui distinguido.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Prof. Dr. Alberto Consolaro,

*Pelo exemplo de Profissionalismo e Amor à Universidade,
Pela Dedicação, Amizade e Respeito fundamentais para a
finalização deste trabalho*

AGRADECIMENTOS

Aos professores da Faculdade de Odontologia do Estado do Rio de Janeiro e aos professores do curso de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, responsáveis pela minha formação profissional, contribuindo direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, Adriana Passanezi, Alessandro, Ana Lúcia, Eduardo Matte, Emildre, Maria Fernanda, José Alfredo, Leonardo Magalhães, Lillian Nevauld, Luciana Gentile, Marly Sonohara e Sylvia Bastos, pelo carinho e respeito no decorrer do curso;

Aos queridos Damé, Mário Taba Júnior e Nilce dos Santos Melo, pelas discussões científicas e filosóficas e principalmente porque nos momentos mais difíceis sua amizade incondicional me fazia acreditar que todo o esforço valeria a pena;

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia, Esther, Ivânia, Marcos, Maria Ângela, Neusa e Edilaine pelo carinho com que sempre me receberam e pela amizade que consolidamos durante os anos de convivência;

Aos professores Dr. Luis Antônio de Assis Taveira, Dr^a. Denise Tostes de Oliveira e Dr^a. Vanessa e funcionários Bernadete, Cristina, Fátima, Jurão e Valdir da Disciplina de Patologia Bucal pelo acolhimento sincero e caloroso;

Aos funcionários da Biblioteca Ademir, César, Cybelle, Marcelo, Maria Helena, Rita, Valéria, Vera e ao Salvador pela atenção, disposição e carinho com que sempre atenderam aos meus questionamentos e solicitações;

À Direção da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa da Diretora Professora Doutora Maria Fidela de Lima Navarro, pela oportunidade concedida;

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do Presidente Professor Doutor José Carlos Pereira, pelas condições oferecidas para realização do curso;

Aos funcionários da Pós-Graduação, Aurélio e Giane pela atenção que sempre me dispensaram;

Ao grupo de professores do Bone Transplantation Research Group, Prof. Dr. T.S. Lindholm, Prof. Dr. Pekka Jalovaara e Prof^a. Dr^a. Oili Hietala pelo relacionamento profissional e pela amizade desenvolvida no curto período de convivência;

Aos funcionários Bone Transplantation Research Group, Prof. Dr. Zenhua Lu; ac. Mari Ulmanen, ac. Verena Wolfram, Elli Birr, Kirsi Kampainen, pelo carinho com que me receberam;

À Prof^a. Dr^a. Anna-Marja Voipio e os funcionários do Laboratório Central de Animais da Universidade de Oulu, pela atenção e profissionalismo durante a realização deste trabalho

Ao Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo;

Agradeço também a todos que de forma silenciosa ou explícita, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiv
1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1 História e desenvolvimento das Proteínas Ósseas Morfogenéticas.....	06
2.1.1 Formação óssea heterotópica.....	06
2.1.2 Descoberta das Proteínas Ósseas Morfogenéticas.....	07
2.1.3 Isolamento das Proteínas Ósseas Morfogenéticas.....	09
2.1.4 Difusão transmembrana.....	10
2.1.5 Purificação.....	11
2.2 Estrutura, forma e classificação das BMPs.....	12
2.2.1 Estrutura molecular e relação com a superfamília TGF- β	12
2.2.2 BMP como um morfogene.....	15
2.3 Mecanismo de Ação.....	17
2.3.1 A função embrionária das BMPs.....	17
2.3.2 BMPs em outros tecidos.....	19
2.3.3 BMPs e a indução óssea pós-fetal.....	19
2.3.4 Reparo em osso endocondral e intramembranoso.....	20
2.4 Defeitos de tamanho crítico em calvária.....	20
2.5 Carreadores.....	21
2.5.1 Colágeno.....	21
2.5.2 Carbonato de cálcio.....	22
2.5.3 Hidroxiapatita.....	24
2.5.4 Polímeros.....	26

2.6 Estudos em animais.....	27
2.7 BMPs e a periodontia	33
2.8 BMPs e a implantologia.....	36
2.9 BMPs e levantamento de assoalho de seio maxilar.....	38
2.10 Estudos em humanos.....	40
2.11 Osteoindução <i>in vivo</i> por transferência gênica.....	43
3 PROPOSIÇÃO.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Experimento I.....	48
4.1.1 Origem, seleção e manutenção dos animais.....	48
4.1.2 Extração das Proteínas Ósseas Morfogenéticas.....	48
4.1.3 Carreadores.....	50
4.1.3.1 Carbonato de cálcio.....	50
4.1.3.2 Colágeno.....	50
4.1.4 Combinação das BMPS aos carreadores.....	53
4.1.4.1 Carbonato de cálcio em grânulos e colágeno.....	53
4.1.4.2 Carbonato de cálcio em blocos e colágeno.....	53
4.1.5 Amostras controle.....	54
4.1.6 Grupos experimentais.....	54
4.1.7 Técnica cirúrgica.....	56
4.1.7.1 Anatomia da região operada.....	56
4.1.7.2 Anestesia.....	56
4.1.7.3 Criação dos defeitos em calvária.....	57
4.1.8 Obtenção dos espécimes.....	58

4.1.9	Preparo dos espécimes para corte microscópico.....	60
4.1.9.1	Coloração.....	61
4.1.10	Análise dos espécimes.....	62
4.1.10.1	Critérios para análise tomográfica da densidade óssea.....	62
4.1.10.2	Critérios para análise microscópica da densidade óssea.....	64
4.1.11	Análise estatística dos resultados.....	64
4.1.12	Aspectos éticos e legais.....	66
4.2	Experimento II.....	67
4.2.1	Origem, seleção e manutenção dos animais.....	67
4.2.2	Extração das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs).....	67
4.2.3	Carreadores	67
4.2.3.1	Carbonato de cálcio.....	67
4.2.3.2	Colágeno.....	68
4.2.4	Combinação das BMPs aos carreadores.....	68
4.2.4.1	Carbonato de cálcio em grânulos e coláge.....	68
4.2.5	Amostras controle.....	68
4.2.6	Grupos experimentais.....	69
4.2.7	Técnica cirúrgica.....	70
4.2.7.1	Anestesia.....	70
4.2.7.2	Inserção dos implantes.....	70
4.2.8	Obtenção dos espécimes.....	71
4.2.9	Preparo dos espécimes para corte microscópico.....	71
4.2.9.1	Coloração.....	73
4.2.10	Análise dos espécimes.....	73
4.2.10.1	Critérios para a análise do percentual de osseointegração.....	74
4.2.10.2	Critérios para a análise microscópica do volume ósseo.....	74

4.2.11	Análise estatística dos resultados.....	76
4.2.12	Aspectos éticos e legais.....	76
5	RESULTADOS.....	78
5.1	Experimento I.....	79
5.1.1	Análise microscópica.....	79
5.1.1.1	Grupo I.....	79
5.1.1.1.1	Quatro semanas.....	79
5.1.1.1.2	Seis semanas.....	80
5.1.1.1.3	Dez semanas.....	80
5.1.1.2	Grupo II.....	81
5.1.1.2.1	Quatro semanas.....	81
5.1.1.2.2	Seis semanas.....	81
5.1.1.2.3	Dez semanas.....	82
5.1.1.3	Grupo III.....	82
5.1.1.3.1	Quatro semanas.....	82
5.1.1.3.2	Seis semanas	83
5.1.1.3.3	Dez semanas	83
5.1.2	Análise descritiva.....	84
5.1.3	Análise estatística.....	88
5.1.3.1	Gráficos e tabelas.....	88
5.1.4	Análise tomográfica.....	100
5.1.4.1	Grupo I.....	100
5.1.4.2	Grupo II.....	101
5.1.4.3	Grupo III.....	102
5.1.5	Análise descritiva.....	103
5.1.6	Análise estatística.....	106
5.1.6.1	Gráficos e tabelas.....	106

5.2	Experimento II.....	121
5.2.1	Análise microscópica.....	121
5.2.1.1	Grupo I – Subgrupo A.....	121
5.2.1.1.1	Quatro semanas.....	121
5.2.1.1.2	Seis semanas.....	122
5.2.1.1.3	Dez semanas.....	122
5.2.1.2	Grupo I – Subgrupo B.....	123
5.2.1.2.1	Quatro semanas.....	123
5.2.1.2.2	Seis semanas.....	123
5.2.1.2.3	Dez semanas.....	124
5.2.1.3	Grupo II – Subgrupos A e B.....	124
5.2.1.3.1	Quatro semanas.....	124
5.2.1.3.2	Seis semanas.....	125
5.2.1.3.3	Dez semanas.....	125
5.2.2	Análise descritiva.....	126
5.2.3	Análise estatística.....	128
5.2.3.1	Gráficos e tabelas.....	128
6	DISCUSSÃO.....	136
6.1	Da concepção do trabalho.....	137
6.2	Dos modelos de estudo.....	138
6.2.1	Em animais.....	138
6.2.2	Dos carreadores.....	139
6.2.3	Das proteínas ósseas morfogénicas.....	140
6.2.4	De estatística.....	143

6.3 Do experimento I.....	143
6.3.1 Defeitos de tamanho crítico em calvária.....	143
6.3.2 Dos resultados microscópicos.....	144
6.3.3 Dos resultados microscópicos.....	146
6.4 Do experimento II.....	147
6.4.1 Implantes de titânio em tíbia de coelho.....	147
6.4.2 Dos resultados.....	148
6.4.2.1 Microscópicos.....	148
6.5 Das perspectivas e aplicações clínico terapêuticas.....	150
7 CONCLUSÕES.....	152
7.1 Experimento I.....	153
7.2 Experimento II.....	154
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
ABSTRACT	

RESUMO

Objetivos. Avaliar a formação óssea em defeitos ósseos criados em calvárias de coelhos, aplicando proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) carregadas pelo compósito carbonato de cálcio-colágeno. Analisar o percentual linear de contato osso-implante e o volume ósseo percentual no interior das roscas de implantes de titânio, inseridos em alvéolos cirúrgicos, preparados em tíbias de coelho e preenchidos pelo compósito carbonato de cálcio-colágeno combinado à BMPs. **Material e métodos. Experimento I:** Defeitos criados cirurgicamente em calvária de 45 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) brancos, raça Nova Zelândia, gênero masculino. Nos sítios teste, preencheu-se estes defeitos com rBMPs extraídas de ossos longos de renas (*Rangifer tarandus*) combinadas ao compósito carbonato de cálcio-colágeno, tanto em forma granular quanto em forma de bloco. Nos sítios controle, preencheu-se os defeitos com osso autógeno (controle positivo), com as duas formas do compósito. O controle negativo não recebeu nenhum tipo de tratamento. **Experimento II:** Confeccionou-se alvéolos cirúrgicos nas tíbias de 30 coelhos. Previamente a inserção de implantes rosqueáveis de titânio, apresentando 3,75mm de diâmetro e 11,5mm de comprimento, preencheu-se os alvéolos dos sítios teste com compósito carbonato de cálcio-colágeno combinado a rBMP. Preencheram-se os sítios controle com carbonato de cálcio-colágeno, colágeno e; no controle negativo nenhum tipo de material foi inserido. **Resultados. Experimento I:** Após os períodos de quatro, seis e dez semanas os animais foram submetidos à eutanásia. A BMP extraída de rena e combinada ao compósito carbonato de cálcio-colágeno promoveu osteogênese semelhante à obtida quando utilizado osso autógeno e superior aos controles de compósito e coágulo sangüíneo. A análise tomográfica apresentou um quadro de resultados semelhantes aos obtidos com a histomorfometria, entretanto, superestimados para os períodos iniciais de observação, nos grupos que receberam enxerto do compósito. O compósito carbonato de cálcio-colágeno isoladamente ou combinado a BMP não induziu reações inflamatórias desfavoráveis. **Experimento II:** A BMP extraída de rena e combinada ao compósito carbonato de cálcio-colágeno promoveu osteogênese superior aos controles do compósito, do colágeno e do coágulo sangüíneo, provendo à superfície do implante de titânio maior percentual de contato linear e maior volume percentual de osso no interior de suas roscas. **Conclusões:** O compósito carbonato de cálcio-colágeno combinado a BMP extraída de rena possui capacidade osteogênica em sítios ortotópicos. A associação de materiais de enxerto contendo rBMPs a implantes de titânio aumenta a qualidade do contato osso-implante, permitindo possivelmente uma redução do tempo de espera entre a cirurgia de inserção de implantes e o tratamento reabilitador protético, nas situações de osso pouco denso e com espaços medulares amplos.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da técnica para inserção de implantes osseointegrados ampliou as possibilidades de reabilitar proteticamente pacientes desdentados totais e parciais. Os altos índices de sucesso obtidos em trabalhos longitudinais e multicêntricos^{1,2,11,12,130} ofereceram grande credibilidade a este tipo de terapia. Nestes índices, os pacientes não beneficiados com o tratamento, pela quantidade insuficiente de osso para a inserção de implantes, não estavam relacionados. Além da limitação na indicação, as falhas apresentavam-se, em sua maioria, associadas a implantes inseridos em osso com espaços medulares amplos e poucas áreas corticais³⁸.

O aumento da quantidade de osso com o objetivo de permitir a inserção de implantes se realiza por meio de várias técnicas e diferentes tipos de materiais, incluindo-se o osso autógeno; osso alógeno; hidroxiapatita e substitutos ósseos compostos^{23,39,73,114,120,129}. O osso autógeno apresenta os resultados mais previsíveis de sucesso, enquanto os biomateriais citados possuem diferentes índices de sucesso e sua utilização deve seguir critérios rígidos de seleção baseando-se no conhecimento da biologia da formação e reparo ósseo.

O suprimento sangüíneo adequado, a formação e a manutenção do coágulo são os fatores necessários para desencadear a cascata de eventos inflamatórios que levarão ao reparo de um defeito ósseo. Esta reparação tecidual possui limitações quando o defeito excede o tamanho crítico para aquela região, idade e espécie a ser tratada. Estas restrições geram dificuldades na resolução de tratamentos na ortopedia, na cirurgia bucomaxilofacial, na periodontia e na implantodontia.

A busca por um substituto ósseo ideal intensificou-se nas últimas décadas disponibilizando ampla variedade de materiais sintéticos como a hidroxiapatita, vidro bioativo, carbonato de cálcio e o fosfato tricálcico. Estes materiais possuem capacidade

apenas de osteocondução e geralmente estão associados a enxertos autógenos ou alógenos, como o osso liofilizado desmineralizado e o mineralizado.

O material ideal para enxerto deve; promover osteogênese, possuindo ou permitindo a incorporação de citocinas e fatores de crescimento responsáveis pelo mecanismo de osteoindução; permitir a angiogênese e a osteocondução, estar disponível em quantidade suficiente para o tratamento proposto; ser de fácil manipulação e aplicabilidade; apresentar estrutura física capaz de manter o espaço para a formação óssea; ser reabsorvível e não gerar resposta imune.

O enxerto autógeno preenche basicamente todos estes requisitos. Considerado o melhor material para este propósito, exceto pela sua limitada disponibilidade e pela morbidade relacionada a sua obtenção aumentar de forma diretamente proporcional a sua demanda quantitativa.

As propriedades osteocondutoras e osteoindutoras da matriz óssea desmineralizada foram descobertas por URIST¹²⁵, em 1965. A extração e purificação de citocinas capazes de exercerem efeitos sobre a formação de novo osso foram investigadas e identificadas^{123,124,126,127,138}. Estas moléculas, denominadas proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs)^a, induzem reações celulares que ativam células mesenquimais perivasculares a diferenciarem-se em células capazes de formar osso. Em todas formas, as BMPs nativas, parcialmente purificadas ou recombinantes demonstraram a indução da formação de novo osso quando implantadas tanto em sítios ectópicos, quanto em sítios ortotópicos. Estes extratos consistem não apenas em um tipo de proteína, mas várias proteínas diferentes pertencentes a superfamília de fatores de crescimento β transformadores.

Uma vez isoladas estas proteínas, qual a melhor forma de levá-las até o sítio operatório quando necessário? Os seus efeitos apresentariam difusibilidade para as menores áreas como as reentrâncias implantares?

^a Bone morphogenetic proteins

Baseando-se nestes questionamentos e futura aplicabilidade clínica, planejou-se este trabalho a partir da compreensão dos eventos biológicos relacionados ao processo de reparação óssea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para auxiliar o reparo ou formar novo osso, vários materiais implantares são utilizados, em odontologia e medicina. Os materiais que simplesmente fornecem um arcabouço para o crescimento vascular e posterior calcificação são conhecidos como osteocondutores. Os materiais denominados osteoindutores possuem fatores de crescimento, que regulam a proliferação celular de tecidos diferenciados. Os morfogenes, incluindo a proteína óssea morfogenética, são osteoindutores controladores de substâncias que iniciam o desenvolvimento de tecidos, órgãos e sistemas pela indução de células indiferenciadas a conversão fenotípica.

Apesar dos enxertos ósseos autógenos possuírem propriedades osteoindutivas e osteocondutivas, a quantidade limitada e a morbidade relacionada a sua remoção podem limitar suas indicações, conduzindo a necessidade de utilização de substitutos ósseos.

Muitos fatores de crescimento presentes no osso foram isolados e sua capacidade para estimular o crescimento ósseo testada, estas proteínas atuam sobre células osteoprogenitoras presentes no osso em desenvolvimento ou no osso pré-existente e seus efeitos são limitados em defeitos ósseos amplos e praticamente nulos na formação óssea na ausência de células osteoprogenitoras. A vantagem da utilização de morfogenes, como as BMPs, para promover a formação óssea constitui-se na possibilidade deste evento ocorrer na ausência de células osteoprogenitoras.

A descoberta chave realizada por MARSHALL URIST¹²⁵, em 1965, consistiu na implantação de fragmentos ósseos desmineralizados tanto subcutaneamente quanto intramuscularmente em animais. Estes fragmentos possuíam a capacidade de induzir a formação óssea ectópica. A procura pelos fatores responsáveis por esta indução resultou na identificação da família das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs).

Estas proteínas possuem papel crucial no crescimento e na diferenciação de uma variedade de tipos celulares, incluindo os osteoblastos e são os únicos morfogenes identificados até hoje nos mamíferos não sendo detectados apenas durante o período embrionário, mas também durante o desenvolvimento pós-fetal.

Com o desenvolvimento das pesquisas com BMPs e a possibilidade desta se tornar aplicável terapeuticamente, cabe-nos revisar a história e o desenvolvimento das BMPs; sua estrutura e classificação; os mecanismos de ação embrionário e pós-fetal; os principais sistemas utilizados como carreadores e sua aplicação em estudos clínicos.

2.1 História e desenvolvimento das Proteínas Ósseas Morfogenéticas

2.1.1 Formação óssea ectópica

A formação óssea em tecidos extra-esqueléticos sob certas condições patológicas é observada há muito tempo. Esta formação óssea é denominada heterotópica ou ectópica, considerada como osso verdadeiro e contém todas as características morfológicas e metabólicas do osso ortotópico, incluindo medula óssea.

A formação heterotópica de osso pode ocorrer em função de trauma muscular, de miosite ossificante traumática, de trauma cirúrgico, de tumores derivados de células osteogênicas ou condrogênicas, de osteossarcoma, de osteoma osteóide, de osteoblastoma e uma alteração do tecido conjuntivo, denominada de miosite ossificante progressiva, que leva a alterações no desenvolvimento esquelético e ossificação progressiva dos tecidos moles. O como e o porquê os tecidos extra-ósseos ossificam sempre interessou a comunidade científica, não apenas pelo aspecto patológico, mas na esperança de utilizar estas informações na reparação do tecido ósseo. Uma das explicações mais comuns era o envolvimento do periósteo como fator importante levando à calcificação, especialmente em áreas traumatizadas. Isto não explicaria,

entretanto as causas da formação óssea ectópica na ausência de trauma ou em áreas distantes de perióstio. Algumas décadas atrás defendeu-se a teoria de que a presença de remanescentes embriogênicos em vários tecidos responderiam à alguns estímulos para sua transformação em tumores epiteliais ou osteogênicos. Outra teoria preconizava que osso, cartilagem e tecido conjuntivo seriam morfologicamente equivalentes e possuiriam a capacidade de substituir um ao outro⁵⁵.

2.1.2 A descoberta das Proteínas Ósseas Morfogenéticas

No início da década de 60, vários pesquisadores investigavam o mecanismo de calcificação nos tecidos extra ósseos. Em uma série de experimentos planejados para testar sua teoria da calcificação em 1965, URIST¹²⁵ e colaboradores descobriram por serendipidade⁴⁴ que as amostras de controle de osso descalcificado e não tratado implantado na musculatura de coelhos e ratos resultaram na formação de nova cartilagem e de osso. Isto levou à hipótese da formação óssea por auto-indução, na qual uma célula indutora - um monócito - atua sobre uma célula induzida - um macrófago ou um pericito - causando a diferenciação tanto para uma célula osteoprogenitora quanto para uma célula condroprogenitora¹²⁵. Entretanto URIST¹²⁵ não foi o primeiro a aludir sobre a teoria da formação óssea por auto-indução ou da hipotética substância que ele mais tarde chamaria de “proteína óssea morfogenética”.

Experimentos em série foram conduzidos para estudar a reparação óssea em 1938, por LEVANDER⁵⁶, que relatou inicialmente a implantação de fragmentos ósseos vivos de 1,0 a 1,5cm de comprimento tanto subcutaneamente quanto intramuscularmente. Estes fragmentos eram inicialmente tratados removendo-se o perióstio, e em alguns casos uma camada óssea superficial também era removida. Após a obtenção de osso formado ectopicamente, LEVANDER⁵⁶ demonstrou que nem o perióstio e nem as células da superfície ou do interior do enxerto, eram as responsáveis pelo crescimento ósseo. Pelo fato de ser evidente que o novo osso era

formado no tecido mesenquimal que circundava o enxerto, ele propôs que deveria haver algum agente estimulante originado do enxerto, e que possivelmente seria uma substância solúvel no tecido linfático. Em experimentos subsequentes, extratos alcoólicos de osso eram injetados intra-muscularmente, resultando em 22% de sítios formando cartilagem ou osso. Oitenta controles receberam injeção alcoólica de similar concentração e volume, não resultando em desenvolvimento de osso ou cartilagem. Concluiu que havia uma substância possível de ser extraída do osso e capaz de ativar células mesenquimais para formar tecido ósseo. Ele raciocinou como sendo uma razoável explicação para a formação de osso após trauma muscular, assim como a possibilidade desta substância estar no sangue e causar as outras formas de osteogênese ectópica.

Em experimentos de implantação de cartilagem e extratos alcoólicos de epífises cartilaginosas dos ossos longos de coelhos, LACROIX⁵³, em 1945, constatou que a formação óssea observada era decorrente de um fenômeno de indução originado de uma substância ou de um grupo de substâncias dentro da cartilagem que ele denominou de osteogenina.

Alguns anos depois, HEINEN et al.³¹, em 1949, desafiaram a hipótese da existência de uma substância osteogênica específica conforme propunham LEVANDER⁵⁶, 1938 e LACROIX⁵³, em 1945. Seu grupo descobriu que um número de animais desenvolvia osso e cartilagem após a injeção de álcool puro. Posteriores investigações com outras substâncias irritantes revelaram algumas situações interessantes. A quantidade de osso e cartilagem formada era aumentada nos animais que se exercitavam e as maiores quantidades de osso eram formadas em animais mais jovens quando comparados a animais mais velhos. Concluíram que esta substância osteogênica hipotética não podia ser provada, e que infelizmente as investigações anteriores eram realizadas em coelhos, animais que manifestam alta incidência de formação de cartilagem e de osso ectópicos, após vários tipos de experimentos.

2.1.3 Isolamento das Proteínas Ósseas Morfogenéticas

Apesar de não ter sido URIST¹²⁵, em 1965, o primeiro a especular sobre a existência de uma substância osteoindutora, deve ser creditado a ele a maior parte do trabalho precoce envolvido no isolamento da proteína óssea morfogenética. Não saber exatamente como ou o que procurar, o levou a muitos anos de pesquisa, resultando em muitas informações em relação aos métodos e procedimentos para obter resultados positivos para a formação óssea, mas pouco em relação sobre o que especificamente induzia esta formação.

Os prévios relatos conflitantes de investigadores sobre o uso de matriz óssea descalcificada com o objetivo de preencher defeitos ósseos cirurgicamente, levaram ao pensamento de que para se avaliar adequadamente a capacidade indutora óssea de um implante de osso desmineralizado, este implante deveria ser inserido longe do osso ortotópico, subcutaneamente ou intramuscularmente¹²⁸. Várias espécies de animais eram testadas com implantes de osso desmineralizado utilizando uma variedade de agentes químicos com respeito a temperatura, concentração e tempo.

Revisando suas próprias observações, assim como a literatura prévia sobre matriz óssea descalcificada, VAN DE PUTTE; URIST¹²⁸ perceberam que implantes de osso descalcificado tanto em ácido cítrico como em EDTA^a geravam resultados negativos, e osso descalcificado em ácido hidrocloreídrico induzia a osteogênese. Matriz óssea descalcificada em ácido nítrico promovia intensa reação inflamatória, rápida desintegração do implante e ausência de formação óssea. Implantes de osso desmineralizado em baixas concentrações de EDTA a 4°C e pH neutro produzia formação óssea limitada em ratos e coelhos, mas nenhuma formação óssea em porcos¹²⁸.

^a ácido etilenodiamino tetracético

O osso descalcificado em HCl^a diluído (0,6N) a 2°C em um período menor que 3 a 5 dias seguido de lavagem em 0,15M NaCl^b ou álcool a 70% produziu os melhores resultados positivos. Modificações deste método de preparo auxiliaram a localizar os componentes presentes no osso que continham propriedades morfogenéticas.

No final da década de 60, existiam evidências demonstrando a substância responsável pela indução óssea intimamente relacionada ao colágeno do osso. Entretanto era incerto se a propriedade indutora ocorria devido especificamente às características químicas ou se a estrutura física do colágeno de alguma maneira direcionava o mecanismo de diferenciação das células mesenquimais¹²⁴.

2.1.4 Difusão transmembrana

A pulverização da matriz óssea promovia a inativação do substrato indutor, inicialmente suposto tanto pela desnaturação da estrutura protéica¹²⁴ quanto pela alteração da sua geometria¹⁰². Um experimento proposto para analisar a atividade morfogenética de vários tamanhos de partículas ósseas utilizava preparações de matriz óssea pulverizada em um moedor por congelação à -199°C com o objetivo de minimizar a possível desnaturação protéica resultante do aquecimento. Câmeras de difusão confeccionadas de membrana de acetilcelulose com 150µm de espessura e possuindo poros de 0,45µm também eram utilizadas para o propósito de determinar se as características físicas das partículas por si próprias seriam um importante fator, ou se a inatividade observada pelas menores partículas era um fator de rápida difusão e desaparecimento do substrato indutor antes das células capazes de indução pudessem chegar ao local. Câmeras de difusão com espessura variando de uma a cinco membranas eram utilizadas para este experimento. Implantes controle eram colocados do lado de fora das membranas, e nestes, as partículas com tamanho variando entre

^a ácido clorídrico

^b cloreto de sódio

400-100 μ m resultaram na formação de novo osso, enquanto que partículas variando entre 79-149 e 44-74 μ m não produziam novo osso.

Em câmeras com apenas uma membrana, partículas de 44-74 μ m não produziam novo osso e em câmeras duplas os sítios de teste produziam osteogênese por meio da membrana. Também demonstrou-se que, com o maior tamanho de partícula, 400-1000 μ m, a quantidade de novo osso formado no lado externo das membranas diminuía da membrana mais próxima para a membrana mais distante. Portanto, a quantidade de novo osso formado era inversamente proporcional à distância que a propriedade morfogénica óssea deveria percorrer. Este experimento embasou a evidência de uma propriedade morfogénica de rápida difusão quando previamente não se acreditava em sua existência¹²⁶. Por meio da retenção desta propriedade de difusão por meio de várias membranas, até as menores partículas que são mais solúveis e teriam sua desintegração mais rápida eram capazes de induzir a formação de novo osso. Um estudo posterior¹¹⁶ revelou que a pulverização das partículas ósseas em menos de 44 μ m levava à inativação da propriedade morfogénica óssea, muito provavelmente pela formação de radicais livres da absorção de energia e quebra da cadeia molecular, ambas levando à desnaturação protéica. Estes estudos auxiliaram a confirmar que a propriedade osteoindutora na matriz óssea era o resultado de uma proteína óssea morfogénica não colagênica.

2.1.5 Purificação

O isolamento e a purificação das BMPs tem sido difícil pelo fato de que tão pouco desta está presente no osso quando comparado com outras proteínas não colagênicas e também devido à sua relativa insolubilidade. No início da década de 80, métodos que utilizavam grandes quantidades de osso e um número de passos para separar diferentes frações das proteínas não colagênicas produziu um grupo de componentes com baixo peso molecular que possuíam capacidade osteoindutora.

Estudos preliminares indicaram que o peso molecular da BMP bovina variava entre 12 e 30 kDa^a com fortes evidências para uma BMP com 17 a 18kDa¹²⁷.

Com o objetivo de determinar quais frações ou subfrações eram capazes de induzir a formação óssea, utilizou-se um método de reconstituição¹⁰². A proteína a ser testada era reconstituída com matriz óssea colágena desprovida de BMP, e implantada subcutaneamente. A formação de osso indicava uma resposta positiva para a proteína implantada.

O principal avanço no campo de pesquisa de BMP ocorreu quando em 1988, através de SDS-poliacrilamida^b gel de eletroforese, um grupo de proteínas de 30kDa de osso bovino foram identificadas e desenvolvidos clones recombinantes para cada uma. Sequências de aminoácidos de 16, 18 e 30kDa foram utilizados para desenvolver sondas para varreduras de bibliotecas de DNA complementar (cDNA)^c bovina. Os clones recombinantes obtidos eram então utilizados para a varredura de bibliotecas de cDNA humanas correspondentes. Portanto, as recombinantes humanas BMP-1^d, BMP-2A^e e BMP-3^f foram obtidas e suas características bioquímicas e biológicas, incluindo suas seqüências de aminoácidos, determinadas¹³⁸.

2.2 Estrutura, formas e classificação das BMPs

2.2.1 Estrutura molecular e relação com a superfamília TGF-**β**

Das nove BMPs relatadas na literatura até hoje, oito delas, BMP-2 a 9, estão relacionadas umas às outras. Além disso, devido à sua seqüência de aminoácidos, a BMP-2 até a BMP-9 são classificadas como pertencentes à superfamília do fator de

^a Dalton – unidade de massa atômica – representado por Da – IUPAC Golden Book.

^b SDS-PAGE – sodium dodecyl poliacrilamida gel de eletroforese

^c complementary deoxyribonucleic acid

^d bone morphogenetic protein-1

^e bone morphogenetic protein-2A

^f bone morphogenetic protein-3

crescimento beta transformador - TGF- β^a . Assim como outros membros da superfamília TGF- β , eles são derivados das cadeias precursoras polipeptídicas variando o tamanho entre 396-513 aminoácidos¹³⁸. Cada precursor é composto por uma sequência líder N-terminal secretora, e uma região C-terminal altamente conservada contendo 114-139 aminoácidos⁹⁰.

A conservação dos aminoácidos da região C-terminal, incluindo uma série de sete resíduos de cisteína completamente conservados caracterizam os membros da superfamília TGF- β . Uma exceção envolve a BMP-8^b, que contem uma oitava cisteína nesta região⁹⁰.

A parte madura ou a molécula de BMP ativa é derivada do terminal carboxi da cadeia precursora, e como outros membros da superfamília TGF- β , possui a forma de um dímero. Se a BMP existe apenas como um homodímero não se sabe. Assim como outros membros da família TGF- β , conhecidos por existirem como heterodímeros, existe a possibilidade de que as BMPs poderiam permitir combinações múltiplas de monômeros com potencial para diversas atividades.

As proteínas BMP-2 a BMP-8 apresentam-se divididas em três subgrupos, baseando-se em similaridades na sua sequência de aminoácidos. A BMP-2 até BMP-4^c formam um grupo, possuindo 92% de aminoácidos idênticos dentro do domínio de sete cisteínas da região madura. As proteínas BMP-5^d até BMP-8 formam um segundo grupo, possuindo 82% de identificação nesta região. Estes dois subgrupos possuem cerca de 59% de homologia e apenas 45% de homologia com a BMP-3, que forma um grupo isoladamente. A BMP-9^e possui de 50 a 55% de homologia com as BMPs 2,4,5,6 e 7⁵⁵.

^a transforming growth factor- β

^b bone morphogenetic protein-8

^c bone morphogenetic protein-4

^d bone morphogenetic protein-5

^e bone morphogenetic protein-9

Como parte da superfamília TGF- β , relaciona-se as BMPs com as moléculas *dpp*^a e a *Vgr1*, críticas na diferenciação e processo de desenvolvimento embrionário. Em adição ao seu papel no desenvolvimento embriogênico, as proteínas BMP-2 a BMP-8 têm mostrado induzir a formação de cartilagem e osso na vida pós fetal.

As TGF- β , em suas várias formas são similares às BMPs no que se refere à sua ativa expressão durante o processo de desenvolvimento embrionário até a idade adulta. A TGF- β também tem demonstrado efeitos estimulatórios em osso. Entretanto, as BMPs são as únicas moléculas conhecidas capazes de formar cartilagem e osso em um sítio ectópico. É interessante notar que as BMPs compartilham maior sequência homóloga com algumas das outras proteínas do que com as TGF- β 1, - β 2 e - β 3. De uma maneira geral, as seqüências homólogas de aminoácidos dentro da região C-terminal entre todos os membros da superfamília TGF- β varia entre 25 a 80%.

A proteína *Drosophila dpp*, importante na especificação dorso-ventral durante a embriogênese, é intimamente relacionada com a BMP-2 e a BMP-4, possuindo em torno de 75% de seqüências homólogas para ambas. Sugere-se que uma dessas BMPs é a homóloga humana da proteína *dpp*¹³⁸, e que a *dpp*, BMP-2 e BMP-4 seriam derivados atuais altamente conservados de um gene que estava presente em ancestrais comuns à linhagem dos artrópodes e vertebrados.

Outros membros da superfamília da TGF- β incluem o *Vgr1*^b, um produto de gene expressado durante a embriogênese do camundongo e que é homólogo à BMP-6¹⁶⁵; os fatores de crescimento/diferenciação GDF-5^c, -6 e -7 que formam um subgrupo de fatores relacionados às BMPs; as substâncias inibidoras Mullerian (MIS), que causam a regressão do ducto de Mullerian durante a maturação sexual masculina; o *Xenopus Vgr1*, um produto do gene restrito a um vegetal, e as inibinas e activinas, implicadas na liberação de hormônios da glândula pituitária.

^a drosophila protein

^b *Vgr1* – relacionado ao vegetal

^c growth differentiation factor

Como diferentes grupos isolaram e identificaram as BMPs em diferentes sistemas, outros nomes são utilizados como referência à essas moléculas. A osteogenina, uma molécula purificada do osso bovino é equivalente a BMP-3. A BMP-6 é o homólogo humano da *Vgr1* murina. A BMP-7 e a BMP-8 são também conhecidas como OP-1^a (osteopontina-1) e OP-2^b (osteopontina-2), respectivamente.

A BMP-1, em função de sua sequência de aminoácidos, não pode ser classificada como pertencente à superfamília TGF- β , e não possui capacidade de induzir a formação óssea. Ela possui sequência de aminoácidos similares às proteases de lagosta, e também produz uma sequência similar ao fator de crescimento epidérmico, e pode possuir alguns efeitos sinérgicos com outras moléculas de BMP¹³⁸.

2.2.2 BMP como um morfogene

No artigo clássico de URIST¹²⁵ em 1965, intitulado, “Bone: formation by autoinduction”, o princípio de indução é utilizado para explicar os resultados obtidos após a implantação de matriz óssea desmineralizada. Define-se indução como “uma interação entre um tecido indutor e outro tecido de resposta, com o resultado no qual o tecido de resposta sofre alterações em sua direção de diferenciação”¹²⁵. Os fatores que influenciam o mecanismo de indução incluem o tempo de resposta, considerando-se tanto o tempo de exposição necessário assim como o tempo que o indutor é capaz de induzir, a localização ou proximidade de células competentes capazes de responder e a concentração do indutor. Em termos de osteoindução, temos uma substância indutora – BMP - atuando sobre uma célula capaz de responder - célula mesenquimal indiferenciada - transformando-a em uma célula osteoprogenitora capaz de formar osso.

^a osteopontina-1

^b osteopontina-2

Existem outras substâncias, como os fatores de crescimento, que são responsáveis pelo crescimento e regulação óssea. Entretanto estes fatores, como o TGF- β , não são capazes de induzir a formação óssea em sítios ectópicos, diferença marcante entre a capacidade e função dos fatores de crescimento e das proteínas ósseas morfogenéticas. Preferencialmente estes atuam como moduladores ou estimuladores de células osteoprogenitoras em sítios ortotópicos em desenvolvimento ou pré-existentes para formar cartilagem e osso⁹⁰.

A maior compreensão da função que as BMPs executam durante o desenvolvimento embrionário suscita o questionamento em relação ao termo indução. As BMPs não possuem apenas efeitos sobre a direção da diferenciação celular, elas atuam também como sinais de posição e provêm informações necessárias para o padrão de informações. Em função destas características, as BMPs se ajustam apropriadamente na categoria de morfogenes⁵⁵.

O termo morfogene se relaciona com o padrão de formação pela distribuição das substâncias morfogenéticas. Apesar da classificação de sinais de posição ser similar a do processo indutivo, em termos de alcance e localização do sinal e do tipo de concentração e informação dispersada, existem diferenças marcantes entre as duas. Primariamente a molécula morfogene-sinalizadora especifica o padrão, enquanto um sinal indutor não o faz.

A extensão em que estes processos, de indução e morfogenético, estão relacionados ainda não está clara. O entendimento atual dos sistemas sinalizadores que orquestram a expressão dos genes, no tempo e no espaço durante o desenvolvimento ainda é bastante limitada. Provavelmente as BMPs são verdadeiros morfogenes apenas no estágio de desenvolvimento embrionário, e posteriormente na idade adulta atuariam como fatores osteoindutores¹³⁷.

2.3 Mecanismos de ação

2.3.1 A função embrionária das BMPs

Seguindo a descoberta das BMPs no modelo de indução pós-fetal, muito conhecimento acumulou-se a respeito das BMPs no campo da embriologia. Como as BMPs estão intimamente relacionadas umas às outras, e cada uma, desde a BMP-2 até a BMP-8 podem iniciar a formação óssea heterotópica, temos que considerar a importância disto ser redundante, e questionar se as BMPs, em adição a indução e a formação de cartilagem e de osso, possuem funções específicas no desenvolvimento.

Informações em relação à importância das BMPs durante a formação inicial e desenvolvimento, assim como evidências para basear a necessidade de múltiplas BMPs provêm de estudos recentes em ratos. Em regiões anatômicas específicas de ratos, condensações celulares são alteradas na forma e tamanho ou completamente ausentes. Demonstra-se o envolvimento do gene BMP-5, encontrado na região *se* do cromossomo, em alterações de desenvolvimento. Alterações ou a deleção do gene BMP-5 afetam processos de sinalização necessários para formar novas condensações normais, resultando em elementos esqueléticos alterados ou ausentes. Em função de outros elementos esqueléticos parecerem não afetados por mutações *se*, podemos raciocinar que outras BMPs são responsáveis pelo desenvolvimento normal destas partes. Evidências para isto foram providas pela localização cromossomial dos genes humanos para a BMP-1 até a BMP-7. Utilizando-se células híbridas somáticas e sondas de hibridização cDNA, mapearam as BMP-1 a BMP-7 para os seguintes cromossomos humanos: BMP-1 no cromossomo 8; BMP-2 e BMP-7 no cromossomo 20; BMP-3 no cromossomo 4, sublocalização 4p14-q21; BMP-4 no cromossomo 14; BMP-5 e 6 no cromossomo 6. Como outros membros da superfamília TGF- β , foi encontrado uma grande dispersão dos genes das BMPs por todo o genoma humano, e esta dispersão facilita o desenvolvimento de várias funções tecido-específicas.

Em adição a estes problemas observados em camundongos mutantes *se*, estes apresentam diminuição na capacidade de reparar fraturas de costelas, demonstrando uma relação entre os sinais utilizados durante a embriogênese e aqueles necessários durante o reparo pós-fetal.

Outro exemplo do envolvimento precoce das BMPs nos processos de desenvolvimento, inclui a BMP-2 e a BMP-4, o que como previamente mencionado são considerados os homólogos humanos a proteína *dpp* de *Drosophila* que é responsável pela especificação dorso-ventral durante o desenvolvimento embrionário precoce e mais tarde para a formação dos discos imaginais¹³⁸.

Estas proteínas são tão semelhantes que podem ser substituídas uma pela outra em experimentos funcionais. Seqüências do gene da BMP-4 de mamíferos resgatam defeitos embrionários em moscas *dpp* mutantes. Contrariamente proteínas recombinantes de *Drosophilas* induzem a formação de osso endocondral em mamíferos¹⁰². Sabendo portanto que a BMP-4 e *dpp* podem ser substituídas uma pela outra, podemos suspeitar que a BMP-4 na embriogênese dos mamíferos é também responsável pela sinalização e padronização posicional durante a diferenciação celular.

A BMP-2 tem sido fortemente implicada em possuir múltiplas funções na morfogênese e no padrão de formação no embrião dos vertebrados, não apenas no desenvolvimento do esqueleto, mas também em outros tecidos e órgãos. Isto é evidenciado pela ampla distribuição da expressão do RNA^a da BMP-2 em uma variedade de tecidos¹³⁷.

A importância da BMP-2 e BMP-4 é mais fácil de entender se considerarmos que o *knockout*^b para ambas leva a uma situação embrionária letal¹³⁷. A eliminação ou alteração da BMP-5 leva apenas a mutação no camundongo. No desenvolvimento embrionário cada BMP possui variáveis graus de importância, apresentando atividades sobrepostas ou distintas, podendo ser empregada em diferentes tempos e lugares com o objetivo de direcionar a formação de tecidos moles e/ou duros.

^a ribonucléic acid

^b eliminação completa destas proteínas do cromossomo

2.3.2 *BMPs em outros tecidos*

Provavelmente as maiores evidências para o envolvimento das BMPs na embriogênese provêm do isolamento dos mRNAs^a para as BMPs em vários tecidos, novamente sugerindo funções múltiplas tanto na morfogênese quanto no padrão de formação fora do esqueleto. A hibridização “in situ” evidenciou que o mRNA da BMP-2 é expresso durante o desenvolvimento dos membros, coração, dentes, mesênquima craniofacial e olhos⁵⁵.

2.3.3 *BMPs e a indução óssea pós-fetal*

A hipótese pressupõe que a BMP induz o desenvolvimento ósseo na vida pós-fetal a partir de células pré-progenitoras no processo normal de remodelamento, reparo de fraturas, incorporação de enxertos e ossificação heterotópica. Apesar de terem transcorrido mais de 35 anos desde a descrição inicial do processo de indução óssea por URIST¹²⁵, o mecanismo exato de como isto realmente ocorre ainda não está completamente esclarecido, entretanto, o conhecimento das alterações celulares e bioquímicas durante a formação de cartilagem e osso já existe.

Após a implantação de matriz óssea desmineralizada ou de BMP, observa-se três fases de osteoindução: quimiotaxia, mitogênese e diferenciação. A quimiotaxia inicialmente atrai leucócitos polimorfonucleares para a região implantada, seguidos por fibroblastos e células aderidas a matriz. Durante a mitogênese, podemos observar a proliferação de células mesenquimais no terceiro dia, medido pela incorporação de [3H]-timidina no DNA celular assim como um aumento na atividade da ornitina descarboxilase no implante. Coincidindo com a agregação de células mesenquimais existe um aumento do mRNA de colágeno tipo I, o que pode ser indicador do aumento da atividade destas células.

^a RNA mensageiro

2.3.4 Reparo em osso endocondral e intramembranoso

Em 1996, RABIE; DAN; SAMMAN⁸⁴, planejaram um estudo para identificar as células envolvidas no reparo de enxertos ósseos autógenos de origem intramembranosa e endocondral. Foram criados 36 defeitos nos crânios de 18 coelhos Nova Zelândia. Os defeitos eram preenchidos com enxerto ósseo intramembranoso (IM^a), enxerto ósseo endocondral (EC^b), matriz óssea desmineralizada (DBM^c) ou a combinação IM-DBM e EC-DBM. A identificação das células foi realizada após 7 e 14 dias utilizando-se microscopia óptica e eletrônica. No osso IM, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos eram observados sem estágio intermediário cartilaginoso, enquanto que no osso EC, condroblastos e condrócitos eram observados. Enxertos com DBM e IM-DBM eram caracterizados pela presença de um estágio cartilaginoso. Concluíram que o osso IM reparava por meio de uma ossificação osteogênica enquanto que o osso EC reparava com uma ossificação endocondral na presença da matriz desmineralizada o osso IM adotava um padrão de ossificação endocondral.

2.4 Defeitos de tamanho crítico em calvária

A extensão do reparo que ocorrerá em um defeito ósseo depende diretamente do seu tamanho. Os defeitos ósseos criados para avaliar experimentalmente o seu reparo devem possuir amplitude suficiente para impedir o reparo espontâneo, sendo denominados de defeitos de tamanho crítico (CSD^d)^{61,105}.

Com o objetivo de determinar o CSD em calvária de coelhos pesando entre dois, quatro e dez quilos, KRAMER; KELLY; WRIGHT⁵¹, em 1968 constataram que o

^a intramembranous autogenous

^b endocondral autogenous

^c demineralized bone matrix

^d critical size defects

reparo ósseo de defeitos de 8,0mm de diâmetro ocorria somente após o período de 16 semanas.

2.5 Carreadores

2.5.1 Colágeno

A resposta tecidual após a implantação de discos de colágeno com 2,5mm de diâmetro e 0,5mm de espessura combinados a 1,0mg de bBMP^a (teste) ou apenas o disco de colágeno (controle) em subcutâneo de ratos foi analisada por HORISAKA et al.³⁴, em 1994. As análises foram realizadas em períodos de sete, dez e 14 dias após a implantação. Após sete dias, os implantes estavam rodeados e invadidos por células fosfatase alcalina positivas, observando-se formação óssea na periferia do implante. Nas regiões de cartilagem e calcificada e formação óssea, estas matrizes osteogênicas estavam interconectadas com os implantes. Os depósitos minerais foram visualizados por microscopia eletrônica tanto sobre as matrizes osteogênicas quanto no colágeno implantado. Após 14 dias, o osso tinha se infiltrado no centro do implante. Nenhuma osteogênese ou condrogênese foi detectada nos grupos controle. Concluíram que a calcificação ocorreu no colágeno em função da indução óssea pela bBMP.

Com o objetivo de avaliar a formação óssea em sítios ectópicos de ratos, KÜBLER, et al.⁵², em 1998, combinou rhBMP-2 produzida em sistema de expressão bacteriano à matriz de colágeno. Em períodos de avaliação de tre e quatro semanas, encontraram formação óssea ectópica na maioria das amostras.

Em defeitos de tamanho crítico realizados no osso rádio de coelhos, HOLLINGER, et al.³³, em 1998, compararam a utilização de enxertos autógenos, colágeno, 35µg de rhBMP-2^b combinada ao colágeno e a defeitos não tratados. A

^a bovine bone morphogenetic protein

^b recombinant human bone morphogenetic protein

eutanásia dos animais foi realizada após quatro e oito semanas e o exame microscópico demonstrava maior formação óssea nos sítios tratados com enxerto autógeno e com rhBMP-2 em relação aos grupos controle. Exames radiográficos seriados revelaram relação tempo-dependente com o aumento da radiopacidade das amostras que receberam rhBMP-2.

O colágeno combinado a 10µg de rhBMP-2 foi avaliada na osteoindução em subcutâneo de ratos por OMURA et al.⁷⁶, em 1998. Uma semana após a implantação o sítio teste estava circundado por tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos em maior quantidade quando comparado ao sítio controle. Em duas semanas, vários focos de formação óssea estavam evidentes na periferia dos implantes contendo rhBMP-2 a partir da condensação de feixes de fibras colágenas. O exame radiográfico realizado após quatro semanas demonstrava material radiopaco nos sítios teste de todos os ratos e microscopicamente o material implantar havia sido substituído por osso.

2.5.2 Carbonato de Cálcio

A capacidade osteoindutora de um compósito consistindo de coral natural, colágeno, um material semelhante a proteínas morfogenéticas (BP^a) ósseas e o fator de crescimento básico derivado de fibroblastos bFGF, foi testada por DAMIEN et al.²⁰, em 1993. Inicialmente, cartilagem e cartilagem mineralizada estavam presentes e posteriormente formação óssea com medula óssea era evidente. Concluíram que a presença de bFGF pode melhorar a maturação dos ossículos nos estádios iniciais. O compósito coral-colágeno parece ser um bom carreador para proteínas ósseas e deveria ser testado em sítios ósseos.

A formação óssea em sítios ectópicos em implantes de carbonato de cálcio (CC^b) e de hidroxiapatita porosa (PHA^a) foi comparada por OHGUSHI et al.⁷⁴, em

^a bone proteins

^b carbonato de cálcio

1992. Não ocorreu formação óssea em nenhum dos implantes sem medula óssea, enquanto que nos implantes combinados à medula óssea ocorreu formação óssea em todos os implantes após um período de quatro semanas. A formação óssea, tanto para o carbonato de cálcio quanto para a hidroxiapatita, ocorreu inicialmente na superfície dos poros e progrediu em direção ao seu centro do poro. Os resultados indicaram que a formação óssea no carbonato de cálcio obtido de corais marinhos é comparável à ocorrida na hidroxiapatita.

A análise das alterações ocorridas na superfície de carbonato de cálcio reabsorvível, em forma de coral natural, foi analisada por DAMIEN et al.¹⁹, em 1994. Os resultados microscópicos indicaram a formação *in vivo* de uma camada rica em fosfato de cálcio na superfície do coral. Este fato poderia explicar a boa adesão do osso ao carbonato de cálcio.

VUOLA et al.¹³⁵, em 1996, utilizou blocos de coral natural (carbonato de cálcio) e hidroxiapatita combinados à medula óssea no músculo dorsal de ratos para analisar a capacidade de formação óssea. Os períodos de avaliação foram de três, seis, 12 e 24 semanas. Houve formação óssea apenas nos enxertos contendo medula óssea sendo significativamente maior nos implantes de coral em relação aos implantes de hidroxiapatita. Após 12 semanas, todos os implantes de coral perderam sua estrutura original e a área da secção transversal diminuiu para 40% de sua área.

O efeito do crescimento tecidual dentro de implantes de coral e de hidroxiapatita nas propriedades mecânicas destes implantes foi examinado por VUOLA et al.¹³⁴, em 1998. Os blocos de hidroxiapatita não mostraram reabsorção enquanto o coral reabsorveu rapidamente e perdeu sua força de compressão, a qual era inicialmente maior que a da hidroxiapatita. Após seis semanas, o crescimento ósseo pareceu manter a força mecânica do implante de coral mesmo se este estivesse sendo reabsorvido. A força mecânica de ambos materiais era comparável à do osso maduro.

^a porous hidroxiapatite

As alterações microscópicas na membrana do seio maxilar foram avaliadas BRAVETTI et al.¹³, em 1998, após enxerto de osso autógeno combinado com partículas de carbonato de cálcio no seio maxilar de cabras. As amostras foram obtidas após 2,5; 4,5 e 6,5 meses e a mucosa do seio maxilar foi examinada utilizando microscopia de luz e microscopia de transmissão. As partículas de coral estavam rodeadas por tecido conjuntivo fibroso quando utilizada sozinha, mas quando combinada ao osso autógeno ocorria formação óssea. O epitélio do seio mostrou um aumento nas células caliciformes, evidenciando que a mucosa sofre adaptações fisiológicas, mas permanece saudável e livre de sinusite crônica após enxerto no seio maxilar.

Em um trabalho longitudinal de 5 anos, YUKNA; YUKNA¹⁴⁶, em 1998, avaliaram a utilização do carbonato de cálcio reabsorvível como um substituto ósseo em defeitos periodontais de humanos. Observaram uma significativa melhora no nível de inserção à sondagem e concluíram que este material possui um efeito benéfico em longo prazo para o tratamento de defeitos infra-ósseos.

2.5.3 Hidroxiapatita

A eficácia da hidroxiapatita, isolada ou combinada ao colágeno tipo I, como carreador da proteína óssea morfogenética foi testada por ONO et al.⁸⁰, em 1995,. A osteogênese progrediu lentamente com o tempo e após nove semanas da inserção, a maioria dos poros de ambos os grupos estava preenchida por novo osso. Entretanto o grupo BMP-hidroxiapatita-colágeno exibiu maior indução óssea.

A hidroxiapatita porosa foi utilizada como substrato por RIPAMONTI⁸⁸, em 1991, para estudar a morfogênese óssea em músculo de primatas. Secções seriadas de espécimes de três, seis e nove meses mostraram que a formação inicial de tecido conjuntivo fibroso era caracterizada por um componente vascular intenso e a condensação de fibras colágenas na interface da hidroxiapatita. A morfogênese óssea

estava intimamente associada com a diferenciação das condensações do tecido conjuntivo. O osso formou-se sem a presença de uma fase endocondral. A quantidade de osso aumentou a cada período analisado e a estrutura da hidroxiapatita reduziu significativamente após seis e nove meses.

A formação óssea sobre a hidroxiapatita porosa foi avaliada por RIPAMONTI⁸⁷, em 1992, em defeitos de tamanho crítico em calvária de babuínos adultos. A microscopia e a histomorfometria de secções não descalcificadas e descalcificadas preparadas de espécimes obtidos após três, seis e nove meses resultou em crescimento ósseo substancial sobre o implante de hidroxiapatita.

RIPAMONTI; van der HEEVER; van WYK, J.⁹¹, em 1993, utilizaram a hidroxiapatita porosa como uma matriz morfogenética para estudar a formação precoce de tecidos precedendo a morfogênese óssea em sítios ectópicos de babuínos. Os espécimes foram obtidos após 30, 60 e 90 dias. Não se formou osso em nenhum dos espécimes após 30 dias. Após 60 dias houve formação óssea. Após 90 dias, a formação óssea dentro dos poros era freqüente. A diferenciação de células osteogênicas em aposição direta a hidroxiapatita sugere que este substrato pode agir como uma matriz sólida para a adsorção e liberação controlada de proteínas ósseas morfogenéticas produzidas endogenamente. A hidroxiapatita porosa, utilizada neste experimento em primatas, pode ser um apropriado sistema de liberação para proteínas ósseas morfogenéticas para o início controlado da osteogênese terapêutica.

Para a criação de um compósito com propriedades osteoindutivas e osteocondutivas DAMIEN et al.¹⁸, em 1995, combinou hidroxiapatita obtida pela conversão hidrotermal do carbonato de cálcio de coral natural, que possui uma estrutura similar ao osso medular, com matriz óssea desmineralizada. O estudo foi realizado em defeitos em crânio de coelhos e os resultados indicaram nova formação óssea e aumento na taxa de reparo dos defeitos preenchidos com o compósito.

2.5.4 Polímeros

A resposta tecidual à implantação de discos de ácido poli-lático (PLA)^a combinados a bBMP em defeitos ósseos na calvária ratos foi analisada por MIKI et al.⁶⁸, em 1994. Os discos apresentavam 1,3mm de espessura e 8,0mm de diâmetro combinados a 13mg de colágeno e 500µg de bBMP (teste) ou apenas colágeno (controle). As análises microscópicas foram realizadas após duas e quatro semanas após a implantação. Após duas semanas, observaram neoformação óssea no grupo teste enquanto no grupo controle esta não ocorreu nem mesmo após quatro semanas. Concluíram que o PLA pode ser um carreador efetivo para a BMP e utilizado como um material de enxerto.

Um sistema de liberação controlada para as BMPs foi avaliado por ISOBE et al.³⁶, em 1996. Foram confeccionadas cápsulas de ácido poli-lático-glicólico (PGLA)^b e BMP. Cada cápsula era composta de 8,0mg de PGLA e 1,4mg de BMP. A eficiência e a taxa de liberação *in vitro* foram medidas utilizando BMP marcada com isocianato fluorescente. A quantidade de BMP liberada das cápsulas de PGLA aumentou entre três e cinco dias. Além disso, a efetividade da BMP encapsulada com PGLA para induzir a formação óssea *in vivo* foi examinada pela implantação em subcutâneo de ratos. A degradação completa das cápsulas e neoformação óssea com medular foram identificadas por exame microscópico três semanas após a implantação. Concluíram que a combinação de BMP com PGLA pode ser um método de indução para a formação óssea em ensaios clínicos.

^a poly lactic acid

^b poly glycolic acid-colactic acid

2.6 Estudos em Animais

Implantes de titânio combinados a dispositivos contendo proteínas osteogênicas foram inseridos em alvéolos dentais, imediatamente após a extração dos incisivos maxilares e mandibulares e dos caninos mandibulares. RUTHERFORD et al.⁹⁸, em 1992, avaliaram a formação óssea precoce em três macacos, nos quais os implantes foram combinados a três tipos de material. No primeiro os implantes eram inseridos sem material adicional, no segundo combinado à matriz de colágeno e no terceiro combinado ao dispositivo de proteína osteogênica (proteína osteogênica combinada à matriz de colágeno). Outros alvéolos receberam apenas a matriz de colágeno ou o dispositivo de proteína osteogênica sem o implante de titânio. Após duas semanas, o grupo implante/proteína osteogênica apresentava uma quantidade maior de osso formado em justaposição aos implantes de titânio em relação aos grupos controle. Nos grupos onde os implantes de titânio foram inseridos, constatou-se que no período de três semanas houve formação óssea nos alvéolos. Sugerem que a utilização da proteína osteogênica pode encurtar o intervalo de tempo entre a extração do dente e a osseointegração, diminuindo o período de edentulismo total ou parcial.

XIANG et al.¹⁴¹, em 1993, avaliaram a osseointegração de implantes cilíndricos de superfície lisa combinados à proteína óssea morfogenética bovina (bBMP) ou à albumina de soro bovino (BSA) em cães edêntulos. A bBMP foi extraída e purificada, de acordo com os procedimentos descritos por URIST; STRATES¹²⁶, em 1971. Os implantes de titânio apresentavam 3,75mm de diâmetro por 10,0mm de comprimento. Um orifício de 2,0mm de diâmetro foi feito na porção apical do cilindro, onde era inserido um precipitado gelatinoso contendo 4,0mg de bBMP no grupo teste e 4,0mg de BSA no grupo controle. Estes conjuntos foram liofilizados e esterilizados com gás oxido de etileno. Os pré-molares mandibulares direitos e esquerdos de 15 cães, pesando entre 15 e 20Kg foram extraídos oito semanas antes da inserção dos implantes. Três sítios foram preparados de cada lado da mandíbula, sendo os implantes teste inseridos do lado direito e os implantes controle contra-lateralmente. Análises

microscópicas de tecido descalcificado foram realizadas após uma, duas, quatro, oito e 12 semanas após a implantação. Os resultados demonstraram que a osseointegração dos implantes de titânio combinados a bBMP ocorre um mês após a implantação, sugerindo que a formação óssea é aumentada pela capacidade osseointegradora da bBMP. A formação precoce de novo osso foi atribuída à deposição sobre o osso receptor, que é um modo convencional em que ocorre a ancoragem óssea do implante e estimulação de células mesenquimais indiferenciadas pela bBMP. Pesquisas precisam ser realizadas abordando o efeito fisiológico a longo prazo da carga sobre o implante de titânio combinado com a bBMP.

Em estudo semelhante ao anterior, YAN et al.¹⁴³, em 1994, analisaram a formação óssea microscopicamente após, duas, quatro, seis, oito e doze semanas após a inserção dos implantes. Os resultados demonstraram que a neoformação óssea ocorreu entre os períodos de oito a doze semanas. Concluíram que a neoformação óssea na zona da interface e na abertura apical ocorreu mais prematuramente e era maior no grupo teste em relação ao grupo controle. Sugerem estudos adicionais enfocando as medidas quantitativas de morfometria e biomecânica para comparar as diferenças na osseointegração com e sem presença de BMP e a observação em longo prazo dos implantes após carga.

Os efeitos de osteoindução de 4 tipos de materiais implantares foram comparados por MARDEN et al.⁶², em 1994: 1) 2,2µg de proteína óssea recombinante humana-2 (rhBMP-2) combinada com matriz óssea de colágeno insolúvel (ICBM^a); 2) 6,5µg de rhBMP-2 e ICBM; 3) ICBM e 4) matriz óssea desmineralizada (DBM). Os enxertos foram realizados em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos e analisados após sete, 14 e 21 dias. Avaliaram a hipótese de que a rhBMP-2 combinada com a ICBM poderia induzir maior formação óssea do que a ICBM sozinha, e que esta quantidade maior de osso poderia estar associada ao tempo de análise e a dose utilizada. Além disso, queriam comprovar que o efeito indutor da rhBMP-2 seria igual ou superior a que a matriz óssea desmineralizada. Os resultados radiomorfométricos

^a Insoluble collagenous bone matrix

analisados por regressão linear múltipla, mostraram que o tempo e a dose de rhBMP-2 tiveram efeitos significativos na radiopacidade durante o curso de 21 dias do estudo. Não ocorreram diferenças significativas entre os grupos de tratamento após o período de sete dias. Decorridos 14 dias, observou-se material mais hiperdenso em todos os grupos de tratamento em relação aos grupos controle. Além disso, os resultados do grupo 2 (6,5µg de rhBMP-2/ICBM) foram superiores aos do grupo 1 (2,2µg de rhBMP-2/ICBM) e do grupo 4 (DBM). No 21º dia, ambos os grupos rhBMP-2/ICBM tinham induzido mais radiopacidade que ICBM ou DBM. Neste momento não havia diferença significativa entre a radiopacidade dos defeitos tratados com as diferentes doses de rhBMP-2.

A quantidade de tecido calcificado, medida em secções coronárias dos locais dos defeitos, reparada em resposta aos quatro tratamentos nos três períodos, se assemelhou ao padrão de radiopacidade avaliado. Novamente, a análise de regressão linear múltipla mostrou que os efeitos dos dois tempos e doses da rhBMP-2 foram significativos. Ambas as doses de rhBMP-2/ICBM formaram mais osso que a DBM aos 14 e 21 dias. Os resultados microscópicos após sete dias da implantação mostraram que havia mais material calcificado nos defeitos tratados com 6,5µg de rhBMP-2/ICBM que em defeitos tratados com os outros tipos de enxertos. Após 14 dias, os defeitos tratados com 2,2µg de rhBMP-2/ICBM ou 6,5µg de rhBMP-2/ICBM, revelaram quantidades crescentes de calcificação quando comparados aos espécimes de 7 dias. Não havia nenhuma espécie de resposta celular local adversa para 6,5µg de rhBMP-2/ICBM. Os defeitos tratados com DBM exibiram zonas ocasionais de cartilagem em calcificação e tecido ósseo imaturo nas margens do leito da implantação. Formação óssea, em resposta ao ICBM, foi mínima e estava localizada ao longo das extremidades do leito de implantação. Após 21 dias, havia consolidação dos elementos de calcificação em resposta ao tratamento com 2,2µg de rhBMP-2/ICBM ou 6,5µg de rhBMP-2/ICBM. Em geral, a morfologia era consistente com osso trabecular. Ao contrário, os defeitos tratados com ICBM revelaram uma tentativa fraca de reparação óssea, com penínsulas de osso novo originando-se das margens do leito de

implantação. Havia menor formação de osso novo nestes locais em relação aos tratados com qualquer dose de rhBMP-2/ICBM. Não houve nenhuma indicação de reações teciduais adversas. Nenhum resquício de cartilagem foi observado neste período.

A impressão geral foi de que a remineralização de partículas de matriz ICBM ocorreu principalmente em resposta às composições que continham rhBMP-2, minimamente em locais tratados com DBM e raramente em resposta ao ICBM sozinho. Com o passar do tempo, eles constataram que os defeitos tratados com partículas de rhBMP-2/ICBM eram invadidas por canais vasculares e uma população de osteoblastos, seguida de neoformação óssea. Ao contrário, as partículas de ICBM sozinhas não foram remineralizadas a qualquer grau, sendo encapsuladas no estroma de tecido conjuntivo fibroso. As seguintes observações foram destacadas: uma única recombinante da BMP, a rhBMP-2, associada com ICBM, é suficiente para reparar defeitos experimentais em crânio de ratos; a rhBMP-2 associada com ICBM estimulou reparação óssea de maneira dependente da dose e do tempo; a rhBMP-2 associada com ICBM induziu a formação de mais osso e em menos tempo do que o DBM; a superioridade da rhBMP-2 sobre o DBM pode ter ocorrido em função da maior concentração de proteína osteoindutora nas preparações sintéticas. A rhBMP-2 pode ter uma solubilidade maior que as proteínas indutoras presentes no DBM, permitindo que mais proteína se difundisse para fora das células.

O mecanismo de reparação de defeitos ósseos combinando membrana de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) e rhBMP-2 foi comparada por LINDE; HEDNER⁵⁸, em 1995, com a utilização da membrana isoladamente. Utilizaram 27 ratos *Sprague-Dawley* (450-500mg), nos quais defeitos ósseos bilaterais foram criados na mandíbula por meio de acesso submandibular extra-oral, com uma broca esférica de 5,0mm de diâmetro. A rhBMP-2 foi misturada ao sangue de rato e este composto acrescentado a um veículo com partículas biodegradáveis, permitindo a formação de um coágulo firme. Depois de mantido por 40 minutos em temperatura ambiente, o coágulo que possuía aproximadamente 10µg de rhBMP-2/100µg, foi inserido completamente no defeito. Os defeitos receberam quatro diferentes categorias de

tratamento: 1) defeitos sem implantação de rhBMP-2; mas com membrana de e-PTFE; 2) defeitos preenchidos com rhBMP-2, sem membrana; 3) defeitos preenchidos com rhBMP-2 e recobertos por membrana; 4) sem preenchimento com material adicional. No grupo 1, durante a análise microscópica podia observar-se, aos 12 dias, tecido colágeno preenchendo o espaço do defeito. Após 24 dias, foram observadas “ilhas” de tecido ósseo imaturo na área do defeito e uma moderada formação óssea ao redor do defeito. Em relação ao escore, a cicatrização foi melhor em termos de “união óssea” neste grupo, quando comparada ao grupo controle, nos dois períodos analisados.

No grupo 2, houve formação profunda de ramificações e organização de trabéculas em osso novo atravessando o defeito, somente 12 dias após a cirurgia.

No grupo 3, em termos de “união óssea” e qualidade da medula, os melhores resultados foram observados após 12 dias, quando comparados ao grupo 1. O defeito foi totalmente substituído, apresentando ramificações e anastomoses de osso novo. A medula óssea mostrou um aumento da maturidade contendo células sangüíneas e um grande número de células adiposas aos 24 dias. Há uma diferença essencial entre este grupo e o grupo 2, no sentido de haver uma formação lateral de osso, que foi mais profuso no grupo 2. A colocação de membrana causou uma restrição no crescimento lateral do osso no defeito.

No grupo 4, o tecido mole e o tecido muscular ao redor invaginaram para o espaço do defeito e virtualmente não foi visto nenhum sinal de cicatrização óssea após 12 ou 24 dias. A formação foi significativamente mais baixa, quando comparada aos grupos 1 e 3. Os resultados demonstraram que o tratamento combinando rhBMP-2 e membrana promoveu melhor reparo ósseo, tanto aos 12 quanto aos 24 dias. Concluíram que a rhBMP-2 tem poder osteoindutor, contrastando com os achados prematuros obtidos com outros tipos de preparo de BMP. A reparação óssea foi guiada quando a rhBMP-2, foi combinada com a técnica de membrana, causando um melhor reparo ósseo, comparado à membrana sozinha.

A resposta do periósteo de coelhos à implantação de hidroxiapatita sintética (HA) combinada a 3mg de BMP/colágeno foi investigada por ONO et al.⁷⁹, em 1995.

Discos de HA com 3,0mm de espessura e 1,0mm de diâmetro com o tamanho dos poros variando entre 50 a 300µm foram inseridos cirurgicamente sob o periósteo do crânio de coelhos. Os períodos de análise foram de três, seis e nove semanas após a implantação. A atividade da fosfatase alcalina (ALP) estava elevada apenas no grupo que recebeu os implantes contendo BMP e o aumento da densidade óssea foi mais exuberante neste grupo. Ao exame microscópico, observou-se que a formação óssea no grupo teste foi encontrada não apenas na interface com o crânio, mas também circundando todo o disco, enquanto no grupo controle, a formação óssea foi encontrada apenas nos poros da superfície de contato entre os discos e o crânio. Concluíram com este trabalho que o complexo HA-colágeno-BMP foi eficiente em aumentar a formação óssea nas referidas condições.

A diferença da capacidade de osteoindução ectópica entre a proteína morfogenética óssea purificada de bovinos (bBMP) e a proteína recombinante humana (rhBMP-2) foi comparada por BESSHO, K.⁶, em 1996. As amostras eram compostas de 50µm, tanto de bBMP quanto de rhBMP-2 combinadas a 3mg de colágeno tipo I, sendo implantadas em músculo de ratos. Após o período de três semanas foram realizados exames radiográficos para analisar a densidade por meio da radiopacidade. Ambos materiais apresentaram imagens radiopacas, entretanto a bBMP apresentou características morfológicas idênticas em todo o material implantado, enquanto a rhBMP-2 apenas em pequena área. O conteúdo de cálcio presente no tecido era de 298,9µg/mg e de 30,2µg/mg para a bBMP e rhBMP-2 respectivamente. Microscopicamente o tecido onde foi implantada a bBMP apresentava osteogênese não apenas em seu limite externo mas também no interior da região implantada, contrastando com o tecido onde foi implantado a rhBMP-2, que apresentava formação óssea apenas em sua superfície mais externa.

BODEN et al.⁷, em 1997, utilizaram um compósito de carbonato de cálcio/colágeno com diferentes doses (0, 100, 300, 1000µm) de um extrato de proteínas ósseas oriundas de bovinos, para a fusão de coluna vertebral em coelhos. Após cinco semanas, o uso de carbonato de cálcio/colágeno sem proteínas indutoras resultou na

ausência de fusões sólidas em 31 % dos coelhos. Carbonato de cálcio com 300 ou 1000µg de proteínas ósseas resultou em sólida fusão na coluna vertebral dos coelhos.

Em defeitos segmentares de cães, o carbonato de cálcio (coral natural) combinado a proteínas ósseas derivadas de bovino foi submetido à avaliação por SCIADINI; DAWSON; JOHNSON,¹⁰⁶ em 1997. Realizaram osteotomias bilaterais, com criação de defeitos ósseos de 2,5cm, em vinte cães divididos em dois grupos. Um dos lados recebeu enxerto ósseo autógeno e o defeito contralateral recebeu implantes cilíndricos consistindo de coral natural ou de coral natural combinado com proteína óssea (3,0mg/implante). Os períodos de avaliação foram de 12 e 24 semanas. Radiograficamente, após 12 semanas, o carbonato de cálcio mostrava praticamente completa reabsorção e substituição por tecido ósseo.

2.7 BMPs e a Periodontia

Com o objetivo de induzir a cementogênese em defeitos de furca classe III criados cirurgicamente em dentes de babuíños, RIPAMONTI et al.⁹³, em 1996, utilizaram rhBMP-7 (OP-1) carregadas por colágeno bovino insolúvel. Experimentaram concentrações de 100µg e 500µg de rhBMP-7 por grama de colágeno e em cada furca inseriram aproximadamente 200mg de colágeno. Após 60 dias, as furcas haviam sido preenchidas por material cementóide ligado ao osso remanescente por fibras de ligamento em ambas concentrações. Demonstraram com este trabalho a indução de formação de cimento pela rhBMP-7 na presença de dentina.

Em modelo de reparação periodontal em ratos, KING, G.N. et al.⁴⁶, em 1997, estudaram os efeitos da rhBMP-2 nos estádios iniciais do reparo pós-operatório e após a completa cicatrização (10 e 38 dias respectivamente). Removeram o ligamento periodontal da face vestibular das raízes dos molares inferiores, por meio de janela criada cirurgicamente no osso. Seguindo o condicionamento ácido das superfícies radiculares, aplicaram 10µl de uma solução de 50µg/ml rhBMP-2 em gel de colágeno

nos defeitos cirúrgicos criados e nos sítios controle aplicaram apenas 10µl de gel de colágeno. No grupo analisado após dez dias, nova formação óssea estava significativamente aumentada no grupo teste sem evidências de anquilose. A rhBMP-2 estimulou a formação de cemento em uma área duas vezes maior à área controle. A presença de tecido conjuntivo de inserção foi semelhante para os dois grupos. Completa cicatrização ocorreu em todos os animais após o período de 38 dias não existindo diferenças entre os grupos teste e controle.

A reparação periodontal de defeitos criados de experimentalmente, por meio de inserção de ligaduras em pré-molares de cães beagle foi avaliada após o tratamento destes defeitos com um composto de ácido poli-láctico e rhBMP-2 (40µg/µl), por KINOSHITA et al.⁴⁷, em 1997. Avaliaram os resultados no período de 12 semanas e observaram microscopicamente a formação de novo osso, fibras de Sharpey e cemento sobre a raiz em maior quantidade no grupo teste em relação ao controle.

A resposta precoce das células do ligamento periodontal frente ao fator de crescimento derivado de plaquetas-BB e à proteína morfogenética óssea-2 foram investigadas por ZAMAN; SUGAYA; KATO,¹⁴⁷ em 1999. Prepararam 174 blocos de dentina, obtidos do terço médio de dentes periodontalmente envolvidos. Estes dentes haviam sido submetidos à raspagem e alisamento e posteriormente desmineralizados com EDTA a 24% (pH 7,02). Cento e vinte blocos de dentina foram tratados com 0,5 e 1µg/ml rhPDGF-BB, 1 e 3µg/ml rh-BMP-2 e apenas meio essencial mínimo (MEM) como controle. Células de ligamento periodontal humanas foram colocadas em contato com estes blocos e incubadas. Avaliaram a atividade da fosfatase alcalina e a concentração de proteínas das células após dois, quatro e sete dias. Cinquenta e quatro blocos de dentina tratados com 1µg/ml rhPDGF-BB, 3µg/ml rh-BMP-2 e meio essencial mínimo (MEM). Após dois, quatro e sete dias realizaram a contagem de células sob microscopia de luz. Demonstraram significativo aumento na concentração de proteínas e número de células nos grupos tratados com PDGF-BB em relação ao grupo controle, apesar de não haver aumento na atividade da fosfatase alcalina. Um aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina foi observada nos grupos

tratados com BMP-2 em relação ao grupo controle, mas a concentração de proteínas e o número de células permaneceu o mesmo ao longo do tempo. Portanto a aplicação de rhPDGF-BB e rhBMP-2 sobre a superfície de raízes desmineralizadas com EDTA promoveu a resposta precoce das células do ligamento periodontal humanas pelo aumento da proliferação e diferenciação celulares, respectivamente.

BARBOSA, E.P. et al.³ avaliaram em 2000, um modelo potencial de defeito de rebordo alveolar Classe III, estudando o efeito da compressão exercida pelo tecido mole na indução óssea mediada pelo rhBMP-2/ACS. Foram utilizados quatro cães sem raça definida com aproximadamente 40 kg. Os defeitos tipo Classe III foram produzidos após a extração dos quartos pré-molares mandibulares com brocas carbide, com extensão de 10-15mm mesiodistalmente, de 3-5mm apicocoronalmente e 3-5mm vestibulolingualmente, sendo permitido seu reparo por um período de 8 semanas. Os implantes utilizados foram de dois tipos, rhBMP-2 (1,6mg)/ACS e rhBMP-2 (1,6mg)/ACS/HA. Aumento ósseo em espessura limitado (0,7 + 0,6mm) foi obtido após a implantação de rhBMP-2/ACS, entretanto os sítios que receberam rhBMP-2/ACS/HA exibiram aumento relevante do rebordo alveolar (5,5 + 1,6mm). Defeitos preenchidos com rhBMP-2/ACS exibiram denso trabeculado ósseo dentro do corpo do processo alveolar reduzido. Comumente as partículas de HA estavam encapsuladas por tecido fibroso e algumas partículas estavam em contato com o osso. Concluíram, que o rhBMP-2/ACS tem efeito limitado no aumento de espessura em rebordos alveolares e a inclusão de HA resulta em aumento clínico relevante, entretanto a qualidade óssea está comprometida.

A identificação da presença de OP-1 e BMP-2 sincronicamente com diferente distribuição espacial, durante a formação da raiz e dos tecidos periodontais, por RIPAMONTI, U. et al.⁹², em 2001, o conduziu a desenvolver experimento utilizando estas duas proteínas, isolada e concomitantemente, para avaliar a indução tecidual em defeitos de furca classe II criados cirurgicamente em babuínos. Utilizaram três animais adultos, nos quais deslocaram retalhos mucoperiósteos e prepararam cirurgicamente quatro defeitos de furca classe II nos primeiros e segundos molares. As raízes expostas

foram curetadas para remover as fibras de ligamento periodontal e cimento além de receberem marcações com pequenas brocas na altura do osso residual. A profundidade do defeito se estendia entre 10 e 12mm vestibulolingualmente. A rhOP-1 e a rhBMP-2 em doses de 100µg cada, foram adicionadas a um grama de matriz colágena bovina. Aproximadamente 200mg do carreador foram utilizados por defeito. A microscopia e histomorfometria de secções seriadas não desmineralizadas foram realizadas 60 dias após implantação. Concluíram que o morfogênese do tecido periodontal formado pela combinação da rhOP-1 e rhBMP-2 é qualitativamente diferente em comparação à aplicação destes morfogenes isoladamente. Este trabalho, combinado a outros anteriores sugeriram que as doses de rhOP-1 utilizadas induzem substancial cementogênese. Por outro lado, os defeitos tratados com rhBMP-2 mostraram limitada formação de cimento, mas uma melhora na reparação e remodelação óssea. Estes resultados sugerem que a co-administração de BMP-2 e OP-1 poderia resultar em aumento da capacidade morfogenética destas proteínas. Os resultados deste experimento mostraram que as doses utilizadas não foram capazes de atuar sinergisticamente para melhorar a reparação do periodonto de sustentação em primatas, mas em função de trabalhos anteriores com metodologia semelhante, estes resultados indicam fortemente a realização de novos experimentos com aplicação binária de morfogenes em experimentos de reparação.

2.8 BMPs e a Implantologia

A formação óssea e a reosseointegração após a implantação cirúrgica de rhBMP-2 em defeitos periimplantares foi avaliada por HANISCH et al.³⁰, em 1997. Implantes com superfície de hidroxiapatita foram inseridos bilateralmente na área de pré-molares de maxila e mandíbula de macacos *Rhesus*, permanecendo durante o período de um ano para permitir a osseointegração. A periimplantite foi induzida por ligadura de algodão por um período de 11 meses, resultando em defeitos

circunferenciais. Durante a cirurgia reconstrutiva, os defeitos eram aleatoriamente preenchidos com rhBMP-2 (0,43mg/ml) em uma esponja colágeno reabsorvível e em quadrantes contralaterais apenas com o carreador. O ganho ósseo vertical nos defeitos com rhBMP-2 ($2,6 \pm 1,2\text{mm}$) foi significativamente maior do que nos controles ($0,8 \pm 0,8\text{mm}$). A reosseointegração também diferiu significativamente entre o teste e controle, $29,0 \pm 10,5\%$ e $3,5 \pm 2,5\%$ respectivamente. Concluíram que a rhBMP-2 possui potencial para promover a formação e reosseointegração em defeitos avançados de periimplantite em modelo não humano.

A capacidade de osteoindução do complexo proteína óssea morfogenética/hidroxiapatita (BMP/HA) em defeitos ósseos de 2,5mm por 4,0mm, confeccionados após a inserção de implantes de titânio em tíbias de coelho foi avaliada em 1999 por UEDA¹²². Os defeitos confeccionados sobre implantes de titânio, expondo sua as roscas, foram preenchidos com dois tipos de material; BMP/HA e osso autógeno. As análises dos cortes microscópicos de tecido desmineralizado foram realizadas após sete e 42 dias. Após sete dias, os resultados mostraram a presença de rede de fibrina em ambos os grupos. No grupo osso autógeno, notou-se a presença de material enxertado sendo reabsorvido e cristais de HA no grupo BMP/HA; neste último ainda se observou a presença de tecido cartilaginoso e início de neoformação óssea. Após 42 dias, a substituição do material de enxerto e neoformação óssea foram observadas em ambos os grupos. Concluiu-se que o complexo BMP/HA apresenta excelente comportamento biológico como agente osteoindutor.

A osteogênese na medula óssea na tíbia de coelhos foi avaliada após a inserção de hidroxiapatita reabsorvível (HA) contendo um grupo de proteínas ósseas hidrofóbicas combinada ao osso bovino desproteínado. COSTA FILHO¹⁷, em 1999, colocou no interior de cilindros ocos de titânio comercialmente puro os seguintes materiais: 1) HA contendo um *pool* de proteínas ósseas (proporção em massa de 20 de HA: 1 de *pool*) misturada em igual proporção volumétrica com osso bovino desproteínado; 2) HA sem proteínas ósseas e misturada em igual proporção volumétrica com osso bovino desproteínado e 3) coágulo sangüíneo. Após 67 dias, os

animais foram sacrificados e os espécimes submetidos a cortes mineralizados. A análise morfométrica de volumetria relativa dos pontos no microscópio óptico mostrou que o grupo de biomateriais contendo o *pool* formou significativamente menos osso que os biomateriais sem o *pool*; o grupo sem as BMPs formou maior quantidade de tecido ósseo quando comparado com o grupo coágulo sangüíneo e os materiais contendo o *pool* não mostraram diferença em relação ao grupo coágulo sangüíneo. Com estes resultados o autor concluiu que o *pool* de BMPs teve efeito inibitório na osteogênese e que os biomateriais, particularmente o osso bovino desproteínado proporcionaram um substrato favorável à formação óssea.

Em defeitos criados cirurgicamente ao redor de implantes de titânio inseridos em mandíbulas de cães, COCHRAN et al.¹⁶, em 1999 combinaram rhBMP-2 ao colágeno associada ou não à membranas de politetrafluoretileno expandido, e por meio de microscopia óptica avaliaram a osteogênese após períodos de 4 e 12 semanas de reparação. Os sítios que receberam material implantar com rhBMP-2 apresentaram maior quantidade de formação óssea e maior percentual de contato osso-implante, não ocorrendo diferenças entre os sítios tratados ou não com membrana.

2.9 BMPs e levantamento de assoalho de seio maxilar

Com o objetivo de testar a eficácia, segurança e aplicabilidade técnica do emprego de rhBMP-2 combinada ao colágeno em levantamento de assoalho de seio maxilar em cabras, NEVINS et al.⁷², demonstraram em 1996, por meio de análises microscópicas, radiográficas e tomográficas, um progressivo aumento da formação óssea. Sugeriram a viabilidade da utilização deste material implantar como alternativa aceitável ao tratamento tradicional com osso autógeno ou substitutos ósseos.

A formação óssea e a osseointegração ao redor de implantes de titânio inseridos no interior do seio maxilar foram avaliadas após a implantação cirúrgica de proteína morfogenética óssea recombinante humana-2 (rhBMP-2) em macacos. HANISCH, O.²⁹

et al., em 1997, submeteram os macacos a cirurgias bilaterais do seio maxilar. Um lado era tratado com o conjunto rhBMP-2/ACS (0,19mg por implante) e o lado oposto era tratado apenas com o veículo (ACS). Após três meses, dois implantes de titânio eram inseridos em cada seio maxilar aumentado, e um implante adicional era inserido anteriormente a essa área. Portanto, cada animal possuía três sítios experimentais: rhBMP-2, controle e osso original. Os animais foram submetidos à eutanásia após três meses. Secções em bloco foram removidas e preparadas para análise histométrica. O aumento ósseo vertical médio foi significativamente maior para os sítios com rhBMP-2 ($6,0 \pm 0,3\text{mm}$) em relação aos sítios controle ($2,6 \pm 0,3\text{mm}$). A densidade óssea média nos sítios rhBMP-2 era de $14,4 \pm 2,9\%$ contra $13,9 \pm 4,6\%$ e $14,1 \pm 3,6\%$ para os sítios controle e do osso nativo do paciente respectivamente, sem diferenças significativas entre as condições experimentais. A interface osso-implante nos sítios rhBMP-2 ($41,4 \pm 7,7\%$) não era significativamente diferente da obtida nos sítios controle ($38,9 \pm 12,4\%$) e no osso nativo ($46,8 \pm 10,6\%$). Este trabalho provê evidências consideráveis para o aumento ósseo vertical no seio maxilar após implantação cirúrgica de rhBMP-2/ACS, permitindo a inserção de implantes dentários. Sugeriram a utilização do conjunto rhBMP-2/ACS como alternativa realista aos enxertos ósseos autógenos em procedimentos de levantamento de assoalho de seio maxilar.

A formação óssea após a implantação de rhBMP-2 em defeitos ósseos faciais após a movimentação de segmentos osteotomizados foi avaliada por YUDELL; BLOCK¹⁴⁵, em 2000. Utilizaram seis cães sem raça definida pesando aproximadamente 20kg. Criaram defeitos bilaterais de 15mm de comprimento, reposicionados 8,0mm lateralmente e fixados com parafusos de titânio. Os defeitos foram preenchidos com 1,3mg de rhBMP-2 em um carreador de colágeno reabsorvível (rhBMP-2/ACS); com solução tamponada e o carreador de colágeno reabsorvível (tampão/ACS) e outro não foi preenchido com material implantar, determinando assim a formação de três diferentes grupos. Após o período de 12 semanas, a avaliação radiográfica demonstrou diferença significativa no reparo quando comparados o grupo teste e aos grupos controle, não ocorrendo diferença entre estes dois últimos. Na avaliação microscópica,

os sítios-controle demonstraram mínima formação óssea, e nos sítios-teste observava-se formação óssea ativa, com espaços medulares preenchidos por canais vasculares, sugerindo ativo suprimento sanguíneo para os tecidos. A intensa formação vascular estava acompanhada por formação óssea. Concluíram que a rhBMP-2 possui potencial para substituir os enxertos ósseos autógenos, diminuindo a morbidade pós operatória nos pacientes, e que a utilização clínica deste material expandirá com o aumento do número de experimentos obtidos com este material.

2.10 Estudos em Humanos

Os resultados da utilização de bBMP em 1106 cirurgias, realizadas em 482 pacientes foram publicados por SALIER; KOLB^{99,100} em 1994 e em 1996. Os extratos de bBMP eram ligados a um carreador de hidroxiapatita reabsorvível e misturados a osso liofilizado desmineralizado ou a cartilagem liofilizada. A concentração de bBMP era de 1mg para cada 1cm³ de material carreador. Foram realizadas cirurgias de reparação de grandes defeitos de face e crânio, cirurgias de implantes com condições críticas para a osseointegração (implantes imediatos com grandes enxertos ósseos). Demonstraram baixos índices de perda de implantes quando a bBMP foi colocada nos espaços entre o enxerto e o osso remanescente, bem como em perfurações realizadas no enxerto. Constataram que as bBMPs aceleraram o processo de mineralização da, pelo fato da hidroxiapatita quando utilizada isoladamente, promove a mineralização no período entre 10 e 12 meses, enquanto com a associação da bBMP a mineralização ocorreu entre um e dois meses. Não houve relatos de problemas de ordem imunopatológica nos pacientes.

A associação de uma esponja de colágeno reabsorvível e a rhBMP-2 (rhBMP-2/ACS), com concentração de 0,43mg/ml, para a preservação do rebordo alveolar após a extração dentária e para o aumento de defeitos ósseos localizados, foi avaliada por HOWELL, et al.³⁵, em 1997. O objetivo inicial deste trabalho foi de avaliar a segurança

de utilização em curto prazo e a exeqüibilidade técnica do procedimento. Doze pacientes foram envolvidos neste estudo, seis para preservação do rebordo e seis para o aumento de defeitos ósseos. A segurança dos pacientes e a formação óssea foram monitoradas, por meio de exames intra-orais, radiografias periapicais, tomografia computadorizada e coleta de amostras de sangue. Os pacientes submetidos à preservação dos alvéolos receberam entre 0,12mg e 0,88mg por sítio operado, e os pacientes submetidos ao aumento de rebordo receberam entre 0,20 a 1,75mg de rhBMP-2 por sítio. As amostras de soro testadas para a formação de anticorpos não detectaram níveis significativos de anti-rhBMP-2^a, anticolágeno tipo I bovino ou humano. Os resultados clínicos sugeriram que rhBMP-2/ACS foi bem tolerado local e sistemicamente, com nenhum tipo de efeito colateral. O dispositivo foi facilmente adaptado ao rebordo ou ao alvéolo. A formação óssea foi observada em todos os alvéolos, mas o aumento de espessura não foi observado. A avaliação deste último parâmetro, utilizando tomografia computadorizada, demonstrou uma relação dose-dependente para a formação óssea.

O conjunto rhBMP-2/ACS foi avaliado por BOYNE P.J. et al.⁹, em 1997 para o levantamento de assoalho de seio maxilar em humanos. O objetivo deste estudo de 16 semanas era de analisar a segurança e a possibilidade técnica de implantar o conjunto rhBMP-2/ACS na técnica de levantamento de assoalho de seio maxilar em duas etapas. Foram selecionados 12 pacientes com altura óssea inadequada na região maxilar posterior. A dose total de rhBMP-2 implantada variou entre 1,77 e 3,40mg por paciente. O dispositivo rhBMP-2/ACS foi facilmente manipulado e significativa formação óssea foi verificada por meio de cortes tomográficos computadorizados em 11 dos 12 pacientes submetidos à cirurgia. A altura óssea média obtida era de 8,51mm. Os exames microscópicos, obtidos de biópsias durante a inserção dos implantes, confirmaram a qualidade óssea induzida pelo rhBMP-2/ACS. Não ocorreram efeitos imunopatológicos adversos e alterações clínicas significativas nos exames de sangue ou urina. Onze pacientes receberam implantes e continuam sendo examinados.

^a anticorpo contra rhBMP-2

Concluíram que rhBMP-2/ACS pode prover uma alternativa aceitável para os tradicionais enxertos e substitutos ósseos para os procedimentos de levantamento de assoalho de seio maxilar em humanos.

Em 1997, YAN; YANG¹⁴² relataram êxito no tratamento de 20 pacientes com cistos ósseos de origem endodôntica. O material implantado foi a bBMP combinada ao vidro bioativo ou a cerâmica de osso bovino, em proporção bBMP/carreador de 1:25.

O reparo ósseo de alvéolos humanos pós-exodontia foi analisado por BECKER, et al.⁴, em 1998, comparando o osso autógeno, o osso liofilizado desmineralizado (DFDBA), o osso bovino desproteínado (Bio-Oss) e a BMP humana em carreador de proteínas não colágenas, como materiais implantares. Somente o implante de BMP acelerou o reparo do alvéolo, (que dura cerca de 15 semanas), os outros materiais atrasaram o reparo do alvéolo. Em relação a qualidade óssea formada, o implante de BMP resultou em osso lamelar já aos três meses após a implantação. A segunda melhor qualidade óssea foi verificada com osso autógeno, muito embora partículas não reabsorvidas de osso sem vitalidade ainda fossem encontradas após seis meses após a implantação. Os outros biomateriais resultaram em uma qualidade óssea onde predominavam osso primário e restos de DFDBA ou BioOss até seis meses após a cirurgia.

Um estudo longitudinal de três anos, avaliando, a segurança do emprego de 0,43mg de rhBMP-2 combinada ao colágeno, por meio de avaliações clínicas, radiográficas, sistêmicas e imunológicas e defeitos ósseos preenchidos por este material implantar e que posteriormente receberam implantes de titânio, por meio de microscopia, foi conduzido por COCHRAN et al¹⁵. e publicado em 2000. Não ocorreram experiências adversas no decorrer do estudo e nos dez pacientes que receberam implantes, seis em alvéolos dentais e quatro em enxertos “onlay” todos implantes estavam estáveis e na análise microscópica o osso removido da região implantada apresentava características de normalidade.

2.11 Osteoindução *in vivo* por transferência gênica

As proteínas ósseas morfogenéticas representam alternativas terapêuticas promissoras no reparo de fraturas ou defeitos ósseos. Entretanto, doses relativamente grandes são necessárias para estimular formação óssea significativa em animais, aumentando os custos da terapia e os riscos de gerar imunogenicidade ou outros efeitos tóxicos. Como uma alternativa, a transferência gênica pode apresentar um custo benefício mais adequado, pelo fato do custo da produção de DNA para a utilização clínica ser menor quando comparada aos tradicionais métodos de purificação de proteínas¹³³.

Nos últimos anos, a aplicabilidade da transfecção de vários tipos de tecidos, por vetores virais e não virais carreando diferentes inserções de DNA específicos, tem sido demonstrada como sendo um método efetivo de produzir proteínas funcionais *in vivo*. Esta técnica tem sido aplicada no estudo dos fatores de crescimento, da regulação da expressão de proteínas, da rejeição de implantes, terapia gênica, na regulação imune e na produção de anticorpos monoclonais. Mas sem dúvida, a aplicação de maior sucesso até hoje foi a geração de respostas imunes em modelos animais com o objetivo de desenvolver vacinas¹³³.

Fatores de ocorrência natural ou fatores recombinantes osteoindutores como a proteína óssea morfogenética representam alternativas terapêuticas promissoras para o tratamento de fraturas ou enxertos ósseos. Entretanto, doses relativamente grandes (microgramas com a recombinante e miligramas com BMPs de ocorrência natural) são necessárias para estimular nova formação óssea em animais, levantando-se a hipótese de que a terapia em humanos poderia aumentar o risco de imunogenicidade ou outra toxicidade e como alternativa a transferência gênica poderia ser utilizada¹³³.

Em princípio, moléculas de DNA podem ser desenvolvidas como produtos biofarmacêuticos, finalmente permitem que genes sejam administrados diretamente a pacientes, mais especificamente a células alvo, expressando os produtos destes genes

de forma controlada. Existe uma grande variedade de vetores virais e não virais para a expressão de um determinado produto de um gene. Principalmente pela não imunogenicidade e simplicidade técnica, a transferência não viral deve ser preferida, quando um produto gênico (ex. BMP), poderia ser expresso *in vivo*, em um sítio anatômico desejado (ex. seio maxilar, de feito ósseo). A terapia gênica requer que genes de interesse sejam direcionados para algumas células no corpo, transferidas através da membrana plasmática para o corpo da célula e compartimentalizado no núcleo, onde a expressão gênica pode ocorrer. O DNA administrado (inserido em um plasmídio ou outro vetor) deve persistir como um elemento extracromossômial (epísome) capaz de expressar o produto do gene por um período discreto antes de sua eliminação por uma nuclease de degradação¹³³.

Estudos pré-clínicos de transferência gênica estão sendo realizados para demonstrar sua viabilidade técnica em várias abordagens. Avanços tecnológicos e soluções para problemas básicos em relação a regulação da expressão gênica são necessários para que a transferência gênica osteogênica inicie uma fase de análise de eficácia clínica¹³³.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Considerando a literatura pertinente e os questionamentos abordados na introdução deste trabalho, propusemo-nos a:

- 3.1 Avaliar a formação óssea em defeitos ósseos criados em calvárias de coelhos, aplicando-se proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) carregadas pelo compósito carbonato de cálcio-colágeno (experimento I);

- 3.2 Analisar o percentual linear de contato osso-implante e o volume ósseo percentual no interior das roscas de implantes de titânio comercialmente puro em tíbias de coelho, aplicando-se proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) carregadas pelo compósito carbonato de cálcio-colágeno (experimento II).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTO I

4.1.1 Origem, seleção e manutenção dos animais

Foram utilizados 45 coelhos brancos (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia, do gênero masculino, pesando entre 3,0 e 3,5kg, com aproximadamente quatro meses de vida. Os animais foram fornecidos pelo Laboratório Central de Animais da Universidade de Oulu, após aprovação do projeto encaminhado ao Comitê de Cuidados e Utilização de Animais da Universidade de Oulu e em seguida pelo Governo da Província de Oulu. Os coelhos foram aclimatados ao laboratório em ambiente com temperatura, alimentação, iluminação e higiene controlada, em gaiolas individuais de 80cm³, possibilitando espaço suficiente para sua movimentação e descanso. Os animais ficavam isolados, para certificar-se de que estes estariam estáveis e saudáveis, mantendo contato apenas com as pessoas envolvidas no trabalho.

4.1.2 Extração das Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMPs) (FIGURA 1)

Inicialmente ossos longos de renas (*Rangifer tarandus*) jovens eram enviados pelo frigorífico sob refrigeração de 0° C. Logo que estes ossos chegavam ao Laboratório do “Bone Transplantation Research Group” na Universidade de Oulu, removiam-se o perióstio e o osso medular, por meio de jatos de água sob alta pressão, mantendo-se assim apenas o osso cortical. Estes ossos eram cortados com uma serra vertical em cilindros de 5,0cm de comprimento e imediatamente acondicionados em recipiente contendo nitrogênio líquido. Depois de aproximadamente dez minutos estes ossos eram transformados em grânulos de 500µm, utilizando máquina de pulverização,

acondicionados em recipiente plástico e mantidos sob refrigeração de -80°C . Após obtenção do osso granulado, este era pesado para quantificar o material necessário para iniciar o processo de desmineralização.

O processo de desmineralização foi realizado com ácido clorídrico (HCl -0,6M) sendo, para cada quilo de osso granulado, utilizados dois litros de ácido clorídrico, por dois períodos de 48 horas em centrifugação lenta e constante, de aproximadamente 50rpm, em câmara fria a 4°C . Após o primeiro período de 48 horas, aguardava-se a decantação do osso granulado e trocava-se todo o conteúdo de ácido clorídrico e prosseguia-se por mais um período de 48 horas de centrifugação constante. Aguardava-se nova decantação, removia-se todo o ácido clorídrico e submetia-se o osso granulado à lavagem com água pura esterilizada e deionizada por duas vezes.

A partir deste ponto, o osso granulado desmineralizado estava pronto para a extração das proteínas não colagênicas, inclusive as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Esta extração foi iniciada com a utilização de aminometanamidina 4M (Practical Grade – Sigma G4630 – $\text{CH}_5\text{N}_3\text{HCl}$). Nesta fase, para cada quilo de osso eram utilizados três litros de guanidina hidrocloreídrica, mantidos em centrifugação lenta (50rpm) e constante (FIGURA 2) por dois períodos de 48 horas, em câmara fria a 4°C . Após o primeiro período de 48 horas, aguardava-se a decantação do osso granulado e trocava-se todo o conteúdo de guanidina hidrocloreídrica e prosseguia-se por mais um período de 48 horas de centrifugação constante. Toda a guanidina hidrocloreídrica obtida nestes dois períodos de centrifugação lenta e constante eram submetidos à centrifugação de fluxo contínuo – 7000rpm - sob refrigeração. O líquido obtido foi filtrado em um sistema de fluxo tangencial (FIGURA 3), inicialmente com um filtro de $0,30\mu\text{m}$ e posteriormente com filtro de 10kD (Minitan – Milipore). Este material foi dialisado contra água, por dois períodos de 24 horas, utilizando-se membrana Spectra PorR 4 MWCO: 12-14.000, e novamente submetido à centrifugação de fluxo contínuo, descrita acima. O material insolúvel em água foi dissolvido em

guanidina hidrocloreídrica pura por um período de 24 horas e novamente submetido à centrifugação de fluxo contínuo. O material insolúvel em guanidina foi descartado e a solução dialisada em 11 volumes de solução tampão de citrato 0,25M, pH3,1, por dois períodos de 12 horas e novamente submetido à centrifugação de fluxo contínuo. O material insolúvel foi coletado e liofilizado em 0,09mbar a -57°C , tomando a forma de pó.

4.1.3 Carreadores

4.1.3.1 Carbonato de cálcio

O carbonato de cálcio utilizado como carreador neste trabalho foi o Biocoral[®] (Inotek, St. Gonnery, France, CE0459), um biomaterial, reabsorvível, derivado de coral natural, gênero *Porites* sendo constituído de 97% de carbonato de cálcio em sua forma cristalina (aragonita) e elementos traço muito semelhantes às do osso. O tamanho de seus poros variava entre 100 a 200 μm , sendo similar ao osso esponjoso, os grânulos apresentavam 500 μm de diâmetro e os blocos 5,0mm de largura x 5,0mm de comprimento x 3,0mm de espessura.

4.1.3.2 Colágeno

Combinado ao carbonato de cálcio em grânulos, foi utilizado o colágeno bovino tipo I granular (Sigma Chemical, St. Louis, USA.). O carbonato de cálcio em bloco foi envolvido em tiras de colágeno tipo I Lyostypt (B. Braun).

FIGURA 1. Esquema da extração de proteínas ósseas morfogénicas (a partir de JORTIKKA⁴¹, 1993)

FIGURA 2. Durante os processos de desmineralização e extração das proteínas não colágenas, a solução era mantida sob constante agitação durante duplo período de 48 horas em sala refrigerada a temperatura de 4°C

FIGURA 3. A) Bomba d'água; B) Filtro com sistema de fluxo tangencial utilizados durante o processo de filtração; C) "Eppendorfs" contendo material implantar

4.1.4 Combinação das rBMPs aos carreadores

4.1.4.1 Carbonato de cálcio em grânulos e colágeno

Inicialmente 15,0mg de rBMP¹ liofilizada foram pesados em balança de precisão e associados a 150µl de água esterilizada. A esta solução eram adicionados 375mg de colágeno tipo I e mantidos em agitador orbital por um período de 12 horas, a 4°C. Amostras de 25mg de carbonato de cálcio em grânulos foram acondicionados em 30 “ependorfs” (FIGURA3) e 10µl da solução, contendo aproximadamente 1,0mg de rBMP, foi adicionada a estes tubos e o conjunto foi submetido à agitação por dez segundos. Estas amostras foram levadas ao freezer com temperatura de -70°C, permanecendo por 12 horas. Posteriormente as amostras foram liofilizadas e submetidas à esterilização em gás óxido de etileno.

4.1.4.2 Carbonato de cálcio em blocos e colágeno

Inicialmente 15,0mg de rBMP liofilizada foram pesados em balança de precisão e associados a 150µl de água esterilizada. Os blocos de carbonato de cálcio foram envolvidos pelo colágeno em tiras de colágeno tipo I. Neste momento 10µl da solução eram adicionadas a este conjunto e posteriormente liofilizados e esterilizados em gás óxido de etileno.

¹ Reindeer bone morphogenetic protein

4.1.5 Amostras Controle

A confecção das amostras controle seguiram os mesmos passos das amostras testes (com rBMPs), a não ser pelo fato de não receberem rBMPs.

4.1.6 Grupos Experimentais

Foram utilizados 45 coelhos, divididos em três grupos de acordo com os materiais a serem implantados. Em cada animal foram realizados dois defeitos, de 8,0cm de diâmetro, lateralmente a linha média (FIGURA 4). Cada grupo era composto por 15 animais, submetidos à eutanásia após os períodos de quatro, seis e dez semanas, conforme tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos grupos e períodos de avaliação, experimento I

Grupo	Nº de animais	Material Implantado		Tempos de Avaliação (semanas)
		Direito	Esquerdo	
I	15	carbonato de cálcio (grânulos) + colágeno + rBMP	carbonato de cálcio (grânulos) + colágeno	4
				6
				10
II	15	carbonato de cálcio (bloco) + colágeno + rBMP	carbonato de cálcio (bloco) + colágeno	4
				6
				10
III	15	osso autógeno	coágulo	4
				6
				10

4.1.7 Técnica cirúrgica

4.1.7.1 Anatomia da região operada

FIGURA 4. **A)** Visão superior do crânio e face de coelho. **B)** Visão aproximada do osso frontal e ossos nasais, com desenho da perfuração realizada no osso frontal. **C)** Desenho esquemático de corte sagital de crânio e face de coelho, com a região da perfuração assinalada (a partir de POPESKO, P.; RAJTOVA, V.; HORAK, J., 1992⁸²).

4.1.7.2 Anestesia

Os animais foram submetidos à anestesia geral produzida por uma injeção intramuscular de hidrocloreto de ketamina, (Ketalar^R, Parke-Davis, Barcelona, Spain; - 50mg/ml – 20mg/kg) e de hidrocloreto de medetomidina, (Domitor^R Lääkefarmos Oy, Turku, Finlândia; - 1mg/ml – 300mg/Kg). Como dose de manutenção, a dosagem acima era diluída em 10ml de soro fisiológico estéril e quando necessário, injetados de

1,0 a 2,0ml intravascularmente. O antibiótico Cefuroxina 250mg era administrado profilaticamente. As áreas a serem operadas foram tricotomizadas e submetidas a anti-sepsia local com solução de clorexidina a 2%. Na área da incisão foi infiltrada lidocaína a 2% (Astra AB, Södertälje, Sweden) a fim de conseguir hemostasia local durante o procedimento cirúrgico (FIGURA 5).

4.1.7.3 Criação dos defeitos em calvária

A incisão na fronte do animal estendia-se por oito centímetros de comprimento sendo realizada com lâmina de bisturi número 15. Um retalho de espessura total deslocava a pele, músculo e periósteo, expondo parcialmente os ossos nasais e frontal. A pele era divulsionada do periósteo para permitir a posterior sutura destes tecidos em camadas, favorecendo a manutenção de uma área estável na região em que o enxerto seria realizado (FIGURA 6).

Os defeitos em calvária foram criados com broca esférica carbide número dois em baixa rotação e irrigação constante com soro fisiológico estéril. Um dispositivo metálico circular perfurado com 8,0mm de diâmetro interno foi utilizado para padronizar as perfurações. Foram realizados dois defeitos situados lateralmente à linha média do animal (FIGURA 5), sendo o defeito do lado direito do animal preenchido com material experimental e o defeito do lado esquerdo preenchido com material considerado controle (FIGURA 6). Inicialmente a broca perfurava a cortical óssea externa a qual era removida com o auxílio de uma cureta de arestas não cortantes. Posteriormente a cortical interna era desgastada com a broca carbide e deslocada com muito cuidado para não romper a membrana dura-máter subjacente. O osso autógeno, utilizado no grupo controle positivo, era obtido triturando-se o osso removido da calvária e de osteotomia realizada no osso frontal. No grupo controle negativo manteve-se o coágulo.

FIGURA 5. **A)** Medicação utilizada para anestesia do animal; **B)** Isolamento do campo operatório e região do crânio tricotomizada; **C)** Retalho de espessura total expondo o tecido ósseo; **D)** Defeitos criados no crânio do coelho

4.1.8 Obtenção dos espécimes

Após os respectivos períodos experimentais, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de superdosagem de pentobarbital intramuscular. Posteriormente realizou-se incisão com lâmina de bisturi número 15, com o objetivo de expor o tecido ósseo da região na qual o enxerto fora realizado. Com um disco de aço montado em mandril para peça reta de micromotor elétrico, cortou-se uma peça que possuía pelo menos 5,0mm de margem de segurança em relação às paredes laterais dos defeitos submetidos aos enxertos (FIGURA 7).

FIGURA 6. **A)** Preenchimento dos defeitos com material de enxerto em bloco, envolvido por colágeno; **B)** Preenchimento dos defeitos com material de enxerto granular; **C)** Sutura do periósteo, com “vicryl” trançado, evitando que a movimentação da pele possa movimentar a região do enxerto; **D)** Sutura da pele com náilon em monofilamento [T= sítio teste / C= sítio controle]

4.1.9 Preparo dos espécimes para corte microscópico

Cada espécime (FIGURA 7) era inserido em recipiente plástico identificado pelo número e grupo do coelho, contendo formalina a 4% por um período de 24 horas. Após este período o espécime foi lavado em água corrente por um período de duas horas para eliminação do fixador. Passou-se a desidratação, por meio de uma série crescente de soluções alcoólicas, variando entre álcool 60°, 70°, 80°GL e absoluto. O tempo de desidratação em cada concentração de álcool foi de três dias sob agitação constante. O próximo passo foi a infiltração plástica, realizada inicialmente com um mistura de 70% de glicometacrilato (Technovit 7200C) e 30% de álcool etílico absoluto, seguida por variações gradativas da mistura para 50% cada substância, 70% e 30% respectivamente e finalmente por duas infiltrações de glicolmetacrilato puro. Cada passo teve a duração de três dias, mantendo-se o conjunto sob agitação constante.

FIGURA 7. **A)** Pentobarbital utilizado para eutanásia dos animais; **B)** Espécime obtido da região da calvária

4.1.9.1 Coloração

Após o corte, os espécimes foram corados com Tricômico de Goldner.

Técnica utilizada:

1. lavar as lâminas em água destilada por duplo período de 15 minutos;
2. imersão das lâminas em hematoxilina de Weigert's por 20 minutos;
3. lavar em água;
4. diferenciação com álcool ácido a 0,5%;
5. lavar em água por 20 minutos;
6. fucsina ácida/azoflo xina por cinco minutos;
7. lavar em ácido acético por dez segundos;
8. ácido fosfomolibídico/laranja G por 20 minutos;
9. lavar em ácido acético por dez segundos;
10. verde leve por cinco minutos;
11. lavar em água;
12. secagem com papel absorvente;
13. lavar em álcool por duas vezes;
14. lavar em metil-cicloxane por duas vezes;

4.1.10 Análise dos Espécimes

4.1.10.1 Critérios para análise tomográfica da densidade óssea

A tomografia computadorizada de cada espécime foi realizada durante o período de desidratação. O tomógrafo utilizado foi o XCT 960 A (Norland – Stratec, Birkenfeld, Germany¹³⁹) um tomógrafo periférico de análise quantitativa, utilizado para diagnóstico de osteoporose em punho em humanos (FIGURA 9).

Cada espécime era inserido em tubo plástico cilíndrico para permitir a rotação do tomógrafo e imerso na mesma solução alcoólica em que estava presente. Este tubo era fixado no braço do tomógrafo de forma que o laser de localização incidisse exatamente na linha média anteroposterior e laterolateral dos defeitos criados no crânio dos coelhos (FIGURA 9).

O tomógrafo foi programado para realizar três cortes transversais em cada espécime, sendo cada espécime submetido ao tomógrafo por três vezes em diferentes tempos. Desta forma cada espécime era submetido a nove cortes, sendo a média das médias das três tomografias utilizada como valor final de cada espécime (FIGURA 8).

FIGURA 8. Organograma do exame tomográfico de cada espécime

As informações de cada animal eram gerenciadas em um banco de dados (programa de análise pQCT versão 5.1) com ordem hierárquica. Para cada espécime, definiu-se um número de identificação e adicionalmente um número para cada medição foi fornecido. Para cada medição, diferentes regiões de interesse (ROI) foram definidas – ROI 1 –sítio teste / ROI 2 – sítio controle – e para cada região de interesse a densidade óssea mineral foi calculada (FIGURAS 8 e 9).

FIGURA 9. **A)** Tomógrafo periférico de análise quantitativa pQCT XCT960A e cilindro com espécime em posição durante exame tomográfico; **B)** Detalhe do cilindro no qual o espécime estava inserido; **C)** Imagem tomográfica obtida e regiões de interesse analisadas (ROI 1 – Teste / ROI 2 – Controle)

4.1.10.2 Critérios para análise microscópica da densidade óssea

As lâminas foram analisadas em microscópio Nikon Optiphot II (Nikon Corporation, Japan) e as imagens digitais foram capturadas com câmera Sony – 3CCD– modelo XCT 930P (Sony Corporation, Japan). O programa de computador utilizado para a análise das imagens digitalizadas foi o MCID-M4 3.0 – Rev. 1.1 – Imaging Research, Ontário, Canadá.

Para cada espécime foi confeccionada uma lâmina, e em cada lâmina pôde-se visualizar o sítio teste e o sítio controle (FIGURA 10A). Na região de interesse a ser analisada (sítio teste ou controle), era realizada a demarcação da área na qual o defeito ósseo havia sido realizado (FIGURAS 10B e 10C) e da tonalidade e cor do osso (“pixel”) a ser computado como preenchendo a área previamente delimitada. Com estes dados o programa de computador calculava a área proporcional da matriz óssea mineralizada na área delimitada (FIGURAS 10D e 10E). Estas medições foram realizadas três vezes para cada sítio analisado em intervalos de tempo diferentes.

4.1.11 Análise estatística dos resultados

Neste experimento, realizou-se inicialmente análise descritiva da formação óssea ao longo dos três períodos de avaliação.

Para análise dos grupos no mesmo animal, foi realizado o teste t de Student para cada período de tempo. Para a análise dos grupos entre animais foi realizada análise de variância, para cada período de tempo. O programa utilizado foi o SPSS 8.0 (SPSS, Dec.1997).

FIGURA 10. **A)** Fotomicrografia inicial, onde se pode avaliar parcialmente os sítios teste e controle; **B e C)** Fotomicrografias dos sítios teste e controle, respectivamente, com áreas a serem analisadas delimitadas em vermelho; **D e E)** Fotomicrografias dos sítios teste e controle, respectivamente, após a seleção e análise da área pelo programa [**ob**=osso basal; **on**=osso neoformado; **mc**=massa cefálica; **cc**=carbonato de cálcio; **tc**=tecido conjuntivo]

4.1.12 Aspectos éticos e legais

O protocolo deste projeto foi submetido e aprovado previamente pelo Comitê de Cuidados e Utilização de Animais da Universidade de Oulu e em seguida pelo Governo da Província de Oulu, Finlândia (apêndice).

4.2 EXPERIMENTO II

4.2.1 Origem, seleção e manutenção dos animais

Foram utilizados 30 coelhos brancos (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia, do gênero masculino, pesando entre 3,0 e 3,5kg, com aproximadamente quatro meses de vida. Os animais foram fornecidos pelo Laboratório Central de Animais da Universidade de Oulu, após aprovação pelo Comitê de Cuidados e Utilização de Animais da Universidade de Oulu e em seguida pelo Governo da Província de Oulu. Os coelhos foram aclimatados ao laboratório em ambiente com temperatura, alimentação, iluminação e higiene controlada, em gaiolas individuais de 80cm³, possibilitando espaço suficiente para sua movimentação e descanso. Os animais ficavam isolados, para certificar-se de que estes estariam estáveis e saudáveis, mantendo contato apenas com as pessoas envolvidas no trabalho.

4.2.2 Extração das Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMPs)

Idem ao item descrito no experimento I.

4.2.3 Carreadores

4.2.3.1 Carbonato de cálcio

O carbonato de cálcio utilizado como carreador neste trabalho foi o Biocoral[®] (Inoteb, St. Gonnerly, France, CE0459), um biomaterial, reabsorvível, derivado de coral natural, gênero *Porites* sendo constituído de 97% de carbonato de cálcio em sua forma cristalina (aragonita) e elementos traço muito semelhantes às do osso. O tamanho de seus poros é de 100 a 200µm, sendo similar ao osso esponjoso e os grânulos apresentavam 500µm de diâmetro.

4.2.3.2 Colágeno

Associado ao carbonato de cálcio em grânulos, foi utilizado o colágeno bovino tipo I granular (Sigma Chemical, St. Louis, USA).

4.2.4 Combinação das rBMPs aos carreadores

4.2.4.1 Carbonato de cálcio em grânulos e colágeno

Inicialmente 15,0mg de rBMP liofilizada foram pesados em balança de precisão e associados a 150µl de água esterilizada. A esta solução eram adicionados 375mg de colágeno tipo I e mantidos em agitador orbital por um período de 12 horas, a 4°C. Amostras de 25mg de carbonato de cálcio em grânulos foram acondicionados em 15 “eppendorfs” e 10µl da solução, contendo aproximadamente 1,0mg de rBMP, foi adicionada a estes tubos e o conjunto foi submetido à agitação por dez segundos. Estas amostras foram levadas ao freezer com temperatura de menos 70°C, permanecendo por 12 horas. Posteriormente as amostras foram liofilizadas e submetidas à esterilização em gás óxido de etileno.

4.2.5 Amostras Controle

A confecção das amostras controle seguiram os mesmos passos das amostras testes (com rBMPs), a não ser pelo fato de não receberem rBMPs.

4.2.6 Grupos experimentais

Dos 45 coelhos utilizados no experimento I, 30 receberam dois implantes rosqueáveis de titânio puro, com 3,75mm de diâmetro e 11,5mm de altura, um localizado em cada tíbia. Em cada grupo utilizaram-se 15 animais, submetidos à eutanásia após os períodos de quatro, seis e dez semanas, conforme Tabela 2.

Todos os coelhos foram submetidos inicialmente à cirurgia na calvária e posteriormente nas tíbias. Mesmo os animais que não receberam os implantes de titânio na tíbia, foram submetidos ao mesmo protocolo cirúrgico e inserção dos biomateriais.

Tabela 2. Distribuição dos grupos e períodos de avaliação, experimento II

Grupo	Nº de animais	Material Implantado		Tempos de Avaliação (semanas)
		Direito	Esquerdo	
I	15	implante de titânio + carbonato de cálcio (grânulos) + colágeno + rBMP	implante de titânio + carbonato de cálcio (grânulos) + colágeno	4
				6
				10
II	15	implante de titânio + colágeno	implante de titânio + coágulo	4
				6
				10

4.2.7 Técnica Cirúrgica

4.2.7.1 Anestesia

Os animais foram submetidos à anestesia geral produzida por uma injeção intramuscular de hidrocloreto de ketamina, (Ketalar^R, Parke-Davis, Barcelona, Spain; - 50mg/ml – 20mg/kg) e de hidrocloreto de medetomidina, (Domitor^R Lääkefarmos Oy, Turku, Finlândia; - 1mg/ml – 300mg/Kg). Como dose de manutenção, a dosagem acima era diluída em 10ml de soro fisiológico estéril e quando necessário, injetados de 1 a 2ml intravascularmente. O antibiótico Cefuroxina 250mg era administrado profilaticamente. As áreas a serem operadas foram tricotomizadas e submetidas à antissepsia local com solução de clorexidina a 2%. Na área da incisão foi infiltrada lidocaína a 2% (Astra AB, Södertälje, Sweden) a fim de conseguir hemostasia local durante o procedimento cirúrgico (FIGURAS 5 e 11).

4.2.7.2 Inserção dos implantes

Realizou-se uma incisão com lâmina de bisturi número 15 de aproximadamente 10cm na pele, no tecido muscular e periósteo de modo a alcançar o tecido ósseo, no qual se procedeu a uma perfuração em cada tíbia para a instalação da fixação. Iniciava-se a perfuração com uma broca esférica, seguindo com uma broca cilíndrica de 2,0mm de diâmetro, broca piloto e posteriormente com uma broca cilíndrica de 3,0mm diâmetro em alta velocidade (2000rpm), usando irrigação copiosa com soro fisiológico, como preconiza a técnica cirúrgica. Após a perfuração dos sítios, o sítio do lado direito do animal era escolhido para inserir o material de teste e o lado esquerdo o material controle, conforme se observa na tabela 2. Posteriormente à inserção dos materiais, os implantes de titânio foram rosqueados em baixa velocidade (20rpm) e tapados com

parafusos de cobertura. O periósteo e os tecidos sobrejacentes eram suturados com fio vicryl 4.0 (Jonhson & Jonhson) e a pele suturada com fio de náilon 4.0 (Jonhson & Jonhson) (FIGURAS 11. A-D).

4.2.8 Obtenção dos espécimes

Após os respectivos períodos experimentais, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de superdose de pentobarbital (FIGURA 7) intramuscular. Posteriormente realizou-se incisão com lâmina de bisturi número 15, com o objetivo de expor o tecido ósseo da região na qual o implante fora realizado. Com um disco de aço montado em mandril para peça reta de micromotor elétrico, a tíbia do animal foi cortada à pelo menos 5,0mm do implante inserido (FIGURA 12).

4.2.9 Preparo dos espécimes para corte microscópico

Cada espécime era inserido em recipiente plástico identificado pelo número e grupo do coelho, contendo formalina a 4% por um período de 24 horas. Após este período o espécime foi lavado em água corrente por um período de duas horas para eliminação do fixador. Passou-se a desidratação, por meio de uma série crescente de soluções alcoólicas, variando entre álcool 60°, 70°, 80°GL e absoluto. O tempo de desidratação em cada concentração de álcool foi de três dias sob agitação constante. O próximo passo foi a infiltração plástica, realizada inicialmente com um mistura de 70% de glicometacrilato (Technovit 7200C) e 30% de álcool etílico absoluto, seguida por variações gradativas da mistura para 50% cada substância, 70% e 30% respectivamente e finalmente por 2 infiltrações de glicolmetacrilato puro. Cada passo teve a duração de três dias, mantendo-se o conjunto sob agitação constante.

FIGURA 11. A) Tíbia do coelho após realização de perfuração com seqüência de brocas para inserção do implante; B) Após o preenchimento da perfuração com material de enxerto ou com a manutenção do coágulo, o implante foi inserido; C) Sutura do periósteo, com “vicryl” trançado; D) Sutura da pele com náilon em monofilamento; E) Radiografia demonstrando a presença de material enxertado após a inserção do implante [c= coágulo; t= tíbia; p=pele; pe=periósteo; I=implante]

4.2.9.1 Coloração

Idem ao experimento I.

4.2.10 Análise dos espécimes

As lâminas foram analisadas em microscópio Nikon Optiphot II (Nikon Corporation, Japan) e as imagens digitais foram capturadas com câmera Sony – 3CCD– modelo XCT 930P (Sony Corporation, Japan). O programa de computador utilizado para a análise das imagens digitalizadas foi o MCID-M4 3.0 – Rev. 1.1 – Imaging Research, Ontário, Canadá.

FIGURA 12. **A)** Após a eutanásia do animal, o tecido ósseo e o implante eram expostos por meio de retalho total; **B)** Tíbia do animal após corte com disco de aço montado em mandril [**d**= margem de segurança de pelo menos 5,0mm; **t**= tíbia; **p**= periósteo; **I**= implante]

4.2.10.1 Critérios para análise do percentual de osseointegração

Foram utilizadas para contagem as três primeiras roscas a partir do limite entre o osso cortical e o osso medular (seis no total, três de cada lado do implante). A medida linear de contato ósseo (em vermelho) era realizada pelo programa, assim como a medida linear de não contato (em azul), e estas eram somadas para se obter a superfície total da rosca analisada (FIGURA 13). O resultado da osseointegração foi obtido da seguinte forma, para cada rosca: % de osseointegração = superfície de contato X 100 / superfície total. Os resultados para cada amostra foram obtidos pela média das roscas analisadas.

4.2.10.2 Critérios para análise microscópica do volume ósseo

Foram utilizadas para contagem as três primeiras roscas a partir do limite entre o osso cortical e o osso medular (seis no total, três de cada lado do implante). A área alvo era selecionada e o volume ósseo calculado como um percentual de toda a área tecidual diretamente pelo programa (FIGURA14). Para os valores de volume ósseo no interior das roscas o programa utilizava o seguinte cálculo:

$$\text{volume} = \text{área ocupada por matriz óssea mineralizada} \times 100 / \text{área total}.$$

FIGURA 13. **A)** Fotomicrografia da interface implante-osso; **B)** Medição linear da superfície com contato direto entre implante e tecido ósseo (vermelho); **C)** Medição linear da superfície sem contato implante tecido ósseo (azul), associada à medição linear da superfície com contato direto entre implante e tecido ósseo; [O programa executava a seguinte fórmula para o cálculo do percentual linear de integração - % de osseointegração = superfície de contato X 100 / superfície total - I=implante; O=osso]

4.2.11 Análise estatística dos resultados

Neste experimento, realizou-se inicialmente análise descritiva da formação óssea ao longo dos três períodos de avaliação.

Os grupos foram comparados entre si por meio de análise de variância, utilizando-se o programa estatístico SPSS 8.0.

4.2.12 Aspectos éticos e legais

O protocolo deste projeto foi submetido e aprovado previamente pelo Comitê de Cuidados e Utilização de Animais da Universidade de Oulu e em seguida pelo Governo da Província de Oulu, Finlândia (apêndice).

FIGURA 14. **A)** Fotomicrografia da interface implante-osso; **B)** Seleção linear da área alvo; **C)** Volume ósseo calculado como o percentual de toda a área de matriz mineralizada (vermelho); [O programa executava a seguinte fórmula para o cálculo do volume percentual - volume = área ocupada por matriz óssea mineralizada X 100 / área total - I=implante; O=osso]

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Experimento I

Durante a realização deste trabalho não houve significativa morbidade dos animais, presença de infecções e hematomas ou dificuldade de alimentação pós-operatória.

5.1.1 Análise Microscópica

5.1.1.1 Grupo I

5.1.1.1.1 Quatro Semanas

FIGURA 15. A) Fotomicrografia do sítio teste evidenciando a formação óssea ao redor e entre os grânulos de carbonato de cálcio. Na parte superior, nota-se a presença de tecido conjuntivo; B) No sítio controle, a formação óssea está restrita às bordas do defeito em contato com osso basal. Os grânulos de carbonato de cálcio estão circundados por tecido conjuntivo [mc=massa cefálica; ob= osso basal; on = osso neoformado; tc= tecido conjuntivo; seta = carbonato de cálcio]

5.1.1.1.2 Seis Semanas

FIGURA 16. A) Fotomicrografia do sítio teste evidenciando a formação óssea ao redor e entre os grânulos de carbonato de cálcio; B) No sítio controle, mínima formação óssea restrita às bordas do defeito em contato com osso basal. Os grânulos de carbonato de cálcio estão circundados por tecido conjuntivo [mc=massa cefálica; ob= osso basal; on = osso neoformado; tc= tecido conjuntivo; seta = carbonato de cálcio]

5.1.1.1.3 Dez Semanas

FIGURA 17. A) Fotomicrografia do sítio teste, evidenciando a formação óssea em toda a região do defeito ósseo e ausência de grânulos de carbonato de cálcio. Na região inferior do defeito, o osso possui características lamelares, com espaços medulares reduzidos; B) Sítio controle, com formação óssea também preenchendo toda a região do defeito, entretanto os espaços medulares são mais amplos; [mc=massa cefálica; ob= osso basal; on = osso neoformado; ol = osso lamelar; tc= tecido conjuntivo]

5.1.1.2 Grupo II

5.1.1.2.1 Quatro Semanas

FIGURA 18. **A)** Fotomicrografia do sítio teste, evidenciando-se neoformação óssea na região onde foi confeccionado o defeito; **B)** No sítio controle, mínima formação óssea restrita às bordas do defeito em contato com osso basal; [ob= osso lamelar; on= osso neoformado; mc= massa cefálica; tc= tecido conjuntivo; seta = carbonato de cálcio]

5.1.1.2.2 Seis Semanas

FIGURA 19. **A)** Fotomicrografia do sítio teste evidenciando a formação óssea ao redor e entre os grânulos de carbonato de cálcio; **B)** No sítio controle, mínima formação óssea restrita às bordas do defeito em contato com osso basal. Os grânulos de carbonato de cálcio estão circundados por tecido conjuntivo; [mc=massa cefálica; ob= osso basal; on = osso neoformado; tc= tecido conjuntivo; seta = carbonato de cálcio; seta = carbonato de cálcio]

5.1.1.2.3 Dez Semanas

FIGURA 20. **A)** Fotomicrografia do sítio teste, evidenciando-se a formação óssea em toda a região em que havia o defeito ósseo e ausência de grânulos de carbonato de cálcio. Na região inferior do defeito, o osso apresenta características lamelares; **B)** No sítio controle, presença maior de grânulos de carbonato de cálcio e predominância de tecido conjuntivo; [mc=massa cefálica; ob= osso basal; on= osso neoformado; ol = osso lamelar; tc= tecido conjuntivo].

5.1.1.3 Grupo III

5.1.1.3.1 Quatro Semanas

FIGURA 21. **A)** Fotomicrografia do sítio teste, com formação óssea preenchendo toda a área do defeito, com espaços medulares amplos. **B)**, Sítio controle, espaço no qual a o tecido conjuntivo foi deslocado durante o processamento e ausência de formação óssea; [mc=massa cefálica; ob= osso basal; on = osso neoformado]

5.1.1.3.2 Seis Semanas

FIGURA 22. A) Fotomicrografia do sítio teste evidenciando a formação óssea com características lamelares na região onde foi confeccionado o defeito; B) Sítio controle com presença de tecido conjuntivo preenchendo grande parte da região do defeito e formação óssea mínima; [mc=massa cefálica; ob= osso basal; on = osso neoformado; ol = osso lamelar; tc= tecido conjuntivo]

5.1.1.3.3 Dez Semanas

FIGURA 23. A) Fotomicrografia do sítio teste evidenciando o preenchimento do defeito com osso com características lamelares; B) Sítio controle com formação óssea na região onde havia sido confeccionado o defeito, mas com volume total menor ao original; [mc=massa cefálica; ob= osso basal; ol= osso lamelar]

5.1.2 Análise Descritiva

No grupo I, os sítios teste foram preenchidos pelo compósito formado por grânulos de carbonato de cálcio e colágeno tipo I combinado a 1,0mg de BMP e os sítios controle foram preenchidos apenas pelo compósito, sem a utilização de BMP. Após quatro semanas, os sítios teste apresentavam osteogênese em grande parte da extensão do defeito e mineralização da matriz óssea neoformada com características de osso imaturo. No sítio controle, visualizava-se osteogênese restrita às bordas do defeito em contato com osso basal, enquanto a região central apresentava-se preenchida por tecido conjuntivo. Os grânulos de carbonato de cálcio estavam presentes e circundados por tecido ósseo no sítio teste enquanto no sítio controle os grânulos estavam circundados por tecido conjuntivo (Fig.15). A proporção média de matriz óssea mineralizada neoformada foi maior ($p= 0.00$) no sítio teste ($0,319 \pm 0,02$) em relação ao sítio controle ($0,221 \pm 0,08$) (Fig.24 e TABELA 3).

A matriz óssea continuou em processo de mineralização na sexta semana (FIGURA 16), principalmente no sítio teste, chegando a proporção média de $0,325 \pm 0,01$, diminuindo os espaços medulares e o número de grânulos de carbonato de cálcio. No sítio controle, a osteogênese estendia-se a partir das bordas do defeito, observavam-se alguns grânulos circundados por tecido ósseo e a proporção média de matriz mineralizada ($0,235 \pm 0,07$) menor que a do sítio teste ($p= 0,05$) (FIGURA 24 e TABELA 3).

Os espaços medulares estavam reduzidos no sítio teste no período de dez semanas e apesar do sítio controle estar completamente preenchido por tecido ósseo os espaços medulares eram amplos. Em ambos os sítios não se visualizavam grânulos de carbonato de cálcio indicando sua completa reabsorção (FIGURA 17). A proporção média de matriz mineralizada era de $0,385 \pm 0,02$ no sítio teste $0,265 \pm 0,08$ no sítio controle ($p= 0,03$) (FIGURA 24 e TABELA 3).

No grupo II, os sítios teste foram preenchidos pelo compósito formado por blocos de carbonato de cálcio e colágeno tipo I combinado a 1,0mg de BMP e os sítios controle foram preenchidos apenas pelo compósito, sem a utilização de BMP. No primeiro período de avaliação, os sítios teste apresentavam osteogênese e mineralização da matriz óssea neoformada com características semelhantes a do grupo I. No sítio controle, visualizava-se osteogênese restrita às bordas do defeito em contato com osso basal, enquanto a região central apresentava-se preenchida por tecido conjuntivo. O bloco, ou partes do bloco de carbonato de cálcio não estavam presentes neste corte provavelmente pelo fato do corte ter sido realizado sobre a área em que o colágeno circundava o mesmo (FIGURA18). A proporção média de matriz óssea mineralizada neoformada foi maior no sítio teste ($0,309 \pm 0,03$) em relação ao sítio controle ($0,196 \pm 0,07$) (FIGURA25 e TABELA 4), mas não significativa ($p=0,110$), sendo um dos motivos para isso o pequeno tamanho da amostra, reduzido ainda mais nesse caso em função da perda de uma das lâminas por erro de processamento.

A osteogênese estava mais evidente na sexta semana de avaliação (FIGURA 19), principalmente no sítio teste, chegando a proporção média de $0,343 \pm 0,04$ (FIGURA 25 e TABELA 4), diminuindo os espaços medulares. A presença do carbonato de cálcio era evidente, mas com sinais de reabsorção perdendo sua característica de bloco. No sítio controle, a osteogênese era limitada às bordas do defeito, ocupado quase completamente por tecido conjuntivo. O carbonato de cálcio apresentava sinais de reabsorção e a proporção de matriz óssea mineralizada presente era de ($0,19 \pm 0,03$), significativamente menor que a do sítio teste ($p= 0,00$) (FIGURA25 e TABELA 4).

Na análise realizada na décima semana, observavam-se espaços medulares reduzidos no sítio teste, sendo o defeito praticamente preenchido por osso em toda a sua extensão. No sítio controle, o osso formado na região inferior apresentou características lamelares, não ocorrendo preenchimento completo do defeito, sendo em sua porção superior preenchida por tecido conjuntivo.

Não se detectou a presença de carbonato de cálcio, indicando sua completa reabsorção neste período (FIGURA 20). A proporção média de matriz mineralizada era de $0,362 \pm 0,14$ no sítio teste e $0,210 \pm 0,06$ no sítio controle ($p= 0,01$) (FIGURA 25 e TABELA 4).

No grupo III, os sítios teste foram preenchidos por osso autógeno removido da própria calvária em forma de grânulos e os sítios controle permaneceram com o coágulo sangüíneo. No primeiro período de avaliação, os defeitos confeccionados nos sítios teste estavam amplamente preenchidos por osso, mas com espaços medulares amplos. Os sítios controle possuíam pouca ou nenhuma formação óssea na análise realizada neste período. A proporção média de matriz mineralizada era maior ($p= 0,04$) no sítio teste ($0,364 \pm 0,06$) em relação ao sítio controle ($0,137 \pm 0,06$) (FIGURA 26 e TABELA 5).

Após seis semanas, nos sítios teste, o osso que reparou a região em que haviam sido confeccionados os defeitos apresentava características lamelares (FIGURA 22), e no sítio controle o tecido conjuntivo preenchia grande parte da região do defeito, sendo visualizada formação óssea apenas na região superior. A proporção média de matriz óssea mineralizada neoformada foi maior ($p= 0,00$) no sítio teste ($0,373 \pm 0,01$) em relação ao sítio controle ($0,192 \pm 0,03$) (FIGURA 26 e TABELA 5).

O defeito confeccionado no sítio teste encontrava-se completamente preenchido por tecido ósseo com espaços medulares reduzidos no período de dez semanas. O defeito no sítio controle estava reparado por tecido ósseo com uma área de preenchimento menor em relação a área original (FIGURA 23). A proporção média de matriz mineralizada era de $0,424 \pm 0,05$ no sítio teste $0,249 \pm 0,05$ no sítio controle ($p=0,00$) (FIGURA 26 e TABELA 5).

A comparação realizada entre os sítios teste e controle nos três diferentes grupos apresentaram diferenças significativas em todos os períodos realizados, exceto no grupo II durante o primeiro período de avaliação, em função provavelmente de a amostra estar extremamente reduzida.

No gráfico referente a figura 27, confeccionado para permitir a comparação intragrupos teste e intragrupos controle, por meio de análise de variância, no período de quatro semanas, constatou-se que o sítio teste do grupo III (controle positivo) apresentou proporção ligeiramente maior de matriz óssea mineralizada em relação aos grupos teste (I e II), não o suficiente para apresentar significado ($p=0,216$) estatístico (TABELA 6). Inversamente, o sítio controle do grupo III (controle negativo) apresentou proporção ligeiramente menor de matriz óssea mineralizada em relação aos grupos teste (I e II), não o suficiente para apresentar significado ($p=0,114$) estatístico (TABELA 6).

De maneira semelhante, nas figuras 28 e 29 constata-se que o sítio teste do grupo III (controle positivo) apresentou proporção ligeiramente maior de matriz óssea mineralizada em relação aos grupos teste (I e II), não o suficiente para apresentar significado (GII - $p=0,079$ / TABELA 7 e GIII $p=0,264$ / TABELA 8) estatístico. Inversamente, o sítio controle do grupo III (controle negativo) apresentou proporção ligeiramente menor de matriz óssea mineralizada em relação aos grupos teste (I e II), não o suficiente para apresentar significado (GII - $p=0,306$ / TABELA 7 e GIII $p=0,135$ / TABELA 8) estatístico.

5.1.3 Análise Estatística

5.1.3.1 Gráficos e Tabelas

FIGURA 24. Gráfico segmentado pelos diferentes períodos de avaliação do **Grupo I**. Evidencia-se a maior quantidade de osso formado nos subgrupos teste em relação aos subgrupos controle. Pode-se ainda observar incrementos na formação óssea ao longo do tempo em todos os subgrupos

TABELA 3. Estatística do **Grupo I** Comparação entre subgrupo teste e subgrupo controle para cada período analisado (**teste** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno +BMP; **controle** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno). Teste t pareado com respectivos valores de significância bicaudais (* diferença significativa).

Estatísticas das amostras pareadas						Teste t pareado		
Grupo	Subgrupo	Tempo	Média	n	d. p.	t	gl	sig.
I	teste	4	0,3192	5	0,022	7	4	0,00*
I	controle	4	0,2215	5	0,008			
I	teste	6	0,3258	5	0,016	2,75	4	0,05*
I	controle	6	0,2359	5	0,067			
I	teste	10	0,3853	5	0,016	2,95	4	0,04*
I	controle	10	0,2658	5	0,082

FIGURA 25. Gráfico segmentado pelos diferentes períodos de avaliação do **Grupo II**. Evidencia-se a maior quantidade de osso formado nos subgrupos teste em relação aos subgrupos controle. Pode-se ainda observar incrementos na formação óssea ao longo do tempo em todos os subgrupos

TABELA 4. Estatística do **Grupo II**. Comparação entre subgrupo teste e subgrupo controle para cada período analisado (**teste** = bloco de carbonato de cálcio + colágeno +BMP; **controle** = bloco de carbonato de cálcio + colágeno). Teste t pareado com respectivos valores de significância bicaudais (* diferença significativa)

Estatísticas das amostras pareadas						Teste t pareado		
Grupo	Subgrupo	Tempo	Média	n	d. p.	t	gl	sig.
II	teste	4	0,3097	4	0,032	2,19	3	0,11
II	controle	4	0,1964	4	0,072			
II	teste	6	0,3435	5	0,045	16,9	4	0,00*
II	controle	6	0,1922	5	0,037			
II	teste	10	0,3628	5	0,14	3,9	4	0,01*
II	controle	10	0,2109	5	0,06

FIGURA 26. Gráfico segmentado pelos diferentes períodos de avaliação do **Grupo III**. Evidencia-se a maior quantidade de osso formado nos subgrupos teste em relação aos subgrupos controle. Pode-se ainda observar incrementos na formação óssea ao longo do tempo em todos os subgrupos

TABELA 5. Estatística do **Grupo III**. Comparação entre subgrupo teste e subgrupo controle para cada período analisado (**teste** = osso autógeno; **controle** = coágulo). Teste t pareado com respectivos valores de significância bicaudais (* diferença significativa).

Estatísticas das amostras pareadas						Teste t pareado		
Grupo	Subgrupo	Tempo	Média	n	d. p.	t	gl	sig.
III	teste	4	0,3644	4	0,069	7,9	3	0,04*
III	controle	4	0,1370	4	0,068			
III	teste	6	0,3733	5	0,018	8,9	4	0,00*
III	controle	6	0,1924	5	0,035			
III	teste	10	0,4247	5	0,050	9,1	4	0,00*
III	controle	10	0,2493	5	0,056

FIGURA 27. Gráfico segmentado pelos diferentes grupos e subgrupos de avaliação no período de quatro semanas. Evidencia-se a maior quantidade de formação óssea nos subgrupos teste em relação aos subgrupos controle. Nos subgrupos teste, pode-se observar formação óssea ligeiramente maior (diferença não significativa) para o subgrupo que recebeu osso autógeno (controle positivo). Nos subgrupos controle, a formação óssea é ligeiramente menor (diferença não significativa) nos sítios que não receberam nenhum tipo de enxerto (controle negativo).

TABELA 6. Comparação do comportamento dentro dos subgrupos teste e dentro dos subgrupos controle após quatro semanas de reparo ósseo. A estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA). Não ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) tanto entre os subgrupos teste quanto entre os subgrupos controle nos **Grupos I, II e III**

		Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Sítios teste	Entre grupos	6,970E-03	2	3,485E-03	1,795	,216
	Dentro dos grupos	1,942E-02	10	1,942E-03		
	Total	2,639E-02	12			
Sítios controle	Entre grupos	1,629E-02	2	8,143E-03	2,723	,114
	Dentro dos grupos	2,991E-02	10	2,991E-03		
	Total	4,619E-02	12

FIGURA 28. Gráfico segmentado pelos diferentes grupos e subgrupos de avaliação no período de seis semanas. Evidencia-se a maior quantidade de formação óssea nos subgrupos teste em relação aos subgrupos controle. Nos subgrupos teste, pode-se observar formação óssea ligeiramente maior (não estatisticamente significativa) para o subgrupo que recebeu osso autógeno (controle positivo). Nos subgrupos controle, não ocorreram diferenças significativas

TABELA 7. Comparação do comportamento dentro dos subgrupos teste e dentro dos subgrupos controle após seis semanas de reparo ósseo. A estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA). Não ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) tanto entre os subgrupos teste quanto entre os subgrupos controle nos **Grupos I, II e III**

		Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
sítios teste	Entre grupos	5,759E-03	2	2,880E-03	3,163	,079
	Dentro dos grupos	1,093E-02	12	9,105E-04		
	Total	1,669E-02	14			
sítios controle	Entre grupos	6,329E-03	2	3,164E-03	1,309	,306
	Dentro dos grupos	2,902E-02	12	2,418E-03		
	Total	3,535E-02	14

FIGURA 29. Gráfico segmentado pelos diferentes grupos e subgrupos de avaliação no período de dez semanas. Evidencia-se a maior quantidade de formação óssea nos subgrupos teste em relação aos subgrupos controle. Nos subgrupos teste, pode-se observar formação óssea ligeiramente maior (não significante estatisticamente) para o subgrupo que recebeu osso autógeno (controle positivo). Nos subgrupos controle, não ocorreram diferenças significativas

TABELA 8. Comparação do comportamento dentro dos subgrupos teste e dentro dos subgrupos controle após dez semanas de reparo ósseo. A estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA). Não ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) tanto entre os subgrupos teste quanto entre os subgrupos controle nos **Grupos I, II e III**

		Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
sítios teste	Entre grupos	9,829E-03	2	4,915E-03	0,630	,549
	Dentro dos grupos	9,366E-02	12	7,805E-03		
	Total	,103	14			
sítios controle	Entre grupos	7,954E-03	2	3,977E-03	0,833	,458
	Dentro dos grupos	5,728E-02	12	4,773E-03		
	Total	6,523E-02	14			

5.1.4 Análise Tomográfica

5.1.4.1 Grupo I

FIGURA 30. Cortes tomográficos representativos do Grupo I. **A)** Após quatro semanas, observa-se no sítio teste área hiperdensa mais compacta, enquanto no sítio controle existem formações hiperdensas representativas dos grânulos de carbonato de cálcio, e áreas hipodensas ao redor destas formações; **B)** Após seis semanas evidencia-se o aumento da densidade, sugerindo o preenchimento completo do defeito no sítio teste, enquanto a parte superior do sítio controle apresenta área hipodensa; **C)** Após dez semanas, a imagem sugere o preenchimento de ambos os sítios, entretanto o sítio teste possui densidade maior em relação ao sítio controle, compatível com neoformação óssea [T=sítio teste; C=sítio controle]

5.1.4.2 Grupo II

FIGURA 31. Cortes tomográficos representativos do Grupo II. **A)** Após quatro semanas, observa-se em ambos os sítios áreas hiperdensas compactas, representativas dos blocos de carbonato de cálcio, e áreas hipodensas ao redor destes blocos; **B)** Após seis semanas evidencia-se o aumento da densidade, sugerindo o preenchimento completo do defeito no sítio teste, enquanto a parte superior e inferior do sítio controle apresenta área hipodensa; **C)** Após dez semanas, a imagem sugere o preenchimento de ambos os sítios, entretanto o sítio teste possui maior densidade e no sítio controle imagem sugere a permanência de parte do bloco de carbonato de cálcio; [T=sítio teste; C=sítio controle]

5.1.4.3 Grupo III

FIGURA 32. Cortes tomográficos representativos do Grupo III. **A)** Após quatro semanas, observa-se no sítio teste aumento da densidade em toda a região em que o defeito foi criado. No sítio controle o aumento da densidade ocorreu apenas nos bordos do defeito; **B)** Após seis semanas evidencia-se o aumento da densidade, sugerindo o preenchimento completo do defeito no sítio teste, enquanto a parte superior do sítio controle apresenta ainda área hipodensa; **C)** Após dez semanas, a imagem sugere o preenchimento completo do sítio teste e aumento de sua densidade. No sítio controle, apenas a região central apresenta densidade aumentada [T=sítio teste; C=sítio controle]

5.1.5 Análise Descritiva

Esta foi realizada para avaliar se a sugestão das imagens obtidas em tomografias poderia ser compatível com os resultados microscópicos. O tomógrafo pQCT XCT960A fornecia a densidade óssea mineral em mg/cm³. Para minimizar os efeitos da presença de material hiperdenso na região onde foi feito o enxerto, calibraram-se as tonalidades de cinza existentes entre as radiopacidades do osso e do carbonato de cálcio.

Em relação aos Grupos I e II (FIGURAS. 30 e 31) pode-se observar que as imagens apresentavam o evidente aumento da densidade em função do preenchimento por material hiperdenso, sugerindo o reparo dos defeitos ósseos nos sítios teste. A densidade da imagem aumentou progressivamente, tornando-se homogênea em toda a área onde foi confeccionado o defeito e sugerindo o reparo total do mesmo. No Grupo II, principalmente, a densidade observada no período inicial de análise, se deve a presença do carbonato de cálcio implantado em forma de bloco, que requereu um tempo maior para ser reabsorvido. Nos sítios controle, também ocorreu progressivo aumento da densidade da imagem na região onde os defeitos foram confeccionados, mas não com a mesma exuberância dos sítios teste. No Grupo III, a imagem referente ao sítio teste também apresentava um aumento da densidade em função do preenchimento por material hiperdenso sugerindo o reparo ósseo da região, mas em função do osso apresentar radiopacidade inferior a do carbonato de cálcio essa densidade era ligeiramente menor (não significativa) em relação aos grupos I e II no primeiro período de análise.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados na análise microscópica e a comparação pareada realizada entre os sítios teste e os sítios controle, nos três diferentes grupos apresentaram diferenças significativas em todos os períodos analisados (Grupo I – FIGURA 33 e TABELA 9; Grupo II – FIGURA 34 e TABELA 10; Grupo III – FIGURA 35 e TABELA 11).

A maior amplitude nas diferenças encontradas na análise tomográfica em relação à análise microscópica ocorre pela impossibilidade de removermos completamente a interferência da radiopacidade presente no material enxertado.

De maneira análoga a análise microscópica, foi realizada avaliação comparativa intragrupos teste por meio de gráficos (FIGURAS. 36; 37 e 38 – quatro, seis e dez semanas respectivamente) e por meio de análise de variância, divididas por períodos de análise (TABELAS 12 e 13 – quatro semanas; TABELAS 17 e 18 – seis semanas e TABELAS 22 e 23 – dez semanas).

Nos três períodos de observação, ao compararmos os sítios teste dos três grupos, não foram observadas diferenças significativas (quatro semanas - $p=0,863$; seis semanas – $p=0,896$ e dez semanas – $p=0,850$).

O mesmo procedimento foi realizado para os grupos controle, por meio de gráficos (FIGURAS. 36; 37 e 38 – quatro, seis e dez semanas respectivamente) e por meio de análise de variância, divididas por períodos de análise (TABELAS 14, 15 e 16 – quatro semanas; TABELAS 19,20 e 21 – seis semanas e TABELAS 24,25 e 26).

Nos três períodos de observação, ao compararmos os sítios controle dos três grupos, foram observadas diferenças significativas (quatro semanas - $p=0,003$; seis semanas – $p=0,005$ e dez semanas – $p=0,014$). O teste de comparações múltiplas revelou que para o primeiro período de avaliação, os sítios controle do grupo I (412,16 mg/cm³) e II (408,24 mg/cm³) apresentaram densidades médias maiores que o grupo III (286,37 mg/cm³), - valores de $p= 0,06$ e $0,007$ respectivamente – e não apresentaram diferenças significativas entre si ($p> 0,05$).

Para o período de seis semanas de avaliação, o teste comparações múltiplas revelou diferenças significativas ocorreram apenas entre os grupos I (555,30 mg/cm³) e III (418,61 mg/cm³) e valor de $p = 0,005$. Não houve diferenças entre os grupos I e II (508,28 mg/cm³) e entre os grupos II e III. O teste de comparações múltiplas revelou que para o último período de avaliação, os sítios controle do grupo I (585,28 mg/cm³) e II (596,93 mg/cm³) apresentaram densidades médias maiores que o grupo III (459,68 mg/cm³), e valores de $p = 0,04$ e $0,02$ respectivamente – e não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

A diferença ocorrida entre a análise tomográfica e a análise microscópica ocorreu pela presença do material enxertado no interior dos defeitos terem contribuído para o aumento nos valores densitométricos, sem realmente significar quantidade real de formação óssea.

5.1.6 Análise Estatística

5.1.6.1 Gráficos e Tabelas

FIGURA 33. Gráfico segmentado pelos diferentes períodos de avaliação. Evidencia-se a maior quantidade de conteúdo mineral nos subgrupos teste em relação aos subgrupos controle. Está ainda demonstrado aumento do conteúdo mineral ao longo do tempo em todos os subgrupos

Tabela 9. Estatística do **Grupo I**. Comparação entre subgrupo teste e subgrupo controle para cada período analisado (**teste** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno +BMP; **controle** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno). Teste t pareado com respectivos valores de significância bicaudais (* diferença significativa)

Estatísticas das amostras pareadas						Teste t pareado		
Grupo	Subgrupo	Tempo	Média	n	d. p.	t	gl	sig.
I	teste	4	614,68	5	78,28	14,4	4	0,00*
I	controle	4	412,18	5	47,23			
I	teste	6	682,87	4	34,40	17,1	3	0,00*
I	controle	6	548,92	4	29,34			
I	teste	10	761,97	4	83,12	10,1	3	0,002*
I	controle	10	585,27	4	53,75

FIGURA 34. Gráfico segmentado pelos diferentes períodos de avaliação. Evidencia-se a maior quantidade de conteúdo mineral nos subgrupos teste em relação aos subgrupos controle. Está ainda demonstrado aumento do conteúdo mineral ao longo do tempo em todos os subgrupos.

Tabela 10. Estatística do **Grupo II**. Comparação entre subgrupo teste e subgrupo controle para cada período analisado (**teste** = bloco de carbonato de cálcio + colágeno + BMP; **controle** = bloco de carbonato de cálcio + colágeno). Teste t pareado com respectivos valores de significância bicaudais (* diferença significativa)

Estatísticas das amostras pareadas						Teste t pareado		
Grupo	Subgrupo	Tempo	Média	n	d. p.	t	gl	sig.
II	teste	4	598,62	4	76,32	12,2	3	0,001*
II	controle	4	399,55	4	44,15			
II	teste	6	648,02	4	105,15	6,2	3	0,008*
II	controle	6	508,27	4	68,59			
II	teste	10	754,66	5	108,35	5,14	4	0,007*
II	controle	10	596,94	5	68,66

FIGURA 35. Gráfico segmentado pelos diferentes períodos de avaliação. Evidencia-se a maior quantidade de conteúdo mineral nos subgrupos teste em relação aos subgrupos controle. Está ainda demonstrado aumento do conteúdo mineral ao longo do tempo em todos os subgrupos.

Tabela 11. Estatística do **Grupo III**. Comparação entre subgrupo teste e subgrupo controle para cada período analisado (**teste** = osso autógeno; **controle** = coágulo). Teste t pareado com respectivos valores de significância bicaudais (*diferença significativa)

Estatísticas das amostras pareadas						Teste t pareado		
Grupo	Subgrupo	Tempo	Média	n	d. p.	t	gl	sig.
III	teste	4	591,45	4	19,01	20,1	3	0,000*
III	controle	4	286,37	4	48,59			
III	teste	6	705,52	4	46,28	105	3	0,000*
III	controle	6	418,6	4	42,46			
III	teste	10	765,65	4	38,60	25,8	3	0,000*
III	controle	10	459,67	4	53,56

FIGURA 36. Gráfico para avaliação comparativa intragrupos teste e intragrupos controle. Pode-se observar a ausência diferença entre os grupos teste. Entre os grupos controle, os sítios que não receberam nenhum tipo de material implantar apresentaram densidade menor em relação aos grupos que receberam o compósito carbonato de cálcio-colágeno

Tabela 12. Análise descritiva da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes aos grupos **teste** da figura 36

Grupo	N	Média	Desvio-padrão
I	5	614,6813	78,2842
II	4	598,6408	76,3480
III	4	591,4358	19,0015
Total	13	602,5933	60,8104

Tabela 13. Estatística da análise de variância (ANOVA) da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes da figura 36. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos **teste** Após quatro semanas de reparo ósseo

	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	1291,047	2	645,523	,150	,863
Dentro dos grupos	43083,865	10	4308,386		
Total	44374,912	12			

Tabela 14. Análise descritiva da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes aos grupos **controle** da figura 36

Grupo	N	Média	Desvio-padrão
I	5	412,1653	47,2155
II	5	408,2407	42,9041
III	4	286,3725	48,6201
Total	14	374,8229	71,9091

Tabela 15. Estatística da análise de variância (ANOVA) da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes à figura 36. Ocorreu diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) entre os diferentes grupos **controle** Após quatro semanas de reparo ósseo.

	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	43849,915	2	21924,957	10,319	,003*
Dentro dos grupos	23371,984	11	2124,726		
Total	67221,899	13			

Tabela 16. Comparações múltiplas (teste de Bonferroni) da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes à figura 36 (* grupos estatisticamente diferentes)

		Diferença média (I-J)	Sig.
(I) GRUPO	(J) GRUPO		
I	II	3,9247	1,000
	III	125,7928	,006*
II	I	-3,9247	1,000
	III	121,8682	,007*

FIGURA 37. Gráfico para avaliação comparativa intragrupos teste e intragrupos controle. Pode-se observar a ausência diferença entre os grupos teste. Entre os grupos controle, os sítios que não receberam nenhum tipo de material implantar apresentaram densidade menor em relação aos grupos que receberam o compósito carbonato de cálcio-colágeno. A diferença foi significativa apenas para o Grupo I, grânulos de carbonato de cálcio-colágeno

Tabela 17. Análise descritiva da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes aos grupos **teste** da figura 37

Grupo	N	Média	Desvio-padrão
I	4	682,8850	34,4129
II	5	682,1600	118,8814
III	4	705,5100	46,2935
Total	13	689,5677	75,2677

Tabela 18. Estatística da análise de variância (ANOVA) da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes à figura 37. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos **teste** Após seis semanas de reparo ósseo.

	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	1469,632	2	734,816	,110	,896
Dentro dos grupos	66513,150	10	6651,315		
Total	67982,782	12			

Tabela 19. Análise descritiva da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes aos grupos **controle** da figura 37

Grupo	N	Média	Desvio-padrão
I	5	555,3060	29,1724
II	4	508,2825	68,6045
III	4	418,6125	42,4972
Total	13	498,7777	73,5903

Tabela 20. Estatística da análise de variância (ANOVA) da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes à figura 37. Ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os diferentes grupos **controle** Após seis semanas de reparo ósseo.

	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	42044,446	2	21022,223	9,163	,005*
Dentro dos grupos	22941,872	10	2294,187		
Total	64986,318	12			

Tabela 21. Comparações múltiplas dos grupos **controle** (teste de Bonferroni) da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes à figura 37. (* grupos estatisticamente diferentes)

(I) GRUPO	(J) GRUPO	Diferença média (I-J)	Sig.
I	II	47,0235	,522
	III	136,6935	,005*
II	I	-47,0235	,522
	III	89,6700	,073

FIGURA 38. Gráfico para avaliação comparativa intragrupos teste e intragrupos controle. Pode-se observar a ausência diferença entre os grupos teste. Entre os grupos controle, os sítios que não receberam nenhum tipo de material implantar apresentaram densidade menor em relação aos grupos que receberam o compósito carbonato de cálcio-colágeno

Tabela 22. Análise descritiva da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes aos grupos **teste** da figura 38

Grupo	N	Média	Desvio-padrão
I	5	785,9887	89,8171
II	5	754,6640	108,3468
III	4	765,6342	38,6351
Total	14	768,9857	81,4383

Tabela 23. Estatística da análise de variância (ANOVA) da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes à figura 38. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos **teste** Após dez semanas de reparo ósseo.

	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	2515,991	2	1257,995	,165	,850
Dentro dos grupos	83702,565	11	7609,324		
Total	86218,555	13			

Tabela 24. Análise descritiva da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes aos grupos **controle** da figura 38

Grupo	N	Média	Desvio-padrão
I	4	585,2867	53,7859
II	5	596,9313	68,6716
III	4	459,6850	53,5922
Total	13	551,1187	84,0449

Tabela 25. Estatística da análise de variância (ANOVA) da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes à figura 38. Ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os diferentes grupos **controle** Após dez semanas de reparo ósseo.

	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	48604,273	2	24302,136	6,721	,014*
Dentro dos grupos	36158,337	10	3615,834		
Total	84762,609	12			

Tabela 26. Comparações múltiplas entre os grupos **controle** (teste de Bonferroni) da densidade óssea mineral (BMD) dos dados referentes à figura 38. (* grupos estatisticamente diferentes).

(I) GRUPO	(J) GRUPO	Diferença média (I-J)	Sig.
I	II	-11,6447	1,000
	III	125,6017	,043*
II	I	11,6447	1,000
	III	137,2463	,020*

5.2 Experimento II

Durante a realização deste trabalho não houve significativa morbidade dos animais, presença de infecções de hematomas ou dificuldade de alimentação pós-operatoriamente.

5.2.1 Análise Microscópica

5.2.1.1 Grupo I – Subgrupo A

5.2.1.1.1 Quatro Semanas

FIGURA 39. **A)** Fotomicrografia do sítio teste (compósito com BMP), evidenciando-se a osteogênese com características de osso imaturo ao redor e em contato com os grânulos de carbonato de cálcio e justapondo-se ao implante. **B)** Visão aproximada da área em destaque [**I**=implante; **o**=osso; **cc**=carbonato de cálcio]

5.2.1.1.2 Seis Semanas

FIGURA 40. A) Fotomicrografia do sítio teste (compósito com BMP), evidenciando-se a osteogênese ao redor e em contato com os grânulos de carbonato de cálcio e com o implante. A matriz extracelular aumenta progressivamente sua mineralização. A quantidade de grânulos de carbonato de cálcio diminuiu em relação ao período de avaliação inicial; B) Visão aproximada da área em destaque [I=implante; O=osso; CC=carbonato de cálcio]

5.2.1.1.3 Dez Semanas

FIGURA 41. A) Fotomicrografia do sítio teste (compósito com BMP), evidenciando-se a osteogênese ao redor e em contato com os grânulos de carbonato de cálcio e com o implante. Os espaços medulares diminuem com o aumento da mineralização da matriz. Observa-se apenas vestígio de material implantar; B) Visão aproximada da área em destaque [I=implante; O=osso; CC=carbonato de cálcio]

5.2.1.2 Grupo I - Subgrupo B

5.2.1.2.1 Quatro Semanas

FIGURA 42. **A)** Fotomicrografia do sítio controle (compósito sem BMP), com osteogênese limitada a proximidade do implante e muito menos evidente em relação ao sítio teste. Ao redor dos grânulos observa-se a formação de tecido conjuntivo; **B)** Visão aproximada da área em destaque [**I**=implante; **o**=osso; **cc**=carbonato de cálcio]

5.2.1.2.2 Seis Semanas

FIGURA 43. **A)** Fotomicrografia do sítio controle (compósito sem BMP), evidenciando osteogênese com características de osso imaturo ao redor e em contato com os grânulos de carbonato de cálcio e com o implante; **B)** Visão aproximada da área em destaque [**I**=implante; **o**=osso; **cc**=carbonato de cálcio]

5.2.1.2.3 Dez Semanas

FIGURA 44. **A)** Fotomicrografia do sítio controle (compósito sem BMP), evidenciando a osteogênese ao redor e em contato com os grânulos de carbonato de cálcio, que ainda permanecem nos espaços medulares; **B)** Visão aproximada da área em destaque [I=implante; o=osso; cc=carbonato de cálcio]

5.2.1.3 Grupo II – Subgrupos A e B

5.2.1.3.1 Quatro Semanas

FIGURA 45. **A)** Fotomicrografia do sítio controle (colágeno ou coágulo), evidenciando pouca osteogênese limitada as regiões próximas à cortical da tíbia e ao implante; **B)** Visão aproximada da área em destaque [I=implante; o=osso]

5.2.1.3.2 Seis Semanas

FIGURA 46. A) Fotomicrografia do sítio controle (colágeno ou coágulo), evidenciando a osteogênese limitada a proximidade do implante; B) Visão aproximada da área em destaque [I=implante; o=osso]

5.2.1.3.3 Dez Semanas

FIGURA 47. A) Fotomicrografia do sítio controle (colágeno ou coágulo), evidenciando formação óssea limitada as regiões próximas ao implante e a cortical da tibia; B) Visão aproximada da área em destaque [I=implante; o=osso]

5.2.2 Análise Descritiva

No Grupo I, anteriormente a instalação dos implantes de titânio, o compósito carbonato de cálcio-colágeno era inserido no alvéolo preparado, combinado a BMP (sítio teste) ou não (sítio controle). Os resultados nos três diferentes períodos de análise demonstraram no sítio teste, tanto percentuais de contato linear osso-implante (Grupo IA - FIGURA 48 e Tabela 27 - 46,68%; 52,91% e 61,51% para quatro, seis e dez semanas respectivamente) quanto volumes percentuais de osso no interior das roscas (Grupo IA - FIGURA 49 e Tabela 30 - 52,26%; 56,46% e 65,11% para quatro, seis e dez semanas respectivamente) significativamente maiores (percentuais de contato linear osso-implante - $p=0,01$; $p=0,05$ e $p=0,01$ e volumes percentuais de osso no interior das roscas $p=0,06$; $p=0,01$ e $p=0,002$; para quatro, seis e dez semanas respectivamente) em relação aos sítios controle (Grupo IB - percentuais de contato linear osso-implante - FIGURA 48 e Tabela 27 - 38,82%; 45,81% e 52,63% para quatro, seis e dez semanas respectivamente / Grupo IB - volumes percentuais de osso no interior das roscas - FIGURA 49 e Tabela 30 - 41,45%; 47,38% e 53,43% para quatro, seis e dez semanas respectivamente), exceto para o primeiro período de análise do volume percentual de osso no interior das roscas.

Ao compararmos os sítios teste (Grupo IA) aos outros grupos controle (Grupo IIC - colágeno + implante- e Grupo IID - apenas implante) por meio de análise de variância e pelos testes de comparações múltiplas de Bonferroni (homogeneidade entre as variâncias) constataram-se diferenças significativas em relação aos dois grupos no período de quatro semanas, quando analisado o percentual de contato osso-implante ($p=0,015$ e $p=0,017$ respectivamente) e na análise do volume percentual de osso no interior das roscas ($p=0,049$ e $p=0,005$ respectivamente).

No período de seis semanas, a diferença ocorreu em relação ao Grupo IIC ($p=0,01$) mas não em relação ao Grupo IID ($p= 0,107$) quando analisados os percentuais de contato linear osso-implante, enquanto que na avaliação do volume percentual de osso no interior das roscas não houve diferença significativa para os dois grupos ($p=0,09$ e $p=0,06$ respectivamente) . Na análise Após dez semanas, constataram-se diferenças significativas, tanto em relação aos percentuais de contato linear osso-implante ($p=0,003$ e $p=0,001$ respectivamente) quanto em relação ao volume percentual de osso no interior das roscas ($p=0,00$ e $p=0,001$ respectivamente), Tabelas 29 e Tabela 32).

5.2.3 Análise Estatística

5.2.3.1 Gráficos e Tabelas

FIGURA 48. Gráfico segmentado pelos diferentes períodos de avaliação. Evidencia-se a maior quantidade de contato direto osso-implante nos subgrupos teste em relação aos subgrupos controle. Pode-se observar ainda o aumento deste contato ao longo do tempo em todos os subgrupos. **Grupo I (subgrupo A =** grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + BMP + implante de titânio; **subgrupo B =** grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + implante de titânio). **Grupo II (subgrupo C =** colágeno + implante de titânio; **subgrupo D =** coágulo + implante de titânio)

Tabela 27. Análise descritiva do contato osso-implante dos dados referentes à figura 48. **Grupo I** (**subgrupo A** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + BMP + implante de titânio; **subgrupo B** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + implante de titânio). **Grupo II** (**subgrupo C** = colágeno + implante de titânio; **subgrupo D** = coágulo + implante de titânio)

tempo (semanas)	subgrupo	n	média	desvio-padrão
4	A	5	46,6804	2,6364
	B	5	38,8287	2,5851
	C	5	39,3987	2,0634
	D	5	39,4883	4,8780
6	A	5	52,9111	1,2237
	B	5	45,8176	4,6961
	C	5	44,1163	2,3054
	D	5	44,3445	5,4589
10	A	5	61,5093	3,5578
	B	5	52,6326	3,9389
	C	5	52,4708	1,5169
	D	5	50,6228	3,6083

Tabela 28. Estatística da análise de variância (ANOVA) do contato osso-implante dos dados referentes à figura 48. Ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos nos períodos de quatro, seis e dez semanas de avaliação

tempo (semanas)		soma dos quadrados	gl	quadrado médio	F	Sig.
4	Entre Grupos	208,957	3	69,652	6,684	,004*
	Dentro dos Grupos	166,744	16	10,422		
	Total	375,701	19			
6	Entre Grupos	257,714	3	85,905	5,857	,007*
	Dentro dos Grupos	234,661	16	14,666		
	Total	492,375	19			
10	Entre Grupos	358,111	3	119,370	10,978	,000*
	Dentro dos Grupos	173,976	16	10,873		
	Total	532,086	19			

Tabela 29. Comparações múltiplas do contato osso-implante dos dados referentes à figura 48 (* grupos estatisticamente diferentes – $p \leq 0,05$).

Grupo I (**subgrupo A** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + BMP + implante de titânio; **subgrupo B** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + implante de titânio). **Grupo II** (**subgrupo C** = colágeno + implante de titânio; **subgrupo D** = coágulo + implante de titânio). O teste de comparações múltiplas utilizado foi o Bonferroni

Tempo (semanas)	teste de comparação	(I) subgrupo (J)	subgrupos	diferença média (I-J)	Sig.
4	Bonferroni	A	B	7,8517	,009*
			C	7,2817	,015*
			D	7,1921	,017*
		B	C	-,5700	1,000
			D	-,6596	1,000
		C	D	-8,9623E-02	1,000
6	Bonferroni	A	B	7,0936	,059
			C	8,7948	,013*
			D	8,5666	,016*
		B	C	1,7013	1,000
			D	1,4731	1,000
		C	D	-,2282	1,000
10	Bonferroni	A	B	8,8767	,004*
			C	9,0385	,003*
			D	10,8865	,001*
		B	C	,1618	1,000
			D	2,0098	1,000
		C	D	1,8480	1,000

FIGURA 49. Gráfico segmentado pelos diferentes períodos de avaliação. Evidencia-se o maior volume ósseo preenchendo o espaço entre as roscas dos implantes nos subgrupos teste em relação aos subgrupos controle. Pode-se observar ainda o crescente aumento de volume ao longo do tempo em todos os subgrupos. **Grupo I** (subgrupo A = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + BMP + implante de titânio; subgrupo B = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + implante de titânio). **Grupo II** (subgrupo C = colágeno + implante de titânio; subgrupo D = coágulo + implante de titânio)

Tabela 30. Análise descritiva do volume percentual médio de osso no interior das roscas dos dados referentes à figura 49. **Grupo I** (**subgrupo A** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + BMP + implante de titânio; **subgrupo B** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + implante de titânio). **Grupo II** (**subgrupo C** = colágeno + implante de titânio; **subgrupo D** = coágulo + implante de titânio)

tempo (semanas)	subgrupos	n	média	desvio-padrão
4	A	5	52,2674	5,1648
	B	5	41,4579	2,9410
	C	5	42,9961	6,5418
	D	5	39,6927	4,0656
6	A	5	56,4615	2,8671
	B	5	47,3805	4,7391
	C	5	48,8671	2,0742
	D	5	48,2884	6,6165
10	A	5	65,1092	4,8571
	B	5	53,4390	2,5522
	C	5	54,6321	1,6631
	D	5	56,0032	,5620

Tabela 31. Estatística da análise de variância (ANOVA) do volume percentual médio de osso no interior das roscas dos dados referentes à figura 49. Ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos nos períodos de quatro, seis e dez semanas de avaliação

tempo (semanas)		Soma dos quadrados	gl	quadrado médio	F	Sig.
4	Entre grupos	471,647	3	157,216	6,644	,004*
	Dentro dos grupos	378,595	16	23,662		
	Total	850,242	19			
6	Entre grupos	262,883	3	87,628	4,450	,019*
	Dentro dos grupos	315,041	16	19,690		
	Total	577,924	19			
10	Entre grupos	423,453	3	141,151	17,013	,000*
	Dentro dos grupos	132,746	16	8,297		
	Total	556,199	19			

Tabela 32. Comparações múltiplas do volume percentual médio de osso no interior das roscas dos dados referentes à figura 48 (* grupos estatisticamente diferentes – $p \leq 0,05$). **Grupo I** (**subgrupo A** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + BMP + implante de titânio; **subgrupo B** = grânulos de carbonato de cálcio + colágeno + implante de titânio). **Grupo II** (**subgrupo C** = colágeno + implante de titânio; **subgrupo D** = coágulo + implante de titânio). O teste de comparações múltiplas utilizado foi o Bonferroni

tempo (semanas)	teste de comparações	(I) Subgrupos	(J) Subgrupos	Diferença média (I-J)	Sig.
4	Bonferroni	A	B	10,8095	,017*
			C	9,2712	,049*
			D	12,5747	,005*
		B	C	-1,5382	1,000
			D	1,7652	1,000
		C	D	3,3034	1,000
6	Bonferroni	A	B	9,0810	,031*
			C	7,5943	,093
			D	8,1731	,061
		B	C	-1,4866	1,000
			D	-,9079	1,000
		C	D	,5787	1,000
10	Bonferroni	A	B	11,6702	,000*
			C	10,4772	,000*
			D	9,1060	,001*
		B	C	-1,1930	1,000
			D	-2,5642	1,000
		C	D	-1,3712	1,000

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Da concepção do trabalho

Na concepção deste trabalho o seguinte questionamento foi determinante: como melhorar e/ou acelerar o processo de reparo ósseo ao redor de implantes osseointegrados inseridos em osso pouco denso e rico em medula óssea, que apresentam os maiores índices de insucesso?

A possibilidade de utilização de fatores indutores no reparo periodontal e periimplantar sempre esteve em nosso pensamento. No final de 1997, o livro “*Bone morphogenetic proteins: Biology, biochemistry and reconstructive surgery*”, publicado em 1996 pelo Prof. T. S. Lindholm, que havia desenvolvido sua pós-graduação com o Prof. Marshall Urist, intensificou o interesse pelas proteínas ósseas morfogenéticas e passou a ser um objetivo de trabalho a ser alcançado. Identificamos a origem finlandesa do editor, na Universidade de Oulu e escrevemos o projeto para análise e aprovação pelo Prof. Lindholm, com o apoio do CNPq. No mesmo ano, um segundo livro, publicado pelo mesmo autor “*Skeletal reconstruction and bioimplantation*”, estabeleceu a certeza que lá seria o lugar em que deveríamos iniciar nosso trabalho.

Durante as primeiras discussões na Finlândia, com o Prof. Lindholm e seu grupo, foi sugerido além da realização do trabalho com implantes de titânio em tíbias de coelhos, o desenvolvimento de um trabalho avaliando o reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico em calvária de coelhos, um modelo já estabelecido para analisar a osteogênese.

6.2 Dos modelos de estudo

6.2.1 Em animais

A capacidade de reparação do tecido ósseo ao redor de implantes osseointegrados pode ser comparada ao processo de cura normalmente encontrado no osso durante o reparo de fraturas estabilizadas. A duração dos estádios individuais do processo podem ser determinados em experimentos em animais utilizando a marcação seqüencial com fluorocromos e posteriormente calculadas para humanos baseando-se na duração do ciclo de remodelação óssea. Este ciclo de remodelação, que consiste nas fases de ativação, reabsorção, quiescência e formação, tem duração aproximada de seis, oito e 18 semanas, para coelhos, cães e humanos respectivamente. Com avaliação dos resultados nos períodos de quatro, seis e dez semanas, pôde-se observar diferentes estádios de evolução do processo reparador tanto nos defeitos em calvária quanto nas tíbias submetidas à inserção de implantes de titânio em coelhos.

Os coelhos apresentam rápida capacidade de reparo ósseo, disponibilidade, baixo custo, facilidade de trabalho e na situação em questão, onde a permissão de utilização de animais exigia critérios elevados e principalmente tempo para a aprovação do projeto de trabalho tanto pela Comissão do Laboratório Central de Animais quanto do Governo da Província de Oulu, o coelho foi considerado o animal de escolha. Outro fator importante está na ampla utilização dos coelhos neste tipo de trabalho, o que viabiliza a comparação de resultados com outros centros de pesquisa.

6.2.2 Dos carreadores

Para uma célula alterar o seu fenótipo, exercer função secretora ou proliferativa, ela recebe informações de moléculas presentes na matriz extracelular, inclusive BMPs, por meio de receptores de membrana específicos em número suficiente. A resposta celular depende ainda da concentração e do tempo em que estas moléculas estão disponíveis na matriz extracelular^{21,27,60}. A utilização de carreadores para a BMP se deve por esta se apresentar, posteriormente a liofilização, a forma de pó. A adição isolada das BMPs ao local operatório não permite que esta atue o tempo suficiente para induzir a osteogênese durante um período adequado^{44,50,55}.

Clinicamente a realização de enxertos com materiais implantares tem o objetivo de aumentar o percentual linear e volumétrico na interface osso-implante de titânio em situações onde os implantes são inseridos tanto imediatamente após extrações dentárias, durante o levantamento de assoalho de seio maxilar e em fenestrações durante a inserção do implante. Deve-se também respeitar esses nas situações onde os implantes são inseridos em sítios previamente enxertados e que necessitam de períodos de reparação específicos³⁹. Este fato nos conduziu a utilizar um carreador composto pela combinação do carbonato de cálcio ao colágeno, por ambos apresentarem reabsorção progressiva e substituição por tecido ósseo, permitindo posterior contato direto osso-implante, sem interferência do material implantar nesta interface^{20,134,135}.

Outro fator importante para a combinação destes materiais ocorreu pelas diferentes características físicas apresentadas por cada um. O carbonato de cálcio, com estrutura física rígida^{20,28,134,135}, impede o colapamento do retalho na região do defeito a ser tratado e exige um período de tempo para reabsorção maior que o colágeno. Por outro lado, a BMP quando incorporada a estruturas rígidas e porosas apresenta dissolução mais rápida do que quando combinada ao colágeno^{60,80}. Este não apresenta estrutura física rígida o suficiente, como foi apontado por BARBOZA et al.³, em 2000,

tanto em sua forma granular quando na forma de esponja, para impedir o colapamento do retalho gerando efeito limitado no aumento do volume ósseo em enxertos do tipo “onlay”.

A boa adesão do osso ao carbonato de cálcio, observada nos resultados tanto no experimento I quanto no experimento II, principalmente quando associada a BMP, pode ser explicado pelos resultados do trabalho realizado por DAMIEN et al.¹⁹, em 1994, constatando a formação *in vivo* de uma camada rica em fosfato de cálcio em sua superfície, favorável a osteointegração e pelo tamanho dos poros, variando entre 100 a 200µm permitindo a osteogênese por osteocondução.

6.2.3 Das proteínas ósseas morfogenéticas

BMPs nativas têm sido extraídas e purificadas de ossos de coelhos^{60,123} bovinos^{67,69,117}; de renas⁴², de suínos⁴¹ e de humanos e sintetizada a partir de tecnologia seqüências de DNA¹³⁸.

A proteína morfogenética óssea utilizada neste experimento foi extraída de renas jovens baseando-se no método descrito por JORTIKKA et al.⁴², 1993. A extração de BMPs de animais jovens fornece maior quantidade de BMPs e com atividade osteoindutora superior a animais adultos^{71,113}. A capacidade osteoindutora das BMPs extraídas de ossos de rena foi comparada a atividade osteoindutora de BMPs extraídas de ossos de bovinos, de caprinos e de suínos⁴². A formação óssea mínima detectável em exames radiográficos necessitava de 0,6mg de BMP extraída de rena, 2,5mg de BMP extraída de bovinos; 5,1mg de BMP extraída de caprinos e 8,0mg de BMP extraída de suínos. Constataram com estes resultados a maior capacidade osteoindutora das BMPs extraídas de renas em relação as outras espécies testadas.

A extração das BMPs de rena gerava 2,0g de material em pó liofilizado, a partir de 40kg de ossos longos. Amostras deste material eram submetidas para análise de sua

capacidade osteoindutora, em sítios ectópicos, no mesmo momento de sua obtenção e posteriormente em intervalos semestrais.

A opção por utilizar BMP extraída de rena ocorreu em função da disponibilidade deste tipo de animal em países escandinavos, da sua capacidade osteoindutora em relação à de outros animais e à própria recombinante humana. Esta última foi comparada por BESSHO⁶, em 1996 com a proteína morfogenética óssea purificada de bovinos (bBMP), encontrando o conteúdo de cálcio presente no tecido submetido a implantação 10 vezes maior nos sítios onde foram implantadas amostras de bBMP em relação a rhBMP-2 (298,9µg/mg e de 30,2µg/mg para a bBMP e rhBMP-2 respectivamente).

O tempo necessário para a reparação, a quantidade de preenchimento e o tamanho dos defeitos ósseos apresentam relação diretamente proporcional a dose de BMP a ser utilizada. As dosagens de BMP empregadas em diferentes modelos de reparação óssea variam amplamente, de microgramas a miligramas. Para citar alguns exemplos:

- JORTIKKA et al.⁴², em 1993, obtiveram osteoindução ectópica com 0,6mg de BMP extraída de rena;
- Em 1994, MARDEN et al.⁶², compararam a utilização de 2,2 e 6,5µg de rhBMP-2 em defeitos em crânio de ratos obtendo resultados melhores com a maior dosagem;
- Combinando hidroxiapatita a 1,0mg de BMP, ONO et al.⁸⁰, em 1995, induziram a formação óssea em periósteo de coelhos após seis semanas;
- Em defeitos de tamanho crítico em porcos, VILJANEN et al.¹³², em 1997 utilizaram 8,0mg de BMP extraída de porcos com formação de novo osso após 16 semanas visualizada tanto microscópica quanto radiograficamente;

- BOYNE et al.⁹, em 1997 relataram a utilização de doses variando entre 1,77 e 3,4mg de rhBMP-2 para elevação de assoalho de seio maxilar de 12 pacientes;
- HOLLINGER et al.³³, em 1998 utilizou 0,35µg de rhBMP-2 em CSD de coelhos, obtendo preenchimento dos defeitos após o período de 8 semanas de análise;
- A concentração de 0,2mgbBMP/20mgHA foi utilizada por UEDA¹²² em 1999, e apesar da dose não ter sido claramente definida em seu trabalho, a análise microscópica após 42 dias demonstrava a osteogênese nos sítios teste.

No presente trabalho a dose de 1,0mg de rBMP por implante realizado foi eficiente em promover osteogênese tanto no defeitos em calvária quanto ao redor de implantes osseointegrados.

Fato relevante a ser analisado ocorre da utilização na maioria dos trabalhos de animais relativamente jovens, possuindo maior capacidade reparadora em relação aos adultos e idosos, populações que mais freqüentemente necessitam de enxertos ósseos para viabilizar o tratamento com implantes. Em trabalho realizado por NAGAI et al.⁷¹, em 1999, indicaram que a razão e a quantidade de formação óssea ectópica foi era reduzida nos ratos idosos citando como fator responsável a distribuição e quantidade dos vasos sanguíneos.

A resposta as BMPs tem características dose-dependente^{24,62}, e os limites são definidos pela quantidade de células e principalmente de receptores disponíveis para a ação das BMPs. A exposição destes receptores ocorre quando o citoesqueleto celular estabiliza em uma determinada superfície, como o titânio⁷⁷.

6.2.4 Da estatística

Os gráficos empregados indicavam em seu ponto central, a média, e os valores duplicados do desvio-padrão estavam representados pelas barras, demonstrando a variabilidade da amostra na mesma escala do valor de significância utilizado de 5%.

A comparação entre as médias dos sítios teste e dos sítios controle foi realizada por meio do teste t de pareado, sendo a normalidade das amostras testada previamente a realização da estatística. Para analisar as diferenças entre as médias dentro dos grupos teste e dentro dos grupos controle foi realizada análise de variância (ANOVA), sendo a variabilidade das amostras testadas previamente por meio do teste de Levene. Quando ocorreram diferenças significativas, $p < 0,05$, o teste de comparações múltiplas escolhido foi o de Bonferroni em função da similaridade de variância entre as amostras.

6.3 Do experimento I

6.3.1 Dos defeitos de tamanho crítico em calvária

A calvária, definida como a porção do crânio estendendo-se da crista supra-orbitária a protuberância occipital externa, compreende os ossos parietais, a porção escamosa do occipital, o frontal e pequena porção da asa maior do osso esfenóide. A origem embrionária intramembranosa e a limitada capacidade de reparação atribuída a pouca quantidade de suprimento sangüíneo e de osso medular tornam a calvária um sítio de escolha para testar a capacidade de osteoindução e osteocondução de materiais implantares^{59,61,67,75,105}.

No experimento I, a confecção de dois defeitos ósseos com 8,0mm de diâmetro, situados em lados opostos a linha média, em calvária de coelhos foi realizada pelo fato de permitir a comparação entre tratamentos em um mesmo animal e ainda os defeitos controle-negativos não seriam completamente preenchidos por osso durante o período de tempo analisado.

6.3.2 Dos resultados

6.3.2.1 Microscópicos

A compósito carbonato de cálcio-colágeno promoveu a osteogênese de forma eficaz quando combinado a BMP, pois obteve resultados semelhantes aos obtidos com a utilização de osso autógeno, considerado o melhor material⁸¹ implantar por suas propriedades osteoindutoras e osteocondutoras. Este tipo de combinação tem demonstrado êxito em outros trabalhos¹³, e parece ser uma forma equilibrada de manutenção de espaço para a reparação óssea e liberação controlada das BMPs. A diferença marcante observada nos sítios que receberam o compósito associado às BMPs e os sítios controle indicam sua capacidade osteoindutora.

Estes resultados são compatíveis com os resultados de trabalhos combinando BMPs a diferentes carreadores em calvária de ratos^{62,68}, de coelhos^{51,79,96}, de porcos⁵⁹, em defeitos em mandíbulas de ratos⁵⁸, e em defeitos ósseos em cães^{3,106}.

A utilização isolada de carreadores para a BMP com estrutura rígida, como a hidroxiapatita, também promove osteogênese^{50,122}, entretanto ONO et al.⁷⁹, em 1995, demonstraram que o compósito hidroxiapatita-colágeno quando combinado a proteínas osteogênicas promoveu maior formação óssea, a partir de três semanas após implantação do material como enxerto “onlay” em crânio de coelhos, resultados

compatíveis com pesquisas desenvolvidas em outros centros de trabalho^{3,144}. Citaram que esta diferença ocorreu pela rápida difusibilidade apresentada pela BMP quando combinada a hidroxiapatita e que o colágeno atuou de forma semelhante a um sistema de liberação de lenta de medicamentos.

Nos sítios em que o compósito foi utilizado isoladamente, a formação de tecido conjuntivo foi evidente nos períodos iniciais de análise o tempo de reabsorção das partículas de carbonato de cálcio também foi maior. Comparando estes sítios aos sítios que não receberam nenhum tipo de enxerto (controle negativo), o compósito apresentou capacidade osteocondutora limitada, principalmente nos períodos iniciais de análise, contrariando algumas trabalhos que demonstraram este potencial^{134,135,146}, entretanto foi eficaz em impedir o colabamento do retalho e permitiu que ao período final de análise o defeito ósseo fosse preenchido. Estas constatações questionam o emprego indiscriminado de materiais implantares sem fatores de indução para o preenchimento de cavidades ósseas não muito extensas, como alvéolos dentários que possuam suas paredes íntegras e confirmam a idéia de que o coágulo sanguíneo possui a capacidade de promover osteogênese sem o auxílio de materiais condutores e que estes, caso não possuam a característica de serem reabsorvidos, podem ocupar o espaço que preferencialmente o osso neoformado ocuparia atrasando o processo de reparo. A osteogênese pode ter uma velocidade de progressão diminuída pelo fato do material implantar necessitar ser reabsorvido e substituído por novo osso, fato também observado por BECKER et al.⁴ em 1998, que encontrou resposta mais eficiente apenas nos alvéolos dentários que receberam material implantar contendo BMP e por CARVALHO et al.¹⁴, em 1998, que mesmo após sessenta dias de avaliação em defeitos confeccionados em tíbias de ratos, ainda encontrava partículas de matriz natural de osso esponjoso.

O emprego de duas formas de carbonato de cálcio neste experimento teve o objetivo de comparar se a osteogênese nos espaços existentes entre os grânulos promoveria reabsorção mais rápida do carreador em relação à sua forma de bloco.

Apesar de não terem ocorrido diferenças numéricas entre os grupos, visualmente os grânulos apresentaram progressão de reabsorção mais rápida em relação aos blocos por facilitarem a osteocondução entre suas partículas, e principalmente no grupo controle, após dez semanas, os defeitos enxertados com grânulos encontravam-se preenchidos por osso em sua totalidade.

O compósito contendo BMP foi reabsorvido durante o período de análise mais rapidamente que o compósito isolado, pelo fato das BMPs acelerarem o processo de osteogênese por indução na alteração de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e pelo aumento da atividade celular dos osteoblastos presentes na região. Este fato associado à sugestão MARDEN et al.⁶², em 1994, de que o osso liofilizado possui concentração e solubilidade de BMPs muito menor quando comparada a carreadores associados a estas, pode explicar a lenta reabsorção deste tipo de material em diferentes sítios de aplicação.

A futura utilização deste compósito combinado a proteínas ósseas morfogenéticas para realização de levantamento de soalho de seio maxilar, poderá ser testada em pesquisas clínicas controladas. As alterações ocorridas na membrana do seio maxilar após enxerto com carbonato de cálcio levaram a alterações fisiológicas, como o aumento do número de células caliciformes, não ocorrendo casos de sinusite.

6.3.2.2 Tomográficos

A análise tomográfica tem sido um método eficaz para avaliação do volume ósseo durante o planejamento da inserção de implantes e como controle pós operatório de pacientes ou em experimentos submetidos a aumento deste volume com procedimentos de enxerto.

Neste experimento, para a realização da análise tomográfica utilizou-se um tomógrafo periférico para analisar a densidade óssea nos defeitos criados em calvária

de coelhos. Diferentes amplitudes nos valores de densidade podem ser observadas na imagem obtida a partir da varredura da amostra variando do azul marinho ao branco representando respectivamente áreas hipodensas e áreas hiperdensas.

Os resultados obtidos demonstraram o preenchimento com material hiperdenso nos sítios submetidos à tratamento com compósito combinado a BMP ser homogêneo e em maior amplitude em relação aos sítios controle em todos os períodos de tempo analisados. As imagens sugerem a formação óssea nestes sítios e foi confirmada pela análise microscópica. Comparando os defeitos ósseos preenchidos com compósito combinado a BMP aos preenchidos com osso autógeno, os resultados foram semelhantes, sendo a hiperdensidade presente nos primeiros, ligeiramente superior, mas não significativa, nos períodos iniciais de análise em função da presença do carbonato de cálcio, que possui hiperdensidade superior a do osso autógeno, pois na análise microscópica o osso autógeno apresentava valores ligeiramente superiores.

Este fato confirma a necessidade dos exames imageológicos serem complementados com análise microscópica nos experimentos conduzidos para avaliar a osteogênese nas diferentes situações clínicas.

6.4 Do experimento II

6.4.1 Dos implantes de titânio em tíbia de coelho

A histomorfometria deste trabalho foi conduzida nas três primeiras roscas do implante (seis no total, três de cada lado do implante) a partir do limite córtico-medular da tíbia do coelho, com o objetivo de avaliar a osteogênese em região de medula óssea. A análise da região em que se situam as três primeiras roscas apresentam obviamente valores elevados de contato osso-implante e área preenchida por implante, como visto

no trabalho de SENNERBY; THOMSEN; ERICSON¹⁰⁷, em 1992. Apesar da região medular da tíbia de coelhos não apresentar matriz mineralizada possui células com potencial osteogênico¹⁷, e o emprego de BMPs poderia levar o aumento do percentual linear de contato osso-implante e do volume ósseo percentual no interior das roscas, tendo este último influência preponderante para o sucesso em longo prazo dos implantes osseointegrados.

A utilização isolada do colágeno teve o objetivo de avaliar se o colágeno poderia atuar como matriz para a proliferação de osteoblastos e osteogênese como indicado por ONO et al.⁷⁹, em 1995. Neste experimento, não ocorreram diferenças entre o grupo controle e o colágeno provavelmente pelo fato do implante ter sido inserido em duas corticais, o que facilita a migração de osteoblastos sobre a superfície de titânio.

6.4.2 Dos resultados

6.4.2.1 Microscópicos

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram um aumento progressivo tanto no percentual médio de contato osso implante quanto no volume ósseo médio ao longo dos três períodos examinados (FIGURAS. 48 e 49). Nos sítios teste (compósito + BMP) estes valores foram superiores aos valores dos sítios controle praticamente em todos os períodos de análise (TABELAS 27 a 32), confirmando a hipótese de que as proteínas ósseas morfogenéticas aumentariam a qualidade da interface osso-implante e possivelmente sua aplicação clínica pode aumentar a longevidade ou abreviar o período de espera para aplicação de cargas oclusais sobre os implantes. O aumento percentual de contato osso implante também foi obtido em trabalhos associando implantes de

titânio à BMPs inseridos em mandíbula de cães^{16,22,66,98,109,140,141} e em tíbia de coelhos^{17,122}.

Quando comparamos, no período de seis semanas, os valores de contato linear osso-implante e volume ósseo médio, por rosca, obtidos neste trabalho, observamos que os valores dos sítios controle (15%) foram ligeiramente superiores aos valores das três roscas analisadas na região medular relatados por SENNERBY; THOMSEN; ERICSON¹⁰⁷, em 1992 (11%) e inferiores aos valores dos sítios onde a BMP foi utilizada (18%).

Quando foram comparados os grupos controle, não ocorreu diferença significativa entre a utilização do composto carbonato de cálcio-colágeno, do colágeno isoladamente ou a não utilização de nenhum material, tanto em relação aos percentuais de contato linear osso-implante quanto ao volume percentual de osso no interior das roscas (Tabelas 41 e 42). Resultados semelhantes aos encontrados por BERGLUNDH; LINDHE⁵, em 1997, utilizando partículas de osso mineral (Bio-Oss) em cães após três meses de reparação e ao experimento I, confirmando que o emprego sem critérios definidos biomateriais aumenta os custos do procedimento cirúrgico e não acelera ou melhora a qualidade da reparação óssea.

A análise tomográfica não foi realizada neste experimento em função da imagem formada ao redor do implante impedir medições confiáveis.

Radiografias periapicais padronizadas, tanto em relação à duração e ao direcionamento do feixe de raios-X, por meio de dispositivo de transferência adaptado ao implante e técnica do cone longo tanto durante o processamento automático foram realizadas. Durante a análise pôde-se verificar que o método não apresenta sensibilidade suficiente para detectar alterações no espaço de tempo avaliado neste modelo experimental.

6.5 Das perspectivas e aplicações clínico terapêuticas

O compósito carbonato de cálcio-colágeno combinado a BMP pode ter grande utilidade em fenestrações ocorridas durante a inserção de implantes, associado ou não ao osso autógeno proveniente das perfurações. Este tipo de abordagem evita a formação de tecido conjuntivo na superfície das roscas expostas, maximizando a superfície de contato osso-implante e principalmente dificultando a posterior instalação de uma patologia peri-implantar e seus efeitos negativos de longo prazo. Em relação a este tópico, há um trabalho em andamento na Universidade de Oulu, no qual defeitos foram confeccionados após a inserção de implantes rosqueáveis em tíbia de coelho e preenchidos por este material.

Nas situações em que os implantes rosqueáveis apresentam perdas ósseas decorrentes da exposição a patologias peri-implantares, sua superfície se torna alterada pela contaminação e formação de biofilmes bacterianos⁸⁵. A obtenção de sucesso neste tipo de tratamento ou pelo menos a minimização de suas seqüelas pode estar na associação entre a forma de descontaminação da superfície do implante e materiais implantares contendo osteoindutores³⁰, como o utilizado neste trabalho.

As proteínas ósseas morfogenéticas têm demonstrado capacidade osteogênica por osteoindução combinadas a carreadores com potencial de osteocondução:

- em diferentes sistemas de cultura de células^{37,54,77,118,138};
- em sítios ectópicos^{21,41,52,70,125};
- em defeitos ósseos de tamanho crítico^{32,43,45,50,62,67,68,87,121,131,145};
- em periodontia^{26,27,47,86,89,90,92,94,95,147}
- em implantologia^{3,17,122};

- no levantamento de assoalho de seio maxilar realizados em animais^{63,72,129,136};
- em fissuras palatais¹⁰;
- em pesquisas clínicas controladas em humanos^{4,15,25,35,99,100,101,129,1482,148}.

A utilização clínica das BMPs se expandirá com o aumento de número de experimentos clínicos longitudinais controlados, com o objetivo de definir a concentração ideal suficiente para estimular o máximo de osteogênese; o carreador que permita a manutenção do espaço físico e a liberação controlada das BMPs durante o processo de reparo e ainda a possível combinação com fatores de crescimento^{66,108,119} com o objetivo estimular as diferentes etapas do processo de reparo. Nestes experimentos a combinação de análises radio e tomográfica, microscópica e imunológica serão necessárias para permitir confiabilidade nos resultados obtidos.

A aplicação clínica imediata dos resultados obtidos deve passar por testes criteriosos quanto a dosagem efetiva de rBMP no compósito estudado. Em alguns casos as citocinas e os fatores de crescimento, incluindo as BMPs, presentes no coágulo sanguíneo são suficientes para promover o reparo ósseo ideal. A aplicação de fatores de indução em materiais implantares pode gerar quantidade excessiva de morfogenes desnecessária e dispendiosa, pois seus efeitos dependem diretamente do número de receptores expostos presentes nas células.

Finalmente a natureza protéica animal da rBMP e considerando a existência de moléculas virais e de príons, cuidados especiais na preparação destes extratos são necessários em relação às normas de biossegurança. Do mesmo modo preocupante, a aplicação clínica dos resultados requer um estudo criterioso e rigoroso da resposta imunológica que possa ser induzida, ou não, no organismo humano receptor das BMPs. Considerando os avanços tecnológicos e os protocolos de análise existentes, esses aspectos serão brevemente esclarecidos e quiçá contornados para que as BMPs possam contribuir para otimização de procedimentos clínicos e cirúrgicos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados microscópicos e histomorfométricos obtidos neste trabalho e relevando as limitações inerentes a qualquer metodologia, constatamos que:

7.1 No experimento I:

- O compósito carbonato de cálcio-colágeno impediu que o retalho cirúrgico colabasse sobre o defeito criado em calvária e após o período de 10 semanas havia sido reabsorvido na maior parte dos sítios;
- O compósito em grânulos promoveu osteogênese precocemente em relação ao compósito em bloco quando combinados a rBMP, sendo reabsorvido em menor espaço de tempo;
- A BMP extraída de rena e combinada ao compósito carbonato de cálcio-colágeno promoveu osteogênese semelhante à obtida quando utilizado osso autógeno e superior aos controles de compósito e coágulo sangüíneo;
- A análise tomográfica apresentou padrão de resultados semelhantes aos obtidos com a histomorfometria, entretanto superestimados para os períodos iniciais de observação nos grupos que receberam enxerto do compósito;
- O compósito carbonato de cálcio-colágeno isoladamente ou combinado a BMP não induziu reações inflamatórias desfavoráveis clínica ou microscopicamente detectáveis.

Fundamentados por estes resultados concluímos que o compósito carbonato de cálcio-colágeno combinado a BMP extraída de rena permitiu osteogênese precocemente em relação aos controles negativos.

7.2 No experimento II:

- O colágeno e o compósito carbonato de cálcio-colágeno, inseridos justapostos a implantes de titânio não foram capazes de promover osteogênese superior a obtida apenas com a manutenção do coágulo;
- A BMP extraída de rena e combinada ao compósito carbonato de cálcio-colágeno promoveu osteogênese superior aos controles do compósito, do colágeno e do coágulo sangüíneo, provendo à superfície do implante de titânio maior percentual de contato linear e maior volume percentual de osso no interior de suas roscas;
- O compósito carbonato de cálcio-colágeno isoladamente ou combinado a BMP não induziu a reações inflamatórias adversas.

Fundamentados por estes resultados e baseando-se na literatura pertinente, concluímos que a associação de materiais de enxerto contendo rBMPs à implantes de titânio aumenta a quantidade e qualidade do contato osso-implante, o que poderá reduzir o tempo de espera entre a cirurgia de inserção de implantes e o tratamento reabilitador protético nas situações de osso pouco denso e com espaços medulares amplos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ADELL, R. et al. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Int. J. Oral Surg.**, v. 10, n.6, p.387-416, Dec. 1981.
2. ALBREKTSSON, T. et al. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting direct bone anchorage in man. **Acta Orthop Scand.**, v.52, p.155-70, 1981.
3. BARBOZA, E.P. et al. Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the dog. **J. Periodont.**, v.71, n.3, p.488-96, Mar. 2000.
4. BECKER, W. et al. Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports. **J. Periodont.**, v.69, n.4, p.414-21, Apr. 1998.
5. BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. **Clin. Oral. Impl. Res.**, v.8, p.117-24, 1997.
6. BESSHO, K. Ectopic osteoinductive difference between purified bovine and recombinant human bone morphogenetic protein. In: LINDHOLM, T.S. **Bone morphogenetic proteins: Biology, biochemistry and reconstructive surgery**. Austin, R.G. Landes Company and Academic Press, 1996, Cap.10, p.105-11.
7. BODEN, S.D. et al. In vivo evaluation of a resorbable osteoinductive composite as a graft substitute for lumbar spinal fusion. **J. Spinal Disord.**, v.10, n.1, p.1-11, Feb. 1997.
8. BOYNE, P. Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. **Bone**, v. 19, n.1, p.83S-93S, July 1996.

* Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento "Referências Bibliográficas: exemplos", emanado pelo Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

-
9. BOYNE, P. et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.17, n.11, p.11-25, 1997.
 10. BOYNE, P.J.; NATH, R.; NAKAMURA, A. Human recombinant BMP-2 in osseous reconstruction os simulated cleft palate defects. **Brit. J. oral Maxillofac. Surg.**, v.36, p.84-90, 1998.
 11. BRANERMARK, P-I. et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10 year period. **Scand. J. Plast. Reconst. Surg.**, v.16, p.132, 1977.
 12. BRANERMARK, P-I. et al. Intra-osseous anchorage of dental prosthesis. Experimental studies. **Scand. J. Plast. Reconst. Surg.**, v.3, p.81-100, 1969.
 13. BRAVETTI, P. et al. Histologic changes in the sinus membrane after maxillary sinus augmentation in goats. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 56, n.10, p. 1170-6, Oct. 1998.
 14. CARVALHO et al. Estudo experimental sobre matriz natural de osso esponjoso em cavidades ósseas. **Innovations Magazine**, v.2, n.1, p.13-20, Jan/Mar. 1998.
 15. COCHRAN, D.L. et al. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. **J. Periodont.**, v.71, n.8, p.1241-57, Aug. 2000.
 16. COCHRAN, D.L. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. **J. Periodont.**, v.70, n.2, p.139-50, Feb. 1999.
 17. COSTA FILHO, L.C. **Avaliação do potencial osteogênico da medula óssea da tíbia de coelho frente ao conjugado de proteínas osteoindutoras – hidroxiapatita bioabsorvível e ao osso bovino desproteínado.** Bauru, 1999. 141p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

-
18. DAMIEN, C.J. et al. Effect of demineralized bone matrix on bone growth within a porous HA material: a histologic and histometric study. **J. Biomater. Appl.**, v.9, n.3, p.275-88, 1995.
19. DAMIEN, C.J. et al. Formation of a calcium phosphate-rich layer on a absorbable calcium carbonate bone graft substitutes. **Calcif. Tissue Int.**, v.55, n.2, p.151-8, Aug. 1994.
20. DAMIEN C. J. et al. A composite of natural coral, collagen, bone protein and basic fibroblast growth factor tested in a rat subcutaneous model. **Ann. Chir. Gynaecol. Suppl.**, v. 207, p.117-28, 1993.
21. EKELUND, A.; BROSJÖ, O.; NILSSON, O.S. Experimental induction of heterotopic bone. **Clin. Orthop.**, n.263, p.102-12, 1991.
22. FIORELLINI. J.P. et al. Effect of bone healing of bone morphogenetic protein placed in combination with endosseous implants: a pilot study in beagle dogs. **Int. J. Periodont. Res.**, v.21, n.1, p.41-71, Feb. 2001.
23. FUGAZZOTO, P.A.; VLASSIS, J. Long-term success of sinus augmentation using various surgical approaches and grafting materials. **Int. J. oral Maxillofac. Impl.**, v. 13, p.52-8, 1998.
24. GAO, T.J. et al. Bone inductive potential and dosedependent response of bovine bone morphogenetic protein combined with type IV collagen carrier. **Ann. Chirurg Gynaec.**, v.82, 77-84, 1993.
25. GEESINK, R.G.T.; BULSTRA, S.K.; HOEFNAGELS, N.H.M. The use of osteogenic protein-1 in clinical cases with severe bone loss: five case reports. In: LINDHOLM, T.S. **Skeletal Reconstruction and Bioimplantation**. Austin, R.G. Landes Company and Academic Press, 1997, cap.17, p.193-211.
26. GIANNOBILE, W.V. et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. **J. Periodont.**, v.69, n.2, p.129-37, Feb. 1998.

-
27. GIANNOBILE, W.V. Periodontal tissue engineering by growth factors. **Bone**, v.19, n.1. Suppl., p. 23S-37S July 1996.
28. GREGHI, S.L.A. **Análise comparativa da biocompatibilidade de materiais cerâmicos diversos em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos (*rattus norvegicus* – var. *Albinus rodentia mammalia*)**. Bauru, 1991. 241p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
29. HANISCH, O. et al. Bone formation and osseointegration stimulated by rhBMP-2 following subantral augmentation procedures in nonhuman primates. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 12, n.5, p.785-92, Sept./Oct. 1997.
30. HANISCH, O. et al. Bone formation and reosseointegration in peri-implantitis defect following surgical implantation of rhBMP-2. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.12, n.5, p.604-10, Sept./Oct. 1997.
31. HEINEN, J.H.; DABB, G.H.; MASON, H.A. The experimental production of ectopic cartilage and bone in muscles of rabbits. **J. Bone Joint Surg.**, 31A, p.765-75, 1949.
32. HIGUCHI, T. et al. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. **J. Periodont.**, v.70, n.9, p.1026-31, Sep. 1999.
33. HOLLINGER, J.O. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 43, p.356-64, 1998.
34. HORISAKA, Y. et al. Histological changes of implanted collagen material during bone induction. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.28, n.1, p.97-103, Jan. 1994.
35. HOWELL, T.H. et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentatio. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.17, n.2, p.125-39, 1997.

-
36. ISOBE, M. et al. Bone morphogenetic protein encapsulated with a biodegradable and biocompatible polymer. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.32, n.3, p.433-8, Nov. 1996.
37. ISRAEL, D.I. et al. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo*. **Growth Factors**, v.13, n.3-4, p.291-300, 1996.
38. JAFFIN, R.A.; BERMAN, C.L. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. **J. Periodont.**, v. 62, n.1, p.2-4, Jan. 1991.
39. JENSEN, O.T et al. Report of the sinus consensus conference of 1996. **Int. J. oral Maxillofac. Implants.**, v.13, special supplement, 1998.
40. JIN, Y.; YANG, L.J.; SI, X.H. Synergistic effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β on bone formation. In: LINDHOLM, T.S. **Skeletal reconstruction and bioimplantation**. Austin, R.G. Landes Company and Academic Press, 1997, cap.12, 137-48.
41. JORTIKKA, L. **Native bone morphogenetic proteins: purification and action on rat skeletal muscle myoblasts**. Academic dissertation 64p. Acta Universitatis Tamperensis, 1998.
42. JORTIKKA, L.; MARTTINEN, M.; LINDHOLM, T.S. Partially purified reindeer (*Rangifer Tarandus*) bone morphogenetic protein has a high bone-forming activity compared with some other artiodactyls. **Clin. Orthop.**, v. 297, p.33-37, Dec.1993.
43. KENLEY, et al. Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant bone morphogenetic protein-2. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 28, p.1139-47, 1994.
44. KIBERSTIS, P.; SMITH, O.; NORMAN, C. Bone health in the balance. **Science**, v.289, p.1497-1500, Sep. 2000.
45. KING, G.N.; KING, N.; HUGHES, F.J. Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration *in vivo*. **J. Periodont. Res.**, v. 33, p.226-36, 1998.

-
46. KING, G.N. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. **J. Dent. Res.**, v.76, n.8, p.1460-70, Aug.1997.
47. KINOSHITA, A. et al. Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. **J. Periodont.**, v. 68, p.103-9, 1997.
48. KIRKER-HEAD, C.A. Developing recombinant bone morphogenetic proteins for clinical use. In: LINDHOLM, T.S. **Skeletal reconstruction and bioimplantation**. Landes Bioscience. Austin, 1997, p.119-131.
49. KIRKER-HEAD, C.A. et al. A new animal model for maxillary sinus floor augmentation: avaluation parameters. **Int. J. oral Maxillofac. Implants**, v.12, n.3, p.403-11, 1997.
50. KOEMPEL, J.A. et al. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the integration of porous hydroxypapatite implants with bone. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.41, p.359-63, 1998.
51. KRAMER, I.R.H.; KELLY, H.C.; WRIGHT, H.C. A histological and radiological comparison of the healing of defects of the rabbit calvarium with and without implanted heterogenous anorganic bone. **Arch. Oral Biol.**, v.13, p.1095, 1968.
52. KÜBLER, et al. Inductive properties of human BMP-2 produced in a bacterial expression system. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.27, p.305-9, 1998.
53. LACROIX, P. Recent investigations on the growth of bone. **Nature**, n.15656, p.576, 1945.
54. LECOEUR, L.; OUHAYOUN, J.P. *In vitro* induction of osteogenic differentiation from non-osteogenic mesenchymal cells. **Biomaterials**, v.18, n.14, p.989-93, 1997.
55. LEE, M.B. Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction. **J. Clin. Periodont.**, v. 24, p.355-65, 1997.

-
56. LEVANDER, G. A study of bone regeneration. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**. v.67, p.705-14, 1938.
57. LILLY, L.C.; SCHOW, S.; TRIPLETT, G.R. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for maxillary sinus grafting. In: JENSEN, O.T. **The Sinus Bone Grafting**. Chicago, Quintessence, c1999, Cap.12, p.145-56.
58. LINDE, A.; HEDNER, E. Recombinant bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing, guided by osteopromotive e-PTFE membranes: An experimental study in rats. **Calcif. Tissue Int.**, v.56, p.549-53, 1995.
59. LINDHOLM, T.C. **Calvarial reconstruction with implants of: hydroxyapatite, autogenous bone marrow, allogeneic demineralized bone matrix and bone morphogenetic protein**. Academic Dissertation. Annales Universitatis Turkuensis. Turku, 1995.
60. LINDHOLM, T.S. Documentation os osteoinductivity, delivery and application modes of bone morphogenetic proteins. In: LINDHOLM, T.S. **Skeletal reconstruction and Bioimplantation**. Austin, R.G. Landes Company and Academic Press, c 1997, Cap.1, p.5-15.
61. LINDHOLM, T.S.; LINDHOLM, T.C. The skull defect model in measuring osteoinductivity. **J. Musculoskeletal Res.**, v. 2, n.2, p. 123-39, 1998.
62. MARDEN, L.J. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralizaed bone matríz in repairing craniotomy defects in rats. **J. Biomed. Mater Res.**, v.28, p.1127, 1994.
63. MARGOLIN, M.D. et al. Maxillary sinus augmentation in the non-human primate: a comparative radiographic and histologic study between recombinant human osteogenic protein-1 and natural bone mineral. **J. Periodont.**, v.69, n.8, p.911-9, Aug. 1998.
64. MARTTINEN, A.; LEHTO, M. Cell culture microassay measuring new bone formation induced by native bone morphogenetic proteins. In: LINDHOLM,

- T.S. **Skeletal reconstruction and bioimplantation.** Austin, R.G. Landes Company and Academic Press, c1997, Cap.2, p.17-21.
65. MATSUMOTO, A. et al. Effect of aging on bone formation induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2 combined with fibrous collagen membranes at subperiosteal sites. **J. Periodont. Res.** , v. 36, p.175-82, 2001.
66. MERAW, S.J. Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. **J. Periodont.**, v.71, n.1, p.8-13, Jan. 2000.
67. MIKI, T.; IMAI, Y. Osteoinductive potential of freeze-dried, biodegradable, poly (glycolic acid-co-lactic acid) disks incorporated with bone morphonetic protein in skull defects of rats. **Int. J. oral Maxillofac. Surg.**, v.25, p.402-6, 1996.
68. MIKI, T. et al. Effect of freeze-dried poly-l-lactic acid discs mixed with bone morphogenetic protein on the healing of rat skull defects. **J. oral Maxillofac. Surg.**, v.52, p.387-91, 1994.
69. MULATINHO, J.; TAGA, ,R. Aplicação de Osseobond e biohapatita em caso de colocação imediata de implante de titânio. Estudo clínico e histológico. **Rev. Bras. Implant.**, v.2; n.4; p.11-8, Jul./Ago. 1996.
70. MURATA, M. et al. Carrier-dependence of cellular differentiation induced by bone morphogenetic protein in ectopic sites. **Int. J. oral Maxillofac. Surg.**, v.27, n.5, p.391-6, Oct. 1998.
71. NAGAI, N. et al. Age effects on ectopic bone formation induced by purified bone morphogenetic protein. **Int. J. oral Maxillofac. Surg.**, v.28, p.143-50, 1999.
72. NEVINS, M. et al. Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants with recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.16, n.1, p.9-19, 1996.

-
73. NISHIBORI, M. et al. Short-term healing of autogenous and allogeneic bone grafts after sinus augmentation. A report of 2 cases. **J. Periodont.**, v.65, n.10, p.958-66, Oct. 1996.
74. OHGUSHI, H. et al. Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.26, n.7, p.885-95, Jul. 1992.
75. OKLUND, S. et al. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. **Clin. Orthop.**, n.205, p.269-91, Apr. 1986.
76. OMURA, S. et al. A carrier for clinical use of recombinant human BMP-2 dehydrothermally cross-linked composite of fibrillar and denatured atelocollagen sponge. **Int. J. oral Maxillofac. Surg.**, v.27, p.129-34, 1998.
77. ONG, J.L. et al. Osteoblast responses to BMP-2 treated titanium *in vitro*. **Int. J. oral Maxillo fac. Implants.** v.12, n.4, p.649-54, Sept/Oct. 1997.
78. ONG, J.L. et al. Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblast cells *in vitro*. **Implant Dentistry**, v.6, p.19-24, Spring 1997.
79. ONO, I. et al. Bone induction of hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein and covered with periosteum. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.95, n.7, p.1265-72, June 1995.
80. ONO, I. et al. Efficacy of hydroxyapatite ceramic as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein. **J. Craniofac. Surg.**, v.6, n.3, p.238-44, 1995.
81. PASSANEZI, E. **Estudo morfológico do comportamento de enxertos ósseos autógenos (tecido em neoformação) em cães, em defeitos periodontais provocados**. Bauru, 1971. 86p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
82. POPESKO, P.; RAJTOVA, V.; HORAK, J. **A color atlas anatomy of small laboratory animals**. v.1.rabbit-guinea pig. Wolfe Publishing, 1992.

-
83. PUZAS, J.E.; MILLER, M.D.; ROSIER, R.N. Pathologic bone formation. **Clin. Orthop.**, n.245, p.269-81, 1989.
84. RABIE, A-B.M.; DAN, Z.; SAMMAN, N. Ultrastructural identification of cells involved in the healing of intramembranous and endochondral bones. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.25, p.383-8, 1996.
85. RIBEIRO, F.C. **Aspectos morfológicos dos biofilmes microbianos na osteomielite crônica supurativa e correlações endodôntica e parendodôntica.** Bauru, 1999. 128p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
86. RIPAMONTI, U. Induction of cementogenesis and periodontal ligament regeneration by bone morphogenetic proteins. In: LINDHOLM, T.S. **Bone Morphogenetic Proteins: Biology, Biochemistry and Reconstructive Surgery.** Austin, R.G. Landes Company and Academic Press, 1996, Cap.17, p.189-98.
87. RIPAMONTI, U. Calvarial reconstruction in baboons with porous hydroxyapatite. **J. Craniofac. Surg.**, v. 3, n.3, p.149-59, Nov. 1992.
88. RIPAMONTI, U. The induction of bone in osteogenic composites of bone matrix and porous hydroxyapatite replicas. **J. oral Maxillofac. Surg.**, v.49, p.817-30, 1991.
89. RIPAMONTI, U.; REDDI, A H. Tissue engineering, morphogenesis and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. **Crit. Rev Oral Biol.**, v.8, n.2, p.154-63, 1997.
90. RIPAMONTI, U.; REDDI, A H. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. **J. Periodont. Res.**, v.29, p.225-35, 1994.
91. RIPAMONTI, U.; VAN DEN HEEVER, B.; VAN WYK, J. Expression of the osteogenic phenotype in porous hydroxyapatite implanted extraskelally in baboons. **Matrix**, v.13, n.6, p.491-502, Nov.1993.

-
92. RIPAMONTI, U. et al. Periodontal tissue regeneration by combined applications of recombinant human osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-2. A pilot study in Chacma baboons (*Papio ursinus*). **Eur. J. oral Sciences**, v. 109, p.241-8, 2001.
93. RIPAMONTI, U. et al. Complete regeneration of bone in the *Baboon* by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7). **Growth Factors**, v.123, n.3-4, p.273-89, 1996.
94. RIPAMONTI, U. et al. Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1/BMP-7) in the baboon (*Papio ursinus*). **Arch. Oral Biol.**, v.41, n.1, p.121-6, 1996.
95. RIPAMONTI, U. et al. Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in the baboon (*Papio ursinos*). **J. Periodont. Res.** v.29, n.6, p.439-45, Nov. 1994.
96. ROGERS, J.B. et al. Two lyophilized polymer matrix recombinant human bone morphogenetic protein-2 carriers in rabbit calvarial defects. **J. Craniofacial Surg.**, v.9, n.2, p.147-53, Mar. 1998.
97. RUTHERFORD, R.B.; CHARETTE, M.; RUEGER, D. Role of osteogenic (bone morphogenic) protein and paltelet derived growth factor in periodontal wound healing. In: GENCO, R. et al. **Molecular pathogenesis of periodontal diseases**. ASM Press, Washington DC, 1994.
98. RUTHERFORD, R.B. et al. Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.7, n.3, p.297-301, Fall 1992.
99. SAILER, H.F.; KOLB, E. Purified bone morphogenetic protein for clinical use in difficult conditions of cranio-maxillofacial surgery. In: LINDHOLM, T.S. **Bone morphogenetic proteins: Biology, biochemistry and reconstructive surgery**. Austin, R.G. Landes Compay and Academic Press, 1996, Cap.19, p.207-30.

-
100. SAILER, H.F.; KOLB, E. Application of purified bone morphogenetic protein (BMP) in cranio-maxillofacial surgery: Reconstruction in craniofacial malformations and post-traumatic or operative defects of the skull with lyophilized cartilage and BMP. **J. Cranio Maxillofac. Surg.** v.22, n.4, p.191-9, Aug. 1994.
 101. SAILER, H.F.; KOLB, E. Application of purified bone morphogenetic protein (BMP) in cranio-maxillofacial surgery: BMP in compromised surgical reconstructions using titanium implants. **J. Cranio Maxillofac. Surg.** v.22, n.1, p.2-11, Feb. 1994.
 102. SAMPATH, T.K.; REDDI, A.H. Importance of geometry of the extracellular matrix in endochondral bone differentiation. **J. Cell Biol.**, v.98, p.2191-7, June 1984.
 103. SANTOS, C.R.R. **Os coelhos**. Seminário apresentado a Disciplina de Princípios e Métodos de Patologia Experimental. Curso de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo. 8p.
 104. SCHMITT, J. M. et al. Comparison of porous bone mineral and biologically active glass in critical-size defects. **J. Periodont.**, v.68, n.11, p.1043-53, Nov. 1997.
 105. SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin. Orthop.**, v.205, p.299-308, 1986.
 106. SCIADINI, M.F.; DAWSON, J.M.; JOHNSON, K.D. Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. **J. Orthopod. Res.**, v.15, n.6, p.844-57, Nov. 1997.
 107. SENNERBY, L.; THOMSEN, P. ERICSSON, L.E. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. **Int. J. oral Maxillofac. Implants**, v.7, n.1, p.62-70, 1992.

-
108. SI, X.; JIN, L.; YANG, L. Induction of new bone by ceramic bovine bone with recombinant human bone morphogenetic protein 2 and transforming growth factor beta. **Int. J. oral Maxillofac. Surg.**, v.27, n.4, p.310-4, Aug.1998.
 109. SIGURDSSON, T.J.; NGUYEN, S.; WIKESJÖ, U.M.E. Alveolar ridge augmentation with rhBMP-2 and bone to implant contact in induced bone. **Int. J. Rest. Dent.** , v.21, n.5, p.461-73, Oct. 2001.
 110. SIGURDSSON, T.J. et al. Periodontal repair in dogs. Evaluation of rh-BMP-2 carriers. **Int. J. Periodont. Rest. Dent**, v. 16, n.6, p.525-37, Dec.1996.
 111. SIGURDSSON, T.J. et al. Periodontal regenerative potential of space-providing expanded polytetrafluoroethylene membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins. **J. Periodont.** , v.66, n. 6, p.511-21, June 1995.
 112. SIGURDSSON, T.J. et al. Periodontal repair in dogs. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. **J. Periodont.**, v. 66, n.2, p.131-8, Feb. 1995.
 113. STRATES, B.S.; STOCK, A. J.; CONNOLLY, J.F. Skeletal repair in the aged. A preliminary study in rabbits. **Am. J. Med. Sci.**, v.296, n.4, p.266-9, Oct. 1988.
 114. SUMMERS, R.B. Sinus floor elevation with osteotomes. **J. Esthet. Dent.**, v.10, n.3, p.164-71, 1998.
 115. SUN, Y. et al. Evaluation of transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein composite on healing bone defects. **Chin. Med. J.**, v.110, n.12, p.927-31, Dec. 1997.
 116. SYFTESTAD, G.; URIST, M.R. Degradation of bone matrix morphogenetic activity by pulverization. **Clin. Orthop.**, n.141, p.281-6, 1979.
 117. TAGA, R. et al. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. **Rev. Bras. Implant.**, v.3, n.1, p.13-20, Jan/Fev. 1997.

-
118. TAKIGUCHI, T. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblasts differentiation and suppresses matrix metalloproteinase-1 production in human bone cells isolated from mandible. **J. Periodont. Res.**, v.33, p.476-85, 1998.
 119. TAKITA, H. et al. Enhancement by bFGF of osteogenesis induced by rhBMP-2 in rats. **Eur. J. oral Sci.**, v.105, p.588-92, 1997.
 120. TATUM H. Maxillary and sinus implant reconstructions. **Dent. Clin. North Amer.**, v.30, p.207-29, 1986.
 121. TORIUMI, D.M. et al. Mandibular reconstruction with a recombinant bone inducing factor. **Arch. Otolaryng. Head and Neck Surg.**, v.117, p.1101-12, Oct. 1991.
 122. UEDA, J.K. **Estudo comparativo da substituição óssea frente a enxertos de proteína morfogenética óssea e osso autógeno, ao lado de implantes de titânio. Análise histológica.** Bauru, 1999. 196p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
 123. URIST, M.R. Bone morphogenetic protein in biology and medicine. In: **Bone morphogenetic proteins: Biology, Biochemistry and Reconstructive Surgery.** Austin, R.G. Landes Company and Academic Press, 1996, Cap.2, p.7-27.
 124. URIST, M.R. Transmembrane bone morphogenesis across multiple-walled diffusion chambers. **Arch. Surg.**, n.112, p.612-9, 1977.
 125. URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, 150:893-9, 1965.
 126. URIST, M.R.; DOWELL, T.A. Inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix. **Clin. Orthop.**, n.61, p.61-78, 1968.
 127. URIST, M.R.; STRATES, B.S. Bone morphogenetic protein. **J. dent. Res.** v. 50, p.1392-1406, 1971.

-
128. VAN DE PUTTE, K.A.; URIST, M.R. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. **Clin. Orthop.**, n.43, p.257-70, 1966.
129. VAN DER BERGH, J.P.A. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 in maxillary sinus floor elevation surgery in 3 patients compared to autogenous bone grafts. **J. clin. Periodont.**, v.27, p.627-36, 2000.
130. VAN STEENBERGHE D, et al. Applicability of osseointegrated oral implants in the rehabilitation of partial edentulism: a prospective multicenter study on 558 fixtures. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.5, n.3, p.272-81, Fall 1990.
131. VILJANEN, V.V. et al. Xenogeneic moose (*Alces alces*) bone morphogenetic protein (m-BMP)-induced repair of critical-size defects in sheep. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 25, p.217-22, 1996.
132. VILJANEN, V.V. et al. Low dosage of native allogeneic bone morphogenetic protein in repair of sheep calvarial defects. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 26, p.389-93, 1997.
133. VILJANEN, V.V. et al. Osteoinduction in vivo by gene transfer. In. LINDHOLM, T.S. **Skeletal reconstruction and bioimplantation**. Austin, R.G. Landes Company and Academic Press, 1997, Cap.224-33.
134. VUOLA, J. et al. Compressive strength of calcium carbonate and hydroxyapatite implants after bone-marrow-induced osteogenesis. **Biomaterials**, v.19, n.1, p.223-7, Jan-Feb 1998.
135. VUOLA, J. et al. Bone marrow induced osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants. **Biomaterials**, v.17, n.18, p.1761-6, Sep. 1996.
136. WADA, K. et al. Maxillary sinus floor augmentation in rabbits: a comparative histologic-histomorphometric study between rhBMP-2 and autogenous bone. **Int. J. Period. Rest. Dent.**, v.21, n.3, p.289-95, June 2001.

-
137. WOZNEY, J.M. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. **J. Periodont.**, v. 66, n.6, p.506-10, June 1995.
138. WOZNEY, J.M. et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Science**, v. 242, p.1528-33, Dec. 1988.
139. XCT 960/960A Manual. Preliminary version. Software version 5.20. Stratec.
140. XIANG, W. et al. Tissue reactions to titanium implants containing bovine bone morphogenetic protein: a scanning electron microscopic investigation. **Int. J. oral Maxillofac. Surg.**, v.23, p.115-9, 1994.
141. XIANG, W. et al. The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants. **J. oral Maxillofac. Surg.**, v.51, p.647-51, 1993
142. YAN, J. YANG, L.J. Enhanced bone formation by bone morphogenetic protein complexed with biomimplants in oral maxillofacial defects. In: LINDHOLM, T.S. **Skeletal Reconstruction and Biomplantation**. Austin, R.G. Landes Company and Academic Press, 1997, Cap.14, 157-73.
143. YAN, J. et al Early histologic response to titanium implants complexed with bovine bone morphogenetic protein. **J. prosth. Dent.**, v.71, n.3, p.289-94, Mar. 1994.
144. YOSHIDA, K. et al. Enhancement by recombinant human bone morphogenetic protein-2 of bone formation by means of porous hydroxyapatite in mandibular bone defects. **J. dent. Res.**, v.78, n.9, 1505-10, Sep. 1999.
145. YUDELL, R.M.; BLOCK, M.S. Bone gap in the dog using recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J. oral Maxillofac. Surg.**, v.58, p.761-6, 2000.
146. YUKNA, R.A.; YUKNA, C.N. A 5-year follow-up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (Biocoral) bone replacement grafts in infrabony defects. **J. Clin. Periodon.**, v. 25, n.12, p.1036-40, Dec. 1998.

147. ZAMAN, K.U.; SUGAYA, T.; KATO, H. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response. **J. Periodont. Res.**, v.34, n.5, p.244-50, Dec. 1999.
148. ZIJDERVELD, S.A. et al. Pre-clinical and clinical experiences with BMP-2 and BMP-7 in sinus floor elevation surgery: a comparison. **J. Musculoskeletal Res.**, v.6, n.1, p.43-54, Mar. 2002.

ABSTRACT

ABSTRACT

Osseointegration enhancement around titanium implants and calvarial reconstruction induced by bone morphogenetic proteins in rabbits.

Objective. Study I: The aim of this study was to assess osteogenesis in surgically created skull defects in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) induced by bone morphogenetic proteins combined to the composite calcium carbonate-collagen. **Study II:** Evaluate osteogenesis around titanium implants inserted in the rabbit tibia, induced by bone morphogenetic protein combined to the composite calcium carbonate-collagen. The parameters assessed were bone-implant interface and the bone volume between threads of titanium. **Material and methods. Study I:** Skull defects were surgically created in 45 New Zealand male white rabbits. Test sites were filled with 1,0mg of reindeer (*Rangifer tarandus*) rBMP combined to the composite calcium carbonate-collagen. Control sites received either autogenous bone (positive control), composite calcium carbonate-collagen or left untreated (negative control). **Study II:** Sixty titanium implants were inserted in the tibia of 30 New Zealand male white rabbits. Previously to its insertion, test sites were filled with 1,0mg of rBMP combined to the composite calcium carbonate-collagen. Control sites were filled either with composite calcium carbonate-collagen, collagen or left untreated. **Results.** Rabbits were submitted to euthanasia 4, 6 and 10 weeks after implantation. **Study I:** Histometric and tomographic analysis were performed. rBMP-calcium carbonate-collagen treated sites showed earlier and increased osteogenesis compared to control sites and similar results to autogenous bone. Tomographic scans showed similar pattern to histomorphometry, although overestimated for the composite groups at 4 and 6 weeks examination periods. **Study II:** Histometric analysis was performed. Test sites showed a percent linear bone-implant contact and percent bone volume at implant threads greater for all periods of examination than control sites. **Conclusion:** The results demonstrated that 1,0mg of rBMP combined to calcium carbonate-collagen composite were able to enhance osteogenesis at orthotopic sites. Association of graft materials combined to rBMP increases quality at bone-implant interface. Though the time between surgical implant placement and prosthetic rehabilitation at sites with large medullary spaces and less cortical bone could be shortened.