**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS**

MARIA DA CONCEIÇÃO ANDRADE DE FREITAS PIMENTA

**Análise histológica da região alveolar enxertada com rhBMP-2 em
pacientes com fissuras labiopalatinas**

**BAURU
2017**

MARIA DA CONCEIÇÃO ANDRADE DE FREITAS PIMENTA

**Análise histológica da região alveolar enxertada com rhBMP-2 em
pacientes com fissuras labiopalatinas**

Tese apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação.

.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Gamba
Garib Carreira

BAURU

2017

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS**

Rua Silvio Marchione, 3-20

Caixa Postal: 1501

17012-900 – Bauru, SP, Brasil

Telefone: (14) 3235-8000

Prof. Dr. Marco Antonio Zago – Reitor da USP

Dra. Maria Aparecida de A. Moreira Machado – Superintendente do HRAC-USP

Autorizo, exclusivamente, para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta Tese, desde que citada a fonte.

Maria da Conceição Andrade de Freitas Pimenta

Bauru, ____ de _____ de 2017.

Pimenta, Maria da Conceição Andrade de Freitas

P649a Análise histológica da região alveolar enxertada com
rhBMP-2 em pacientes com fissuras labiopalatinas. Bauru, 2017.
117p.: il.; 30cm.

Tese (Doutorado em Ciências da Reabilitação) - Hospital de
Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Gamba Garib Carreira

1. Fissura labiopalatina. 2. Enxerto ósseo. 3. rhBMP-2.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria da Conceição Andrade de Freitas Pimenta

Tese apresentada ao Hospital de
Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências da Reabilitação.
Área de concentração: Fissuras Orofaciais e
Anomalias Relacionadas

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Profa. Dra. Daniela Gamba Garib Carreira

Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC-USP

Data de depósito da Tese junto à SPG: ____/____/____

DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai Alvaro Marques de Freitas

AGRADECIMENTOS

Obrigada DEUS por nunca me abandonar!
Não tenhas medo, que Eu estou contigo” (Is 43, 5).

Obrigada DEUS pela sintonia maravilhosa vivenciada com minha querida orientadora **Profª Drª Daniela Garib**, ser humano ímpar sinônimo de humildade, sensibilidade, competência e profissionalismo.

Obrigada DEUS pelos anjos que iluminaram o meu caminho na construção dessa tese presentes nos setores de **Cirurgia bucomaxilofacial, Ortodontia, Pós graduação e UEP do HRAC/USP**.

Obrigada DEUS pelo apoio recebido nos departamentos de **Histologia e Patologia Bucal da FOBUSP**.

Obrigada DEUS pela existência de um espírito de luz chamado **Tania Cestari**.

Obrigada Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela ajuda de custo.

Ao lerem essa tese procurem sempre ser solidários. Um ser sozinho é uma pessoa frágil, mas unidos formam uma corrente forte e poderosa!

RESUMO

Freitas MCA. Análise histológica da região alveolar enxertada com rhBMP-2 em pacientes com fissuras labiopalatinas (tese). Bauru. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo, 2017.

Objetivo: Este estudo visou avaliar histologicamente os tecidos ósseo e mole removidos da região da fissura alveolar enxertada com rhBMP-2 em pacientes com fissuras labiopalatinas, 6 a 46 meses após a cirurgia. **Material e Metodos:** O grupo experimental foi composto por 13 pacientes com caninos retidos na região alveolar enxertada com rhBMP-2 (*Infuse*[®]). O grupo controle foi composto por seis pacientes com caninos retidos na região alveolar contralateral ou próxima à fissura não enxertada e um com canino retido na área enxertada com osso autógeno da crista ilíaca. No ato da exposição cirúrgica do canino, 6 a 46 meses após o enxerto ósseo secundário, as biopsias dos tecidos ósseo e mole foram retiradas e submetidas a análise histológica pela técnica hematoxilina e eosina. **Resultados:** Os cortes microscópicos do grupo experimental (n=12) evidenciaram fragmentos de tecido ósseo viável, com osteócitos normais em lacunas, osteoblastos na superfície óssea e espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo fibroso e vasos sanguíneos. O quadro histológico das biópsias de tecido ósseo removidas num período de 6 a 9 meses de enxertia evidenciaram trabéculas ósseas mais desorganizadas, sem formações lamelares e com maior densidade de osteócitos por área indicando menor grau de maturidade óssea. As do período 24 a 46 meses eram compostas somente por tecido ósseo maduro de arranjo lamelar contendo linhas de reversão/incrementais e lacunas de osteócitos. Os cortes de tecido mole (n=3) revelaram fragmentos de mucosa bucal constituída por epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado com tecido conjuntivo subjacente denso. **Conclusão.** Os fragmentos de tecidos ósseo e mole removidos da área da fissura enxertada com rhBMP-2 apresentaram morfologia histológica normal, assemelhando-se com as características teciduais do grupo controle.

Palavras chaves: Fissura labiopalatina. Enxerto ósseo. rhBMP-2.

ABSTRACT

Freitas MCA. Histological analysis of rhBMP-2 alveolar bone graft in individuals with cleft lip and palate (thesis). Bauru. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo, 2017.

Objective: This study aimed to evaluate histologically the bone and soft tissue removed from the region of the rhBMP-2-grafted alveolar cleft in patients with cleft lip and palate 6 to 46 months after surgery. **Material and Methods:** The experimental group consisted of 13 patients with canines retained in the alveolar region grafted with rhBMP-2 (Infuse®). The control group consisted of six patients with canines retained in the contralateral alveolar region or near the ungrafted cleft and one with canine retained in the grafted area with autogenous iliac crest bone. At the time of surgical exposure of the canine, 6 to 46 months after secondary bone graft, biopsies of bone and soft tissues were submitted to histological analysis by the hematoxylin and eosin technique. **Results:** The microscopic sections (n = 12) showed fragments of viable bone tissue with normal osteocytes in gaps, osteoblasts in the bone surface and spinal spaces filled by fibrous connective tissue and blood vessels. The bone tissue biopsies removed at a 6 to 9 months after grafting showed more disorganized bone trabeculae, with no lamellar formations and with a higher osteocyte density per area indicating a lower degree of bone maturity. Biopsies taken from 24 to 46 months after grafting were composed only for mature lamellar bone tissue containing reversion / incremental lines and osteocyte gaps. Soft tissue sections (n= 3) revealed fragments of buccal mucosa consisting of parakeratinized stratified squamous epithelium with fibrous connective tissue. **Conclusion.** Fragments of bone and soft tissues removed from the rhBMP-2 grafted cleft area showed normal histological morphology, resembling tissue characteristics on the control group.

Key Words: Cleft lip and palate. Bone graft. rhBMP-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 12,7 anos.	33
Figura 2.	Paciente do gênero feminino, com fissura de lábio com comprometimento do rebordo alveolar lado esquerdo que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,7	35
Figura 3.	Paciente do gênero feminino com fissura labiopalatina completa lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 12,1 anos	37
Figura 4.	Paciente do gênero masculino, 12,5 anos, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo não enxertada.	39
Figura 5.	Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,1 anos	43
Figura 6.	Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,10 anos	45
Figura 7.	Paciente do gênero feminino, com fissura de lábio com comprometimento do rebordo alveolar lado esquerdo que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,7 anos	47
Figura 8.	Paciente do gênero feminino, com fissura labiopalatina completa lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 12,1 anos	51
Figura 9.	Paciente do gênero masculino com fissura labiopalatina completa lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 10,9 anos	53
Figura 10.	Paciente do gênero masculino com fissura labiopalatina completa lado esquerdo que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 13,2 anos	55
Figura 11.	Paciente do gênero feminino, com fissura labiopalatina completa lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 12 anos	57
Figura 12.	Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,6 anos	59
Figura 13.	Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 12,6 anos	61

Figura 14.	Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 10,2 anos.	65
Figura 15.	Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,10 anos	67
Figura 16.	Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 12,7 anos	69
Figura 17.	Paciente do gênero feminino, com canino retido do lado contralateral (sem fissura) à fissura labiopalatina completa lado esquerdo aos 13,1 anos.....	73
Figura 18.	Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo sem EOA aos 14,5 anos.....	75
Figura 19.	Paciente do gênero feminino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo sem EOA com rhBMP-2 aos 16 anos.....	77
Figura 20.	Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo que recebeu EOA obtido da crista ilíaca aos 12,6 anos	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição da população do estudo. 99

Tabela 2. Descrição da amostra do estudo..... 110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMPs	Proteínas Morfogenéticas Osseas
BMP-2	Proteína Morfogenética Ossea tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EOA	Enxerto ósseo alveolar
FDA	Food and Drugs Administration
FTUD	Fissura transforame unilateral direita
FTUE	Fissura transforame unilateral esquerda
FPFUEC	Fissura pré forame esquerda completa
FPFUDC	Fissura pré forame direita completa
HE	Hematoxilina e Eosina
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
IC	Incluso
IRs	Irrompidos
IRTRAC	Irrompido por tracionamento
m	meses
MCA	Membrana de colágeno absorvível
MicroCT	Microtomografia Computadorizada
mg	miligrama
mm	milímetros
n	número
R	Irrupção
RNA	ácido ribonucleico
rhBMP-2	Proteína Morfogenética Ossea Recombinante Humana
RX	Radiografia
TGF-beta	Fator de crescimento transformante beta
TRAC	Tracionado
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	13
2	PROPOSIÇÃO	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	25
4	RESULTADOS	31
4.1	Descrição clínica dos pacientes e das biópsias.....	31
4.2	Avaliação histológica do tecido mole	32
4.2.1	Grupo experimental	32
4.2.2	Grupo controle	32
4.3	Avaliação histológica do tecido ósseo alveolar.....	41
4.3.1	Grupo experimental	41
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICES.....	99
	ANEXOS	113

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O enxerto ósseo alveolar secundário faz parte do protocolo de reabilitação dos pacientes com fissura labiopalatina com o propósito de reparar a fissura alveolar, permitindo o fechamento da comunicação buconasal, a movimentação dentária e reabilitação protética na região anterior. Quando realizado no final da dentadura mista possibilita a irrupção do canino permanente, favorecendo uma melhor condição periodontal para os dentes adjacentes a fissura. Tanto o enxerto autógeno da crista ilíaca e do mento, quanto o da proteína morfogenética óssea em membrana de colágeno absorvível produzem resultados satisfatórios no reparo do defeito alveolar (Enemark, Jensen e Bosch, 2001; Francis et al., 2013; Sharma et al., 2013; Seifeldin, 2016).

De acordo com o material de enxertia empregado, três processos celulares estão associados ao seu sucesso: osteogênese, osteoindução e osteocondução (Misch, Dietsh, 1993). O osso autógeno da crista ilíaca é considerado padrão ouro entre os materiais de enxertia para fissura alveolar, pois induz a formação óssea por ser ricamente celularizado e por seu volume ósseo disponível, com índice de sucesso próximo a 90% (Boyne, 1974; Herford, Dean, 2011; Meyer, Molsted, 2013). Apesar dos êxitos referidos na literatura, são observadas morbidades pós-operatória como dor, necrose do osso enxertado na área receptora e dificuldade de locomoção pós-cirúrgica. No entanto, a bioengenharia tecidual busca incessantemente um substitutivo ósseo sintético que proporcione sucesso tão significativo, porém com menor morbidade da área doadora, redução do tempo cirúrgico e hospitalar (Herford et al., 2007; Dickinson et al., 2008; Francis et al., 2013; Krishnan et al., 2015; Allareddy, 2014).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são um grupo de proteínas que fazem parte da superfamília de fatores de crescimento. Quantidades mínimas dessas proteínas estão presentes no esqueleto maduro, participando da sua manutenção e reparação das fraturas ósseas (Chen, Zhao e Mundy, 2004; Chappuis et al., 2012). Num estudo pioneiro, Urist (1965) demonstrou que segmentos de matriz óssea alogênica desmineralizada colocadas em transplantes

extraesqueléticos em coelhos e ratos induzem a formação óssea em 4 a 6 semanas. Mais tarde, moléculas das BMPs 2 e 4 foram sequenciada e clonada (Wozney, 1988), sendo a partir de então produzidas em laboratório para futuras aplicações terapêuticas. Em 1990, a proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP-2) foi obtida pela clonagem molecular de seus cDNAs e suas expressões em ovários de hamster chineses (Carreira et al., 2014). O emprego clínico da rhBMP-2 constitui uma alternativa para o enxerto ósseo por sua potente propriedade osteoindutiva, (Tsuji et al., 2006; Janssen et al., 2014; Lu et al., 2016). A rhBMP-2 em doses superfisiológicas (em torno de 200.000 vezes a concentração estimada da BMP-2 fisiológica) age localmente, concentrando as células mesenquimais hospedeiras e influenciando sua diferenciação em osteoblastos (Szpalski et al., 2013; Carreira et al., 2014). A agência reguladora americana *Food and Drugs Administration* (FDA) aprovou, em 2002, o uso comercial da rhBMP-2 denominada de *Infuse[®] Bone Graft (Medtronic Spinal and Biologics, Memphis, TN)* em cirurgias ortopédicas da coluna vertebral (fusão espinal lombar) e em 2004 em enxerto ósseo para a redução de fraturas de ossos longos com perda de substância. O uso da rhBMP-2 nas cirurgias de levantamento de seio maxilar e correção de defeitos alveolares em pacientes adultos foi aprovado em 2007 pela FDA (Herford et al., 2007; Woo, 2012).

Sawada et al (2009) analisaram a neoformação óssea em defeitos alveolares criados em 6 coelhos após 4 semanas de implantação da BMP-2 em hidrogel (dose total 17mg). Pela MicroCT observaram completa formação óssea na área enxertada. Os cortes microscópicos, pela técnica de Hematoxilina e Eosina, evidenciaram osso lamelar contendo vasos sanguíneos e a presença de tecido conjuntivo fibroso. Na avaliação histomorfométrica, o volume ósseo do grupo com BMP-2 foi significativamente maior que o do grupo controle (lado oposto sem enxerto). Num experimento realizado em defeitos ósseos criados em 30 calvarias de ratos, Aghaloo et al (2010) observaram, após 12 semanas de reparo, formação óssea tanto no centro como nas margens de todas as áreas enxertadas nos grupos com BMP-2. Os cortes microscópicos, pela técnica de Hematoxilina e Eosina, revelaram uma integração de fragmento de tecido ósseo neoformado com osso lamelar maduro. Pela coloração do Tricômico de Masson-Goldner observaram a presença de osteócitos em matriz mineralizada e tecido ósseo lamelar maduro.

Significativamente, os achados histológicos se correlacionaram com a intensa densidade óssea evidenciada nas imagens da MicroCT. Deng et al (2015) ao analisarem, após 12 semanas, a eficácia osteogênica da BMP-2 (dose total 30mg) em defeitos ósseos criados por osteotomia radial bilateral em 36 coelhos, demonstraram por análises histológicas, imunohistoquímica e radiográfica a extensa formação óssea nas áreas enxertadas que evidenciou-se quando associada ao C-terminal 24 a.a . peptide of Mechano Growth Factor.

Mostafa et al (2015) analisaram, pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina e de Tricômico de Masson, cortes microscópicos de fragmentos ósseos retirados após 8 semanas dos enxertos com rhBMP-2 (dose total 12mg) em membrana de colágeno absorvível (MCA) realizados em fissuras alveolares criadas em 6 ratos. Em quase todas as áreas enxertadas dos ratos, os cortes evidenciaram tecido conjuntivo fibroso com formações ósseas tanto central como periféricamente, confirmando os achados em MicroCT. Nos outros dois animais os cortes evidenciaram tecido fibroso com pouca formação óssea. Pela técnica de Tricômico de Masson, os cortes evidenciaram microscopicamente tecido ósseo maduro e uma grande espessura de neoformação óssea.

Alonso et al (2010) compararam o resultado do enxerto ósseo secundário com rhBMP-2 (dose total 4,2mg) em MCA e osso autógeno da crista ilíaca realizados em 16 pacientes com fissuras de lábio e palato completa unilaterais. Os autores relataram que o preenchimento ósseo aferido pelo volume em imagens tomográficas computadorizadas do grupo rhBMP-2 não demonstrou diferenças do grupo do osso autógeno em 6 e 12 meses pós-cirúrgicos. Entretanto, os autores verificaram que a neoformação óssea foi mais rápida no grupo controle. Seis meses após a cirurgia já demonstrava a fissura totalmente preenchida. No grupo enxertado com rhBMP-2, o preenchimento ósseo foi identificado após 12 meses de acompanhamento. Num recente estudo em 23 pacientes adultos com defeitos ósseos horizontais ≤ 4 mm provenientes de atrofia maxilar anterior que foram submetidos a enxerto com rhBMP-2 (dose total 4,2mg) em MCA e osso autógeno (região retromolar mandibular), foram retiradas biopsias de tecido ósseo durante cirurgia de implante dentário após 6 meses do período de enxertia. Após as análises microscópica (HE) e da expressão genica do mRNA os autores relataram a presença de tecido ósseo mais espesso celularizado e vascularizado e os espaços entre as formações lamelares

preenchidos por tecido ósseo mais imaturo nos dois grupos (Freitas et al., 2016).

As intercorrências a longo prazo após o uso da rhBMP-2 em enxerto ósseo alveolar são desconhecidas. Francis et al (2013) compararam as radiografias oclusais de 36 pacientes que realizaram enxerto ósseo secundário com rhBMP-2 *Infuse*[®] em MCA com 19 com enxerto de crista ilíaca após 21 meses de reparo. Pelas escalas de Chelsea ou de Bergland, demonstraram que a rhBMP-2 usada no enxerto alveolar nas fissuras de lábio e palato completa unilaterais apresentou maiores índices de sucesso (97,2%) em comparação aos enxertos de crista ilíaca (84,2%). Neste mesmo estudo houve a avaliação histológica de fragmento de tecido ósseo removido de um paciente de 16 anos durante a cirurgia ortognática Le Fort I após 42 meses de reparo ósseo alveolar com rhBMP-2. Foi observado microscopicamente a presença de cortical óssea espessa com espaços medulares e tecido conjuntivo fibroso vascularizado.

Carragee et al (2011) numa revisão de dados disponíveis na literatura sugeriram que o risco de efeitos adversos do rhBMP-2 em fusões espinais é 10 a 50 vezes maior do que os relatados em estudos experimentais, levantando preocupações sobre a segurança no uso desta proteína. Eles constataram que estudos retrospectivos e casos relatados pela FDA sobre efeitos adversos da rhBMP-2 nessas regiões refletem a gravidade dos riscos. Estudos recentes relataram efeitos adversos após a primeira semana de uso de rhBMP-2 (dose total 2.25mg) em enxerto ósseo alveolar secundário causando edema gengival acentuado, mas sem intercorrências na irrupção dentária (Neovius et al., 2013). Intensa inflamação foi relatada, após 6 semanas, num paciente de 12 anos de idade submetido ao reparo de uma fratura ulnar e radial com dose total de 4,2 mg de rhBMP-2. Após 4 meses e meio de acompanhamento, as imagens radiográficas revelaram reabsorção óssea na área enxertada (Ritting et al., 2012).

Os dados da *FDA's Manufacturer and User Facility Device Experience* (MAUDE) até abril de 2011, referenciaram 929 relatos de efeitos adversos após o uso da rhBMP-2 em cirurgias (Woo, 2012). Oitenta e três (8,9%) foram cirurgias bucomaxilofaciais. Destas, 28 (33,7%) procedimentos on-label, 44 (53%) off-label entre os quais 19 (22,9%) enxertos de fissura alveolar e 11 (13,3%) de cirurgias bucomaxilofaciais sem especificação. De todos os casos relatados, 76%

apresentaram intercorrências como edema local, dor, perda do enxerto e infecções no local da cirurgia. Não houve ocorrência de morte. Cinquenta e três por cento das intercorrências descritas foram do uso off-label da rhBMP-2 (Woo, 2012).

DeVine et al (2012) ao comparar estudos de revisões pareadas com os do FDA sobre a ocorrência de câncer em pacientes submetidos a cirurgias da fusão espinal com rhBMP-2 sugerem a relação com o uso de altas doses desta proteína comercialmente denominada de *AMPLIFY™* (rhBMP-2, dose total 40mg). Carragee et al (2013) observaram após dois e cinco anos de acompanhamento um aumento significativo de incidência de diversos tipos de câncer fora da área enxertada em pacientes considerados de baixo risco a carcinogênese que realizaram tratamento da artrodese colunar com *AMPLIFY™*. Essa associação do rhBMP-2 com o câncer pode ser explicada pelas vias de sinalização do TGF-beta que desempenham complexas funções dependentes do contexto celular. As rupturas do equilíbrio destas sinalizações e a regulação negativa no ciclo celular pelo TGF-beta têm implicações na promoção da formação do câncer (Massagué, 2012). Herford e Boyne (2008) ao analisarem o uso da rhBMP-2 (dose total de 4 a 8 mg) em 10 pacientes, 14 a 55 anos de idade, com defeitos ósseos resultantes de lesões como Ameloblastoma, Fibroma ossificante e Osteomielite no corpo e ângulo da mandíbula, relataram formação óssea pela avaliação das imagens das radiografias panorâmicas após 3 e 6 meses de acompanhamento. Dois pacientes, após 6 e 8 meses, foram submetidos a cirurgia de implantes nas áreas enxertadas com sucesso.

Revisões sistemáticas recentes sobre rhBMP-2 reportaram a ausência de estudos que avaliem histologicamente áreas enxertadas por rhBMP-2 em tecido ósseo humano a longo prazo (Carragee et al., 2011; Simmonds et al., 2013; Carreira et al., 2014). Deste modo, este estudo visa analisar histologicamente os tecidos ósseo e mole removidos da região da fissura enxertada com rhBMP-2 em membrana de colágeno após no mínimo 6 meses da cirurgia de enxerto ósseo alveolar dos pacientes que apresentaram caninos superiores retidos e foram submetidos à cirurgia para tracionamento ortodôntico nesta região.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos desse trabalho foram:

- Analisar microscopicamente as características histológicas dos fragmentos dos tecidos ósseo e mole removidos da região da fissura alveolar enxertada com proteína morfogenética óssea recombinante humana em pacientes com fissuras de lábio e palato completa unilaterais com necessidade de exposição cirúrgica dos caninos superiores para tracionamento ortodôntico 6 a 46 meses após o enxerto alveolar;
 - Comparar os achados histológicos dos fragmentos dos tecidos ósseo e mole biopsiados da região da fissura alveolar enxertada com proteína morfogenética óssea com um grupo controle da região dos caninos superiores retidos contralaterais à fissura ou na região da fissura não enxertada.
 - Comparar os achados histológicos dos tecidos ósseo e mole com um caso controle da região da fissura alveolar enxertada com osso autógeno da crista ilíaca.
-

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade de São Paulo, com o parecer nº 407.770 (Anexo A). A população de estudo foi constituída por pacientes na fase da dentadura mista com fissuras pré forame completa e transforame unilaterais tratados no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofacial da Universidade de São Paulo (HRAC/USP). Estes pacientes realizaram enxerto ósseo alveolar no período entre março de 2011 a dezembro de 2014.

Os pacientes foram previamente selecionados de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

- Ausência de síndromes craniofaciais, deformidades e/ou patologias orofaciais associadas.
- Saúde geral boa, sem relato de doenças ósseas ou uso de fármacos que afetem o metabolismo ósseo.
- Pacientes que realizaram enxerto ósseo alveolar secundário com rhBMP-2 (Infuse[®] Bone Graft, Medtronic Sofamor Danek, Memphis, Tennessee, USA) em membrana de colágeno absorvível na fase da dentadura mista ou com osso autógeno da crista ilíaca.
- Documentação radiográfica, panorâmicas e periapicais, de boa qualidade avaliativa obtidas do arquivo do departamento de Radiologia do HRAC/USP.

Para este estudo, avaliou-se uma população inicial de 445 pacientes, que em função da ausência de imagens radiográficas para realização do diagnóstico do comportamento irruptivo do canino superior permanente resultou em 336 pacientes (62,4% masculino e 37,5% feminino), sendo que 31,8% possuíam fissuras de lábio

com comprometimento do rebordo alveolar unilaterais e 68,1% fissuras de lábio e palato completa unilaterais. Vinte e cinco por cento da amostra foi perdida por falta de controle radiográfico e 92% tiveram irrupção espontânea do canino na área enxertada (Tabela 1).

O grupo experimental (n=13) foi composto por pacientes com diagnóstico de retenção de caninos superiores permanentes na região da fissura enxertada com rhBMP-2 e com indicação de exposição cirúrgica para tracionamento ortodôntico. O comportamento irruptivo dos caninos superiores foi avaliado pelas radiografias panorâmicas e periapicais obtidas antes do início do tratamento ortodôntico corretivo de todos os pacientes triados (Tabela 1). Foi considerado retido os caninos superiores não irrompidos com formação radicular completa. A idade média desta população amostral na época da cirurgia do enxerto foi de 12,05 anos (DP=0,78). A cirurgia de enxerto foi realizada por dois cirurgiões bucomaxilofaciais do HRAC. A mesma técnica cirúrgica foi utilizada por eles e estava de tal forma padronizada entre eles que não foi considerada uma variável. Foi utilizado um kit médio de rhBMP-2 e MCA em sua forma comercial Infuse[®] Bone Graft com membrana de colágeno absorvível para cirurgia de enxerto ósseo alveolar a cada dois pacientes com fissura lábio palatina unilateral. Posteriormente, na exposição cirúrgica dos caninos retidos foram coletadas as biópsias de tecidos ósseo e mole. A idade média desta população amostral na época da cirurgia de tracionamento foi de 13,56 anos (DP=0,64).

Para compor o grupo controle (n=6), foram selecionados da população inicial 2 pacientes com caninos superiores retidos do lado contralateral à fissura, e um com canino retido na área enxertada com osso autógeno da crista ilíaca. Posteriormente, foi coletada a biópsia de 3 pacientes com caninos retidos na região alveolar próxima à fissura não enxertada, proveniente do atendimento ambulatorial e não da seleção inicial. Todos os pacientes do grupo controle possuíam indicação cirúrgica de exposição da coroa do canino para tracionamento ortodôntico.

Biopsias dos fragmentos ósseos e mole

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com autorização dos

pais ou responsáveis dos pacientes pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B) e do Termo de doação da biopsia (ANEXO C).

O acesso cirúrgico do canino superior permanente para o tracionamento ortodôntico foi planejada pelos cirurgiões bucomaxilofaciais do HRAC/USP conforme a posição e a altura do canino em relação ao rebordo ósseo alveolar. Foi realizada uma incisão para obtenção do retalho mucoperiosteal, deslocamento e localização da coroa do dente. No momento da incisão foi removido um fragmento de tecido mole. A osteotomia por meio de cinzéis e broca foi realizada com o intuito de expor a coroa do dente retido possibilitando assim a sua perfuração com broca carbide esférica ¼ e transfixação com fio de aço 0.08” para posterior tracionamento ortodôntico. Os fragmentos dos tecidos ósseo proveniente da osteotomia e de tecido mole biopsiados foram fixados em solução de formalina a 10% e enviados ao laboratório de Patologia do departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Técnica e Análise Microscópicas

Os fragmentos de tecido ósseo biopsiados foram colocados na solução desmineralizadora de Morse durante 1 a 2 meses. Finalizado o processo de desmineralização, estes fragmentos foram encaminhados para processamento laboratorial de rotina e inclusão em parafina. Foram obtidos cortes microscópicos de 4 micrometros de espessura. Os fragmentos de tecido mole biopsiados também foram processados para inclusão em parafina e cortes microscópicos de 4 micrometros de espessura.

Para cada caso estudado, foram obtidas 2 lâminas com vários cortes microscópicos, os quais foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) de acordo com a técnica padrão do laboratório de Patologia do departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

As lâminas foram analisadas por dois examinadores utilizando-se um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS). Em seguida foram capturadas as imagens dos cortes microscópicos de cada caso biopsiado no aparelho Leica DM 500, utilizando o programa Leica Application Suite Versão 2.0.0.

2010. As radiografias periapicais tiradas antes da biopsia foram associadas as fotomicrografias de cada caso.

A ordem dos casos durante a análise microscópica foi baseada no tempo obtido entre a data do enxerto ósseo alveolar com rhBMP-2 e a da cirurgia de exposição cirúrgica do canino retido de maneira crescente. Os cortes microscópicos das lâminas coradas pela técnica de HE foram analisadas qualitativamente quanto o padrão morfológico do tecido ósseo descrevendo a presença ou ausência de tecido ósseo lamelar, matriz osteóide, linhas de reversão basofílicas, tecido ósseo mais imaturo, canais nutritivos, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos além da observação do tecido conjuntivo com presença ou ausência de fibras colágenas, bem como presença ou não de processo inflamatório e vasos sanguíneos. Para os cortes microscópicos do tecido mole biopsiado foi analisada características histológicas do epitélio, bem como a presença ou não de atipias epiteliais e de inflamação no tecido conjuntivo (lâmina própria).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Descrição clínica dos pacientes e das biópsias

Dos 13 casos biopsiados para o grupo experimental, 12 casos possuíam fragmentos de tecido ósseo de tamanhos suficientes para avaliação histológica, sendo a média e o desvio padrão (DP) da área avaliada para cada biópsia de $3,6 \pm 1,64 \text{ mm}^2$. Macroscopicamente, os fragmentos ósseos apresentavam consistência firme, forma irregular, coloração branca ou castanho claro. Dos 12 casos, onze apresentavam fissura transforame unilateral, sendo 9 do gênero masculino e 2 do feminino, e um com fissura pré forame completa unilateral esquerda do gênero feminino. A idade média dos pacientes do grupo experimental foi de 11,97 anos (DP=1,11) na época da realização do enxerto alveolar e de 14,47 anos (DP=2,91) na época da exposição cirúrgica do canino superior na área enxertada. O intervalo entre o período do enxerto e o da biópsia variou de 6 a 46 meses (Tabela 2). Em relação aos fragmentos de tecido mole, apenas três das biópsias realizadas obtiveram materiais suficientes para análise histológica sendo a média da área avaliada de $3,6 \pm 1,64 \text{ mm}^2$. Os fragmentos de tecido mole possuíam consistência flácida, superfície lisa, forma irregular e coloração cinza.

No grupo controle, dos 6 casos biopsiados, 4 possuíam fragmentos de tecido ósseo de tamanhos suficientes para análise histológica, sendo a média e DP da área avaliada de $4,8 \pm 5,7 \text{ mm}^2$. Todos os pacientes apresentavam fissura transforame unilateral esquerda, com predominância do gênero masculino (Tabela 2). A idade média desta população amostral na época da exposição cirúrgica do canino e biópsia foi de 14,3 anos (DP=1,46) (Tabela 2). Em relação aos fragmentos de tecido mole apenas um possuía material suficiente para a análise sendo a média da área avaliada de $3,6 \pm 1,64 \text{ mm}^2$.

4.2 Avaliação histológica do tecido mole

4.2.1 Grupo experimental

Os cortes microscópicos de todos os casos corados pela hematoxilina e eosina revelaram tecido mole bucal constituído por epitélio de revestimento estratificado paraqueratinizado espesso contendo papilas epiteliais longas e estreitas. Em todas as biópsias foi possível identificar as camadas do epitélio. A camada basal composta por células colunares ou cuboide, a espinhosa contendo as pontes celulares ou espinhos entre as células adjacentes, a granulosa contendo células achatadas e grânulos de querato-hialina e a camada córnea contendo células achatadas e núcleos picnóticos (veja os detalhes na Figura 1D-E). Na interface entre o epitélio e o tecido conjuntivo projeções ascendentes do tecido conjuntivo fibroso, denominado de papilas conjuntivas que se interdigitavam com as cristas epiteliais (Figura 1F). A lâmina própria era composta por tecido conjuntivo fibroso contendo fibroblastos e vasos sanguíneos (Fig. 1E). O mesmo foi observado nos dois outros casos do grupo experimental (Figs. 2A-E e 3A-E).

4.2.2 Grupo controle

No único caso do grupo controle (Fig. 4A-E), o epitélio apresentou características de normalidade. Observou-se também a presença de um discreto infiltrado inflamatório na lâmina própria.

Figura 1. Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 12,7 anos de idade. A) Rdiografia periapical obtida **46 meses** após a enxertia mostrando a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas do tecido mole corado pela HE:** B-C) Imagem panorâmica do fragmento da biópsia mostrando o epitélio de revestimento (seta verde) e adjacente a lâmina própria (seta vermelha) composta por denso tecido conjuntivo. Objetivas de 4x e 10x. D) Detalhe do epitélio mostrando a camada superficial paraqueratinizada (1) contendo no seu interior os núcleos picnóticos, a camada granulosa (2) contendo os grânulos de querato-hialina e a camada espinhosa (3) com seus queratinócitos mostrando em detalhe as “pontes intercelulares” ou espinhos entre as células. Objetivas de 40x e 100x; E) Detalhe das cristas epiteliais (CE) mostrando a camada basal (4) formada por células colunares e as papilas conjuntivas (PC). Objetivas de 40x e 100x. F) Detalhe da lamina própria formado por tecido conjuntivo denso (TC) contendo fibroblastos (círculo azul) e vasos sanguíneos (V). Objetiva de 40x.

Figura 2. Paciente do gênero feminino, com fissura pré-forame esquerda completa que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,7 anos de idade. A) Rdiografia periapical obtida **9 meses** após a enxertia mostrando a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas do tecido mole corado pela HE:** B-C) Imagem panorâmica do fragmento da biópsia mostrando o epitélio de revestimento (seta verde) e adjacente a lâmina própria (seta vermelha) composta por denso tecido conjuntivo. Objetivas de 4x e 10x. D) Detalhe do epitélio mostrando a camada granulosa (2) contendo os grânulos de querato-hialina e a camada espinhosa (3) com seus queratinócitos mostrando em detalhe as “pontes intercelulares” entre as células. Devido ao plano do corte, não observa nitidamente a camada córnea. Objetivas de 40x e 100x; E) Detalhe das cristas epiteliais (CE) mostrando a camada basal (4) formada por células colunares e as papilas conjuntivas (PC). Objetivas de 40x e 100x. F) Detalhe da lamina própria formado por tecido conjuntivo denso (TC) contendo fibroblastos (círculo azul) e vasos sanguíneos (V). Objetiva de 40x.

Figura 3. Paciente do gênero feminino com fissura labiopalatina completa lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 com 12,1 anos de idade. A) Rdiografia periapical obtida **13 meses** após a enxertia mostrando a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens Histológicas do tecido mole corado pela HE:** B-C) Imagem panorâmica do fragmento da biópsia mostrando o epitélio de revestimento (seta verde) e adjacente a lâmina própria (seta vermelha) composta por denso tecido conjuntivo. Objetivas 4x e 10x. D) Detalhe do epitélio mostrando a camada superficial paraqueratinizada (1) contendo no seu interior os núcleos picnóticos, a camada granulosa (2) contendo os grânulos de querato-hialina e a camada espinhosa (3) com seus queratinócitos mostrando em detalhe as “pontes intercelulares” ou espinhos entre as células. Objetivas de 40x e 100x; E) Detalhe das cristas epiteliais (CE) mostrando a camada basal (4) formada por células colunares e as papilas conjuntivas (PC). Objetivas de 40x e 100x. F) Detalhe da lamina própria formado por tecido conjuntivo denso (TC) contendo fibroblastos (círculo azul) e vasos sanguíneos (V). Objetiva de 40x

Figura 4. Paciente do gênero masculino, 12,5 anos de idade, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo não enxertada. A) Rdiografia periapical obtida imediatamente antes da exposição cirúrgica mostrando a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). B) Aspecto panorâmico dos fragmentos da biópsia. **Imagens histológicas do tecido mole corado pela HE:** B-C) imagem panorâmica dos fragmentos da biópsia ($\approx 3,6\text{mm}^2$) mostrando o epitélio de revestimento (seta verde) e adjacente a lâmina própria (seta vermelha) composta por tecido conjuntivo denso. Objetivas de 4x e 10x. D) Detalhe do epitélio mostrando a camada granulosa (2) contendo poucos grânulos de querato-hialina e a camada espinhosa (3) com seus queratinócitos mostrando em detalhe as “pontes intercelulares” entre as células. Devido ao plano do corte, não se observa toda camada granulosa e a camada córnea está ausente. Objetivas de 40x e 100x. E) Detalhe das cristas epiteliais (CE) mostrando a camada basal (4) formada por células colunares e as papilas conjuntivas (PC). Objetivas de 40x e 100x. F) Detalhe da lamina própria formado por tecido conjuntivo denso (TC) contendo fibroblastos, vasos sanguíneos (V) e células inflamatórias (área em destaque). Objetiva de 40x.

4.3 Avaliação histológica do tecido ósseo alveolar

4.3.1 Grupo experimental

Durante a avaliação histológica dos cortes das biópsias após o enxerto ósseo alveolar (EOA) com rhBMP-2 corados pela hematoxilina e eosina observou-se alterações morfológicas significativas quanto o período de enxertia. Desta maneira, os resultados serão apresentados por ordem crescente temporal após o enxerto (Intervalo de tempo entre a enxertia e a cirurgia de exposição cirúrgica do canino) em: Períodos de 6 a 12 meses; Períodos de 13 a 24 meses e Períodos com mais de 24 meses.

Período de 6 a 12 meses após EOA

Neste período obtivemos 3 biópsias, duas com 6 meses de EOA (Figs. 5 e 6) e uma com 9 meses de EOA (Fig. 7) os quais apresentaram quadro histológico similares. Uma das biópsias de 6 meses (Fig 5C) composta por um único bloco era possível notar a presença de uma tábua óssea contínua mais densa e espessa, referente a cortical óssea alveolar, que recobre um tecido ósseo trabeculado com grandes espaços entre as trabéculas (espaço ocupado pela medula óssea). A cortical óssea era composta em sua maioria por áreas de densa formação óssea lamelares circunscrevendo canais nutritivos e os espaços entre estas formações lamelares mostravam preenchidas por tecido ósseo mais imaturo contendo várias lacunas de osteócitos em arranjo desorganizado aprisionados na matriz óssea (veja os detalhes na Fig 5D-E). Adjacente a cortical óssea, o osso trabeculado era composto por uma mistura de tecido ósseo mais organizado contendo pequenas lacunas de osteócitos dispersos na matriz óssea de forma concêntrica, linhas de reversão basofílicas e uma extensa camada de osso imaturo seguido por uma fina camada de matriz osteóide fracamente corada pela eosina indicando uma contínua deposição de tecido ósseo (Fig 5 F-G). O outro caso de 6 meses (Fig 6) embora fragmentado apresentava fragmentos similares ao observado para a cortical óssea do caso anterior (Figs. 6D-E) e outros mais desorganizado e imaturo (Figs. 6F-G)

Na biópsia obtida após 9 meses de EOA (Fig. 7F-G) o quadro histológico era similar ao de 6 meses, porém as trabéculas ósseas eram menos espessas, mais desorganizadas, sem formações lamelares e com maior densidade de osteócitos por área (Compare a Fig. 5F-G com 7F-G) indicando menor grau de maturidade.

Figura 5. Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,1 anos de idade: A-B). Rdiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **6 meses** após o enxerto (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas do tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico do fragmento maior da biópsia ($\cong 2,5 \text{ mm}^2$) formado por uma região de tábua óssea mais espessa e contínua (área tracejada em azul) e o restante por tecido ósseo mais trabeculado contendo grandes espaços entre as trabéculas. Objetiva de 4X. D-E) Detalhe da tabua óssea composto por tecido ósseo lamelar (seta preta) cujas lamelas e as lacunas de osteócitos mostram-se dispostos paralelamente ao canal nutritivo (cabeça de seta amarela) e o espaço entre elas preenchido por um tecido ósseo mais imaturo/desorganizado com osteócitos dispostos aleatoriamente. Objetivas de 10X e 40X. F-G). Região do fragmento composto por uma mistura de tecido ósseo mais organizado contendo pequenas lacunas de osteócitos (área circundada em azul) dispersos na matriz óssea de forma concêntrica, linhas de reversão basofílicas (cabeça de seta azul) e uma extensa camada de osso imaturo seguido por uma fina camada de matriz osteóide fracamente corada pela eosina (cabeça de seta verde) indicando uma contínua deposição de tecido ósseo. Objetivas de 10X e 40X.

Figura 6. Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,10 anos de idade: A-B). Rdiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **6 meses** após o enxerto (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas do tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico dos fragmentos biopsiados ($\leq 1 \text{ mm}^2$). Objetiva de 4X. D-E) Fragmento composto por tecido ósseo (TO) mais denso e organizado comparado aos da imagem anterior (D-E) contendo lacunas de osteócitos (área circundada em azul) menores e mais dispersas na matriz óssea (MO). Objetivas de 10X e 40X. F-G) Fragmento composto por tecido ósseo trabecular imaturo (TOI) contendo várias lacunas de osteócitos (área circundada em azul) em arranjo desorganizado aprisionados na matriz óssea (MO) e grandes espaços entre as trabéculas (seta verde) preenchidos por tecido conjuntivo(TC). Objetivas de 10X e 40X.

Figura 7. Paciente do gênero feminino, com fissura de lábio com comprometimento do rebordo alveolar lado esquerdo que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,7 anos de idade: A-B) Rdiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **9 meses** após o enxerto (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas do tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico do fragmento da biópsia ($\cong 1 \times 1,5 \text{ mm}^2$) formado por uma região de tábuas ósseas mais espessas e contínuas (área tracejada em azul) e o restante por tecido ósseo trabeculado contendo grandes espaços entre as trabéculas. Objetiva de 4X. D-E) Detalhe da tábua óssea composto por áreas de densa formação óssea (setas pretas) circunscrevendo canais nutritivos (cabeça de seta amarela) e os espaços entre as formações lamelares preenchidos por tecido ósseo mais imaturo (TOI) contendo várias lacunas de osteócitos (área circundada em azul) em arranjo desorganizado aprisionados na matriz óssea. Objetivas de 10X e 40X. F-G) Região do fragmento composto por uma mistura de tecido ósseo trabeculado contendo inúmeros osteócitos (área circundada em azul) dispersos na matriz óssea. Objetivas de 10X e 40X.

Período de 13 a 24 meses após EOA

Neste período obtivemos 6 biópsias, duas com 13 meses de EOA (Figs. 8 e 9), uma com 16 meses de EOA (Fig. 10), duas com 18 meses (FIG 11 e 12) e uma com 21 meses (Fig. 13).

Um dos casos do período de 13 meses (Figs. 8A-G) obtido do paciente do gênero feminino mostrou tecido ósseo mais imaturo composto por uma tabua óssea contendo inúmeras e pequenas áreas de formação óssea de arranjo lamelar circunscrevendo novos canais nutritivos (Fig 8D-E). Na periferia dos canais nutritivos observou-se deposição de novo osso caracterizado por uma camada de matriz uma osteóide pouco eosinofílica (Fig. 8E). Os espaços entre os arranjos lamelares estavam preenchidos por tecido ósseo mais imaturo/interlamelar contendo várias lacunas de osteócitos em arranjo desorganizado (Figs. 8D-E). Em algumas regiões da biópsia observou-se a formação de um tecido ósseo recém-sintetizado associado ao tecido conjuntivo contendo osteócitos recém aprisionados e osteoblastos ativos (Fig. 8G). O outro caso de 13 meses de um paciente do gênero masculino (Fig. 9) apresentou maior grau de maturidade formado por tecido ósseo compacto de arranjo lamelar que circunscreve os canais nutritivos que são menos numerosos quando comparado com a biópsia anterior (compare a Fig. 8D-E com a Fig. 9D-E). As lamelas ósseas continham poucos osteócitos e os espaços entre os arranjos lamelares preenchidos por pouco tecido ósseo mais imaturo/interlamelar (Fig. 9D). Embora apresentasse elevado grau de maturidade óssea haviam áreas de tecido ósseo imaturo com osteoblastos ativos presentes na superfície óssea recoberta por tecido conjuntivo fibroso (Fig. 9F-G). O mesmo foi observado para a biópsia coletada após 16 meses de EOA (compare as características morfológicas das Figs 9 com as da Fig. 10).

Com relação às duas biópsias obtidas após 18 meses de EOA, a amostra obtida de paciente feminino (Fig. 11) apresentava tecido ósseo mais imaturo em relação ao obtido do paciente do gênero masculino (Fig. 12) e similar ao observado para a biópsia de 13 meses obtida de paciente do gênero feminino (Compare a Fig. 11 com a Fig. 8). Com relação à biópsia obtida do paciente masculino (Fig. 12) grande parte era formada por tecido ósseo maduro de arranjo lamelar contendo linhas incrementais/reversão com sobreposição de novo osso e presença de matriz

osteóide e osteoblastos na superfície óssea (Fig. 12D-E). Porém, algumas regiões da biópsia o tecido ósseo apresentava sinais de remodelação contendo áreas de reabsorção e de neoformação óssea associadas ao tecido conjuntivo fibroso (Fig. 12F-G).

Já, aos 21 meses de EOA, a biópsia (Fig. 13) mostra maior grau de maturidade em relação as anteriores, sendo composta por tecido ósseo maduro de arranjo lamelar contendo tênues linhas de reversão/incrementais e lacunas de osteócitos dispersas na matriz óssea contendo na sua superfície osteoblastos de revestimento (ver detalhes das Figs. 13D-E).

Figura 8. Paciente do gênero feminino, com fissura labiopalatina completa lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 12,1 anos de idade. A-B) Rdiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **13 meses** após o enxerto (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas de tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico do fragmento da biópsia ($\cong 2 \text{ mm}^2$) formado por um único bloco ósseo. Objetiva de 4X. D-E) Detalhe da tabua óssea composto por inúmeras e pequenas áreas de formação óssea de arranjo lamelar (setas preta) circunscrevendo novos canais nutritivos (cabeça seta amarela) exibindo no seu interior formação de matriz osteóide pouco eosinofílica. Os espaços entre estes arranjos lamelares mostram-se preenchidos por tecido ósseo mais imaturo/interlamelar (TOI) contendo várias lacunas de osteócitos (área circundada em azul) em arranjo desorganizado. Objetivas de 10X e 40X. F-G) Região do fragmento associado ao tecido conjuntivo formado por tecido ósseo imaturo contendo osteócitos recém aprisionados (área circundada em azul) e osteoblastos ativos (área circundada em verde). Objetivas de 10X e 40X.

Figura 9. Paciente do gênero masculino com fissura labiopalatina completa lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 10,9 anos de idade: A-B) Radiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **13 meses** após o enxerto (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas de tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico do fragmento da biópsia ($\cong 2 \times 3,5 \text{ mm}^2$) formado por um denso bloco ósseo. Objetiva de 4X. D-E) Detalhe da região central da biópsia composta por tecido ósseo mais compacto de arranjo lamelar (setas preta) circunscrito ao redor dos canais nutritivos (cabeça de seta amarela) contendo poucas osteócitos (área circundada em azul) e os espaços entre os arranjos lamelares preenchidos por tecido ósseo mais imaturo/interlamelar (TOI). Objetivas de 10X e 40X. F-G) Outro detalhe do fragmento mostrando o arranjo lamelar do tecido ósseo com presença de osteoblastos ativos (área circundada em verde) na superfície recoberta por tecido conjuntivo fibroso (TC). Objetivas de 10X e 40X.

Figura 10. Paciente do gênero masculino com fissura labiopalatina completa lado esquerdo que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 13,2 anos de idade: A-B) Rdiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **16 meses** após o enxerto (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas do tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico do bloco ósseo fragmentado da biópsia ($\cong 1 \times 3 \text{ mm}^2$) composto por tecido ósseo e tecido conjuntivo. Objetiva de 4X. D-G) Detalhes da biópsia composta por tecido ósseo mais compacto de arranjo lamelar (setas preta) circunscrito ao redor dos canais nutritivos (cabeça de seta amarela) contendo poucas osteócitos (área circundada em azul) e os espaços entre os arranjos lamelares preenchidos por tecido ósseo mais imaturo/interlamelar (TOI)). Objetivas de 10X e 40X.

Figura 11. Paciente do gênero feminino, com fissura labiopalatina completa lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 12 anos de idade: A-B) Rdiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **18 meses** após o enxerto (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas do tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico do fragmento da biópsia ($\cong 2 \text{ mm}^2$) formado por um único bloco ósseo. Objetiva de 4X. D-E) Detalhe da tabua óssea composta por inúmeras e pequenas áreas de formação óssea de arranjo lamelar (setas preta) circunscrevendo novos canais nutritivos (cabeça seta amarela). Os espaços entre estes arranjos lamelares mostram-se preenchidos por tecido ósseo mais imaturo/interlamelar (TOI) contendo várias lacunas de osteócitos (área circundada em azul) em arranjo desorganizado. Objetivas de 10X e 40X. F-G) Região do fragmento com arranjo ósseo lamelar mais organizado (lamelas concêntricas – seta preta e lamelas circunferenciais -LC) comparado as figuras anteriores (D-E). Objetivas de 10X e 40X.

Figura 12. Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,6 anos de idade: A-B) Rdiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **18 meses** após a enxertia (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas de tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico dos fragmentos da biópsia (um de com $\cong 2,5 \text{ mm}^2$ e os demais menores que 1mm^2). Objetiva de 4X. D-E) Detalhe do fragmento maior formado por tecido ósseo maduro de arranjo lamelar (seta preta), linhas incrementais/reversão (cabeça de seta azul) com sobreposição de novo osso (NB), matriz osteóide e osteoblastos na superfície óssea (área circundada em verde). Objetivas de 10X e 40X. F-G) Outro fragmento composto por uma mistura de tecido ósseo em remodelação contendo áreas de reabsorção (cabeça de seta amarela) e de formação óssea (cabeça de seta verde) envoltas por tecido conjuntivo fibroso (TC). Objetivas de 10X e 40X.

Figura 13. Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 12,6 anos de idade: A-B) Rdiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **21 meses** após o enxerto (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas de tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico dos fragmentos da biópsia (um fragmento de $\cong 4,5 \times 0,5 \text{ mm}^2$ e um fragmento de $\cong 2,5 \times 0,5 \text{ mm}^2$). Objetiva de 4X. D-G) Detalhes dos fragmentos formado por tecido ósseo maduro de arranjo lamelar (seta preta) contendo tênues linhas de reversão/incrementais (cabeça de seta azul) e lacunas de osteócitos dispersas na matriz óssea revestida externamente pelos osteoblastos (área circundada em verde). Objetivas de 10X e 40X.

Período acima de 24 meses após EOA

Neste período obtivemos 3 biópsias, uma com 24 meses e 10 dias de EOA (Fig. 14), uma com 26 meses de EOA (Fig. 15) e uma com 46 meses (Fig 16).

A biópsia de 24 (Fig.14) e 26 meses (Fig. 15) era composta somente por tecido ósseo maduro de arranjo lamelar contendo linhas de reversão/incrementais e lacunas de osteócitos dispersas na matriz óssea (Figs. 14D-E e 15D-E). A biópsia de 46 meses era formada por densas trabéculas ósseas envoltas externamente por tecido conjuntivo fibroso e outras compostas por medula óssea. Inúmeras linhas de reversão com sinais de reabsorção e de aposição de novo osso indicam intensa remodelação do tecido ósseo (Figs. 16D-E).

Figura 14. Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 10,2 anos de idade: A-B) Radiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **24 meses** após a enxertia (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas de tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico da biópsia ($\approx 3 \times 1,2 \text{ mm}^2$). Objetiva de 4X. D-E) Detalhe dos fragmentos formado por tecido ósseo maduro de arranjo lamelar (seta preta) contendo linhas de reversão/incrementais (cabeça de seta azul) e lacunas de osteócitos dispersas na matriz óssea (MO). Objetivas de 10X e 40X. F-G) Outro detalhe do fragmento mostrando uma área de tecido ósseo lamelar (seta preta) e outra formada por tecido ósseo mais imaturo (TOI) contendo várias lacunas de osteócitos (área circundada em azul) dispostos de forma desorganizada na matriz óssea. Objetivas de 10X e 40X.

Figura 15. Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado direito que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 11,10 anos:de idade A-B) Rdiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **26 meses** após a enxertia (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas de tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico dos fragmentos da biópsia (um fragmento de $\cong 2,5 \times 1,5 \text{ mm}^2$ e dois fragmentos menores que 1mm^2). Objetiva de 4X. D-G) Detalhes dos fragmentos formados por tecido ósseo maduro de arranjo lamelar contendo linhas de reversão/incrementais (cabeça de seta azul) e lacunas de osteócitos (área circundada em azul) dispersas na matriz óssea. Objetivas de 10X e 40X.

Figura 16. Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo que recebeu EOA com rhBMP-2 aos 12,7 anos de idade: A-B) Radiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **46 meses** após a enxertia (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas de tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico dos fragmentos da biópsia ($\cong 2\text{mm}^2$) formados por densas trabéculas ósseas envoltas externamente por tecido conjuntivo fibroso (TC) (seta azul) e outras compostas por medula óssea. Objetiva de 4X. D-G) Detalhes dos fragmentos formados por tecido ósseo maduro (seta preta) de arranjo lamelar contendo linhas de reversão (cabeça de seta azul) com sinais de reabsorção (cabeça de seta amarela) e de aposição de novo osso imaturo (TOI) (cabeça de seta verde) e lacunas de osteócitos (área circundada em azul) dispersas na matriz óssea (MO). Objetivas de 10X e 40X.

Grupo Controle

No paciente do gênero feminino aos 13,1 anos de idade, a biópsia obtida na região do canino retido do lado contralateral à fissura labiopalatina (Fig. caso 17) apresentava inúmeras e pequenas áreas de formação óssea de arranjo lamelar circunscrevendo novos canais nutritivos e o espaço entre as formações lamelares ocupadas por tecido ósseo mais imaturo contendo grandes lacunas de osteócitos (Fig caso17C-D). O outro fragmento era formado por tecido ósseo mais organizado de arranjo lamelar contendo pequenos canais nutritivos e lacunas de osteócitos acompanhando a organização lamelar (Fig. Caso 17E-F).

As biópsias obtidas do paciente do gênero masculino aos 14,4 anos de idade (Fig. 18) e do paciente aos 16 anos de idade (Fig. 19) do lado esquerdo sem EOA eram compostas por um bloco de tecido ósseo maduro de arranjo lamelar cujos osteócitos acompanham o sentido das lamelas (Fig. 18C-D e 19C-D) e áreas de tecido ósseo mais desorganizado com lacunas de osteócitos dispersos aleatoriamente na matriz óssea, linhas de reversão e os canais nutritivos sugestivos de remodelação óssea (Fig. 18F-G e 19F-G).

A única biópsia de EOA autógeno obtida do paciente do gênero masculino aos 12,6 anos de idade na época da enxertia e 24,5 anos de idade na época da biópsia eram compostas por pequeno bloco de tecido ósseo maduro de arranjo lamelar (Fig. 20D-E).

Figura 17. Paciente do gênero feminino, com canino retido do lado contralateral (sem fissura) à fissura labiopalatina completa lado esquerdo aos 13,1 anos de idade: A) Radiografia periapical obtida no dia da exposição cirúrgica mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas de tecido ósseo corado pela HE:** B) Aspecto panorâmico dos dois fragmentos da biópsia (um fragmento com $\cong 3 \times 1,5 \text{ mm}^2$ e um com $\cong 4 \times 2 \text{ mm}^2$). Objetiva de 4X. C-D) Detalhe da tabua óssea composto por inúmeras e pequenas áreas de formação óssea de arranjo lamelar (setas preta) circunscrevendo novos canais nutritivos (cabeça seta amarela) e o espaço entre as formações lamelares ocupadas por tecido ósseo mais imaturo contendo grandes lacunas de osteócitos (área circundada em azul). Objetivas de 10X e 40X. E-F) Outro fragmento exibindo osso compacto mostrando o tecido lamelar contendo pequenos canais nutritivos (cabeça de seta amarela) e as lacunas de osteócitos (área circundada em azul) acompanhando a organização lamelar. Objetivas de 10X e 40X.

Figura 18. Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo sem EOA aos 14,5 anos de idade: A) Radiografia periapical obtida no dia da exposição cirúrgica mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas de tecido ósseo corado pela HE:** B) Aspecto panorâmico do fragmento da biópsia ($\approx 3 \times 4 \text{ mm}^2$). Objetiva de 4X. C-D) Detalhe dos fragmentos formado por tecido ósseo maduro de arranjo lamelar cujos osteócitos (área circundada em azul) acompanham o sentido das lamelas. Observar na superfície óssea os osteoblastos (área circundada em verde). Objetivas de 10X e 40X. E-F) Outro detalhe mostrando tecido ósseo mais desorganizado com lacunas de osteócitos (área circundada em azul) dispersos aleatoriamente na matriz óssea, linhas de reversão (cabeça de seta azul) e os canais nutritivos (cabeça de seta amarela). Objetivas de 10X e 40X.

Figura 19. Paciente do gênero feminino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo sem EOA com rhBMP-2 aos 16 anos de idade: A) Radiografia periapical obtida no dia da exposição cirúrgica mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas do tecido ósseo corado pela HE:** B) Aspecto panorâmico dos fragmentos da biópsia (um fragmento de $\cong 1,5 \times 0,5 \text{ mm}^2$ e outros fragmentos $< 0,5 \text{ mm}^2$). Objetiva de 4X. C-D). Detalhes do fragmento formado por uma mistura de tecido ósseo maduro de arranjo lamelar (seta preta) e osso imaturo mais desorganizado (TOI) contendo várias lacunas de osteócitos próximas (área circundada em azul). Objetivas de 10X e 40X. E-F) Outro detalhe do fragmento formado por denso tecido ósseo de arranjo lamelar com as lacunas de osteócitos (área circundada em azul) acompanhando as o sentido das lamelas e as linhas de reversão (cabeça de seta azul). Objetivas de 10X e 40X.

Figura 20. Paciente do gênero masculino, com fissura labiopalatina completa do lado esquerdo que recebeu EOA obtido da crista ilíaca aos 12,6 anos de idade: A-B) Rdiografias periapicais obtidas no dia do EOA (A) e **11,9 anos** após a enxertia (B) mostrando a retenção do canino permanente e a área de remoção da biópsia (área contornada em vermelho). **Imagens histológicas do tecido ósseo corado pela HE:** C) Aspecto panorâmico do pequeno fragmento da biópsia ($\cong 0,5\text{mm}^2$). Objetiva de 4X. C-D) Detalhe do fragmento formado por tecido ósseo maduro de arranjo lamelar contendo linhas de reversão (cabeça de seta azul). Objetivas de 10X e 40X.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O enxerto ósseo alveolar antes da irrupção do canino permanente consiste em um simplificador na reabilitação dos pacientes com fissura labiopalatina. No presente estudo, a adaptação anatômica e funcional observada na área enxertada com rhBMP-2 permitiu a restauração do arco alveolar e dentário. Foram analisados microscopicamente os fragmentos de tecido ósseo biopsiados da região da fissura alveolar enxertada com rhBMP-2, 6 a 46 meses após o enxerto alveolar secundário. A biópsia tecidual ocorreu na ocasião da cirurgia oral para acesso cirúrgico e tracionamento de caninos retidos na área da fissura. Esse pressuposto justifica o reduzido número amostral do estudo, visto que a prevalência de retenção dos caninos correspondeu a aproximadamente 8%. Os escassos estudos histológicos em humanos existentes sobre a rhBMP-2 utilizaram número amostral semelhante ou inferior (Francis et al., 2013; Freitas et al., 2016). No nosso estudo, de 336 pacientes avaliados houve só um caso do lado sem fissura, revelando a dificuldade de obtenção de material para compor o grupo controle. Outra limitação do presente estudo relacionou-se à quantidade dos fragmentos dos tecidos mole e ósseo removidos que foi bastante reduzida, com obtenção insuficiente para análise histológica. Distarte, dos 13 casos selecionados, uma biópsia de tecido ósseo e 10 biópsias de tecido mole não obtiveram material suficiente para leitura microscópica.

No presente estudo, as análises histológicas das amostras de tecido mole e ósseo coletadas na área da fissura enxertada com rhBMP-2 foram compatíveis com o padrão morfológico de normalidade descrito por Ten Cate (2013). Corroborando com este fato, no grupo controle, os achados histológicos da biópsia obtida na região do canino retido da paciente gênero feminino aos 13,1 anos de idade, apresentaram inúmeras e pequenas áreas de formação óssea de arranjo lamelar circunscrevendo novos canais nutritivos e o espaço entre as formações lamelares ocupadas por tecido ósseo mais imaturo contendo grandes lacunas de osteócitos similares ao observado no paciente do mesmo sexo com 9 meses de EOA com rhBMP-2 e 12,4 anos de idade na época da biópsia (compare as Figs 17C-D do controle com as Figs.7C-D do experimental). O outro fragmento era formado por tecido ósseo mais organizado de arranjo lamelar contendo pequenos canais

nutritivos e lacunas de osteócitos acompanhando a organização lamelar, similar ao observado no paciente do gênero masculino com 6 meses de EOA com rhBMP-2 e 12,4 anos de idade na época da biópsia (compare as Figs 17E-F do controle com as Figs. 6 C-E do experimental). As biópsias obtidas do paciente masculino com 14,4 anos e do paciente com 16 anos foram compostas por um denso bloco de tecido ósseo maduro de arranjo lamelar cujos osteócitos acompanham o sentido das lamelas, linhas de reversão e canais nutritivos. O quadro histológico destas biópsias mostrou-se similar ao obtido para o paciente com 24 meses de EOA com rhBMP-2 e aos 12,2 anos de idade na época da biópsia (compare as FIG18C-F e 19C-G do controle com as Figs. 14D-G do experimental).

Os achados histológicos do presente estudo na única biópsia de EOA autógeno obtida do paciente gênero masculino aos 24,5 anos de idade, e com o enxerto alveolar realizado aos 12,6 anos de idade, demonstrou um pequeno bloco de tecido ósseo maduro de arranjo lamelar similar ao observado no paciente do gênero masculino com 26 meses de EOA com rhBMP-2 e 14,1 anos de idade na época da biópsia (compare as Figs 20D-E do controle com as Figs. 15 C-G do experimental) e no paciente do gênero masculino com 46 meses de EOA com rhBMP-2 e 16,5 anos de idade na época da biópsia (compare as Figs 20D-E do controle com as Figs. 16 D-G do experimental). Estas características histológicas evidenciaram tecido ósseo viável celularizado e vascularizado incorporado na região enxertada tanto com a rhBMP-2 ou com o osso autógeno da crista ilíaca, corroborando com os achados histológicos encontrados na literatura (Boyne,1974; Freitas et al., 2016).

Não foram encontrados outros estudos histológicos na região da fissura enxertada com rhBMP-2 em humanos, com exceção de relato de um caso clínico (Francis et al., 2013). Por outro lado, as avaliações histológicas dos fragmentos ósseos retirados das áreas de enxertia com BMP-2 em fissuras criadas em modelos animais (Sawada et al., 2009; Aghaloo et al., 2010; Deng et al., 2015; Mostafa et al., 2015) revelaram tecido ósseo trabecular imaturo contendo várias lacunas de osteócitos, presença de osteoblastos na superfície, de permeio a um tecido conjuntivo fibroso e vascularizado, com discretos focos de infiltrado inflamatório mononuclear. Nossos achados histológicos referentes aos cortes microscópicos do período de 6 a 12 meses após a cirurgia de enxerto ósseo com rhBMP-2 em

indivíduos com fissuras labiopalatinas corroboram com os estudos anteriores em animais (Sawada et al., 2009; Aghaloo et al., 2010; Deng et al., 2015; Mostafa et al., 2015). Adicionalmente Freitas et al (2016) obtiveram resultados semelhantes em fragmentos removidos do rebordo alveolar desdentado e enxertado com rhBMP-2 previamente à cirurgia do implante dentário. Os cortes microscópicos dos fragmentos ósseos retirados 6 meses após o enxerto com rhBMP-2 revelaram tecido ósseo vascularizado e celularizado compondo um trabeculado de osso imaturo. Notaram também tecido conjuntivo denso periférico sem evidência de inflamação. Os cortes microscópicos do presente estudo após pelo menos 24 meses de enxertia com rhBMP-2, apresentaram características histológicas similares as relatadas por Francis et al (2013) presentes em cortes obtidos da biópsia de um paciente com fissura labiopalatina, após 42 meses de enxerto ósseo secundário com rhBMP-2, evidenciando tecido ósseo maduro de arranjo lamelar com lacunas de osteócitos dispersas na matriz óssea preenchido por tecido conjuntivo fibroso.

Clinicamente, o uso da rhBMP-2 na sua forma comercial *Infuse* e *AMPLIFY™*, tem sido vastamente discutido na literatura. DeVine et al (2012) salientaram que os analistas da FDA alertam sobre o uso clínico da rhBMP-2 com dose total de 40 mg (forma comercial *AMPLIFY™*), pois a alta concentração desta proteína pode proporcionar sucesso na promoção da formação óssea como também efeitos adversos a longo prazo. O banco de dados do *FDA's Manufacturer and User Facility Device Experience* evidenciou que dos doze relatos de ossificação ectópica após o uso em cirurgias ortopédicas do rhBMP-2 *AMPLIFY™*, cinco declararam que os pacientes necessitaram de nova cirurgia para remoção do osso extra (Woo, 2013). No presente estudo, os achados histológicos dos fragmentos ósseos retirados das áreas de enxertia com o uso da rhBMP-2 na sua forma comercial *Infuse*® com dose total de 4,2 mg, revelaram tecido ósseo viável sem ossificação ectópica, ausência de estrutura óssea pobre e/ou reabsorção óssea. Nenhum paciente da amostra demonstrou ossificação atípica ou excesso de volume tecidual na área do rebordo alveolar enxertado. Quanto ao risco de câncer, DeVine et al (2012), numa revisão sistemática, ao comparar os estudos que avaliaram o uso do rhBMP-2 *Infuse*® com o enxerto ósseo autógeno demonstraram que o surgimento de neoplasias malignas nestes pacientes foi similar em ambos os grupos, 0,7%

após 24 meses de acompanhamento. Entretanto, segundo ainda os dados do FDA, os estudos demonstraram 3,8% de risco de câncer ao fazer uso do rhBMP-2 *AMPLIFY™* comparados com 0,9% do grupo controle (enxerto autógeno) em 24 meses de acompanhamento e 6,3% comparados com 2,2% em 60 meses de acompanhamento (DeVine et al., 2012). Estes dados apontaram para uma associação do uso de alta dosagem da rhBMP-2 com o aumento do surgimento de novas patologias potencialmente malignas (Carragee et al, 2013). Neste estudo, os achados histológicos dos fragmentos mole e ósseo removidos das áreas de enxerto com rhBMP-2 *Infuse®* e crista ilíaca não evidenciaram características histopatológicas de malignidade no período de 6 a 46 meses da realização da cirurgia.

No presente estudo, os cortes microscópicos dos grupos experimental e controle corados pela hematoxilina e eosina revelaram fragmentos de tecido mole bucal constituído por epitélio pavimentoso, estratificado e paraqueratinizado e tecido conjuntivo subjacente densamente colagenizado com vasos sanguíneos, ambos compatíveis morfológicamente com a normalidade. A literatura não referencia estudos sobre a análise histológica do tecido mole adjacente ao enxerto com rhBMP-2. Entretanto, neste presente estudo, os achados histológicos revelaram tecido mole compatível com o padrão de normalidade agregado ao tecido ósseo viável que preencheu a fissura alveolar residual após a enxertia com rhBMP-2 com incorporação também ao tecido ósseo adjacente. Não foram observadas atipias epiteliais nos cortes microscópicos dos fragmentos de tecido mole que poderiam a depender da intensidade da displasia epitelial conferir potencial de malignidade com base nos critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (Gale et al., 2005).

A influência tecidual do uso da rhBMP-2 necessita de estudos futuros a longo prazo. Futuras pesquisas sobre os efeitos locais e sistêmicos após o uso da rhBMP-2 devem ser realizadas com tempo de acompanhamento superior a 5 anos. Pacientes com necessidade de cirurgia ortognática ao final do crescimento poderiam ser biopsiados na intersecção entre a área enxertada e a osteotomia de Le Fort I para avanço maxilar.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O aspecto histológico do tecido ósseo e tecido mole na área da fissura enxertada com rhBMP-2, após um período de reparo de 6 a 46 meses, foi compatível com a normalidade. As características histológicas do tecido ósseo biopsiado após enxerto com rhBMP-2 assemelharam-se com as características teciduais do grupo controle.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aghaloo T, Cowan CM, Zhang X, Freymiller E, Soo C, Wu B, Ting K, Zang Z. NELL1 and bone morphogenetic protein-2 on calvarian bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 68(2):1-15.

Allareddy V. Use of human recombinant bone morphogenetic protein is associated with increased hospital charges in children with cleft lip and palate having bone graft procedures. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;1-8.

Alonso N, Tanikawa, Freitas RS, Canan L, Ozawa TO, Rocha DL. Evaluation of maxillary alveolar reconstruction using a resorbable collagen sponge with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cleft lip and palate patients. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(5):1183-9.

Boyne PJ. Use of marrow-cancellous bone grafts in maxillary alveolar and palatal clefts. *J Dent Res*. 1974;53(4):821-824.

Carragee EJ, Hurwitz EI, Weiner BK. A critical review of bone morphogenetic protein-2 in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *The spine Journal*. 2011;11:471-491.

Carragee EJ; Chu G, Rohatgi R, Hurwitz EI, Weiner BK, Yoon ST, Comer G, Kopjar B. Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am*. 2013; 95:1537-45.

Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik, E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges and future perspectives. 2014; 93(4):335-345.

Chappuis V, Gamer L, Cox K, Lowery JW, Bosshardt DD, Rosen V. Periosteal BMP2 activity drives bone graft healing. *Bone*. 2012; 51:800-809.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004;22(4):233-241.

Deng M, Liu P, Xiao H, Zhang Y, Wang Y, Zhao J, Xu J. Improving the osteogenic efficacy of BMP2 with mechano growth factor by regulating the signaling events in BMP pathway. *Cell Tissue Res*. 2015;361:723-731.

DeVine JG, Dettori JR, France JC, Brodt E, McGuire RA. The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk? *Evidence Based Spine Care Journal*. 2012; 3(2):35-41.

Dickinson BP, Ashley RK, Wasson, KL, O'hara C, Gabbay J, Heller JB, Bradley JP. Reduced morbidity and improved healing with bone morphogenetic protein-2 in older patients with alveolar clefts defects. *Plast. Reconstr. Surg*. 2008; 121:209-217.

Enemark H, Jensen J, Bosch C. Mandibular bone graft material for reconstruction of alveolar cleft defects: Long-term results. *Cleft Palate- Craniofacial Journal*. 2001; 38(2):155-163.

Food and Drug Administration. Food and Drug Administration Executive summary for P050036 Medtronic's *AMPLIFY™* rhBMP-2 Matrix Orthopaedic and rehabilitation devices advisory panel, 2010. Avaliado: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/MedicalDevices/MedicalDevicesAdvisoryCommittee/OrthopaedicandRehabilitationDevicesPanel/UCM220079.pdf>. Acessado em 25 de julho de 2015.

Francis CS, Mobin SSN, Lypka MA, Rommer E, Yen S, Urata MM, et al. RhBMP-2 with a desmineralized bone matrix scaffold versus autologous iliac crest bone graft for alveolar cleft reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2013; 131(5):1107-15.

Freitas RM, Susin C, Tamashiro WMSC, Chaves de Souza JA, Marcantonio c, Wikesjo UM, Pereira LAVD, Marcantonio E Jr, Histological analysis and gene expression profile following augmentation of the anterior maxilla using rhBMP-2/ACS versus autogenous bone graft. *Journal of Clinical Periodontology*. 2016.

Gale, N. et al. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics: head and neck tumours*. Lyon: IARC Press. 2005.

Herford AS, Boyne PJ, Rawson R, Williams RP. Bone morphogenetic protein-induced repair of the premaxillary cleft. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:2136-41.

Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 66:616-624.

Herford AS, Dean JS. Complications in bone grafting. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am*. 2011; 23:433-42.

Janssen NG, Weijs WL, Koole R, Rosenberg AJ, Meijer GJ. Tissue engineering strategies for alveolar cleft reconstruction: a systematic review of the literature. *Clin Oral Invest.* 2014;18(1):219-26.

Krishnan L, Priddy LB, Esancy C, Li MTA, Stevens HY, Jiung X, Tran L, Rowe DW, Guidberg RE. Hydrogel-based delivery of rhBMP-2 improves healing of large bone defects compared with autograft. *Clin Orthop Relat Res.* 2015; 473: 2885-2896.

Lu H, Liu Y, Guo J, Wo H, Wang J, Wu G. Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects. *Int J Mol Sci.* 2016;17(334):1-18.

Massagué J. Signalling TGFB in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(10): 616-630.

Meyer S, Molsted K. Long-term outcome of secondary alveolar bone grafting in cleft lip and palate patients: A 10-year follow-up cohort study. *J Plast Surg Hand Surg.* 2013; 47(6):503-8.

Misch CE, Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent.* 1993; 2:158-67.

Mostafa NZ, Talwar R, Shahin M, Unsworth LD, Major PW, Doschak M. Cleft Palate reconstruction using collagen and nanofiber scaffold incorporating bone morphogenetic protein rats. *Tissue Engineering Part A.* 2015; 21(1-2): 85-95.

Neovius E, Lamberger M, Ducherty Skogh AC, Hiilborn J, Engstrand T. Alveolar bone healing accompanied by severe swelling in cleft children treated with bone morphogenetic protein-2 delivered by hydrogel. *Journal of Plastic Reconstructive & Aesthetic Surgery.* 2013; 66:37-42.

Ritting AW, Weber EW, Lee MC. Exaggeated inflammatory response and bony resorption from BMP-2 use in a pediatric forearmnonunion. *J Hand Surg Am.* 2012, 37316-32.

Sawada Y, Hokugo A, Nishiura A, Hokugo R, Matsumoto N, Morita S, Tabata Y. A trial of alveolar cleft bone regeneration by controlled release of bone morphogenetic protein: an experimental study in rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(6):812-820.

Seifeldin SA. Is alveolar cleft reconstruction still controversial? (Review of literature). *The Saudi Dental Journal.* 2016;28:3-11.

Sharma S, Rao D, Majumder K, Jain H. Secondary alveolar bone grafting: radiographic and clinical evaluation. *Annals of Maxillofac Surg.* 2013;2(1):41-44.

Simmonds MC, Brown JVE, Heirs MK, Higgins JPT, Mannion RJ, Rodgers MA, Stewart LA. Safety and effectiveness of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for spinal fusion. *Ann of Intern Med.* 2013; 158:877-889.

Szpaiski C, Sagebin F, Barbaro M, Warren SM. The influence of environmental factors on bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.* 2013;101B:663-675.

Ten Cate. *Histologia Oral.* 8ª edição, 2013, 278-281.

Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet.* 2006;38:1424-1429.

United States Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Center for Devices and Radiological Health. Infuse bone Graft/LT-CAGE? Lumbar tapered fusion Devices-P00058.2002. Avaliado: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cftopic/pma.cfm?num5P000058>. Acessado em 25 de julho de 2015.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150:893-899.

Woo EJ. Adverse events reported after the use of recombinant bone morphogenetic protein 2. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70:765-769.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988;242:1528-1534.

APÊNDICES

APÊNDICES

Tabela 1. Descrição da população do estudo

No	TIPO FISSURA	EOA BMP2	GÊNERO	IDADE (ANOS)	Comportamento Irruptivo 13 e 23 em 2013	Comportamento Irruptivo 13 e 23 2014 a 2016
1	FPFUEC	03/2011	M	11	13 IR/ 23 IC	13IR 23IRTRAC
2	FTUE	03/2011	M	09	13 e 23 em IR	13 IR e 23 IC
3	FTUD	03/2011	M	10	SEM RX	SEM RX
4	FTUE	03/2011	F	11	SEM RX	SEM RX
5	FPFUEC	03/2011	M	09	13 e 23 PIR	13 e 23 IRs
6	FTUD	03/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
7	FPFUEC	03/2011	F	10	RX 2011	SEM RX
8	FTUE	03/2011	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
9	FPFUDC	03/2011	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
10	FTUE	03/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
11	FTUE	03/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
12	FPFUEC	04/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
13	FTUE	04/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
14	FPFUEC	04/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
15	FTUE	04/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
16	FTUE	04/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
17	FPFUEC	04/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
18	FPFUEC	04/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
19	FTUE	05/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
20	FTUE	05/2011	F	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
21	FTUE	05/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
22	FPFUDC	05/2011	F	11	13 IC e 23 IR	13 e 23 IRs
23	FPFUDC	05/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
24	FTUE	05/2011	F	10	13 IC e 23 IR	SEM RX
25	FTUE	05/2011	M	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
26	FPFUEC	05/2011	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
27	FPFUDC	05/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
28	FTUD	05/2011	M	11	13IC e 23 em IR	13IRTRAC 23IR
29	FTUD	06/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
30	FTUD	06/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
31	FTUD	06/2011	F	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
32	FPFUEC	06/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
33	FTUD	06/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
34	FPFUEC	06/2011	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
35	FTUE	06/2011	F	11	13 IR e 23 IC	13 IR e 23 IC
36	FPFUEC	07/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
37	FTUE	07/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
38	FPFUEC	07/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
39	FTUE	07/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
40	FTUD	07/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
41	FTUE	07/2011	M	09	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
42	FTUE	07/2011	F	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs

No	TIPO FISSURA	EOA BMP2	GÊNERO	IDADE (ANOS)	Comportamento Irruptivo 13 e 23 em 2013	Comportamento Irruptivo 13 e 23 2014 á 2016
43	FTUE	07/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
44	PPFUEC	07/2011	M	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
45	FTUD	07/2011	M	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
46	PPFUDC	07/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
47	FTUE	07/2011	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
48	FTUE	07/2011	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
49	FTUE	07/2011	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
50	FTUE	08/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
51	PPFUEC	08/2011	M	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
52	FTUE	08/2011	M	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
53	PPFUEC	09/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
54	FTUD	09/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
55	FTUE	09/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
56	FTUE	09/2011	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
57	PPFUEC	09/2011	F	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
58	FTUE	09/2011	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
59	PPFUEC	09/2011	M	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
60	PPFUEC	10/2011	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
61	PPFUDC	10/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
62	FTUE	10/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
63	PPFUDC	10/2011	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
64	FTUD	10/2011	M	10	13 IC e 23 IR	13IRTRAC 23IR
65	FTUD	11/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
66	FTUE	11/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
67	FTUE	11/2011	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
68	FTUD	11/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
69	FTUE	11/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
70	FTUE	11/2011	M	11	13 IR e 23 IC	13IR 23IRTRAC
71	FTUE	11/2011	F	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
72	PPFUEC	11/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
73	FTUE	11/2011	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
74	FTUD	12/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
75	FTUE	12/2011	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
76	PPFUDC	12/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
77	FTUE	12/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
78	FTUE	12/2011	M	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
79	PPFUDC	12/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
80	FTUE	12/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
81	PPFUDC	12/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
82	FTUD	12/2011	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
83	PPFUEC	12/2011	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
84	FTUE	02/2012	F	09	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
85	FTUE	02/2012	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
86	PPFUEC	03/2012	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs

No	TIPO FISSURA	EOA BMP2	GÊNERO	IDADE (ANOS)	Comportamento Irruptivo 13 e 23 em 2013	Comportamento Irruptivo 13 e 23 2014 á 2016
87	FTUD	03/2012	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
88	FTUD	03/2012	M	11	13 IC e 23 IR	SEM RX
89	FPFUEC	03/2012	F	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
90	FPFUEC	03/2012	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
91	FTUE	03/2012	F	10	13 IR e 23 IC	13 IR e 23 IC
92	FTUD	03/2012	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
93	FTUE	03/2012	F	10	13 e 23 em IR	SEM RX
94	FTUE	03/2012	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
95	FPFUEC	03/2012	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
96	FPFUEC	03/2012	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
97	FPFUEC	03/2012	M	09	SEM RX	SEM RX
98	FTUE	03/2012	F	09	13 e 23 em IR	13 IR e 23 IC
99	FPFUEC	03/2012	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
100	FPFUEC	04/2012	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
101	FTUE	04/2012	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
102	FTUE	04/2012	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
103	FPFUDC	04/2012	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
104	FTUE	04/2012	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
105	FTUE	04/2012	M	11	13IR e 23 em IR	SEM RX
106	FTUD	04/2012	F	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
107	FPFUDC	04/2012	F	10	13 e 23 em IR	SEM RX
108	FTUD	04/2012	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
109	FTUE	04/2012	F	10	13IR e 23 em IR	SEM RX
110	FTUD	04/2012	M	09	13 em IR e 23IR	13 e 23 IRs
111	FPFUDC	05/2012	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
112	FPFUDC	05/2012	M	09	13 em IR e 23IR	13 e 23 IRs
113	FTUE	05/2012	F	09	13 em IR e 23IR	13 e 23 IRs
114	FTUE	05/2012	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
115	FPFUEC	05/2012	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
116	FTUE	05/2012	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
117	FTUE	05/2012	M	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
118	FTUE	06/2012	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
119	FTUE	06/2012	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
120	FPFUEC	06/2012	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
121	FTUE	06/2012	F	10	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
122	FTUE	06/2012	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
123	FTUD	06/2012	M	10	13 em IR e 23IR	SEM RX
124	FPFUEC	06/2012	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
125	FTUD	06/2012	M	09	13 e 23 em IR	13 em IR e 23IC
126	FTUD	06/2012	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
127	FTUE	07/2012	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
128	FPFUEC	07/2012	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
129	FPFUEC	07/2012	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
130	FTUD	07/2012	F	11	13IC e 23 em IR	13IRTRA 23 IR

No	TIPO FISSURA	EOA BMP2	GÊNERO	IDADE (ANOS)	Comportamento Irruptivo 13 e 23 em 2013	Comportamento Irruptivo 13 e 23 2014 a 2016
131	FPFUEC	07/2012	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
132	FTUE	07/2012	M	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
133	FTUE	07/2012	M	10	13 IR e 23 IC	13IR 23IRTRAC
134	FTUD	07/2012	M	11	13 em IR e 23IR	SEM RX
135	FTUD	07/2012	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
136	FTUD	07/2012	F	12	13IC e 23 IR	13IRTRAC 23IR
137	FTUE	08/2012	M	11	SEM RX	SEM RX
138	FTUE	08/2012	M	09	13 em IR e 23IC	13IR 23IRTRAC
139	FTUE	08/2012	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
140	FTUE	08/2012	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
141	FPFUDC	08/2012	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
142	FTUD	08/2012	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
143	FPFUEC	08/2012	F	11	13 e 23 IRs	SEM RX
144	FTUE	08/2012	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
145	FTUE	08/2012	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
146	FTUE	08/2012	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
147	FPFUEC	09/2012	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
148	FTUE	09/2012	M	10	13 e 23 IRs	SEM RX
149	FTUE	09/2012	M	10	13 em IR e 23IC	13 IR e 23 IC
150	FTUE	09/2012	F	10	SEM RX	SEM RX
151	FPFUDC	09/2012	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
152	FPFUEC	09/2012	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
153	FPFUEC	09/2012	F	09	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
154	FPFUDC	09/2012	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
155	FPFUEC	09/2012	F	10	13 e 23 IRs	SEM RX
156	FTUE	09/2012	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
157	FPFUEC	09/2012	M	11	13 IR e 23 IC	13IR 23IRTRAC
158	FTUE	09/2012	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
159	FTUD	09/2012	F	10	13 em IR e 23IR	13 e 23 IRs
160	FPFUDC	09/2012	F	11	13 e 23 IRs	13e 23 IRs
161	FPFUDC	09/2012	F	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
162	FTUE	10/2012	F	10	13 em IR e 23IC	13IR 23IRTRAC
163	FTUE	10/2012	M	10	13 e 23 em IR	13 IR e 23 em IR
164	FTUE	11/2012	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
165	FTUE	11/2012	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
166	FTUE	11/2012	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
167	FTUE	11/2012	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
168	FPFUEC	11/2012	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
169	FTUE	11/2012	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
170	FPFUDC	11/2012	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
171	FTUE	11/2012	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
172	FPFUEC	11/2012	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
173	FPFUEC	11/2012	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
174	FPFUDC	11/2012	M	11	13 em IR e 23IR	13 e 23 IRs

No	TIPO FISSURA	EOA BMP2	GÊNERO	IDADE (ANOS)	Comportamento Irruptivo 13 e 23 em 2013	Comportamento Irruptivo 13 e 23 2014 a 2016
175	FPFUEC	11/2012	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
176	FPFUEC	11/2012	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
177	FTUE	11/2012	M	11	13 IR e 23 IC	13IR e 23TRAC
178	FPFUEC	11/2012	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
179	FTUD	12/2012	M	11	13 IC e 23 IR	13IRTRA 23IR
180	FTUE	12/2012	F	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
181	FTUD	12/2012	F	11	13IC e 23 em IR	13 IC e 23 IR
182	FTUE	12/2012	M	11	13 em IR e 23IC	13IR 23IRTRAC
183	FTUD	12/2012	F	11	13 em IR e 23IR	13 e 23 IRs
184	FPFUDC	12/2012	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
185	FTUE	12/2012	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
186	FTUE	12/2012	F	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
187	FPFUEC	12/2012	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
188	FTUD	12/2012	M	11	13 IC e 23 IR	13IRTRAC 23IR
189	FTUE	12/2012	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
190	FPFUEC	01/2013	F	11	13IR e 23IC	13IR e 23IC
191	FPFUEC	01/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
192	FTUD	01/2013	M	09	13 em IR e 23IR	SEM RX
193	FPFUEC	01/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
194	FPFUDC	01/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
195	FTUE	01/2013	F	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
196	FTUE	01/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
197	FPFUDC	01/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
198	FTUE	01/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
199	FPFUEC	01/2013	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
200	FTUE	01/2013	F	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
201	FTUE	01/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
202	FPFUEC	01/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
203	FPFUEC	01/2013	F	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
204	FTUD	01/2013	M	11	13 em IR e 23IR	13 e 23 IRs
205	FTUE	01/2013	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
206	FPFUEC	01/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
207	FPFUEC	01/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
208	FPFUEC	01/2013	M	11	13IR e 23 em IR	SEM RX
209	FPFUEC	01/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
210	FTUE	01/2013	F	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
211	FPFUEC	01/2013	F	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
212	FTUE	01/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
213	FPFUEC	01/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
214	FTUE	01/2013	F	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
215	FTUE	01/2013	F	10	13 IR e 23IC	13 IR e 23IC
216	FTUE	01/2013	F	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
217	FTUE	01/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
218	FTUE	01/2013	F	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs

No	TIPO FISSURA	EOA BMP2	GÊNERO	IDADE (ANOS)	Comportamento Irruptivo 13 e 23 em 2014	Comportamento Irruptivo 13 e 23 2015/2016
219	FPFUEC	02/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
220	FTUE	02/2013	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
221	FPFUEC	02/2013	M	10	13IR e 23 em IR	SEM RX
222	FPFUEC	02/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
223	FTUD	02/2013	F	11	13 e 23 em IR	SEM RX
224	FTUD	02/2013	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
225	FTUE	02/2013	F	1	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
226	FTUE	02/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
227	FTUE	02/2013	F	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
228	FPFUDC	02/2013	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
229	FTUD	02/2013	F	11	13IC e 23 em IR	13IC e 23 em IR
230	FTUE	02/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
231	FPFUEC	02/2013	M	10	13IR e 23 em IR	SEM RX
232	FTUD	02/2013	F	10	13 e 23 em IR	SEM RX
233	FPFUE	02/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
234	FPFUEC	02/2013	F	09	13 e 23 em IR	13 em IR e 23IR
235	FTUD	02/2013	F	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
236	FTUD	02/2013	F	09	13 e 23 em IR	SEM RX
237	FTUD	02/2013	M	10	13 em IR e 23IR	13 em IR e 23IR
238	FTUE	02/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
239	FPFUDC	02/2013	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
240	FPFUEC	02/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
241	FTUE	02/2013	M	10	13IR e 23 em IR	SEM RX
242	FPFUEC	02/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 em IR e 23IR
243	FTUE	02/2013	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
244	FTUE	02/2013	M	10	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
245	FTUD	02/2013	M	10	13 em IR e 23IR	13 e 23 IRs
246	FTUD	02/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 em IR e 23IR
247	FTUE	02/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
248	FTUD	02/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
249	FTUE	02/2013	M	10	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
250	FTUD	02/2013	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
251	FTUD	02/2013	M	10	13 em IR e 23IR	SEM RX
252	FTUD	02/2013	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
253	FPFUEC	02/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
254	FPFUDC	02/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
255	FTUE	02/2013	F	09	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
256	FTUD	03/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 em IR e 23IR
257	FTUE	03/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
258	FTUD	03/2013	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
259	FPFUEC	03/2013	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
260	FPFUEC	03/2013	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
261	FPFUEC	03/2013	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
262	FTUE	03/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs

No	TIPO FISSURA	EOA BMP2	GÊNERO	IDADE (ANOS)	Comportamento Irruptivo 13 e 23 em 2014	Comportamento Irruptivo 13 e 23 2015/2016
263	FTUE	03/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
264	FTUE	03/2013	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
265	FTUE	03/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
266	FPFUEC	03/2013	F	11	Sem RX	SEM RX
267	FTUE	03/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
268	FTUE	03/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
269	FTUE	03/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
270	FTUD	03/2013	M	11	13 em IR e 23IR	13 e 23 IRs
270	FTUE	03/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
271	FTUD	03/2013	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
272	FTUD	03/2013	M	10	13 em IR e 23IR	SEM RX
273	FPFUDC	03/2013	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
274	FPFUEC	03/2013	F	10	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
275	FTUE	03/2013	M	10	13IR e 23 em IR	13IR e 23 em IR
276	FTUD	03/2013	M	10	13 em IR e 23IR	13 em IR e 23IR
277	FTUE	03/2013	M	11	13 e 23 IRs	SEM RX
278	FTUE	03/2013	M	09	13 e 23 em IR	13IR e 23 em IR
279	FTUD	03/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
280	FTUD	03/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
281	FTUE	03/2013	M	10	13IR e 23 em IR	SEM RX
282	FTUE	03/2013	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
283	FTUE	03/2013	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
284	FTUE	03/2013	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
285	FTUD	03/2013	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
286	FPFUDC	04/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
287	FTUD	04/2013	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
288	FTUE	04/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
289	FTUE	04/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
290	FTUE	04/2013	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
291	FTUE	04/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
292	FTUD	04/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
293	FTUE	04/2013	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
294	FPFUDC	04/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
295	FTUD	04/2013	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
296	FTUE	05/2013	M	11	13 e 23 IRs	SEM RX
297	FTUE	05/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
298	FTUD	05/2013	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
299	FTUE	05/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
300	FTUE	05/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
301	FPFUDC	05/2013	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
302	FTUD	05/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
303	FTUD	05/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
304	FTUE	05/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
305	FTUE	05/2013	M	10	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs

No	TIPO FISSURA	EOA BMP2	GÊNERO	IDADE (ANOS)	Comportamento Irruptivo 13 e 23 em 2014	Comportamento Irruptivo 13 e 23 2015/2016
306	FTUD	05/2013	M	09	13 em IR e 23IR	13 e 23 IRs
307	FTUD	05/2013	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
308	FTUE	06/2013	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
309	FPFUEC	06/2013	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
310	FTUE	06/2013	F	10	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
311	FTUE	06/2013	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
312	FTUE	06/2013	F	11	SEM RX	SEM RX
313	FTUE	06/2013	M	10	13IR e 23 em IR	SEM RX
314	FTUE	06/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
315	FTUE	06/2013	F	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
316	FTUD	06/2013	M	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
317	FTUD	06/2013	M	10	13 e 23 IRs	SEM RX
318	FTUD	06/2013	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
319	FPFUEC	06/2013	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
320	FTUE	06/2013	M	10	13IR e 23 em IR	SEM RX
321	FTUE	06/2013	F	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
322	FTUE	07/2013	M	10	13IR e 23 em IR	SEM RX
323	FPFUDC	07/2013	F	10	13 e 23 em IR	SEM RX
324	FTUD	07/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
325	FTUD	07/2013	M	09	13 em IR e 23IR	13 e 23 IRs
326	FPFUEC	07/2013	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
327	FTUE	07/2013	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
328	FTUE	07/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
329	FTUD	07/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
330	FTUE	07/2013	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
331	FPFUEC	07/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
332	FTUE	07/2013	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
333	FTUE	07/2013	F	11	13 e 23 IRs	SEM RX
334	FTUD	07/2013	M	10	13IC E 23 IR	13IC e 23IR
335	FTUE	07/2013	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
336	FTUE	07/2013	M	10	13 e 23 em IR	13IR 23 emIRs
337	FTUD	07/2013	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
338	FTUE	07/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
339	FTUE	07/2013	M	10	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
340	FTUE	08/2013	M	10	13em IR e 23 IC	13IR23IRTRAC
341	FTUE	08/2013	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
342	FTUE	08/2013	M	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
343	FTUD	08/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
344	FTUE	08/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
345	FTUE	08/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
346	FTUD	08/2013	F	09	13 e 23 em IR	SEM RX
347	FPFUDC	08/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
348	FTUD	09/2013	F	10	13IC 23 em IR	13IRTRAC 23IR
349	FTUE	09/2013	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX

No	TIPO FISSURA	EOA BMP2	GÊNERO	IDADE (ANOS)	Comportamento Irruptivo 13 e 23 EM 2014	Comportamento Irruptivo 13 e 23 EM 2015
350	FTUD	09/2013	F	09	13 e 23 em IR	13 em IR e 23IR
351	FTUE	09/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
352	FTUE	09/2013	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
353	FTUE	09/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
354	FTUE	09/2013	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
355	FPFUEC	09/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
356	FTUD	09/2013	M	11	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
357	FTUD	09/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
358	FTUE	09/2013	M	10	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
359	FTUE	09/2013	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
360	FTUE	10/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
361	FTUE	10/2013	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
362	FTUD	10/2013	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
363	FTUE	10/2013	M	09	13 e 23 em IR	13IR e 23 em IR
364	FTUE	10/2013	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
365	FTUE	10/2013	F	09	13 IR e 23 IC	13IR 23IRTRAC
366	FTUE	10/2013	M	10	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
367	FTUD	10/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
368	FTUD	10/2013	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
369	FTUE	10/2013	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
370	FTUD	11/2013	M	11	SEM RX	SEM RX
371	FTUD	11/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 IC e 23 IR
372	FTUE	11/2013	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
373	FTUE	11/2013	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
374	FTUD	11/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
375	FTUE	11/2013	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
376	FTUD	11/2013	M	11	13 em IR e 23IR	SEM RX
377	FTUE	11/2013	M	09	13 e 23 em IR	13 em IR e 23IR
378	FTUE	11/2013	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
379	FTUE	11/2013	F	10	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
380	FTUE	11/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
381	FTUE	11/2013	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
382	FTUE	11/2013	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
383	FTUE	01/2014	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
384	FPFUDC	01/2014	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
385	FTUE	01/2014	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
386	FPFUEC	01/2014	M	10	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
387	FPFUDC	01/2014	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
388	FPFUDC	01/2014	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
389	FPFUEC	01/2014	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
390	FTUE	02/2014	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
391	FPFUDC	02/2014	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
392	FTUE	02/2014	M	09	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
393	FTUE	02/2014	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs

No	TIPO FISSURA	EOA BMP2	GÊNERO	IDADE (ANOS)	Comportamento Irruptivo 13 e 23 EM 2015	Comportamento Irruptivo 13 e 23 EM 2016
394	FTUE	02/2014	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
395	FTUE	02/2014	F	10	SEM RX	SEM RX
396	FTUE	02/2014	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
397	FTUE	02/2014	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
398	FTUE	02/2014	F	11	13IR e 23 em IR	SEM RX
399	FTUD	02/2014	F	09	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
400	FTUE	02/2014	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
401	FTUE	03/2014	F	11	13 e 23 IRs	SEM RX
402	FTUE	03/2014	F	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
403	FTUE	03/2014	F	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
404	FPFUDC	03/2014	F	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
405	FTUE	03/2014	F	11	13 e 23 IRs	SEM RX
406	FTUD	03/2014	M	11	13 IC e 23 IR	13IRTRAC 23IR
407	FTUE	03/2014	F	10	13 e 23 em IR	13IR e 23 em IR
408	FPFUEC	03/2014	M	11	13IR e 23 em IR	SEM RX
409	FTUE	06/2014	M	10	13IR e 23 em IR	SEM RX
410	FTUE	07/2014	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
411	FPFUEC	07/2014	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
412	FPFUEC	07/2014	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
413	FPFUDC	07/2014	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
414	FPFUEC	08/2014	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
415	FTUD	08/2014	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
416	FPFUDC	08/2014	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
417	FTUE	08/2014	F	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
418	FTUE	08/2014	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
419	FTUE	08/2014	M	09	13 em IR 23 IC	13IR 23IRTRAC
420	FTUD	09/2014	F	10	13 e 23 em IR	SEM RX
421	FTUE	09/2014	F	11	13 e 23 IRs	SEM RX
422	FPFUDC	09/2014	M	11	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
423	FPFUEC	09/2014	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
424	FPFUEC	09/2014	M	09	13 e 23 em IR	SEM RX
425	FPFUEC	09/2014	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 em IR
426	FPFUEC	09/2014	F	10	13 e 23 em IR	SEM RX
427	FTUE	09/2014	F	10	13 e 23 em IR	SEM RX
428	FPFUDC	10/2014	F	09	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
429	FPFUEC	10/2014	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
430	FPFUDC	10/2014	M	11	13 e 23 IRs	SEM RX
431	FTUE	10/2014	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
432	FPFUEC	10/2014	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
433	FLRAD	10/2014	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
434	FLRAC	10/2014	F	10	13IR e 23 em IR	13 e 23 IRs
435	FLPE	10/2014	F	10	13 e 23 em IR	SEM RX
436	FLPE	10/2014	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX

No	TIPO FISSURA	EOA BMP2	GÊNERO	IDADE (ANOS)	Comportamento Irruptivo 13 e 23 EM 2015	Comportamento Irruptivo 13 e 23 EM 2016
437	FLRAD	10/2014	M	10	13 e 23 IRs	SEM RX
438	FLPE	11/2014	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
439	FLRAD	11/2014	M	11	13 e 23 em IR	SEM RX
440	FLRAD	11/2014	M	10	13 e 23 em IR	SEM RX
441	FLRAD	11/2014	M	10	13 e 23 IRs	SEM RX
442	FLRAD	11/2014	M	11	13 e 23 IRs	13 e 23 IRs
443	FLRAD	12/2014	F	11	13 e 23 IRs	SEM RX
444	FLRAE	12/2014	M	10	13 e 23 em IR	13 e 23 IRs
445	FLPE	12/2014	F	10	13 e 23 em IR	SEM RX

LEGENDA: FLPD- Fissura labiopalatina direita; FLPE- Fissura labiopalatina esquerda; FLRAE-Fissura de lábio com comprometimento do rebordo alveolar esquerda.; FLRAD-Fissura de lábio com comprometimento do rebordo alveolar direita; IR- Irrupção; IRs -Irrompidos; IC-Incluso; TRAC- Tracionado; IRTRAC-Irrompido por tracionamento; RX- Radiografia.

Tabela 2. Descrição da amostra do estudo.

Paciente/ Tipo de Fissura	Sexo	Amostra: Experimental/ Controle	Idade paciente Enxerto rhBMP2	Idade do paciente cirurgia para tracionamento	Intervalo obtido para Avaliação (m=meses)	Biopsia tecido Ósseo/Mole
FLPD	Masculino	Experimental	11a1m	11a7m	06m	Ósseo
FLPD	Masculino	Experimental	11a10m	12a4m	06m	Ósseo
FLRAE	Feminino	Experimental	11a7m	12a4m	09m	Ósseo e Mole
FLPD	Feminino	Experimental	12a1m	13a2m	13m	Ósseo e mole
FLPD	Masculino	Experimental	10a9m	11a10m	13m	Ósseo
FLPE	Masculino	Experimental	13a2m	14a6m	16m	Ósseo
FLPE	Feminino	Experimental	12a	13a6m	18m	Ósseo
FLPD	Masculino	Experimental	11a6m	13a1m	19m	Ósseo
FLPD	Masculino	Experimental	12a6m	14a3m	21m	Ósseo
FLPE	Masculino	Experimental	10a2m	12a2m	24m	Ósseo
FLPD	Masculino	Experimental	11a10m	14a	26m	Ósseo
FLPE	Masculino	Experimental	12a7m	16a5m	46m	Ósseo e Mole
FLPE	Feminino	Controle		13a1m		Ósseo
FLPE	Masculino	Controle		14a5m		Ósseo
FLPE	Feminino	Controle		16a		Ósseo
FLPE	Masculino	Controle	12a6m EOAutogeno	24a5m	11a9m	Ósseo
FLPE	Masculino	Controle		12a5m		Mole

Legenda: FLPD- Fissura labiopalatina direita; FLPE- Fissura labiopalatina esquerda; FLRAE- Fissura de lábio com comprometimento de rebordo alveolar esquerda.

ANEXOS

ANEXO A

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS DA USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA □ **Título da Pesquisa:** Comportamento do canino permanente na área do enxerto ósseo alveolar com rhBMP2

em pacientes com fissura labiopalatina **Pesquisador:** Maria da Conceição Andrade de Freitas Pimenta

Área Temática: □ **Versão:** 1 □ **CAAE:** 17860713.5.0000.5441 □ **Instituição Proponente:** Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER Número do Parecer: 407.770

Data da Relatoria: 24/09/2013

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa referente a tese doutorado. □ Esta pesquisa trata-se de um estudo transversal que pretende analisar a influência do enxerto ósseo com rhBMP-2 no comportamento irruptivo dos caninos permanentes superiores através da avaliação de medidas lineares e angulares obtidas das imagens das radiografias panorâmicas e tomografias do arquivo do HRAC de pacientes com fissura labiopalatina completa unilateral submetidos a cirurgia de enxerto ósseo alveolar com rhBMP-2 antes da irrupção do canino permanente no período de 2009 à 2013. **METODOLOGIA.** Registros radiográficos e tomográficos do HRAC-USP de pacientes com fissura unilateral completa de lábio e palato submetidos a enxerto ósseo com rhBMP2 antes da irrupção dos caninos permanentes pelo mesmo cirurgião maxilofacial realizada entre 2009 e 2012. Medidas mesiodistais, bucolinguais e verticais de caninos superiores serão realizadas utilizando o software AutoCAD antes e após um ano do enxerto ósseo. Serão realizadas biopsias de tecido mucoso e ósseo, caso haja indicação de exposição cirúrgica para tracionamento ortodôntico de caninos permanentes retidos nas áreas enxertadas e consequentemente análises histológicas destes tecidos, bem como uma de imagem pela MicroCT do material ósseo. **RESULTADOS ESPERADOS.** O enxerto ósseo com proteína morfogenética em membrana reabsorvível produzirá resultados satisfatórios no reparo do defeito alveolar e proporcionará uma migração espontânea do canino adjacente em formação e irrupção ativa. Os caninos retidos, caso ocorram, representariam uma anomalia dentária de caráter genético e por tanto de ocorrência independente do lado com fissura e sem fissura, e associado com outras anomalias geneticamente determinadas como as agenesias dentárias

Objetivo da Pesquisa:

Analisar o comportamento irruptivo dos caninos permanentes superiores na região de fissura enxertada com rhBMP2 e os indicadores radiográficos precoces que poderiam prever a sua retenção. Secundariamente, pretende-se analisar as características histológicas do tecido ósseo e mucoso removidos na região enxertada com rhBMP2, nos casos em que haja necessidade de exposição cirúrgica dos caninos para tracionamento ortodôntico, assim como avaliar esses tecidos ósseos por meio de análises de imagens MicroCT. Pretende-se, também, verificar a ocorrência de caninos retidos por palatino nos pais e irmãos dos pacientes com fissuras labiopalatinas pela aplicação de um questionário aos familiares destes pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os possíveis riscos decorrentes deste estudo serão mínimos, pois pode ser que cause algum constrangimento emocional, mas a privacidade será respeitada, ou seja, o nome ou qualquer outro dado que possa, de qualquer forma, identificar o participante, será mantido em sigilo. Também pode ocorrer a recusa da participação do estudo, ou a retirada do consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, o seu filho(a) ou irmão(ã) não sofrerá qualquer prejuízo no tratamento realizado no HRAC-USP. Não haverá danos de qualquer ordem contra os indivíduos participantes da pesquisa e/ou seus responsáveis.

O principal benefício seria para o paciente pois determinaria que os caninos retidos representariam uma anomalia dentária de caráter genético e portanto de ocorrência independente do lado com fissura e sem fissura, e que estaria associado a outras anomalias geneticamente determinadas como as agenesias dentárias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta relevância clínica e científica e atende as normas de ética em pesquisa envolvendo seres humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados dois TCLE (referente ao questionário e a doação de material de biópsia) critérios para suspender ou encerrar a pesquisa, documento referente aos riscos e benefícios e formulário de permissão ao uso de dados do prontuário (fotos, radiografias, tomografias). Os documentos estão adequados, exceto o termo de doação de biópsia que necessita ser corrigido, uma vez que no projeto se refere a doação de material biopsiado (tecido ósseo e mucoso) e não a dentes como citado no termo de doação.

Recomendações:

Correção do termo de doação de biópsia.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa atende as normas de ética em pesquisa, no entanto, o termo

de doação de material de biopsia requer correções, assim sugiro aprovação após efetuada a correção.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acatou o parecer do relator em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 466/12 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Ressaltamos que, conforme a Resolução CNS 466/12, o pesquisador é responsável por "desenvolver o projeto conforme delineado" e por informar ao CEP as emendas, ou seja, "todos os fatos relevantes que alterem o curso normal dos estudos por ele aprovados e, especificamente, nas pesquisas na área da saúde, dos efeitos adversos e da superioridade significativa de uma intervenção sobre outra ou outras comparativas" (alterações que envolva métodos, critérios éticos, mudança de pesquisadores/entrevistadores e instrumental), tais emendas devem ser entregues na Seção de Apoio a Pesquisa do SVAPEPE, bem como anexadas na Plataforma Brasil. O CEP avaliará e emitirá o parecer das emendas.

O pesquisador também fica responsável pela entrega dos relatórios semestrais e final, bem como notifica- los pela Plataforma Brasil. □ Informamos que após o recebimento do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final para publicação do trabalho.

BAURU, 26 de Setembro de 2013

Assinador por:

Marcia Ribeiro Gomide (Coordenad

ANEXO B**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, _____
_____, natural de _____, sexo
_____, cor _____,
residente _____
_____, telefone _____, portador do RG
_____, aceito doar a biopsia dos tecidos
ósseo e mucoso removidos durante o procedimento cirúrgico para tracionamento do
canino retido para a pesquisa “Comportamento do canino permanente na área do
enxerto ósseo alveolar com rhBMP2 em pacientes com fissura labiopalatina” ciente
de que os mesmos serão utilizados pelos pesquisadores responsáveis desta
pesquisa para estudo. Estou consciente de que este material biopsiado foi removido
por indicação terapêutica para a melhoria de minha saúde, como documentado em
meu prontuário. O estudo histológico deste material biopsiado será utilizado em
pesquisa e deverá ter sido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
do HRAC-USP, sendo preservada a minha identidade na divulgação.

Bauru, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do doador ou responsável

Cirurgião-dentista: _____

CRO: _____

Assinatura

Testemunha

ANEXO C**TERMO DE DOAÇÃO DE BIOPSIA**

Eu, _____
_____, RG _____ residente à _____, nº _____, na cidade de _____ aceito doar o material biopsiado, tecido ósseo e mucoso, para a pesquisa intitulada Comportamento do canino permanente na área do enxerto ósseo alveolar com rhBMP2 em pacientes com fissura labiopalatina

sob responsabilidade dos pesquisadores Maria da Conceição Andrade de Freitas Pimenta, Daniela Gamba Garib Carreira e Roberta Martinelli Carvalho. Estou ciente de que os tecidos ósseo e mucoso foram removidos por indicação terapêutica para a melhoria da minha saúde, como documentado em meu prontuário. Fui informado que caso não aceitasse doar os dentes para a pesquisa, meu tratamento não seria prejudicado. Fui informado também que a minha identidade na divulgação dos resultados será preservada.

A qualquer momento, poderei esclarecer minhas dúvidas com os pesquisadores ou via Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC/USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 na Seção de Apoio à Pesquisa do Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão ou por telefone (14) 3235-8421.

Bauru-SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa ou responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

Nome do Pesquisador Responsável: Maria da Conceição A. de Freitas Pimenta.
Endereço Institucional: Hospital de Reabilitação de Anomalias craniofaciais. Rua
Rua Silvio Marchione, 3-20. Cidade: Bauru Estado: São Paulo CEP: 17012-900.
Telefone: 14 32358434 E-mail: conca.freitas@hotmail.com