

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA - IMPLANTODONTIA**

**GUILHERME PIRÁGINE CONTADOR**

**AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA DO EFEITO DA RHBMP-2 NO GANHO ÓSSEO  
VERTICAL EM ENXERTOS XENÓGENOS FIXADOS EM TÍBIA DE COELHOS**

São Paulo  
2013

GUILHERME PIRÁGINE CONTADOR

**AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA DO EFEITO DA RHBMP-2 NO GANHO ÓSSEO  
VERTICAL EM ENXERTOS XENÓGENOS FIXADOS EM TÍBIA DE COELHOS**

Dissertação apresentada para obtenção  
do título de Mestre em Odontologia – Área  
de concentração Implantodontia do  
Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia da Universidade de Santo  
Amaro.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto  
Sendyk.

São Paulo  
2013

*Dedico este pesquisa inicialmente a Deus, que me impôs fortes dificuldades ao longo deste caminho de forma árdua, transformando este processo de mestrado em um desafio e que me levou a um crescimento muito significativo, principalmente na reestruturação da forma de como pensar e de como conduzir a vida.*

*Dedico também esta pesquisa a minha família, que, juntamente a mim, enfrentou este desafio, compreendeu minha ausência e me deu forças para que não desistisse desta íngreme subida em prol do conhecimento e da minha formação profissional. Em específico, dedico este trabalho ao Roberto Marcio da Costa Florim, que, nesta caminhada, me proporcionou a segurança e estímulo resultante de amor, transcendendo de forma sublime da figura inicial em um verdadeiro pai.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço de coração ao Prof. Wilson Roberto Sendyk pela oportunidade e honra em tê-lo como meu orientador, referencial que me fez buscar esta escola e que me proporcionou o desenvolvimento do raciocínio científico crítico em enxergar a ciência de forma pura, assim, pude distinguir a verdade e a mentira contida no universo da Implantodontia.*

*Gostaria de agradecer também de coração a meu grande amigo e irmão Geraldo Guedes Martini, à Dra. Jully Silva Santos, Dra. Kamila Pinto Silva, ao Dr. Caio Vinícius Roman Torres, à Dra. Yeon Jung kim, Dr. William Cunha Brandt, à Dra. Letícia C. Cidreira Boaro e a toda a minha nobre equipe de implantodontia, que me deram forças e compreenderam os momentos em que estive ausente. Assim, agradeço a vocês que me acompanham ao longo destes anos em busca do espírito de um aprendizado em comunhão.*

*Obrigado a todos que, de alguma forma, me ajudaram de forma direta ou indireta a superar mais um ciclo de aprendizado vivido.*

## RESUMO

A proteína óssea morfogenética recombinante humana tipo 2 (rhBMP-2- Infuse®) tem demonstrado resultados promissores em promover a regeneração do tecido ósseo no campo da Medicina e Odontologia quando associados à membrana de colágeno. Este estudo teve por objetivo avaliar o crescimento ósseo vertical dos enxertos xenógenos em forma de blocos fixados em tíbia de coelhos, com e sem rhBMP-2. Foram utilizados 20 coelhos da raça Nova Zelândia, fêmeas, pesando entre 3,5 a 4kg, que foram divididas em quatro grupos: blocos sem membranas associados a rhBMP-2, blocos com membranas associados rhBMP-2, blocos sem membrana e sem rhBMP-2 e blocos com membrana e sem rhBMP-2. Cada tíbia recebeu dois blocos retangulares fixados por um parafuso faceado ao bloco que foram mensurados em milímetros com paquímetro centesimal após sua fixação. Após três meses, os animais foram submetidos à eutanásia e os blocos foram novamente mensurados. Os dados foram analisados utilizando Kruskal-Wallis Tukey ( $\alpha=0,05$ ). A análise estatística revelou que a interação entre os fatores rhBMP-2 e membrana não foi significativa ( $p=0,114$ ). Analisando os fatores de forma individual, os grupos sem membrana ( $2,38 \pm 1,08$ ) apresentaram a média de crescimento ósseo maior que os grupos com membrana ( $1,72 \pm 1,51$ ) ( $p<0,001$ ). Os grupos com rhBMP-2 ( $2,70 \pm 1,50$ ) apresentaram a média de crescimento ósseo maior que os grupos sem rhBMP-2 ( $1,43 \pm 0,78$ ) ( $p=0,039$ ). Concluímos que a utilização de rhBMP-2 resultou num maior crescimento ósseo, enquanto a utilização de membrana resultou em menor crescimento ósseo.

**Palavras-chave:** Osso e Ossos. Implantes Dentários. Proteína Morfogenética Óssea  
2. Fatores Biológicos. Coelhos.

## ABSTRACT

The human recombinant type 2 (rhBMP-2 Infuse ®) is a bone morphogenetic protein capable of assisting considerably in cases of bone graft. This study aimed to evaluate the vertical bone growth of block-shaped xenogenous grafts fixed to the tibia of rabbits with and without rhBMP-2. We used 20 New Zealand female rabbits, weighing between 3.5 and 4 kg, which were divided into four groups: blocks without membranes associated with rhBMP-2, blocks with membranes associated with rhBMP-2, blocks without membranes and not associated with rhBMP-2, and blocks with membranes not associated with rhBMP-2. Two rectangular blocks were fixed to each tibia with screws at the same level as the surface of the blocks, and thereafter measured in millimeters using a pachymeter. After three months, the animals were euthanized and the blocks were again measured. Data were analyzed using Kruskal-Wallis/Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Statistical analysis revealed that the interaction between the factors rhBMP-2 and Membrane was not significant ( $p = 0.114$ ). Analyzing the factors individually, the groups without membrane ( $2.38 \pm 1.08$ ) presented a mean bone growth greater than the groups with membrane ( $1.72 \pm 1.51$ ). We came to the conclusion that the use of rhBMP-2 resulted in a greater vertical bone growth, and it is an option for the treatment of atrophic areas.

**Key words:** Bone and Bones. Dental Implants. Bone Morphogenetic Protein 2. Biological Factors. Rabbits.

## LISTA DE FIGURAS

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b>  | Anestésica infiltrativa complementar local na região da tíbia .....                                                                                                                                                                                          | 33 |
| <b>Figura 2:</b>  | A Incisão do plano cutâneo foi realizada deixando a linha de<br>incisão distante da área de fixação dos enxertos .....                                                                                                                                       | 33 |
| <b>Figura 3:</b>  | Foi realizada divulsão do plano muscular por planos com tesoura<br>metzembraum curva.....                                                                                                                                                                    | 34 |
| <b>Figura 4:</b>  | Obtenção de um retalho de espessura total expondo a tíbia em<br>sua totalidade .....                                                                                                                                                                         | 34 |
| <b>Figura 5:</b>  | Decorticalização com cinco perfurações apenas nas regiões de<br>fixação dos blocos.....                                                                                                                                                                      | 34 |
| <b>Figura 6:</b>  | Bloco bovino mineral 5 mm x 6mm x 5mm.....                                                                                                                                                                                                                   | 35 |
| <b>Figura 7:</b>  | Foi realizada a perfuração do bloco com fresa de 1,4mm de<br>diâmetro .....                                                                                                                                                                                  | 36 |
| <b>Figura 8:</b>  | Os enxertos foram fixados com parafuso de osteossíntese de<br>1,4mm x12mm faceados com a superfície oclusal do bloco,<br>obtendo-se boa estabilidade mecânica .....                                                                                          | 36 |
| <b>Figura 9:</b>  | A membrana de colágeno (ACS Infuse®) fracionada de forma<br>padronizada.....                                                                                                                                                                                 | 37 |
| <b>Figura 10:</b> | As membranas foram colocadas sobre o bloco de forma aleatória<br>e umedecidas com soro fisiológico.....                                                                                                                                                      | 37 |
| <b>Figura 11:</b> | A sutura foi realizada por planos musculares por pontos simples<br>com mononylon 5-0 e sutura com mononylon 4-0 do plano<br>cutâneo de forma a se conseguir uma sutura oclusiva livre de<br>tensão .....                                                     | 38 |
| <b>Figura 12:</b> | A proteína rhBMP2 foi cuidadosamente fracionada e pesada em<br>uma balança de precisão dentro de um ambiente de fluxo laminar<br>estéril (Bioseg12 classe 2 tipo A1), e acondicionado em<br>ependorfs estéreis, de modo a conter 0,7mg do material cada..... | 39 |
| <b>Figura 13:</b> | Foi utilizado uma pipeta eletrônica de alta precisão, foram<br>adicionados 0,0875 mg de rhBMP2 nos blocos com membrana e<br>nos os blocos sem membrana.....                                                                                                  | 40 |

|                   |                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 14:</b> | Após a fixação dos blocos, foi realizada a mensuração com sonda periodontal e <i>stop</i> de borracha, e transferidos para um paquímetro de precisão centesimal.....                          | 41 |
| <b>Figura 15:</b> | Foi realizada higiene da ferida cirúrgica e trocas dos curativos para proteção da área operada a cada três dias.....                                                                          | 41 |
| <b>Figura 16:</b> | Foi constatado maior edema pós-operatório no grupo de rhBMP2 .....                                                                                                                            | 41 |
| <b>Figura 17:</b> | Após a eutanásia, foi realizada incisão e divulsão dos tecidos. As amostras foram removidas com disco diamantado com margem de segurança para mesial e distal dos enxertos .....              | 42 |
| <b>Figura 18:</b> | Mensuração biométrica na região da cabeça do parafuso .....                                                                                                                                   | 43 |
| <b>Figura 19:</b> | Grupo G1 sem rhBMP2 .....                                                                                                                                                                     | 43 |
| <b>Figura 20:</b> | Grupo G2 com rhBMP2 .....                                                                                                                                                                     | 43 |
| <b>Figura 21:</b> | Cada coelha foi fragmentada em quatro partes referente a cada bloco, armazenada e identificada em frascos individuais com solução de formol durante 48h e, posteriormente, em álcool 70%..... | 44 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |                                                                                                    |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> | Médias (DP) dos dados de crescimento ósseo em mm .....                                             | 45 |
| <b>Tabela 2:</b> | Média (DP) dos dados de crescimento ósseo (mm) em função do<br>fator membrana ( $p < 0,001$ )..... | 45 |
| <b>Tabela 3:</b> | Média (DP) dos dados de crescimento ósseo (mm) em função do<br>fator rhBMP-2 ( $p < 0,039$ ).....  | 45 |

## SUMÁRIO

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                   | <b>10</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                        | <b>13</b> |
| 2.1 TECIDO ÓSSEO .....                                                      | 13        |
| 2.2 MECANISMOS BIOLÓGICOS DO REPARO ÓSSEO:.....                             | 15        |
| 2.3 ENXERTO XENÓGENO: .....                                                 | 16        |
| 2.4 PROTEÍNA ÓSSEA MORFOGENÉTICA: .....                                     | 20        |
| <b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>                                                   | <b>30</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                           | <b>31</b> |
| 4.1 ANESTESIAS E PREPARO DOS ANIMAIS.....                                   | 32        |
| 4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS .....                                          | 32        |
| 4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA UTILIZADA NO GRUPO 1 (SEM ADIÇÃO DE<br>RHBMP-2) ..... | 33        |
| 4.4 TÉCNICA CIRÚRGICA UTILIZADA NO GRUPO 2 – COM ADIÇÃO DE<br>RHBMP-2 ..... | 38        |
| 4.5 METODOLOGIA DE MENSURAÇÃO BIOMÉTRICA .....                              | 40        |
| 4.6 CONTROLE PÓS-OPERATÓRIO .....                                           | 41        |
| 4.7 EUTANÁSIA .....                                                         | 42        |
| 4.8 REMOÇÕES DAS AMOSTRAS .....                                             | 42        |
| 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                               | 44        |
| <b>5 RESULTADOS.....</b>                                                    | <b>45</b> |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>                                                    | <b>47</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO .....</b>                                                    | <b>53</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                     | <b>54</b> |
| <b>APÊNDICE A - Tabelas de Dados Brutos Pré e Pós-Operatório.....</b>       | <b>60</b> |
| <b>APÊNDICE B - Tabela de Crescimento Ósseo .....</b>                       | <b>61</b> |
| <b>APÊNDICE C - Tabela com Cálculos Estatísticos.....</b>                   | <b>62</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A reabilitação bucal por meio de próteses totais ou parciais removíveis foi muito utilizada na prática da Odontologia, no entanto, os casos de desdentados totais e parciais com extremidade protética posterior livre, limitações estéticas, mecânicas e funcionais existem e requerem atenção especial do profissional. As reabilitações estético funcionais de pacientes com edentulismo associado às atrofia ósseas maxilo mandibulares causadas por diversas patologias maxilo faciais têm sido um desafio para a Implantodontia.

O tecido ósseo é, sem dúvida, de vital importância tanto para o suporte dos implantes como também para a sustentação e estabilidade dos tecidos moles. Os implantes apresentam elevada taxa de sobrevivência e previsibilidade estética quando instalados em pacientes que possuem tecido ósseo em quantidade e qualidade suficiente. Para suprir as deficiências ósseas comumente presentes, são necessárias cirurgias de reconstruções ósseas que, conforme o grau de atrofia, aumentam a complexidade cirúrgica reconstrutiva prévia à instalação dos implantes (ESPÓSITO *et al.*, 2006; CHIAPASCO, 2009).

A morfologia do defeito ósseo está intimamente relacionada com a escolha da técnica cirúrgica, bem como a opção do substituto ósseo com a biologia mais adequada a cada situação clínica de atrofia. A regeneração óssea guiada com barreiras associadas a substitutos ósseos particulados, os enxertos em bloco do tipo onlay, os enxertos interposicionais e a distração osteogênica, são técnicas consagradas que têm mostrado satisfatórias taxas de sucesso quando respeitados os limites biológicos e as indicações de cada técnica cirúrgica (CHIAPASCO *et al.*, 2009).

O avanço no campo do conhecimento biológico envolvido no processo de regeneração óssea vem propiciando, de forma crescente, o surgimento de novos substitutos ósseos, fatores de crescimento, que, associados às técnicas cirúrgicas consagradas, têm minimizado principalmente os danos teciduais e a morbidade cirúrgica nas cirurgias de reconstrução do tecido ósseo.

Um substituto ósseo ideal deve ser biocompatível, biodegradável, possuir propriedades osteocondutivas e, preferivelmente, osteoindutivas. A busca desse material tem sido o grande desafio das indústrias desse setor.

Até o presente momento, o osso autógeno ainda é considerado o padrão ouro para qualquer tipo de aumento ósseo (SENDYK, 2004; CHIAPASCO, 2009), porém, as técnicas cirúrgicas, por mais aprimoradas que sejam ainda requerem grandes quantidades de tecido ósseo, o que nem sempre pode ser obtida do próprio paciente devido à disponibilidade limitada, aumento do tempo cirúrgico, idade do paciente, tempo transoperatório, necessidade de internação hospitalar, limitações de ordem sistêmica e/ou local, fatores que, em muitos casos, inviabiliza seu uso (SENDYK, 2004).

As alternativas clínicas mais comuns para o enxerto autógeno são o enxerto homogêneo (humano), xenógeno (animal, por exemplo, bovino) e o enxerto sintético ou aloplástico (metal, plástico ou cerâmico). Estes substitutos ósseos vêm sendo utilizado em diversas modalidades cirúrgicas de enxertia oral, porém cada material apresenta uma particularidade única como vantagens, desvantagens, limitação e indicações precisas com protocolos clínicos científicos pré-estabelecidos relacionados à morfologia do defeito ósseo (PIMENTEL *et al.*, 2012).

Os estudos da complexidade do microambiente medular possibilitaram identificar e delinear novas estratégias para potencializar o crescimento ósseo com os fatores de crescimentos (BOYNE *et al.*, 2005). A reconstrução de grandes defeitos ósseos causados por patologias ou traumatismo ainda são um desafio para a implantodontia e cirurgia buco maxilo facial. Substitutos ósseos, transferência de tecido microvascularizado e distração osteogênica são algumas das técnicas utilizadas para solucionar o problema. A diversidade de técnicas é um indicativo de dificuldade na reconstrução mandibular. Apesar das muitas vantagens do enxerto autógeno, existem algumas desvantagens, as quais incluem: a morbidade do local, a disponibilidade limitada de tecidos, limitações na forma do osso e contorno remanescente. A aplicação clínica da capacidade de indução óssea da proteína morfogenética óssea mostra um incrível potencial de tecnologia com resultados promissores.

A proteína morfogenética óssea mais utilizada atualmente e que é capaz de estimular células da linhagem mesenquimal provenientes da medula óssea e dos vasos sanguíneos no tecido conjuntivo a se diferenciarem em células osteogênicas tem sido a proteína morfogenética óssea recombinante humana tipo 2 (rhBMP2-Infuse®), que é resultante de um processo de Engenharia Genética da proteína natural humana. Desde então, esse fator de crescimento tem sido amplamente

estudado e utilizado nas áreas de Ortopedia e em outras áreas da Medicina que envolvam enxerto ósseo, incluindo as indicações craniofaciais. Várias pesquisas têm enfatizado que a indução de formação óssea pelo rhBMP2 (Infuse®) é diretamente dependente das propriedades do carreador, no entanto, a esponja de colágeno (ACS Infuse®) tem sido o transportador mais utilizado desta proteína nos estudos em humanos (BOYNE, 1997; BOYNE 2001; COCHRAN *et al.*, 2000; JUNG *et al.*, 2008; TRIPLETTE *et al.*, 2009).

Deste modo, este estudo tem por objetivo avaliar de forma biométrica enxertos xenógenos em forma de bloco fixados em tíbia de coelhos, com e sem a aplicação da rhBMP2, diretamente sobre os blocos de enxerto ou nas esponjas de colágenos (ACS Infuse®) em um modelo de regeneração óssea avaliando o crescimento ósseo vertical.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo responsável pelo suporte, sustentação e locomoção do nosso corpo apresenta-se metabolicamente muito ativo, sendo responsável pelo controle da homeostase iônica de cálcio e fósforo no organismo, manutenção do pH sanguíneo, assim como na transmissão do impulso elétrico em nervos e músculos. São capazes de absorver toxinas e metais pesados, minimizando seus efeitos adversos, em outros tecidos do corpo (JEE, 1988; MARX; GARG, 1988).

O osso é constituído de uma parte orgânica e de outra inorgânica. A matriz orgânica é formada de colágeno, principalmente tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas, e a inorgânica, por íons fosfato, cálcio e, em menor quantidade, bicarbonato, magnésio, potássio e sódio. A união do fosfato e do cálcio formam cristais com estrutura de hidroxiapatita que, associados às fibras colágenas, fornecem a resistência e dureza características do tecido ósseo. Histologicamente, o tecido ósseo existe sob duas formas distintas: o tecido ósseo primário e o tecido ósseo lamelar. O tecido ósseo primário ou imaturo é o primeiro a ser formado no processo de reparação, apresenta fibras colágenas pouco organizadas dispostas em diversas direções e com pouca quantidade de minerais. Todo tecido primário gradativamente é substituído por osso lamelar. O osso lamelar é o componente principal dos ossos cortical e trabecular maduro. Possui boa resistência devido à abundante quantidade de matriz óssea calcificada, na qual as fibras de colágeno encontram-se orientadas em lamelas dispostas ao redor de um vaso sanguíneo central.

Os vasos sanguíneos centrais, em conjunto com osteócitos e as lamelas concêntricas ao vaso, constituem o Sistema de Havers. Esses sistemas comunicam-se por meio de um segundo grupo de vasos sanguíneos, transversais ou oblíquos, denominados canais de Volkmann. Apresenta uma menor velocidade de formação se comparado ao esponjoso devido a sua estrutura organizada de fibras colágenas e cristais de minerais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Macroscopicamente, o tecido ósseo é classificado de acordo com a densidade como osso compacto (ou cortical) e esponjoso (ou medular). O osso compacto ou cortical proporciona maior resistência e proteção, sendo encontrado na

região mais periférica dos ossos chatos ou diáfises de osso longo. O osso esponjoso, também chamado medular ou trabecular, é o regulador das funções metabólicas. A matriz óssea apresenta-se organizada em lamelas longitudinais com os osteócitos organizados em trabéculas. Preenchendo o espaço entre as trabéculas, encontra-se a medula óssea. As superfícies ósseas internas e externas são revestidas, respectivamente, pelo endóstio e perióstio, uma fina camada de tecido com grande potencial osteogênico (MARK; GARG, 1998).

Nos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea, sob os aspectos histológicos, participam, basicamente, quatro tipos celulares distintos que derivam de duas linhagens: uma relacionada à formação e manutenção do tecido ósseo, o osteoblasto, células de revestimento ósseo e osteócitos, e outra ao processo de reabsorção, os osteoclastos (BOYNE, 2001).

Osteoblastos são células responsáveis pela osteogênese, síntese, maturação e mineralização da matriz orgânica do osso por meio do colágeno e proteínas não colagênicas, fatores de crescimento específicos, prostaglandinas, collagenases e fosfatase alcalina. São células cubóides ou ligeiramente alongadas mononucleadas com núcleo esférico, encontradas de forma organizadas e localizadas na superfície da matriz óssea chamada osteoide, uma camada não mineralizada, que recobre a superfície óssea mineralizada. Pertencem à linhagem osteoblástica, são células mesenquimais pluripotentes, indiferenciadas que possuem alta capacidade em proliferar e se especializar em células ósseas maduras, condroblastos ou mesmo fibroblastos, de acordo com a natureza e o grau do estímulo que recebem (AUBIN, 1998).

Alguns osteoblastos tornam-se inativos e revestem as superfícies ósseas, sendo, então, denominados células de revestimento ósseo (*bone lining cells*). Estas células recobrem as superfícies ósseas do endóstio e o perióstio dos ossos de um indivíduo adulto, podendo voltar a sua atividade quando reativadas (JEE, 1998).

Os osteócitos são as células mais numerosas do tecido ósseo e correspondem às formas mais diferenciadas do osteoblasto. Uma vez que o osteoblasto tenha sintetizado a matriz óssea e esteja totalmente envolvido por ela, dentro de espaços isolados, denominados lacunas osteocíticas, passa a ser chamado de osteócito. Suas longas projeções citoplasmáticas comunicam um osteócito a outro por meio das junções comunicantes, essas junções do tipo *teia*

permitem a passagem de moléculas e garantem a sobrevivência da célula na sua lacuna isolada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Osteoclastos são células grandes multinucleadas, formadas a partir da fusão de células progenitoras mononucleares da linhagem dos monócitos e macrófagos. Sua principal função é promover a reabsorção óssea, desempenhando, também, importante função durante os processos de formação, manutenção e remodelação das estruturas ósseas. Devido a seu tamanho e à atividade metabólica, um único osteoclasto pode reabsorver a matriz óssea depositada por 100 osteoblastos, fato que justifica seu baixo número em quantidade no tecido ósseo normal.

Quando é ativado, o osteoclasto aderido à superfície óssea promove escavações na superfície óssea denominadas lacunas de Howship. Adjacente à superfície óssea, sua membrana celular exibe numerosas invaginações, formando uma borda em escova, área que delimita a zona de reabsorção do osso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

## 2.2 MECANISMOS BIOLÓGICOS DO REPARO ÓSSEO:

Os mecanismos biológicos de reparo ósseo associados aos biomateriais ou enxertos ósseos podem ser classificados em diferentes níveis, como osteogênese, osteoindução, osteocondução e osteopromoção.

A osteogênese se caracteriza pela atividade de osteoblastos e pré-osteoblastos viáveis transplantados com o enxerto para o defeito ósseo a partir de uma área doadora do próprio indivíduo. Entretanto, mesmo que algumas células do enxerto sobrevivam à transferência, as principais fontes de células para esta fase são as células osteogênicas e osteoprogenitoras do hospedeiro. Logo, a osteogênese independe de células mesenquimais indiferenciadas para que haja uma nova formação óssea. A eficiência deste processo depende da fonte de enxerto utilizada – o osso medular, especialmente aquele acompanhado de medula óssea tende a apresentar maior revascularização que o cortical, porém, este último tende a apresentar maior suporte estrutural. Como desvantagens desta técnica, deve-se considerar a morbidade do paciente e variável disponibilidade em quantidade e qualidade do osso na área doadora (LUNDGREN *et al.*, 2008).

Urist, em 1965, realizando experimentos em animais, observou acidentalmente um fenômeno de indução óssea, a osteoindução. Verificou que

proteínas não-colagenosas orientaram a modulação e diferenciação de células mesenquimais em células da linhagem óssea, promovendo a osteogênese (URIST; STRATES, 1971; ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001). Neste processo, células são estimuladas a produzir osso e é evidente a conversão fenotípica de células indiferenciadas do mesênquima em osteoblastos na área do defeito. É um mecanismo biológico básico que acontece com frequência regular, como no reparo de fratura (ALBREKTSSON, JOHANSSON, 2001). São exemplos deste processo a matriz óssea desmineralizada e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (GRANJEIRO *et al.*, 2005).

A osteocondução é o processo em que o enxerto serve como arcabouço, de forma passiva, para migração de vasos sanguíneos e deposição de novo osso na superfície ou dentro de poros, canais ou túneis (CALASANS-MAIA *et al.*, 2008).

A osteopromoção utiliza barreiras mecânicas ou membranas de proteção que evitam a proliferação do tecido conjuntivo em meio ao defeito ósseo, permitindo que esse seja povoado por células osteoprogenitoras. Esta exclusão tecidual é realizada com o uso de membranas (barreiras físicas), que podem ser bioabsorvíveis ou não. As membranas, rígidas ou com reforço de titânio, são capazes de promover a formação de quantidade significativa de novo osso e manter espaço suficiente, sem a adição de material de preenchimento. Isso ocorre devido à sua capacidade de impedir a invasão de outros tecidos competitivos. A técnica de regeneração óssea guiada (ROG) é indicada no tratamento de defeitos ósseos, para aumentar a altura e largura da crista óssea, em que a barreira física é adaptada para proteger o coágulo sanguíneo, criando um espaço isolado e permitindo a regeneração óssea (BUSER *et al.*, 1998).

### 2.3 ENXERTO XENÓGENO:

São frequentes as situações clínicas nas quais há a perda do elemento dentário e do tecido ósseo por diversas patologias maxilo faciais ou trauma, o que dificulta ou impossibilita a instalação de implantes em pacientes desdentados devido à ausência de quantidade óssea adequada. A necessidade de reconstrução do tecido ósseo previamente à instalação de implantes por meio de enxertos tem sido extensivamente avaliada por diversas técnicas cirúrgicas consagradas nos últimos 40

anos com boa previsibilidade clínica e taxa de sobrevivência de implantes (CHIAPASCO *et al.*, 2009).

Carlsson *et al.* (1967) estudaram as alterações do osso alveolar em um estudo radiográfico longitudinal de cinco anos mostrando que há perda de 25% de volume ósseo no primeiro ano e de 40 a 60% até o terceiro ano pós-exodontia.

Pacientes portadores de próteses totais ou parciais removíveis possuem uma contínua reabsorção do osso alveolar devido às condições de carga no tecido ósseo ser desfavorável em relação ao órgão dental (LINDQUIST; CARLSSON; JEMT, 1996). Estes também demonstraram que a perda óssea é mais acentuada durante os primeiros dois anos após a extração dentária embora este processo prossiga por quinze anos.

Atualmente, o osso autógeno ainda é considerado o padrão ouro para qualquer tipo de aumento ósseo, no entanto, ainda requer grandes quantidades frente ao grau de atrofia, o que nem sempre pode ser obtido do próprio paciente devido a fatores como traumatismo da zona doadora, aumento do tempo cirúrgico, edema pós-operatório, idade do paciente, necessidade de internação, limitações de ordem sistêmica e/ou local, fatores que, em muitos casos, superam as vantagens em se utilizá-lo (SENDYK, 2004; ESPÓSITO *et al.*, 2006).

Um substituto ósseo ideal deveria ser biocompatível, biodegradável, possuir propriedades osteocondutivas e, preferivelmente, osteoindutivas (URIST, 1965; JENSEN *et al.*, 2006). As alternativas mais comuns para o enxerto autógeno utilizado clinicamente seriam os enxertos xenógenos, aloplásticos, cerâmicos e homólogos.

O osso bovino inorgânico é uma hidroxiapatita bovina osteocondutiva, usada extensivamente para preenchimento ósseo desde o início da década de sessenta com os primeiros ensaios clínicos para o preenchimento de defeitos ósseos (JENSEN *et al.*, 2006).

Jensen *et al.* (1996) testaram em mandíbulas de miniporcos a utilização do osso mineral bovino particulados e observaram que a osseointegração do osso bovino foi maior que dos outros materiais cerâmicos testados, porém com menor índice de biodegradação.

O osso bovino inorgânico, estruturalmente, apresenta uma proporção cálcio/fosfato de 1,67 e tamanho médio do cristal de, aproximadamente, 100µm.

conferindo semelhanças químicas e estruturais com a hidroxiapatita humana (VON ARX *et al.*, 2001).

O processo de reabsorção da hidroxiapatita bovina inorgânica foi demonstrado em um estudo longitudinal de 10 anos por Sartori *et al.* em 2003, revelando que o biomaterial não é reabsorvido totalmente e sim incorporado ao tecido ósseo.

A hidroxiapatita sob a forma de grânulos ou particulada é bem relatada na literatura em terapias regenerativas do tecido ósseo oral como material de preenchimento em defeitos ósseo periodontais e peri-implantares, na manutenção do alvéolo dentário após extração, cirurgias de enxerto em seio maxilar e ganho de espessura óssea associada à técnica de regeneração óssea guiada (BUSER *et al.*, 1998; ARTIZI *et al.*, 2004).

A topografia rugosa da hidroxiapatita favorece a proliferação de osteoblastos e ainda promove a síntese da matriz óssea na sua superfície, no entanto, o osso mineral bovino não possui propriedades osteoindutivas e sim osteocondutivas. (TORRES *et al.*, 2009).

Vários estudos longitudinais retrospectivos em humanos sustentam a utilização clínica deste material mostrando taxa de sobrevivência de implantes de 95% em 15 anos, semelhante ao do osso autógeno com taxa de 97% quando utilizado como material de preenchimento sob a forma particulada em defeitos com mais de três paredes ósseas (KURKCU *et al.*, 2012).

O enxerto bovino em forma de bloco ósseo mineral foi estudado inicialmente por Takagi e Urist (1982), que demonstraram, em estudos com animais, que a hidroxiapatita em bloco, quando utilizada como enxertos do tipo *onlay*, apresenta boa estabilidade à pressão do periósteo, da pele ou da mucosa ao longo de 24 semanas, mostrando ser um substituto ósseo osteocondutor estável em relação à manutenção do volume pós-operatório.

Jung *et al.* (2003) avaliaram se a adição ou não de rhBMP2 ao enxerto xenógeno (Bio-Oss) proporciona melhora na terapia de regeneração óssea guiada com relação à densidade, ao volume e à maturação óssea. Em 11 indivíduos, foram instalados 34 implantes dentários em áreas que necessitavam de enxerto ósseo. Todas as áreas (5 superiores e 6 inferiores) receberam enxerto xenógeno e membrana de colágeno (Bio-Guide). No grupo teste, foi adicionado rhBMP2 ao bloco de enxerto. Os resultados mostraram redução da altura do defeito ósseo em ambos

os grupos, e uma maior densidade e fração mineralizada óssea no grupo teste. Concluíram que a combinação do enxerto xenógeno com rhBMP2 pode melhorar o processo de maturação e pode aumentar o contato osso-enxerto.

Cornelini *et al.* (2004) relataram a utilização de enxertos xenógenos (Bio-Oss) em conjunto com membranas de colágeno (Bio-Guide) em áreas que, após exodontia, receberam implantes transmucosos. Foram avaliados 20 indivíduos que foram divididos em dois grupos; o grupo teste, que recebeu Bio-Oss e Bio-Guide, e o grupo controle, que recebeu apenas Bio-Guide. Após 6 meses, exames clínicos e radiográficos foram realizados e os resultados não mostraram diferenças quanto ao nível ósseo verificado radiograficamente e profundidade de sondagem. Foi observada diferença significativa com relação ao posicionamento da margem gengival nas faces proximais, sendo que, no grupo teste, este posicionamento foi mais coronário do que no grupo controle. Concluíram que a utilização de osso bovino juntamente com a membrana em áreas que receberam implantes após exodontia oferece vantagens estéticas relacionadas a problemas em áreas proximais.

Simion *et al.* (2006) avaliaram o aumento vertical do rebordo alveolar de seis cães em defeitos críticos verticais padronizados criados no momento da extração dos quatro pré-molares inferiores bilateral que permaneceram em espera de 12 semanas para cicatrização dos tecidos. Foram utilizados enxertos de osso bovino mineral em forma de bloco associado ou não a fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Três grupos foram testados; bloco de osso bovino mineral em combinação com uma membrana de colágeno, bloco de osso bovino mineral associado à PDGF apenas e bloco de osso bovino mineral associado à PDGF recoberto por uma membrana de colágeno. Após 16 semanas, foi demonstrado histologicamente que a associação de PDGF em combinação com um enxerto bovino em bloco sem a colocação de uma membrana de colágeno tem maior potencial regenerativo em relação à quantidade de osso formado em defeitos ósseos mandibulares verticais, evidenciando, também, o importante papel do periósteo como uma fonte de células osteoprogenitoras no processo de regeneração do tecido ósseo.

Rothamel *et al.* (2009) avaliaram histologicamente o aumento vertical do rebordo ósseo em mandíbula de cães. Dois blocos de ossos (de 6 x 10 x 15 mm) (CS-Block bovin, Tutogen Medical) foram inseridos em cada lado da mandíbula e

fixados com um implante de titânio e um parafuso osteossíntese. Três diferentes terapias foram testadas: (1) bloco xenógeno sozinho, (2) bloco xenógeno recoberto por uma membrana de colágeno (Tutodent Membran, Tutogen Medical), (3) bloco autógenos colhidos durante a execução do defeito crítico. Após 12 semanas de maturação, os sistemas de fixação foram removidos e substituídos por implantes dentários que permaneceram por mais um período de reparação adicional de 3 meses. A análise histológica revelou que os blocos xenógenos demonstraram propriedades osteocondutivas em nível equivalente ao grupo de blocos autógenos, com presenças de 50% a 60% de tecido ósseo no interior dos blocos. A utilização de uma membrana de colágeno não melhorou os resultados encontrados.

Felice *et al.* (2009) compararam duas técnicas para o aumento de osso vertical utilizando enxerto autógeno da crista do íliaco e enxerto ósseo bovino. Foram selecionados 10 indivíduos parcialmente desdentados que receberam os dois tipos de enxerto na porção posterior da mandíbula do lado direito e esquerdo. Não foram observadas diferenças quando comparados os dois tipos de enxerto em relação à altura óssea marginal dos implantes. Concluíram que ambos os tipos de enxerto proporcionaram bons resultados, mas o uso de enxerto de osso bovino deve ser preferido, pois é um procedimento menos invasivo e realizado em única etapa.

Schmitt (2011) avaliou a taxa de formação óssea e osseointegração de bloco mineral bovino (Bio-Oss ®) associado a rhBMP-2 e ou rhVEGF, e inseridos em defeitos críticos em calvária de porcos para ganho vertical. Todos os blocos ósseos inseridos apresentaram crescimento ósseo ao redor e em seu interior com suficiente estabilidade volumétrica podendo ser utilizado para procedimentos de aumento, no entanto, a adição de fatores de crescimento (BMP-2 e VEGF) não promoveu o aumento significativo de neoformação óssea.

## 2.4 PROTEÍNA ÓSSEA MORFOGENÉTICA:

Fatores de crescimento são proteínas que exercem profunda influência na proliferação e crescimento das células. Os fatores de crescimento estimulam a diferenciação das células tronco progenitoras. Esses fatores de crescimento ósseo, que consistem em menos do que 1% das proteínas não colágenas, são produzidos, principalmente, pelos osteoblastos e incorporados à matriz extracelular durante a formação óssea. Os fatores de crescimento mais citados pela literatura são: Fatores

de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs); Fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs); Fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ); Fatores de crescimento vasculares endoteliais (VEGFs); e Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) (LIND *et al.*, 1996).

O PDGF é sintetizado por plaquetas, monócitos, macrófagos e células endoteliais, influenciando a maioria das células de origem mesodérmica. Como consequência do seu papel no crescimento celular, PDGFs podem exercer o seu efeito aumentando o número de células sintetizadoras de colágeno. O IGF é produzido por diferentes tipos de células, incluindo osteoblastos, podendo ser do tipo I (IGF-I) ou II (IGF-II). O IGF-I está relacionado ao recrutamento e à proliferação de células mesenquimais, e o IGF-II é ativado mais tarde, no início do processo de calcificação óssea. Sabe-se que IGF-I ativa a expressão de osteocalcina dentro da célula, o que é importante para a manutenção da massa óssea e para promover o crescimento ósseo longitudinal. Já os fatores de crescimento de Fibroblastos FGFs regulam a mitogênese, diferenciação e manutenção celular.

A família do Fator de Crescimento Transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ) é composta por cinco membros: proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), fatores de crescimento e diferenciação (GDF), ativinas, inibinas e substância de Muller. Osteoblastos e condrócitos expressam receptores TGF $\beta$ . Encontrado principalmente nos ossos, plaquetas e cartilagem, o TGF $\beta$  desencadeia o crescimento, a diferenciação e a síntese de matriz extracelular. Os TGF $\beta$ s são produzidos pelos osteoblastos e armazenados na matriz óssea, seu maior reservatório. As proteínas morfogenéticas ósseas são membros da superfamília TGF- $\beta$ , e são moléculas diméricas responsáveis por desempenhar um papel crítico no desenvolvimento embrionário, regulando uma ampla gama de atividades celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação, determinação da célula e apoptose (JENSEN *et al.*, 1996).

Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) foram denominadas por Marshall Urist, Professor Emérito do Departamento de Cirurgia Ortopédica da Faculdade de Medicina da UCLA em 1965, após um experimento com osso desmineralizado que foi inserido em tecido subcutâneo e muscular induzindo a formação óssea nesses locais por meio de um extrato proteico, denominado de proteína morfogenética, o qual foi associado a uma matriz óssea acelular, desvitalizada e descalcificada. Após seus 70 experimentos realizados em 300 animais, a primeira evidência encontrada foi que osso descalcificado produz novo osso em uma quantidade proporcional ao

volume do implante. A segunda evidência é que, onde quer que a indução óssea ocorra, há um conjunto de células-tronco, células osteoprogenitoras e pequenos capilares rodeados por osteoblastos. A terceira evidência em seus estudos é que a formação óssea ocorre em implantes extraesqueletais de matriz óssea descalcificada no interior de cavidades, e os osteoblastos são derivados não de elementos do tecido doador, mas da proliferação de células pluripotentes originárias do hospedeiro.

Urist e Craven (1970) realizaram um estudo para avaliar a morfogênese óssea por meio da implantação de matriz óssea em músculos em um receptor alogênico, isogênico e autógeno por 42 dias. A matriz xenógena produziu uma escassa produção de osso. A quantidade de novo osso formado foi medido por histologia e de forma macroscópica. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo clássico, a estabilidade dos padrões morfogenéticos na matriz óssea, de acordo com a produção de osso novo de implantes intramusculares em vertebrados, mostra o coelho como animal estável na morfogenia do tecido ósseo entre as espécies analisadas.

Urist e Strates (1971) observaram que as BMPs gerenciam a modulação e diferenciação das células mesenquimais do tecido muscular em osso e medula óssea. Durante a osteogênese, células mesenquimais pluripotentes diferenciam-se em pré-osteoblastos que servem de células progenitoras para adipócitos, miócitos ou condrócitos. Estes pré-osteoblastos se diferenciam em osteoblastos maduros que depositam componentes necessários para formar a matriz óssea e subsequente mineralização, neste estudo, foi definido o princípio da indução óssea.

Urist não foi capaz de isolar a substância responsável pela morfogênese óssea dentro do extrato, somente em 1983, os bioquímicos Kuber Sampath e Hari Reddi desenvolveram um sistema de indução óssea *in vivo*. O sistema consistia na implantação de um dispositivo com a mistura da proteína de interesse sob a pele de um rato macho. Logo após o sistema ser desenvolvido, os dois pesquisadores foram contratados por empresas diferentes. As duas companhias chegaram à reta final simultaneamente em 1987, determinando a sequência parcial da proteína específica do aminoácido cisteína, semelhantes ao TGF- $\beta$ , por essa razão fazem parte da grande família de fatores de crescimento conhecido por TGF- $\beta$ . Reddi nomeou as proteínas com o prefixo BMP, identificando-as como BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8. Enquanto isso, Sampath e colegas, no Creative

Biomolecules, identificaram uma proteína que eles chamaram OP-1, que corresponde à BMP-7 (REDDI, 1997; REDDI, 2007).

Wozney *et al.* (1988) produziram pesquisas, por mais de uma década, estudando os mecanismos de ação das Proteínas Morfogenéticas Ósseas, formas de purificação e clonagem, até o processo de obtenção das recombinantes humanas.

Wozney (1989) observou que o tempo em que esses eventos transcorrem é dependente da quantidade de BMP implantada. Em quantidades limitadas de 0,5 mg de rhBMP-2, a formação óssea é vista aos 14 dias, enquanto 30 mg de rhBMP-2 antecipa a formação óssea para sete dias. Com implantação de grandes quantidades de rhBMP-2, como > 100 mg, extensa formação óssea pode ser observada aos 5 dias. A partir deste estudo, foi evidenciado que a formação óssea induzida pela BMP-2 é dose-dependente.

As BMPs foram definidas como glicoproteínas produzidas pelos osteoblastos, com massa molecular de, aproximadamente, 17.500 kd, que se assemelham funcionalmente às citocinas e possuem a capacidade de iniciar a neoformação óssea. Por clonagem molecular, pelo menos, 6 membros desta família têm sido identificados e foram denominados de BMP-2 até BMP-7, e são parte da superfamília TGF- $\beta$ . Pela facilidade de manipulação, o sistema de pesquisa *in vivo* de escolha é a implantação subcutânea de BMP em rato ou camundongo. Nesse sistema de análise, a formação de cartilagem ocorre dentro de cinco a sete dias de implantação da BMP, a formação óssea é evidente, aproximadamente, entre os dias 10 e 14, e a remodelação óssea continuam após 21 dias. É importante notar que, por meio dos experimentos realizados por Wozney e colegas, o efeito da BMP é estritamente local: cartilagem e formação óssea são vistos somente no local de implantação, e o tamanho e forma do osso formado são proporcionais ao material inicialmente implantado (WOZNEY, 1989 e 1992).

Wang *et al.* (1990) descreveram a purificação e caracterização da rh BMP2. O gene é removido e inserido (recombinado) em uma célula usada na reprodução celular em ovário de hamster chinês. A população é criada, armazenada e congelada após o processo de liofilização, obtendo-se o produto final (rhBMP2 Infuse®).

Reddi (1997) evidenciou em seu estudo que a indução óssea por matriz óssea desmineralizada é uma cascata de vários estágios sequenciais. As fases-chave dessa cascata são: quimiotaxia, mitose e diferenciação.

Avaliando a formação óssea em defeitos ósseos periodontais supra-alveolares de cães (SIGURDISSON *et al.*, 1996), utilizaram diversos materiais como carreadores de rhBMP-2: Micropartículas de ácido polilático e poliglicólico (PLGA); Matriz óssea bovina (Bio-oss®); Esponja de colágeno (ACS Infuse®). Grânulos de ácido polilático (DRILAC®); Matriz óssea desmineralizada canina (DBM). DBM e Bio-oss foram os carreadores que obtiveram melhores resultados. Foi comprovada, nesse estudo, a influência que os carreadores podem exercer em variadas funções, como a capacidade de manutenção do espaço e habilidade da rhBMP-2 para regenerar osso alveolar.

Estudos mostram que a concentração da proteína aplicada no carreador, bem como o volume deste carreador, ainda não são totalmente compreendidos, embora valores absolutos de 10ng até 1,5mg têm sido utilizados. Isto indica que muitos estudos empregam uma superdosagem, visto que, no tecido ósseo, encontra-se 1µg/ml de BMP e a concentração exigida para a indução osteogênica *in vivo* é de 300µg/ml. (YAMAGUCHI, 1996).

A resposta tecidual ao implante de BMPs ocorre de modo similar ao desenvolvimento embriológico, possibilitando a formação e o desenvolvimento da reparação na osteogênese pós-natal.

Os genes produtores de BMPs, identificados por técnicas de DNA recombinante, têm sido utilizados para sintetizar BMP recombinante (rBMP) em culturas de células de mamíferos, produzindo proteínas altamente ativas e potencialmente disponíveis, bem como maiores frações do que era anteriormente possível (GONÇALVES; GUIMARÃES; GARCIA, 1998).

As sequências específicas de DNA são introduzidas em um vetor apropriado que contém potencializadores e marcadores específicos para esta determinada sequência. Este vetor é transferido para a célula hospedeira, normalmente células CHO (*Chinese Hamster Ovaria*) ou bactéria *Escherichia coli*, portanto, a primeira tem sido mais utilizada porque também influencia o custo no preço final do produto (BESSHO *et al.*, 1999; COCHRAN *et al.*, 1997).

Boyne *et al.* (1997), em um estudo avaliou as reações locais e sistêmicas de 12 pacientes submetidos a preenchimento de seio maxilar com rh BMP-2 carreada

em esponja de colágeno (ACS Infuse®), encontraram significativo crescimento ósseo, o qual foi documentado por meio de tomografias computadorizadas. Não houve nenhuma reação inesperada e nenhuma alteração clínica importante nos exames hematológicos e de urina. Os efeitos pós-operatórios mais frequentes foram edema facial e eritema. As biópsias ósseas retiradas no momento da instalação dos implantes mostraram boa qualidade óssea, confirmando sua indicação em substituição aos enxertos autógenos.

Cochran *et al.* (2000) avaliaram pacientes submetidos à implantação de rhBMP-2 pós-exodontias ou preenchimento do rebordo alveolar pelo período de 36 meses. O objetivo principal era monitorar a segurança dos pacientes tratados com rhBMP-2 em longo prazo e avaliar os implantes instalados sobre o enxerto. Nenhuma reação adversa inesperada foi observada. Todos os implantes apresentaram-se estáveis e com tecidos periimplantares saudáveis.

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

Matin *et al.* (2003) avaliaram a regeneração óssea com o uso da rhBMP-2 ao redor de implantes instalados imediatamente após exodontia. No grupo que recebeu a rhBMP-2, os implantes foram totalmente cobertos com osso, incluindo a parte coronária, enquanto que, no grupo sem a BMP, um terço do implante permanecia exposto. O estudo concluiu que o uso da rhBMP-2 facilitou e acelerou a regeneração óssea ao redor dos implantes.

Wikesjö *et al.* (2004) analisaram o potencial da utilização da rhBMP-2 associada à esponja de colágeno (ACS Infuse®) para melhorar a regeneração óssea guiada (ROG) em defeitos ósseos horizontais ao redor de implantes usinados e de superfície tratada, utilizando-se membrana de polifluoretileno expandido (PTFE). A quantidade de nova formação óssea ao redor dos implantes que receberam a rhBMP-2 foi comprovadamente maior que no grupo controle (sem adição de BMP-2), independente do tipo de superfície.

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

Wikesjö *et al.* (2008) estudaram o efeito de diferentes dosagens de rhBMP-2 revestindo a superfície do implante, na formação óssea local, incluindo osseointegração e aumento vertical do rebordo alveolar em defeitos perimplantares de 5mm. As doses foram de 0,75mg/ml , 1,5mg/ml ou 3.0 mg/ml de rhBMP-2. Os animais receberam marcadores ósseos nas semanas 3, 4, 7 e 8 pós-cirurgia. Os locais em que receberam os implantes revestidos com rhBMP-2 mostraram evidente formação óssea, algumas vezes, até excedendo a plataforma do implante. Os implantes revestidos por rhBMP-2 nas concentrações de 0,75 e 1,5 mg/ml mostraram formação de córtex. Os locais que receberam implantes revestidos com rhBMP-2 na concentração de 3,0 mg/ml apresentaram mais formação óssea trabecular imatura, formação de seromas e remodelação óssea perimplantar, que resultou em baixa estabilidade primária dos implantes.

Jung *et al.* (2009) avaliaram os resultados clínicos longitudinais por exames radiológicos de 34 implantes instalados em área enxertada com osso bovino e membrana de colágeno com e sem adição de rhBMP-2. Os controles após três e cinco anos não mostraram nenhuma diferença estatisticamente significantes em relação ao contato osso-implantes nos grupos com e sem rhBMP-2. Os tecidos moles adjacentes apresentaram-se estáveis e saudáveis nos dois grupos.

A BMP-2 tem sido utilizada com diferentes carreadores para regeneração óssea, incluindo materiais inorgânicos como hidroxiapatita, Tricálcio fosfato, e cimentos a base de fosfato de cálcio, polímeros sintéticos e polímeros naturais. A desvantagem associada com carreadores sintéticos e ou inorgânicos para BMP-2 são a baixa biodegradabilidade e substituição por novo tecido ósseo. Atualmente, um dos carreadores para liberação de rhBMP2 mais efetivo nos estudos humanos é a esponja de colágeno bovino tipo I absorvível (ACS). Por possuir boa

biocompatibilidade com os tecidos, tem alguns problemas inerentes no controle da taxa de liberação de BMP-2, frequentemente, resultando em uma alta explosão de liberação inicial e, conseqüentemente, na incapacidade de prover uma liberação de BMP-2 em longo prazo, bem como sua instabilidade mecânica (ZHANG; DOSCHAK; ULUDAG, 2009).

Em 2009, Triplette *et al.* avaliaram a segurança e eficiência da rhBMP-2 em esponja de colágeno absorvível (ACS Infuse®), comparando com enxerto ósseo autógeno em pacientes submetidos à cirurgia de levantamento de seio maxilar com instalação de implantes em 2 estágios. Significante quantidade de osso formou-se após seis meses, com altura óssea de  $7,83 \pm 3,52$  mm no grupo com rhBMP-2 e  $9,46 \pm 4,11$  mm no grupo com osso autógeno. Aos 6 meses após função, o osso formado pela indução de rhBMP-2 era significativamente mais denso que o grupo de autoenxerto. Nenhuma reação adversa foi relatada pelos pacientes tratados com rhBMP-2, enquanto casos de parestesia, dor no local doador ou edema prolongado foram relatados pelos pacientes submetidos a enxerto autógeno.

Thoma *et al.* (2010) avaliaram a regeneração óssea com rhBMP-2 combinado com diferentes enxertos com malha de titânio. Defeitos ósseos foram criados em cinco cães, após oito semanas, os enxertos foram realizados e quatro grupos foram testados: rhBMP-2/membrana de colágeno (ACS Infuse®) associado a uma malha de titânio, rhBMP-2/(ACS Infuse®) associado a osso canino congelado particulado, rhBMP-2/ACS associado a osso canino desmineralizada e liofilizado (DFDBA) e rhBMP-2/(ACS Infuse®) enrolado a um bloco de enxerto canino cortical. Os cães foram sacrificados após 16 semanas e foram realizadas análise histológica e histomorfométrica. A maior quantidade de osso foi encontrado no grupo de enxerto em bloco associado a rhBMP2, podendo-se concluir que a combinação de rhBMP-2 enxerto de bloco proporciona a maior largura do rebordo das quatro opções de tratamento utilizadas neste modelo de aumento de rebordo ósseo em cães.

Kinsella (2011) realizou um estudo com o objetivo de avaliar diferentes concentrações de rhBMP2 na esponja de colágeno (ACS Infuse®) associadas a diferentes substitutos ósseos. Foram utilizados vinte e três cães adultos, nos quais foram criados defeitos críticos na calvária. Os animais foram divididos em 5 grupos sendo: nenhum tratamento, 0,2 mg/ml de rhBMP-2 associado à esponja de colágeno (ACS), 0,2 mg/ml de rhBMP-2 associado à esponja de colágeno (ACS) a um enxerto cortico-esponjoso, 0,2 mg/ml de rhBMP-2 associado à esponja de colágeno (ACS)

com grânulos de biomaterial reabsorvível e 0,4 mg/ml de rhBMP-2 associado a um veículo resistente compressão. Foram realizados exames de imagem em todos os defeitos no dia 0, 8, 16, e 24 semanas após a cirurgia antes dos animais serem sacrificados. Todas as amostras foram avaliadas qualitativamente por histologia. Formação óssea ectópica foi encontrada de forma consistente em todos os grupos com rhBMP2. O tratamento com 0,2 mg/ml de rhBMP-2 associado à esponja de colágeno (ACS) e a grânulos de biomaterial reabsorvível mostraram o mínimo de formação ectópica de osso, formação de osso mais compacta dentro do defeito, e espessura e consistência óssea.

Herford *et al.* (2012) avaliaram a rhBMP-2 como opção na reconstrução de defeitos ósseos. Foram avaliados 13 macacos e, em cada um, 2 defeitos mandibulares foram realizados. A terapêutica com a aplicação de rhBMP2 foi feita com diferentes concentrações (0,75mg/ml – 2,0mg/ml) e combinados com esponja de colágeno (ACS Infuse®) com uma matriz resistente à compressão. Os defeitos tratados com rhBMP-2 em concentração de 2mg/ml mostraram resultados significativamente melhores do que os defeitos tratados com concentração de 1,5mg/ml. Concluíram que a combinação de rhBMP-2 com uma matriz resistente à compressão mostraram uma maior densidade óssea e melhor manutenção do espaço do que a combinação de rhBMP-2 com ACS nesse modelo de estudo avaliado.

Hunziker *et al.* (2012) avaliaram o efeito osteocondutivo de diferentes modelos de aplicação de rhBMP-2 em 18 porcos. Foram realizadas exodontias dos seis pré-molares superiores (3 do lado direito e 3 do lado esquerdo) e, após 6 meses, 6 implantes foram instalados nas regiões submetidas à exodontia. A rhBMP-2 foi aplicada associada a membranas, adicionadas a membranas, um grupo não recebeu rhBMP-2, e outro não recebeu membrana nem rhBMP-2. Os resultados mostraram diferença significativa na formação óssea quando rhBMP-2 foi aplicado, mas sem diferença entre os grupos que receberam rhBMP-2. Concluíram que a capacidade da rhBMP-2 em induzir e manter a formação óssea local pode ser influenciada pelo modo de como é aplicada no espaço periimplantar e que a resposta osteogênica pode ser mais eficaz quando a liberação da rhBMP2 é gradual.

Choi *et al.* (2013) avaliaram o efeito osteocondutivo da rhBMP-2 em áreas sinusais de 16 coelhos. Em um dos seios maxilares, foi colocado rhBMP-2 mais fosfato de cálcio (BCP), no outro seio, apenas BCP. Exames radiográficos e

histométricos foram realizados após 2 e 8 semanas dos procedimentos cirúrgicos. Após 2 semanas, observou-se um volume ósseo maior no grupo teste do que no grupo controle. Concluíram que uma adequada manutenção do espaço na terapia de levantamento de seio pode ser suficiente com a utilização apenas de BCP, mas o potencial osteocondutivo da membrana sinusal é ativada desde os primeiros momentos após aplicação de rhBMP-2.

A compreensão dos resultados obtidos com diversos substitutos ósseos que promovam o ganho ósseo em sítios que apresentam comprometimento que impede a reabilitação adequada é essencial para o desenvolvimento de inovações na área.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Avaliar de forma biométrica o crescimento ósseo vertical dos enxertos xenógenos em forma de bloco em um modelo de regeneração óssea utilizando a rhBMP2 (Infuse®) aplicada diretamente no bloco de enxerto ou esponja de colágeno (ACS Infuse®) em tíbias de coelhos.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santo Amaro (UNISA) sob o Parecer nº 18-2012 e foi realizado mediante os princípios éticos de experimentação animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS), segundo normas internacionais para a utilização de animais em pesquisas embasadas na tríade “sensibilidade, bom-senso e boa ciência”.

Foram utilizados 18 coelhos da raça Nova Zelândia, fêmeas, pesando entre 3,5 a 4kg, e idade entre 11 e 15 meses. Os animais foram, inicialmente, mantidos em observação por um período de sete dias após a chegada para que fossem descartadas quaisquer anomalias no estado geral de saúde. Foram realizados exames hematológicos e de fezes em todos os animais. Todas as coelhas provenientes de criadouro particular foram mantidas no Biotério da Unisa, no qual foram assistidas e medicadas por médicos veterinários. As cirurgias aconteceram nas dependências do laboratório de técnica cirúrgica multidisciplinar da UNISA. Os animais foram mantidos em local apropriado com ventilação e temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), e alimentados com ração Nutríara (Paulinia, São Paulo-Brasil) e água administrada *ad libitum*.

Os animais foram divididos, inicialmente, em dois grupos, o primeiro sem aplicação de rhBMP 2 (Infuse®) e o segundo com aplicação de rhBMP 2 Infuse®). No primeiro grupo (G1)  $n=9$ , os coelhos foram numerados por tatuagem (3, 5, 11, 12, 13, 14, 16, 18 e 20) e receberam dois blocos de enxerto xenógeno (Critéria – Brasil) com forma quadrangular com, aproximadamente, 5 mm de altura, 6mm comprimento e 5mm de largura, fixados por 1 parafuso de osteossíntese de 1,4mm x 10mm ou 1,4mm x 12mm (Dentoflex – Brasil) nas tíbias direita e esquerda. Os blocos de enxerto foram fixados sempre mantendo uma distância mínima de 5mm entre eles de forma a se conseguir a totalidade de adaptação de contato da base desses sobre a área óssea receptora. Metade dos blocos de enxerto foi recoberta por uma membrana de colágeno (ACS Infuse®), enquanto a outra metade não foi recoberta por membrana (ACS Infuse®). Dois blocos de enxerto (Critéria – Brasil), com e sem membrana, foram fixados na região medial da epífise proximal e outro no terço distal

da epífise proximal, perna direita e/ou esquerda de forma alternada e aleatória, nesse grupo, não houve a aplicação de rhBMP 2.

No segundo grupo (G2) n=9, os coelhos foram numerados por tatuagem (6, 8, 15, 17, 19, 21, 22, 23 e 24) e receberam dois blocos (Critéria – Brasil) padronizados de enxerto xenógeno nas tíbias direita e esquerda. Seguindo o mesmo protocolo de fixação e de alternada posição tanto distal e proximal à epífise proximal como perna direita e esquerda da mesma forma que o (G1). No entanto, todos os blocos, tanto aqueles que foram recobertos por membrana de colágeno (ACS Infuse®) quanto os sem membrana, foram acrescidos de 0,0875mg de rhBMP-2 (Infuse, Medtronic, USA) (POLO *et al.*, 2013).

Para a tabulação dos dados e elaboração dos resultados, os blocos foram divididos em quatro grupos da seguinte maneira: blocos sem membranas associados a rhBMP-2, blocos com membranas associados a rhBMP-2, blocos sem membrana e sem rhBMP-2 e blocos com membrana e sem rhBMP-2.

#### 4.1 ANESTESIAS E PREPARO DOS ANIMAIS

O procedimento anestésico foi realizado pela equipe veterinária do biotério segundo o seguinte protocolo: Cetamina- 30 - 50 mg/kg/IM, Xilasina- 5 – 10 mg/kg/IM, Meperidina- 5 – 10 mg/kg/IM.

Os coelhos receberam oxigenoterapia por máscara durante todo procedimento. E acompanhamento pela médica veterinária responsável pelo funcionamento do laboratório de animais da UNISA.

#### 4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Após a anestesia e verificação do plano anestésico, a tricotomia foi realizada na área a ser operada (tíbia). Foi realizada antissepsia de campo com auxílio de uma escova embebida em solução de clorexidina a 2% (Rioquímica, São José do Rio Preto - Brasil) na área a ser operada. Para a manutenção da assepsia durante a cirurgia, foram utilizados campos estéreis sobre os animais, expondo apenas as áreas de interesse. A manutenção da cadeia asséptica foi preservada durante todos os procedimentos cirúrgicos.

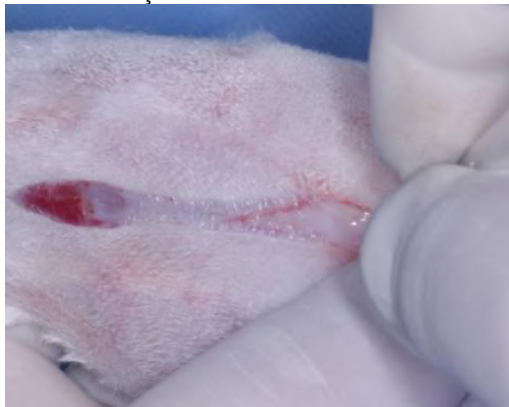
#### 4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA UTILIZADA NO GRUPO 1 (SEM ADIÇÃO DE RHBMP-2).

Após indução anestésica e preparo dos animais, todos receberam uma complementação anestésica com infiltração local intramuscular na região da tíbia com um tubete de cloridrato de mepivacaína 2% com noradrenalina 1:100.000 (Scandicaína-Septodont- Distribuidora DFL Ind. Com. Ltda. – Rio de Janeiro – RJ) (Fig. 01). Foi realizada uma incisão longitudinal ao longo de toda extensão da tíbia 4mm deslocada para medial com o objetivo de deixar a linha de sutura distante dos enxertos. A incisão foi realizada com lâmina número 15 C montada em cabo de bisturi, ultrapassando plano cutâneo (Fig. 02), foi realizada a divulsão do plano muscular com tesoura Metzembraum curva (Quinelato, Rio Claro, Brasil), expondo a tíbia em sua totalidade (Fig. 03). A obtenção de um retalho de espessura total e o preparo do tecido foi realizado com descoladores Molt número 2 (Quinelato, Rio Claro, Brasil), (Fig. 04).

**Figura 1:** Anestésica infiltrativa complementar local na região da tíbia



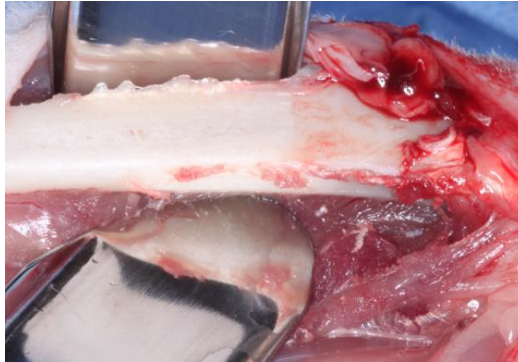
**Figura 2:** A Incisão do plano cutâneo foi realizada deixando a linha de incisão distante da área de fixação dos enxertos



**Figura 3:** Foi realizada divulsão do plano muscular por planos com tesoura metzembaum curva



**Figura 4:** Obtenção de um retalho de espessura total expondo a tíbia em sua totalidade



A decorticalização óssea foi realizada com pequenas perfurações na cortical óssea com brocas esféricas número 2 para ponta reta (Kavo - Santa Catarina - Brasil) em rotação de 1500 rpm. Para aumentar a nutrição sanguínea apenas na área correspondente à fixação do enxerto e evitar que o tecido ósseo local tivesse algum comprometimento, a área foi refrigerada com o uso abundante de irrigação com solução salina estéril 0,9% (Fig. 05).

**Figura 5:** Decorticalização com cinco perfurações apenas nas regiões de fixação dos blocos



Cada animal recebeu dois blocos (Critéria, São Paulo, Brasil) em cada perna, blocos fabricados e padronizados em 5mm de altura por 6mm de comprimento e 5mm de largura (Fig. 06), fixados na proximal e distal na epífise óssea de cada perna com parafuso de osteossíntese de 10mm e 12mm de comprimento com 1,4mm de diâmetro (Dentoflex, São Paulo, Brasil) (Fig. 07), instalados faceados com a face oclusal do bloco. O preparo do leito receptor foi realizado com fresa de 1,2mm e do bloco com fresas de 1,4mm de forma a se conseguir a estabilidade mecânica dos enxertos. Durante as perfurações foi utilizada irrigação com soro fisiológico a 0,9% (Fig. 08).

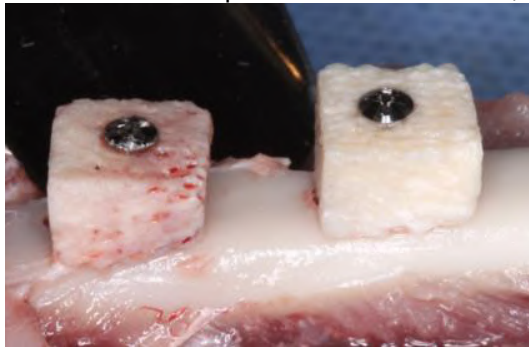
**Figura 6:** Bloco bovino mineral 5 mm x 6mm x 5mm



**Figura 7:** Foi realizada a perfuração do bloco com fresa de 1,4mm de diâmetro



**Figura 8:** Os enxertos foram fixados com parafuso de osteossíntese de 1,4mm x12mm faceados com a superfície oclusal do bloco, obtendo-se boa estabilidade mecânica.



Antes da sutura, as membranas de colágeno (ACS Infuse®) foram fracionadas com lâmina de bisturi número 15 em fragmentos de modo a cobrir a totalidade dos enxertos e inseridas sobre os blocos conforme o delineamento entre bloco medial e bloco distal na epífise óssea proximal (Fig. 09), perna direita e esquerda. As membranas foram umedecidas sobre os blocos com soro fisiológico para sua melhor acomodação no leito cirúrgico (Fig. 10).

**Figura 9:** A membrana de colágeno (ACS Infuse®) fracionada de forma padronizada

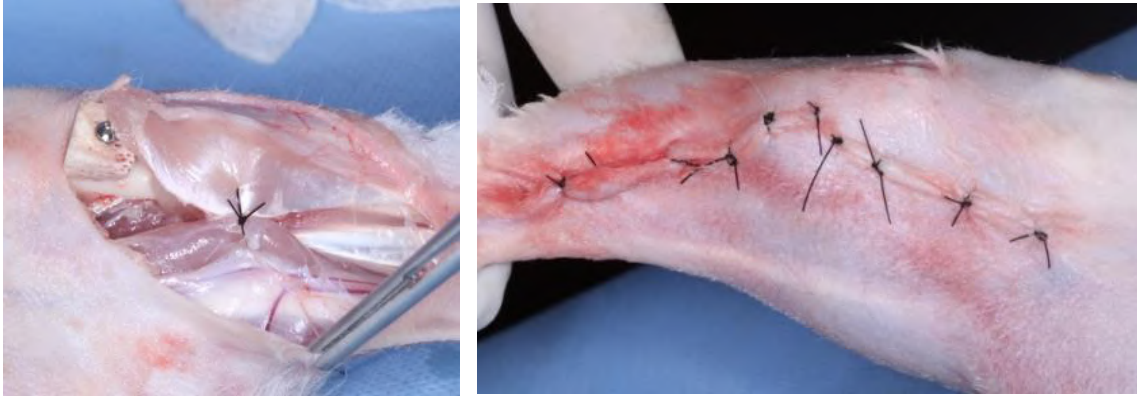


**Figura 10:** As membranas foram colocadas sobre o bloco de forma aleatória e umedecidas com soro fisiológico



Foi verificada a passividade das bordas cirúrgicas antes de ser realizada a sutura por pontos simples inicialmente nos planos musculares com mononylon preto 5-0 e com 4-0 (mononylon Ethicon) nas bordas da ferida cirúrgica de forma a se conseguir uma sutura oclusiva livre de tensão (Fig. 11).

**Figura 11:** A sutura foi realizada por planos musculares por pontos simples com mononylon 5-0 e sutura com mononylon 4-0 do plano cutâneo de forma a se conseguir uma sutura oclusiva livre de tensão



#### 4.4 TÉCNICA CIRÚRGICA UTILIZADA NO GRUPO 2 – COM ADIÇÃO DE RHBMP-2

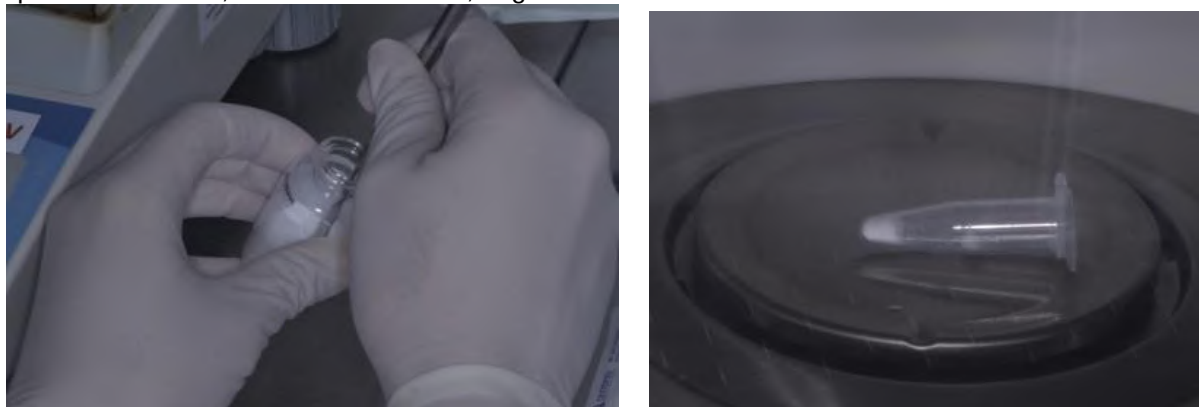
O procedimento cirúrgico para o Grupo 2 n=9, após indução anestésica e preparo dos animais, foi o seguinte: as 9 coelhas receberam dois blocos padronizados de enxerto xenógeno nas tíbias direita e esquerda. Seguindo o mesmo protocolo de fixação de alternada posição tanto medial e distal da epífise proximal como perna direita e esquerda com mensuração com sonda periodontal e transferência para o paquímetro digital e da mesma forma que o G1, no entanto, os blocos que foram recobertos por membrana de colágeno agora foram acrescidos de rhBMP 2 (Infuse®), enquanto os blocos sem membrana de colágeno receberam o rhBMP 2 (Infuse®) na mesma concentração diretamente sobre esses após sua fixação.

Considerando-se a determinação do fabricante de utilizar o produto preparado dentro do prazo limite de duas horas, o conjunto estéril contendo 12mg de rhBMP 2 (Infuse®) liofilizada foi dividido de maneira que pudéssemos operar uma coelha de cada vez.

O vidro contendo 12mg de pó liofilizado da proteína foi cuidadosamente dividido e pesado em uma balança de precisão dentro de um ambiente de fluxo laminar estéril (Bioseg12 classe 2 tipo A1), e acondicionado em 10 tubos *ependorfs*

estéreis, de modo a conter 0,7mg do material cada. O material restante foi descartado (Fig. 12).

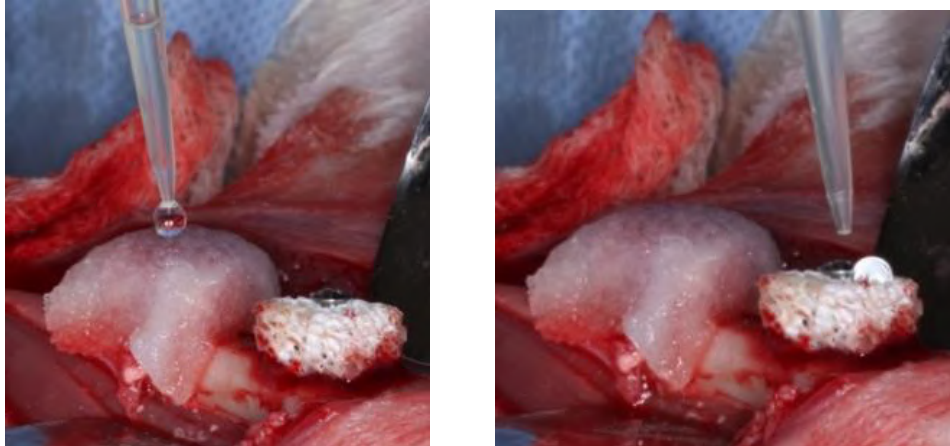
**Figura 12:** A proteína rhBMP2 foi cuidadosamente fracionada e pesada em uma balança de precisão dentro de um ambiente de fluxo laminar estéril (Bioseg12 classe 2 tipo A1), e acondicionado em ependorfs estéreis, de modo a conter 0,7mg do material cada



Após a fixação dos blocos com boa estabilidade mecânica, foi realizada a mensuração com mesma metodologia aplicada ao grupo 1. Para cada eppendorf, 0,7mg da proteína foi diluída em 0,5 ml de solução de água destilada estéril com uma seringa de insulina de 1ml, originando um solução com concentração de 1,4mg de rhBMP2 por ml.

De cada eppendorf, por meio de pipeta eletrônica de alta precisão, removeu-se 0,0625ml da solução preparada e aplicou-se sobre os blocos ou sobre as esponjas de colágeno. Desta maneira, cada bloco ou esponja de colágeno recebeu 0,0875mg da proteína reconstituída. O biomaterial hidratado repousou por 15 minutos sobre os blocos antes de ser realizada a sutura, conforme prescrição do fabricante (Fig. 13).

**Figura 13:** Foi utilizado uma pipeta eletrônica de alta precisão, foram adicionados 0,0875 mg de rhBMP2 nos blocos com membrana e nos os blocos sem membrana

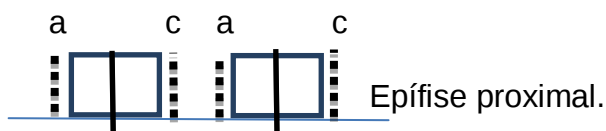


Foi verificada a passividade das bordas cirúrgicas antes de ser realizada a sutura por pontos simples inicialmente nos planos musculares com mononylon 4-0 e 5-0 (mononylon Ethicon) nas bordas da ferida cirúrgica de forma a se conseguir uma sutura oclusiva livre de tensão.

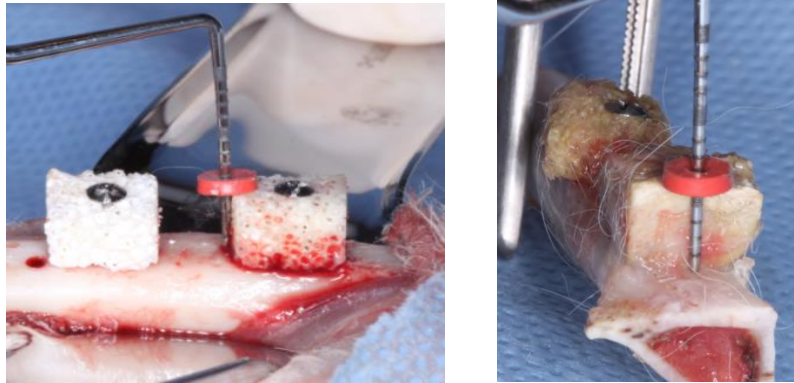
Após o procedimento cirúrgico, os coelhos se movimentaram livremente em gaiolas separadas durante sete dias, período no qual receberam a medicação pós-operatória e os cuidados de assepsia no local da ferida cirúrgica. Ao final desse período, foram colocados de volta às baias, em grupos de dois.

#### 4.5 METODOLOGIA DE MENSURAÇÃO BIOMÉTRICA

Com os enxertos fixos e estáveis nas áreas receptoras, iniciou-se a mensuração das alturas dos blocos com sonda periodontal e *stop* de borracha apoiado na superfície oclusal dos blocos. As medidas aferidas foram transferidas para um paquímetro digital com precisão centesimal (Didimess IP65, Alemanha). Foram aferidas duas medidas em cada bloco, uma na face cefálica e outra na face caudal de cada bloco, sempre tendo como área de eleição a porção central desses em relação à área receptora. As mensurações foram sempre realizadas por um mesmo avaliador no pré-operatório e pós-operatório (Fig.14.).



**Figura 14:** Após a fixação dos blocos, foi realizada a mensuração com sonda periodontal e stop de borracha, e transferidos para um paquímetro de precisão centesimal.



#### 4.6 CONTROLE PÓS-OPERATÓRIO

Imediatamente após a cirurgia, foram realizados curativos com bandagem e esparadrapo tipo micropore, envolvendo as tíbias para a proteção das feridas cirúrgicas. Os curativos foram trocados a cada três dias juntamente com a higiene das feridas cirúrgicas durante três semanas (Fig. 15 e 16).

**Figura 15:** Foi realizada higiene da ferida cirúrgica e trocas dos curativos para proteção da área operada a cada três dias



**Figura 16:** Foi constatado maior edema pós-operatório no grupo de rhBMP2



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

A medicação utilizada: a) Antibiótico: Enrofloxacina 5g – 5-10mg/kg SC/10dias; b) Anti-inflamatório: Meloxicam – 0,2mg/kg SC/3dias; c) Antisséptico: Iodopovidine. (solução) e Rifomicina (*spray*) a cada troca diária dos curativos (Brasil, São Paulo - SP).

Os animais foram observados e acompanhados diariamente pelo pesquisador e pela equipe de veterinários da Unisa a fim de se atender a qualquer alteração de saúde ou de comportamento dos animais.

#### 4.7 EUTANÁSIA

Os coelhos foram submetidos à eutanásia após doze semanas. Foi aplicada anestesia geral antes da injeção letal sob responsabilidade dos médicos veterinários do biotério, utilizando-se o seguinte protocolo: Cetamina- 30 mg/kg/IM; Xilasina- 5 - 10 mg/kg/IM; Tiopental- 20 mg/kg/IV; Cloreto de potássio – 19,1% - 1 ampola/animal.

#### 4.8 REMOÇÕES DAS AMOSTRAS

Após os procedimentos de eutanásia, foi feita uma incisão no mesmo local da primeira cirurgia, com afastamento e descolamento dos tecidos. Após exposição total das tíbias, foi realizada uma osteotomia proximal e distal distante aos blocos enxertados com um disco diamantado (Comet, EUA, Burnsville) (Fig.17)

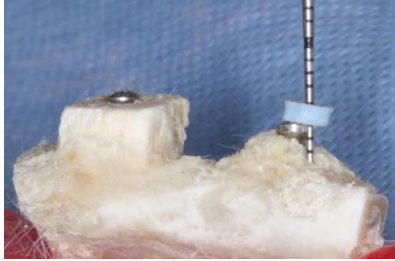
**Figura 17:** Após a eutanásia, foi realizada incisão e divulsão dos tecidos. As amostras foram removidas com disco diamantado com margem de segurança para mesial e distal dos enxertos.



Foi realizada a remoção dos tecidos moles aderidos ao redor dos blocos ósseos e foram mensurados com a mesma metodologia utilizada no pré-operatório no grupo (G1) e (G2), no entanto, uma nova medida biométrica foi adicionada na região da cabeça do parafuso a fim de se mensurar a reabsorção óssea ao redor

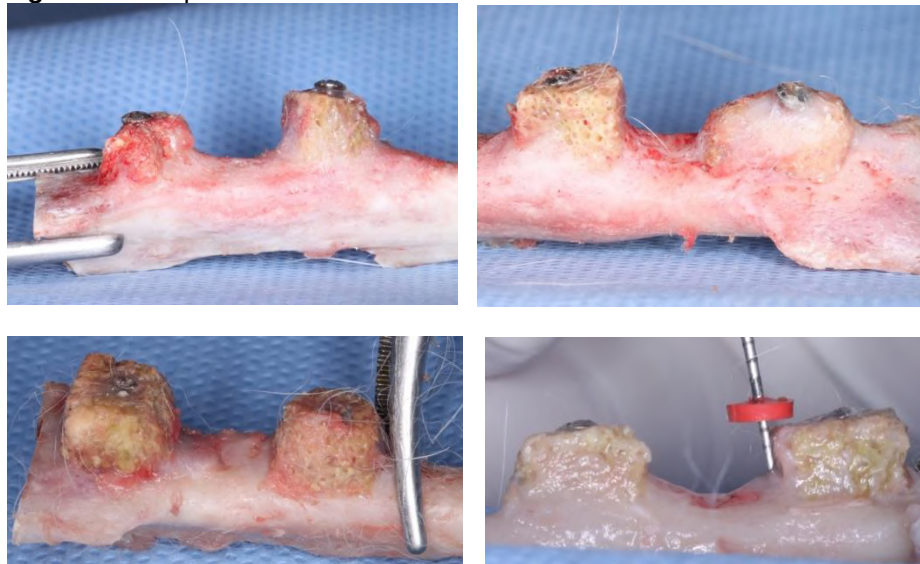
desses. Todas as medidas foram realizadas com sonda periodontal com *stop* de borracha e transferidas para paquímetro com precisão centesimal (Fig. 18).

**Figura 18:** Mensuração biométrica na região da cabeça do parafuso



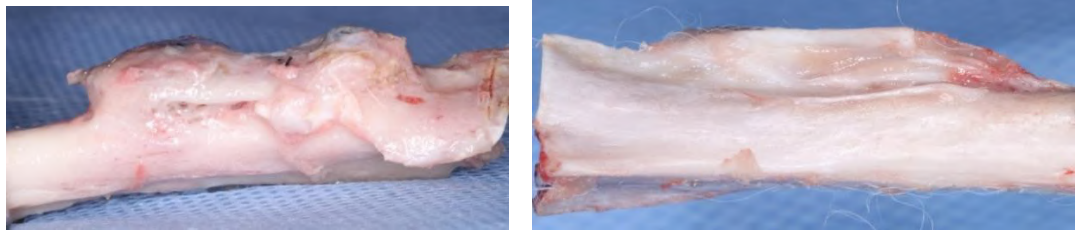
Após as mensurações, todas as tíbias do foram fotografadas individualmente (Fig. 19 e 20).

**Figura 19:** Grupo G1 sem rhBMP2



**Figura 20:** Grupo G2 com rhBMP2





Cada tíbia foi fragmentada em duas partes referente a cada bloco e armazenada em frascos individuais contendo solução de paraformaldeído 4% e transferidas em álcool 70% para análises posteriores (Fig. 21).

**Figura 21:** Cada coelha foi fragmentada em quatro partes referente a cada bloco, armazenada e identificada em frascos individuais com solução de formol durante 48h e, posteriormente, em álcool 70%



#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Devido a não homocedasticidade dos dados, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis de fator duplo, rhBMP 2 (Infuse®) e membranas de colágeno (ACS Infuse®) foi utilizado para análise dos fatores e o teste de Tukey para o contraste de médias. O nível global de significância para ambos os testes foi de 5%.

## 5 RESULTADOS

Os dados de crescimento ósseo estão apresentados na tabela 1. Os valores variaram entre 1,4 mm (grupo com membrana e sem rhBMP-2) e 3,3 mm (grupo sem membrana e com rhBMP-2).

**Tabela 1:** Médias (DP) dos dados de crescimento ósseo em mm

|                     | Sem rhBMP-2 | Com rhBMP-2 |
|---------------------|-------------|-------------|
| <b>Sem membrana</b> | 1,5 (0,8)   | 3,3 (1,6)   |
| <b>Com membrana</b> | 1,4 (0,8)   | 2,1 (1,2)   |

A análise estatística revelou que a interação entre os fatores membrana e rhBMP-2 não foi significativa ( $p=0,114$ ). Tanto o fator membrana ( $p<0,001$ ) quanto o fator rhBMP-2 ( $p=0,039$ ) foram estatisticamente significantes. Deste modo, os fatores foram analisados de forma individual. A tabela 2 apresenta os dados de crescimento ósseo em função do fator membrana, e a tabela 3 apresenta os dados de crescimento ósseo em função do fator rhBMP-2.

Quando apenas o fator membrana é analisado, a presença da membrana resultou num crescimento ósseo estatisticamente menor (Tabela 2). Já quando o fator rhBMP-2 é analisado, a presença da proteína resultou num crescimento ósseo estatisticamente maior (Tabela 3).

**Tabela 2:** Média (DP) dos dados de crescimento ósseo (mm) em função do fator membrana ( $p<0,001$ )

|                     | Crescimento ósseo (mm)   |
|---------------------|--------------------------|
| <b>Sem membrana</b> | 2,38 (1,08) <sup>A</sup> |
| <b>Com membrana</b> | 1,72 (1,51) <sup>B</sup> |

**Tabela 3:** Média (DP) dos dados de crescimento ósseo (mm) em função do fator rhBMP-2 ( $p<0,039$ )

|                    | Crescimento ósseo (mm)   |
|--------------------|--------------------------|
| <b>Sem rhBMP-2</b> | 1,43 (0,78) <sup>B</sup> |
| <b>Com rhBMP-2</b> | 2,70 (1,50) <sup>A</sup> |



## 6 DISCUSSÃO

Na Implantodontia, os procedimentos reconstrutivos para aumento ósseo vertical em áreas atróficas como região posterior de mandíbula previamente à reabilitação com implantes dentários têm sido um desafio.

Com os avanços da Bioengenharia, o tratamento de defeitos ósseos tem se desenvolvido por meio de pesquisas experimentais *in vitro* e *in vivo* utilizando avaliações mais refinadas do comportamento dos biomateriais desenvolvidos (SENDYK *et al.*, 2004; JENSEN *et al.*, 2005; SIMION *et al.*, 2006; ROTHAMEL *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2009; KURKCU *et al.*, 2012). No presente estudo, foi observada de forma clínica e biométrica se a adição de rhBMP 2 associado a enxerto xenógeno em blocos mineralizados poderiam promover efeito adicional no aumento ósseo vertical em tíbias de coelhos com a utilização ou não de membrana de colágeno (ACS Infuse®).

Diversas pesquisas utilizaram o coelho para avaliar as estratégias de aumento do tecido ósseo previamente à instalação de implantes, substitutos ósseos, reparação de alvéolos de extração, sendo, assim, um modelo experimental consagrado na literatura para tal finalidade (POLO *et al.*, 2013).

A escolha do modelo experimental é determinada por diversos fatores, como custo, viabilidade técnica do procedimento, fundamentação científica, disponibilidade, aceitação da sociedade, e facilidade de acomodação e manutenção, além da similaridade com as características humanas (MARK; GARG, 1998). O conhecimento das características ósseas dos animais, como microestrutura e composição óssea, e processos de formação e reabsorção óssea são importantes para permitir a correlação dos achados com situações clínicas em humanos (JENSEN *et al.*, 1996).

Os coelhos apresentam a vantagem de facilidade de manuseio devido ao tamanho reduzido, além de atingirem a maturidade esquelética precocemente e um menor tempo de espera devido à relação do sigma, sendo três vezes mais rápido em relação à espécie humana (JEE, 1998). Contudo, são muito utilizados para avaliar biomateriais, previamente aos modelos humanos. Coelhos da Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) são, frequentemente, utilizados como modelo animal indicado para experimentos em diversas áreas, incluindo a Ortopedia e a Cirurgia Crânio-maxilofaciais (CALASANS-MAIA *et al.*, 2009; POLO *et al.*, 2013).

Os animais utilizados neste trabalho apresentaram evolução clínica normal, não se observando quaisquer sinais de infecção ou complicações. A cicatrização da ferida cirúrgica ocorreu por primeira intenção, sendo os pontos retirados no décimo quarto dia, sem que houvesse indícios de rejeição do biomaterial.

No nosso estudo, a opção da tíbia como sítio receptor dos enxertos foi na tentativa de reproduzir a região posterior da mandíbula atrófica devido à semelhança da baixa vascularização do osso, bem como alta densidade óssea encontrada na região. Durante a colocação dos blocos minerais xenógenos com e sem membrana, nosso grupo teve o cuidado de colocá-los de forma igualmente dividida na parte medial e distal da epífise proximal da tíbia evitando possível viés da ação da proximidade à epífise óssea, que apresentam melhor potencial de vascularização.

Urist, em 1965, a partir de matriz óssea desmineralizada, isolou um extrato proteico denominado por ele como BMP, substância posteriormente classificada como pertencentes à família dos fatores de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), com capacidade de induzir a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos secretores de matriz óssea. As BMP são moléculas diméricas presentes no tecido ósseo responsáveis fisiologicamente por manter a integridade do esqueleto ósseo devido à microfraturas diárias decorrentes da biomecânica de nosso esqueleto (LIND *et al.*, 1996).

A BMP-2 é uma das proteínas com maior capacidade osteoindutora e possui efeitos biológicos pleiotrópicos, isto é, a expressão do gene não se encontra restrita a um único tipo de célula ou órgão, mas sim a diversas localizações e/ou em diversos momentos do processo de desenvolvimento do organismo, produzindo variados efeitos segundo os contextos de expressão, podendo atuar em vários outros tecidos além de osso.

A utilização da BMP-2, tanto em estudos experimentais como em estudos clínicos, demonstrou resultados encorajadores (CORNELINI *et al.*, 2004; HERFORDET *et al.*, 2012; HUNZIKER *et al.*, 2012; CHOI *et al.*, 2013) A BMP-2 foi, inicialmente, utilizada em modelos de fratura óssea, fusão vertebral, defeitos de continuidade, tanto em ossos longos quanto craniofaciais, como defeitos do rebordo alveolar. Inicialmente, a BMP-2 foi isolada a partir da matriz óssea bovina desmineralizada, embora essa, para se isolar poucos microgramas de BMP-2, são necessários 100 quilogramas de matriz óssea bovina desmineralizada, tornando o

processo laborioso e de alto custo financeiro. Assim, devido à pequena quantidade de BMPs resultantes da purificação a partir de osso bovino, houve o estímulo para a utilização de técnicas de biologia molecular recombinante para a clonagem dos genes das BMPs e expressão desses genes em sistemas de culturas de células em larga escala (GRANJEIRO *et al.*, 2005).

Um grande número de estudos com humanos e animais tem documentado o sucesso do uso da rhBMP-2 para induzir e aumentar a regeneração óssea para defeitos de ressecção mandibular (BOYNE *et al.*, 1999), defeitos de fenda palatina (BOYNE *et al.*, 1998), crista alveolar (COCHRAN *et al.*, 1999; JUNG *et al.*, 2003) e elevação do soalho do seio maxilar (CHOI *et al.*, 2013). Além disso, tem sido demonstrado que implantes instalados em osso induzido por rhBMP-2 tem osseointegração e respondem a carga funcional em longo prazo similarmente a implantes instalados em osso alveolar natural. Nossos dados clínicos e biométricos revelaram um aumento de volume ósseo ao redor e entre os blocos dos animais que receberam rhBMP-2, colaborando com os resultados obtidos pelos estudos anteriores (MATIN *et al.*, 2003; WIJESKO *et al.*, 2004; MIRANDA *et al.*, 2005; KINSELLA *et al.*, 2011).

É necessário conter a BMP-2 por um relativo período de tempo no local em que se deseja fazer o aumento ósseo, sempre respeitando a tríade: estabilidade mecânica, oxigênio e células (HUNZIKER *et al.*, 2012). Somente assim, uma quantidade significativa de células indiferenciadas poderá ser induzida a se diferenciar em osteoblastos e produzir grande quantidade de matriz óssea. Nesse momento, criou-se a necessidade de haver um material que carregasse a BMP até a sua total metabolização local e que a mantivesse até o momento da sua completa atuação no papel de regeneração óssea.

Inúmeros materiais foram testados como carreadores da rhBMP-2 em estudos pré-clínicos, entre estes, está a esponja de colágeno absorvível (ACS) (TRIPLETTE *et al.*, 2009; HUNZIKER *et al.*, 2012), matriz óssea descalcificada (HERFORD *et al.*, 2012), ácido hialurônico, matriz bovina mineral (JUNG *et al.*, 2009), hidroxiapatita (MIRANDA *et al.*, 2005), fosfato de cálcio (CHOI *et al.*, 2013), ácido polilático (SIGURDISSON *et al.*, 1996), poli metil metacrilato, também chamado de PMMA (ZHANG; DOSCHAK; ULUDAG, 2009).

O carreador perfeito, entre outras características, deve promover condições ideais para angiogênese devido à presença de poros e interconexões, favorecendo a

replicação celular local, deve ser passível de produção em larga escala, não causar reação imunogênica, e ser moldável e mecanicamente estável para a neoformação óssea.

O carreador mais pesquisado e mais difundido na atualidade é a esponja de colágeno (ACS Infuse®), a qual é obtida a partir de tendão bovino. A esponja de colágeno (ACS Infuse®) tem sido o carreador mais utilizado em associação a rhBMP-2 em praticamente quase a totalidade dos protocolos já utilizado em humanos, no entanto, sua baixa estabilidade mecânica tem despertado o interesse em se pesquisar novos carreadores que supram as desvantagens de estabilidade da membrana de colágeno (TRIPLETTE *et al.*, 2009; THOMA *et al.*, 2010; KINSELLA *et al.*, 2011; SCHMITT *et al.*, 2011)

No entanto, em nosso estudo, a presença de membrana foi associada ao menor crescimento ósseo independentemente da localização do enxerto, descartando, assim, o efeito da ação da gravidade e a falta de estabilidade mecânica em ambos os grupos, semelhante aos achados de Rothamel e colaboradores em 2008 e 2009.

No momento, não há um consenso na literatura a respeito da concentração ideal de rhBMP-2 associada a outros carreadores diferentes da esponja de colágeno (ACS Infuse®), isso dificulta a comparação dos resultados obtidos nos trabalhos (WIKESJÖ *et al.*, 2008; KIM; SHIN; SHIN, 2010; SCHMITT *et al.*, 2011; POLO *et al.*, 2013). No presente estudo, a dosagem usada foi semelhante do Polo *et al.* (2013), que avaliou diversos biomateriais em associação ao rhBMP-2 na calvária do mesmo modelo animal.

Intrigantemente, não foi observada a formação óssea excessiva que ultrapassasse o limite dos parafusos ou a superfície oclusal dos blocos utilizados na utilização do fator de crescimento rhBMP 2, diferentemente dos achados de outro estudo do nosso grupo (POLO *et al.*, 2013). A provável explicação desse efeito seria que área de calvária é uma região altamente vascularizada em comparação à tíbia e às cartolas de titânio utilizadas para acondicionamento dos biomateriais, as quais impediram a dispersão da proteína, favorecendo a manutenção da concentração local.

Na maioria dos estudos realizados, as mensurações foram baseadas em dados histológicos e histomorfométricos diferente do presente estudo que observou clinicamente por meio de paquímetro digital possíveis alterações na morfologia

óssea, sendo possível a observação de crescimento ósseo ao redor e entre os blocos, os quais não apresentavam descorticalização. Tendo em vista nossos resultados, a metodologia empregada fornece evidências favoráveis para ganho ósseo em altura de áreas atróficas.

Os resultados mostraram que todos os blocos testados estavam integrados com a cortical óssea do leito receptor, apresentando estabilidade durante a realização dos procedimentos.

Em nosso estudo, analisando os fatores de forma individual, os grupos sem rhBMP2 com membrana e sem membrana de colágeno (ACS Infuse®), o ganho de  $1,4\pm0,8\text{mm}$  e de  $1,5\pm0,8\text{mm}$ , respectivamente, esses não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao crescimento ósseo semelhante a alguns estudos (BOYNE *et al.*, 1997; ROTHAMEL *et al.*, 2008, 2009).

Assim como diversos estudos (JUNG *et al.*, 2003; MATIN *et al.*, 2003; THOMA *et al.*, 2010), quando avaliados quanto à presença de rhBMP2, os grupos apresentaram ganho de  $2,70\pm1,50\text{mm}$ , no grupo com rhBMP 2, e de  $1,5\pm0,8\text{mm}$ , no grupo que não recebeu rhBMP 2, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Os resultados mostram que a adição de rhBMP 2 ao enxerto xenógeno mineral em bloco melhorou o processo de maturação e aumentou o crescimento ósseo. Estatisticamente a proporção de crescimento ósseo foi semelhante ao estudo de Miranda *et al.* (2005), mostrando que a associação de rhBMP-2 a carreadores pode aumentar em, aproximadamente, duas vezes o volume de crescimento ósseo.

Alguns estudos (SCHMITT *et al.*, 2011; KINSELLA *et al.*, 2011; HERFORD *et al.*, 2012) mostram a dificuldade na determinação da concentração ideal de rhBMP 2 a ser utilizada. Isso pode, quando utilizada em concentrações baixas, não promover benefício nenhum nas estruturas que tiveram rhBMP 2 aplicadas.

Quando analisado o fator rhBMP 2, a presença da proteína resultou num crescimento ósseo estatisticamente maior quando o rhBMP 2 foi utilizado sem membrana, ou seja, diretamente no bloco de enxerto bovino mineralizado, um ganho de  $2,7\pm1,5\text{mm}$  em comparação com o grupo que possuía uma membrana recobrimo o bloco que obteve ganho de  $1,43\pm0,78\text{mm}$ . Estudo recente (HERFORD *et al.*, 2012) demonstra que a combinação de rhBMP-2 com uma matriz resistente à compressão mostra-se com uma maior densidade óssea e melhor manutenção do volume dos enxertos quando comparados à combinação de rhBMP 2 com membrana de colágeno (ACS Infuse®).

A dificuldade deste estudo foi confrontar os resultados obtidos com os encontrados em estudos anteriores que avaliassem o ganho ósseo em enxertos xenógenos minerais por meio de histologia e histomorfometria. Mesmo assim, com a metodologia que foi aplicada, foi possível observar um maior ganho ósseo considerável nas áreas que receberam rhBMP-2. É necessária uma maior padronização nas metodologias aplicadas nesse tipo de pesquisa, bem como a continuidade no aprofundamento desta investigação com microtomografia computadorizada e histologia permitindo uma comparação equivalente deste estudo com os demais estudos existentes.

## **7 CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a utilização de rhBMP-2 resultou num maior crescimento ósseo, podendo ser utilizado diretamente no bloco de enxerto.

## REFERÊNCIAS

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J**, 10 Suppl 2, S96-101, Oct. 2001.

ARTZI, Z.V. *et al.* Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and  $\beta$ -Tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 19, n. 3, p. 357-68, 2004.

AUBIN, J.E. Advances in the osteoblast lineage. **Biochem Cell Biol**, v. 76, n. 6, p. 899-910, 1998.

BESSHO, K. *et al.* BMP Stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. **Clin Oral Impl Res**, v. 10, p. 212-18, 1999.

BOYNE, P.J. *et al.* Feasibility Study evaluating rhBMP-2 / absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. **Int J Perio Rest Dent**, v. 17, n. 1, p. 11-25, 1997.

BOYNE, P.J. Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. **J Bone Joint Surg**, v. 83-A, suppl 1, part 2, p. 146-50, 2001.

BOYNE, P.J. *et al.* De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 63, n. 12, p. 1693-707, Dec. 2005.

BUSER, D. *et al.* Evaluation of filling materials in membrane protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. **Clin Oral Implants Res**, v. 9, n. 3, p. 137-50, 1998.

CALASANS-MAIA, M.D. *et al.* The rabbit as an animal model for experimental surgery. **Acta Cir Bras**, v. 24, n. 4, p. 325-8, Jul./Aug. 2009.

CARLSSON, G.E.; THILANDER, H.; HEDEGARD, B. Changes in contour of the maxillary alveolar process after extractions with or without of an under immediate full denture. **Acta Odontol Scand**, v. 25, p. 21-43, 1967.

CHIAPASCO, M.; CASENTINI, P.; ZANIBONI, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, Suppl: 237-59, 2009.

CHOI, Y. *et al.* Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Stimulates the Osteogenic Potential of the Schneiderian Membrane: A Histometric Analysis in Rabbits. **Tissue Eng**, Part A, May. 10 2013.

COCHRAN, D.L. *et al.* Radiographic analysis of regenerated bone around endosseous implants in the canine using recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 12, p. 739-48, 1997.

COCHRAN, D.L. *et al.* Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein – 2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3 – year results of a pilot study in humans. **J Periodontol**, v. 71, n. 8, p. 1241-57, ago. 2000.

CORNELINI, R. *et al.* Deproteinized bovine bone and biodegradable barrier membranes to support healing following immediate placement of transmucosal implants: a short-term controlled clinical trial, v. 24, n. 6, p. 555-63, Dec. 2004.

ESPOSITO, M. *et al.* The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 21, n. 5, p. 696-710, Sep./Oct. 2006.

FELICE, P. *et al.* Vertical bone augmentation versus 7-mm-long implants in posterior atrophic mandibles. Results of a randomised controlled clinical trial of up to 4 months after loading. **Eur J Oral Implantol**, Spring, v. 2, n. 1, p. 7-20, 2009.

FUJITA, R. *et al.* Bone augmentation osteogenesis using hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate blocks. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 61, n. 9, p. 1045-53, Sep. 2003.

GONÇALVES, E.A.L.; GUIMARÃES, S.A.C.; GARCIA, R.B. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. **Rev Odontol Univ**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 299-304, jul./set. 1998.

GRANJEIRO, J.M. *et al.* Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 10, p. 1463-73, Oct. 2005.

HALL, J. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 1001-10, 2008.

HERFORD, A.S.; LU, M. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 Combined With an Osteoconductive Bulking Agent for Mandibular Continuity Defects in Nonhuman Primates. **J Oral Surg Maxillofac**, v. 70, n. 3, p. 703-16, 2012.

HUNZIKER, E.B. *et al.* Osseointegration: the slow delivery of BMP-2 enhances osteoinductivity. **Bone**, v. 51, n. 1, p. 98-106, jul. 2012.

JEE, W.S.S. "The Skeletal Tissue". In: Weiss, I. **Cell and Tissue Biology**. 6th ed. Urban & Schwarzenberg, Baltimore, 1988. p. 211-54.

JENSEN, S.S. *et al.* Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. **J Oral Maxillofac Implants**, v. 11, p. 55-66, 1996.

JENSEN, S.S. *et al.* Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 3, p. 237-43, Jun. 2006.

JUNG, R.E. *et al.* Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans.. **Clin Oral Implants Res**, v. 14, n. 5, p. 556-68, Oct. 2003.

JUNG, R.E. *et al.* A randomized-controlled clinical trial evaluating clinical and radiological outcomes after 3 and 5 years of dental implants placed in bone regenerated by means of GBR techniques with or without the addition of BMP-2. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 7, p. 660-6, jul. 2009.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Guanabara Koogan, 2004.

KIM, S.J.; SHIN, H.S.; SHIN, S.W. Effect of bone block graft with rhBMP-2 on vertical bone augmentation. **Int J Oral Maxillofacial Surg**, v. 39, n. 9, p. 883-8, 2010.

KINSELLA, C.R.J.; BYKOWSKI, M.R. BMP-2-mediated regeneration of large-scale cranial defects in the canine: an examination of different carriers. **Plast. Reconstr. Surg**, v. 127, n. 5, p. 1865-73, 2011.

KURKCU, M. *et al.* Anorganic bovine-derived hydroxyapatite vs  $\beta$ -tricalcium phosphate in sinus augmentation: a comparative histomorphometric study. **J Oral Implantol**, v. 38, Spec No, p. 519-26, Sep. 2012.

LINDQUIST, L.W.; CARLSSON, G.E.; JEMT, T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. **Clin Oral Implants Res**, v. 7, n. 4, p. 329-36, Dec. 1996.

LORENZ, H.P. *et al.* The impact of biomolecular medicine and tissue engineering on plastic surgery in the 21st century. **Plast Reconstr Surg**, v. 105, n. 7, p. 2467-81, jun. 2000.

LUNDGREN, S. *et al.* Strategies in reconstruction of the atrophic maxilla with autogenous bone grafts and endosseous implants. **Periodontol**, v. 47, p. 143-61, 2000.

MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology. **Implant Dent**, v. 7, n. 4, p. 267-76, 1998.

MATIN, K. *et al.* Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 around immediate implants: a pilot study in rats. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 18, n. 2, p. 211-7. Mar./Apr. 2003.

MIRANDA, D.A.O. *et al.* Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the repair of alveolar ridge defects in baboons. **J Periodontol**, v. 76, n. 2, p. 210-20, Feb. 2005.

- PIMENTEL, A.C. *et al.* Reconstruction of the edentulous mandible with fresh frozen bone grafts and implants: a 4-year report of a prospective clinical study. **Cell Tissue Bank**, v. 2, nov. 2012.
- POLO, C.I. *et al.* Effect of recombinant human bone morphogenetic protein 2 associated with a variety of bone substitutes on vertical guided bone regeneration in rabbit calvarium. **J Periodontol**, v. 84, n. 3, p. 360-70, Mar. 2013.
- REDDI, H.A. Bone morphogenetics proteins: an unconventional approach to isolation of First mammalian morphogens. **Cytokine & Growth Factor**, v. 8, n. 1, p. 11-20, 1997.
- REDDI, H.A. Growth factors and morphogens: signals for tissue engineering. In: FISHER, J.P.; MIKOS, A.G.; BRONZINO, J.D. **Tissue Engineering**, Boca Raton: CRC Press. 2007. Cap. 2, p. 2-1/2-5.
- ROTHAMEL, D. *et al.* Vertical augmentation of the mandible using cortico-spongiuous xenoblocks. A histomorphometrical study in dogs. **Schweiz Monatsschr Zahnmed**, German, v. 118, n. 12, p. 1162-9, 2008.
- ROTHAMEL, D. *et al.* Vertical ridge augmentation using xenogenous bone blocks: a histomorphometric study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, n. 2, p. 243-50, Mar./Apr. 2009.
- SARTORI, S. *et al.* Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. **Clin Oral Implants Res**, v. 14, n. 3, p. 369-72, Jun. 2003.
- SCHMITT, C.; LUTZ, R. Bio-Oss® blocks combined with BMP-2 and VEGF for the regeneration of bony defects and vertical augmentation. **Clin Oral Implants Res**, v. 00, p. 1-11, 2011.
- SENDYK, W.R. Reconstruções ósseas utilizando áreas doadoras intra-orais. **Implant News**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 196-7, 2004.
- SENNERBY, L. Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. An experimental study in the rabbit skull bone. **Clin Oral Implants Res**, v. 11, n. 2, p. 99-106, Apr. 2000.
- SIGURDSSON, T.J. *et al.* Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carriers. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 16, n. 6, p. 524-37, Dec. 1996.
- SIMION, M. *et al.* Vertical ridge augmentation by means of deproteinized bovine bone block and recombinant human platelet-derived growth factor-BB: a histologic study in a dog model. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 26, n. 5, p. 415-23, Oct. 2006.
- SIMION, M. *et al.* Vertical ridge augmentation with guided bone regeneration in association with dental implants: an experimental study in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 1, p. 86-94, Feb. 2007.

TAKAGI, K.; URIST, M.R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **Ann Surg**, v. 196, n. 1, p. 100-9, July 1982.

TETSCH, J.; TETSCH, P.; LYSEK, D.A. Long-term results after lateral and osteotome technique sinus floor elevation: a retrospective analysis of 2190 implants over a time period of 15 years. **Clin Oral Impl Res**, v. 21, p. 497-503, 2010.

THOMA, D.S. *et al.* Ridge augmentation using recombinant bone morphogenetic protein-2 techniques: an experimental study in the canine. **J Periodontol**, v. 81, n. 12, p. 1829-38, Dec. 2010.

TORRES, J. *et al.* Effect of combining platelet-rich plasma with anorganic bovine bone on vertical bone regeneration: early healing assessment in rabbit calvariae. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 25, n. 1, p. 123-9, Jan./Feb. 2009.

TRIPLETT, R.G. *et al.* Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 67, n. 9, p. 1947-60, Sep. 2009.

URIST, M.R. Bone formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-99, 1965.

URIST, M.R.; CRAVEN, P.L. Bone cell differentiation in avian species: with comments on multinucleation and morphogenesis. **Fed Proc [S.I.]**, v. 29, n. 5, p. 1680-93, Sep./Oct. 1970.

URIST, M.R.; STRATES, B.S. Bone Morphogenetic Protein. **J Dent Des**, v. 50, p. 1392-406, 1971.

VON, A.T. *et al.* Lateral ridge augmentation and implant placement: an experimental study evaluating implant osseointegration in different augmentation materials in the canine mandible. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 6, p. 343-54, 2001.

WAASDORP, J. Allogeneic Bone Onlay Grafts for Alveolar Ridge Augmentation: A Systematic Review. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 25, p. 525-53, 2010.

WANG, E.A. *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. **Proc Natl Acad. Sci, USA**, v. 87, p. 2220-24, mar. 1990.

WIKESJO, E.U. *et al.* rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. **Clin Oral Implants Res**, v. 15, n. 2, p. 194-204, Apr. 2004.

WIKESJÖ, U.M.E. *et al.* Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 1001-10, 2008.

WIKESJO, U.M.E. *et al.* Bone formation at recombinant human bone morphogenetic protein-2-coated titanium implants in the posterior maxilla (Type IV bone) in non-human primates. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 11, p. 992-1000, nov. 2008.

WOZNEY, J.M. *et al.* Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Science**, v. 242, n. 4885, p. 1528-34, 16 Dec. 1988.

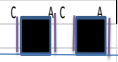
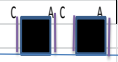
WOZNEY, J.M. Bone Morphogenetics Proteins. **Progress in Growth Factor Research**, v. 1, p.267-80, 1989.

WOZNEY, J.M. The Bone Morphogenetic Protein family and Osteogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, p. 160-7, 1992.

YAMAGUCHI, A. *et al.* Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 220, n. 2, p. 366-71, 18 Mar 1996.

ZHANG, S. *et al.* Pharmacokinetics and bone formation by BMP-2 entrapped in polyethylenimine-coated albumin nanoparticles. **Biomaterials**, v. 30, p. 5143-55, 2009.

## APÊNDICE A - Tabelas de Dados Brutos Pré e Pós-Operatório

|                                                                                   |                                        |                                                                                   |                                         |                                            |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|--|
| Bloco proximal                                                                    |                                        | Bloco Distal                                                                      |                                         |                                            |  |
| C                                                                                 | A                                      | C                                                                                 | A                                       |                                            |  |
|  |                                        |  |                                         |                                            |  |
| Medidas pré operatórias:                                                          |                                        |                                                                                   |                                         |                                            |  |
| Coelhas grupo 1                                                                   | Perna direita / Bloco proximal epífise | Perna direita / Bloco distal epífise                                              | Perna esquerda / Bloco proximal epífise | Perna esquerda / Bloco distal epífise      |  |
| coelha número 3 (3,53kg)                                                          | C=5,52 A=5,25                          | C=4,95mm/A=5,33mm (membrana sim)                                                  | C=5,07mm/A=4,92mm (membrana sim)        | C=5,60mm/A=5,69mm                          |  |
| Coelha número 5 (3,900kg)                                                         | C= 6,02mm/A=5,79mm                     | C= 5,23mm/A=5,65mm (membrana sim)                                                 | C= 5,56mm/A=4,7mm (membrana sim)        | C= 5,46mm/A=5,45mm                         |  |
| Coelha número 11 (3,3kg)                                                          | C=5,16mm/ A=5,17mm/l=5,08mm            | C=5,27mm/A=5,68mm (membrana sim)                                                  | C=5,50mm/A=5,32mm (membrana sim)        | C=5,36mm/A=5,27mm                          |  |
| Coelha número 12 (3,5kg)                                                          | C=5,79mm/A=6,25mm (membrana sim)       | C=4,42mm/A=5,09mm                                                                 | C=5,70mm/A=5,64mm                       | C=4,96mm/A=5,10mm (membrana sim)           |  |
| Coelha número 13 (3,5kg)                                                          | C=5,61mm/A=6,03mm/l=5,41mm             | C=5,62mm/A=4,77mm (membrana Sim)                                                  | C=5,53mm/A=5,66mm (membrana sim)        | C=5,35mm/A=4,95mm                          |  |
| Coelha número 14 (xxkg)                                                           | C=5,02mm/A=5,04mm (membrana sim)       | C=5,41mm/A=5,14mm                                                                 | C=5,54mm/A=5,74mm                       | C=5,10mm/A=5,09mm (membrana sim)           |  |
| Coelha número 16 (xxkg)                                                           | C=4,81mm/A=4,41mm (membrana sim)       | C=4,62mm/A=4,54mm                                                                 | C=5,25mm/A=5,25mm                       | C=4,82mm/A=5,12mm (membrana sim)           |  |
| Coelha número 18 (xxkg)                                                           | C=6,02mm/A=6,02mm (membrana sim)       | C=5,25mm/A=5,46mm                                                                 | C=5,78mm/A=5,78mm                       | C=5,56mm/A=5,56mm (membrana sim)           |  |
| Coelha número 20 (xxkg)                                                           | C=5,36mm/A=5,36mm(membrana sim)        | C=5,09mm/A=5,34mm                                                                 | C= 5,78mm/A=5,78mm                      | C=6,14mm/A=6,14mm (membrana sim)           |  |
| Medidas após eutanásia:                                                           |                                        |                                                                                   |                                         |                                            |  |
| Coelhas grupo 2: rhBMP2                                                           | Perna direita / Bloco proximal epífise | Perna direita / Bloco distal epífise                                              | Perna esquerda / Bloco proximal epífise | Perna esquerda / Bloco distal epífise      |  |
| Coelha número 6                                                                   | C=5,87mm/A=6,11 (membrana sim)         | C=5,45mm/A=5,45mm                                                                 | C=5,24mm/A=5,24mm                       | C=5,73mm/A=5,79mm (membrana sim)           |  |
| Coelha número 8                                                                   | C=5,36mm/A=5,36mm (membrana sim)       | C=4,90mm/A=4,90mm                                                                 | C= 4,71/ A=4,71mm                       | C= 6,15mm/A=6,63mm (membrana não colocada) |  |
| Coelha número 15                                                                  | C=5,49mm/A=5,49mm                      | C=6,73mm/A=6,73mm (membrana sim)                                                  | C=4,85mm/A=5,06mm (membrana sim)        | C=7,14mm/A=7,14mm                          |  |
| Coelha número 17                                                                  | C=5,15mm/A=5,5mm                       | C=5,0mm/A=5,88mm (membrana sim)                                                   | C=5,81mm/A=5,51mm (membrana sim)        | C=6,12mm/A=5,80mm                          |  |
| Coelha número 19                                                                  | C=6,40mm/A=6,74mm                      | C=4,64mm/A=4,98mm (membrana sim)                                                  | C=5,98mm/A=5,48mm (membrana sim)        | C=4,84mm/a=5,25mm                          |  |
| Coelha número 21                                                                  | C= 6,06mm/A=5,73mm                     | C=5,84mm/A=5,43mm (membrana sim)                                                  | só a perna direita foi operada          | só a perna direita foi operada             |  |
| Coelha número 22                                                                  | C=5,36mm/A=5,96mm (membrana sim)       | C=4,76mm/A=5,07mm                                                                 | C=4,95mm/A=4,95mm                       | C=5,26mm/A=5,26mm                          |  |
| Coelha número 23                                                                  | C=5,75mm/A=5,75mm                      | C=6,78mm/A=6,51mm (membrana sim)                                                  | C=6,33mm/A=6,33mm (membrana sim)        | C=5,36mm/A=5,36mm                          |  |
| Coelha número 24                                                                  | C=6,30mm/A=5,73mm (membrana sim)       | C=5,50mm/A=5,50mm                                                                 | C= 6,51mm/A=6,51mm                      | C=6,13mm/A6,13mm (membrana sim)            |  |
| Medidas após eutanásia:                                                           |                                        |                                                                                   |                                         |                                            |  |
| Grupo 1:                                                                          | Perna direita / Bloco proximal epífise | Perna direita / Bloco distal epífise                                              | Perna esquerda / Bloco proximal epífise | Perna esquerda / Bloco distal epífise      |  |
| coelha número 3                                                                   | P=5,08mm - l = 5,2mm                   | P = 4,48mm                                                                        | P = 4,97mm - l=4,53                     | P = 4,79mm                                 |  |
| coelha número 5                                                                   | P=3,75mm - l = 6,79mm                  | P = 4,09mm                                                                        | P = 2,61mm - l = 6,19mm                 | P = 3,67mm                                 |  |
| Coelha número 11                                                                  | P = 4,23mm l = 5,13mm                  | P =4,54mm                                                                         | P= 4,9mm - l = 5,14mm                   | P = 3,39mm                                 |  |
| Coelha número 12                                                                  | P = 3,27mm l = 4,48mm                  | P = 2,84mm                                                                        | P = 2,77mm l= 4,68mm                    | P = 3,42mm                                 |  |
| Coelha número 13                                                                  | 5,2mm l= 6,84mm                        | P= 3,01                                                                           | exposição cirúrgica. PERDA              | P = exposição cirúrgica                    |  |
| Coelha número 14                                                                  | P = 3,49mm l= 4,75mm                   | P = 3,49mm                                                                        | P = 4,96mm l= 4,91mm                    | P = 3,15mm                                 |  |
| Coelha número 16                                                                  | 3,35mm l= 4,91mm                       | P = 2,70mm                                                                        | P = 3,01mm l= 6,01mm                    | P = 3,52mm                                 |  |
| Coelha número 18                                                                  | P = 4,53mm l= 6,44mm                   | P = 3,56mm                                                                        | P = 4,87mm l= 4,7mm                     | P = reab parafuso. (medida parafuso)       |  |
| Coelha número 20                                                                  | P = 3,59mm l= 5,90mm                   | P = 2,84mm                                                                        | exposição cirúrgica. PERDA              | P = exposição cirúrgica                    |  |
| Medidas após eutanásia:                                                           |                                        |                                                                                   |                                         |                                            |  |
| Coelhas grupo 2: rhBMP2                                                           | Perna direita / Bloco proximal epífise | Perna direita / Bloco distal epífise                                              | Perna esquerda / Bloco proximal epífise | Perna esquerda / Bloco distal epífise      |  |
| Coelha número 6                                                                   | P= 4,69mm l=4,74mm                     | P= 5,09mm                                                                         | P= 4,73mm l= 4,28mm                     | P= 3,7mm                                   |  |
| Coelha número 8                                                                   | P= 1,93mm l=5,63mm                     | P=3,11mm                                                                          | P=2,16mm l=5,54 mm                      | P=2,58 mm                                  |  |
| Coelha número 15                                                                  | P=3,33mm l= 6,23 mm                    | P=4,38 (medida de parafuso)                                                       | P= 3,19 mm l=6,76                       | P=4,09                                     |  |
| Coelha número 17                                                                  | P= 1,65mm l= 2,14mm                    | P= 0,39 mm                                                                        | P=4,63mm l= 3,53 mm                     | P=2,03 mm                                  |  |
| Coelha número 19                                                                  | P=4,27 mm l= 3,15 mm                   | P= 2,97mm                                                                         | P= 0 mm l= 2,71 mm                      | P= 0 mm                                    |  |
| Coelha número 21                                                                  | P= 0 mm l = 3,37 mm                    | P= 0 mm                                                                           | Perna não operada                       | Perna não operada                          |  |
| Coelha número 22                                                                  | P= 3,08mm l= 2,89 mm                   | P= 2,49 mm                                                                        | P= 0 mm l=2,84 mm                       | P = 0 mm                                   |  |
| Coelha número 23                                                                  | P= 3,41 mm l = 5,60 mm                 | P= 4,27 mm                                                                        | P= 4,16 mm l= 6,43 mm                   | P= 3,14 mm                                 |  |
| Coelha número 24                                                                  | P= 4,49 mm l = 6,32 mm                 | P= 4,96 mm                                                                        | P= 4,38 mm l= 5,04 mm                   | P= 2,95 (medida de parafuso)               |  |

## APÊNDICE B - Tabela de Crescimento Ósseo

| G1SM (n=14) mm       |              |          |          | G1CM (n=16) mm       |              |          |          | G2SM (n=14) mm       |              |          |          | G2CM (n=14) mm       |              |          |          |
|----------------------|--------------|----------|----------|----------------------|--------------|----------|----------|----------------------|--------------|----------|----------|----------------------|--------------|----------|----------|
| Altura bloco inicial | Altura final | parafuso | variação | Altura bloco inicial | Altura final | parafuso | variação | Altura bloco inicial | Altura final | parafuso | variação | Altura bloco inicial | Altura final | parafuso | variação |
| 5,25                 | 5,08         | 0        | 0,17     | 6,25                 | 3,37         | 0        | 2,88     | 5,49                 | 3,33         | 0        | 2,16     | 6,11                 | 4,69         | 0        | 1,42     |
| 5,79                 | 3,75         | 0        | 2,04     | 5,04                 | 3,49         | 0        | 1,55     | 5,5                  | 1,25         | 0        | 4,25     | 5,96                 | 3,08         | 0        | 2,88     |
| 5,17                 | 4,23         | 0        | 0,94     | 4,41                 | 3,35         | 0        | 1,06     | 6,74                 | 4,27         | 0        | 2,47     | 5,73                 | 4,49         | 0        | 1,24     |
| 6,03                 | 5,2          | 0        | 0,83     | 6,02                 | 4,53         | 0        | 1,49     | 5,73                 | 0            | 0        | 5,73     | 6,73                 | 4,38         | 1,25     | 1,1      |
| 4,42                 | 2,84         | 0        | 1,58     | 5,36                 | 3,59         | 0        | 1,77     | 5,75                 | 3,41         | 0        | 2,34     | 5                    | 0,39         | 0        | 4,61     |
| 5,41                 | 3,49         | 0        | 1,92     | 4,95                 | 4,48         | 0        | 0,47     | 5,5                  | 3,96         | 0        | 1,54     | 4,64                 | 2,97         | 0        | 1,67     |
| 5,09                 | 2,84         | 0        | 2,25     | 5,23                 | 4,09         | 0        | 1,14     | 5,24                 | 4,73         | 0        | 0,51     | 5,84                 | 0            | 1,09     | 4,75     |
| 5,64                 | 2,77         | 0        | 2,87     | 5,27                 | 4,54         | 0        | 0,73     | 4,95                 | 0            | 0        | 4,95     | 6,78                 | 4,27         | 0        | 2,51     |
| 5,74                 | 4,96         | 0        | 0,78     | 5,62                 | 3,01         | 0        | 2,61     | 6,51                 | 4,38         | 0        | 2,13     | 5,06                 | 3,19         | 0        | 1,87     |
| 5,25                 | 3,01         | 0        | 2,24     | 4,9                  | 4,9          | 0        | 0        | 7,14                 | 4,09         | 0        | 3,05     | 5,51                 | 4,63         | 0        | 0,88     |
| 5,78                 | 4,87         | 0        | 0,91     | 4,7                  | 2,61         | 0        | 2,09     | 6,12                 | 2,03         | 0        | 4,09     | 5,48                 | 4,63         | 0        | 0,85     |
| 5,6                  | 4,79         | 0        | 0,81     | 5,32                 | 4,9          | 0        | 0,42     | 4,84                 | 0            | 0        | 4,84     | 6,33                 | 4,16         | 0        | 2,17     |
| 5,46                 | 3,67         | 0        | 1,79     | 4,96                 | 3,42         | 0        | 1,54     | 5,26                 | 0            | 0        | 5,26     | 5,73                 | 3,7          | 0        | 2,03     |
| 5,36                 | 3,39         | 0        | 1,97     | 5,1                  | 3,15         | 0        | 1,95     | 5,36                 | 3,14         | 0        | 2,22     | 6,13                 | 2,95         | 1,17     | 2,01     |
|                      |              |          | 0        | 4,82                 | 3,52         | 0        | 1,3      |                      |              |          |          |                      |              |          |          |
|                      |              |          | 0        | 5,56                 | 4,87         | 0        | 0,69     |                      |              |          |          |                      |              |          |          |

### APÊNDICE C - Tabela com Cálculos Estatísticos

| G1 sem membrana (n=14) mm | G1 com membrana (n=16) mm | G2 sem membrana (n=14) mm | G2 com membrana (n=14) mm |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,17                      | 2,88                      | 2,16                      | 1,42                      |
| 2,04                      | 1,55                      | 4,25                      | 2,88                      |
| 0,94                      | 1,06                      | 2,47                      | 1,24                      |
| 0,83                      | 1,49                      | 5,73                      | 1,1                       |
| 1,58                      | 1,77                      | 2,34                      | 4,61                      |
| 1,92                      | 0,47                      | 1,54                      | 1,67                      |
| 2,25                      | 1,14                      | 0,51                      | 4,75                      |
| 2,87                      | 0,73                      | 4,95                      | 2,51                      |
| 0,78                      | 2,61                      | 2,13                      | 1,87                      |
| 2,24                      | 0                         | 3,05                      | 0,88                      |
| 0,91                      | 2,09                      | 4,09                      | 0,85                      |
| 0,81                      | 0,42                      | 4,84                      | 2,17                      |
| 1,79                      | 1,54                      | 5,26                      | 2,03                      |
| 1,97                      | 1,95                      | 2,22                      | 2,01                      |
| 0                         | 1,3                       |                           |                           |
| 0                         | 0,69                      |                           |                           |