

**MILTON MIKIO MORISHIN FILHO**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE CRANIOTOMIAS TRATADAS COM PROTEÍNA  
MORFOGENÉTICA ÓSSEA (rhBMP-2) E CRANIOTOMIAS TRATADAS COM PÓ  
DE OSSO EM SUÍNOS: AVALIAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO ENXERTO**

**CURITIBA**

**2014**

**MILTON MIKIO MORISHIN FILHO**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE CRANIOTOMIAS TRATADAS COM PROTEÍNA  
MORFOGENÉTICA ÓSSEA (rhBMP-2) E CRANIOTOMIAS TRATADAS COM PÓ  
DE OSSO EM SUÍNOS: AVALIAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO ENXERTO**

Tese apresentada ao Curso Pós-Graduação em  
Clínica Cirúrgica, do Setor de Ciências da Saúde,  
da Universidade Federal do Paraná, como  
requisito para a obtenção do grau de Mestre em  
Clínica Cirúrgica.

Orientador: Dr. Renato da Silva Freitas

**CURITIBA**

**2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Morishin Filho, Milton Mikio

K91 Estudo comparativo entre craniotomias tratadas com proteína morfogenética óssea (rhBMP-2) e craniotomias tratadas com pó de osso em suínos: avaliação da integração do enxerto / Milton Mikio Morishin Filho – Curitiba, 2014.

97 f.

Orientador: Prof. Dr. Renato da Silva Freitas.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Craniotomia. 2. Transplante Ósseo. 3. Proteína Morfogenética Óssea. 4. osteogênese. 5. Suínos. I. Título. II. Freitas, Renato da Silva.

NLM: WO 600

Ao meu filho Julio, a minha mulher Paola e aos animais...  
Aos meus pais, Milton e Helena, a eles todos os créditos...

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer ao Programa de Pós Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela oportunidade de prosperar cientificamente na carreira de docência.

Assim como a Universidade Tuiuti do Paraná (UTP), que colaborou de forma fundamental na realização do projeto de pesquisa.

À minha equipe de trabalho, os Médicos Veterinários Residentes Daniel H. Sano; Liédge C. Simioni; Marília de Medeiros Augusto; Sílvia P. Bueno, e funcionários da UTP (Emerson Faria e Cida) que viabilizaram a realização do experimento, tornando possível vencer esse desafio.

Ao Dr. Sérgio Eiji Ono e ao DAPI (Diagnóstico Avançado por Imagem – Liga das Senhoras Católicas de Curitiba) que colaboraram na análise por tomografia computadorizada.

À Dr<sup>a</sup>. Maria Fernanda Soares e Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) que colaboraram na análise histopatológica.

A Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Laura Angeli que foi peça fundamental para encerrar a busca por um orientador, apresentando-me o meu atual orientador.

A todos os professores do departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Botucatu. Em especial a Prof.<sup>a</sup> Titular Sheila C. Rahal que sempre me inspirou e foi o meu modelo de excelência em cirurgia.

Ao meu primo e colega de profissão Rafael I. Cipullo e a Dr<sup>a</sup>. Juliana Brondani, que me ajudaram muito com as análises estatísticas.

Ao médico João Felipe Z. Aurichio, pela ajuda fundamental na realização do experimento e análises dos resultados.

E não poderia deixar agradecer de forma muito especial ao meu Orientador Dr. Renato da Silva Freitas que aceitou o desafio de me orientar sendo sempre atencioso e solícito.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
2.1 OSSIFICAÇÃO.....	23
2.2 CRANIOPLASTIA.....	24
2.3 PRINCÍPIO BIOLÓGICO DA REPARAÇÃO E REVASCULARIZAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS AUTÓGENOS .....	26
2.4 TIPOS DE ENXERTOS.....	27
2.4.1 AUTOENXERTOS OU ENXERTOS AUTÓGENOS.....	27
2.4.2 ENXERTOS HOMÓGENOS OU ALOENXERTOS.....	27
2.4.3 XENOENXERTOS.....	27
2.5 PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA (BMP).....	28
2.6 CARREADORES.....	31
2.7 RESPOSTA IMUNE A PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA.....	33
2.8 PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA RECOMBINANTE HUMANA (rhBMP).....	34
<b>3 OBJETIVO.....</b>	<b>38</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 EXPERIMENTO.....	41
4.2 AMOSTRA.....	41
4.3 LOCAL DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	42
4.4 PROTOCOLO ANESTÉSICO.....	42
4.5 PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA (rhBMP-2)	42
4.6 CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO.....	43
4.7 PÓS-OPERATÓRIO.....	47
4.8 EUTANÁSIA.....	48
4.9 COLETA DE MATERIAL.....	49
4.10 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DAS ANÁLISES.....	49
4.11 ANÁLISE DA TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA.....	49

4.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	51
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
5.1 ANÁLISE POR TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA.....	55
5.1.1 PORCOS EUTANASIADOS AOS 30 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS..	55
5.1.2 RECONSTRUÇÃO EM 3D DO CRÂNIO DOS PORCOS EUTANASIADOS 30 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS.....	59
5.1.3 PORCOS EUTANASIADOS AOS 60 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS..	62
5.1.4 RECONSTRUÇÃO EM 3D DO CRÂNIO DOS PORCOS EUTANASIADOS 60 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS.....	65
5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	69
5.2.1 REABSORÇÃO ÓSSEA 30 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS.....	71
5.2.2 REABSORÇÃO ÓSSEA 60 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS.....	72
5.2.3 NEOFORMAÇÃO ÓSSEA 30 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS.....	73
5.2.4 NEOFORMAÇÃO ÓSSEA 60 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS.....	74
5.2.5 INFILTRADO INFLAMATÓRIO 30 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS.....	75
5.2.6 INFILTRADO INFLAMATÓRIO 60 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS.....	76
5.2.7 DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO AO TRICRÔMIO DE MASSON 30 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS.....	77
5.2.8 DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO AO TRICRÔMIO DE MASSON 60 DIAS PÓS-OPERATÓRIOS.....	78
5.2.9 NEOCOLAGENIZAÇÃO AO PICROSSIRIUS 30 DIAS PÓS- OPERATÓRIOS.....	79
5.2.10 NEOCOLAGENIZAÇÃO AO PICROSSIRIUS 60 DIAS PÓS- OPERATÓRIOS.....	80
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A.C (antes de Cristo)

& (apóstrofe)

% (porcentagem)

= (sinal de igual)

> (sinal de maior)

< (sinal de menor)

cm (centímetros)

cm<sup>2</sup> (centímetros quadrados)

m (metro)

mm (milímetros)

kv (quilovolts)

mAs (miliampères)

TC (tomografia computadorizada)

kg (quilo)

mg (miligrama)

mg/kg (miligrama por quilo)

UI/kg (unidade internacional por quilo)

ml/kg (mililitro por quilo)

DNA (ácido dexossiribonucléico)

BMP (proteína morfogenética óssea)

rhBMP-2 (proteína morfogenética óssea recombinante humana dois)

OP (sinônimo de BMP-7)

TGF-β (fator de transformação do crescimento beta)

PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta)

FGF (fator de crescimento fibroblástico)

VEGF (fator do crescimento do endotélio vascular)

IGF (somatomedina C)

TGF (fator de crescimento tumoral)

SMAD (proteína intracelular)

IM (intramuscular)

IV (intravenoso)

FDA (Food and Drug Administration)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
<b>FIGURA 1</b> – Etapas para a criação do rhBMP-2 (Medtronic).....	35
<b>FIGURA 2</b> – Componentes que contém cada kit de INFUSE® Bone Graft.....	36
<b>FIGURA 3</b> – Identificação dos porcos utilizando-se a tatuagem de algarismos arábicos em orelha.....	41
<b>FIGURA 4</b> – Fracionamento da esponja de colágeno em partes de 2,5 cm x 3,75 cm.....	43
<b>FIGURA 5</b> – Demarcação do local da incisão de pele em crânio de porco.....	45
<b>FIGURA 6</b> – Posicionamento do craniótomo em osso parietal de porco.....	45
<b>FIGURA 7</b> – Afastadores evidenciando craniotomia em suíno realizada com craniótomo 6 mm de diâmetro em osso parietal direito e esquerdo .....	46
<b>FIGURA 8</b> – Craniotomia em osso parietal direito de suíno preenchido com esponja de colágeno contendo rhBMP-2 (A) e craniotomia em osso parietal esquerda preenchida com pó de osso autógeno (B). A seta evidencia o local de aplicação do enxerto.....	46
<b>FIGURA 9</b> – Porcos mantidos em baía em pós-operatório.....	47
<b>FIGURA 10</b> – Seta evidenciando a excelente cicatrização do ponto de pele 10 dias após a realização da craniotomia.....	48
<b>FIGURA 11</b> – Determinação da espessura de craniotomia direita (19,4mm) e craniotomia esquerda (1,2mm) através de tomografia computadorizada em porco.....	50
<b>FIGURA 12</b> – Determinação da espessura de craniotomia direita (17,1 mm) tratadas com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (1,0 mm) tratada com pó de osso através de tomografia computadorizada em P1 (30 dias pós-operatório).....	56
<b>FIGURA 13</b> – Determinação da espessura de craniotomia direita (17,2 mm) tratadas com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (1,1 mm) tratada com pó de osso através de tomografia computadorizada em P3 (30 dias pós-operatório).....	56
<b>FIGURA 14</b> – Determinação da espessura de craniotomia direita (19,4 mm) tratadas com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (1,2 mm) tratada com pó de osso através de tomografia computadorizada em P5 (30 dias pós-operatório).....	57
<b>FIGURA 15</b> – Determinação da espessura de craniotomia direita (9,1 mm) tratadas com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (0,1 mm) tratada com pó de osso através de tomografia computadorizada em P11 (30 dias pós-operatório).....	57
<b>FIGURA 16</b> – Determinação da espessura de craniotomia direita (13,9 mm) tratadas com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (1,2 mm) tratada com pó de osso através de tomografia computadorizada em P12 (30 dias pós-operatório).....	58
<b>FIGURA 17</b> – Determinação da espessura de craniotomia direita (20,9 mm) tratadas com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (1,3 mm) tratada com pó de osso através de tomografia computadorizada em P13 (30 dias pós-operatório).....	58
<b>FIGURA 18</b> – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P1) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (SETA FINA)	

	autógeno aos 30 dias pós-operatório).....	59
<b>FIGURA 19 –</b>	Reconstrução em 3D de crânio de porco (P3) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (SETA FINA) aos 30 dias pós-operatório.....	59
<b>FIGURA 20 –</b>	Reconstrução em 3D de crânio de porco (P5) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (SETA FINA) aos 30 dias pós-operatório.....	60
<b>FIGURA 21 –</b>	Reconstrução em 3D de crânio de porco (P11) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (SETA FINA) aos 30 dias pós-operatório.).....	60
<b>FIGURA 22 –</b>	Reconstrução em 3D de crânio de porco (P12) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (SETA FINA) aos 30 dias pós-operatório.).....	61
<b>FIGURA 23 –</b>	Reconstrução em 3D de crânio de porco (P13) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (SETA FINA) aos 30 dias pós-operatório.....	61
<b>FIGURA 24 –</b>	Determinação da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (4,1 mm) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (2,1 mm) através de tomografia computadorizada em P2 (60 dias pós-operatório).....	62
<b>FIGURA 25 –</b>	Determinações da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (10,6 mm) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (1,1 mm) através de tomografia computadorizada em P4 (60 dias pós-operatório).....	63
<b>FIGURA 26 –</b>	Determinações da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (17,6 mm) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (9,8 mm) através de tomografia computadorizada em P7 (60 dias pós-operatório).....	63
<b>FIGURA 27 –</b>	Determinações da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (4,9 mm) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (0,1 mm) através de tomografia computadorizada em P9 (60 dias pós-operatório).....	64
<b>FIGURA 28 –</b>	Determinações da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (9,2 mm) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (2,6 mm) através de tomografia computadorizada em P8 (60 dias pós-operatório).....	64
<b>FIGURA 29 –</b>	Determinações da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (22,2 mm) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (2,6 mm) através de tomografia computadorizada em P10 (60 dias pós-operatório)....	65
<b>FIGURA 30 –</b>	Reconstrução em 3D de crânio de porco (P2) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório.....	65
<b>FIGURA 31 –</b>	Reconstrução em 3D de crânio de porco (P4) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório.....	66

<b>FIGURA 32 –</b>	Reconstrução em 3D de crânio de porco (P7) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório.....	66
<b>FIGURA 33 –</b>	Reconstrução em 3D de crânio de porco (P8) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda não tratada (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório.....	67
<b>FIGURA 34 –</b>	Reconstrução em 3D de crânio de porco (P9) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda não tratada (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório.....	67
<b>FIGURA 35 –</b>	Reconstrução em 3D de crânio de porco (P10) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda não tratada (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório.....	68
<b>FIGURA 36 –</b>	A e B – aspectos da cicatriz cirúrgica no animal do grupo controle (P8). C e D – aspectos da cicatriz cirúrgica em animal com craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (P5) aos 30 dias pós-operatórios. E e F – aspectos da cicatriz cirúrgica em animal com craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (P4) aos 60 dias. A,C,E- HE, 40x. B,D,F- tricrômico de Masson, 40x.....	69
<b>FIGURA 37 –</b>	Foco de reabsorção óssea visualizado em amostra de animal pertencente ao grupo tratado com BMP (P4). HE, 100x.....	70

<b>TABELA 1</b> –	Média e desvio-padrão da área de osso neoformado na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso autógeno (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.....	55
<b>TABELA 2</b> –	Média e desvio-padrão da área de osso neoformado na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso autógeno (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.....	62
<b>TABELA 3</b> –	Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.....	71
<b>TABELA 4</b> –	Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.....	72
<b>TABELA 5</b> –	Distribuição de frequência do grau de neoformação óssea na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.....	73
<b>TABELA 6</b> –	Distribuição de frequência do grau de neoformação óssea na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.....	74
<b>TABELA 7</b> –	Distribuição de frequência do grau de infiltrado inflamatório na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.....	75
<b>TABELA 8</b> –	Distribuição de frequência do grau de infiltrado inflamatório na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.....	76
<b>TABELA 9</b> –	Distribuição de frequência do grau de deposição de colágeno ao tricrômico de Masson na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.....	77
<b>TABELA 10</b> –	Distribuição de frequência do grau de deposição de colágeno ao tricrômico de Masson na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.....	78
<b>TABELA 11</b> –	Distribuição de frequência do grau de neocolagenização ao picrossírius na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.....	79
<b>TABELA 12</b> –	Distribuição de frequência do grau de neocolagenização ao picrossírius na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.....	80

<b>GRÁFICO 1 –</b>	Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea categorizada em 0 (ausência de sinais de reabsorção) ou 1 (presença de < 25% de reabsorção do material de enxerto ou do leito cirúrgico) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.....	71
<b>GRÁFICO 2 –</b>	Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea categorizada em 0 (ausência de sinais de reabsorção) ou 1 (presença de < 25% de reabsorção do material de enxerto ou do leito cirúrgico) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.....	72
<b>GRÁFICO 3 –</b>	Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea categorizada em 0 (ausência de sinais de reabsorção); 1 (Presença de <25% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado); 2 (Presença de 25-50% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado) e 3 (Presença de >50% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.....	73
<b>GRÁFICO 4 –</b>	Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea categorizada em 0 (ausência de sinais de reabsorção); 1 (Presença de <25% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado); 2 (Presença de 25-50% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado) e 3 (Presença de >50% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.....	74
<b>GRÁFICO 5 –</b>	Distribuição de frequência do grau de infiltrado inflamatório categorizada em 0 (ausência de infiltrado inflamatório); 1 (Presença de <25% de infiltrado inflamatório); 2 (Presença de 25-50% de infiltrado inflamatório) e 3 (Presença de >50% de infiltrado inflamatório) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação. ....	75
<b>GRÁFICO 6 –</b>	Distribuição de frequência do grau de infiltrado inflamatório categorizada em 0 (ausência de infiltrado inflamatório); 1 (Presença de <25% de infiltrado inflamatório); 2 (Presença de 25-50% de infiltrado inflamatório) e 3 (Presença de >50% de infiltrado inflamatório) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.....	76
<b>GRÁFICO 7 –</b>	Distribuição de frequência do grau de deposição de colágeno ao tricrômico de Masson categorizada em 0 (ausente); 1 (Presença de deposição de colágeno em <25% da área de enxertia); 2 (Presença de deposição de colágeno em 25-50% da área de enxertia) e 3 (Presença de deposição de colágeno em >50% da área de enxertia) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.....	77
<b>GRÁFICO 8 –</b>	Distribuição de frequência do grau de deposição de colágeno ao tricrômico de Masson categorizada em 0 (ausente); 1 (Presença de deposição de colágeno em <25% da área de enxertia); 2 (Presença de deposição de colágeno em 25-50% da área de enxertia) e 3 (Presença de deposição de colágeno em >50% da área de enxertia) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 P (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.....	78
<b>GRÁFICO 9 –</b>	Distribuição de frequência do grau de neocolagenização ao picrossírius categorizada em 0 (ausente); 1 (Presença de deposição de fibras finas, em <25% da área de enxertia, ao exame sob luz polarizada); 2 (Presença de deposição de fibras finas, em 25-50% da área de enxertia, ao exame sob luz polarizada) e 3 (Presença de deposição de fibras finas, em >50% da área de enxertia, ao exame sob luz polarizada) na calvária de porcos tratados com	

	rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação .....	79
<b>GRÁFICO 10 –</b>	Distribuição de frequência do grau de neocolagenização categorizada em 0 (ausente); 1 (Presença de deposição de colágeno em <25% da área de enxertia); 2 (Presença de deposição de colágeno em 25-50% da área de enxertia) e 3 (Presença de deposição de colágeno em >50% da área de enxertia) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.....	80
<b>QUADRO 1 –</b>	Determinação dos parâmetros da análise histopatológica .....	52

## RESUMO

### ESTUDO COMPARATIVO ENTRE CRANIOTOMIAS TRATADAS COM PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA (rhBMP-2) E CRANIOTOMIAS TRATADAS COM PÓ DE OSSO EM SUÍNOS: AVALIAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO ENXERTO

**Objetivo:** Analisar a capacidade de osteogênese, osteoindução, efeito reabsortivo, complicações e valor estético da proteína morfogênética óssea recombinante humana 2 (rhBMP-2) como material para reconstrução de deformidades cranianas comparado ao pó de osso. **Material e Método:** Utilizou-se uma amostra de 12 porcos com 2 meses de vida, machos da raça Landrace, com peso aproximado de 5 kg. Realizou-se craniotomia com broca de 6 mm de diâmetro em osso parietal direito e esquerdo de cada animal. A craniotomia direita foi tratada com rhBMP-2 e craniotomia esquerda pó de osso autógeno. Realizou-se tomografia computadorizada e análise histológica dos animais 30 dias e 60 dias pós-operatórios. **Resultados:** rhBMP-2 tem capacidade osteoindutora ( $p=0,001$ ) superior quando comparada ao pó de osso pela análise tomográfica perante os parâmetros espessura do osso neoformado ( $p=0,001$ ) e densidade ( $p=0,001$ ), além da tendência do rhBMP-2 possuir uma capacidade osteoindutora superior ao pó de osso de acordo com a análise histológica dos parâmetros reabsorção óssea, infiltrado inflamatório, deposição de colágeno e neocolagenização aos 30 dias. Aos 60 dias pós-operatório apesar de não se observar mais diferença estatisticamente significativa na análise tomográfica e histológica, observou-se uma tendência do grupo rhBMP-2 serem mais osteogênico do que o grupo pó de osso autógeno. **Conclusão:** O rhBMP-2 demonstrou-se uma excelente opção de material osteogênico, viabilizando o seu uso em reconstrução de deformidades cranianas devido a propriedade de estimular a osteoindução de forma precoce evitando complicações como distrofias ósseas, baixa qualidade e baixa eficácia da osteogênese.

**Palavras chave:** Cranioplastia, enxerto, osteoindução, osteogênese e porco.

## ABSTRACT

COMPARATIVE STUDY BETWEEN CRANIOTOMY TREATED WITH BONE MORPHOGENETIC PROTEIN (rhBMP-2) AND CRANIOTOMY TREATED WITH BONE POWDER IN PIGS: GRAFTING INTEGRATION EVALUATION.

**Objective:** Analyze the capacity of osteogenesis, osteoinductive, resorptive effect, complications, and aesthetic value of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2), as material to cranial deformities reconstruction compared to the bone powder. **Material and Method:** It was used a sample of 12 pigs with the age 2 months, Landrace race male pigs, weighing approximately 5 kg. The craniotomy was performed with a 6 mm diameter drill in the right and left parietal bone of each animal. The craniotomy on the right side was treated with rhBMP -2 and the left side treated with autologous bone craniotomy powder. Computed tomographies and histologic analysis of the animals were performed 30 days and 60 days after postoperatively. **Results:** rhBMP-2 possesses the osteoinductive capacity ( $p=0.001$ ), higher when compared to the bone powder by the tomographic scan parameters of the newly formed bone thickness ( $p=0.001$ ) and density ( $p=0.001$ ), beyond the trend that the rhBMP-2 possesses a superior osteoinductive capacity compared to the bone powder, according to the bone resorption parameters histological analysis, inflammatory infiltration, collagen deposition and neocolagenization on the 30 days. On the postoperative 60 days, it's not observing more statistically significant difference into the Computer Tomographic and histological analysis, however there was a trend of rhBMP-2's group to be more osteogenic than the autogenous bone powder's group. **Conclusion:** The rhBMP-2 demonstrated on being an osteogenic material excellent choice, enabling its use into cranial deformities reconstruction due to the osteoinductive precocious way stimulating property, avoiding complications such as bone dystrophies, osteogenesis low quality and low efficiency.

**Key words:** Cranioplasty, grafting, osteoinduction, osteogenesis and pig.

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A cranioplastia, definida como correção cirúrgica dos defeitos cranianos, é um dos procedimentos neurocirúrgicos mais antigos, datando de aproximadamente 3000 anos A.C, quando índios Paracas, do Peru, realizavam processos corretivos em deformidades cranianas. Ao longo dos anos, com a evolução das craniotomias, houve um aperfeiçoamento da reconstrução do crânio, principalmente em relação à técnica e aplicação de materiais aloplásticos e enxertos autólogos. Mesmo assim, ainda existem controvérsias quanto ao material a ser utilizado em determinadas cranioplastias (ZINS *et al.*, 2010). O avanço da medicina regenerativa e engenharia de tecidos trouxeram enormes possibilidades e novas perspectivas na área da saúde. Justamente devido a esses avanços científicos que cada vez mais se busca o substituto ósseo ideal.

Uma revisão publicada em 2011 afirma que nos Estados Unidos estimam-se 15.3 milhões de fraturas tratadas anualmente, sendo que 5 a 10% apresentarão algum tipo de complicação relacionada a não união ou união retardada do osso (NAUTH *et al.*, 2011).

Sendo assim, as pesquisas têm buscado materiais que apresentem biocompatibilidade, previsibilidade, fácil manuseio, segurança e preço acessível. Além disso, é necessário que esse material seja um bom carreador para a engenharia de tecidos. Os enxertos autólogos, como o pó de osso, osso desmineralizado (BEGLEY *et al.*, 1995), cartilagem, gordura, músculo e aponeurose, possuem a vantagem do menor custo e menor probabilidade de reação imunogenética ao paciente (DIMITRIOUA *et al.*, 2011). No entanto, as desvantagens estão na morbidade do sítio doador e na maior capacidade de reabsorção do enxerto autógeno com o tempo. Por outro lado, os materiais aloplásticos, dentre eles o titânio (XIANG *et al.*, 1993), hidroxiapatita, biocerâmica e coral marinho (DOHERTY *et al.*, 1994; BEGLEY *et al.*, 1995), esponja de gelatina (SOHN *et al.*, 2010), poliamida, polietileno (MAAS *et al.*, 1990), politetrafluoretileno (KULAKOV *et al.*, 2010) e polimetilmetacrilato (ABDULAI *et al.*, 2006; JABERI *et al.*, 2013), são ótimos quanto à duração e menor morbidade do paciente; embora tenha maior taxa de infecção secundária, apresentam alto custo e possam necessitar de um procedimento cirúrgico removedor.

Bancos de ossos foram criados como uma alternativa para procedimentos ortopédicos, porém se questiona muito a biosegurança desses bancos com relação à contaminação do enxerto de acordo com Ogada *et al.* (2006).

No entanto nenhum desses materiais foi capaz de atender todas as necessidades exigidas. Esse cenário nos lança um desafio de encontrar um material que seja semelhante à estrutura encontrado no tecido do hospedeiro.

Em 1965, o Dr. Marshall R. Urist publicou seu trabalho descrevendo um grupo de produtos a base de proteína, que ele descobriu que poderia induzir formação óssea. Utilizando ratos e camundongos, Dr. Urist documentou o sucesso da produção de osso ectópico, seis semanas após a aplicação subcutânea e sub-muscular dos extratos isolados de osso bovino desmineralizado (URIST, 1965). Alguns anos mais tarde, após a identificação dos produtos de proteína responsável por este fenômeno notável, Urist utilizou o termo "proteínas morfogenéticas ósseas" (BMP) para descrever sua capacidade de direcionar a formação de osso a partir de células vizinhas (URIST & STRATES, 1971).

Avaliadas as vantagens e desvantagens, a escolha dos materiais para a cranioplastia ainda permanece controverso entre os profissionais. Dessa forma, esse estudo tem por objetivo analisar de forma comparativa a aplicação de pó de osso e proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 (rhBMP-2) e suas propriedades osteogênica, osteoindutiva e osteocondutora, na reconstrução de defeito craniana em porcos.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ossificação

O crescimento e diferenciação da estrutura óssea são codificados por genes chamados Homeobox. A expressão desses genes produz condensações celulares no mesênquima que dará origem à estrutura óssea, ocorrendo de uma forma sequencial e temporal. Essas células mesenquimais são derivadas da crista neural (esqueleto craniofacial), mesoderma paraxial (esqueleto axial) e placa lateral do mesoderma (esqueleto apendicular) (LI & CAO, 2006). Assim, após formação dos condrócitos e osteoblastos, pela diferenciação das células mesenquimais, há a produção de cartilagem e osso, respectivamente.

Na maioria dos ossos ocorre um processo de ossificação endocondral, no qual a formação óssea ocorre a partir de um molde cartilaginoso. Por volta da oitava semana de gestação, a cartilagem dentro do molde sofre alterações degradativas, mineralização e é removida por osteoclasto. Ao passo que esse processo ocorre por todo osso, há a proliferação de vasos sanguíneos e células osteoprogenitoras atuando na formação de tecido ósseo. Na diáfise média do molde cartilaginoso, conhecido como centro de ossificação primário ocorre a produção de osteoblastos que depositam os primórdios do córtex. Na epífise, conhecida como centro de ossificação secundário, a cartilagem é removida, restando uma placa do modelo cartilaginoso encarcerada entre os centros de ossificação em expansão, determinando a fise ou placa de crescimento. Dentro dessa estrutura, os condrócitos sofrem processos de proliferação, crescimento, maturação e necrose; sendo o crescimento e maturação regulados por genes chamados Indian Hedgehog e pela proteína relacionada ao hormônio paratireoideano. A mineralização da matriz cartilaginosa é um sinal para reabsorção pelos osteoclastos, porém, há a persistência de escoras remanescentes que possuem como função a deposição de osso em sua superfície, chamadas de esponja primária, um núcleo de cartilagem coberto por uma camada de osso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Além desse processo, há a formação intramembranosa, que ocorre no interior das membranas do tecido conjuntivo. É o processo formador dos ossos frontal, parietal e de partes do occipital, do temporal e dos maxilares superior e inferior.

Contribui também para o crescimento de ossos curtos e para aumento da espessura dos ossos longos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O local da membrana conjuntiva onde a ossificação começa chama-se centro de ossificação primária. As células mesenquimais se diferenciam e se transformam em grupos de osteoblastos que sintetizarão o osteóide (matriz ainda não mineralizada) que se mineralizará ao englobar os osteoblastos formando então os osteócitos. Vários conjuntos de centro de ossificação vão surgindo, dando o aspecto de osso esponjoso permitindo a penetração de vasos sanguíneos e células mesenquimais indiferenciadas que irão dar origem à medula óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A deposição de osso em uma superfície pré-existente é o princípio dessa formação. Este mecanismo de crescimento aposicional auxilia no entendimento das facetas de crescimento e modelagem ósseas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

## 2.2 Cranioplastia

Cranioplastia é definida como a cirurgia corretiva de deformidades localizadas no crânio. Essas deformidades podem tanto advir de problemas congênitos (encefalocelos e malformações cranianas) e problemas adquiridos (trauma, infecção, tumor e ressecção cirúrgica). Além de apresentarem quadro clínico como cefaléias crônicas e desenvolvimento cerebral deficiente em crianças, os defeitos cranianos são alvos de queixas estéticas pelos pacientes.

Defeitos menores que dois cm e que não possuem queixas estéticas costumam não ter indicações cirúrgicas, pois há capacidade alta de osteogênese pela dura-máter, pericrânio e bordas ósseas. É importante salientar que o resultado da cranioplastia está ligado diretamente ao tamanho do defeito no crânio. Defeitos menores (menor que 75 mm<sup>2</sup>) terão maior chance de reparação, enquanto defeitos maiores (maior que 75 mm<sup>2</sup>) terão menor chance de se reparar por total (ROBBINS, 2005).

O material ideal de uso na cranioplastia deveria ter como características: compatibilidade biológica com o receptor, sem resposta alérgica, não cancerígena, facilidade de esterilização, resistente à pressão, baixa condutibilidade térmica, baixo peso, confiabilidade mecânica e simplicidade de manuseio (ISLAMOGLU *et al.*, 2006).

Os materiais aplicados na reconstrução craniana são divididos em autólogos e heterólogos. Dentre os autólogos, há enxertos de partículas ósseas da tábua óssea da calvária (GREENE *et al.*, 2007), costela, fíbula, crista ilíaca (DIMITRIOUA *et al.*, 2011), pó de osso, gordura, aponeurose, músculo, cartilagem e cubos de cartilagem.

Entretanto, em relação aos materiais aloplásticos, há placas de titânio (DOLDER *et al.*, 2003), hidroxiapatita, biocerâmica, coral marinho (DOHERTY *et al.*, 1994; BEGLEY *et al.*, 1995), esponja de gelatina (SOHN *et al.* 2010), poliamida, polietileno (MAAS *et al.*, 1990), politetrafluoretileno (KULAKOV *et al.*, 2010) e polimetilmetacrilato (ABDULAI *et al.*, 2006; JABERI *et al.*, 2013).

A opção de aplicação desses materiais baseia-se na experiência do profissional e nas vantagens e desvantagens características de cada enxerto. A calota craniana, por exemplo, possui a vantagem de ter a mesma qualidade e densidade do osso, resistência, formato, menor reabsorção e mínima remodelagem. No entanto, tem como desvantagem a possível infecção no local operado (MATSUNO *et al.*, 2006) com conseqüente perda do retalho ósseo e lesão inadvertida da dura-máter e no parênquima, durante a retirada. Em relação às costelas, há a vantagem do acesso, a maleabilidade e a pequena morbidade da área doadora, enquanto, como desvantagem está à alta incidência de reabsorção, dificuldade de obter um contorno aceitável na região frontal, dor pós-operatória na área doadora e risco de pneumotórax. Já a crista ilíaca possui a vantagem da quantidade maior de material ósseo, melhor qualidade do osso esponjoso medular e espessura dos enxertos, porém, como desvantagem há a abordagem de outro campo cirúrgico distante, dor no pós-operatório, cicatriz, osso ilíaco fino e não maleável (DIMITRIOUA *et al.*, 2011).

Os materiais aloplásticos (heterólogos) também são opções para a cranioplastia. A hidroxiapatita (STAFFA *et al.*, 2007; BAMBAKIDIS *et al.*, 2010) possui a vantagem de ser osteointegrativa com a redução da necessidade de obtenção de material ósseo autólogo, a possibilidade de ser moldada com uma broca, prototipagem a partir de modelos em 3D, obtido por tomografia computadorizada (TC); porém é frágil, com maior chance de fratura, risco de erosão para a pele, não devendo ser utilizada em áreas cutâneas de risco ou pós-radioterapia, além do custo elevado do material (STAFFA *et al.*, 2007). O

polimetilmetacrilato (ABDULAI *et al.*, 2006; JABERI *et al.*, 2013) é um material de baixo custo e pode ser colocado em qualquer lugar da calvária, exceto próximo ao seio frontal, mas tem risco elevado de infecção, erosão cutânea, reação exotérmica intensa durante a colocação e risco de fratura do material. Por fim, a placa de titânio (BHARGAVA *et al.*, 2010; KAIDO *et al.*, 2011) é um material inócuo, maleável e resistente, cuja fixação é estável, limitando a reabsorção óssea, porém, ela possui risco de infecção, extrusão cutânea, migração para o espaço epi ou subdural e alto custo.

### 2.3 Princípios biológicos da reparação e revascularização dos enxertos ósseos autógenos

Para se avaliar a qualidade de um enxerto ósseo, devem-se considerar três principais propriedades: capacidade osteogênica, osteoindutora e osteocondutora.

A osteogênese é definida com ato de formar osso novo. Esse processo ocorre quando osteoblastos viáveis e ou precursores de osteoblastos (células troncos) são transplantadas junto com um enxerto ósseo. Esses precursores vão se diferenciar em osteócitos quando em condições ideais no leito receptor (CYPHER & GROSSMAN, 1996).

O reparo e a revascularização de enxertos ósseos processam-se em etapas cuja sequência é determinada por sua densidade e arquitetura. O enxerto de osso esponjoso caracteriza por formação inicial de coágulo e tecido de granulação na interface leito-enxerto. Ocorre a neovascularização nas trabéculas ósseas e os osteoblastos sobreviventes do enxerto e os oriundos do leito receptor começam a secretar matriz óssea na interface e dentro do enxerto, circundando núcleo ósseo não vital (PALECKIS *et al.*, 2005).

Inicia-se a osteoindução que recruta as células tronco no leito receptor a se diferenciarem em osteoblastos (CYPHER & GROSSMAN, 1996). Diversos fatores de crescimento podem influenciar nesse processo. Como exemplo tem-se as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), plasma rico em plaquetas, fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), entre outros (CYPHER & GROSSMAN, 1996). Esses fatores então vão favorecer a neoformação óssea. Segue-se a reabsorção de osso não vital e substituição por osso novo na fase de remodelação que se completa em alguns meses (PALECKIS *et al.*, 2005).

A osteocondução é limitada devido a fatores que podem influenciá-la, como o tamanho do defeito, celularidade do leito receptor, contato com o tecido doador e como ocorrerá a regulação da reabsorção e remodelamento ósseo pelo hospedeiro (CYPHER & GROSSMAN, 1996). Por definição conforme Paleckis *et al.* (2005), a osteocondução refere-se ao fato do enxerto ósseo ou implante ter capacidade de providenciar uma estrutura adequada para que as células ósseas regenerativas possam manter-se no local receptor.

Seja qual for o enxerto ou implante as principais propriedades estruturais sempre devem ser consideradas: porosidade, tamanho desses poros, conectividade dos poros e a rugosidade da superfície, segundo Cypher & Grossman, (1996).

Já em ossos corticais, a reparação ocorre de maneira diferente. A fase inicial também é de natureza inflamatória e forma-se um tecido de granulação na interface enxerto-leito. Porém sua arquitetura densa e pouco porosa impede que ocorra uma rápida invasão de capilares sanguíneos, atrasando sua revascularização (PALECKIS *et al.*, 2005).

## 2.4 Tipos de enxertos

Segundo Piermattei & Flo (1999) Pode-se dividir os enxertos em autógenos, aloenxertos e xenoenxertos.

2.4.1 Autoenxertos ou enxertos autógenos: a origem do enxerto vem do próprio indivíduo. Possui potencial osteogênico máximo e resposta precoce, porém sua coleta aumenta o tempo operatório, riscos (PIERMATTEI & FLO, 1999) e morbidade do leito doador (PALECKIS *et al.*, 2005).

2.4.2 Enxertos homogêneos ou aloenxertos: a origem é de indivíduos de mesma espécie. Não ocorre osteogênese direta e há retardo inicial de aproximação em duas semanas na resposta em comparação com a resposta do enxerto autógeno. A grande vantagem é a maior disponibilidade em quantidade, forma e tamanhos suficientes (PIERMATTEI & FLO, 1999).

2.4.3 Xenoenxertos: a origem é de indivíduos de espécie diferentes. Possui menor potencial osteogênico (PIERMATTEI & FLO, 1999) e apresenta maior

probabilidade de causar reação imunológica mediada por linfócitos T e B (CYPHER & GROSSMAN, 1996).

Com relação à sua estrutura, os enxertos podem ser tanto esponjosos, corticais ou a combinação entre ambos. Os enxertos esponjosos são geralmente coletados de osso metafisário e utilizado como enxerto autógeno a fresco. Os enxertos corticais são mais frequentemente usados como aloenxerto congelados, ao passo que os enxertos corticos-esponjosos podem ser autógenos a fresco ou aloenxerto a fresco ou congelado (PIERMATTEI & FLO, 1999).

## 2.5 Proteína morfogenética óssea (BMP)

Após a descoberta de Urist em 1965, em que matriz óssea desmineralizada liofilizada promoveu a formação de novo osso quando foram implantados na musculatura de ratos, alguns trabalhos conseguiram isolar formas mais purificadas destas proteínas e confirmar sua capacidade osteoindutora (URIST, 1984). Essa indução de formação óssea nova foi demonstrada em outros modelos animais como coelhos, cães e bovinos. Entretanto Urist (1979) observou que a BMP obtida através de matriz óssea desmineralizada de ratos só era capaz de induzir em ratos e não em outras espécies.

Nos anos 80, depois de trabalhar fora da sequência do gene de BMP, pesquisadores de Boston produziram os primeiros clones de DNA com sucesso, abrindo caminho para as futuras produções de BMP recombinantes (WOZNEY *et al.*, 1988). Inicialmente as BMP eram isoladas e purificadas a partir de biomateriais derivados da matriz óssea desmineralizada (BESSHO *et al.*, 1991). Para Grajaneiro *et al.* (2005), as restrições entre espécies sugeriram a existência de uma modulação imunológica e que esta deveria ser mais investigada, abrindo portas para novas pesquisas utilizando BMP. Atualmente mais de 20 BMPs foram clonadas e isoladas (ARGINTAR *et al.*, 2011).

Nomeado pela sua ordem de descoberta, cada BMP com exceção do BMP 1 (um pró-colágeno metaloproteinase) apresenta algum grau de capacidade osteoindutora, como a BMP 2, 4 e 7 (também conhecido como OP-1) (BOSTROM *et al.*, 1995).

As proteínas morfogenéticas ósseas são membros da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ). Proteínas morfogenéticas ósseas podem

existir em pares homodimérica e heterodimérica, evidências apontam para o atual homodímeros sendo responsável pela atividade *in vivo* (CONSTAM & ROBERTSON, 1999; LEE *et al.*, 2002).

Do ponto de vista físico e químico, as BMP são proteínas secretadas pelas células, que atuam ligando-se os receptores presentes na membrana plasmática das células de diferentes tipos, dessa forma estabilizando as células e a organização dos tecidos (GRAJANEIRO *et al.*, 2005).

O papel das BMP no processo de formação óssea durante o desenvolvimento embrionário e na reparação de fraturas já está bem estabelecido. As BMP são capazes de induzir a formação óssea em sítios ectópicos e no local de defeitos ósseos e já foi demonstrado por diversos modelos animais (URIST, 1965; BAX *et al.* 1999; EINHORN *et al.*, 2003a; KLOEN *et al.* 2003; AROSARENA & COLLINS, 2005).

A osteogênese consiste em 3 principais fases: migração e mitose das células mesenquimais, diferenciação dessas células em condroblastos, formação de cartilagem para finalmente essa cartilagem ser substituída por osso. A proliferação e adesão das células mesenquimais ocorre em até três dias após a implantação. Já a condrogênese ocorre após cinco dias da implantação, tendo seu pico entre sete a oito dias. A hipertrofia da cartilagem e mineralização começam a ser observado após o nono dia. A diferenciação dos osteoblastos vai depender da qualidade de angiogênese e ocorre por volta do dia 10-11. A partir do novo osso endocondral formado, inicia-se o remodelamento e se torna um local de hematopoese (PACICCA *et al.*, 2003).

A expressão do BMP é mediada por um grupo de receptores de superfície celular semelhante aos que se ligam TGF- $\beta$ . *In vivo*, receptores são agrupados em duas categorias, par do tipo 1 ou par do tipo 2. Um complexo ativo receptor-ligante inclui uma BMP ligada a um par de receptores do tipo 1/ tipo 2. O receptor ativado do tipo 1 ativa o receptor tipo-2. O receptor tipo-2 ativo, fosforila e ativa as moléculas de expressão intracelular (SAKOU, 1998). A expressão intracelular das BMP é mediada por várias vias de expressão, a mais significativo destas em termos de osteoindução parece ser a proteína SMAD. Também foi observado ser ativada por TGF- $\beta$  (SAKOU, 1998; YU *et al.*, 2002; KLOEN *et al.*, 2003).

SMAD são da família de mediadores de sinalização dos receptores da BMP de vertebrados homólogos. Oito SMAD foram identificados e podem ser divididos em três grupos, SMAD receptor (SMAD-R), SMAD inibidor (SMAD-I) e SMAD co-receptor.

A indução dos genes da BMP tem uma ampla gama de efeitos. Apesar de sua clara habilidade em conduzir o desenvolvimento de vários tipos celulares diferentes (incluindo o desenvolvimento de cartilagem e osso), pouco se sabe sobre o que ocorre a nível genético, uma vez que estímulo da SMAD induzida pela BMP atinge o núcleo. Um gene que tem demonstrado ser um alvo da BMP é Runx-2 (AZARI *et al.* 2002; BESSA *et al.*, 2008). Runx-2 é um fator de transcrição que induz a expressão de genes específicos dos osteoblastos e tem sido considerado essencial para que ocorra a osteogênese (AZARI *et al.*,2002; BESSA *et al.*, 2008). Embora as vias de sinalização exatas ainda estejam sendo elucidado, o aumento da expressão Runx-2 é visto claramente em resposta a um sinal da BMP / SMAD induzida e células que expressam Runx-2 são mais sensíveis à BMP do que aquelas que não expressam (AZARI *et al.*,2002; BESSA *et al.*, 2008).

DOS SANTOS *et al.* (2005) realizaram uma revisão sobre as BMP e perceberam que devido a sua potente capacidade osteoindutora, muitas pesquisas têm se dedicado à determinação do papel que elas desempenham na cicatrização da fratura. A consolidação da fratura em si é um processo complexo que envolve a interação entre várias citocinas e fatores de crescimento com as células inflamatórias, endoteliais e osteogênicas. PDGF, FGF, VEGF, IGF-1, TGF- $\beta$  e BMP foram demonstrados como parte do ambiente que apoia o desenvolvimento ósseo no local da cicatrização da fratura (SAKOU *et al.*, 1998;). O papel fundamental da BMP neste processo foi inicialmente indicado por dados de estudos em animais que utilizaram técnicas de imunoistoquímica para demonstrar a expressão da BMP localizada no local da fratura durante o processo de cicatrização (BAX *et al.* 1999; EINHORN *et al.*, 2003).

Trabalhando em um modelo de cicatrização da fratura em ratos, em 1995, Bostrom *et al.* mostraram que à medida que prossegue a consolidação da fratura, a presença de expressão da BMP aumentou dramaticamente, especialmente em células mesenquimais primitivas e condrócitos. Então, quando o componente cartilaginoso do calo de fratura amadureceu, uma diminuição na expressão da BMP

e na população de células primitivas foi observada. A expressão da BMP retornou a níveis elevados de células osteoblasticas povoando o local da fratura e iniciando a fixação do tecido ósseo na matriz condróide. Finalmente, a intensidade de coloração da BMP novamente diminuiu com o osso lamelar substituído por tecido ósseo primitivo. Um processo similar foi observado nas porções do calo submetido à ossificação intramembranosa.

Outros trabalhos ajudaram a determinar mais especificamente a natureza, espacial e temporal, da expressão da BMP durante a cicatrização da fratura (URIST *et al.*, 1971; EINHORN *et al.*, 2003a). Einhorn *et al.*, (2003a) mostraram em ambos os modelos de cicatrização endocondral e intramembranosa que BMP, seus receptores e efetores de baixo fluxo (SMAD, por exemplo) são expressos no periósteo, medula óssea e células osteogênicas por três dias após a fratura. Expressão destes sinais no local da fratura permanece elevada até cerca de 30 dias, quando é substituído o tecido ósseo da fratura, ocorrendo à remodelação do osso.

Logo no início os pesquisadores perceberam que o potencial de cicatrização óssea poderia ser melhorado pela adição de BMP exógena. Isto levou a uma série de relatórios publicados e séries de casos que demonstraram o poder da BMP para induzir no local da fratura óssea a formação de osso novo, acelerando a taxa na qual o calo da fratura amadurece, diminuindo assim o tempo de cicatrização total (BAX *et al.* 1999; EINHORN *et al.*, 2003a; EINHORN *et al.*, 2003b). Estes dados pré-clínicos e clínicos iniciais estabeleceram as bases para estudos primários, controlados e randomizados, produzindo as indicações iniciais do uso das proteínas morfogenéticas ósseas recombinantes humanas (rhBMP) pelo Food and Drug Administration (FDA).

## 2.6 Carreadores

Embora os sistemas de entrega do rhBMP tornaram-se aceitáveis como substituto de enxerto ósseo em fraturas de ossos longos e fusão espinhal, é necessária a manutenção da investigação contínua concentrando-se no potencial uso da BMP para melhorar a cicatrização óssea em todo o corpo, incluindo o esqueleto craniomaxilofacial (EINHORN *et al.*, 2003b).

Os carreadores têm um papel fundamental no fornecimento da BMP para seu local de ação pretendida. Apesar de a osteoindução demonstrar-se viável através da

aplicação tópica e injeção de solução aquosa da BMP, esta abordagem é geralmente ineficaz e exige quantidades excessivas da BMP para ser bem sucedida devido à rápida dissolução e degradação de proteínas do produto (PHIMPHILAI *et al.*, 2006).

Segundo, Arosarena & Collins (2005) é necessário conhecer melhor a interação biomolecular e o modo de fornecimento do fator de crescimento. Os carreadores permitem a manutenção da BMP por um período de tempo que seja suficiente para que ocorra a indução óssea, limitando assim a concentração da BMP necessária para exercer sua função. Existem inúmeras opções de transporte e têm sido empregadas em relatórios publicados da BMP com sucesso, na condução da osteogênese (CHENG *et al.*, 2003).

Urist (1984) descreveu o uso de osso bovino desmineralizado em seus experimentos originais com BMP, sendo uma opção de transporte viável para os trabalhos clínicos realizados atualmente. Para Arosarena & Collins (2005), existe grande dificuldade de se avaliar qual carreador é mais eficiente, pois os experimentos relatados por diversos autores utilizam modelos animais diferentes.

Em um nível básico, os carreadores podem ser divididos em sintéticos e não sintéticos. Opções sintéticas incluem cerâmicas, vidros bioativos, e polímeros absorvíveis (AROSARENA & COLLINS, 2005; PHIMPHILAI *et al.*, 2006). Entre os não sintéticos são relatados colágeno, gel proteico de matrix extracelular, matrix óssea insolúvel, entre outros (AROSARENA & COLLINS, 2005).

O material sintético no geral tem a vantagem de ser osteocondutor. Porém, sintéticos e não sintéticos podem possuir propriedades osteocondutoras (CYPHER & GROSSMAN, 1996). O crescimento ósseo ocorre com substituição do colágeno por osso calcificado. Um problema chave para materiais sintéticos é que eles não podem ser totalmente substituídos durante o processo de crescimento ósseo, resultando em uma persistência de material de suporte na área onde o crescimento de osso novo foi destinado.

O uso de não sintéticos, que geralmente têm perfil de reabsorção mais favorável do que os sintéticos, pode evitar este problema. Não sintéticos têm a vantagem de ser osteogênico. Lembrando que os materiais osteogênicos são aqueles que proporcionam uma população de células progenitoras, que têm o potencial para participar de nova formação óssea. Em comparação, as BMP

induzem a formação óssea através de osteoindução. Quando o potencial de formação óssea da BMP é combinado com um carreador torna-se uma ferramenta poderosa para reconstrução óssea denominada bioimplante BMP. Tornou-se claro que a escolha do carreador adequado é fundamental para o sucesso do bioimplante.

## 2.7 Resposta imune à proteína morfogenética óssea

A ativação da resposta imune devido à implantação da BMP ainda não é totalmente conhecida ou bem definida devido às muitas controvérsias na literatura segundo, Grajaneiro *et al.* (2005). URIST *et al.* (1985) observaram que apenas uma única aplicação de BMP alogênica e proteína não colagenosa desencadeavam uma resposta imune moderada através da produção de imunoglobulinas G, mas mesmo assim não diminuía a capacidade osteogênica das BMP.

A implantação da BMP alogênica ou xenogênica aparenta promover o recrutamento dos macrófagos, linfócitos e células do plasma, o que acarretaria na produção de anticorpos que poderiam inibir a osteogênese. Em função dessa resposta imune, pesquisadores começaram a buscar uma BMP que não induzisse resposta imune exagerada. A grande questão dos pesquisadores estava relacionada à dose de BMP que poderia induzir a resposta imune indesejada. Alguns estudos demonstraram que doses únicas não estimulavam a reação imune indesejada (NILSSON *et al.*, 1986). Posteriormente Nilsson & Urist (1991) demonstraram resultados que uma segunda dose de BMP intensificou a resposta imune e diminuiu a eficiência da osteogênese com BMP xenogênica no tratamento de falha óssea em cães.

A clonagem de BMP em 1988 por investigadores em Boston abriu o caminho para a possibilidade de recombinação de produtos da proteína BMP (WOZNEY *et al.*, 1988, EINHORN *et al.*, 2003b). A análise da resposta imune após implantação de BMP recombinante humana ainda não foi totalmente estudada (GRAJANEIRO *et al.* 2005). Alguns estudos preliminares demonstraram que a rhBMP não promoveu resposta imunológica em tratamento de mandíbulas de cães (GRAJANEIRO *et al.*, 2005).

Devido à possibilidade de uma resposta imunológica severa às BMP xenógenas e ao alto custo para obtenção dessa proteína, iniciou-se o desenvolvimento de pesquisa com a BMP recombinante humana. De acordo com

Gao *et al*, (1996) para se obter alguns microgramas de BMP são necessários quilos de matrix óssea desmineralizada, e para se conseguir iniciar o processo de purificação são necessários pelo menos 100kg de osso fresco lavados livres de medula óssea. Essa quantidade necessária torna o processo oneroso.

## 2.8 Proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP)

Hoje, duas BMP recombinantes, rhBMP-2 e rhBMP-7 (também conhecida como proteína osteogênica 1 ou OP-1) estão disponíveis comercialmente para a reconstrução óssea.

A obtenção da rhBMP é realizada em 2 etapas (FIGURA 1):

- 1) Identificação, replicação e armazenamento do gene humano para BMP-2.
- 2) Produção, purificação, esterilização e validação da rhBMP-2.

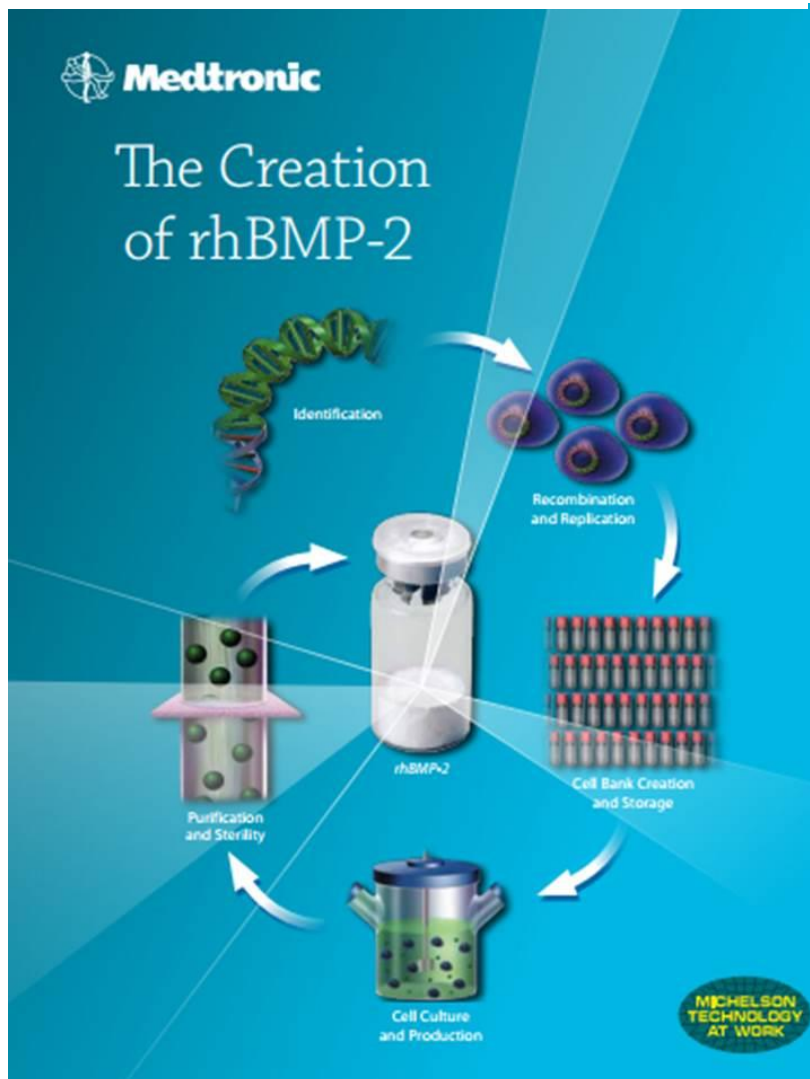
O FDA aprovou as atuais indicações e contraindicações importantes para o uso da rhBMP-2 baseado no sistema de entrega resumido a seguir.

Em 2002, rhBMP-2 com esponja de colágeno como carreador (INFUSE®, Bone Graft, Medtronic Spinal and Biologics, Memphis, TN) foi liberada na dose de 1,5mg/cc como substituto de enxerto ósseo para procedimentos de fusão dos corpos vertebrais da coluna vertebral. Em 2004 INFUSE® teve seu uso liberado para osteossíntese tibial com utilização de haste bloqueada. Recentemente em 2007 o FDA liberou INFUSE® para uso em cirurgia craniofacial na área da odontologia para fixação dos implantes odontológicos.

Até a data, os sistemas baseados na rhBMP-7 e rhBMP-2 têm sido utilizados no tratamento de centenas de milhares de pacientes nas áreas de coluna e cirurgia de ossos longos que apresentaram não-união óssea. Em contrapartida, não há ampla utilização da rhBMP nas áreas de cirurgia craniofacial e maxilofacial, uma vez que apenas produtos à base de rhBMP-2 têm suas indicações aprovadas pelo FDA.

Antes disso, apenas eram permitidos como produtos osteoindutores os materiais baseados em cerâmica. Mesmo assim, a rhBMP-2 ainda tem sua comercialização limitada e restrita a indicações específicas, como enxertia óssea (McKAY, PECKHAM & BADURRA, 2007).

FIGURA 1 – Etapas para a criação do rhBMP-2 (Medtronic)



FONTE: <http://www.sofamordaneq.com>

A rhBMP-2 é comercializada na forma de kits produzidos pela Medtronic® (FIGURA 2).

FIGURA 2 – Componentes que contém cada kit de INFUSE® Bone Graft.

INFUSE® Bone Graft – Kit Components

Part Number/ Size	7510050 XX Small Kit	7510100 X Small Kit	7510200 Small Kit	7510400 Medium Kit	7510600 Large Kit	7510800 Large II Kit
<b>INFUSE® Bone Graft Kit</b>						
<b>Total Graft Volume</b>	0.7cc	1.4cc	2.8cc	5.6cc	8.0cc	8.0cc
<b>Total mg rhBMP-2</b>	1.05mg	2.1mg	4.2mg	8.4mg	12.0mg	12.0mg
<b>Sterile Water for Injection</b>	 (1) 5mL Vial	 (2) 5mL Vials	 (1) 5mL Vial	 (2) 5mL Vials	 (1) 10mL Vial	 (1) 10mL Vial
<b>Sterile rhBMP-2</b>	 (1) 1.05mg Vial	 (2) 1.05mg Vials	 (1) 4.2mg Vial	 (2) 4.2mg Vials	 (1) 12mg Vial	 (1) 12mg Vial
<b>Sterile Absorbable Collagen Sponge (ACS)</b>	 (1) ½" x 2" Sponge	 (1) 1" x 2" Sponge	 (2) 1" x 2" Sponges	 (4) 1" x 2" Sponges	 (6) 1" x 2" Sponges	 (1) 3" x 4" Sponge
<b>PMA Approved Indication</b>	Spine* Dental	Spine* Dental	Spine* Dental	Spine* Dental	Spine* Dental	Spine* Trauma Dental

\*Must be used with a Medtronic Titanium Threaded Interbody Fusion Device.

FONTE: <http://www.sofamordanek.com>

Há diversos dados de estudos com animais e um número crescente de relatórios publicados em humanos, que relatam o sucesso do uso da rhBMP-2 para a reconstrução do esqueleto craniofacial e maxilofacial (ALONSO *et al.*, 2010).

Demonstrado suas qualidades osteoindutora, osteocondutora e osteogênico, e considerando a longa história de transplante autólogo de resultados previsíveis, começa a se questionar qual seria o padrão ouro para procedimentos de enxerto ósseo atualmente. No entanto, se a tecnologia baseada no recombinante pode produzir resultados iguais, evitando os desafios técnicos e morbidades conhecidas da colheita do enxerto, questionam-se agora quais são os obstáculos para a rhBMP tornar-se a primeira opção na enxertia do futuro.

### **3 OBJETIVO**

### **3. OBJETIVO**

O objetivo fundamental nesse estudo é:

1. Analisar a capacidade de osteogênese, osteoindução, efeito reabsortivo da proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP-2) como material para reconstrução de deformidades cranianas e comparar ao uso de pó de osso.

## **4 MATERIAIS E MÉTODO**

## 4. MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 Experimento

O experimento foi analisado e aprovado sua realização sob protocolo 001/12 (ANEXO 1), perante o Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Tuiuti do Paraná (CEUA/UTP).

### 4.2 Amostra

O estudo em questão utilizou uma amostra de 12 porcos provenientes da mesma ninhada com dois meses de vida, machos da raça Landrace, com peso aproximado de 5 kg. Inicialmente foram selecionados 14 animais dos quais 12 foram utilizados para o experimento.

Utilizou-se para identificação dos animais algarismos arábicos de 1 a 14 (P1 a P14) tatuados na face interna da orelha (FIGURA 3). Os 12 animais selecionados para manter a uniformidade dos grupos com relação ao peso corpóreo foram: porco 1 (P1), porco 2 (P2), porco 3 (P3), porco 4 (P4), porco 5 (P5), porco 7 (P7), porco 8 (P8), porco 9 (P9), porco 10 (P10), porco 11 (P11), porco 12 (P12), porco 13 (P13).

**FIGURA 3** – Identificação dos porcos utilizando-se a tatuagem de algarismos arábicos em orelha.



Todos os 12 porcos foram submetidos à craniotomia direita e esquerda. De acordo com o material usado (rhBMP-2 ou pó de osso) para tratar cada craniotomia determinou a qual grupo cada porco pertence. Os animais foram divididos em 2 grupos de forma aleatória. Sendo o GRUPO rhBMP-2 constituído de 12 porcos (P1,

P2, P3, P4, P5, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13) tratados com rhBMP-2 em craniotomia direita, e GRUPO PO constituído de 8 porcos tratados com pó de osso em craniotomia esquerda (P1, P2, P3, P4, P5, P7, P9, P13). Dos 12 porcos, quatro não tiveram a craniotomia esquerda tratada, denominados controle negativo (P8, P10, P11 e P12). Os dados do controle negativo não foram submetidos à análise estatística. Os porcos do grupo rhBMP-2 (P1, P3, P5, P11, P12, P13) foram eutanasiados com 30 dias pós-operatórios e os porcos do grupo rhBMP-2 (P2, P4, P7, P8, P9, P10) foram eutanasiados com 60 dias pós-operatórios. Os porcos do grupo PO (P1, P3, P5, P13) foram eutanasiados com 30 dias pós-operatórios, e os porcos do grupo PO (P2, P4, P7, P9) foram eutanasiados com 60 dias pós-operatórios.

#### 4.3 Local de execução do experimento

O procedimento cirúrgico e acompanhamento pós-operatório foram realizados no Hospital Veterinário da Fazenda Pé de Serra – São José dos Pinhais – PR - Universidade Tuitui do Paraná.

#### 4.4 Protocolo Anestésico

Os porcos foram submetidos ao jejum alimentar de 12 horas e jejum hídrico de 6 horas antes do procedimento cirúrgico.

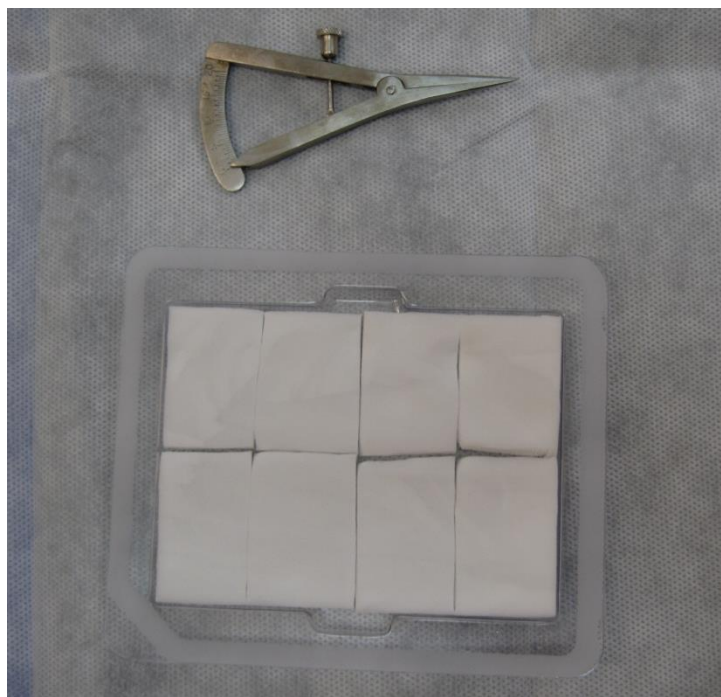
Foi utilizada a medicação pré-anestésica: primeiramente administrada acepromazina 0,1mg/kg associado à morfina 1mg/kg via IM e em seguida administrado 0,3 mg/kg midazolam associada à 10 mg/kg quetamina via IM. Caso fosse necessário, poderia ser administrado 0,2 mg/kg de midazolam IV e 2 mg/kg quetamina IV de forma complementar.

#### 4.5 Preparação da proteína morfogenética óssea (rhBMP-2)

A proteína morfogenética óssea utilizada foi rhBMP-2 (INFUSE® LARGE II KIT – 8.0cc). A esponja de colágeno foi fracionada em fragmentos de 2,5 cm x 3,75 cm (FIGURA 4). Para a reconstituição da BMP, a amostra de 12 mg liofilizada foi diluída em 8,4 ml de água para injeção estéril e homogeneizada de forma gentil. Em seguida foi distribuído de forma uniforme 8,0 ml da rhBMP-2 reconstituída, na esponja de colágeno fracionada.

Em cada fragmento da esponja de colágeno foi instilado 1,0 ml da rhBMP-2 reconstituída.

**FIGURA 4** – Fracionamento da esponja de colágeno em partes de 2,5 cm x 3,75 cm



#### 4.6 Criação de defeito ósseo

Todos os 12 porcos foram submetidos à craniotomia no mesmo dia.

A calota foi depilada e preparada para cirurgia asséptica. Foi utilizado iodopolvidona 10% (Riohex 10% degermante; RIOQUÍMICA, São José do Rio Preto) e álcool 70% (Rialcool 70; RIOQUÍMICA, São José do Rio Preto) para pré-antissepsia e álcool 70% (Rialcool 70; RIOQUÍMICA, São José do Rio Preto) como antisséptico cirúrgico.

Para determinar o local da incisão de pele foi identificada a crista sagital por palpação e traçada uma linha contínua com caneta cirúrgica azul (Texta fine 700). Em seguida foi determinada uma distância de dois centímetros perpendicular ao seio sagital e traçada uma linha paralela à direita e uma linha paralela à esquerda da crista sagital (FIGURA 5)

O acesso ao osso parietal do crânio foi realizado com incisão na pele sobre a linha paralela tracada previamente, em seguida realizada a divulsão do tecido subcutâneo lateralmente às bordas supraorbitais com auxílio de pinça Halted curva e incisão da fáscia do músculo parietal. A musculatura foi rebatida lateralmente e o

osso parietal localizado com auxílio de elevador de periósteo e afastador Senn Miller duplo.

Realizaram-se as craniotomias, uma de cada lado, sobre o osso parietal, com craniotomo de seis milímetros de diâmetro (FIGURA 6), em cada osso parietal (direito e esquerdo) (FIGURA 7).

Após a realização da craniotomia, de acordo com cada grupo, os animais tiveram o defeito ósseo preenchido com pó de osso autógeno proveniente da própria craniotomia (FIGURA 8), proteína morfogenética óssea (rhBMP-2) (FIGURA 8) ou não tiveram o defeito preenchido por nenhum material. Em seguida foi realizada sutura da fáscia muscular com fio poliglactina 910 (3-0) (Vicryl, ETHICON, São Paulo) em padrão simples contínuo, a sutura do tecido subcutâneo foi suturada com fio poliglactina 910 (3-0) em padrão Cushing e sutura da pele com fio nylon 3-0 (Nylon, ETHICON, São Paulo), padrão simples separado.

Ao término do procedimento cirúrgico os animais tinham as duas faces côncavas das orelhas tatuadas com o seu respectivo número de registro de acordo com cada grupo. Somente após a finalização da tatuagem que o procedimento anestésico foi encerrado.

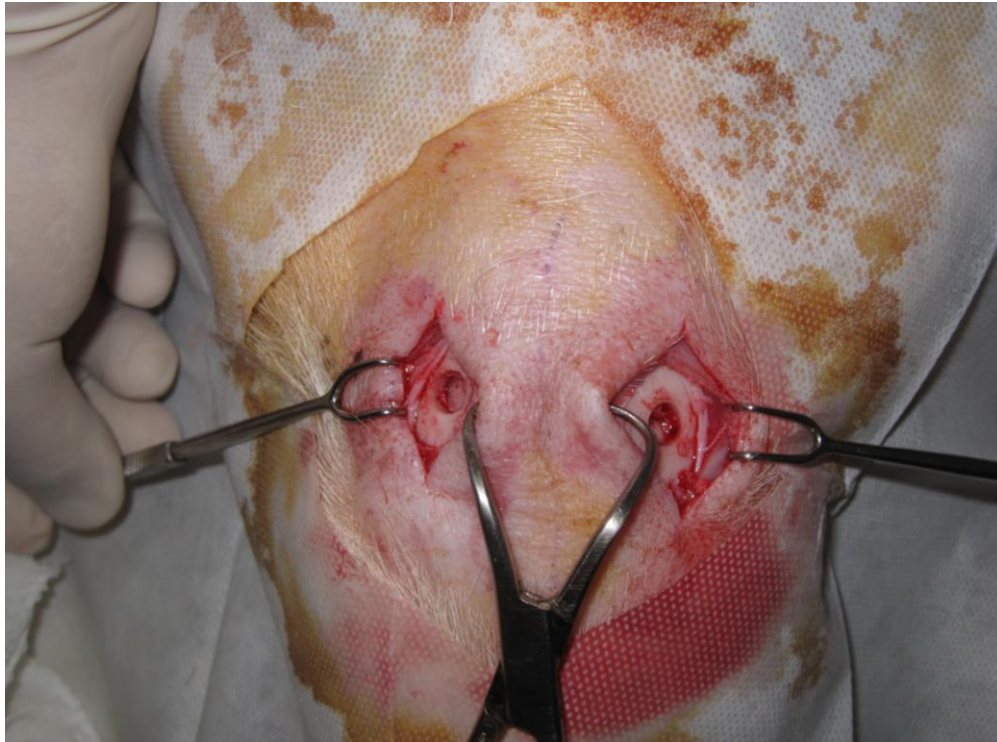
**FIGURA 5** – Demarcação do local da incisão de pele em crânio de porco.



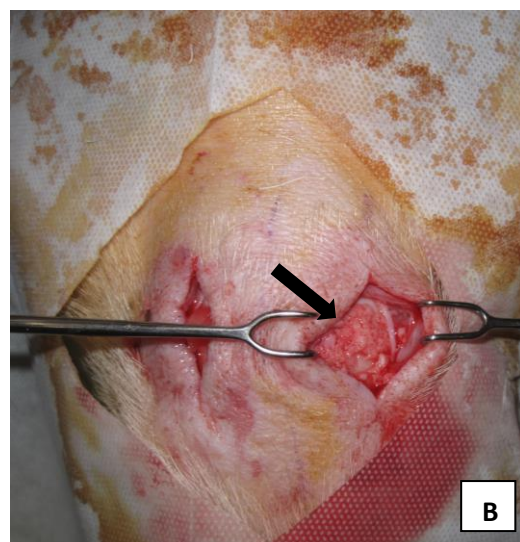
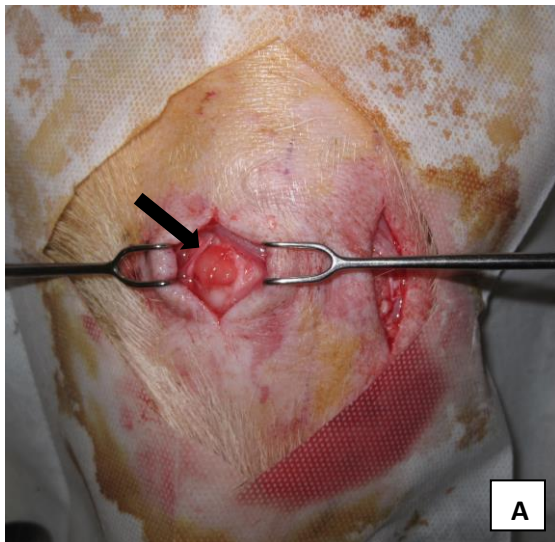
**FIGURA 6** – Posicionamento do craniotomo em osso parietal de porco.



**FIGURA 7** – Afastadores evidenciando craniotomia em suíno realizada com craniotomo de 6 mm de diâmetro em osso parietal direito e esquerdo.



**FIGURA 8** – Craniotomia em osso parietal direito de suíno preenchido com esponja de colágeno contendo rhBMP-2 (A) e craniotomia em osso parietal esquerda preenchida com pó de osso autólogo (B). A seta evidencia o local de aplicação do enxerto.



Nos animais do GRUPO 3 e 4, na craniotomia esquerda, foi mantido a abertura óssea sem aplicação de qualquer material ou enxerto, funcionando como controle. Porém, na craniotomia direita foi aplicada a proteína morfogenética óssea (rhBMP-2).

#### 4.7 Pós-operatório

Os GRUPOS 1 e 3 foram mantidos juntos, assim como os GRUPO 2 e 4 também foram mantidos juntos. Os animais foram acomodados em baias de dimensões de 4,8 m X 4,6 m, com ventilação natural, iluminação artificial, água *ad libitum*, alimentados com ração comercial 2 vezes ao dia até o fim do experimento (FIGURA 9).

Todos os grupos foram tratados com 0,4 mg/kg via IM de meloxicam (OURO FINO, Cravinhos) e 3 mg/kg de cloridrato de tramadol a cada 6 horas via IM no dia 0 (pós operatório imediato). No dia 1 e 2 foi administrado cloridrato de tramadol 3 mg/kg a cada 6 horas via IM e nos dias 1, 2 e 3 do pós-operatório foi administrado 0,4 mg/kg de meloxicam a cada 24 horas via IM.

**FIGURA 9** – Porcos mantidos em baia em pós-operatório



A antibioticoterapia preventiva instituída foi penicilina benzatina 40.000 UI/kg a cada 48 horas via subcutânea durante oito dias em todos os grupos.

Os pontos da pele foram retirados no dia 10 e não foi observado deiscência de pontos ou cicatrização inadequada da ferida cirúrgica (FIGURA 10).

**FIGURA 10** – Seta evidenciando a excelente cicatrização do ponto de pele 10 dias após a realização da craniotomia.



#### 4.8 Eutanásia

Os animais foram anestesiados com aplicação de injeção intramuscular de cetamina 20 mg/kg e xilazina 2 mg/kg em seringa única. Os animais foram cateterizados utilizando-se o vaso auricular e administrado tiopental 15 mg/kg via IV em bôlus. Após a verificação e confirmação do animal estar em plano anestésico (ausência de reflexo palpebral e corneal), foi aplicado 1 ml/kg de cloreto de potássio a 19,1% SAMTEC BIOTECNOLOGIA LTDA, via intravenoso, em bôlus. A confirmação do óbito feita através da ausência de batimentos cardíacos e dilatação pupilar.

#### 4.9 Coleta do material

Após 30 dias, os porcos dos GRUPOS 1 e 3 foram eutanasiados conforme protocolo acima. Uma vez confirmada a morte do animal era realizado a decapitação e a cabeça higienizada em água corrente durante 5 minutos. Procedido à secagem das cabeças com toalhas limpas e embaladas com papel filme para evitar extravasamento de qualquer secreção ou sangue.

As cabeças foram mantidas sob-refrigeração e armazenadas em dispositivos de isopor. Em seguida encaminhadas para avaliação e análise por Tomografia Computadorizada (TC).

Ao término da análise tomográfica as peças foram encaminhadas para a retirada e isolamento da região do osso parietal de cada hemisfério tratada previamente durante procedimento cirúrgico. Os fragmentos ósseos foram acondicionados em meio específico, identificados e enviados para análise histopatológica.

Após 60 dias do procedimento cirúrgico os animais dos GRUPOS 2 e 4 foram eutanasiados e analisados conforme protocolo acima.

#### 4.10 Local de desenvolvimento das análises

Os exames de Tomografia Computadorizada foram realizados no Serviço de Radiologia Médica do HC-UFPR (Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná), enquanto a análise histopatológica foi realizada no Departamento de Anatomopatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

#### 4.11 Análise da Tomografia Computadorizada

As cabeças foram posicionadas em decúbito ventral para a realização da análise tomográfica.

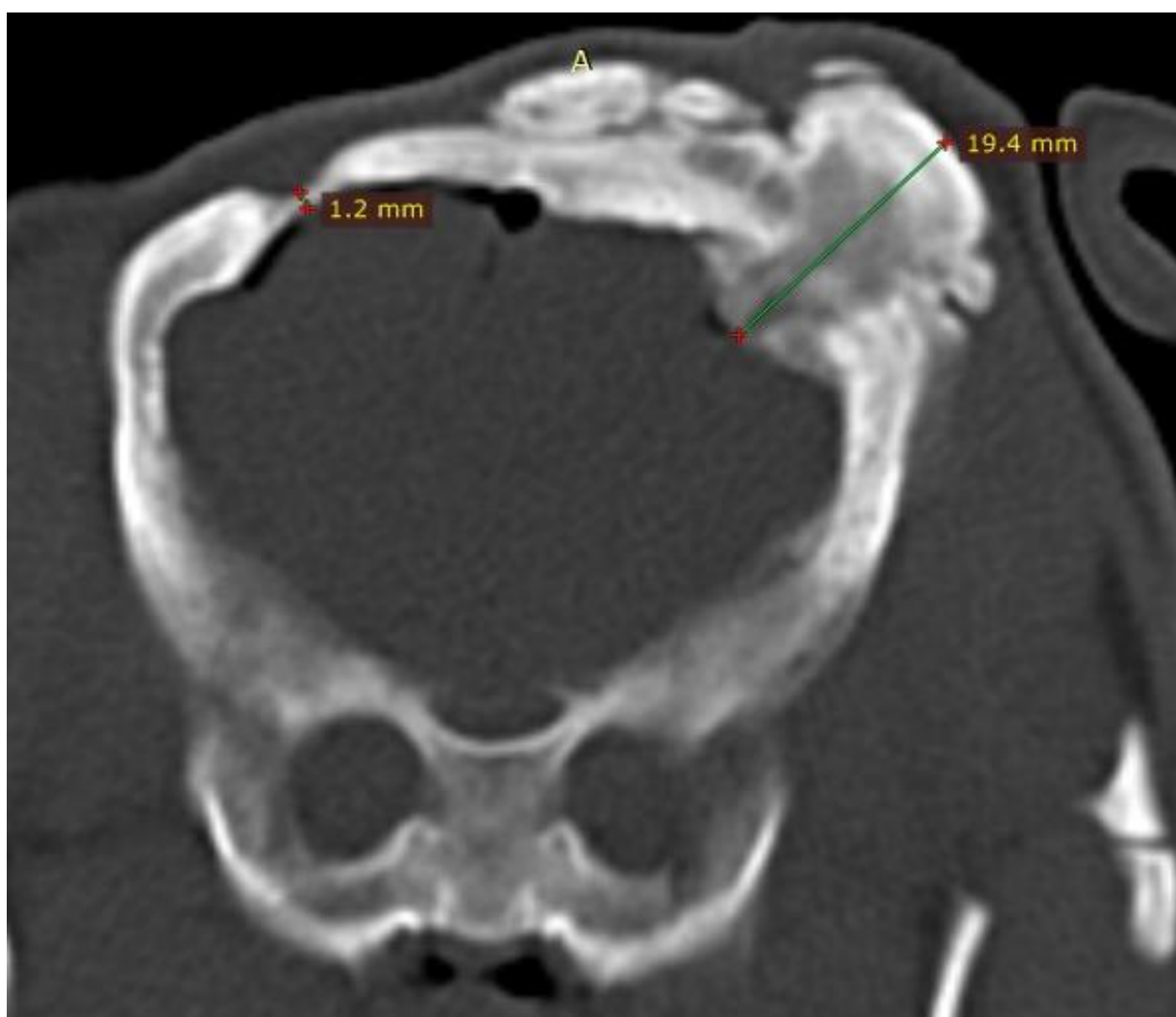
Os dados bi-dimensionais coletados foram: densiometria óssea medida em unidades Hounsfield utilizando como ponto de referência o centro da craniotomia de seis milímetros e espessura de osso produzido medido em milímetros utilizando o centro da craniotomia como referência e traçando uma linha perpendicular até o fim da proliferação óssea (FIGURA 11). Os dados da tomografia computadorizada foram analisados com software de imagem (Northern Eclipse, Glen Mills, Pensilvânia) para

determinar a diferença na área cicatrizada e grau de formação óssea ectópica nas amostras dos grupos.

Utilizou-se para análise aparelho Siemens somaton emotio e estabelecido os seguintes cortes:

- da base: de 3 mm com deslocamento de mesa de 5 mm.
- supratentorial: de 10 mm com deslocamento de mesa de 10 mm.
- técnica de exame: 130 kv e 180 mAs
- scan time: 1,5 segundos

**FIGURA 11** – Determinação da espessura de craniotomia direita (19,4mm) e craniotomia esquerda (1,2mm) através de tomografia computadorizada em porco.



#### 4.12 Análise Histológica

Após a craniotomia, as amostras ósseas foram imersas em solução de ácido fórmico 20%, permanecendo nesta por 30 dias, com troca da solução a cada dois dias. As amostras foram clivadas com navalha metálica, produzindo fragmentos com espessura de 0,3 cm e maior eixo variando de 1,5 a 4,0 cm, interessando a área de enxertia e margens de tecido ósseo adjacente. Os fragmentos foram encapsulados em cassetes plásticos devidamente identificados e submetidos a processamento histológico de rotina em auto técnico, cujas etapas incluem desidratação, diafanização e embemimento em parafina, com posterior confecção de bloco histológico. Os blocos foram submetidos à microtomia com 0,5 micrômetros de espessura e as lâminas foram coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e vermelho picrossírius.

As lâminas histológicas foram analisadas por um único patologista, no Departamento de Patologia Médica da UFPR, em microscópio óptico Nikon Eclipse E200 (Nikon Instruments, Melville, USA). O material foi analisado semiquantitativamente conforme o quadro abaixo (QUADRO 1), adaptado de PINHEIRO *et al.*, (2011).

**QUADRO 1** – Determinação dos parâmetros da análise histopatológica.

	<b>Ausente (0)</b>	<b>Discreto (1)</b>	<b>Moderado (2)</b>	<b>Acentuado (3)</b>
<b>Reabsorção óssea</b>	Ausência de sinais de reabsorção	Presença de <25% de reabsorção do material de enxerto ou do leito cirúrgico	Presença de 25-50% de reabsorção do material de enxerto ou do leito cirúrgico	Presença de >50% de reabsorção do material de enxerto ou do leito cirúrgico
<b>Neoformação óssea</b>	Ausência de sinais de tecido ósseo neoformado	Presença de <25% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado	Presença de 25-50% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado	Presença de >50% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado
<b>Infiltrado inflamatório</b>	Ausência de infiltrado inflamatório	Área de enxertia composta por <25% de infiltrado inflamatório	Área de enxertia composta por 25-50% de infiltrado inflamatório	Área de enxertia composta por >50% de infiltrado inflamatório
<b>Deposição de colágeno ao tricrômico de Masson</b>	Ausente	Presença de deposição de colágeno em <25% da área de enxertia	Presença de deposição de colágeno em 25-50% da área de enxertia	Presença de deposição de colágeno em >50% da área de enxertia
<b>Neocolagenização ao picrossírius</b>	Ausente	Presença de deposição de fibras finas, em <25% da área de enxertia, ao exame sob luz polarizada	Presença de deposição de fibras finas, em 25-50% da área de enxertia, ao exame sob luz polarizada	Presença de deposição de fibras finas, em >50% da área de enxertia, ao exame sob luz polarizada

FONTE: adaptado de PINHEIRO *et al.*, (2011)

Reabsorção óssea foi identificada pela presença de osteoblastos em uma das faces trabeculares e de osteoclastos na face oposta. Neoformação óssea foi caracterizada por deposição de matriz óssea, formação de linhas cementantes e envolvimento dos osteoblastos pela “neomatriz”, formando o chamado “osso trançado” (*woven bone*). As áreas de neoformação óssea podem estar acompanhadas de proliferação do tecido fibroso jovem nos espaços medulares e se

traduzirem à ressonância magnética por perda do hipersinal de gordura na sequência FLAIR. Infiltrado inflamatório foi definido como a presença de linfomononucleares – linfócitos, plasmócitos e macrófagos – e reação gigantocelular do tipo corpo estranho na área de enxertia. Finalmente, observou-se a deposição de tecido conjuntivo e colagenização das áreas de enxertia, pelo exame dos espécimes às colorações de tricrômico de Masson e vermelho picrossírius, nesta sob luz polarizada.

Os achados foram tabulados em planilha Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

#### 4.13 Análise Estatística

Para avaliação dos dados dispostos em categorias (escore das variáveis histológicas) foi utilizada a análise de frequência pelo teste do Qui-quadrado. As variáveis paramétricas com distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (densidade óssea e espessura do osso neoformado) foram analisadas pelo teste t de Student para populações independentes e apresentadas como média e desvio-padrão. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Para indicar diferenças significativas entre os grupos foram utilizadas letras minúsculas em vermelho ( $a > b$ ). As análises foram realizadas pelo programa Sigma-Stat® versão 3.5 e MedCalc® versão 12.4.0.

## **5 RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise por tomografia computadorizada

Os dados obtidos na análise tomográfica foram tabulados de acordo com o momento da análise.

#### 5.1.1 Porcos eutanasiados aos 30 dias pós-operatórios.

A tabela 1 contém a análise (média e desvio padrão) dos dados do exame tomográfico (densidade do osso neoformado e a espessura do osso neoformado) aos 30 dias pós-operatório comparando os porcos tratados com rhBMP-2 com os porcos tratados com pó de osso (PO) na região da craniotomia.

**Tabela 1** - Média e desvio-padrão da área de osso neoformado na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso autógeno (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.

	rhBMP-2	PO	Valor p
Densidade	373,3 ± 50,2 <b>b</b>	644,5 ± 124,0 <b>a</b>	p = 0,001
Espessura	16,3 ± 1,1 <b>a</b>	4,2 ± 0,1 <b>b</b>	p = 0,001

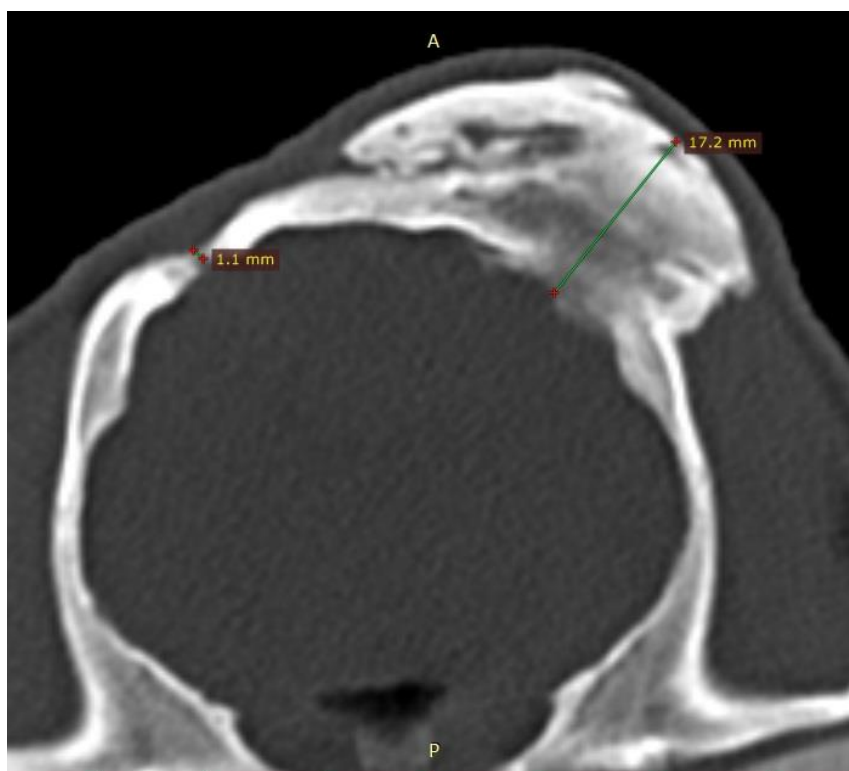
Letras minúsculas em vermelho indicam diferença estatística entre grupos com a > b pelo teste t de Student.

As figuras da análise por tomografia computadorizada foram organizadas de acordo com cada grupo:

**FIGURA 12** – Determinação da espessura de craniotomia direita (17,1 mm) tratada com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (1,0 mm) tratada com pó de osso através de tomografia computadorizada em P1 (30 dias pós-operatório)



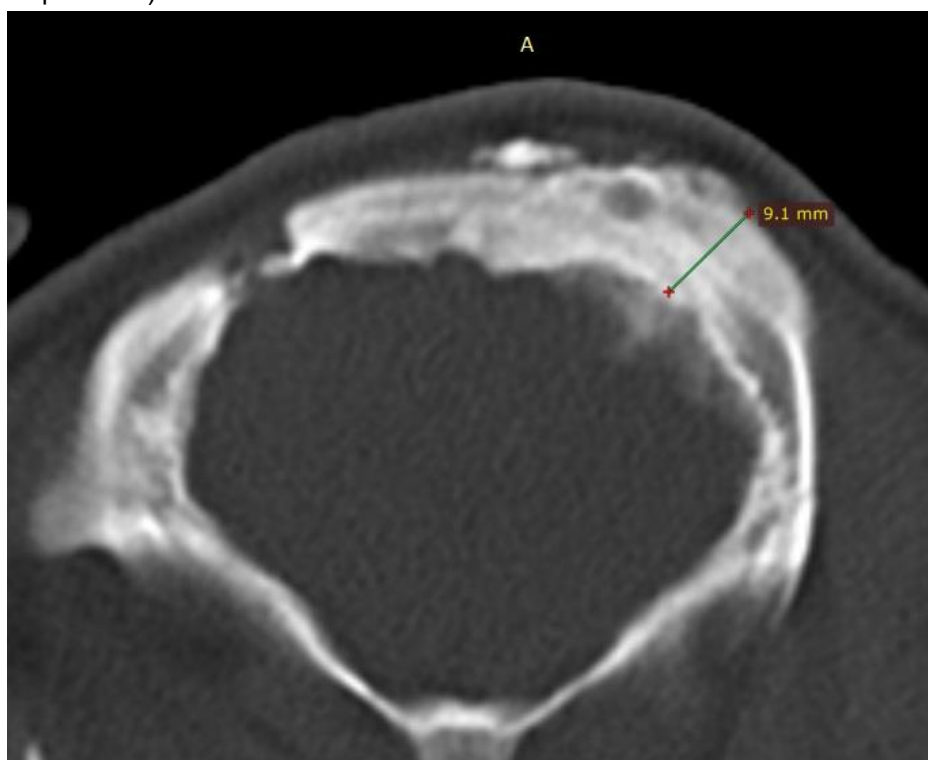
**FIGURA 13** – Determinação da espessura de craniotomia direita (17,2 mm) tratada com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (1,1 mm) tratada com pó de osso através de tomografia computadorizada em P3 (30 dias pós-operatório).



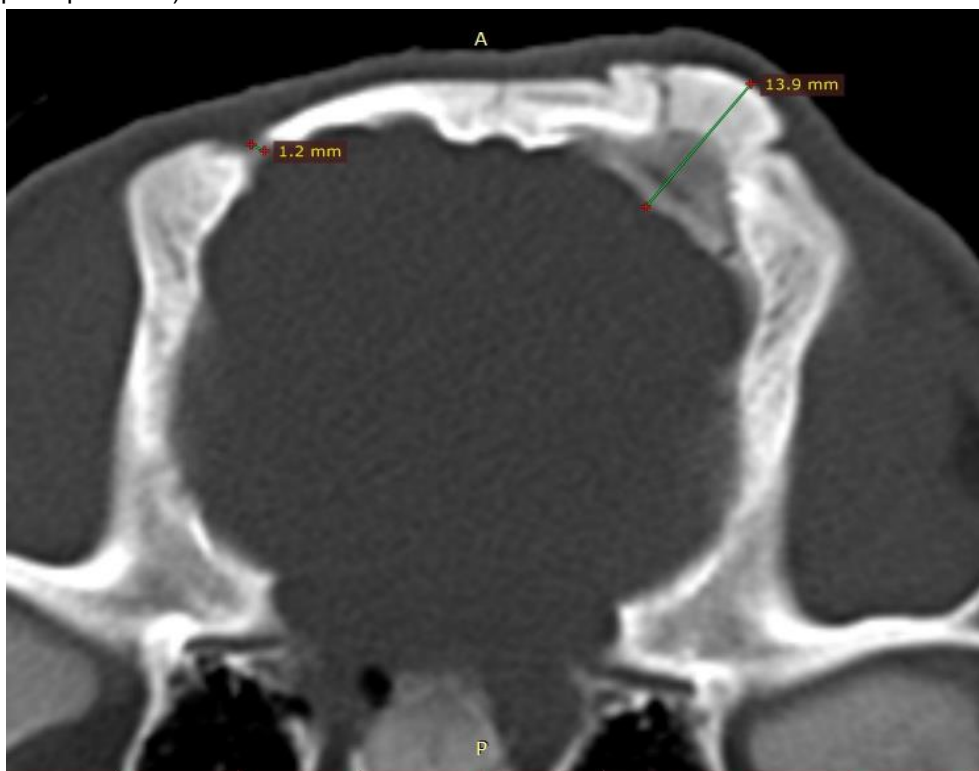
**FIGURA 14** - Determinação da espessura de craniotomia direita (19,4 mm) tratada com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (1,2 mm) tratada com pó de osso através de tomografia computadorizada em P5 (30 dias pós-operatório).



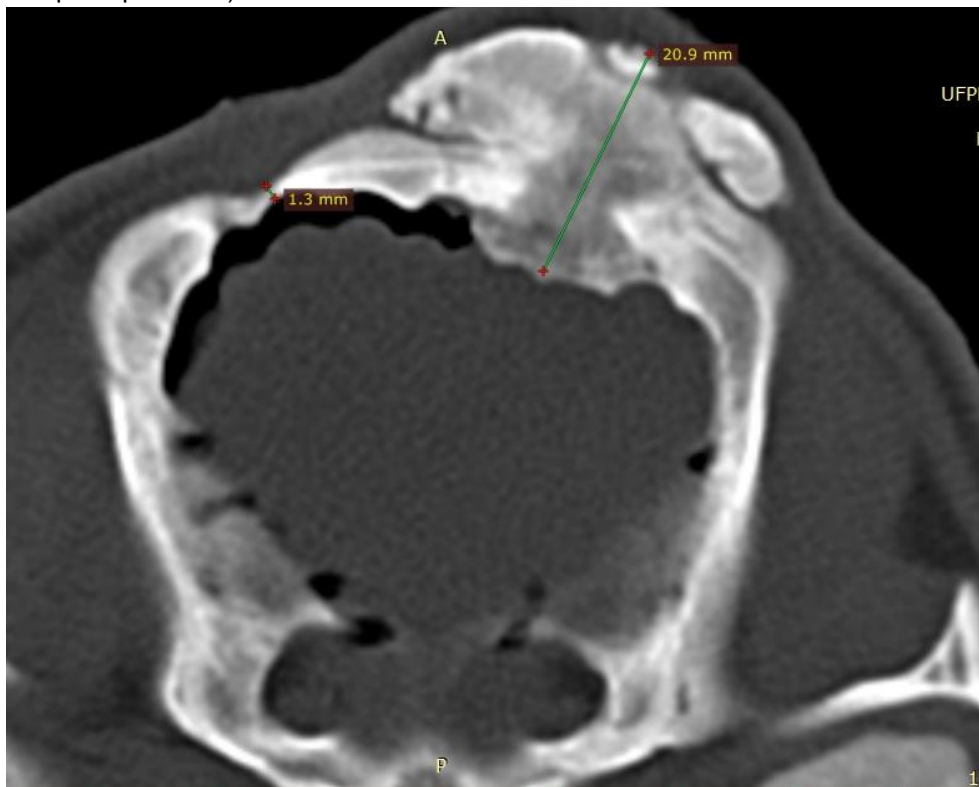
**FIGURA 15** - Determinação da espessura de craniotomia direita (9,1 mm) tratada com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (0,1 mm) - controle negativo, através de tomografia computadorizada em P11 (30 dias pós-operatório)



**FIGURA 16** - Determinação da espessura de craniotomia direita (13,9 mm) tratada com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (1,2 mm) - controle negativo, através de tomografia computadorizada em P12 (30 dias pós-operatório).

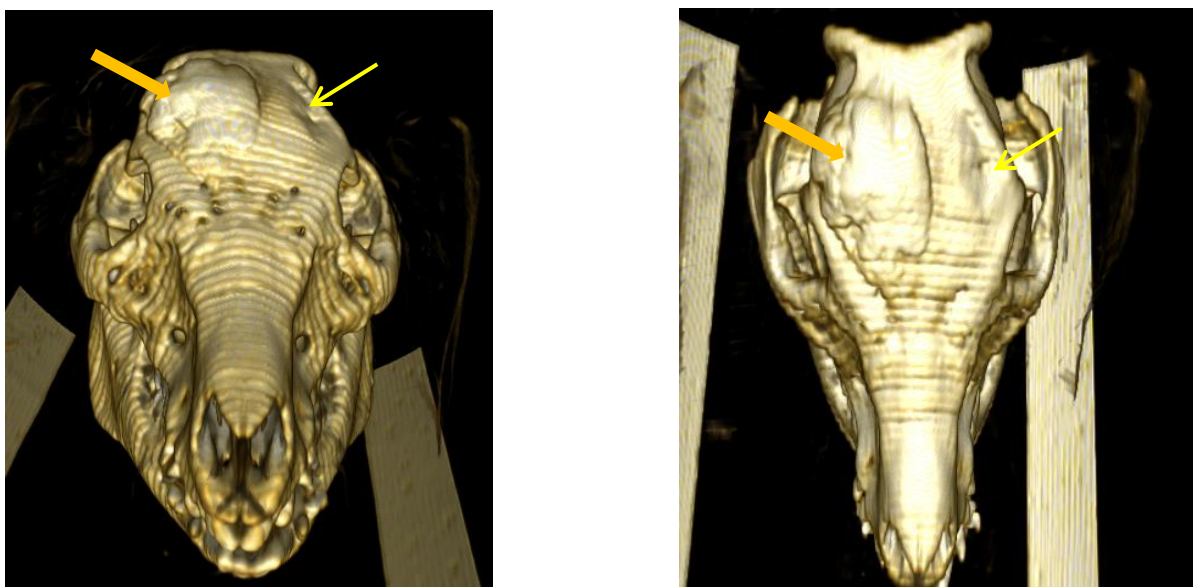


**FIGURA 17** - Determinação da espessura de craniotomia direita (20,9 mm) tratada com rhBMP-2 e craniotomia esquerda (1,3 mm) tratada com pó de osso através de tomografia computadorizada em P13 (30 dias pós-operatório).

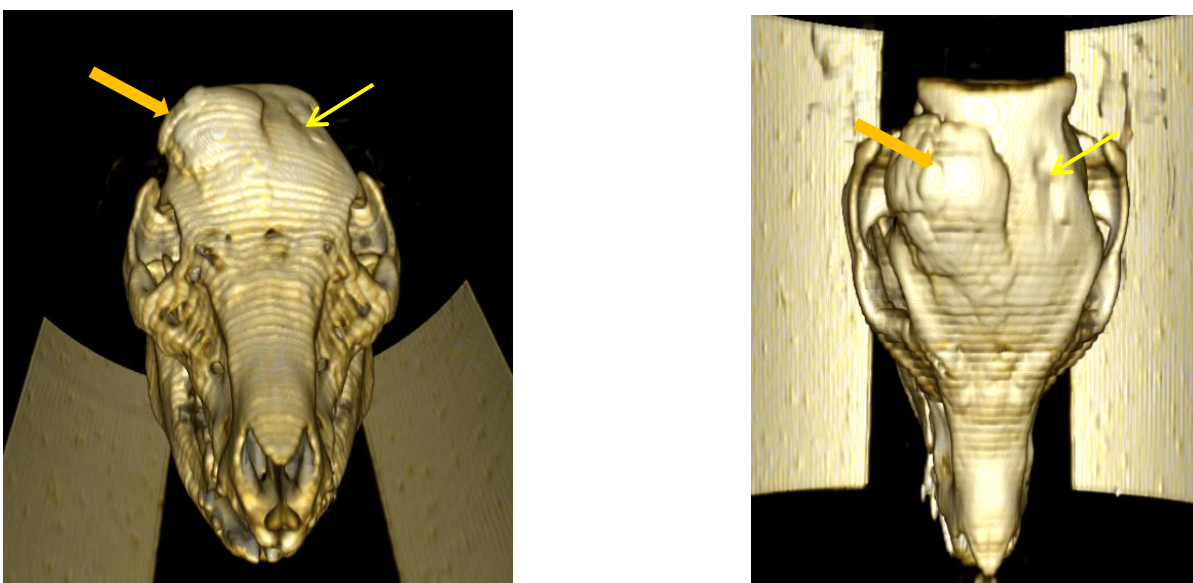


5.1.2 Reconstrução em 3D do crânio dos porcos eutanasiados aos 30 dias pós-operatórios.

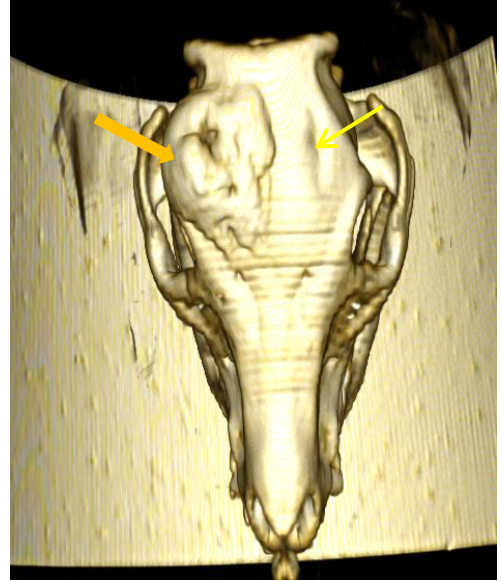
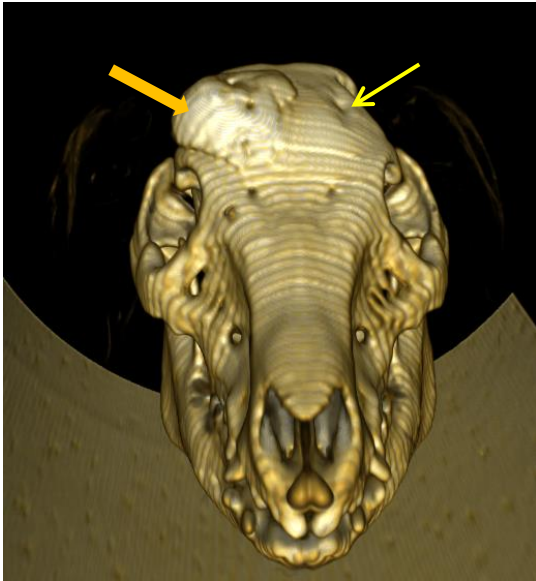
**FIGURA 18** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P1) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (SETA FINA) aos 30 dias pós-operatório.



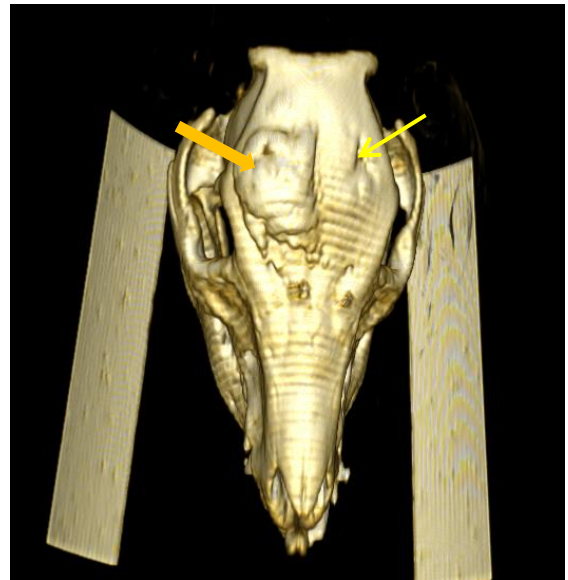
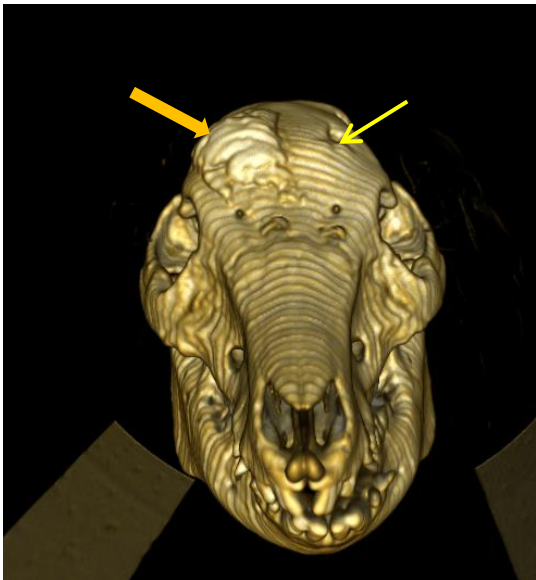
**FIGURA 19** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P3) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (SETA FINA) aos 30 dias pós-operatório.



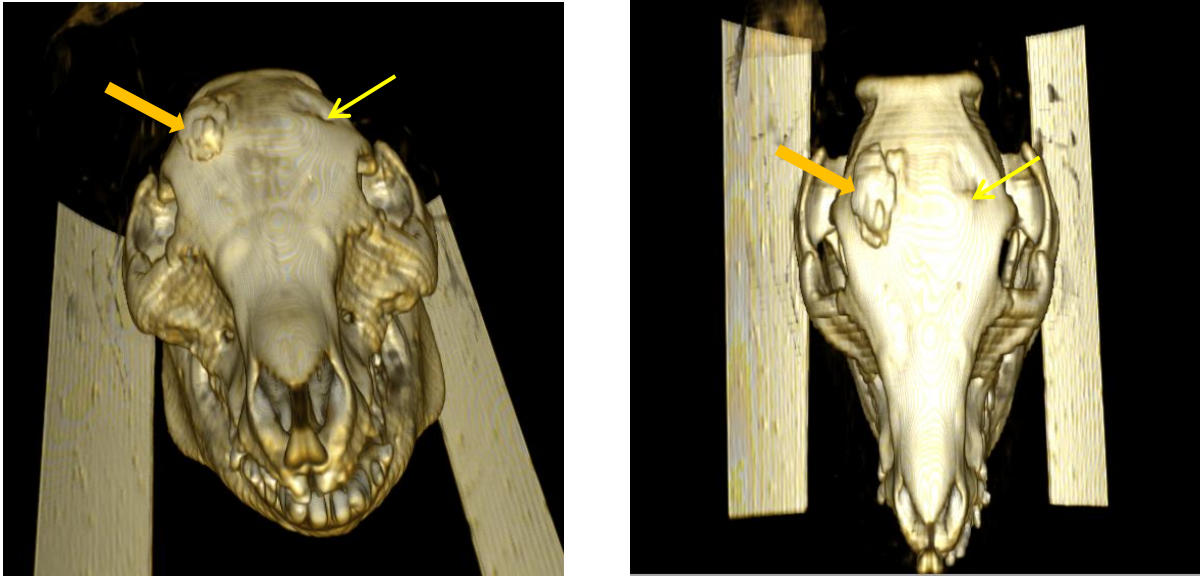
**FIGURA 20** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P5) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (SETA FINA) aos 30 dias pós-operatório.



**FIGURA 21** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P11) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda não tratada (SETA FINA) aos 30 dias pós-operatório.



**FIGURA 22** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P12) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda não tratada (SETA FINA) aos 30 dias pós-operatório.



**FIGURA 23** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P13) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (SETA FINA) aos 30 dias pós-operatório.



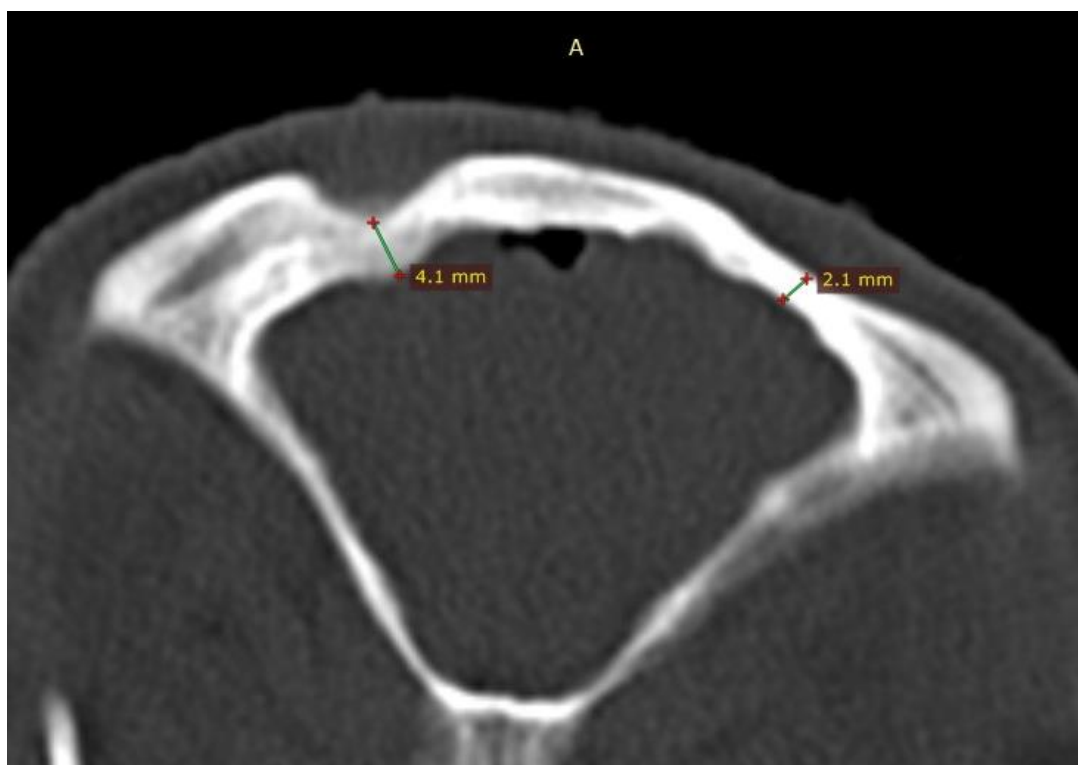
### 5.1.3 Porcos eutanasiados aos 60 dias pós-operatórios.

A tabela 2 contém a análise (média e desvio padrão) dos dados do exame tomográfico (densidade do osso neoformado e a espessura do osso neoformado) aos 60 dias pós-operatório comparando os porcos tratados com rhBMP-2 com os porcos tratados com pó de osso autógeno (PO) na região da craniotomia.

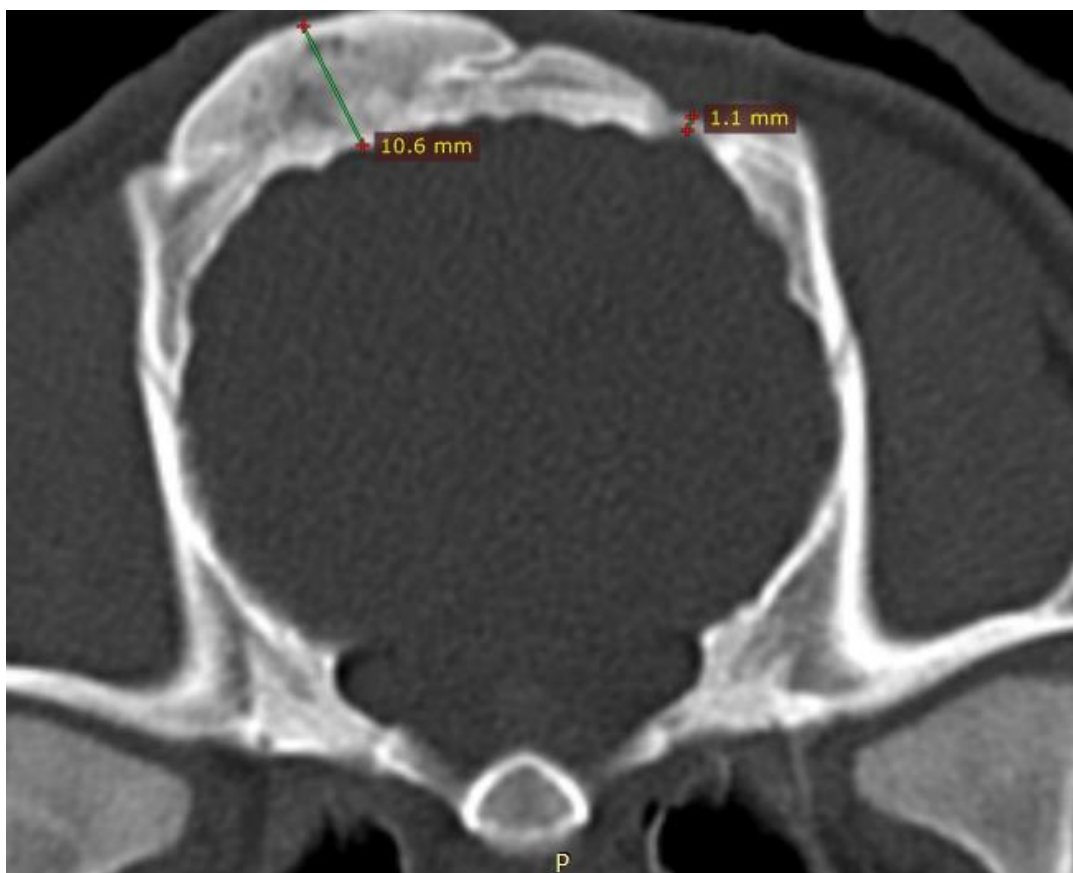
**Tabela 2** - Média e desvio-padrão da área de osso neoformado na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso autógeno (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.

	rhBMP-2	PO	Valor p
Densidade	665,2 ± 116,5	599,2 ± 110,5	p = 0,398
Espessura	11,4 ± 7,1	3,3 ± 4,4	p = 0,079

**FIGURA 24** – Determinação da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (4,1 mm) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (2,1 mm) através de tomografia computadorizada em P2 (60 dias pós-operatório).



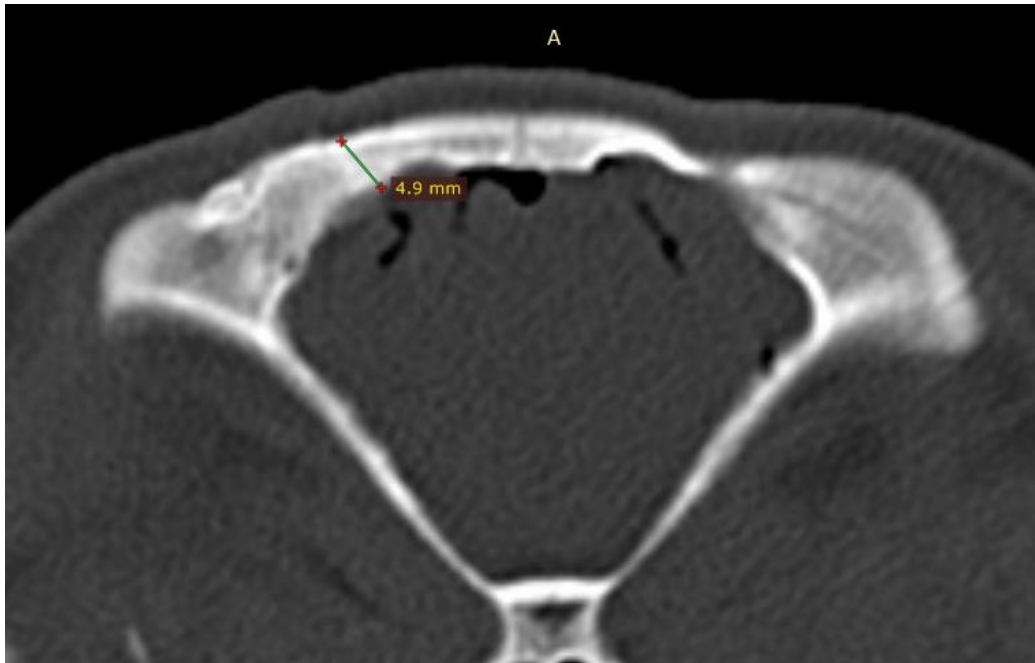
**FIGURA 25** – Determinações da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (10,6 mm) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (1,1 mm) através de tomografia computadorizada em P4 (60 dias pós-operatório).



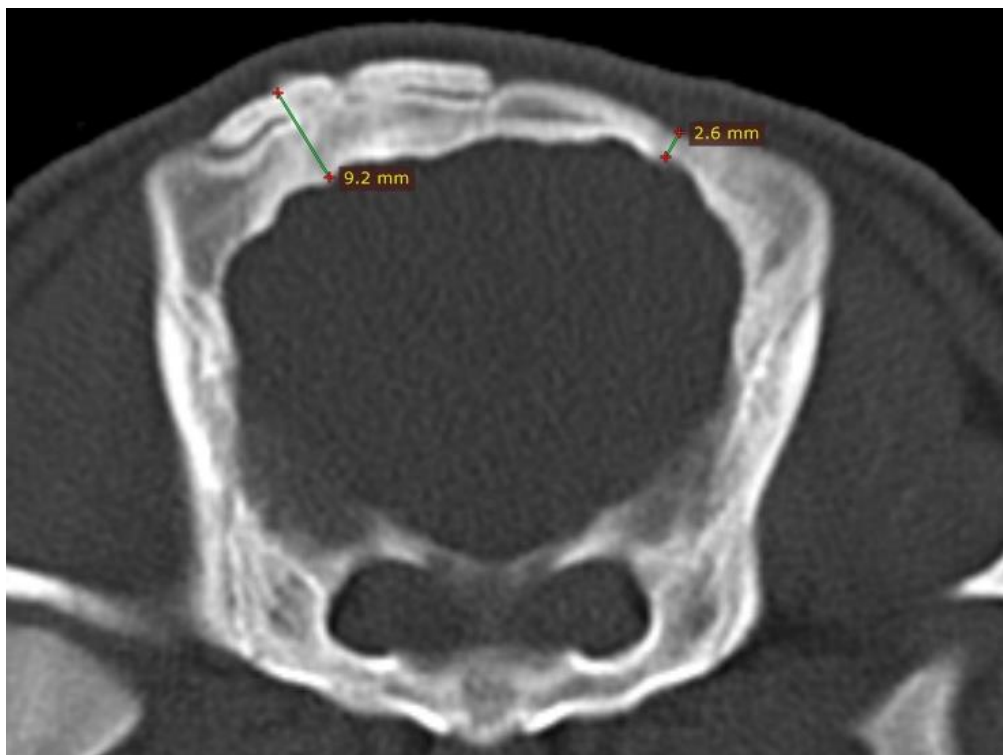
**FIGURA 26** – Determinações da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (17,6 mm) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (9,8 mm) através de tomografia computadorizada em P7 (60 dias pós-operatório).



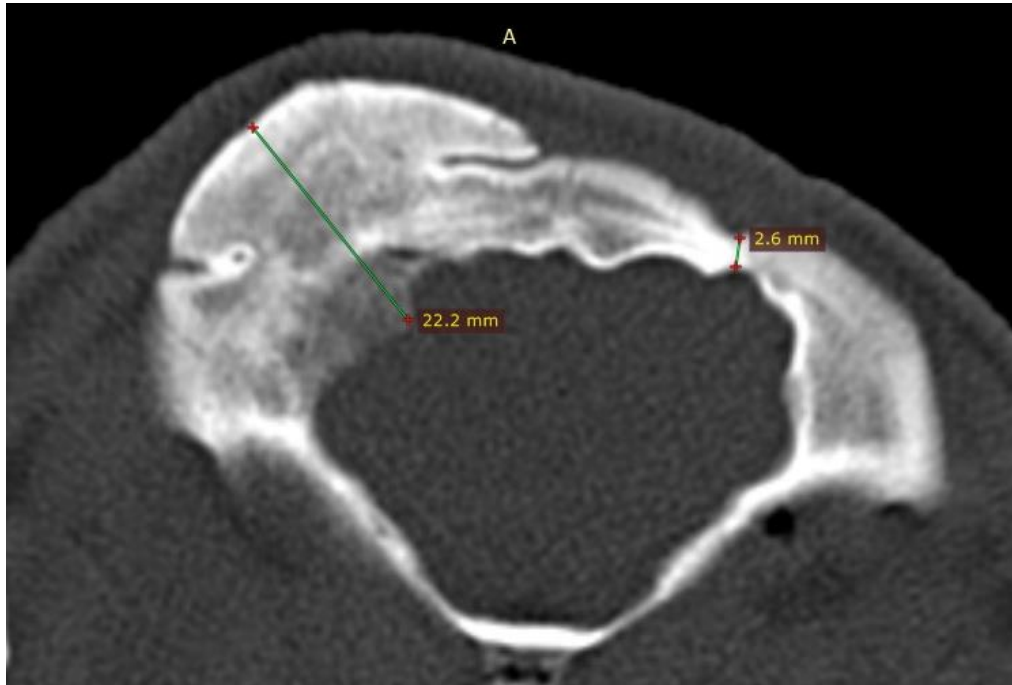
**FIGURA 27** – Determinações da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (4,9 mm) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso (0,1 mm) através de tomografia computadorizada em P9 (60 dias pós-operatório).



**FIGURA 28** – Determinações da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (9,2 mm) e craniotomia esquerda não tratada (2,6 mm) através de tomografia computadorizada em P8 (60 dias pós-operatório).

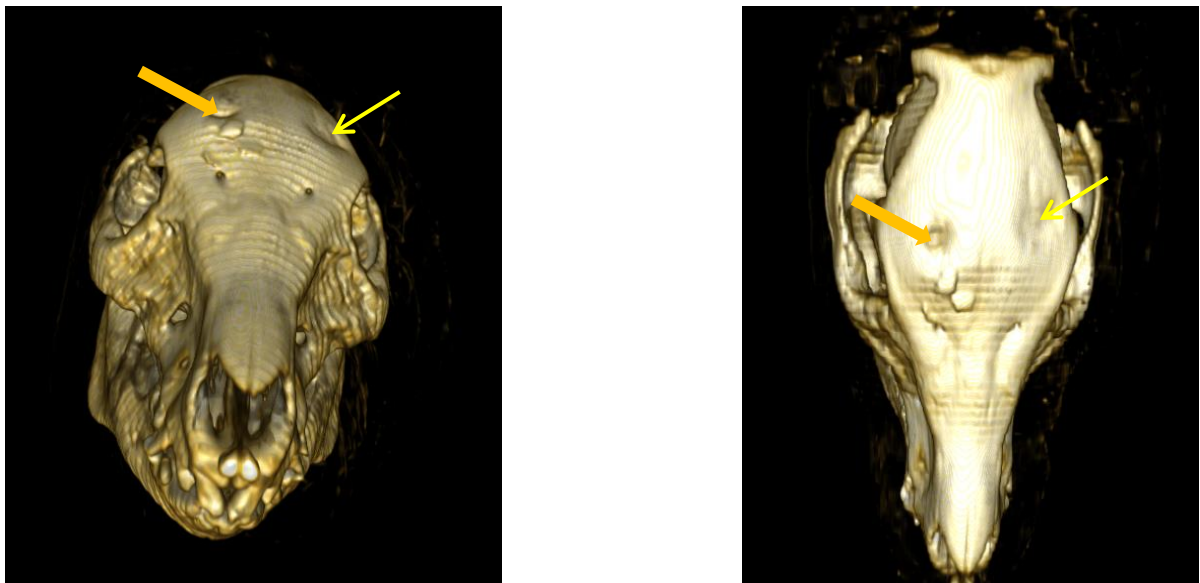


**FIGURA 29** – Determinações da espessura de craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (22,2 mm) e craniotomia esquerda não tratada (2,6 mm) através de tomografia computadorizada em P10 (60 dias pós-operatório).

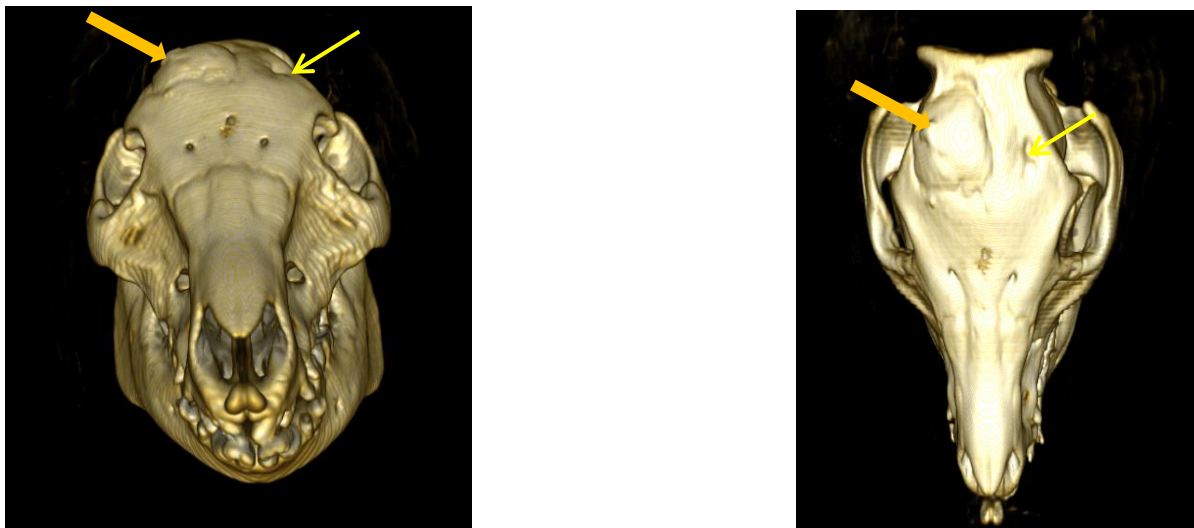


#### 5.1.4 Reconstrução em 3D do crânio dos porcos eutanasiados aos 60 dias pós-operatórios.

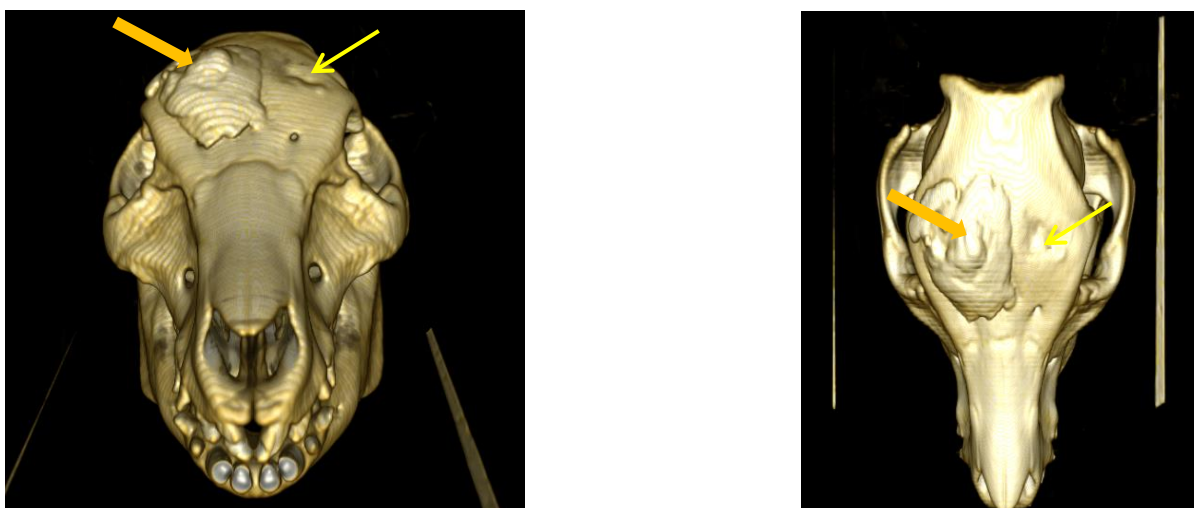
**FIGURA 30** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P2) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório.



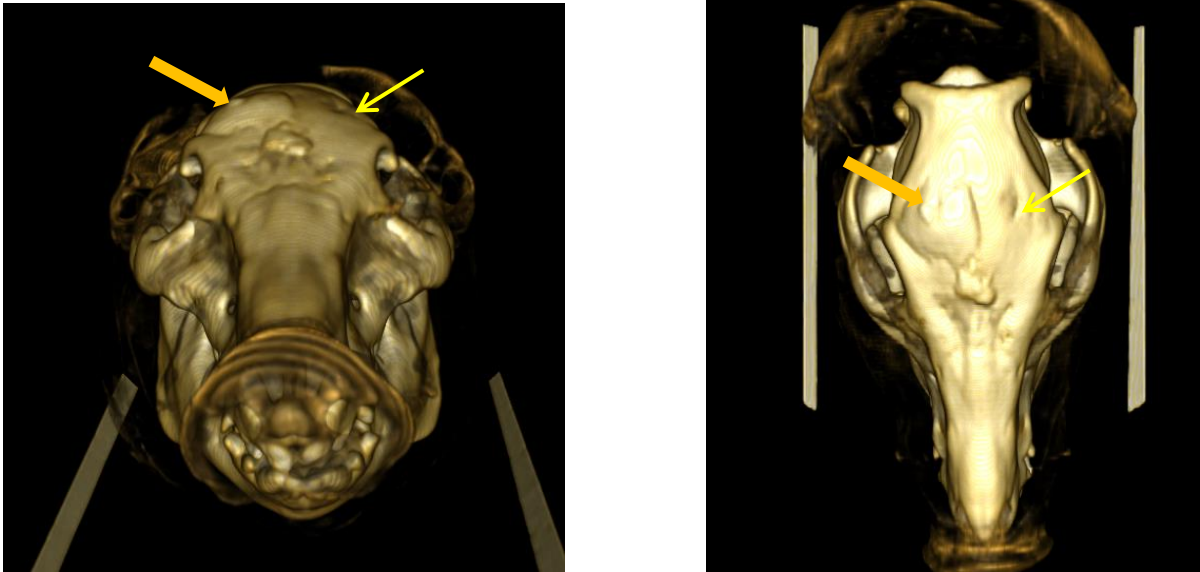
**FIGURA 31** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P4) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório



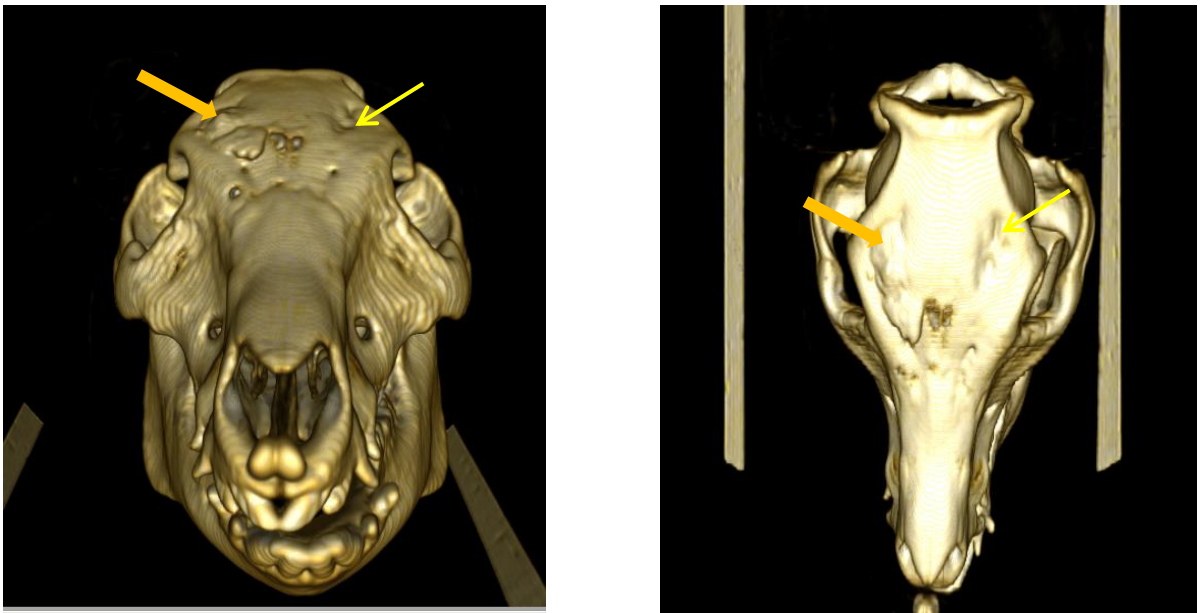
**FIGURA 32** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P7) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório



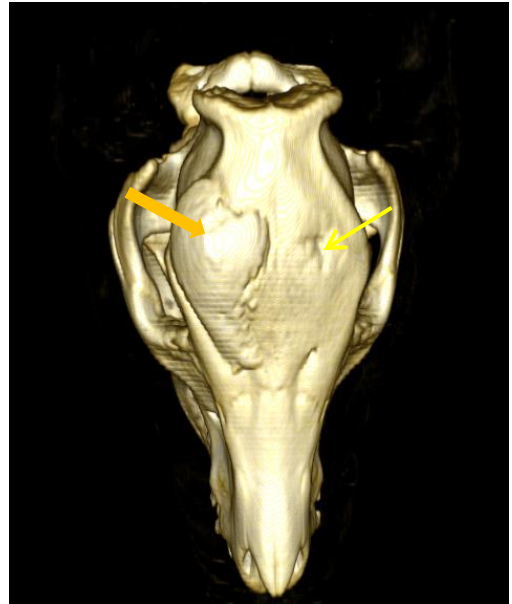
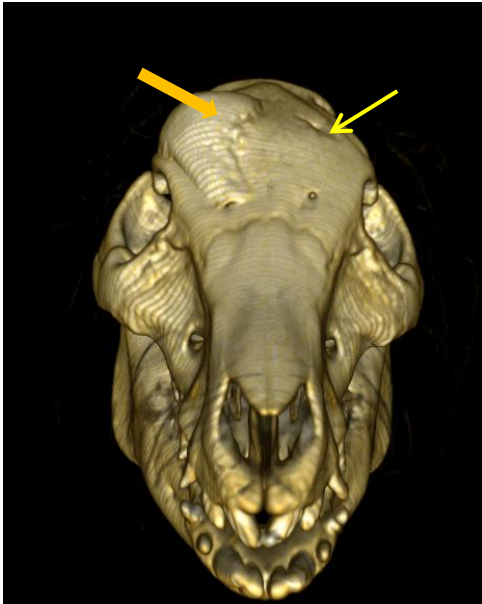
**FIGURA 33** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P8) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda não tratada (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório.



**FIGURA 34** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P9) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório



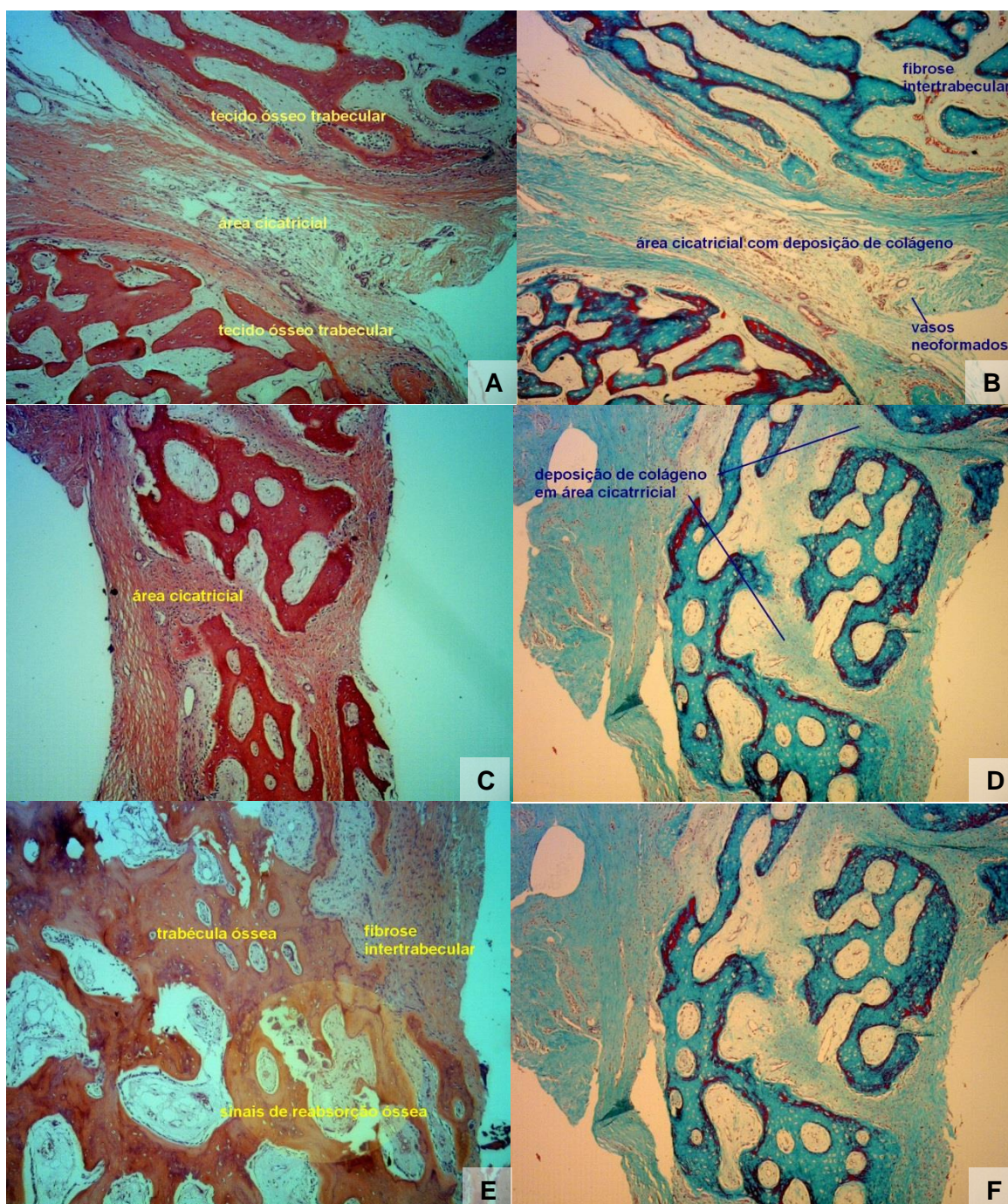
**FIGURA 35** – Reconstrução em 3D de crânio de porco (P10) evidenciando a diferença de osso neoformado em craniotomia tratada com rhBMP-2 (SETA CHEIA) e craniotomia esquerda não tratada (SETA FINA) aos 60 dias pós-operatório.



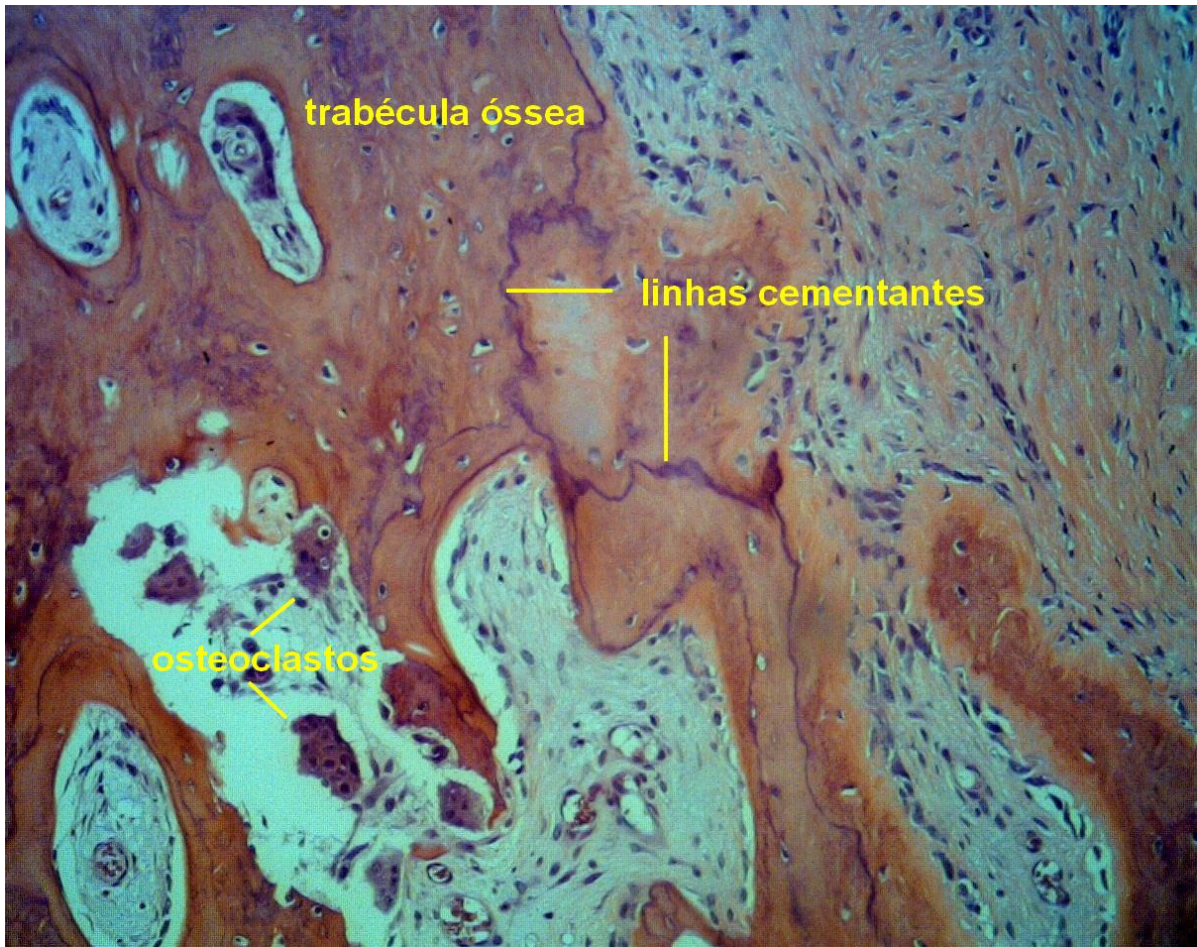
## 5.2 Análise histológica

Os dados obtidos da leitura das lâminas da análise histológica (FIGURA 36 e 37) foram categorizados (QUADRO 1) e submetidos a análise estatística.

**FIGURA 36** – A e B – aspectos da cicatriz cirúrgica no animal do grupo controle (P8). C e D – aspectos da cicatriz cirúrgica em animal com craniotomia esquerda tratada com pó de osso autógeno (P5) aos 30 dias pós-operatórios. E e F – aspectos da cicatriz cirúrgica em animal com craniotomia direita tratada com rhBMP-2 (P4) aos 60 dias. A,C,E- HE, 40x. B,D,F- tricrômico de Masson, 40x.



**FIGURA 37** – Foco de reabsorção óssea visualizado em amostra de animal pertencente ao grupo tratado com rhBMP-2 (P4). HE, 100x.

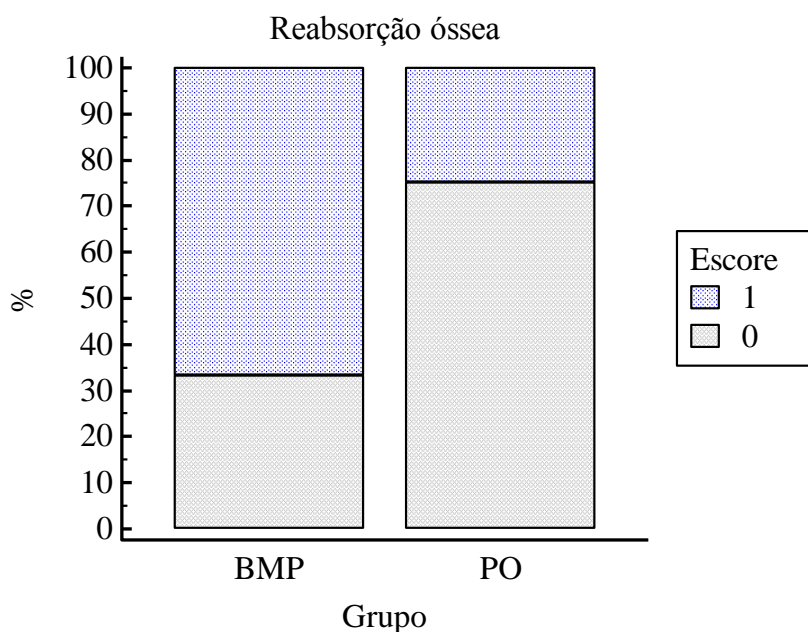


### 5.2.1 Reabsorção óssea 30 dias pós-operatórios.

**Tabela 3** - Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.

Escore	rhBMP-2	PO
0 ausente	2 (33%)	3 (75%)
1 discreta	4 (67%)	1 (25%)
2 moderada	0	0
3 acentuada	0	0

Sem diferença estatística pelo teste do Qui-quadrado ( $p = 0,518$ )



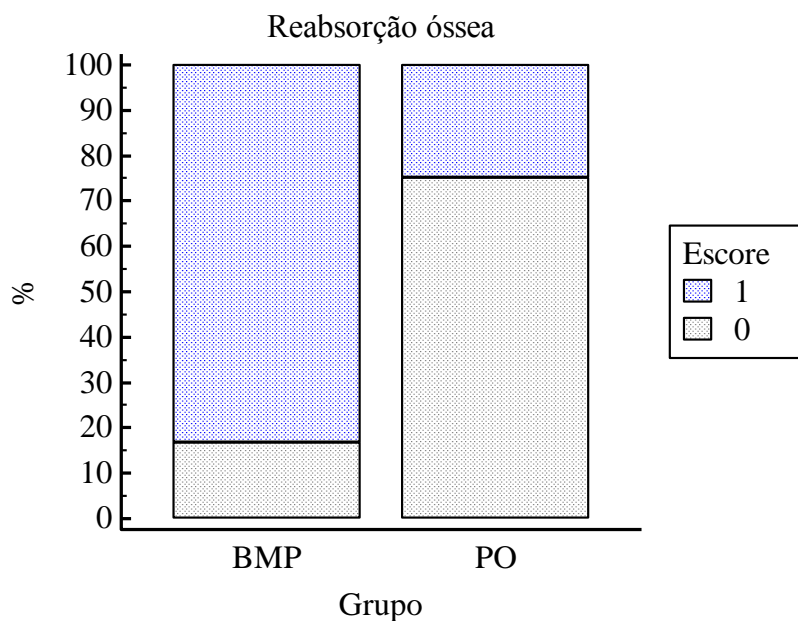
**GRÁFICO 1** - Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea categorizada em 0 (ausência de sinais de reabsorção) ou 1 (presença de < 25% de reabsorção do material de enxerto ou do leito cirúrgico) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.

### 5.2.2 Reabsorção óssea 60 dias pós-operatórios.

**Tabela 4** - Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.

Escore	rhBMP-2	PO
0 ausente	1 (17%)	3 (75%)
1 discreta	5 (83%)	1 (25%)
2 moderada	0	0
3 acentuada	0	0

Sem diferença estatística pelo teste do Qui-quadrado ( $p = 0,235$ )



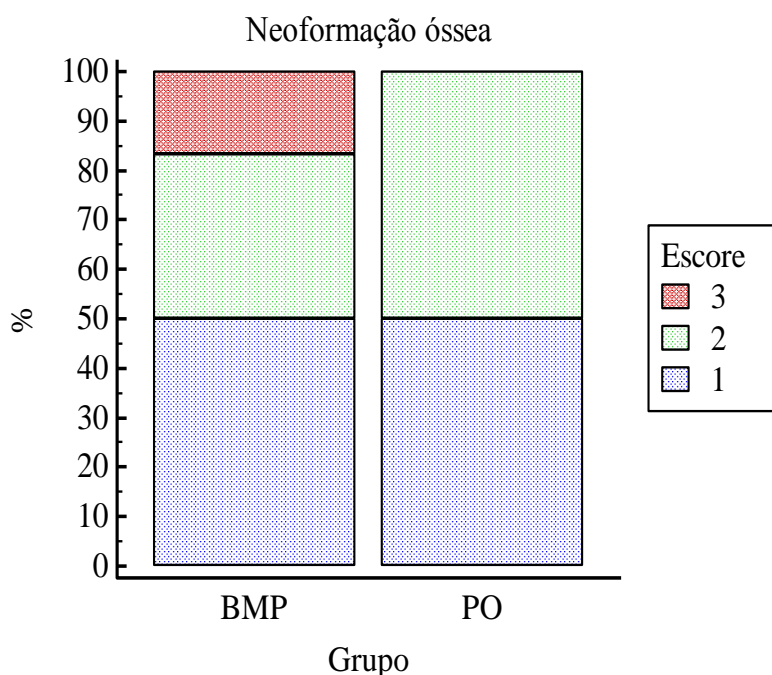
**GRÁFICO 2** - Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea categorizada em 0 (ausência de sinais de reabsorção) ou 1 (presença de < 25% de reabsorção do material de enxerto ou do leito cirúrgico) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.

### 5.2.3 Neoformação óssea 30 dias pós-operatórios.

**Tabela 5** - Distribuição de frequência do grau de neoformação óssea na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.

Escore	rhBMP-2	PO
0 ausente	0	0
1 discreta	3 (50%)	2 (50%)
2 moderada	2 (33%)	2 (50%)
3 acentuada	1 (17%)	0

Sem diferença estatística pelo teste do Qui-quadrado ( $p = 0.659$ )



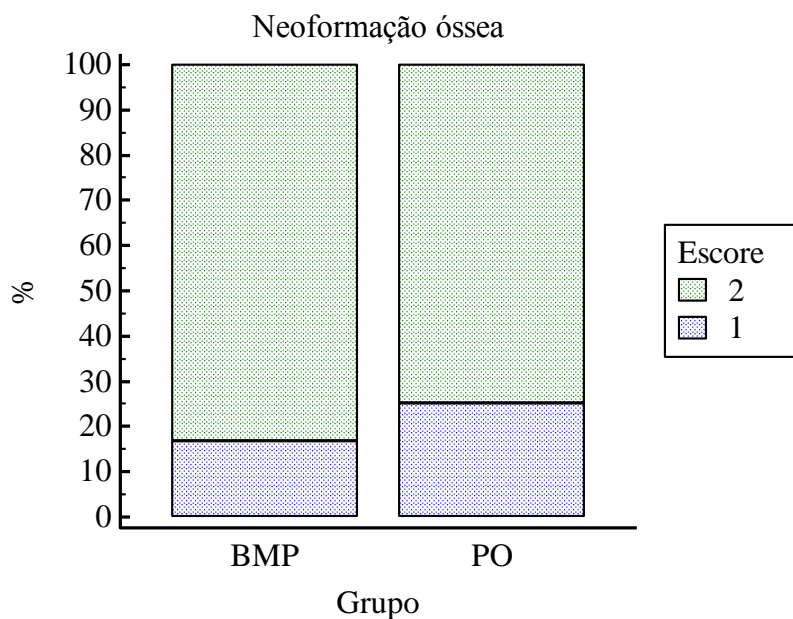
**GRÁFICO 3** - Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea categorizada em 0 (ausência de sinais de reabsorção); 1 (Presença de <25% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado); 2 (Presença de 25-50% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado) e 3 (Presença de >50% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.

### 5.2.4 Neoformação óssea 60 dias pós-operatórios.

**Tabela 6** - Distribuição de frequência do grau de neoformação óssea na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.

Escore	rhBMP-2	PO
0 ausente	0	0
1 discreta	1 (17%)	1 (25%)
2 moderada	5 (83%)	3 (75%)
3 acentuada	0	0

Sem diferença estatística pelo teste do Qui-quadrado ( $p = 0.628$ )



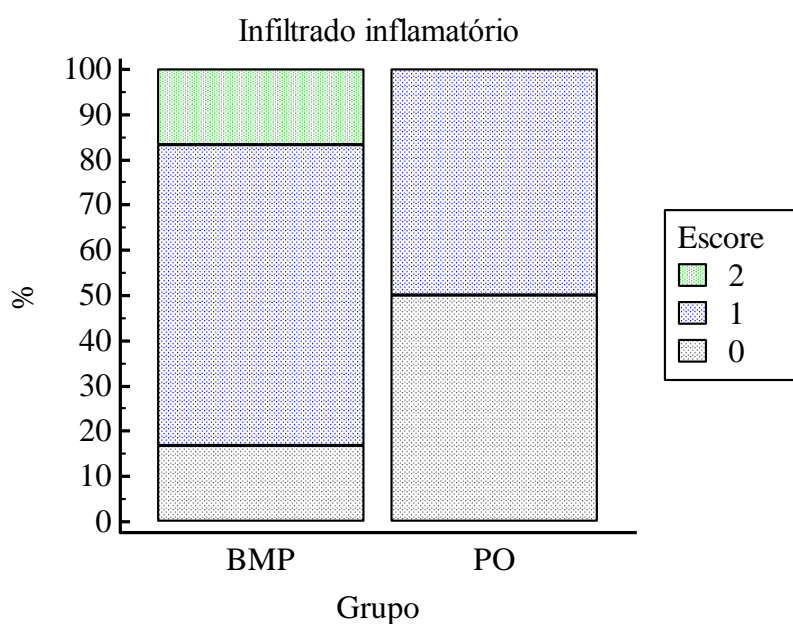
**GRÁFICO 4** - Distribuição de frequência do grau de reabsorção óssea categorizada em 0 (ausência de sinais de reabsorção); 1 (Presença de <25% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado); 2 (Presença de 25-50% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado) e 3 (Presença de >50% de osso neoformado semelhante ao osso adjacente não tratado) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.

### 5.2.5 Infiltrado inflamatório 30 dias pós-operatórios.

**Tabela 7** - Distribuição de frequência do grau de infiltrado inflamatório na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.

Escore	rhBMP-2	PO
0 ausente	1 (17%)	2 (50%)
1 discreta	4 (66%)	2 (50%)
2 moderada	1 (17%)	0
3 acentuada	0	0

Sem diferença estatística pelo teste do Qui-quadrado (p = 0.434)



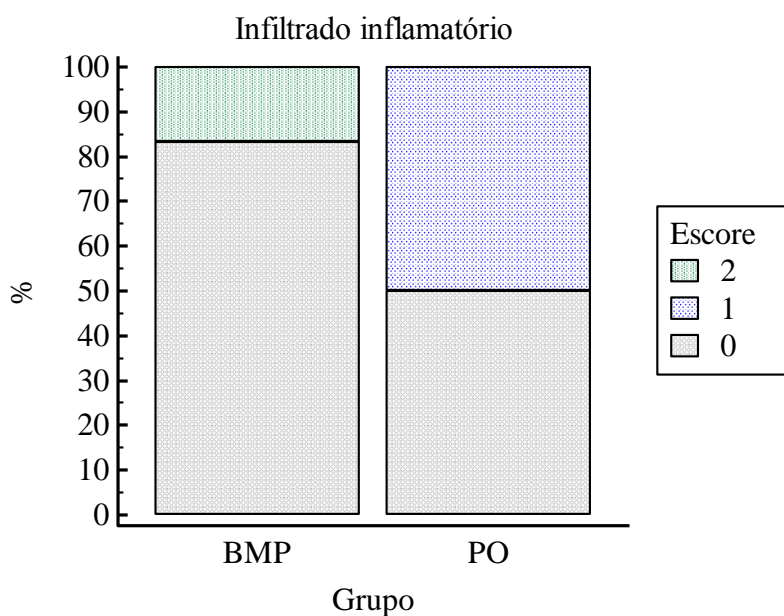
**GRÁFICO 5** - Distribuição de frequência do grau de infiltrado inflamatório categorizada em 0 (ausência de infiltrado inflamatório); 1 (Presença de <25% de infiltrado inflamatório); 2 (Presença de 25-50% de infiltrado inflamatório) e 3 (Presença de >50% de infiltrado inflamatório) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.

### 5.2.6 Infiltrado inflamatório 60 dias pós-operatórios.

**Tabela 8** - Distribuição de frequência do grau de infiltrado inflamatório na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.

Escore	rhBMP-2	PO
0 ausente	5 (83%)	2 (50%)
1 discreta	0	2 (50%)
2 moderada	1 (17%)	0
3 acentuada	0	0

Sem diferença estatística pelo teste do Qui-quadrado ( $p = 0.132$ )



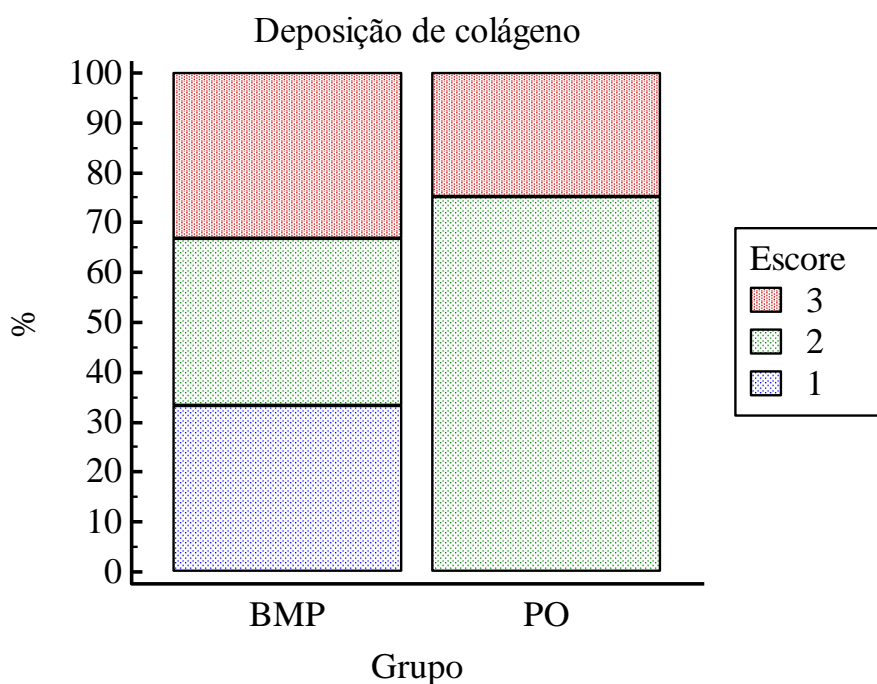
**GRÁFICO 6** - Distribuição de frequência do grau de infiltrado inflamatório categorizada em 0 (ausência de infiltrado inflamatório); 1 (Presença de <25% de infiltrado inflamatório); 2 (Presença de 25-50% de infiltrado inflamatório) e 3 (Presença de >50% de infiltrado inflamatório) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.

5.2.7 Deposição de colágeno ao tricrômico de Masson 30 dias pós-operatórios.

**Tabela 9** - Distribuição de frequência do grau de deposição de colágeno ao tricrômico de Masson na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.

Escore	rhBMP-2	PO
0 ausente	0	0
1 discreta	2 (33%)	0
2 moderada	2 (33%)	3 (75%)
3 acentuada	2 (33%)	1 (25%)

Sem diferença estatística pelo teste do Qui-quadrado ( $p = 0.329$ )



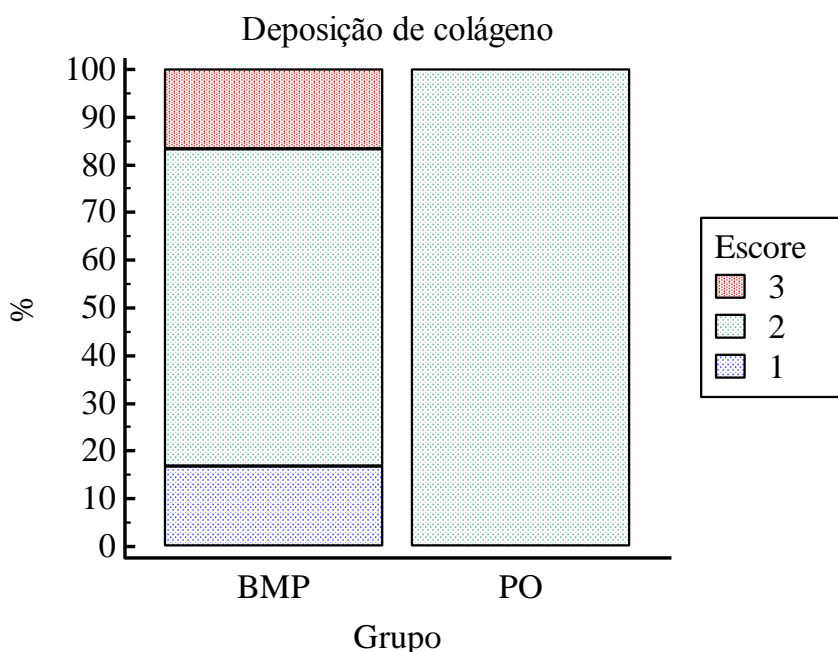
**GRÁFICO 7** - Distribuição de frequência do grau de deposição de colágeno ao tricrômico de Masson categorizada em 0 (ausente); 1 (Presença de deposição de colágeno em <25% da área de enxertia); 2 (Presença de deposição de colágeno em 25-50% da área de enxertia) e 3 (Presença de deposição de colágeno em >50% da área de enxertia) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.

5.2.8 Deposição de colágeno ao tricrômico de Masson 60 dias pós-operatórios.

**Tabela 10** - Distribuição de frequência do grau de deposição de colágeno ao tricrômico de Masson na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.

Escore	rhBMP-2	PO
0 ausente	0	0
1 discreta	1 (17%)	0
2 moderada	4 (66%)	4 (100%)
3 acentuada	1 (17%)	0

Sem diferença estatística pelo teste do Qui-quadrado ( $p = 0.434$ )



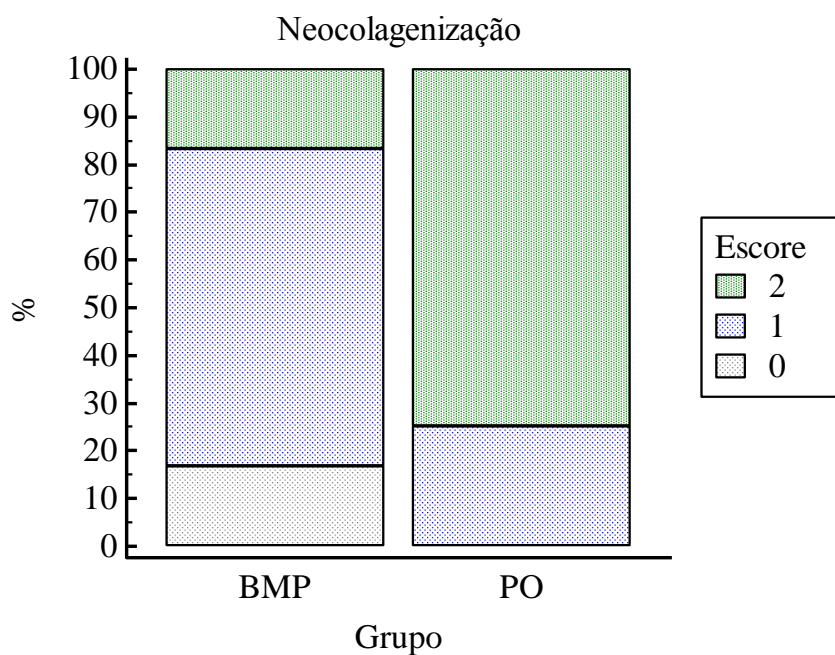
**GRÁFICO 8** - Distribuição de frequência do grau de deposição de colágeno ao tricrômico de Masson categorizada em 0 (ausente); 1 (Presença de deposição de colágeno em <25% da área de enxertia); 2 (Presença de deposição de colágeno em 25-50% da área de enxertia) e 3 (Presença de deposição de colágeno em >50% da área de enxertia) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.

### 5.2.9 Neocolagenização ao picrossírius 30 dias pós-operatórios.

**Tabela 11** - Distribuição de frequência do grau de neocolagenização ao picrossírius na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.

Escore	rhBMP-2	PO
0 ausente	1 (17%)	0
1 discreta	4 (66%)	1 (25%)
2 moderada	1 (17%)	3 (75%)
3 acentuada	0	0

Sem diferença estatística pelo teste do Qui-quadrado ( $p = 0.170$ )



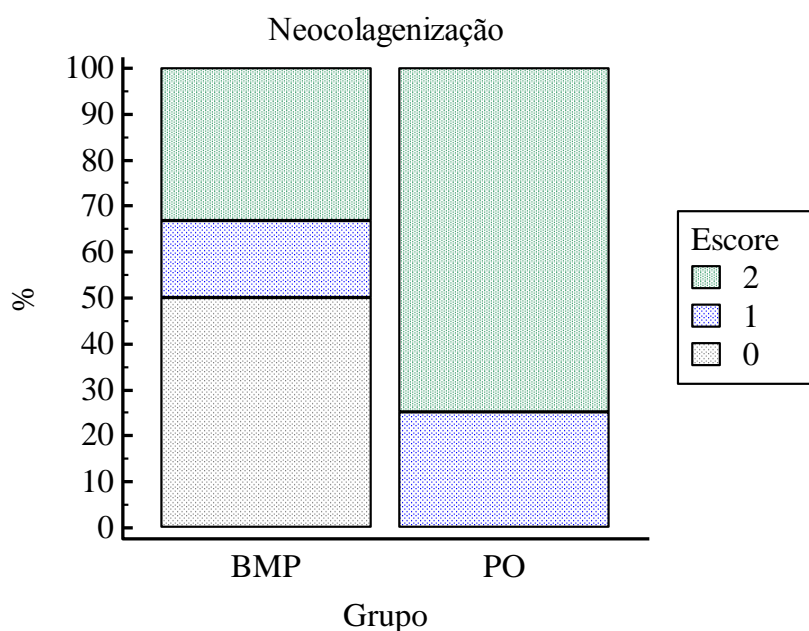
**GRÁFICO 9** - Distribuição de frequência do grau de neocolagenização ao picrossírius categorizada em 0 (ausente); 1 (Presença de deposição de fibras finas, em <25% da área de enxertia, ao exame sob luz polarizada); 2 (Presença de deposição de fibras finas, em 25-50% da área de enxertia, ao exame sob luz polarizada) e 3 (Presença de deposição de fibras finas, em >50% da área de enxertia, ao exame sob luz polarizada) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 30 dias após a aplicação.

### 5.2.10 Neocolagenização ao picrossírius 60 dias pós-operatórios.

**Tabela 12** - Distribuição de frequência do grau de neocolagenização ao picrossírius na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.

Escore	rhBMP-2	PO
0 ausente	3 (50%)	0
1 discreta	1 (17%)	1 (25%)
2 moderada	2 (33%)	3 (75%)
3 acentuada	0	0

Sem diferença estatística pelo teste do Qui-quadrado ( $p = 0.232$ )



**GRÁFICO 10** - Distribuição de frequência do grau de neocolagenização categorizada em 0 (ausente); 1 (Presença de deposição de colágeno em <25% da área de enxertia); 2 (Presença de deposição de colágeno em 25-50% da área de enxertia) e 3 (Presença de deposição de colágeno em >50% da área de enxertia) na calvária de porcos tratados com rhBMP-2 (n=6) ou pó de osso (n=4) eutanasiados aos 60 dias após a aplicação.

## **6 DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

A escolha pelos porcos como modelo animal foi baseada na espécie de maior proximidade com os seres humanos. Milhares de trabalhos utilizam os suínos como modelo animal experimental. Além disso, necessitava-se de uma espécie com o crânio de grandes dimensões devido ao tamanho do craniótomo (6 mm), o que inviabilizaria o uso de ratos ou coelhos.

A idade dos porcos também foi um fator importante na escolha da amostra. Visando entender melhor como o rhBMP-2 age no pacientes pediátricos, foi imposto que os porcos deveriam ter dois meses de idade. Na infância muitas cirurgias cranianas para correções de deformidades congênitas são realizadas. Mesmo sabendo que o potencial osteogênico em crianças é maior, a rhBMP-2 poderá ter no futuro sua indicação de aplicação, mesmo em crianças, para se obter resultados mais rápidos na formação óssea, diminuindo a possibilidade de falhas no tratamento cirúrgico, e sem a necessidade de área doadora de enxertos ósseos.

A determinação do número de animais em uma pesquisa é sempre motivo de discussão. A necessidade de significância estatística, contrabalanceada pela saúde animal e ética em pesquisa são fatores que devem ser analisados com muito cuidado na elaboração de um projeto. O número da amostra foi escolhido de acordo com a quantidade permitida pelo Comitê de Ética da Universidade Tuiuti do Paraná.

Os porcos no início do experimento tinham dois meses de idade e baixo peso, entretanto ao final do experimento os porcos estavam com quatro meses de idade e pesando aproximadamente 28 kg. O manejo de 12 porcos deste porte dificulta muito a sua manutenção. Por isso optou-se por realizar duas craniotomia em cada porco para maximizar a utilização e evitar que mais porcos sejam utilizados. Sendo assim, a craniotomia direita tornou-se controle da craniotomia esquerda e vice e versa.

O defeito ósseo do crânio é indesejável tanto para o efeito estético quanto para o risco de trauma direto na topografia da falha óssea. Há inúmeras causas ou eventos que promovem falhas ósseas do crânio, como deformidades congênitas craniofaciais, trauma, infecções, tumores e cirurgia prévia. Consequentemente muitas dificuldades são encontradas quando é necessário o uso de enxertos (bipartição óssea craniana) ou de próteses (titânio, prototipagem e polietileno poroso).

Analisando os dados obtidos na avaliação tomográfica observou-se diferença estatisticamente significativa na comparação da média da densidade do osso neoformado entre craniotomia tratada com rhBMP-2 e pó de osso autógeno aos 30 dias pós operatório. Essa diferença já era esperada e confirmou-se com a análise tomográfica. Justifica-se pelo fato do osso neoformado tratado com pó de osso ter agregado ao osso neoformado a densidade do próprio pó de osso autógeno. A rhBMP-2 apesar de apresentar-se na forma liofilizada e utilizar uma esponja de colágeno como carreador, o osso neoformado não atinge os mesmos valores da densidade do osso neoformado tratado com pó de osso (tabela 1).

Com um nível de significância de 0,1%, a capacidade osteoindutora da rhBMP-2 foi comprovada quando comparada com o pó de osso na análise tomográfica da espessura do osso neoformado. Observa-se o valor da média da espessura de  $16,3 \pm 1,1$  mm de osso neoformado tratado com rhBMP-2 contra a média da espessura de  $4,2 \pm 0,1$  mm de osso neoformado tratado com pó de osso. A diferença é tão significativa que foi possível macroscopicamente observar a diferença na espessura do osso neoformado tratado com rhBMP-2 e pó de osso em todos os crânios dos porcos do experimento.

Esta constatação é baseada no princípio da osteoindução que se caracteriza pela formação maior de osso neoformado quando comparada ao pó de osso, devido a capacidade da rhBMP-2 estimular a diferenciação local das células mesenquimais indiferenciadas em células formadoras de osso de forma precoce (CYPHER & GROSSMAN, 1996). Diversos trabalhos também confirmaram a capacidade osteoindutora das BMP (GRAJANEIRO *et al.*, 2005), assim como observado por Cowan *et al.* (2007) em testes *in vitro*, Sanches *et al.* (2009) utilizando defeitos em crânios de ratos como modelo animal experimental; assim como em fusões espinhais procedimentos ortopédicos e procedimentos maxilofaciais em humanos (McKAY, PECKHAM, BADURA, 2007).

No presente trabalho também constatamos a grande capacidade osteoindutora do rhBMP-2 em comparação ao pó de osso autógeno. Pela análise tomográfica em reconstrução em terceira dimensão foi possível observar a diferença de osso neoformado (FIGURAS 18, 19, 20, 21, 22, 23, 30, 31, 32, 33, 34, 35).

Porém ocorre uma mudança significativa no comportamento do osso neoformado tratado com a rhBMP-2 e o pó de osso quando foram analisados os dados da análise tomográfica aos 60 dias pós-operatórios. Em nenhum dos parâmetros avaliados as médias da densidade e da espessura apresentaram diferença estatisticamente significativa. Sugere-se que mesmo após a osteoindução precoce, não foi observada diferença entre o pó de osso e a rhBMP-2 no resultado final, apenas aceleram a quantidade e qualidade de osso. Isto só vem a comprovar a eficiência do rhBMP-2.

Nesse momento da análise apesar da média da densidade do osso neoformado tratado com pó de osso ser inferior quando comparada a média da densidade do osso neoformado tratado com a rhBMP-2, não se observou diferença estatisticamente significativa. A osteogênese já se estabeleceu e podemos perceber que a média da densidade óssea do osso neoformado na craniotomia tratada com rhBMP-2 ( $665,2 \pm 116,5$  UH) é superior à média da densidade óssea do osso neoformado na craniotomia tratada com pó de osso ( $599,2 \pm 110,5$  UH). Inclusive quando comparado aos 30 dias pós-operatórios à média da densidade óssea da craniotomia tratada com pó de osso ( $644,5 \pm 124,0$  UH) é superior à média encontrada aos 60 dias pós-operatórios ( $599,2 \pm 110,5$  UH).

A provável explicação para esse comportamento é o fato de se estar utilizando um modelo suíno pediátrico, onde a consolidação ocorre de maneira mais rápida do que em adultos. Conseqüentemente esses animais já estão sofrendo o processo de remodelamento ósseo, o que justificaria inclusive o porquê de não se encontrar diferença estatisticamente significativa na espessura aos 60 dias pós-operatórios. É possível ainda observar que a média da densidade óssea do osso neoformado na craniotomia tratada com rhBMP-2 aos 60 dias pós-operatórios (TABELA 2) é superior à média da densidade óssea do osso neoformado na craniotomia tratada com pó de osso aos 30 dias pós-operatórios (tabela 1), momento em já era esperado que a média da densidade do pó de osso fosse superior à média da densidade do rhBMP-2. Sendo assim, fica evidente que esse comportamento ocorre devido a uma maior capacidade osteoindutora do rhBMP-2.

Aos 60 dias, a análise da média de espessura do osso neoformado tratado com rhBMP-2 também apresentou valores médios maiores ( $11,4 \pm 7,1$  mm) do que tratados com pó de osso autógeno ( $4,2 \pm 0,1$  mm), porém sem diferença significativa

(tabela 2). Existe uma tendência do rhBMP-2 ter uma melhor capacidade osteoindutora que não pode ser confirmada estatisticamente aos 60 dias pós-operatórios. As figuras 30, 31, 32, 33, 34 e 35 ilustram bem a tendência de a espessura ser mais evidente (tabela 2) com animais tratados com rhBMP-2.

Didaticamente, pode-se dividir em seis os estágios do desenvolvimento do calo de fratura, lembrando que essa divisão não é rígida e imutável, podendo variar de uma fratura para outra (em um mesmo ou diferentes indivíduos) e de região para outra em uma mesma fratura. Por isso optou-se por realizar em um mesmo indivíduo duas craniotomias (uma em cada osso parietal direito e esquerdo), visando minimizar a influência de variáveis durante a análise estatística.

Reforçando, o primeiro estágio é a fase de hemorragia que se inicia com a ruptura da rede vascular e com acúmulo de sangue que se interpõe e envolve os fragmentos ósseos separados. Nessa fase ocorrem profusas trombozes vasculares, cujos efeitos (isquemia e necrose osteomedular) se tornam evidentes nos dias subsequentes. Esta fase pode durar de horas a dias (TARRAGÔ & BARRA, 2006). O segundo estágio é a fase inflamatória, caracterizada inicialmente pela presença de exsudato serofibrinoso e pela liberação de pirógenos angiogênicos (calicreína) pelos tecidos necróticos. Segue-se a infiltração de leucócitos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos e mastócitos. Nesta fase, osteoclastos neoformado iniciam a reabsorção do tecido necrótico. É nesta fase que vários fatores já foram identificados como fatores de crescimentos (plaquetas, e TGF- $\beta$ 1, por exemplo) além das BMP (TARRAGÔ & BARRA, 2006), que terão papel fundamental na regulação da proliferação e diferenciação das células. (FOSSUM, 2012). A fase inflamatória inicia-se dois dias após a fratura (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Portanto, analisando os dados obtidos das lâminas do grupo rhBMP-2 e PO aos 30 dias pós-operatórios (TABELA 7) não foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0.434$ ) entre os grupos, porém o gráfico 5 ilustra a distribuição de frequência do grau de infiltrado inflamatório de forma categorizada. É possível observar uma tendência do grupo rhBMP-2 apresentar maior reação inflamatória por se utilizar é um produto recombinante humano e conseqüentemente causando maior estimulação do sistema imune.

A ativação da resposta imune devido a implantação de BMP ainda não é totalmente conhecida ou bem definida devido as muitas controvérsias na literatura

segundo Grajaneiro *et al.* (2005). URIST *et al.* (1985) observaram que apenas uma única aplicação de BMP alogênica e proteína não colagenosa desencadeava uma resposta imune moderada através da produção de imunoglobulinas G. Segundo Nilsson *et al.* (1986), a implantação da BMP alogênica ou xenogênica promove o recrutamento dos macrófagos, linfócitos e células do plasma, aumentando a resposta inflamatória. Mesmo com alguns estudos demonstrando que doses únicas não estimulavam a reação imune indesejada (NILSSON *et al.*, 1986). Posteriormente, Nilsson & Urist (1991) demonstraram resultados que uma segunda dose de BMP intensificou a resposta imune e diminuíram a eficiência da osteogênese com BMP xenogênico no tratamento de falha óssea em cães.

Porém quando o grupo rhBMP-2 foi avaliado histologicamente aos 60 dias pós-operatórios com relação ao infiltrado inflamatório, este grupo apresentou, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa ( $p = 0.132$ ), uma tendência evidente (GRÁFICO 6) na queda da estimulação imunológica do rhBMP-2 quando comparada ao grupo PO que utilizou pó de osso autógeno (TABELA 8). Justificando o investimento no desenvolvimento das proteínas morfogenéticas ósseas recombinante humana para minimizar a possibilidade de reações indesejadas, apesar do seu alto custo, segundo Gao *et al* (1996). Além disso, os mediadores inflamatórios como PGE-1 e PGE-2 estimularam a angiogênese, sendo responsáveis pelo início precoce do estímulo para que os osteoclastos iniciem a reabsorção óssea e a proliferação de células osteoprogenitoras, segundo Fossum (2012).

De acordo com a TABELA 3 foi possível observar que 75% dos indivíduos do grupo PO aos 30 dias pós-operatórios não apresentaram nenhum sinal de reabsorção óssea, enquanto 67% dos indivíduos do grupo rhBMP-2 apresentaram presença menor que 25% de reabsorção do material de enxerto ou do leito cirúrgico, porém sem diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,518$ ). Isso demonstra a tendência do rhBMP-2 estimular precocemente a angiogênese e conseqüentemente estimular a reabsorção quando comparada ao PO (GRÁFICO 1). O mesmo comportamento se observou nos grupos rhBMP-2 e PO aos 60 dias pós-operatórios (TABELA 4), que apesar de também não apresentar diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,235$ ) observou-se que o grupo rhBMP-2 apresentou 83% dos animais na categoria discreta enquanto 75% dos animais tratados com PO ainda se

encontravam na categoria ausente. Sendo assim fica evidente a tendência (GRÁFICO 2) do grupo rhBMP-2 tanto aos 30 dias como aos 60 dias de uma melhor capacidade osteoindutora. Talvez com um número maior de animais fosse possível identificar essa significância.

O terceiro estágio é a fase da formação do tecido de granulação, que corresponde à evolução natural de qualquer dano tecidual e decorrente da proliferação e estimulação das células mesenquimais multipotenciais. Tais células terão como tarefa a organização da revascularização e a neoformação das fibras conjuntivas. Essa fase dura de 2 a 12 dias a partir da fratura (TARRAGÔ & BARRA, 2006).

O quarto estágio é a fase de calo fibroso, caracterizada pela presença de abundante tecido conjuntivo fibroso e pela diferenciação de osteoblastos e condroblastos. Forma-se tecido osteóide internamente (medula óssea) e externamente (na superfície). Concomitante, há formação de tecido cartilaginoso a partir do mesênquima imaturo e multipotencial que prolifera e matura, tornando-se apto a calcificar-se e a sofrer um processo de ossificação (ossificação endocondral). Essa fase é evidente após a primeira semana de fratura e podem durar vários meses (TARRAGÔ & BARRA, 2006).

Para quantificação das fibras de colágeno foi utilizada a coloração de tricrômico de Masson aos 30 e 60 dias pós-operatório. As técnicas de tricrômico de Masson e vermelho picrossírius foram aplicadas aos tecidos, no intuito de demonstrar a presença de fibras colágenas na área cicatricial. No processo cicatricial, parâmetros histopatológicos são valorizados como indicativos do processo de reorganização tecidual, tais como: profundidade da cicatriz, estratificação epitelial, infiltração leucocitária e macrofágica, presença de fibroblastos, extensão da elastose e, particularmente, deposição de colágeno, proteína que desempenha papel dominante na manutenção da integridade tecidual.

A coloração pelo tricrômico de Masson é capaz de diferenciar componentes teciduais, corando em azul ou verde as fibras colágenas finas e grosseiras, presentes na fase de remodelação da cicatriz (SUVIK & EFENDY, 2012). O vermelho picrossírius é um corante aniônico com afinidade ao colágeno, por reagir com seus grupos sulfônicos. A aderência do corante às fibras colágenas revela os

longos eixos paralelos das fibras, aspecto que é reforçado ao exame sob luz polarizada (JUNQUEIRA, BIGNOLAS & BRENTANI, 1979)

Na TABELA 9, aos 30 dias pós-operatórios, foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa, porém notou-se uma distribuição mais homogênea nos animais tratados com rhBMP-2 e no grupo tratado com PO ocorreu uma tendência de uma maior deposição de colágeno em 75% dos animais tratados (presença de deposição de colágeno em 25-50% da área de enxertia) conforme GRÁFICO 7. Foi possível ainda constatar que 33% dos animais do grupo rhBMP-2 encontravam-se no escore acentuado. Nesse caso, o carreador utilizado (esponja de colágeno tipo I) pode ter colaborado para uma maior presença de fibras de colágeno na análise da deposição das fibras de colágeno aos 30 dias pós-operatório.

Aos 60 dias pós-operatórios, na TABELA 10, observou-se que 100% dos animais tratados com PO encontravam-se com presença de deposição de colágeno em 25-50% da área de enxertia. Enquanto os animais tratados com rhBMP-2 observou-se que 66% apresentavam presença de deposição de colágeno em 25-50% da área de enxertia, mas 17% dos animais tratados apresentaram presença de deposição de colágeno > 50% da área de enxertia. Provavelmente esse comportamento seja também em função da utilização do carreador a base de colágeno e sendo que a esponja de colágeno não influencia nas propriedades osteoindutoras da rhBMP-2.

O quinto estágio é a fase do calo propriamente dito decorrente da mineralização do tecido osteóide. O tecido ósseo inicialmente formado é imaturo, e a distribuição das fibras conjuntivas em sua matriz é irregular e aleatória, ocorrendo o mesmo com a distribuição dos osteócitos. O calo formado é denominado calo primário. Essa fase também se inicia após a primeira semana da fratura e se prolonga pelos vários meses subsequentes (TARRAGÔ & BARRA, 2006). A deposição inicial desorganizada do colágeno é importante no processo cicatricial. À medida que o processo cicatricial evolui, as fibras são constantemente formadas a fim de preencher o local lesado. A matriz recém-formada sofrerá o processo de maturação lenta ao longo dos meses, mas nesse período a densa rede de capilares e o número de fibroblastos diminuem até que restem poucos capilares e fibroblastos imersos em matriz de colágeno madura e mais resistente a tração (NORONHA *et al.*, 2004). O calo primário induzido pelo rhBMP-2 avaliado pela mensuração da

espessura da neoformação óssea aos 30 dias foi superior e estatisticamente significativo (TABELA 1). Além disso, a análise estatística histológica do parâmetro neoformação óssea demonstrou uma tendência do rhBMP-2 ser superior ao PO (GRÁFICO 3) aos 30 dias pós-operatório. Porém aos 60 dias pós-operatórios não foi observado essa superioridade osteogênica na análise da espessura (TABELA 2) e chamou-se a atenção para a análise da neoformação óssea aonde foi observado um comportamento semelhante, o que sugere que o resultado final com relação ao osso formado é igual ao pó de osso. Portanto a formação precoce diminui os riscos de complicações.

O sexto e último estágio é a fase de remodelação, caracterizada pela substituição do tecido ósseo imaturo por tecido ósseo maduro (tecido ósseo lamelar). Nessa fase há regularidade na distribuição das fibras da matriz e dos osteócitos. Essa remodelação óssea decorre de intensa atividade osteoclástica (com reabsorção do osso imaturo) e osteoblástica (com deposição de osso maduro). Tal fase se estende por vários meses ou anos (TARRAGÔ & BARRA, 2006). Essa última fase não foi avaliada no experimento, pois os animais foram eutanasiados com 60 dias pós-operatório.

Sendo assim, o rhBMP-2 poderá revolucionar a cranioplastia em adultos e possivelmente em crianças devido sua grande capacidade osteoindutor, diminuindo as taxas de complicações como não união e união retardada, além da rejeição de prótese. Pois o rhBMP-2, ao acelerar a osteogênese principalmente no início do processo de consolidação, minimizaria as chances de rejeição, morbidade do leito doador do enxerto e inclusive a síndrome do trefinado, uma complicação conhecida. O que poderia atrasar a recuperação clínica–neurológica e levar a um mau resultado na evolução do paciente.

## **7 CONCLUSÃO**

## 7.CONCLUSÃO

Baseado na análise estatística foi possível concluir que o rhBMP-2 tem capacidade osteoindutora superior quando comparada ao pó de osso autógeno na tomografia aos 30 dias pós-operatórios, além de ser observado à tendência da rhBMP-2 possuir uma capacidade osteoindutora superior ao pó de osso de acordo com a análise histológica dos parâmetros reabsorção óssea, infiltrado inflamatório, deposição de colágeno e neocolagenização.

Aos 60 dias pós-operatório observou-se uma tendência clara do rhBMP-2 ser mais osteoindutor do que o pó de osso autógeno reforçada pela reconstrução em 3D dos crânios.

O rhBMP-2 demonstrou-se uma excelente opção de material osteogênico, viabilizando o seu uso em reconstrução de deformidades cranianas devido à propriedade de estimular a osteoindução de forma precoce evitando complicações como distrofias ósseas, baixa qualidade e baixa eficácia da osteogênese.

Mais pesquisas precisam ser desenvolvidas nessa faixa etária sobre a utilização da rhBMP-2 em tratamento de craniotomia e cranioplastia.

## REFERÊNCIAS

1. ABDULAI, A. E. *et al.* Cranioplasty using polymethylmethacrylate implant constructed from an alginate impression and wax elimination technique. **Ghana Medical Journal**. v. 40, p. 18-21, 2006.
2. ALONSO, N. *et al.* Evaluation of maxillary alveolar reconstruction using a resorbable collagen sponge with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cleft lip and palate patients. **Tissue Engineering Part C: Methods**. v. 16, n.5, p. 1183-1189, 2010.
3. ARGINTAR, E.; EDWARDS, S.; DELAHAY, J. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. **International Journal of the Care and Injured**. 42, p.730-734, 2011.
4. AROSARENA, O. A.; COLLINS, W. L. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: A comparison of two carriers. **Otolaryngology Head and Neck Surgery**. v. 132, p. 529-597, 2005.
5. AZARI, K. *et al.* Bone morphogenetic proteins. A review for cranial and maxillofacial surgery. **Oral Maxillofacial Surgery Clinics North America**. v. 14, p. 1-14, 2002.
6. BAMBAKIDIS, N. C. *et al.* A novel method of translabrynthine cranioplasty using hydroxyapatite cement and titanium mesh: a technical report. **Journal of North American Skull Base Society**. v. 20, p. 157-161, 2010.
7. BAX, B. E. *et al.* Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. **Calcified Tissue International**. v. 65, p. 83-9, 1999.
8. BEGLEY, C.T. *et al.* Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. **Biomaterials**. v. 16, n. 15, p. 1181-1185, 1995.
9. BESSA, P. C. *et al.* Bone Morphogenetic proteins in tissue enegineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). **Journal of Tissue Engineering and Renerative Medicine**. v. 2, p.81-96, 2008a.
10. BESSA, P. C. *et al.* Bone Morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part I (basic concepts). **Journal of Tissue Engineering and Renerative Medicine**. v. 2, p. 1-13, 2008b.
11. BESSHO, K. *et al.* Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. **Journal of Dentral Research**. v. 70, p. 171-175, 1991.
12. BHARGAVA, D. *et al.* Construction of titanium cranioplasty plate using craniectomy bone flap as template. **Acta Neurochirurgica**. v. 152, p. 173-176, 2010.

13. BOSTROM, M. P. *et al.* Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 13, n. 357-367, 1995.
14. CANALIS, E. *et al.* Bone morphogenetic proteins,, their antagonists and the skeleton. **Endocrine Reviews**. v. 24, n. 2, p. 218-235, 2003.
15. CHENG, H. *et al.* Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 85-A, p. 1544, 2003.
16. CONSTAM, D. B.; ROBERTSON, E. J. Regulation of bone morphogenetic protein activity by prodomains and proprotein convertases. **Journal of Cell Biology**. v. 144, p. 139-149, 1999.
17. COWAN, M. S. *et al.* MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses *in vitro* and in critical sized rat calvarial defects. **Tissue Engineering**. v. 13, n. 3, p. 501-512, 2007.
18. CYPHER, T. J.; GROSSMAN, J. P. Biological principles of bone graft healing. **Journal of Foot and Ankle Surgery**. v. 35, n. 5, p. 413-417, 1996.
19. DIMITRIOUA, R. *et al.* Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review. . **International Journal of the Care and Injured** v. 42, S3–S15, 2011.
20. DOHERTY, M. J. *et al.* Biocompatibility of xenogenic bone, commercially available coral, a bioceramic and tissue sealant for human osteoblast. **Biomaterials**. v. 15, n. 8, p.601-608, 1994.
21. DOLDER, J. V. D. *et al.* Observations on the effect of BMP-2 on rat bone marrow cells culteres om titanium substrates of diferrent roughness. **Biomaterials**. v. 24, p. 1853-1860, 2003.
22. DOS SANTOS, A. A. O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 13, n. 4, p. 194-195, 2005.
23. EINHORN, T. A. *et al.* A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 85-A, n. 8, p. 1425-35, 2003a.
24. EINHORN, T. A. *et al.* Clinical applications of Recombinant Human BMPs: Early Experience and Future Development. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 85-A, n. 3, p. 82-8, 2003b.
25. FOSSUM, T. W. **Small Animal Surgery. Elsevier**. Cap 32. Fundamentals of Orthoprddic Surgery and Fracture Management. 4<sup>a</sup> ed, St. Louis: Elsevier Mosby, 2012, p. 1055-65.

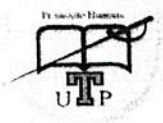
26. GAO, T. *et al.* Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. **Internacional Orthopaedics**. v. 20, p. 321-325, 1996.
27. GRANJEIRO, J. M. *et al.* Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.38, pp.1436-1473, 2005.
28. Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. **Journal of Dental Research**. v. 70, p. 171-175, 1991.
29. GREENE, A. K. *et al.* Pediatric cranioplasty using particulate calvarial bone graft. **Plastic and Reconstructive Surgery Journal**. v. 122, p. 563-571, 2007.
30. GROENEVELD, E. H. J., BURGER, E. H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. **European Journal of Endocrinology**. v. 142, p. 9-21, 2000.
31. ISLAMOGLU, K. *et al.* Permanence of diced cartilage, bone dust and a diced cartilage/bone dust mixture in experimental design in twelve weeks. **The Journal of Craniofacial Surgery**. v. 17, p. 995-998, 2006.
32. JABERI, J. *et al.* Long-term clinical outcome analysis of poly-methyl-methacrylate cranioplasty for large skull defects. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**. v. 71, n. 2, p. 81-88, 2013.
33. JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrossirius staining plus polarization microscopy a specific method for collagen determination in tissue sections. **Histochemical Journal**. v. 11, p. 447-455, 1979.
34. JUNQUEIRA, L. C. U; CARNEIRO, J. C. Tecido ósseo. **In: Histologia básica**. Cap. 8, 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.135-152.
35. KAIDO, T. *et al.* Titanium alloys as fixation device material for cranioplasty and its safety in electroconvulsive therapy. **The Journal of ECT**. v. 27, p. 27-28, 2011.
36. KLOEN, P. *et al.* BMP signaling components are expressed in human fracture callus. **Bone**. v. 33, p. 362-371, 2003.
37. KULAKOV, A. A. *et al.* Critical bone defects elimination by bioengineering construction upon non-resorbable polymeric base with the use of autogenic multipotent stromal cells from adipose tissue. **Stomatologia**. v. 89, n. 3, p. 9-12, 2010.
38. LEE, K. S. *et al.* Both the SMAD and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx-2 expression following induction by transforming growth factor- $\beta$  and bone morphogenetic protein. **Oncogene**. v. 21, n. 47, p.7156-7163, 2002.
39. LI, X., CAO, X. BMP Signaling and skeletogenesis. **Annals of New York Academic Sciences**. v.1068, p. 26-40, 2006.

40. MAAS, C. S. *et al.* Comparison of biomaterials for facial bone augmentation. **Archives Otolaryngology- Head and Neck Surgery**. v. 116, n. 5, p. 551-556, 1990.
41. MATSUNO, A. *et al.* Analyses of the factors influencing bone graft infection after delayed cranioplasty. **Acta Neurochirurgica**. v. 148, p. 535-540, 2006.
42. McKAY, W. F.; PECKHAM, S. M.; BADURA, J. M. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE® Bone graft). **International Orthopaedics (SICOT)**. v. 31, p. 729-734, 2007.
43. NILSSON, O. S. *et al.* Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 68, p. 635-642, 1986.
44. NILSSON, O. S.; URIST, M.R. Immune inhibition of repair of canine skull trephine defects implanted with partially purified bovine morphogenetic protein. **International Orthopaedics**. v. 15, p. 257-263, 1991.
45. NORONHA, L. Estudo morfométrico e morfológico da cicatrização após uso do laser Erbium: YAG em tecidos cutâneos de ratos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 1, p. 41-48, 2004.
46. OGATA, D. V. G. *et al.* Biossegurança em bancos de ossos no Brasil. **Implant News**. v. 4, n. 4, p. 363-367, 2006.
47. PACICCA, D. M. *et al.* Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. **Bone**. v. 33, p. 889-898, 2003.
48. PALECKIS, L. G. P. *et al.* Enxerto ósseo autógeno – Porque e como utilizá-los. **ImplantNews**. v. 2, n. 4, p. 369-374, 2005.
49. PHIMPHILAI, M. *et al.* BMP signaling is required for RUNX2 dependent induction of the osteoblast phenotype. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 21, n. 4, p. 637-646, 2006.
50. PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas em pequenos animais**. 3 ed. Manole: São Paulo, Cap. 3, p. 139-145, 1999.
51. PINHEIRO, A. L. B. *et al.* Light microscopic description of the effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. **Journal of Biomedical Material Research A**. v. 98, n. 2, p. 212-221, 2011.
52. Robbins & Contran. **Bases da patologia da doença**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p. 1599.
53. SAKOU, T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. **Bone**. v. 22, p. 591-603. 1998.

54. SAKOU, T. *et al.* Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. **Bone**. v. 22, n. 6, p. 591-603, 1998.
55. SANCHES, R. S. *et al.* Acompanhamento histomorfométrico e radiográfico do reparo de defeito crítico em crânio de ratos preenchidos com associação de osso medular bovino e BMP. **Innovations Implant Journal**. v. 4, n. 1, p. 32-38, 2009.
56. SOHN, D. S. *et al.* New bone formation in the maxillary sinus using only absorbable gelatin sponge. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 68, n. 6, p. 1327–1333, 2010.
57. SPECTOR, J. A. *et al.* Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. **Plastic and Reconstructive Surgery Journal**. v. 107, n. 1, p. 124-134, 2001.
58. STAFFA, G. *et al.* Custom made cranioplasty prostheses in porous hydroxyapatite using 3D design techniques: 7 years experience in 25 patients. **Acta Neurochirurgica**. v. 149, p. 161-170, 2007.
59. SUVIK, A. EFENDY, A. W. M. The use of modified Masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. **Malaysian Journal of Veterinary Research**. v. 3, n. 1, p. 39, 2012.
60. TARRAGÔ, R. P; BARRA, M. B. Consolidação das fraturas. In: Fraturas – principio e pratica. Artmed- São Paulo. 1 ed. Cap 8. 2003, p.114-121.
61. URIST, M. R. Bone: Formation by autoinduction. **Science** v. 150, n.12, p. 893-899, 1965.
62. URIST, M. R. *et al.* Immunologic evidence of a bone morphogenetic protein in the milieu interieur. **Annales de Biologie Clinique**. v. 43, p. 755-766, 1985.
63. URIST, M. R. *et al.* Induction of new-bone formation in the host bed by human bone-tumor transplant in athymic nude mice. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 61, p. 1207-1216, 1979.
64. URIST, M.R. *et al.* Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 81, p.371-375, 1984.
65. URIST, M.R., STRATES, B. S. Bone morphogenetic protein. **Journal of Dental Research**. v. 50, p. 1392, 1971.
66. WOZNEY J. M. *et al.* Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Science**. v. 242, p. 1528-1534, 1988.
67. XIANG, W. *et al.* The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implats. . **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 51, p. 647-651, 1993.

68. YU, Y. *et al.* TGF-beta, BMPs, and their signal transducing mediators, SMADS in rat fracture healing. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 60, n. 3, p. 392-397, 2002.

69. ZINS, J. E. *et al.* Controversies in skull reconstruction. **Journal of Craniofacial Surgery**. v. 21, p. 1755-1760, 2010



# UNIVERSIDADE TUIUTI DO PARANÁ

Credenciada Decreto Presidencial de 07 de julho de 1997 DOU n.º 128, de 08 de julho de 1997 - Seção 1, página 14.295  
Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde

## COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE TUIUTI DO PARANÁ

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo n° 001/12 sobre **Uso de proteína morfogenética óssea (rh BMP) em craniotomias : estudo experimental**, sob responsabilidade de Milton Mikio Morishin Filho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei 11794/08, Decreto 6899/09 e Res. 879/08 do CFMV, tendo sido aprovado pelo **Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Tuiuti do Paraná (CEUA/UTP)** em reunião realizada em 01.03.2012 . Este certificado expira em 01.03.2013 .

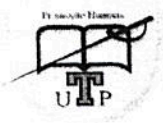
### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 001/12 about **Uso de proteína morfogenética óssea (rh BMP) em craniotomias : estudo experimental**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Reserch adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), Lei 11794/08, Decreto 6899/09 and Res. 879/08 of CFMV, and was approved by the University Tuiuti of Paraná Ethical Committee for Animal Research (**CEUA/UTP**) in 03.01.2012  
Expiration date: 03.01.2013

Curitiba, PR, 04.03.2012

  
Prof. Elza Maria Galvão Ciffoni  
President CEUA/UTP

Profª Elza M. G. Ciffoni  
Medicina Veterinária  
CRMV-PR 1673



# UNIVERSIDADE TUIUTI DO PARANÁ

Credenciada Decreto Presidencial de 07 de julho de 1997 DOU n.º 128, de 08 de julho de 1997 - Seção 1, página 14.295  
Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde

## COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE TUIUTI DO PARANÁ

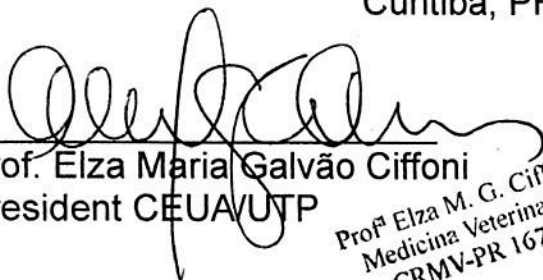
### **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo n° 001/12 sobre **Uso de proteína morfogenética óssea (rh BMP) em craniotomias : estudo experimental**, sob responsabilidade de Milton Mikio Morishin Filho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei 11794/08, Decreto 6899/09 e Res. 879/08 do CFMV, tendo sido aprovado pelo **Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Tuiuti do Paraná (CEUA/UTP)** em reunião realizada em 01.03.2012 . Este certificado expira em 01.03.2013 .

### **CERTIFICATE**

We certify that the protocol number 001/12 about **Uso de proteína morfogenética óssea (rh BMP) em craniotomias : estudo experimental**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Reserch adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), Lei 11794/08, Decreto 6899/09 and Res. 879/08 of CFMV, and was approved by the University Tuiuti of Paraná Ethical Committee for Animal Research (**CEUA/UTP**) in 03.01.2012  
Expiration date: 03.01.2013

Curitiba, PR, 04.03.2012

  
Prof. Elza Maria Galvão Ciffoni  
President CEUA/UTP  
Profª Elza M. G. Ciffoni  
Medicina Veterinária  
CRMV-PR 1673