

BETÂNIA SOUZA MONTEIRO

**O EFEITO DAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs)
ASSOCIADAS A OSSO ESPONJOSO AUTÓGENO NA
REPARAÇÃO DE FALHAS EXPERIMENTAIS NA CALOTA
CRANIANA DE COELHO (*Oryctolagus cuniculus*).**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005**

BETÂNIA SOUZA MONTEIRO

**O EFEITO DAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs)
ASSOCIADAS A OSSO ESPONJOSO AUTÓGENO NA REPARAÇÃO
DE FALHAS EXPERIMENTAIS NA CALOTA CRANIANA DE
COELHO (*Oryctolagus cuniculus*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 26 de agosto de 2005.

Prof. Luiz Gonzaga Pompermayer
(Conselheiro)

Prof^ª. Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Conselheira)

Prof. Marcelo José Vilela

Prof^ª. Andréa Pacheco Batista Borges

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Orientador)

Dedico este trabalho:

A DEUS por sempre iluminar meu caminho e me conduzir por caminhos de paz e luz.

A minha querida mãe por todo carinho, respeito e confiança que sempre teve por mim. Essa conquista é em sinal do meu amor e de minha saudade. MÃE nunca morre, MÃE vira anjo!

Ao meu irmão Vinícius, sempre amigo, companheiro, incentivador e patrocinador de todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pelas condições oferecidas para o desenvolvimento do trabalho, e à CAPES pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou meus estudos e pesquisa.

Ao Professor Ricardo Junqueira Del Carlo pela valiosa e competente orientação, paciência, disponibilidade, ensinamentos e amizade. Sua competência, dedicação e serenidade tornaram-se referências para mim.

Aos Professores Marlene Isabel Vargas Vilorio e Luiz Gonzaga Pompermayer por todos os conselhos que enriqueceram execução e a redação deste trabalho.

Aos professores José Antônio Viana, Andréa Pacheco Batista Borges, Lissandro Gonçalves Conceição, Paulo Renato dos Santos Costa, Maria Verônica de Souza, Eduardo Paulino da Costa e Jackson Victor de Araújo pelas aulas, ensinamentos e qualidade do curso oferecido.

Ao professor Marcelo Vilela e a todos os membros da banca examinadora pelas sugestões, críticas e idéias que possibilitaram a melhoria da dissertação.

A Lisandra Cristina Perez Pinheiro (Lilica) pelo companheirismo incondicional e por todo apoio emocional e técnico que possibilitaram a realização deste projeto. Você foi mais do que normal, feliz e idiota, você foi AMIGA! Obrigada!

A Táta, Kika, Túlio e Júnia pelas alegrias, confusões e por fazer de minha casa um lugar muito mais feliz!

A Paloma Arreguy, Paula Balbinot, Luisa Souza e Olívia Cavalcante por estarem sempre dispostas a ajudar e pelo auxílio nas cirurgias.

Aos colegas de pós-graduação Lukiya Birungi, Tatiana Borges, Jair Jr., Evandro Favarato, Manuela Sena, Fábio Pires, Paulo Ricardo, Rosyane Cruzeiro, Manuela Costa, Daniel Pontes, Anna Paula Ferreira, André Lang, Carlos Henryque e tantos outros cuja memória trai-me em nomeá-los.

A Napoleão Argôlo pela amizade e pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos todos os especializandos 2004 (equipe meia-boca) e 2005 (H-vetinho) pelas amizades que se formaram e pela oportunidade de aprender com vocês.

Aos funcionários Tatiana Duarte, Maninha, Alex, Etelvina, Adão, Claudiomiro, Paulo, Lucinda, Rosinéia e Geraldinho por serem sempre prestativos.

A Ana Paula Daibert, Cristiane Vital, Bruno Santos, Célber Limonge, Thiago Damião, Camilla Neto e Rafael Guedes pelo carinho e amizade.

A Cristina Boock e Moema Rodrigues por todas as risadas, mágicas, estórias, almoços, jantares, lanches e pela ajuda na realização dos “abstract”.

A meu pai, tios, tias e primos pelo incentivo e carinho.

Aos animais que de forma muito especial demonstram toda sua gratidão a nós. São eles razão dos nossos estudos e motivação para o nosso trabalho.

BIOGRAFIA

BETÂNIA SOUZA MONTEIRO, filha de Antônio de Souza Monteiro e Maria do Rosário de Souza Monteiro (*in memoriam*), nasceu em 03 de maio de 1979, em Ipatinga – MG.

Em março de 2003, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. Em março de 2004 adquiriu o título de Especialista em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, nesta mesma instituição, onde em seguida iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, concentrando seus estudos na área de cirurgia de pequenos animais.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1- Capítulo I. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) associadas a osso esponjoso autógeno na reparação de falhas criadas no crânio de coelhos. I - Avaliações clínico-cirúrgica, anátomopatológica e radiográfica.	1
Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
Material e Métodos	6
Resultados e Discussão	10
Conclusões	18
Referências Bibliográficas	19
2- Capítulo II. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) associadas a osso esponjoso autógeno na reparação de falhas criadas no crânio de coelhos. II - Avaliação microscópica.	21
Resumo	21
Abstract	22
Introdução	23
Material e Métodos	26
Resultados e Discussão	29
Conclusões	33
Referências Bibliográficas	37

LISTA DE FIGURAS

1- Capítulo I		Página
Figura 1	Procedimentos cirúrgicos realizados no osso parietal.	9
Figura 2	Detalhes do osso fronto-parietal após o acesso cirúrgico e a realização das falhas ósseas.	9
Figura 3	Aspecto macroscópico do preenchimento das falhas, na porção fronto-parietal.	13
Figura 4	Aspecto radiográfico da porção fronto-parietal do crânio do animal D /grupo 3 exibindo o preenchimento ósseo das falhas.	14
2- Capítulo II		Página
Figura 1	Aspecto microscópico do preenchimento ósseo apresentado pelos grupos 1 e 2.	34
Figura 2	Aspecto microscópico do preenchimento ósseo apresentado pelo grupo 3.	35
Figura 3	Aspecto microscópico do preenchimento ósseo apresentado pelos grupos 4 e 5.	36

LISTA DE TABELAS

1- Capítulo I		Página
Tabela 1	Época de sacrifício dos animais por grupos e em dias.	8
Tabela 2	Classificação, em escores, do grau de preenchimento das falhas ósseas	8
Tabela 3	Graduação, em escores, para o preenchimento ósseo macroscopicamente observado, apresentado por cada falha óssea, em todos os períodos de observação.	12
Tabela 4	Análise de variância não-paramétrica, pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de significância, para o grupo 1.	15
Tabela 5	Análise de variância não-paramétrica, pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de significância, para o grupo 2.	15
Tabela 6	Análise de variância não-paramétrica, pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de significância, para o grupo 3.	16
Tabela 7	Análise de variância não-paramétrica, pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de significância, para o grupo 4.	16
Tabela 8	Análise de variância não-paramétrica, pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de significância, para o grupo 5.	17
2- Capítulo II		Página
Tabela 1	Época de sacrifício dos animais por grupos e em dias.	27

RESUMO

MONTEIRO, Betânia Souza, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2005. **“O efeito das Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) associadas a osso esponjoso autógeno na reparação de falhas experimentais na calota craniana de coelho (*Oryctolagus cuniculus*)”**. Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Viloria e Luiz Gonzaga Pompermayer.

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são promotores de crescimento capazes de induzir a formação de osso e cartilagem, promovendo a quimiotaxia e diferenciação de células mesenquimais para o local onde foram implantadas, mas para uma efetiva osteocondução necessitam de uma substância carreadora. Quando implantadas em tecidos animais, as BMPs se ligam a receptores específicos existentes na superfície das células osteoinduzidas, ativam as proteínas citoplasmáticas SMAD (mothers against decapentaplegic proteins) e, no núcleo da célula receptora, passam a regular a transcrição de genes relacionados com calcificação e formação óssea. No presente estudo, foram avaliados os aspectos clínico-cirúrgicos, macroscópicos, radiográficos e microscópicos da reparação óssea, após implantação de BMPs em diferentes concentrações, carreadas por enxerto ósseo esponjoso, em falhas criadas no crânio de 20 coelhas adultas-jovens, separadas aleatoriamente em cinco grupos experimentais, que corresponderam a cinco períodos de observação (7, 15, 21, 35 e 60 dias). Após a exposição dos ossos do crânio, foram realizadas seis falhas ósseas na região fronto-parietal de cada animal. A falha I não foi preenchida, a II foi completamente preenchida com aproximadamente 3,0 mg de autoenxerto ósseo esponjoso e as falhas III, IV, V e VI foram preenchida com o autoenxerto associado a 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg de BMPs, respectivamente. Não foram observadas complicações clínicas após a cirurgia. Nas avaliações macroscópicas, *post-mortem*, verificou-se que independentemente do período de tratamento das falhas, o preenchimento ósseo iniciava-se a partir das bordas para o centro e do fundo para a superfície das falhas. O preenchimento ósseo das falhas I foi o menor encontrado quando comparado com as demais falhas, em todos os períodos de observação. Constatou-se também que até os valores de 2,0 mg, quanto maior a concentração de BMPs utilizada, maior foi a cobertura óssea. A avaliação radiográfica não permitiu a classificação do grau

de preenchimento ósseo e por meio de análises estatísticas, foi comprovado que há diferenças significativas entre os tratamentos. Microscopicamente verificou-se nas primeiras avaliações, aos sete dias, que o preenchimento ósseo iniciava-se a partir das bordas e do fundo da lesão, com mobilização e diferenciação de células provenientes do periósteo e das meninges, respectivamente e, nas avaliações subseqüentes, a atividade osteoblástica provinha também de “ilhas de ossificação”, semelhantes a centros de ossificação, localizadas no centro da falha. A formação trabecular aumentou proporcionalmente com a concentração utilizada de BMPs e a aposição e organização óssea aumentaram proporcionalmente com o tempo de observação. Em quase todas as falhas foi verificada a presença de tecido cartilaginoso. A melhor relação de quantidade de autoenxerto ósseo esponjoso e BMPs foi de 3,0 mg e 2,0 mg, respectivamente e a associação desta proteína com esse enxerto contribuiu para a formação de novo tecido ósseo, promovendo maior mobilização, diferenciação e organização celular e, abreviou o tempo de formação óssea, sugerindo processo de ossificação endocondral.

Os trabalhos apresentados como parte integrante desta tese estão seguindo as normas de publicação do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, indexada ao ISI, AGRIS, BIOSIS, CAB, CAS, MEDLARS, Referatvnyi Zhurnal, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia e LILACS. ISSN 01020935.

ABSTRACT

MONTEIRO, Betânia Souza, M.S., Universidade Federal de Viçosa. August 2005. " **The effect of the Bone morphogenetic protein (BMPs) associated with cancelous autogenous bone graft in the reparation of calvarial experimental rabbits defects. (*Oryctolagus cuniculus*)**". Adviser: Ricardo Junqueira Del Carlo. Committee members: Marlene Isabel Vargas Vilorio and Luiz Gonzaga Pompermayer.

The bone morphogenetic proteins (BMPs) are growth promoters capable of inducing the formation of bone and cartilage, promoting quimiotaxy and differentiation of mesenchymal cells in the place where they were implanted, but for an effective osteoconduction they need a carrier substance. When implanted in animal tissues, the BMPs link to specific receptors located in the surface of the osteoinduced cells, they activate the SMAD cytoplasmatic proteins (mothers against decapentaplegic proteins) and, in the nucleus of the receiver cell, they begin to regulate the transcription of genes related with calcification and bone formation. In the present study, aspects of clinical-surgical, macroscopic and radiosopic of the bone repair were evaluated after the implantation of the BMPs in different concentrations, carried by autogenous bone graft, in defects created on skulls of 20 adult-young female rabbits, randomizedly separated on five experimental groups that correspond to five periods of observations (7, 15, 21, 35 and 60 days). After the exposure of bones skull, six bone defects were performed on the fronto-parietal region of each animal. The defect I wasn't filled, the II was completed filled with approximately 3,0 mg of autogenous bone graft and the defects III, IV, V and VI were filled with autogenous bone graft associated with 0,5; 1,0; 2,0 and 5,0 mg of BMPs respectively. There wasn't clinical complications after the surgery. In the macroscopic evaluations, *post-mortem*, it was observed that independently of the treatment period of the defects, the bony filling began starting from the borders to the center and from the bottom to the surface of the flaws. The bony filling of defect I was the smallest found when compared with the others defects, in all the observation periods. It was also verified that until 2,0 mg the bigger the concentration of BMPs used, better was bone cover. The radiographic assessment did not permit the classification of the grade of bone filling and through the statistic analyses, it was comproved that there are significant differences between the treatments. It was verified

microscopically in the first evaluations, at the seventh day, that the bone growth started from the borders and from the bottom of the lesion, with mobilization and differentiation of cells deriving from the periosteum and of the meninges, respectively, and in the subsequent evaluations, the osteoblastic activity also derived from "ossification islands" to ossification centers, located in the center of the flaw. The trabecular formation increased proportionally with the concentration of BMPs used, and the apposition and bone organization increased proportionally with the time of observation. The presence of cartilaginous tissue was verified in almost all the flaws. The best relation of quantities of autogenous bone graft and BMPS were 3,0 mg and 2,0 mg, respectively, and the association of this protein with this graft contributed to the formation of new bone tissue, promoting larger mobilization, differentiation and cellular organization. It also abbreviated the time of bone formation, suggesting an endochondral ossification process.

**CAPÍTULO I - PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs)
ASSOCIADAS A OSSO ESPONJOSO AUTÓGENO NA REPARAÇÃO DE
FALHAS EXPERIMENTAIS NA CALOTA CRANIANA DE COELHO
(*Oryctolagus cuniculus*). I - AVALIAÇÕES CLÍNICO-CIRÚRGICA,
ANATOMOPATOLÓGICA E RADIOGRÁFICA.**

RESUMO

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são promotores de crescimento capazes de induzir a formação de osso e cartilagem, promovendo a quimiotaxia e diferenciação de células mesenquimais para o local onde foram implantadas, mas para uma efetiva osteocondução necessitam de uma substância carreadora. No presente estudo, foram avaliados os aspectos clínico-cirúrgicos, anátomopatológicos e radiográficos da reparação óssea, após implantação de BMPs em diferentes concentrações, carreada por enxerto ósseo esponjoso, em falhas criadas no crânio de 20 coelhas adultas-jovens, separadas aleatoriamente em cinco grupos experimentais, que corresponderam a cinco períodos de observação. Após a exposição dos ossos do crânio, foram realizadas seis falhas na região fronto-parietal de cada animal. A falha I não foi preenchida, a II foi completamente preenchida com aproximadamente 3,0 mg de autoenxerto ósseo esponjoso e as falhas III, IV, V e VI foram preenchidas com o autoenxerto associado a 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg de BMPs, respectivamente. Não foram observadas complicações clínicas após a cirurgia. Nas avaliações anátomopatológicas, *post-mortem*, verificou-se que independentemente do período de tratamento das falhas, o preenchimento ósseo iniciava-se a partir das bordas para o centro e do fundo para a superfície das falhas. A falha I manifestou o menor preenchimento ósseo quando comparado com as demais falhas, em todos os períodos de observação. Concluiu-se que a maior quantidade de BMP não determinou maior preenchimento ósseo, uma vez que a quantidade de enxerto utilizado como carreador manteve-se inalterada, não fornecendo arcabouço e osteogenicidade proporcionais a quantidade de BMPs, limitando a atividade desta proteína. Observou-se melhores resultados quando foi associado 2 mg de BMPs a 3 mg de enxerto, evidenciando maior preenchimento ósseo e que a adição de BMPs, mesmo em menor quantidade, influenciou de forma positiva a precocidade de formação óssea.

Palavras-chave: BMPs, enxerto ósseo, reparação óssea.

ABSTRACT

The bone morphogenetic proteins (BMPs) are growth promoters capable to induce the formation of bone and cartilage, inducing quimiotaxy and differentiation of mesenchymal cells to the place where they implanted, but for an effective osteoconduction they need a substance that carries. In the present study, aspects of clinical-surgical, macroscopic and radioscopic of the bone repair were evaluated after the implantation of the BMPs in different concentrations, carries by autogenous bone graft, in defects created on skulls of 20 adult-young female rabbits, randomizedly separated on five experimental groups that correspond to five periods of observations. After the exposure of bones skull, were performed six bone defects on the fronto-parietal region of each animal. The defect I wasn't filled, the II was completed filled with 3,0 mg of autogenous bone graft and the defects III, IV, V and VI were filled with autogenous bone graft associated with 0,5; 1,0; 2,0 and 5,0 mg of BMPs respectively. There weren't observed clinical complications after the surgery. In the macroscopic evaluations, *post-mortem*, it was observed that independently of the treatment period of the defects, the bony filling began starting from the borders for the center and of the botton for the surface of the flaws. The bony filling of the defect I was the smallest found when compared with the others defects, in all the observation periods. It was also verified that until 2,0 mg the bigger the concentration of BMPs used, better was bone cover. In conclusion, the use the BMPs determinates early formation of bone and that the better relation of the quantities of autogenous bone graft and BMPs were 3,0 mg and 2,0 mg, respectively.

Keywords: BMPs, bone graft, bone repair.

INTRODUÇÃO

Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) vêm sendo empregadas em procedimentos ortopédicos reconstrutivos associadas a alo e autoenxertos, como os de medula óssea e osso esponjoso, objetivando precocidade de formação óssea, por meio de indução da osteogênese (Piermattei & Flo, 1999).

Estas proteínas não-colágenas, presentes no osso, são responsáveis pelo recrutamento celular e indução da diferenciação das células mesenquimais não-diferenciadas em condroblastos e osteoblastos, produzindo novo tecido ósseo, *in vivo* e *in vitro* (Sommerman et al, 1983; Wozney, 2002). As BMPs também podem exacerbar a ação de osteoblasto e osteoclasto em tecidos ósseos e dos condroblastos em tecidos cartilaginosos (Tsumaki & Yoshikawa, 2005).

Urist (1965) observou que a matriz óssea desmineralizada (MOD) implantada em tecidos subcutâneo e muscular de roedores induziu a formação ectópica de cartilagem e osso. Na ocasião, embora não fosse possível determinar se o componente ativo no extrato ósseo era composto por uma ou mais moléculas, ele foi identificado como de origem protéica e denominada proteína morfogenética óssea. Del Carlo et al (2003) também constataram que a MOD apresenta fatores indutores inerentes que atuam sobre as células dos tecidos adjacentes, promovendo quimiotaxia, mitose e diferenciação celular.

A partir da década de 80, cada proteína foi testada isoladamente para análise de sua efetividade como agente osteoindutor (Alper, 1994). Determinou-se que as BMPs eram membros da superfamília dos fatores de crescimento TGF- (fatores de crescimento transformador-beta), estruturalmente caracterizadas por cadeias duplas de aminoácidos, interconectadas por sete pontes dissulfídicas, e que sua capacidade osteoindutora provinha da dimerização destas cadeias (Wozney et al, 1988). A única não pertencente a esta superfamília é a BMP-1, que não apresenta potencial osteoindutor (Arosarena & Collins, 2005).

Segundo Schmidmaier et al (2002) e Arosarena & Collins (2005), por meio de técnicas de biologia molecular, foram identificadas mais de 20 tipos diferentes (isoformas) de BMPs, permitindo também, a partir de um mecanismo de produção em

cultura de células de mamífero, a clonagem e recombinação dessas proteínas, sendo chamadas BMPs recombinantes (rBMPs).

Sato e Urist (1985) não evidenciaram relação de toxicidade após aplicação de BMPs tanto em tecido muscular quanto em tecido ósseo. Para tal propósito, testaram doses entre 1 a 20 mg em camundongos, 5 a 50 mg em ratos, 10 a 100 mg em coelhos e 50 a 200 mg em cães. Chelline et al (2002) avaliaram doses de BMPs entre 10 a 100 g/kg e não observaram efeito sistêmico após a administração de BMP-7 em ratos.

Tanto nos modelos experimentais utilizados por Sato & Urist (1985) e Chelline et al (2002), quanto nos anteriores citados por estes autores, quando foram utilizadas diferentes concentrações de BMPs, foi observada relação dose-dependente diretamente proporcional entre a quantidade de formação óssea e quantidade de proteína aplicada.

Yasko et al (1992) reportaram que defeitos ósseos, no fêmur de ratos, tratados com 1,4 g de BMP-2 não apresentaram sinais de união. Contudo, quando tratados com doses de 11,0 g foi verificada, num mesmo período de observação, a completa união óssea entre os segmentos.

Cook et al (1994), utilizaram três doses de BMP-7 (625, 1200 e 2500 g), carregadas em esponja de colágeno, na tentativa de promover a cicatrização precoce de falhas ósseas em ulna de cães. Verificaram, radiograficamente, que após duas semanas de tratamento o preenchimento ósseo apresentado pelos animais que receberam 2500 g da proteína era superior ao exibido pelos animais que receberam a quantidade de 1200 g, e que este crescimento não estava claramente evidenciado nos que receberam a menor dose.

As proteínas morfogenéticas são rapidamente difusíveis e solúveis em água e, para sua efetividade, precisam ser implantadas associadas a um carreador apropriado (Urist et al, 1983; Braz et al, 2003) que deverá atuar como espaçador tridimensional, fornecendo a estrutura necessária para a formação do novo tecido; manter o nível de concentração das BMPs, e contê-las no local desejado (Rutherford et al, 1993).

Vários biomateriais têm sido utilizados como carreadores de BMPs, incluindo colágeno, gel protéico de matriz extracelular, hidroxiapatita, polímero de ácido hialurônico, ácido poliglicólico, ácido polilático e enxertos esponjoso e córtico-esponjoso (Rutherford et al, 1993 e Arosarena & Collins, 2005).

Este trabalho objetivou identificar a melhor relação entre a quantidade de BMPs e autoenxerto esponjoso na reparação das falhas experimentais na calota craniana de coelho, por meio de exames clínico-cirúrgicos, anátomopatológicos e radiográficos.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Departamento de Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa, em fevereiro de 2005.

O experimento foi realizado em 20 coelhas da raça Nova Zelândia, com peso médio de 3,5 Kg e idade entre seis e sete meses, mantidas em gaiolas individuais e alimentadas com ração comercial, feno e água.

À época dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em jejum sólido de oito horas, pré-anestesiados com acepromazina¹ (0,1 mg/kg/IV) e tiveram a porção dorsal do crânio e as asas do fêmo direita e esquerda tricotomizadas. Em seguida, foi realizada anestesia geral dissociativa com de tiletamina/zolazepan² (30 mg/kg/IV) associados numa mesma seringa com 1,0 mg/kg de levomepromazina³ 0,5 %. Foram também submetidos a anestesia epidural com lidocaína⁴ 2% (0,9 mL/animal) objetivando maior conforto durante a coleta do autoenxerto ósseo na crista ilíaca.

A antibioticoterapia foi realizada com cinco aplicações de cefalexina⁵ (5mg/kg/IM), uma após a indução anestésica e a cada 24 horas após o procedimento cirúrgico. A analgesia foi realizada com morfina⁶ (0,4 mg/kg/VO), no período pré-operatório e a cada 8 horas pós-cirurgia, durante três dias e, como medicação antiinflamatória foi utilizado cetoprofeno⁷ (1,1 mg/kg/SC), no pré-operatório.

A BMP⁸ utilizada apresentava-se como um produto liofilizado, correspondendo a um “pool” de proteínas morfogenéticas ósseas, englobando de BMP-2 a BMP-14, e previamente ao procedimento cirúrgico, foi submetida à pesagem em balança de precisão, nas quantidades pré-estabelecidas, para que pudesse ser misturada ao enxerto esponjoso autógeno, no momento do preenchimento das falhas ósseas.

¹ Acepram 1% - Univet – São Paulo – Brasil.

² Zoletil® 50, Virbac – São Paulo – Brasil.

³ Neozine (5mg/ml) - Aventis Pharma – São Paulo – Brasil.

⁴ Lidocaína 2% - Anestésico Bravet – Rio de Janeiro – Brasil.

⁵ Cefalexina 250 mg/5 ml - Aventis Pharma – São Paulo - Brasil.

⁶ Dimorf® Solução Oral - Cristália LTDA – Itapira – Brasil.

⁷ Profenid IV (100mg/2ml) - Aventis Pharma – São Paulo – Brasil.

⁸ Gen-Pro® - Proteínas Morfogenéticas do Osso (BMPSs) - BAUMER S.A - Mogi Mirim - Brasil.

Os animais foram posicionados em decúbito esternal, com a cabeça sobre uma almofada. Após preparo e anti-sepsia do campo cirúrgico foi realizada incisão de pele sobre a crista sagital externa do crânio, estendendo-se da protuberância occipital até próximo aos olhos, de aproximadamente três centímetros de comprimento. O tecido subcutâneo e os músculos frontal, interescutular, occipital e temporal foram incisados e rebatidos lateralmente, assim como o periósteo, permitindo a exposição do osso parietal.

Após a exposição dos ossos do crânio (Fig. 1A), com auxílio de uma broca trefina⁹ cirúrgica de 4,3 mm de diâmetro conectada a uma perfuratriz elétrica¹⁰, na velocidade de 5000 rpm e irrigação contínua com solução fisiológica (Fig. 1B), foram realizadas seis falhas ósseas na região fronto-parietal de cada animal, estando três no antímero direito e três no esquerdo, transpassando toda espessura do díploe, com exposição das meninges ao fundo da falha, sendo esta mantida íntegra.

Estas falhas encontravam-se afastadas por aproximadamente oito milímetros e, cada falha, foi numerada de um a seis no sentido rostro-caudal, da direita para a esquerda (Fig. 2). A falha I não foi preenchida e a falha II foi completamente preenchida com autoenxerto ósseo esponjoso, na quantidade de 3,0 mg, ambas servindo como controle para avaliação do preenchimento ósseo. As falhas III, IV, V e VI foram preenchidas com o autoenxerto associado com 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg de BMPs, respectivamente.

O osso esponjoso autógeno foi coletado da crista ílfaca direita, após a realização das seis falhas. A cortical da crista foi perfurada com uma broca de cinco milímetros conectada a uma parafusadeira manual de baixa rotação¹¹, até a exposição do osso trabecular que foi coletado com uma cureta oval (nº 1) e colocado sobre uma gaze umedecida com solução fisiológica até o momento da enxertia.

Ao término dos procedimentos, as fâscias musculares e a pele foram suturadas, em ambos os sítios cirúrgicos.

Após a cirurgia, os animais foram separados aleatoriamente em cinco grupos experimentais denominados **A**, **B**, **C** e **D**, constituídos de quatro animais e cada um desses grupos correspondeu a uma época de sacrifício (Tab. 1), que foi considerada o período de observação de cada grupo.

⁹ Broca trefina cirúrgica – Neodent Implante Osteointegravel – Curitiba – Brasil.

¹⁰ Microrretífica Dremel – BOSCH – Rio de Janeiro – Brasil.

¹¹ Parafusadeira Bosch 7,2 V – Rio de Janeiro – Brasil.

Tabela 1 - Época do sacrifício dos animais por grupos e em dias.

GRUPO	ÉPOCA DE SACRIFÍCIO
Grupo um (G1)	Sete dias
Grupo dois (G2)	15 dias
Grupo três (G3)	21 dias
Grupo quatro (G4)	35 dias
Grupo cinco (G5)	60 dias

Na data prevista, os animais foram sacrificados com sobredosagem anestésica, utilizando pentobarbital sódico. A pele e a musculatura do crânio foram cuidadosamente removidas para permitir a visualização do local operado. A inspeção macroscópica das falhas foi realizada a olho nu e sob lupa¹², em aumento de até 50 vezes. Foram observadas as características dos tecidos presentes na falha e a intensidade do preenchimento ósseo em profundidade e largura. Esta intensidade foi graduada com o auxílio de um paquímetro e classificada de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 – Classificação macroscópica do grau de preenchimento das falhas ósseas, em escores.

PREENCHIMENTO DA FALHA	ESCORE
Falhas não preenchidas	0
Falhas parcialmente preenchidas, com preenchimento ósseo inferior a 25% da área.	1
Falhas parcialmente preenchidas, com preenchimento ósseo entre 25-50% da área.	2
Falhas parcialmente preenchidas, com preenchimento ósseo entre 50-75% da área.	3
Falhas parcialmente preenchidas, com preenchimento ósseo superior a 75% da área.	4
Falhas preenchidas em quase toda extensão, mas não em 100% da área.	4*
Falhas totalmente preenchidas (100%).	5

¹² Microscópio Estereoscópico – Stemi SV6 – Zeiss – São Paulo – Brasil.

A porção fronto-parietal da calota craniana de cada animal foi submetida a radiografias, na projeção dorso-ventral, objetivando a avaliação do grau de preenchimento das falhas ósseas, a partir das áreas radiopacas formadas no interior da falha.

Dentro de cada grupo, foram estabelecidas as médias do grau de preenchimento ósseo dos quatro animais, para cada tipo de tratamento realizado nas falhas. Esses valores médios encontrados foram comparados e analisados entre as demais falhas dentro do mesmo grupo experimental pelo modelo não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância, pelo programa BioEstat 2.0 (AYRES et al, 2000).

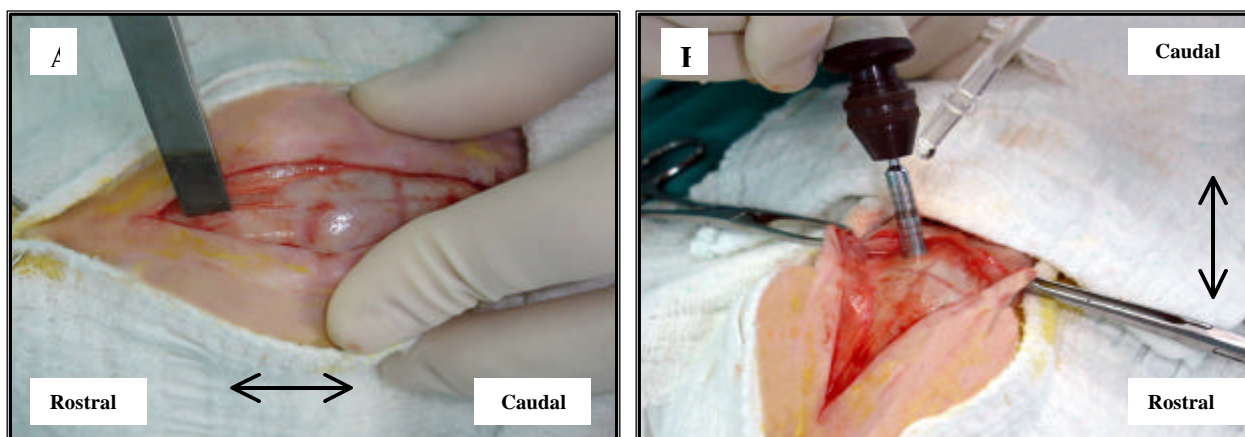


Figura 1- Procedimentos cirúrgicos realizados no osso fronto-parietal dos coelhos. **A)** Utilização da rugina afastando o periósteo. **B)** Confecção da falha utilizando broca trefina conectada à perfuratriz elétrica, sob irrigação com solução fisiológica.

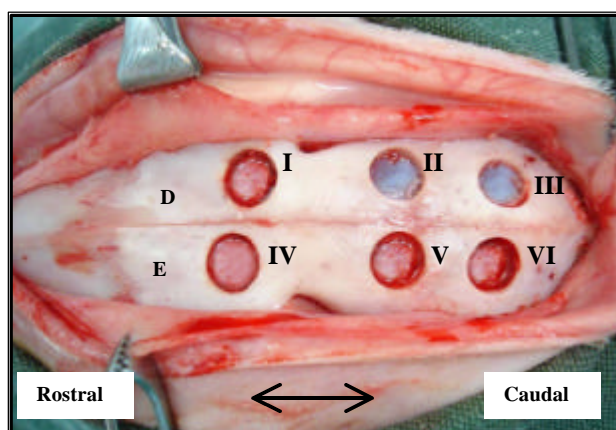


Figura 2 - Detalhes do osso fronto-parietal após acesso cirúrgico e realização das falhas ósseas. Numeração de um a seis no sentido rostro-caudal e da direita para a esquerda.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cirurgias na porção fronto-parietal do crânio, além de maximizar a utilização do animal e minimizar o número de coelhos, determinou um modelo experimental com ausência de carga e de risco de fraturas. Outro fator a considerar, é a baixa capacidade regenerativa dos ossos do crânio, permitindo avaliar alternativas reconstrutivas com agentes que estimulam a reparação, uma vez que implantes sintéticos podem provocar desconforto ao paciente e o autoenxerto ósseo, quando usado isoladamente, corre o risco de ser reabsorvido antes que a reparação se processe por completo, segundo Del Carlo et al (1994) e Braz et al (2003).

Apesar da exposição das meninges na confecção das falhas, durante o período pós-operatório não foram observados sinais de infecção ou complicações neurológicas e todas as coelhas permaneceram alertas, conscientes e deambulando normalmente.

Na avaliação macroscópica, *post-mortem*, em todas as falhas dos 20 animais, havia tecido de aspecto fibroso na região de sutura das fâscias musculares. A presença de coágulo, no interior e sobre a falha controle, foi verificada em todos os animais do G1 (sete dias) e em dois animais do G2 (15 dias), sendo substituído gradativamente nas avaliações subseqüentes, caracterizando evolução do processo de reparação, em que o coágulo inicialmente tampona a lesão e é substituído por fibroblastos e células osteogênicas.

Ainda macroscopicamente, não foi observado crescimento ósseo na face ventral das meninges, em contato com o tecido nervoso. Independentemente do período de observação e do tratamento, o preenchimento ósseo iniciava-se a partir das bordas para o centro (centrípeto) e do fundo para a superfície das falhas, apresentando aspecto menos compacto que o tecido ósseo vizinho, típico de tecido osteóide, semelhante ao descrito nas pesquisas de Sato e Urist (1985), provavelmente pela precocidade da observação e imaturidade do tecido ósseo formado.

Existe uma grande amplitude nas dosagens de BMPs para as quais os autores relataram resultados satisfatórios em suas pesquisas. As doses utilizadas neste experimento estiveram dentro desses limites e também daqueles estabelecidos como seguros, para os leporídeos, em relação à toxicidade, como descrito por Sato e Urist

(1985) e Chelline et al (2002). Esta variação de doses se deve ao grande número de modelos experimentais, as diversas espécies animais que vem sendo utilizadas, bem como aos diferentes tipos de BMPs existentes.

No grupo 1, as falhas I, de todos os animais, demonstraram preenchimento ósseo discreto apenas nas bordas da lesão e com presença de coágulo sangüíneo, sendo classificado em escore 1. As falhas II apresentaram preenchimento ósseo parcial entre 25-50% da área total (escore 2). Nas demais falhas, onde foram utilizadas BMPs associada a enxerto ósseo esponjoso, o preenchimento ósseo encontrado foi parcial e superior a 50% da área, estando mais evidenciado nas falhas de maior concentração de BMPs. No animal **A**, quase toda a área da falha V estava preenchida por osso (Fig. 3A).

No grupo 2, os animais **B** e **C** apresentaram coágulo sobre a falha óssea I. Em todos os animais, o preenchimento ósseo na região da falha foi pequeno (porém maior que o apresentado pelo grupo de sete dias) correspondendo a aproximadamente 20% da área, irregular, proveniente da borda da ferida e com ausência de preenchimento proveniente do fundo. As falhas II apresentavam preenchimento parcial entre 50-75% da área (escore 3) e as demais falhas apresentaram preenchimento ósseo superior a 75% da área (escore 4), sendo que a falha V demonstrou melhor preenchimento ósseo em todos os animais.

No grupo 3, as falhas I dos animais **A** e **B** exibiam preenchimento ósseo entre 25-50%, com o fundo totalmente preenchido, enquanto nos animais **C** e **D**, o preenchimento foi inferior a 25% com a presença de orifício de aproximadamente 2 mm, no fundo da falha, com ausência de osso. Ainda no animal **C**, a falha VI apresentou preenchimento ósseo entre 25-50%, e as falhas que demonstraram melhor preenchimento foram a III e a V.

No grupo 4, o preenchimento ósseo foi maior que nos grupos anteriores, exceto no animal **A**, no qual a falha I estava preenchida com uma fina camada óssea, inferior a 25% da área, apenas sobre o fundo. No geral, o maior preenchimento foi demonstrado na falha V, estando preenchida quase na totalidade da área nos animais **B** e **C**, com exceção do animal **A**, no qual o maior preenchimento foi constatado na falha II (Fig.3B).

No grupo 5, animais sacrificados aos 60 dias, o preenchimento foi superior a 75%, com exceção das falhas I dos animais **B** e **C**, que apresentavam preenchimento entre 25-

50%. O preenchimento ósseo observado nas falhas I apresentava aspecto de osso com trabéculas grandes, sobretudo nas bordas da lesão. Já as demais falhas apresentavam preenchimento com aspecto compacto.

O preenchimento ósseo graduado em escores apresentado por cada falha, em cada animal do respectivo grupo, como descrito em todos os períodos de observação, está apresentado na tabela 3.

Tabela 3 - Classificação, em escores, para o grau de preenchimento ósseo macroscopicamente observado, apresentado por cada falha óssea, em todos os períodos de observação.

Grupo	Animal	Preenchimento ósseo das falhas ósseas experimentalmente criadas (escores)					
		Falha I	Falha II	Falha III	Falha IV	Falha V	Falha VI
1 (sete dias)	A	1	2	3	3	4*	3
	B	1	2	3	3	3	3
	C	1	2	3	3	3	3
	D	1	2	3	3	3	3
2 (15 dias)	A	1	3	4	4	4*	4
	B	1	3	4	4	4*	4
	C	1	3	4	4	4*	4
	D	1	3	4	4	4*	4
3 (21 dias)	A	2	3	3	4	4*	4
	B	2	3	3	3	4	4
	C	1	3	4*	2	4*	1
	D	1	3	4	4*	4	3
4 (35 dias)	A	1	4*	3	4	4	4
	B	2	3	4	4	4*	2
	C	2	3	3	4	4*	1
	D	2	3	4	4	4*	4
5 (60 dias)	A	3	3	4	4	4*	4
	B	2	4	4	4*	4*	3
	C	2	4	4	4	4*	4
	D	3	4	4	4	4	3

Assim como nesse experimento, Sato & Urist (1985) observaram que a porcentagem de preenchimento da falha óssea se deu em função da dose utilizada de BMPs e do tempo de observação. Outro achado semelhante foi a superioridade de preenchimento ósseo nas falhas que receberam BMPs em relação às falhas controle, independentemente da concentração utilizada, em todos os períodos de observação.

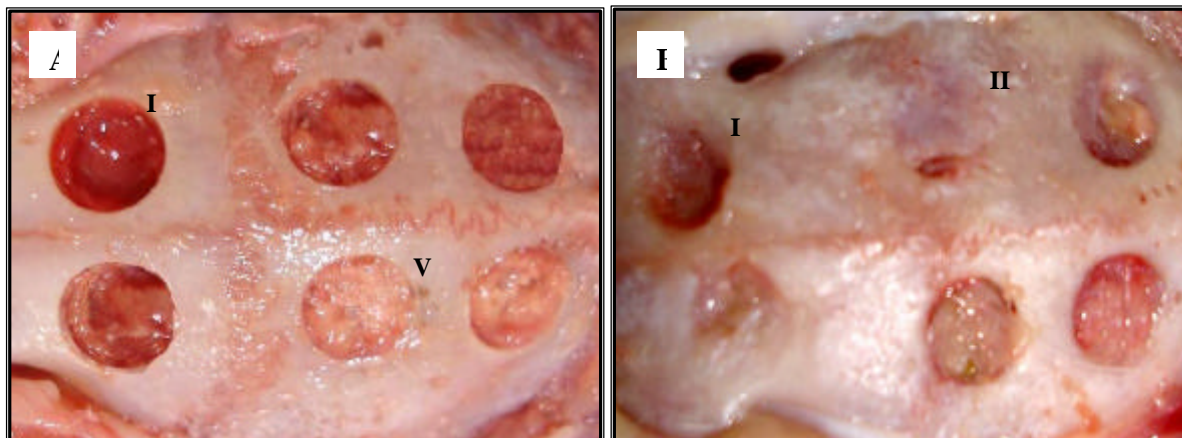


Figura 3 - Aspecto macroscópico do preenchimento das falhas. **A)** Animal A/grupo 1, aos sete dias pós-cirurgia. Preenchimento ósseo limitado às bordas, escore 1, e presença de coágulo na falha I. Preenchimento ósseo em quase toda extensão na falha V. **B)** Animal A/grupo 4, aos 35 dias pós-cirurgia. Preenchimento ósseo com escore 1 na falha I e preenchimento ósseo quase completo, escore 4*, na falha II.

A quantidade de osso novo nas falhas que continham as BMPs associadas ao autoenxerto esponjoso foi superior àquela encontrada nas falhas controle e nas que continham apenas o enxerto, o que evidencia a capacidade deste enxerto como carreador ideal para BMP, nas condições deste experimento, assim como já havia sido relatado em situações diferentes por Becker et al (1995), Piattelli et al (1998) e Allegrini et al (2004). Também é possível inferir que ele permitiu a atividade osteoindutora da proteína óssea morfogénica.

De acordo com Yasko et al (1992), Cook et al (1994) e Chelline et al (2002) a ação da BMP é dose-dependente. Da mesma forma, na presente pesquisa, foi observado que até os valores de 2 mg, quanto maior a quantidade das BMPs utilizadas, maior foi o preenchimento, já que as falhas V foram as que apresentaram maior cobertura óssea. Todavia, a maior quantidade utilizada não determinou o maior preenchimento ósseo, podendo-se inferir que a quantidade de enxerto utilizada como carreador não forneceu arcabouço e osteogenicidade proporcionais a quantidade de BMPs, limitando a atividade desta proteína. Logo, observou-se melhores resultados quando foi associado 2 mg de BMPs a 3 mg de enxerto.

As imagens radiográficas obtidas não foram adequadas para avaliar o grau de preenchimento com osso novo, pois a única projeção radiográfica realizada não permitiu noção de profundidade do preenchimento da falha, quando comparada com o exame macroscópico *post-mortem*. Ou seja, em algumas situações havia preenchimento radiográfico total da superfície da falha, sem cobrir de forma completa a espessura da calota craniana. Com isso, estando o fundo da falha totalmente preenchido, a imagem radiográfica fornecida era de 100% de preenchimento, indicando um resultado falso positivo, por ser superior ao encontrado macroscopicamente.

Em todos os animais, foram observadas diferenças de radiodensidade entre a porção íntegra do osso fronto-parietal e o local onde foi criada a lesão, com presença de áreas de radiopacidade também no centro, retratando preenchimento de osso novo. Independente da falha ou do período de observação, o osso novo sempre apresentou menor densidade que a porção íntegra do osso fronto-parietal.

No animal **C**, do grupo 3 (21 dias), a radiografia sugeriu um preenchimento ósseo entre 50-75% da área (escore 3) para a falha IV e um escore 2 para a falha VI, valores que não foram constatados pela avaliação macroscópica. Da mesma forma, no animal **D** do mesmo grupo, a imagem radiográfica sugere que o preenchimento ósseo da falha II foi superior a 75% da área, valor também não encontrado na avaliação macroscópica (Fig. 4).

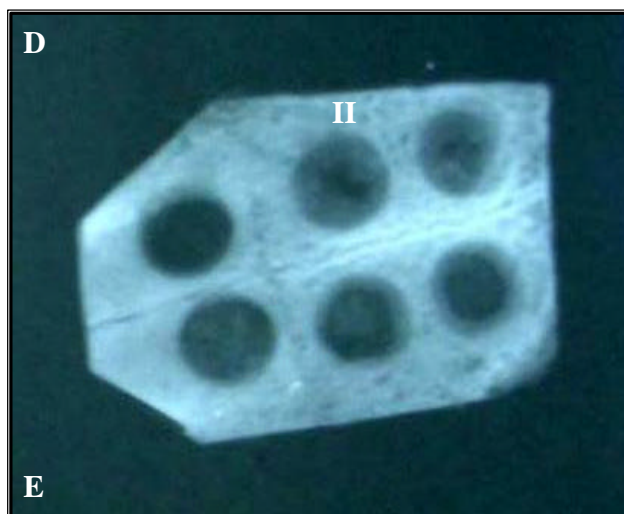


Figura 4 - Aspecto radiográfico da porção fronto-parietal do crânio do animal **D**/grupo 3 exibindo o preenchimento ósseo das falhas. Notar que a falha II exhibe preenchimento superior a 75% da área.

A análise de variância não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou que em todos os grupos experimentais houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos realizados. As falhas V e IV exibiram maiores valores médios, respectivamente, (posto médio) em todos os grupos experimentais (Tab. 4, 5, 6, 7 e 8), elucidando que estas falhas foram as que demonstraram melhor preenchimento ósseos e permitindo inferir que a reparação óssea aumentou na presença de BMPs carregadas por enxerto esponjoso, corroborando os resultados encontrados por Chang et al (2004).

Tabela 4 - Análise de variância não-paramétrica (Kruskal-Wallis), fornecida pelo programa BioEstat 2.0, para o grupo 1. ($p \leq 0,05$).

Resultados Grupo 1	
H =	21,7163
Graus de liberdade =	5,0000
(p) Kruskal-Wallis =	0,0006
R 1 =	10,0000
R 2 =	26,0000
R 3 =	64,0000
R 4 =	64,0000
R 5 =	72,0000
R 6 =	64,0000
R 1 (posto médio) =	2,5000
R 2 (posto médio) =	6,5000
R 3 (posto médio) =	16,0000
R 4 (posto médio) =	16,0000
R 5 (posto médio) =	18,0000
R 6 (posto médio) =	16,0000
p (1 e 2) =	0,4237
p (1 e 3) =	0,0069
p (1 e 4) =	0,0069
p (1 e 5) =	0,0019
p (1 e 6) =	0,0069
p (2 e 3) =	0,0574
p (2 e 4) =	0,0574
p (2 e 5) =	0,0214
p (2 e 6) =	0,0574
p (3 e 4) =	1,0000
p (3 e 5) =	0,6892
p (3 e 6) =	1,0000
p (4 e 5) =	0,6892
p (4 e 6) =	1,0000
p (5 e 6) =	0,6892

Tabela 5 - Análise de variância não-paramétrica (Kruskal-Wallis) fornecida pelo programa BioEstat 2.0, para o grupo 2. ($p \leq 0,05$).

Resultados Grupo 2	
H =	23,0000
Graus de liberdade =	5,0000
(p) Kruskal-Wallis =	0,0003
R 1 =	10,0000
R 2 =	26,0000
R 3 =	66,0000
R 4 =	66,0000
R 5 =	66,0000
R 6 =	66,0000
R 1 (posto médio) =	2,5000
R 2 (posto médio) =	6,5000
R 3 (posto médio) =	16,5000
R 4 (posto médio) =	16,5000
R 5 (posto médio) =	16,5000
R 6 (posto médio) =	16,5000
p (1 e 2) =	0,4237
p (1 e 3) =	0,0051
p (1 e 4) =	0,0051
p (1 e 5) =	0,0051
p (1 e 6) =	0,0051
p (2 e 3) =	0,0455
p (2 e 4) =	0,0455
p (2 e 5) =	0,0455
p (2 e 6) =	0,0455
p (3 e 4) =	1,0000
p (3 e 5) =	1,0000
p (3 e 6) =	1,0000
p (4 e 5) =	1,0000
p (4 e 6) =	1,0000
p (5 e 6) =	1,0000

Baseando-se apenas na avaliação matemática das variáveis $[p(x \text{ e } y)]$ foi verificado que o preenchimento ósseo exibido pelas falhas I e II não diferiu entre si em qualquer momento de avaliação. No geral, esse preenchimento exibido pelas falhas que continham BMPs se diferiram daquele exibido pelas falhas I e II (em destaque nas tabelas). Entretanto, quando foi efetuada a comparação do preenchimento ósseo entre as falhas que continham a proteína, de forma pareada, evidenciou-se não haver diferenças estatísticas para essa variável.

Tabela 6 - Análise de variância não-paramétrica (Kruskal-Wallis) fornecida pelo programa BioEstat 2.0, para o grupo 3. ($p \leq 0,05$).

Resultados Grupo 3	
H =	12,6979
Graus de liberdade =	5,0000
(p) Kruskal-Wallis =	0,0264
R 1 =	14,0000
R 2 =	40,0000
R 3 =	58,0000
R 4 =	53,0000
R 5 =	76,0000
R 6 =	59,0000
R 1 (posto médio) =	3,5000
R 2 (posto médio) =	10,0000
R 3 (posto médio) =	14,5000
R 4 (posto médio) =	13,2500
R 5 (posto médio) =	19,0000
R 6 (posto médio) =	14,7500
p (1 e 2) =	0,1936
p (1 e 3) =	0,0278
p (1 e 4) =	0,0512
p (1 e 5) =	0,0019
p (1 e 6) =	0,0244
p (2 e 3) =	0,3681
p (2 e 4) =	0,5157
p (2 e 5) =	0,0719
p (2 e 6) =	0,3421
p (3 e 4) =	0,8026
p (3 e 5) =	0,3681
p (3 e 6) =	0,9601
p (4 e 5) =	0,2501
p (4 e 6) =	0,7642
p (5 e 6) =	0,3953

Tabela 7 - Análise de variância não-paramétrica (Kruskal-Wallis) fornecida pelo programa BioEstat 2.0, para o grupo 4. ($p \leq 0,05$).

Resultados Grupo 4	
H =	16,5559
Graus de liberdade =	5,0000
(p) Kruskal-Wallis =	0,0054
R 1 =	10,0000
R 2 =	40,0000
R 3 =	50,0000
R 4 =	70,0000
R 5 =	70,0000
R 6 =	60,0000
R 1 (posto médio) =	2,5000
R 2 (posto médio) =	10,0000
R 3 (posto médio) =	12,5000
R 4 (posto médio) =	17,5000
R 5 (posto médio) =	17,5000
R 6 (posto médio) =	15,0000
p (1 e 2) =	0,1336
p (1 e 3) =	0,0455
p (1 e 4) =	0,0027
p (1 e 5) =	0,0027
p (1 e 6) =	0,0124
p (2 e 3) =	0,6171
p (2 e 4) =	0,1336
p (2 e 5) =	0,1336
p (2 e 6) =	0,3173
p (3 e 4) =	0,3173
p (3 e 5) =	0,3173
p (3 e 6) =	0,6171
p (4 e 5) =	1,0000
p (4 e 6) =	0,6171
p (5 e 6) =	0,6171

A análise estatística permite inferir a respeito da divergência entre os tratamentos, e uma vez constatadas diferenças significativas entre as falhas que continham BMPs daquelas que não continham, admite-se que na presença desse promotor de crescimento houve precocidade de formação óssea, principalmente nos grupos 1 ($p = 0,006$) e 2 ($p = 0,003$), assim como já relatado anteriormente por Urist (1983) e Sato & Urist (1985).

Tabela 8 - Análise de variância não-paramétrica (Kruskal-Wallis) fornecida pelo programa BioEstat 2.0, para o grupo 5. ($p \leq 0,05$).

Resultados Grupo 5	
H =	19,1368
Graus de liberdade =	5,0000
(p) Kruskal-Wallis =	0,0018
R 1 =	11,0000
R 2 =	49,0000
R 3 =	60,0000
R 4 =	60,0000
R 5 =	60,0000
R 6 =	60,0000
R 1 (posto médio) =	2,7500
R 2 (posto médio) =	12,2500
R 3 (posto médio) =	15,0000
R 4 (posto médio) =	15,0000
R 5 (posto médio) =	15,0000
R 6 (posto médio) =	15,0000
p (1 e 2) =	0,0574
p (1 e 3) =	0,0143
p (1 e 4) =	0,0143
p (1 e 5) =	0,0143
p (1 e 6) =	0,0143
p (2 e 3) =	0,5823
p (2 e 4) =	0,5823
p (2 e 5) =	0,5823
p (2 e 6) =	0,5823
p (3 e 4) =	1,0000
p (3 e 5) =	1,0000
p (3 e 6) =	1,0000
p (4 e 5) =	1,0000
p (4 e 6) =	1,0000
p (5 e 6) =	1,0000

CONCLUSÕES

Após a implantação de BMPs associadas a osso esponjoso autógeno, nas proporções de 0,5 mg: 3,0 mg; 1,0 mg: 3,0 mg; 2,0 mg:3,0 mg e 5,0 mg: 3,0 mg em falhas experimentais na calota craniana de coelho concluiu-se que a maior quantidade de BMP não determinou maior preenchimento ósseo, uma vez que não foi acompanhada de maior quantidade de enxerto utilizado como carreador não fornecendo arcabouço e osteogenicidade proporcionais a quantidade de BMPs, limitando a atividade desta proteína. Observou-se melhores resultados quando foi associado 2,0 mg de BMPs a 3,0 mg de enxerto, evidenciando maior preenchimento ósseo e que a adição de proteínas ósseas morfogênicas, mesmo em menor quantidade, influenciou de forma positiva a precocidade de formação óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEGRINI, S.Jr., YOSHIMOTO, M., SALLES, M.B., et al. Bone regeneration in rabbit sinus lifting associated with bovine BMPs. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.15, p.127-131, 2004.

ALPER, J. Boning up: newly isolated proteins heal bad breaks. *Science*, v.263, p.324-325, 1994.

AROSARENA, O.A., COLLINS, W.L. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.*, v.132, p.592-597, 2005.

AYRES, M., AYRES, M. Jr., AYRES, D.L., et al. BioEstat 2.0 - aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém/Brasília: Sociedade Civil Mamirauã/CNPq. 272p. 2000.

BECKER, W., SCHENK, R., HIGUCHI, K., et al. Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: a study in dogs. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, v.10, p.143-154, 1995.

BRAZ, F., RAHAL, S.C., ROCHA, N.S. et al. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. *Acta. Cir. Bras.*, v.18, p.19-24, 2003.

CHANG, S.C., CHUANG, H., CHEN, Y. et al. Cranial repair using BMP-2 gene engineered bone marrow stromal cells. *J. Surg. Res.*, v.119, p.85-91, 2004.

CHELINE, A.J., REDDI, A.H., MARTIN, R.B. Bone morphogenetic protein-7 selectively enhances mechanically induced bone formation. *Bone*, v.31, p.570-574, 2002.

COOK, S.D. BAFFES, G.C. WOLFE, M.W. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.301, p.302-312, 1994.

DEL CARLO, R.J., IAMAGUTI, P., BRANCO, M.D.L., et al. Cranioplastia por interposição de auto-enxerto costal. III. Aspectos da enxertia óssea. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 46, p. 244-252, 1994.

DEL CARLO, R.J., SILVA, A.M., VILORIA, M.I.V. et al, Potencial osteoindutor da matriz óssea homóloga desmineralizada de coelho. *Cienc. Rural*, v.33, p.533-538, 2003.

PIATTELLI, A., SCARANO, A., PIATTELLI, M. Microscopic and histochemical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in association with implant placement: a case report. *Int. J. Periodont. Res. Dent.*, v.18, p.355-361, 1998.

PIERMATTEI, D.L., FLO, G.L. Enxertos ósseos. In: (_) Manual de Ortopedia e Tratamento das Fraturas dos Pequenos Animais. São Paulo: Manole, 1999. p.139-145.

RUTHERFORD, R.B., WHALE, J., TUCKER, M., et al. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch. Oral. Biol.*, v.38, p. 571-576, 1993.

SATO, K., URIST, M.R. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.197, p.301-311, 1985.

SCHMIDMAIER, G., WILDEMANN, B., CROMME, F., et al. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone*, v.30, p.816-822, 2002.

SOMMERMAN, M.J., HEWITT, A.T., VARNER, H.H., et al. Identification of bone matrix derived chemotactic factor. *Calcif. Tissue. Int.*, v.35, p.481-485, 1983.

TSUMAKI, N., YOSHIKAWA, H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v.16, p.279-285, 2005.

URIST, M.R. Bone - formation by autoinduction. *Science*, v.150, p.893-899, 1965.

URIST, M.R., DELANGE, R.J., FINERMAN, G.A.M. Bone cell differentiation and growth factors. *Science*, v.13, p.680-686, 1983.

WOZNEY, J.M. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, v.15, s2- 8 review, 2002.

WOZNEY, J.M., ROSEN, V., CELESTE, A.J., et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, v.242, p.1528-1534, 1988.

YASKO, A.W., LANE, J.M., FELLINGER, E.J., et al. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) - a radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J. Bone Joint. Surg.*, v.74(A), p. 659-670, 1992.

**CAPÍTULO II - PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs)
ASSOCIADAS A OSSO ESPONJOSO AUTÓGENO NA REPARAÇÃO DE
FALHAS EXPERIMENTAIS NA CALOTA CRANIANA DE COELHO
(*Oryctolagus cuniculus*). II - AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.**

RESUMO

Quando implantadas em tecidos animais, as BMPs se ligam a receptores específicos existentes na superfície das células osteoinduzidas, ativam as proteínas citoplasmáticas SMAD (mothers against decapentaplegic proteins) e, no núcleo da célula receptora, passam a regular a transcrição de genes relacionados com calcificação e formação óssea. No presente estudo, foram avaliados os aspectos microscópicos da reparação óssea, após implantação de BMPs em diferentes concentrações, carregadas por enxerto ósseo esponjoso, em falhas criadas no crânio de 20 coelhas adultas-jovens, separadas aleatoriamente em cinco grupos experimentais, que corresponderam a cinco períodos de observação (7, 15, 21, 35 e 60 dias). Após a exposição cirúrgica, foram realizadas seis falhas ósseas na região fronto-parietal de cada animal. A falha I não foi preenchida, a II foi completamente preenchida com aproximadamente 3,0 mg de autoenxerto ósseo esponjoso e as falhas III, IV, V e VI foram preenchidas com o autoenxerto associado a 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg de BMPs, respectivamente. Microscopicamente verificou-se nas primeiras avaliações, aos sete dias, que o preenchimento ósseo iniciava-se a partir das bordas e do fundo da lesão, com mobilização e diferenciação de células provenientes do perióstio e das meninges, respectivamente e, nas avaliações subsequentes, a atividade osteoblástica provinha também de “ilhas de ossificação”, semelhantes a centros de ossificação, localizadas no centro da falha. A formação trabecular aumentou proporcionalmente com a concentração utilizada de BMPs e a aposição e organização óssea aumentaram proporcionalmente com o tempo de observação. Em quase todas as falhas foi verificada a presença de tecido cartilaginoso. A BMP associada ao autoenxerto ósseo esponjoso contribuiu para a formação de novo tecido ósseo, promovendo maior mobilização, diferenciação e organização celular e, abreviou o tempo de formação óssea, sugerindo processo de ossificação endocondral.

Palavras-chave: BMP, enxerto ósseo, reparação óssea.

ABSTRACT

When implanted in animal tissues, the bone morphogenetics proteins (BMPs) link to specific receptors located in the surface of the osteoinduced cells, they activate the SMAD cytoplasmatic proteins and, in the nucleus of the receiver cell, they start to regulate transcription of genes related with calcification and bone formation. In the present study, aspects microscopics of the bone repair were evaluated after the implantation of the BMPs in different concentrations, carries by autogenous bone graft, in defects created on skulls of 20 adult-young female rabbits, randomizedly separated on five experimental groups that correspond to five periods of observations (7, 15, 21, 35 and 60 days). After the exposure of bones skull, were performed six bone defects on the fronto-parietal region of each animal. The defect I wasn't filled, the II was completed filled with 3,0 mg of autogenous bone graft and the defects III, IV, V and VI were filled with autogenous bone graft associated with 0,5; 1,0; 2,0 and 5,0 mg of BMPs respectively. It was verified microscopically in the first evaluations, at the seventh day, that the bony growth started from the borders and from the bottom of the lesion, with mobilization and differentiation of cells deriving from the periosteum and of the meninges, respectively and, in the subsequent evaluations, the osteoblastic activity also derived from "ossification islands" to ossification centers, located in the center of the flaw. The trabecular formation increased proportionally with the concentration of BMPs used, and the apposition and bony organization increased proportionally with the time of observation. The presence of cartilaginous tissue was verified in all the flaws. The association of BMPs with autogenous bone graft contributed to the formation of new bony tissue, promoting larger mobilization, differentiation and cellular organization. It also abbreviated the time of bony formation, suggesting an endochondral ossification process.

Keywords: BMPs bone graft, bone repair.

INTRODUÇÃO

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) foram identificadas como substâncias capazes de induzir a formação de cartilagem e osso, mesmo quando implantadas em sítios extra-ósseo, como tecido subcutâneo e muscular (Urist, 1965 e Del Carlo et al, 2003).

Segundo Katagiri et al (1990) a influência osteogênica das BMPs é direcionada apenas para células imaturas e multipotentes. Contudo, pesquisas recentes (Tsumaki & Yoshikawa, 2005 e Wan & Cao, 2005) demonstram que estes promotores de crescimento ósseo além de induzir a condrogênese e a osteogênese pela diferenciação de células mesenquimais, influenciam e exacerbam a ação de osteoblastos e osteoclastos em tecidos ósseos e de condroblastos em tecidos cartilagosos.

Quando implantadas em tecidos animais, as BMPs se ligam a receptores específicos existentes na superfície das células osteoinduzidas e ativam as proteínas SMAD (mothers against decapentaplegic proteins) presentes no citoplasma destas células. As SMAD sofrem fosforilação e translocam-se para o núcleo da célula receptora, passando a regular a transcrição de genes relacionados com calcificação (Sakou, 1998; Tsumaki & Yoshikama, 2005 e Wan & Cao, 2005).

Tsumaki & Yoshikawa (2005) descreveram os eventos envolvidos na formação óssea induzida pelas BMPs, entre eles quimiotaxia e proliferação de células mesenquimais, diferenciação em condroblastos e osteoblastos, calcificação da matriz cartilaginosa, angiogênese e invasão vascular, diferenciação, mineralização e remodelação ósseas, seguida de formação de medula óssea. Afirmaram que esses eventos são semelhantes aos que ocorrem num processo normal de ossificação endocondral, diferenciando apenas quanto à precocidade de formação.

Sampath & Reddi (1983), por meio de análises histológicas e biomecânicas, relataram que o aparecimento de cartilagem, após a implantação de BMPs, se dá entre cinco a 10 dias, e que em torno de sete a 14 dias, esta cartilagem se mineraliza sendo substituída por osso novo, com formação de medula óssea após 21 dias.

Sato & Urist (1985) observaram histologicamente após a injeção de 1-5 mg de BMP na musculatura da coxa de ratos, quimiotaxia de células mesenquimais indiferenciadas; proliferação e diferenciação destas células em condroblastos e

osteoblastos; síntese de componentes da matriz; maturação; mineralização e remodelação, resultando na formação de um ossículo.

As BMPs apresentam ação local, devendo ser depositadas diretamente no local de promoção do crescimento ósseo e necessitam ser carregadas por agente que permita a difusão dessas proteínas por entre as células, facilitando a osteoindução (Marukawa et al 2001). Em acréscimo, Kuboki et al (1995) relataram que os carreadores de BMPs, além de se prestarem como sistemas liberadores, também são importantes como plataforma para diferenciação celular.

O enxerto ósseo esponjoso tem sido considerado um carreador ideal (Allegrini et al, 2004), atuando como arcabouço, promovendo a osteoindução e a vascularização precoce. Ellis & Sinn (1993) ainda acrescentaram como vantagens a histocompatibilidade, o fornecimento de células osteogênicas e a adaptação perfeita às falhas ósseas existentes.

Marx (1994) relatou que, após a aplicação do autoenxerto de osso esponjoso, a formação óssea inicia-se a partir de osteoblastos provenientes da medula contida no interior de suas trabéculas, determinando formação osteóide direta, seguida de migração e diferenciação de células indiferenciadas, quimiotaticamente atraídas por fatores de crescimento, presentes no enxerto. Todavia, a sua associação com BMPs é um procedimento recente.

Este trabalho tem por objetivos avaliar os aspectos microscópicos da reparação óssea, após a implantação de BMPs em diferentes quantidades, carregada por enxerto ósseo esponjoso, em falhas criadas em crânio de coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Departamento de Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa, em fevereiro de 2005.

O experimento foi realizado em 20 coelhas da raça Nova Zelândia, com peso médio de 3,5 Kg e idade entre seis e sete meses, mantidas em gaiolas individuais e alimentadas com ração comercial, feno e água.

À época dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em jejum sólido de oito horas, pré-anestesiados com acepromazina¹³ (0,1 mg/kg/IV) e tiveram a porção dorsal do crânio e as asas do íleo direita e esquerda tricotomizadas. Em seguida, foi realizada anestesia geral dissociativa com de tiletamina/zolazepan¹⁴ (30 mg/kg/IV) associados numa mesma seringa com 1,0 mg/kg de levomepromazina¹⁵ 0,5 %. Foram também submetidos a anestesia epidural com lidocaína¹⁶ 2% (0,9 mL/animal) objetivando maior conforto durante a coleta do autoenxerto ósseo na crista ilíaca.

A antibioticoterapia foi realizada com cinco aplicações de cefalexina¹⁷ (5mg/kg/IM), uma após a indução anestésica e a cada 24 horas após o procedimento cirúrgico. A analgesia foi realizada com morfina¹⁸ (0,4 mg/kg/VO), no período pré-operatório e a cada 8 horas pós-cirurgia, durante três dias e, como medicação antiinflamatória foi utilizado cetoprofeno¹⁹ (1,1 mg/kg/SC), no pré-operatório.

A BMP²⁰ utilizada apresentava-se como um produto liofilizado, correspondendo a um “pool” de proteínas morfogenéticas ósseas, englobando de BMP-2 a BMP-14, e previamente ao procedimento cirúrgico, foi submetida à pesagem em balança de precisão, nas quantidades pré-estabelecidas, para que pudesse ser misturada ao enxerto esponjoso autógeno, no momento do preenchimento das falhas ósseas.

¹³ Acepram 1% - Univet – São Paulo – Brasil.

¹⁴ Zoletil® 50, Virbac – São Paulo – Brasil.

¹⁵ Neozine (5mg/ml) - Aventis Pharma – São Paulo – Brasil.

¹⁶ Lidocaína 2% - Anestésico Bravet – Rio de Janeiro – Brasil.

¹⁷ Cefalexina 250 mg/5 ml - Aventis Pharma – São Paulo - Brasil.

¹⁸ Dimorf® Solução Oral - Cristália LTDA – Itapira – Brasil.

¹⁹ Profenid IV (100mg/2ml) - Aventis Pharma – São Paulo – Brasil.

²⁰ Gen-Pro® - Proteínas Morfogenéticas do Osso (BMPs) - BAUMER S.A - Mogi Mirim - Brasil.

Os animais foram posicionados em decúbito esternal, com a cabeça sobre uma almofada. Após preparo e anti-sepsia do campo cirúrgico foi realizada incisão de pele sobre a crista sagital externa do crânio, estendendo-se da protuberância occipital até próximo aos olhos, de aproximadamente três centímetros de comprimento. O tecido subcutâneo e os músculos frontal, interescutular, occipital e temporal foram incisados e rebatidos lateralmente, assim como o periósteo, permitindo a exposição do osso parietal.

Após a exposição dos ossos do crânio, com auxílio de uma broca trefina²¹ cirúrgica de 4,3 mm de diâmetro conectada a uma perfuratriz elétrica²², na velocidade de 5000 rpm e irrigação contínua com solução fisiológica, foram realizadas seis falhas ósseas na região fronto-parietal de cada animal, estando três no antímero direito e três no esquerdo, transpassando toda espessura do díploe, com exposição das meninges ao fundo da falha, sendo esta mantida íntegra.

Estas falhas encontravam-se afastadas por aproximadamente oito milímetros e, cada falha, foi numerada de um a seis no sentido rostro-caudal, da direita para a esquerda. A falha I não foi preenchida e a falha II foi completamente preenchida com autoenxerto ósseo esponjoso, na quantidade de 3,0 mg, ambas servindo como controle para avaliação do preenchimento ósseo. As falhas III, IV, V e VI foram preenchidas com o autoenxerto associado com 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg de BMPs, respectivamente.

O osso esponjoso autógeno foi coletado da crista ílíaca direita, após a realização das seis falhas. A cortical da crista foi perfurada com uma broca de cinco milímetros conectada a uma parafusadeira manual de baixa rotação²³, até a exposição do osso trabecular que foi coletado com uma cureta oval (nº 1) e colocado sobre uma gaze umedecida com solução fisiológica até o momento da enxertia.

Ao término dos procedimentos, as fâscias musculares e a pele foram suturadas, em ambos os sítios cirúrgicos.

Após a cirurgia, os animais foram separados aleatoriamente em cinco grupos experimentais denominados **A**, **B**, **C** e **D**, constituídos de quatro animais e cada um desses grupos correspondeu a uma época de sacrifício (Tab. 1), que foi considerada o período de observação de cada grupo.

²¹ Broca trefina cirúrgica – Neodent Implante Osteointegravel – Curitiba – Brasil.

²² Microrretífica Dremel – BOSCH – Rio de Janeiro – Brasil.

²³ Parafusadeira Bosch 7,2 V – Rio de Janeiro – Brasil.

Tabela 1 - Época do sacrifício dos animais por grupos e em dias.

GRUPO	ÉPOCA DE SACRIFÍCIO
Grupo um (G1)	Sete dias
Grupo dois (G2)	15 dias
Grupo três (G3)	21 dias
Grupo quatro (G4)	35 dias
Grupo cinco (G5)	60 dias

Na data prevista, os animais foram sacrificados com sobredosagem anestésica, utilizando pentobarbital sódico. A pele e a musculatura do crânio foram cuidadosamente removidas para permitir a visualização do local operado e com auxílio de uma serra manual, a região das falhas na porção fronto-parietal da calota craniana foi removida e submetida a processamento histológico.

O material proveniente da região da falha associado ao osso adjacente foi fixado por 48 horas em formalina 10% tamponada. Posteriormente, foi descalcificado em ácido fórmico 8% associado ao ácido clorídrico 8%, durante 15 dias. A seguir, foi desidratado em álcool 90% por uma hora e em álcool absoluto, durante duas horas (dois banhos de uma hora cada). Depois, o material foi diafanizado em dois banhos com xilol puro, em cada um deles por 40 minutos. Os fragmentos foram imersos em parafina e colocados em estufa a 56° C, por um período de três horas, e foram incluídos em parafina a temperatura ambiente.

Cortes sagitais de cinco micrômetros de espessura, da porção medial da falha, envolvendo o osso receptor nas bordas, foram obtidos em micrótomo e montados em lâminas de vidro. Os fragmentos obtidos foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e com Tricromo de Masson.

As amostras foram avaliadas quanto a morfologia e organização celular e quanto ao tipo de tecido reparando as falhas.

Para a aquisição das imagens fotográficas, utilizou-se uma câmara digital²⁴ acoplada a um microscópio óptico binocular²⁵, fazendo a captura das fotografias pelo programa Photograb FUJIFILM 300Z.

²⁴ Nikon HC 300 Zi – São Paulo - Brasil

²⁵ Microscópio Óptico Nikon Eclipse E600 – Califórnia - USA

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No grupo 1, as falhas I exibiram pouca formação de tecido ósseo, predominantemente trabecular, cujo preenchimento originava-se a partir das bordas e do fundo da lesão e presença de tecido cartilaginoso. Nas reparações oriundas das bordas, a mobilização e diferenciação celular originavam-se no perióstio e quando oriunda do fundo, os tipos celulares presentes eram provenientes das meninges, semelhante aos resultados das pesquisas de Takagi & Urist (1982). Nas falhas II, que receberam o enxerto esponjoso, foi visualizada discreta formação óssea do tipo trabecular com presença de túneis vasculares, superior àquela encontrada na falha anterior e mobilização celular nas imediações do carreador (Figs. 2 A e B). No animal C, foi visualizada pequena área com presença de células da medula óssea, privada de vascularização, com formação de pequenos focos de tecido cartilaginoso. Nas demais falhas, a formação de tecido ósseo apresentava-se mais evidente, com presença de tecido cartilaginoso, sendo também visualizada linhas de cimentação.

A formação trabecular aumentou proporcionalmente com a quantidade de BMPs utilizada, contudo no animal A (falha VI) foram observados pequenos focos de necrose no carreador com formação de tecido conjuntivo. Tais achados estão relacionados à ausência de vasos sanguíneos no local da necrose, pois segundo Piermattei & Flo (1999) a necrose corresponde a porção de osso esponjoso que normalmente morre por deficiência nutricional, e para Schenk (1996) a carência de suprimento sanguíneo e de oxigênio para as células pode alterar o código genético celular induzindo a formação de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso.

No grupo 2, notou-se pequeno preenchimento ósseo sobre a falha I e a presença de um tecido indiferenciado com grande número de células blásticas. A atividade osteoblástica visualizada, em sua maioria, provinha de “ilhas de ossificação” (origem endosteal-trabecular) localizadas no centro da falha e semelhantes a centros de ossificação, diferentemente do apresentado pelas falhas I, do grupo de sete dias.

Nas falhas II, a formação de osso novo foi mais evidente que aquelas constatadas em todas as falhas do grupo 1. Foram observados “corações condróides” e, áreas de tecido ósseo com ósteons primários demonstrando formação de túneis vasculares (Fig.

2C) e maturação do osso novo, osteoclastos em atividade e acompanhados de fileiras de osteoblastos, caracterizando reabsorção e deposição de osso novo (Fig 2D), respectivamente.

No animal **A**, além deste preenchimento ósseo, também foi encontrado abundante tecido de granulação, intensamente vascularizado, que possivelmente forneceu células mesenquimais capazes de participar da formação óssea direta, e que também serviu como plataforma para o crescimento de novo osso, conforme afirma Rabie et al (1996).

Em todas as falhas III foi observada formação de tecido ósseo novo sobre o carreador. Este tecido novo continha osteoblastos e células indiferenciadas, que, provavelmente, originaram-se do autoenxerto e/ou foram atraídas por ação da BMPs, por quimiotaxia, para o local da falha. Ao redor do osso enxertado e do novo tecido formado foram visualizadas espículas ósseas e pequenas formações trabeculares rodeadas por células jovens.

Para as falhas IV, V e VI também constatou-se que a hiperplasia de células jovens originava-se das “ilhas de ossificação”, aumentando a formação e organização do tecido ósseo, assim como a quantidade de trabéculas presentes, respectivamente.

Da mesma forma que Sato e Urist (1985), que também implantaram BMPs em falhas ósseas, o padrão de preenchimento de osso novo desenvolveu-se, primariamente, a partir da meninge e posteriormente foi proveniente do endóstio-trabecular, com formação de “ilhas de ossificação”, não conectadas à borda da falha.

No grupo 3, nas falhas I foi observada intensa mobilização de osteoblastos nas imediações das “ilhas de ossificação” e discreta migração celular advinda da meninge, permitindo formação de tecido ósseo novo, com linhas de cimentação e vasos sanguíneos evidentes (Fig 2A). Em algumas áreas do osso novo observou-se atividade de osteoclastos, formando túneis vasculares. Nas falhas II notou-se pequenos focos de tecido blástico, formação trabecular evidente e preenchimento ósseo proveniente das “ilhas de ossificação”. No animal **B**, também foi constatada uma faixa de tecido fibroso cobrindo o carreador, decorrente, provavelmente, da migração de células das fáscias musculares e do perióstio localizado acima da falha.

Nas falhas III, IV e V, foram observadas “ilhas de ossificação” rodeadas por células jovens, bem como a presença de tecido cartilaginoso em alguns pontos do

preenchimento, corroborando os achados de Cheline et al (2002) que afirmaram que a presença dessas “ilhas” rodeadas por células em diferenciação é um aspecto geralmente observado em sítios de implantação de BMPs.

Para as falhas VI, visualizou-se grande formação óssea trabecular, porém as células osteoblásticas que as rodeavam apresentavam-se desorganizadas. Pode-se inferir que a quantidade de BMPs pode ter sido inadequada em relação a do carreador, refletindo-se nesta desorganização tecidual, já que esta proteína mobilizava novas células, mas estas não encontravam o substrato/ambiente para manifestarem sua atividade osteoindutora.

Em um animal deste grupo (animal **D**) foi caracterizada uma reação imunomediada inespecífica e visualizada a presença de mastócitos. Verificou-se que nas falhas que continham concentrações de 5, 2 e 1 mg de BMPs havia a presença de material refringente no interstício sendo fagocitado por osteoclastos e desorganização celular sugerindo que, nesta etapa, houve formação trabecular óssea seguida de reabsorção estimulada por algum fator irritativo (Fig. 2B). Gerhart et al (1993) e Cook et al (1994) relataram reações imunomediadas associadas a não-união óssea, ocasionadas pelo processamento laboratorial das formas recombinantes purificadas de BMPs. Todavia, como apenas um animal do experimento manifestou intolerância, pode tratar-se de reação individual.

No grupo 4, a formação de tecido ósseo estava presente, sobretudo nas falhas que continham BMPs. Nas falhas I foi observada organização e remodelação óssea, com osteons primários, marcante presença de vasos sanguíneos, osteoclastos e pequenas áreas de tecido cartilaginoso. Nas falhas II, foram encontradas grandes quantidades de osso novo, diminuída quantidade de carreador, presença de muitos vasos sanguíneos e organização óssea mais avançada. A evolução da reparação e o menor volume de carreador podem ser justificados pelas observações de Marx (1994), nas quais, o reparo ósseo iniciou-se imediatamente após a colocação do enxerto e que por volta da quarta semana após a cirurgia o processo de substituição do enxerto esponjoso foi mais evidenciado.

Nas falhas III, com 0,5 mg de BMPs, também foram visualizados osteons primários (figs. 3 A e B), porém o tecido ósseo formado mostrava, em sua maior parte, a

presença de ósteons secundários. Em alguns animais ainda foram encontrados restos de tecido cartilaginoso, concordando com os achados de Yasko et al (1992) que também encontraram tecido cartilaginoso precedendo a formação óssea, em todas as suas amostras experimentais, no mesmo período de observação. Na medida em que aumentava a concentração de BMPs, constatou-se que a formação óssea era maior e a organização em ósteons secundários estava mais evidenciada, sem que fosse observado tecido cartilaginoso, que por outro lado, estava presente nas falhas I.

O tecido ósseo de reparação que cobriu as falhas estava relacionado à formação óssea por aposição, derivada das células osteogênicas presentes no local e atraídas por quimiotaxia pela ação da BMPs e também, derivou-se de mecanismo dependente de cartilagem, observada nos grupos 1, 2, 3 e 4, cujas células podem ter chegado ao local pelos túneis vasculares que se formaram ou terem sido atraídas por ação da proteína óssea morfogenética.

No grupo 5, as falhas apresentavam tecido ósseo bem organizado. Nas falhas I e II o número de ósteons foi menor do que nas falhas em que a BMP estava presente. No animal C, na falha que recebeu só o enxerto, ainda existiam restos trabeculares sendo reabsorvidos. Não foi encontrado tecido cartilaginoso nas falhas, que já teria se calcificado, vascularizado e sido substituído por tecido ósseo, assim como encontraram Takagi & Urist (1982).

Aos 60 dias, a falha V foi a que apresentou maior organização óssea e melhor preenchimento, sendo visualizado tecido ósseo maduro se organizando ao redor de túneis vasculares e fileiras de osteoblasto em atividade (Figs. 3 C e D). Mas, independentemente do período de observação, o comportamento celular foi semelhante entre as falhas no mesmo animal, variando apenas a intensidade e a organização.

A formação de osso novo foi maior e mais precoce nas falhas tratadas com BMPs quando comparadas com as falhas I e II, assim como observado por Springer et al. (2005). Ainda, segundo Yasko et al (1992), o osso que se formou na presença de BMPs foi histologicamente indistinguível daquele produzido quando foram utilizados enxertos ósseos autógenos, matriz óssea desmineralizada e outros substitutos ósseos, diferindo apenas quanto à precocidade de formação óssea, uma vez que essas proteínas tem o poder de induzir a quimiotaxia de células que irão participar do processo de reparação.

CONCLUSÕES

O estudo microscópico após a implantação de BMPs associadas a osso esponjoso autógeno, nas proporções de 0,5 mg: 3,0 mg; 1,0 mg: 3,0 mg; 2,0 mg:3,0 mg e 5,0 mg: 3,0 mg em falhas experimentais na calota craniana de coelho permitiu concluir que as proteínas morfogenéticas ósseas contribuem para a formação de novo tecido ósseo promovendo maior mobilização, diferenciação, organização e remodelação celular e, abrevia o tempo de formação óssea que se dá, predominantemente, por ossificação endocondral.

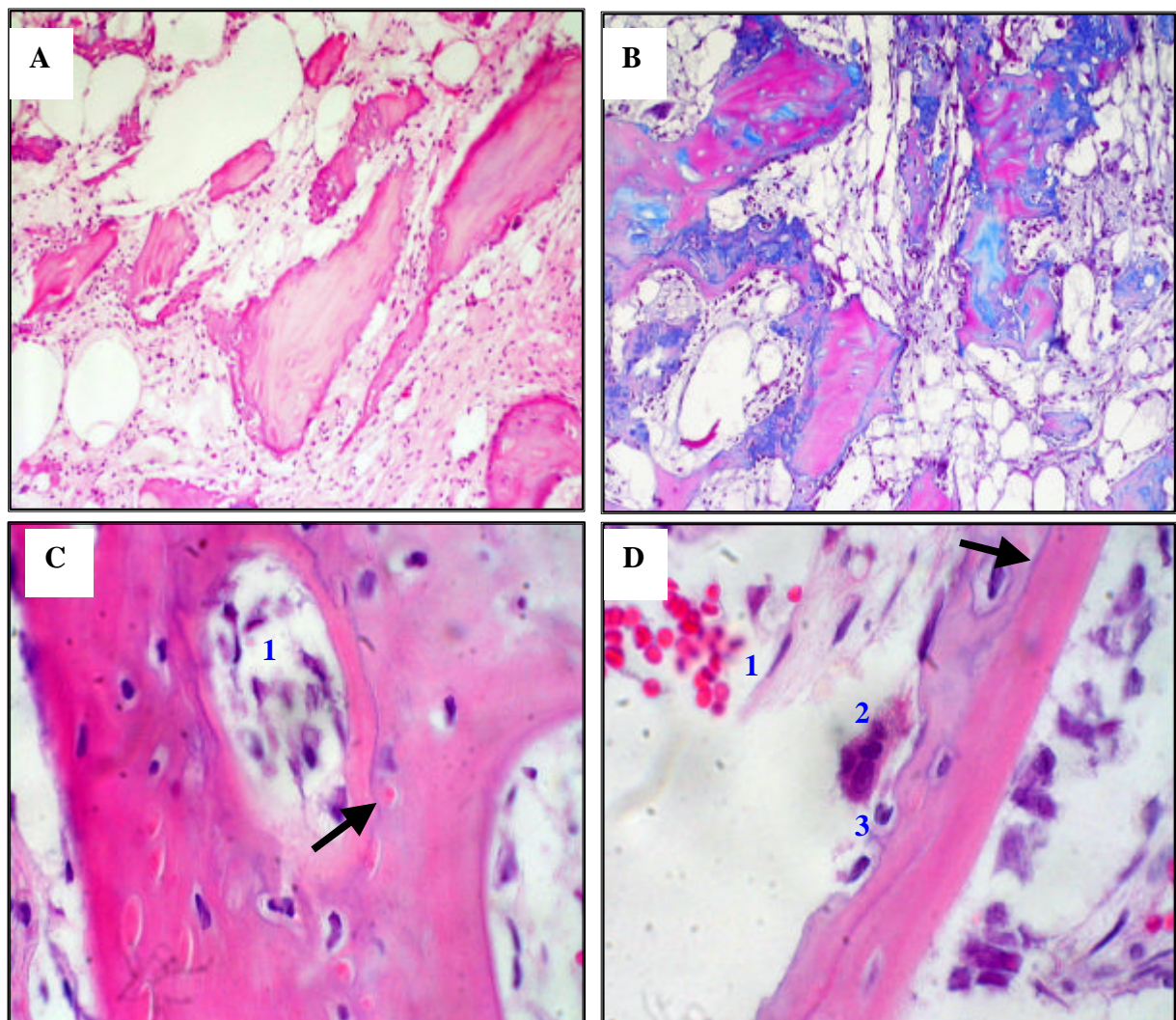


Figura 1 - Aspecto microscópico do preenchimento ósseo apresentado pelos grupos 1 e 2. **A)** Sete dias/Falha II. Mobilização celular () nas imediações do carreador (). (200X/H&E). **B)** Sete dias/Falha II. Mobilização celular () nas imediações do carreador (). (200X/MASSON). **C)** 15 dias/Falha II. Formação de osso novo () acima de osso velho (), com visualização de linhas de cimentação (seta), formação de túneis vasculares (1). (1000X/ HE). **D)** 15 dias/Falha II. Formação de osso novo () acima de osso velho (), com visualização de linhas de cimentação (seta), túneis vasculares (1), e osteoclastos em atividade (2), acompanhados de fileiras de osteoblastos (3), caracterizando absorção e deposição de osso novo, respectivamente. (1000X/ H&E).

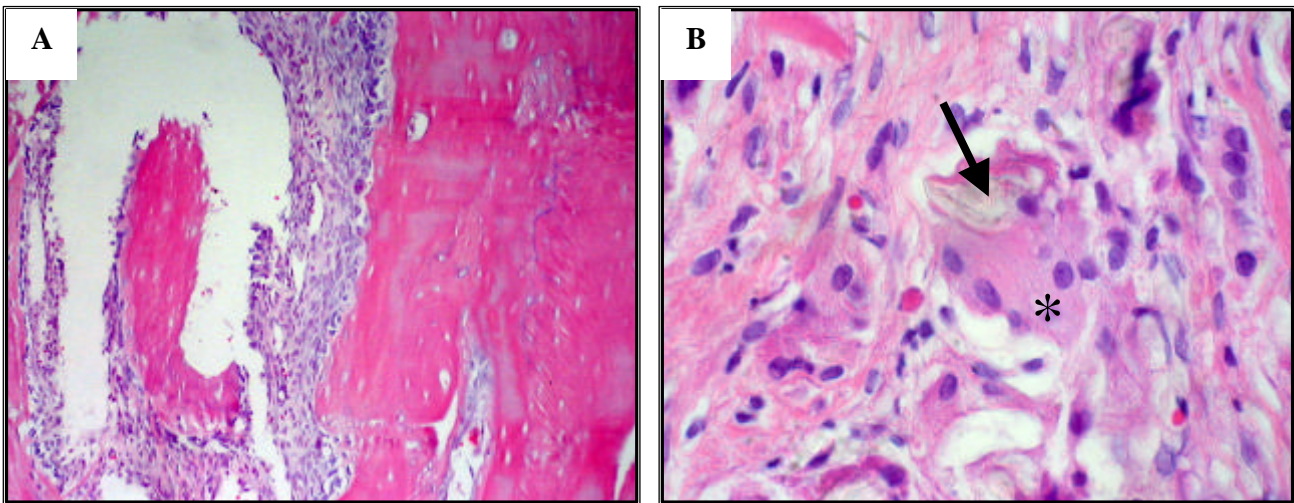


Figura 2 - Aspecto microscópico do preenchimento ósseo apresentado pelo grupo 3. **A)** Falha I. Formação de “ilhas de ossificação” () com intensa mobilização de osteoblastos em suas imediações ().(200X/H&E). **B)** Falha IV do animal **D** que apresentou reação imunomediada inespecífica à presença de BMP. Presença de material refringente (seta) sendo fagocitado pelos osteoclastos (*) e desorganização celular (). (1000X/ H&E).

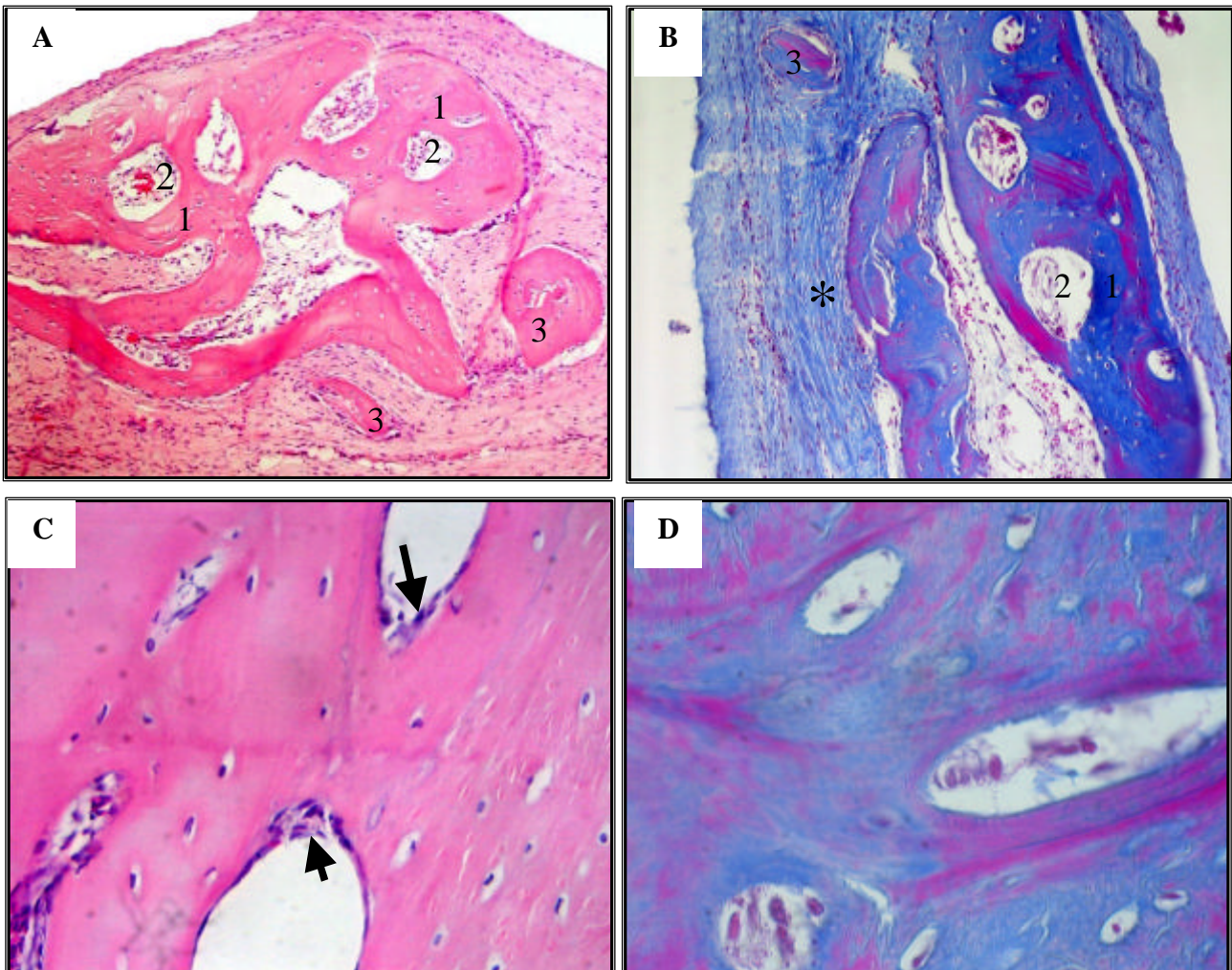


Figura 3 - Aspecto microscópico do preenchimento ósseo apresentado pelos grupos 4 e 5. **A)** Falha IV/grupo 4. Formação de ósteons primários (1) em torno de túneis vasculares (2) e “ilhas de ossificação” (3). (100X/H&E). **B)** Falha IV/grupo 4. Formação de ósteons primários (1) em torno de túneis vasculares (2), “ilhas de ossificação” (3) e presença de tecido fibroso (*). (200X/ MASSON). **C)** Falha V/grupo 5. Tecido ósseo maduro () se organizando em torno de túneis vasculares () e visualização de fileiras de osteoblastos (seta). (1000X/ H&E). **D)** Falha V/grupo 5. Tecido ósseo maduro () se organizando em torno de túneis vasculares (). (1000X/ MASSON).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEGRI, S.Jr., YOSHIMOTO, M., SALLES, M.B., et al. Bone regeneration in rabbit sinus lifting associated with bovine BMPs. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.15, p.127-131, 2004.

CHELINE, A.J., REDDI, A.H., MARTIN, R.B. Bone morphogenetic protein-7 selectively enhances mechanically induced bone formation. *Bone*, v.31, p.570-574, 2002.

COOK, S.D. BAFFES, G.C. WOLFE, M.W. et al. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J. Bone Joint Surg.*, v.76, p.827-838, 1994.

DEL CARLO, R.J., SILVA, A.M., VILORIA, M.I.V. et al, Potencial osteoindutor da matriz óssea homóloga desmineralizada de coelho. *Cienc. Rural*, v.33, p.533-538, 2003.

ELLIS, E., SINN, D.P. Use of homologous bone in maxillofacial surgery. *J. Oral. Maxillof. Surg.*, v.51, p.181-1193, 1993.

GERHART, T.N., KIRKER-HEAD, C.A., KRIZ, M.J., et al. Healing of large mid-femoral segmental defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein (BMP-2). *Clin. Orthop. Relat. Res.*, n.293, p.317-326, 1993.

MARX, R.E. Clinical applications of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clin. Plast. Surg.*, v.21, p.377-392, 1994.

MARUKAWA, E., ASAHINA, I., ODA, M., et al. Bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in alveolar defects of primate mandibles. *Br. J. Oral. Maxillof. Surg.*, v.39, p.452-459, 2001.

KATAGIRI, T., YAMAGUCHI, A., IKEDA, T. et al. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.172, p.295-299, 1990.

KUBOKI, Y., SAITO, T., MURATA, M., et al. Two distinctive BMP carriers induce zonal chondrogenesis and membranous ossification, respectively; geometrical factors of matrices for cell-differentiation. *Connect. Tissue. Res.*, v.32, p.219-226, 1995.

PIERMATTEI, D.L., FLO, G.L. Enxertos ósseos. In: (_) Manual de Ortopedia e Tratamento das Fraturas dos Pequenos Animais. São Paulo: Manole, 1999. p.139-145.

RABIE, A.B., DAN, Z., SAMMAN, N. Ultrastructural identification of cells involved in the healing of intramembranous and endochondral bones. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.*, v.25, p.383-388, 1996.

SAKOU, T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone*, v.22, p.591-603, 1998.

SAMPATH, T.K., REDDI, A.H. Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine, and rat extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.80, p.6591-6595, 1983.

SATO, K., URIST, M.R. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, n.197, p.301-311, 1985.

SCHENK, R.K. Regeneração óssea: bases biológicas. In: BUSER, D., DAHLIN, C., SCHENK, R.K. Regeneração óssea guiada na implantodontia. São Paulo: Quintessence, 1996. p.49-100.

SPRINGER, I.N.G., AÇIL, Y., KUCHENBECKER, S. et al. Bone graft versus BMP-7 in a critical size defect—Cranioplasty in a growing infant model. *Bone*, v.18, 2005. [article in press].

TSUMAKI, N., YOSHIKAWA, H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v.16, p.279-285, 2005.

TAKAGI, K., URIST, M.R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann. Surg.*, v.196, p.100-109, 1982.

URIST, M.R. Bone - formation by autoinduction. *Science*, v.150, p.893-899, 1965.

WAN, M., CAO, X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.328, p.651-657, 2005.

YASKO, A.W., LANE, J.M., FELLINGER, E.J., et al. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J. Bone Joint Surg.* v.74(A), p.659-670, 1992.