

Rogério da Silva Jorge

ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA INCORPORAÇÃO DE ENXERTO ALÓGENO
COM PROTEÍNA MORFOGENÉTICA DO OSSO-2 NA MANDÍBULA DE RATO

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Doutor em Biologia Buco-Dental,
área de Anatomia.

Piracicaba

2004

Rogério da Silva Jorge

ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA INCORPORAÇÃO DE ENXERTO ALÓGENO
COM PROTEÍNA MORFOGENÉTICA DO OSSO-2 NA MANDÍBULA DE RATO

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Doutor em Biologia Buco-Dental,
área de Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria

Prof. Dr. Roberto Henrique Barbeiro

Piracicaba

2004

Ficha Catalográfica

J768e Jorge, Rogério da Silva.
Estudo imunoistoquímico da incorporação de enxerto alógeno com proteína morfogenética do osso-2 na mandíbula de rato. / Rogério da Silva Jorge. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004. xii, 116p. : il.

Orientador : Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ossos – Enxerto. 2. Mandíbula. 3. Rato. I. Luz, João Gualberto de Cerqueira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Abadia, que até hoje é exemplo de vida para as pessoas ao seu redor.

À Edna Toddai, não só pela imensa ajuda na realização do trabalho, mas por ter modificado meu modo de ver e viver, através de sua vida.

Ao Professor João Gualberto, pela paciência e estímulo.

A Jacks, Dan e Júlia.

AGRADECIMENTOS

Desde meus primeiros passos na área da pesquisa em Odontologia percebi com o passar dos anos que a quantidade de autores e Instituições necessários para publicar um artigo vêm aumentando. Algumas décadas atrás era comum artigos com um só autor, mas hoje em dia isto é pouco freqüente. Acho que esta faceta da pesquisa torna o desenvolvimento do conhecimento mais eficiente, pois o volume de informação atualmente é grande e a interação entre diferentes especialidades é uma das formas de se ter uma visão diferente sobre um tema, possibilitando assim a expansão das fronteiras da ciência. Desta forma se justifica uma lista de agradecimentos tão longa e ao mesmo tempo tão imprescindível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo, pelo apoio dado durante a realização da pesquisa (Proc. N. 00/09212-0).

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, na pessoa do Diretor, Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho.

À Coordenação de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, na pessoa da Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen.

À Coordenação do Curso de Biologia Buco-Dental, na pessoa da Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Cária e Carlos Roberto Hoppe Fortinguerra (in memoriam).

Aos professores da Área de Patologia da FOP-UNICAMP Oslei Paes de Almeida, Osvaldo Di Hipólito Junior, Jacks Jorge Junior, Edgard Graner, Márcio Ajudarte Lopes, Ricardo Coletta e Pablo Agustin Vargas.

Ao Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia da FOUSP, na pessoa do seu Chefe, Prof. Dr. Francisco Antônio dos Santos Corrêia.

Aos professores da Disciplina de Traumatologia da FOUSP, João Gualberto de Cerqueira Luz, Antônio Castelo Branco Teixeira, José Benedito Dias Lemos, Antônio Sílvio Fontão Procópio, Francisco Antônio dos Santos Corrêia e Oswaldo Crivello Júnior.

À Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo, pelo constante estímulo à pesquisa e apoio na orientação e execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, pela inestimável ajuda desde o projeto da pesquisa e sua realização.

Ao secretário da Disciplina de Traumatologia, Édison Henrique Vicente, sempre presente com constante alegria e apoio neste trabalho.

Às técnicas do Laboratório da Patologia da FOU SP, Elisa e Edna, que me ajudaram de maneira singular na realização da imunoistoquímica e demais procedimentos de microscopia.

Aos colegas da Disciplina de Cirurgia, Traumatologia e Anestesiologia da Faculdade de Odontologia da UNIP-Campinas, Antônio Silvio Nosé, Paulo Abdalla Saad, Marcos Kazuo Yamamoto, Paulo Dipe e Rodrigo Gironde.

À Maria Aparecida e Júlia Beatriz, pelas horas subtraídas da presença do Professor João.

Aos eternos amigos Ricardo Mesquita, Guilherme Lopes, Feris Biller, Jhony Freitas, Noé de Toledo, Pílón, Danny, Manoel Humberto, Rodrigo Burgos, Gessivaldo Ramos e André Ribeiro, que com sua amizade e abundância de vida muito me ensinaram.

“Filho, aviemó-nos, é preciso dar melhor emprego ao tempo concedido”,
Diálogo de Virgílio com Dante, canto XXIII do purgatório, A Divina Comédia.

SUMÁRIO

	P
LISTA DE SIGLAS E TERMOS UTILIZADOS	1
LISTA DAS FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS	3
RESUMO	5
ABSTRACT	7
1 – INTRODUÇÃO	9
2 – REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 – REVISÃO DOS ESTUDOS EXPERIMENTAIS	11
2.2 – REVISÃO DA DENSITOMETRIA	19
2.3 – REVISÃO DOS ENXERTOS AUTOCLAVADO E AUTÓGENO	20
2.4 – REVISÃO DA BMP	25
2.5 – REVISÃO DAS PROTEÍNAS INDIAN E SONIC HEDGEHOG	41
2.6 – REVISÃO DA OSTEOPONTINA	48
3 – OBJETIVO	51
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	53
5 – RESULTADOS	59
5.1 – ESTUDO HISTOLÓGICO	60
5.2 – ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO	72
5.3 – ESTUDO RADIOGRÁFICO E DE DENSITOMETRIA ÓPTICA	77
6 – DISCUSSÃO	83
7 – CONCLUSÕES	105
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

LISTA DE SIGLAS

aFGF – Fator de crescimento do fibroblasto, tipo ácido, do inglês acidic fibroblast growth factor.

AMPc – Adenosina monofosfato cíclica.

ANOVA – Teste estatístico de análise de variância.

bFGF – Fator de crescimento do fibroblasto, tipo básico, do inglês basic fibroblast growth factor.

BMP-rh – Proteína morfogenética do osso, do inglês bone morphogenetic protein. O rh significa recombinante humana.

BSA – Albumina sérica bovina, do inglês bovin serum albumin.

Cbfa-1 – do inglês core binding factor antigen 1.

DAB – Diaminobenzidina.

DNAc – Ácido desoxiribonucléico complementar.

DO – Densitometria óptica.

FOP – Fibrodisplasia ossificante progressiva.

HE – Hematoxilina e eosina.

IGF – Fator de crescimento tipo insulina, do inglês insulin-like growth factor.

Ihh – Indian hedgehog.

IL – Interleucina.

LSAB – Conjunto de reagentes para imunistoquímica com auxílio do complexo streptoavidina biotina.

MEC – Matriz extracelular.

MMP – Metaloprotease da matriz, do inglês matrix metalloprotease.

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro.

OPN – Osteopontina.

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês platelet-derived growth factor.

PMN – Polimorfonuclear.

PTHrp – Proteína relacionada ao paratormônio, do inglês parathyroid hormone related protein.

PVPI – Polivinilpirrolidona.

RT/PCR – do inglês reverse transcriptase/ polymerase chain reaction.

Shh – Sonic hedgehog.

TGF- β – Fator de crescimento transformante tipo beta 1, do inglês transforming growth factor.

Tris-HCl – Tris-hidroximetil-aminometano

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial, do inglês vascular endotelial growth factor.

LISTA DAS FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

	p
Fig. 1.1 - Detalhe do esqueleto pélvico do rato. Fig. 1.2 - Detalhe da mandíbula do rato, a seta indica o local do enxerto. Fig. 1.3 - Aparência do enxerto antes e após a limpeza do tecido presente no espaço medular, que lhe conferiu cor esbranquiçada. Fig. 1.4 - Uso da trefina sob irrigação para obtenção do defeito mandibular. Fig. 1.5 - Defeito bicortical no ramo mandibular. Fig. 1.6 - Defeito mandibular preenchido por enxerto ósseo.	55
Tabela 1. Peso médio inicial e final dos animais utilizados nesta pesquisa. Valores expressos em gramas.	59
Fig. 2.1 - Um dia, enxerto (E) posicionado no defeito mandibular, a margem da mandíbula (M) está desvitalizada. Infiltrado inflamatório presente no espaço medular. HE, aumento de 10x. Fig. 2.2 - Sete dias, neoformação óssea (NO) ao redor das trabéculas do enxerto no espaço medular. HE, aumento de 20x. Fig. 2.3 - 14 dias, união do enxerto com o leito receptor com neoformação óssea do enxerto. HE, aumento de 5x. Fig. 2.4 - 21 dias, união entre mandíbula (M) e enxerto (E) através da neoformação óssea (NO), que se mostra mais compacta e menos celularizada. HE, aumento de 10x. Fig. 2.5 - 28 dias, remodelamento deixa o local do enxerto com menor espessura. O espaço medular é ocupado por tecido hematopoético. HE, aumento 5x.	63
Fig. 3.1 - Um dia. O enxerto (E) está desvitalizado e posicionado na mandíbula (M), o espaço medular é ocupado por rede de fibrina. HE, aumento de 5x. Fig. 3.2 - Sete dias. O espaço medular (EM) está preenchido por tecido de granulação. HE, aumento de 10x. Fig. 3.3 - 14 dias. A neoformação óssea (NO) tem origem na mandíbula (M) e não entra em contato direto com o enxerto, que mostra sinais de reabsorção. HE, aumento de 10x. Fig. 3.4 - 21 dias. O enxerto (E) mostra sinais de reabsorção, enquanto a neoformação óssea (NO) a partir da mandíbula (M) não envolve as trabéculas do enxerto. HE, aumento de 10x. Fig. 3.5 - 28 dias. O enxerto está bem preservado, embora não esteja unido ao leito receptor. HE, aumento de 5x.	67
Fig. 4.1 - Um dia. Enxerto (E) posicionado na mandíbula (M). HE, aumento de 5x. Fig. 4.2 - Sete dias. Intensa neoformação óssea (NO) ocupa o espaço medular, ligando a mandíbula (M) com o enxerto (E). Fig. 4.3 - Sete dias. A neoformação óssea (NO) mantém íntimo contato com o tecido muscular (TM). HE, aumento de 10x. Fig. 4.4 - 14 dias. O espaço medular é ocupado pela neoformação óssea (NO), que envolve as trabéculas e parte interna do enxerto (E). HE, aumento de 10x.	70
Fig. 5.1 - 21 dias. Grande volume de osso neoformado (NO) no enxerto e mandíbula (M). Presença de tecido hematopoético no espaço medular. HE, aumento de 5x. Fig. 5.2 - 28 dias. O remodelamento ósseo deixou o local do enxerto similar à mandíbula normal. HE, aumento de 10x. Fig. 5.3 - 28 dias. Mesmo em fase adiantada de reparação, ainda foi encontrado fragmentos do enxerto (E) entre as áreas de neoformação óssea (NO). HE, aumento de 20x.	71

Fig. 6.1 – Grupo autoclavado, sete dias. Área de neoformação óssea (NO) com presença de células semelhantes a condrócitos positivas para Shh (seta). Aumento original 40x.	74
Fig. 6.2 – Grupo autoclavado, sete dias. Área de neoformação óssea (NO) com presença de células osteoblásticas positivas para Ihh (seta). Aumento original 40x.	
Fig. 6.3 - Grupo BMP, 14 dias. Área de neoformação óssea (NO) com presença de células semelhantes a condrócitos positivas para Ihh (seta). Aumento original 40x.	
Fig. 6.4 – Grupo autoclavado, 14 dias. As setas indicam células positivas para Shh associadas ao tecido muscular (TM) e próximas a neoformação óssea (NO). Aumento de 40x.	
Fig. 6.5 – Grupo autoclavado, sete dias. Setas indicam células fusiformes positivas para Shh próximas a neoformação óssea (NO). Aumento original de 40x.	
Fig. 6.6 – Grupo autoclavado, sete dias. Área de neoformação óssea endocondral (NO) e tecido condróide (TC) negativos para Ihh. Aumento de 40x.	
Fig. 7.1 – Grupo controle, sete dias. Área de neoformação óssea (NO) com MEC e osteócitos positivos para OPN sobre a cortical mandibular (M). As setas indicam área de NO negativa para OPN onde os osteoblastos começam a ser envoltos pela matriz óssea. Aumento original de 40x.	75
Fig. 7.2 – Grupo controle, 28 dias. Setas indicam linhas de cimentação entre mandíbula (M) e osso neoformado. Aumento original de 40x.	
Fig. 7.3 – Grupo autoclavado, sete dias. Núcleos ovóides positivos para OPN (setas) próximos a área de neoformação óssea (NO). Aumento original de 40x.	
Fig. 7.4 – Grupo autoclavado, sete dias. Tecido condróide (TC) negativo para OPN. Aumento original de 40x.	
Fig. 7.5 – Grupo BMP, 14 dias. Intensa neoformação óssea (NO) unindo o enxerto (E), negativo para OPN, com a mandíbula (M). Aumento original de 40x.	
Fig. 7.6 – Grupo BMP, sete dias. Tecido muscular (TM) com células associadas (setas) positivas para OPN próximas à cortical mandibular (M). Aumento de 40x.	
Fig. 8.1 – Crânio de feto de rato Wistar, mostrando condrócitos positivos para Shh em ossificação endocondral. Aumento de 40x.	76
Fig. 8.2 – Crânio de feto de rato Wistar mostrando área de ossificação com marcação positiva para OPN. Aumento de 40x.	
Tabela 2. Resultados do estudo imunoistoquímico para Shh e Ihh. O número indica a quantidade de animais do grupo positivos para cada anticorpo.	76
Fig. 9.1 - Grupo controle. Um dia. A seta indica o enxerto.	
Fig. 9.2 - Grupo controle. 28 dias. O enxerto mostra bordas pouco nítidas.	79
Fig. 9.3 - Grupo autoclavado. Sete dias. Área radiolúcida ao redor do enxerto.	
Fig. 9.4 - Grupo autoclavado. 28 dias. Enxerto ainda pode ser distinguido da mandíbula.	
Fig. 9.5 - Grupo BMP. Sete dias. A margem do enxerto não está evidente.	
Fig. 9.6 - Grupo BMP. 21 dias. Extensa área radiopaca no local do enxerto. Em todas as imagens está presente a escala de alumínio utilizada na densitometria óptica.	
Tabela 3. Média de densidade óptica nos grupos avaliados, com desvio padrão. Valores expressos em DO.	80
Gráfico 1. Média de densidade óptica nos grupos avaliados, com desvio padrão. Valores expressos em DO.	80
Tabela 4. Resultados dos testes estatísticos.	81

RESUMO

Defeitos ósseos extensos em região maxilo-facial podem ser corrigidos com enxerto autógeno, no entanto as desvantagens desta modalidade terapêutica têm levado à pesquisa por novos materiais para substituir os enxertos autógenos. O objetivo deste estudo foi avaliar a incorporação de enxerto alógeno autoclavado associado à proteína morfogenética do osso-2 recombinante humana (BMP-2rh). Foram utilizados 75 ratos Wistar distribuídos em três grupos de 25 animais cada, sendo submetidos a enxerto ósseo em defeito mandibular de tamanho não reparável espontaneamente. No grupo controle foi utilizado enxerto autógeno fresco de osso ilíaco e nos dois grupos experimentais, enxerto alógeno autoclavado ou enxerto alógeno autoclavado associado a BMP-2rh e colágeno tipo IV. Os animais foram sacrificados após um, sete, 14, 21 e 28 dias, sendo a mandíbula radiografada e cortes histológicos obtidos para coloração em hematoxilina e eosina e reação imunoistoquímica com anticorpos para Indian hedgehog (Ihh), Sonic hedgehog (Shh) e osteopontina (OPN). A imagem radiográfica foi submetida a exame de densitometria óptica e os valores testados estatisticamente. No grupo com enxerto autoclavado a neoformação óssea foi limitada aos cotos mandibulares e a reabsorção do enxerto ocorreu de forma mais lenta, restando grande parte do enxerto no tempo final, não sendo observada a união do enxerto com a mandíbula. No enxerto com BMP-2rh a neoformação óssea foi intensa, com preenchimento do espaço medular por neoformação óssea e união com a mandíbula. A incorporação ocorreu de forma mais rápida e houve reparação do defeito mandibular. A distribuição de Ihh e Shh foi similar, sendo positiva em células semelhantes a condrócitos, células semelhantes a fibroblastos e osteoblastos próximos a áreas de neoformação óssea e em células aparentemente associadas ao tecido muscular vizinho ao enxerto. A OPN mostrou áreas positivas associadas a osteócitos, osteoblastos, matriz extracelular na neoformação óssea e remodelação em todos os grupos. Os dados obtidos pela densitometria óptica mostraram resultados estatisticamente significativos no grupo tratado com BMP-2rh. O experimento mostrou a capacidade de indução óssea da BMP-2rh em ratos, associada ao osso alógeno autoclavado. As proteínas Shh e Ihh foram expressas durante a incorporação do enxerto, participando da rede de sinalização encontrada durante a reparação do defeito mandibular do rato.

ABSTRACT

Large bone defects can be managed by autogenous graft; however limitations in this source have induced research for new materials to replace autogenous graft. The incorporation of autoclaved alogenous bone graft associated to recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) was the objective of this study. The study animals were 75 Wistar rats distributed into 3 groups with 25 animals. The rats were submitted to a mandibular critical size defect to be treated with autogenous graft from iliac in control group while experimental groups used autoclaved alogenous bone, with or without rhBMP-2. The animals were sacrificed after 1, 7, 14, 21 and 28 days, the mandible radoigraphed, decalcified, stained for heamatoxilin and eosin and immunohistochemistry for Indian hedgehog (Ihh) and Sonic hedgehog (Shh) and osteopontin (OPN). Radiographic image was submitted to optical densitometric avaliation. After 28 days microscopic examination showed almost fully incorporated graft in control group, but in alogenous group without rhBMP-2 there was little incorporation and bone neoformation without bony union between mandible and graft. The use of rhBMP-2 caused an intense osteoinduction bonding mandible and graft after 7 days. After 28 days the incorporation process was similar to that seen in control group. Expression of Shh and Ihh was in the same pattern, with positive chondrocytes-like cells, fibroblast-like cells and osteoblasts near bone neoformation. OPN marker showed positive areas associated to osteocytes, osteoblasts, reversal lines and osteoid matrix. Optical densitometry showed statistically significant results inside rhBMP-2 treated group. This study showed that rhBMP-2 associated to autoclaved alogenous graft is osteoinductive. The Shh and Ihh proteins were expressed during graft incorporation, maybe playing an important role in the bone reparation signalling pathway.

1 - INTRODUÇÃO

As proteínas morfogenéticas do osso são as substâncias mais promissoras na osteoindução, sendo esperado que possam ser clinicamente aplicáveis para reconstrução óssea. As BMPs são armazenadas na matriz óssea e estão intimamente envolvidas na formação e desenvolvimento do osso, remodelamento fisiológico e reparação. Tem sido demonstrado que estes fatores de crescimento atuam na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e condroblastos.

O modelo experimental mais indicado para testar possíveis materiais para substituição óssea na literatura recente é o defeito ósseo não reparável espontaneamente, representando um defeito que não sofre reparação óssea espontânea durante a vida do animal (HOLLINER & KLEINSCHMIDT, 1990), desta forma a reparação óssea ocorrerá somente quando no defeito for colocado material que de alguma forma seja osteogênico. Este conceito tem sido aplicado na mandíbula do rato para avaliação de vários materiais, inclusive BMP (ZELLIN & LINDE, 1997).

A despeito dos recentes avanços na área básica e clínica, o conhecimento dos fenômenos biológicos envolvidos na incorporação do enxerto é ainda pequeno. Tópicos como ativação de células alvo, mecanismos de transdução, indução de diferenciação e proliferação, regulação autócrina e parácrina das células envolvidas na reparação óssea são pouco estudados. O estudo de mais de um fator ao mesmo tempo é importante para determinar suas interações.

A participação das proteínas Shh e Ihh é semelhante durante a formação do osso embrionário e seu reparo (FERGUSON *et al.*, 1998; VORTKAMP *et al.*, 1998; MURAKAMI & NODA, 2000), assim é possível questionar que elas também participem da incorporação de enxertos ósseos, fato ainda não descrito na literatura.

A reparação de um defeito ósseo preenchido com enxerto é marcada pela sua incorporação ao leito receptor, com substituição por osso neoformado e posterior remodelamento. O enxerto pode atuar como uma base para a neoformação óssea ou ainda induzir esta neoformação, sendo chamado respectivamente osteocondutor ou osteoindutor. A quantidade de tecido ósseo formado, de enxerto que sofrerá o processo de incorporação e a velocidade destes eventos, fatores de extrema importância clínica, têm sido ligadas à

presença de fatores de crescimento e outros mediadores celulares, tais como BMP, TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- 1), aFGF (acidic Fibroblast growth factor), bFGF (basic Fibroblast growth factor), PDGF (Platelet-derived growth factor), IGF (Insulin-like growth factor) e IL-1 e 6 (Interleucina-1 e 6). Estes fatores possuem reconhecida ação sobre as células envolvidas direta ou indiretamente na formação e reabsorção do tecido ósseo.

A utilização de enxertos autoclavados removidos de cadáveres tem sido descrita na literatura como um meio de substituir o enxerto autógeno e evitar a morbidade associada à sua remoção (ASADA *et al.*, 1997). O enxerto autógeno ainda é uma fonte limitada, ao passo que o autoclavado pode ser obtido virtualmente com quantidade e formato desejado. Contudo este tipo de enxerto é associado com dificuldades mecânicas, lentidão na incorporação e complicações como infecção. O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência da BMP-2rh na incorporação do enxerto alógeno autoclavado em defeito não reparável espontaneamente na mandíbula de rato.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - REVISÃO DOS ESTUDOS EXPERIMENTAIS

KABAN & GLOWACKI (1981) citaram haver dificuldade na avaliação de enxertos ósseos na mandíbula, pois em alguns modelos experimentais o defeito reparava espontaneamente. Propuseram um modelo de defeito ósseo bicortical não reparável espontaneamente no ramo mandibular do rato Charles River, com diâmetro de quatro milímetros, obtido com trefina. Neste defeito foi implantado osso liofilizado, osso pulverizado ou osso desmineralizado pulverizado. Os animais foram sacrificados com duas, quatro, oito e 16 semanas após a cirurgia. O grupo controle mostrou neoformação óssea a partir das margens do defeito, mas que não se ligaram em nenhum dos tempos de avaliação do estudo, evoluindo para cicatrização fibrosa ao final do experimento. Nos grupos experimentais, a reparação mais completa foi encontrada com uso de osso desmineralizado pulverizado, sendo este o único a mostrar formação de tecido cartilaginoso durante o processo de neoformação óssea. Os autores concluíram que o osso desmineralizado pulverizado mostrou maior grau de estímulo osteogênico em relação aos outros dois materiais.

BURCHARDT (1987), em extensa revisão bibliográfica sobre biologia dos transplantes ósseos, citou que o osso é o segundo tipo de tecido mais frequentemente transplantado, após o sangue. Porém, tem a desvantagem de gerar ferida cirúrgica adicional ao paciente, além de ser uma fonte limitada em quantidade, qualidade e formato, sobretudo em crianças. Contudo, ainda é considerado a melhor opção disponível para reconstrução de defeitos ósseos. O termo usado para descrever o processo de reparo do osso transplantado, independente do tipo, foi incorporação. Este processo une o tecido transplantado ao leito receptor, bem como envolve e mescla osso desvitalizado do enxerto com neoformado, refletindo o grau de aceitação do transplante pelo organismo receptor. A incorporação depende do contato próximo do leito receptor com o enxerto e sua estabilidade. Na fase inicial de reparação há formação de coágulo, sendo o enxerto foco de resposta inflamatória na primeira semana. Na semana seguinte o processo inflamatório diminui, estando presente tecido de granulação e atividade osteoclástica e osteoblástica. A remodelação vinda a seguir

completa a reparação. Diferenças são encontradas entre transplante de osso cortical e esponjoso. O osso esponjoso sofre processo de incorporação de forma mais rápida e completa. A revascularização ocorre rapidamente e osteoblastos formam a matriz osteóide, ligando trabéculas vizinhas. Posteriormente o osso do enxerto é gradativamente substituído por osso viável. O enxerto cortical tem vascularização mais lenta, com início da ação osteoclástica antes da osteoblástica. A reabsorção tem início na porção mais próxima do leito receptor, indo posteriormente em direção central. Neste tipo de transplante há possibilidade da não reabsorção de partes do enxerto, ao contrário do osso trabecular.

LANE & SANDHU (1987), em revisão bibliográfica sobre modelos experimentais de enxerto ósseo, citaram que o objetivo do enxerto é restaurar a integridade funcional do osso. Além de ser compatível, o enxerto deve atender às requisições peculiares a cada situação clínica. Diversos modelos de estudo têm sido utilizados para caracterizar o reparo ósseo e respostas a alterações do meio. Entre elas a implantação de materiais em bolsa subcutânea ou intramuscular, em órgãos viscerais, uso de câmaras de difusão *in vivo*, cultura celular *in vitro*. Entretanto, para avaliar completamente a capacidade e característica reparativa de substitutos ósseos, o modelo experimental com defeito no esqueleto é essencial. Dentro deste tipo de experimento os mais destacados seriam os defeitos por trefina, defeitos segmentais em ossos longos e fusão de vértebras. Diversos animais podem ser utilizados, desde camundongos e ratos até cães e ovinos. Citaram ainda que a radiografia ajuda o acompanhamento do processo de reparação e que a densitometria fornece a estimativa do conteúdo mineral no local da reparação.

GUTTU & LASKIN (1989) em revisão sobre modelos de pesquisa experimental em cirurgia oral e maxilo-facial, citaram que as técnicas cirúrgicas têm se desenvolvido ou refinado graças ao uso de animais de laboratório, sendo os benefícios revertidos aos pacientes. Os autores citaram que a incorporação de enxertos tem sido estudada por meio de avaliação histológica, radiográfica, microradiográfica, autoradiográfica e histomorfometria. Os estudos de enxerto ósseo podem ser realizados para avaliar os aspectos básicos de incorporação do enxerto ou seu uso em diferentes situações clínicas simuladas. Animais menores têm sido utilizados por causa dos menores custos de aquisição, manutenção e facilidade de manuseio, mas animais maiores como o macaco

foram mais indicados para procedimentos mais invasivos como segmentação mandibular, sendo importantes nos testes pré-clínicos. Os autores citaram ainda que o modelo proposto por KABAN & GLOWACKI em 1981 é excelente para avaliação de materiais de enxerto ósseo por causa da não reparação espontânea do defeito. Ratos com idade avançada foram relacionados com quantidade e velocidade menores de neoformação óssea.

HOLLINGER & KLEINSCHMIDT (1990) realizaram importante revisão bibliográfica abordando o defeito ósseo não reparável espontaneamente. Este foi definido como o menor defeito ósseo que não sofre processo de reparação por formação óssea durante a vida do animal, portanto dependendo da presença de material ou substância que promova neoformação óssea para se reparar. O defeito não reparável espontaneamente caminha naturalmente para cicatrização fibrosa ou preenchimento por tecido muscular, como no modelo proposto por KABAN & GLOWACKI (1981), onde defeito não reparável espontaneamente foi criado na mandíbula de rato. Citaram ainda que animais com esqueleto imaturo devem ser evitados nestas pesquisas, pois possuem resposta óssea maior que a encontrada em animais adultos, exceção feita ao rato, pois este possui crescimento contínuo durante a vida. Afirmaram que materiais para reparação óssea devem ser testados inicialmente em ratos ou coelhos, para depois utilizar cães ou primatas não humanos e finalmente em humanos. Citaram ainda, sobre o modelo de KABAN & GLOWACKI (1981), que a espessura reduzida entre as corticais mandibulares do rato dificulta a retenção do material implantado, limitando o espaço medular e conseqüentemente o número de células mesenquimais indiferenciadas que estariam envolvidas na reparação do defeito.

SULLIVAN & SZWAJKUN (1991) pesquisaram diferenças entre revascularização de enxertos ósseos de origem intramembranosa ou endocondral em ratos. O intramembranoso foi removido da calota craniana e o endocondral da crista íliaca, sendo implantados abaixo do perióstio na face lateral do osso nasal ou tíbia. Após uma e duas semanas os animais foram sacrificados e injetados com borracha de silicone na artéria aorta, para demarcar a invasão vascular, a qual foi determinada por histomorfometria. O enxerto endocondral mostrou maior revascularização que o intramembranoso. A invasão vascular no enxerto íliaco ocorreu predominantemente através da camada esponjosa, estando a cortical ainda pouco vascularizada após duas semanas. O enxerto

intramembranoso mostrou após uma semana pouca vascularização, porém após duas semanas houve revascularização da parte interna da díploe. Os resultados não mostraram variação para os dois diferentes leitos receptores. Os autores citaram que fatores angiogênicos podem estar envolvidos na causa da diferença entre os dois tipos de enxerto, concluindo que o enxerto de osso ilíaco revasculariza mais cedo e em maior índice que o do crânio e as diferenças entre a incorporação do enxerto devem estar mais relacionadas com a arquitetura do osso do que com sua origem.

SANDBERG *et al.* (1993) testaram o uso de membranas bioabsorvíveis de copolímero de ácido polilático e poliglicólico ou não reabsorvíveis de politetrafluoretileno expandido na reparação de defeito não reparável espontaneamente na mandíbula de ratos. Em ambos os grupos foram observadas células adiposas ocupando o espaço medular no tempo final e presença de tecido cartilaginoso durante a fase de reparação. Após doze semanas os resultados foram semelhantes entre os dois tipos de membranas, com preenchimento parcial do defeito com osso compacto, ficando o centro do defeito ocupado por tecido mole. No grupo tratado com membrana reabsorvível foi relatado infiltrado inflamatório, o que pode ter dificultado a formação óssea. Os autores concluíram que ambos os tipos de membrana são de grande valor nos procedimentos de reconstrução óssea maxilo-facial.

YAMAMOTO *et al.* (1994) avaliaram a resposta tecidual óssea em defeito não reparável espontaneamente na mandíbula de rato após a implantação de hidroxiapatita granular. Os pesquisadores realizaram defeito de aproximadamente três milímetros de diâmetro no ramo mandibular. Os animais foram sacrificados com um, sete, 14, 30, 60, 90 e 180 dias após a cirurgia. No tempo final o grupo controle sem tratamento não mostrou reparação óssea, estando o defeito ocupado por tecido fibroso e tecido muscular. No grupo experimental foi notada persistência dos grânulos de hidroxiapatita, com presença de reação tipo corpo estranho ao seu redor. A atividade osteogênica foi limitada às margens do leito receptor, não promovendo a reparação do defeito.

AABOE *et al.* (1995) em revisão abordando a reparação de defeitos ósseos experimentais, citaram o osso autógeno fresco como o melhor tipo de enxerto, embora cause ferida cirúrgica adicional, tenha quantidade limitada e reabsorção incontrolada. A

quantidade e a qualidade da reparação óssea sob condições experimentais é influenciada pela espécie animal, idade, localização anatômica, defeito uni ou bicortical, presença de perióstio e estabilidade do enxerto. A osteoindução gerada por este tipo de enxerto seria determinada pela diferenciação e proliferação de células mesenquimais locais em osteoblastos estimulada pela proteína morfogênica do osso. Os autores sugeriram que mediadores osteoindutores, tal como BMP, poderão ser utilizados juntamente com um sistema de liberação, no tratamento de defeitos ósseos da região da face e crânio.

REDONDO *et al.* (1995) testaram o uso de osso autógeno removido da mandíbula, desmineralizado e reimplantado de modo ortotópico associado ou não à hidroxiapatita, para reconstrução da borda inferior do ramo da mandíbula de ratos. Os animais foram primeiro submetidos à cirurgia para remoção do fragmento mandibular, de formato quadrado com lado de quatro milímetros. Sutura concluiu esta etapa da pesquisa, deixando o defeito mandibular vazio. Em seguida o fragmento foi submetido a processo de desmineralização, sendo reimplantado após duas semanas. Os animais foram sacrificados com duas ou seis semanas após a reimplantação do fragmento. O resultado, determinado pelo número de células mesenquimais no local do implante, mostrou diminuição da proliferação celular nos sítios contendo hidroxiapatita, concluindo os autores que a hidroxiapatita inibiu a osteoindução gerada pela matriz óssea.

SHIROTA *et al.* (1995) avaliaram a reconstrução de defeito ósseo mandibular em miniporcões, utilizando enxerto autógeno fresco vascularizado, removido da crista ilíaca e fixação com placa e parafusos de titânio. Os animais foram sacrificados com duas, quatro e oito semanas após o transplante. Foi relatada necrose dos osteócitos próximos da área de osteotomia na mandíbula e no enxerto e dos osteócitos vizinhos à placa e parafusos utilizados na fixação do bloco ósseo. Segundo os autores, a morte celular foi relacionada ao trauma cirúrgico e compressão da placa de fixação rígida. Foi observada necrose óssea na maior parte da medula óssea do enxerto, ao passo que a maioria dos osteócitos da cortical sobreviveu ao transplante. Houve neoformação óssea sobre as trabéculas do enxerto, cujo espaço medular foi ocupado por tecido de granulação, células inflamatórias e adiposas. Nos tempos mais prolongados houve diminuição do volume do enxerto e presença de grande quantidade de adipócitos no espaço medular, estando a delimitação do osso enxertado

pouco definida, pois o enxerto assumiu estrutura similar à da mandíbula. Os autores concluíram que parte do enxerto, mesmo sendo vascularizado, não sobreviveu ao transplante.

SZACHOWICZ (1995) em revisão bibliográfica sobre a reparação de ossos faciais, descreveu os eventos iniciais da reparação do enxerto autógeno como sendo semelhante a sequência de reparação em fraturas. Com sete dias houve formação de tecido de granulação, presença de formação óssea e reabsorção por osteoclastos e aos quatorze dias revascularização do enxerto trabecular, sendo a parte cortical revascularizada posteriormente. Por este motivo, parte do osso esponjoso pode sobreviver, sendo capaz de permanecer em atividade osteogênica. O osso esponjoso pode ser completamente substituído pela remodelação óssea, enquanto partes do osso cortical podem persistir em meio à remodelação. O autor citou ainda fatores que influenciam a incorporação do enxerto: seu tipo, cortical ou trabecular; história de radioterapia; presença de infecção ou fibrose; se o enxerto é livre ou vascularizado; tipo de fixação e sua eficiência; tamanho do enxerto; idade do paciente; presença de periósteo; presença de tensão ou compressão e origem do enxerto, se intramembranoso ou endocondral.

TEIXEIRA *et al.* (1998) analisaram a reparação da fratura do processo condilar em ratos adultos. Sob anestesia geral, foi realizada exposição e fratura do côndilo, sendo os animais sacrificados após um, sete, 14, 30 e 90 dias. Com um dia foram verificados osso vitalizado na margem da fratura e processo inflamatório agudo ao longo da cápsula articular e fibras musculares. Proliferação óssea e cartilaginosa nos cotos, os quais mostraram áreas de necrose e atividade osteoclástica com uma semana e tecido de granulação no espaço articular na segunda semana. Após um mês foi notada extensa neoformação óssea ligando os cotos e diminuição da área de necrose. No tempo final o côndilo estava com características de normalidade, centralizado na fossa temporal e com interposição do disco articular. Os autores concluíram que a fratura repara com formação de calo, sendo o processo condilar reposicionado na fossa temporal espontaneamente, indicando capacidade da articulação têmporo-mandibular de sofrer remodelação extensa.

FRANCESCHI (1999) relatou que a formação do osso é cuidadosamente controlada por sinais mediados por morfogens, tal como Shh, definindo a área onde haverá

condensação celular para o início da formação do osso. A BMP seria liberada neste ambiente para promover o engajamento de células mesenquimais indiferenciadas para a linhagem osteoblástica, iniciando a expressão de proteínas que caracterizam o fenótipo osteoblástico, como a fibronectina, colágeno tipo I, osteocalcina, osteonectina e osteopontina. A ativação destes genes pode estar relacionada com o Cbfa-1 (Core binding factor antigen-1), reconhecido por traduzir sinais de receptores de membrana plasmática de BMP e moléculas de adesão da matriz extracelular (MEC) em proteínas. A interação do osteoblasto com a MEC mediada por receptores tipo integrina parece ser essencial para expressão de proteínas relacionadas à sua atividade. O osteoblasto, assim como outras células devotadas à produção de matriz, tem a habilidade de monitorar a composição da MEC e modificar seus produtos para acompanhar as constantes mudanças de necessidade do tecido ósseo. O Cbfa-1 é um fator de transcrição específico da linhagem osteoblástica e é necessário para o desenvolvimento de tecidos mineralizados e sua mutação foi relacionada com a displasia cleidocraniana. O autor citou que no membro embrionário em desenvolvimento a Shh regula o eixo anterior posterior através da zona de atividade polarizada, formada por um grupo de células na parte mais posterior que controlam o desenvolvimento e a modelação do membro.

GORDH *et al.* (1999) estudaram os efeitos da BMP-2rh e membranas osteopromotivas no desempenho enxertos autógenos quanto à manutenção do volume. Foram testadas duas combinações de BMP-2rh, uma com 4µg e outra com 32µg associadas à esponja de colágeno e com ou sem a membrana de politetrafluoretileno expandido sobre um fragmento ósseo unicortical removido do fêmur. O enxerto foi implantado sobre a calvária de ratos e permitido reparar por quatro a 20 semanas, sendo os ratos sacrificados e o material removido para avaliação histológica. Foi realizado imunistoquímica para OPN neste estudo, sendo descrita marcação positiva no tecido ósseo em geral e mais intensa no grupo tratado com BMP-2rh. Os melhores resultados foram encontrados no grupo que recebeu altas doses de BMP-2rh em conjunto com membranas, descrevendo os autores que o volume do enxerto aumentou ou permaneceu o mesmo. Ao contrário o grupo sem BMP-2rh sofreu remodelação com perda de volume contínua. Segundo os autores o resultado mais surpreendente foi no grupo com alta dose de BMP-2rh sem proteção de membrana,

que mostrou intensa reabsorção, com perda quase total do enxerto. Após quatro semanas somente os grupos tratados com BMP-2rh, em alta ou baixa dose, mostraram integração com o leito receptor. Os autores concluíram que a combinação de BMP-2rh com membranas tem efeito sinérgico na manutenção do volume de enxertos autógenos.

JORGE (1999) estudou a reparação de defeito ósseo não reparável espontaneamente em mandíbula de rato tratado com enxerto autógeno fresco removido da crista ilíaca. Foi relatado após três meses completa reparação óssea do defeito e remodelamento local, evidenciado pela modificação estrutural do enxerto para morfologia similar ao osso mandibular, assim como diminuição de seu volume. Foi concluído que o enxerto autógeno fresco foi capaz de reparar o defeito ósseo mandibular.

LUZ *et al.* (1999) estudaram a reparação de defeito ósseo não reparável espontaneamente mandibular em ratos tratados com osso bovino inorgânico bovino com aglutinante dextrana. Os animais foram sacrificados após um, sete, 14, 30 e 90 dias, sendo o material removido e submetido a exame histológico. Foi verificada a contínua reabsorção do material, sem osteocondução ou osteoindução e formação de reação tipo corpo estranho ao redor do material, que permaneceu no defeito após 90 dias. A dextrana não modificou a resposta tecidual. Os autores sugeriram que a dextrana possa ser utilizada como aglutinante biocompatível.

NAGAI *et al.* (1999) estudaram como a idade pode afetar a osteoindução ectópica pela BMP purificada em ratos. Foram utilizados ratos com quatro semanas, 10 meses e 18 meses de idade, recebendo 2mg de BMP associado a atelocolágeno tipo I. A quantidade de osso formado foi verificada por meio de histomorfometria, revelando maior formação óssea no grupo mais novo. A atividade de fosfatase alcalina foi examinada, mostrando maior intensidade nos grupos com quatro semanas e 10 meses de idade. Imunoistoquímica para colágeno tipo IV, reconhecida proteína da membrana basal de vasos, mostrou maior quantidade de vasos no grupo mais novo que nos outros dois. O estudo revelou que a formação óssea reduziu com a idade, sugerindo os autores que este fato possa estar ligado com a redução do suprimento sanguíneo.

2.2 - REVISÃO DA DENSITOMETRIA

BODNER *et al.* (1993) estudaram os efeitos da xerostomia sobre a reparação óssea após extração dental em ratos, através da densitometria. Os animais foram submetidos à sialoadenectomia da glândula submandibular e sublingual e ligadura do ducto salivar da parótida. Como grupo controle foram utilizados ratos sem xerostomia. O primeiro molar inferior esquerdo foi extraído e os animais sacrificados após zero, 14, 21, 28, 45 e 60 dias da extração dental. A mandíbula foi removida, radiografada juntamente com uma escala de alumínio e revelada em processadora automática. A película radiográfica foi examinada em aparelho digital para densitometria, relacionando a área de interesse com a escala de alumínio. Os ratos com xerostomia mostraram densidade óptica menor em relação ao controle na área mais cervical do alvéolo entre 21 e 60 dias, enquanto a apical não mostrou diferenças estatisticamente significativas. Os autores concluíram que a xerostomia causa atraso na reparação do alvéolo dental e que o exame de densitometria é confiável e útil para acompanhar a formação óssea e mineralização com radiografias de rotina.

FEIFEL *et al.* (1994) realizaram a medição da densidade óssea da mandíbula após enxerto de crista ilíaca em pacientes submetidos a mandibulectomia, através de tomografia computadorizada quantitativa. Os autores citaram que os tecidos moles ao redor do osso a ser analisado podem interferir na densidade óssea quando se usa exame radiográfico convencional. O enxerto vascularizado não mostrou mudanças na densidade óssea e o não vascularizado revelou aumento da densidade óssea, em comparação com a crista ilíaca intacta. Os autores sugeriram que ocorreu esclerose óssea reativa no enxerto, explicando o aumento na densidade óssea no enxerto não vascularizado.

BRESIN *et al.* (1999) analisaram a influência da função mastigatória na estrutura óssea mandibular em ratos. Dieta mole ou dura foi oferecida aos ratos em período de crescimento por quatro semanas, sendo os animais sacrificados e a mandíbula seccionada em diferentes regiões. Cada região foi radiografada juntamente com uma escala de alumínio, sendo a imagem digitalizada e com auxílio de um programa de computador as análises de densidade e massa óssea foram realizadas. Os resultados indicaram diminuição da densidade na região do primeiro molar e do ramo mandibular. Os autores sugeriram que a função mastigatória é um fator determinante na densidade óssea.

SOUTHARD *et al.* (2000) estudaram o relacionamento entre a densidade do processo alveolar da maxila e mandíbula e outros ossos do esqueleto em pacientes do sexo feminino com idade variando de 20 a 78 anos. O exame do osso rádio, pélvico e de vértebras lombares 1 a 4 foi realizada com aparelho de densitometria e os resultados comparados com a densidade do processo alveolar obtido por meio de radiografia dental com uma escala de alumínio. Os resultados mostraram que as densidades do processo alveolar da maxila e mandíbula diminuíram com a idade e são significativamente relacionados com a densidade óssea do rádio, íliaco e vértebras lombares.

2.3 - REVISÃO DOS ENXERTOS AUTOCLAVADO E AUTÓGENO

WANGERIN *et al.* (1986) estudaram o uso de osso autógeno autoclavado removido da costela de cães e implantado de forma ortotópica, ou seja, no mesmo lugar. Tanto no grupo controle, com enxerto autógeno fresco, quanto no experimental houve integração com o leito receptor, porém com tempo mais prolongado para o grupo autoclavado. O enxerto autoclavado foi circundado por neoformação óssea originada no periósteo, concomitante com reabsorção. Após um ano houve completo remodelamento do osso. Os autores concluíram que o processo de autoclavagem não altera a resposta imunológica do organismo ao enxerto e que o enxerto é completamente incorporado ao leito receptor.

INOKUCHI *et al.* (1991) estudaram o comportamento biológico de replante imediato de osso após desmineralização superficial com ácido clorídrico e aquecimento a 65°C ou 100°C por 30 a 120 minutos. O enxerto foi removido da tíbia de coelho, sendo tratado e reimplantado em tecido muscular do abdômen de coelhos, que foram sacrificados com quatro ou seis semanas após a cirurgia. Além deste enfoque em osteoindução, o trabalho abordou a viabilidade de células tumorais quando expostas ao calor. Foram testadas células de cultura de linhagem de carcinoma e tecidos removidos de carcinoma implantado em dorso de coelho. A exposição destes dois tipos celulares ao calor de 65°C por 30 minutos ou 100°C por 10 minutos foi suficiente para torná-los inviáveis. Os enxertos mostraram capacidade osteoindutora nos enxertos expostos a 65°C de 30 a 120 minutos, com descrição de formação óssea ao redor do enxerto e dentro do espaço medular, reabsorção do enxerto e aparecimento de tecido hematopoético. Esta capacidade não foi

encontrada no enxerto exposto a 100°C por 10 minutos, cujo estudo histológico mostrou invasão do espaço medular por tecido fibroso, reação inflamatória crônica tipo corpo estranho e poucos sinais de reabsorção. Segundo os autores a desmineralização superficial tem a capacidade de facilitar a saída da BMP da matriz óssea e induzir células mesenquimais no tecido muscular, resultando em melhora da osteogênese. Os autores concluíram que o tratamento a 65°C de 30 a 120 minutos resulta em completa desvitalização de células tumorais e ainda preserva as propriedades osteoindutoras do enxerto alógeno no coelho.

LAURITZEN *et al.* (1991) relataram 13 casos de pacientes submetidos à ressecção de lesões ósseas na região de crânio e face. O enxerto utilizado foi o próprio bloco ósseo removido e autoclavado a 120°C por 20 minutos. Os pacientes foram acompanhados por no mínimo um ano, quando foi realizada biópsia do local para verificação de recorrência. Foi descrito que o osso autoclavado estava desvitalizado e sendo substituído por osso normal. Os autores citaram que a fixação foi um importante fator na incorporação do enxerto e que todos os casos evoluíram bem, concluindo que esta modalidade de tratamento é indicada para reconstrução óssea no esqueleto do crânio e face.

CHEN *et al.* (1994) estudaram a indicação e seleção de sítios doadores de enxerto ósseo para reconstrução de grandes defeitos mandibulares em 55 pacientes. As indicações para usar enxerto vascularizado foram osteoradionecrose ou irradiação do leito receptor, reconstrução de hemi-mandíbula ou de defeitos maiores, defeito segmentar extenso especialmente através da sínfise, defeitos que necessitaram de enxerto composto com pele ou mucosa e incapacidade de imobilização da reconstrução. A seleção do sítio doador deve ser de acordo com o tamanho do defeito, tipo do defeito, tipo de retalho planejado, irradiação prévia do leito receptor, quais vasos a serem utilizados, qual retalho tem vaso de comprimento apropriado, cor e textura da pele do sítio doador, osteotomias requeridas para dar curvatura similar à da mandíbula, rapidez na união óssea e possibilidade de uso de implantes. Os autores citaram utilizar três fontes de enxerto vascularizado: o ilíaco, a fíbula e a escápula, sendo o osso ilíaco sempre indicado como a primeira opção, por apresentar boa qualidade óssea e amplo retalho de pele e tecido mole.

BORCHERS *et al.* (1995) estudaram os efeitos do tratamento térmico sobre as propriedades mecânicas de osso trabecular bovino. Os blocos ósseos foram submetidos a ciclo de autoclavagem ou congelado a -70°C. O processo de autoclavagem provocou a diminuição de sua resistência mecânica à compressão em cerca de 58%. Os autores relataram que este processo foi capaz de denaturar as proteínas, mas deve ser evitado em osso trabecular, pois causa danos à sua integridade estrutural.

BEIRNE *et al.* (1996) avaliaram retrospectivamente as complicações associadas à remoção de enxerto ósseo da parte anterior da crista ilíaca para correção de fenda palatina e alveolar. Foram analisados 137 pacientes, submetidos a 154 procedimentos de remoção de enxerto, com mínimo de um ano de evolução. As complicações relatadas foram dor pós-operatória, dificuldade de deambulação, parestesia do nervo cutâneo lateral da coxa, infecção, deformidade no contorno da crista e sensibilidade do osso e pele. No entanto, estas complicações tenderam à resolução, em curto espaço de tempo. Os autores concluíram que a crista ilíaca pode fornecer quantidade adequada de osso para a correção do defeito, com baixa incidência de complicações no sítio doador.

KALK *et al.* (1996) avaliaram retrospectivamente as complicações associadas à remoção de enxerto ósseo da crista ilíaca para reconstrução de defeitos maxilo-faciais em 65 pacientes. Foi verificada boa aceitação do procedimento pelos pacientes e baixo índice de complicações, concluindo os autores que o osso ilíaco é um local adequado para remoção de enxerto com finalidade de reconstrução óssea da região maxilo-facial.

ASADA *et al.* (1997) publicaram estudo prospectivo de 23 casos de enxerto autoclavados a 135°C por 10 minutos e utilizados no tratamento de tumores ósseos na tentativa de evitar a amputação de membros, por uma média de 48 meses de acompanhamento. Em 15 casos foram utilizados enxertos autoclavados autógenos e em sete enxertos autoclavados removidos de cadáver e em um caso combinação dos dois. Os enxertos foram fixados por próteses, placas ou pinos intramedulares, além disso osso trabecular autógeno macerado foi colocado na junção do enxerto com o leito receptor. Após uma média de 11 meses foi notada através de radiografia a incorporação dos enxertos, no entanto quatro pacientes morreram de metástases e três manifestaram recorrência local. Nestes casos a recorrência não estava associada com o enxerto, segundo os autores. Foi

relatado que nove pacientes tiveram complicações no tratamento como infecção, fratura, reabsorção e mobilidade da prótese, enquanto dois tiveram avaliação razoável e 12 pacientes com avaliação boa ou excelente. Os autores sugeriram que a incorporação do enxerto na junção de leito receptor foi resultado da ação do perióstio e que a osteoindução foi perdida pelo processo de autoclavagem, embora a osteocondução tenha sido mantida. Os autores concluíram que, a despeito das complicações, esta opção de terapia foi uma opção viável para reconstrução de grandes defeitos ósseos.

POGREL *et al.* (1997) compararam enxertos ósseos vascularizados ou não na reconstrução de defeitos segmentais da mandíbula. Foram realizados 68 enxertos, sendo 39 vascularizados e 29 não vascularizados. Dos enxertos vascularizados, 38 foram removidos da fíbula e um da crista ilíaca e dos não vascularizados, 26 da crista ilíaca e três da costela. Ocorreram dois casos de falha nos enxertos vascularizados e sete nos não vascularizados. Os autores relataram que o tamanho do defeito a ser restaurado está relacionado como fator de sucesso ou não dos enxertos não vascularizados, citando o tamanho de nove centímetros como limite para seu uso seguro. Os defeitos maiores seriam mais bem tratados com enxertos vascularizados, sendo esta ainda a primeira opção em locais com irradiação prévia.

SCHRATT & SPYRA (1997) estudaram a incorporação e imunogenicidade de enxertos ortotópicos autoclavado, irradiado ou congelado na tíbia de rato. Foi relatado após 12 semanas que o enxerto autoclavado não estava incorporado, mas somente ligado à margem por meio de calo ósseo. Os enxertos congelado e irradiado sofreram incorporação parcial, porém ao se avaliar a capacidade de gerar resposta imunológica, o grupo autoclavado foi o único a não induzir antigenicidade. Os autores sugeriram que para haver incorporação do enxerto algum grau de antigenicidade pode ser necessário.

BOHM *et al.* (1998) realizaram estudo prospectivo acompanhando por uma média de 66 meses nove pacientes com tumores musculoesqueléticos de membros e pélvico tratados com ressecção óssea e reimplante após autoclavagem. Oito dos nove pacientes estavam bem e sem recidiva, com avaliação do enxerto sendo boa ou excelente. Um paciente morreu de recorrência sistêmica, embora no local do enxerto não houvesse recidiva e um paciente apresentou infecção após radioterapia. Os autores concluíram que o

tratamento com autoclavagem e reimplante usados para evitar a perda de membros tem poucas complicações e resultados funcionais bons.

STELLINGSMA *et al.* (1998) relataram dez casos de reconstrução da mandíbula edêntula extremamente reabsorvida através da remoção da parte superior do osso mandibular e reposicionamento sobre enxerto ósseo removido da crista ilíaca e fixação com implantes dentais endósseos de titânio. Depois de um período médio de 31 meses as condições do enxerto e implantes foram analisadas, assim como a satisfação dos pacientes. Os autores relataram que o método foi adequado para reconstrução da mandíbula e confecção de prótese total inferior sobre implantes e que os pacientes estavam satisfeitos com o tratamento realizado. A morbidade do sítio doador foi baixa em longo prazo, sendo o ilíaco fonte de material suficiente para aumento da altura da mandíbula.

ZELLIN *et al.* (1998) estudaram a integração de enxerto ortotópico autoclavado em defeito ósseo não reparável espontaneamente no osso parietal de ratos suplementado com fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 (FGF-2), descrito como capaz de promover proliferação vascular e formação óssea, estando normalmente presente na matriz óssea. O grupo controle foi tratado com enxerto autoclavado ou autógeno fresco removido do osso ilíaco. Os resultados foram avaliados após quatro ou 12 semanas por radiografia e descrição histológica. Com quatro semanas foi notada zona radiolucida ao redor dos enxertos nos três grupos e preenchimento parcial da cavidade sem diferenças significativas, com exceção do grupo autógeno, que mostrou tecido ósseo sobre todo o defeito. A formação óssea pareceu ser derivada das margens do defeito. O grupo autógeno mostrou maior incorporação na imagem radiográfica após 12 semanas, seguido pelo tratado com enxerto autoclavado e FGF-2. Foi descrito histologicamente que o grupo autógeno mostrou maior integração com o osso neoformado pelo leito receptor, seguido pelo grupo tratado com enxerto autoclavado e FGF-2. Na superfície externa dos enxertos autoclavados foi notada reabsorção óssea, ao passo que no enxerto autógeno foi encontrada neoformação óssea derivada do perióstio. Os autores relataram bons resultados nesta modalidade de correção de defeitos e que a incorporação do enxerto autoclavado pode ser melhorada com uso de FGF-2, diminuindo o período necessário para sua revitalização.

LIM *et al.* (2002) relataram caso clínico de reconstrução orbital através de reimplante ortotópico imediato de bloco ósseo autoclavado em paciente com tumor envolvendo estrutura óssea. Os autores relataram aparecimento de traços de fratura após a autoclavagem, porém sem prejudicar a estabilidade do enxerto, realizada com fixação interna rígida. Foi concluído que a autoclavagem e reimplante de blocos removidos durante tratamento cirúrgico de tumores ósseos foi uma estratégia simples e rápida para reconstruir a anatomia orbital.

2.4 - REVISÃO DA BMP

SASANO *et al.* (1996) demonstraram em implantação ectópica de BMP purificada que a participação do material carreador pode interferir no tipo de ossificação promovida. Ao utilizar matriz fibrosa de colágeno foi descrita a ausência de tecido cartilaginoso, ao passo que a utilização de membrana de fibra de vidro induziu a formação óssea com participação de tecido cartilaginoso, que estava ausente após cinco semanas de avaliação.

BOYNE (1996) estudou o efeito da BMP-2rh na reconstrução de defeito ósseo não reparável espontaneamente na mandíbula de macacos Rhesus. Os defeitos simularam hemimandibulectomia e os cotos foram fixados com tela de titânio. O defeito foi preenchido com esponja reabsorvível de colágeno com altas doses de BMP-2rh, 0,8µg/ml de enxerto ou baixas doses, 0,2 µg/ml de enxerto, sendo os animais sacrificados após cinco meses. O autor relatou que os resultados clínicos foram excelentes para os dois grupos, sendo notada a formação de crista alveolar palpável na borda superior da área reconstruída após cinco semanas com doses altas e seis semanas no grupo tratado com doses baixas. Histologicamente foi notada a formação de osso lamelar cortical e esponjoso. A camada cortical foi mais espessa no grupo tratado com doses altas de BMP-2rh, já o osso trabecular não mostrou diferenças entre os dois grupos. A tela de titânio mostrou integração com o osso neoformado na região do defeito. O autor concluiu que defeitos deste tipo podem ser reparados com BMP-2rh sem necessidade de enxertos ósseos, destacando o grande potencial osteoindutor da BMP-2rh.

YASZEMSKI *et al.* (1996) em revisão bibliográfica relataram que o enxerto autógeno ainda é a melhor opção na tentativa de corrigir defeitos ósseos e devolver a

integridade mecânica ao esqueleto. O processo biológico que começa com o transplante é seguido de neoformação óssea, reabsorção do enxerto e remodelamento. O objetivo do enxerto seria também prover resistência temporária induzindo ou permitindo a formação óssea, que então otimizaria as propriedades funcionais ósseas no local do enxerto. Os autores citam que mesmo se parte do enxerto permanecer viável, não irá contribuir plenamente para a reparação funcional do osso, devendo ser removido para dar espaço a tecido ósseo adaptado às condições do local. Os enxertos de osso trabecular autógeno geralmente sofrem contínua reabsorção até desaparecer e ao mesmo tempo que osteoindução. Os enxertos de osso cortical geralmente se envolvem inicialmente em atividade de reabsorção, apresentando neoformação óssea mais tardia em relação ao enxerto trabecular. A reabsorção da cortical é mais lenta, sendo realizada através de osteoclastos invadindo os canais de Havers e formando lacunas que são ocupadas em seguida por vasos sanguíneos e osteoblastos. Remanescentes do enxerto cortical podem permanecer inviáveis e mesclados com o osso neoformado. Isto seria um fator negativo, pois diminuiria a resistência local. Os autores citaram ainda que os materiais para enxerto devem ser testados primeiramente em primatas não-humanos antes de sua utilização em humanos, pois seu esqueleto se assemelha ao dos humanos.

RIPAMONTI & REDDI (1997) realizaram revisão sobre o uso de BMP para regeneração de tecidos periodontais. Citaram que para resgatar a capacidade osteoindutora da BMP seria necessário sua ligação com material carreador, como o colágeno. Para haver formação óssea seria necessário um sinal osteoindutor, gerado pela BMP, um substrato adequado, no qual a BMP seja liberada ao meio e outro material osteocondutor e finalmente células alvo no leito receptor para desempenhar as funções biológicas. Os autores sugeriram ainda a utilização de BMP produzida por tecnologia recombinante ao invés de BMP purificada de ossos de mamíferos, pois sua eficácia e segurança não são ainda conhecidas. Os autores relataram que o grande desafio do uso de BMP continua sendo a formulação de um sistema carreador adequado à atividade terapêutica desejada.

VILJANEN *et al.* (1996) estudaram a capacidade osteoindutora da BMP extraída de osso de alce em defeito de 2,2cm de diâmetro na calota craniana de ovelhas adultas. Um montante de 52mg de BMP foi implantado juntamente com 13mg de colágeno IV. Um

segundo grupo experimental foi tratado com medula óssea fresca obtida da tíbia e o grupo controle tratado com somente com colágeno. Após 16 semanas os animais foram sacrificados, sendo obtidas radiografias para quantificação do preenchimento do defeito, por análise computadorizada do preenchimento do defeito e lâminas para avaliação histológica. A percentagem de reparação foi maior no grupo da BMP, 93,18%, seguida pela medula óssea, 33,17% e por fim o grupo controle, com 31,32%. Foi ainda feita a titulação de anticorpos anti-BMP de alce após zero, três, seis e 12 semanas depois da cirurgia. Houve aumento da titulação de IgG no grupo da BMP após três semanas, com retorno aos níveis iniciais em seis semanas. Foi demonstrada a capacidade osteoindutora da BMP xenógena assim como sua baixa imunogenicidade. Os autores relataram que o colágeno IV foi confiável como sistema carreador da BMP.

SI *et al.* (1997) estudaram a expressão de BMP-2 e TGF- β 1 com a técnica de hibridização *in situ* durante a reparação de fratura experimental de mandíbula em coelhos, para determinar a interação destes fatores de crescimento na regulação da proliferação celular. Os animais foram sacrificados após um, três, cinco, sete, 11, 14, 21 e 28 dias após a fratura. Houve formação de hematoma, com posterior organização e substituição por tecido de granulação. No quinto dia houve agregação e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, com sinais de BMP-2. Após a formação do calo ósseo, com presença de cartilagem ligando os dois cotos, o sinal de BMP-2 diminuiu e o de TGF- β 1 foi evidente nos osteoblastos diferenciados e nas áreas de cartilagem. Após a união óssea, ambos sinais estavam fracos. Os autores concluíram que a BMP-2 e o TGF- β 1 participam da regulação da reparação da fratura, estando o primeiro relacionado com a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e condrócitos e o segundo com a ativação da proliferação celular e síntese de proteínas ligadas à reparação da fratura.

ZELLIN & LINDE (1997) estudaram a importância de sistemas de liberação de BMP-2rh em defeitos não reparáveis espontaneamente em mandíbula de rato, protegidos por membrana para reparação guiada. Os sistemas de liberação foram esponjas de colágeno ou mistura de copolímero de ácido poliglicólico e ácido polilático com sangue, sendo incorporados a 1 ou 8 μ g de BMP-2rh. Os animais foram sacrificados e as mandíbulas radiografadas para acompanhar a reparação óssea. A melhor resposta foi obtida com BMP-

2rh sem membrana. As duas concentrações de BMP-2rh e os dois carreadores não mostraram diferenças significativas no reparo do defeito mandibular. Os defeitos, quando protegidos por membrana, mostraram diminuição do efeito osteogênico da BMP-2rh, registrando diferenças significativas quando comparados ao grupo tratado com BMP-2rh sem membrana. A técnica de reparação guiada por membrana preencheu a menor proporção do defeito com tecido ósseo. O sistema carreador de BMP-2rh a mostrar a melhor média de ligação óssea foi a mistura de copolímero de ácido poliglicólico e polilático com sangue. Os autores citaram, a despeito dos resultados, que as membranas podem ajudar os efeitos indutores da BMP-2rh mantendo a material osteoindutor no local onde deve exercer sua função e dando contorno anatômico para o osso formado.

BOSTROM (1998) em revisão sobre a expressão da BMP na reparação de fraturas citou que ocorre recapitulação do desenvolvimento ósseo embrionário normal, incluindo migração de células mesenquimais, condensação, proliferação e diferenciação para células osteogênicas. Esta resposta ocorre como uma seqüência contínua de eventos celulares, começando com trauma e dano tecidual, formação de tecido de granulação, tecido ósseo e remodelação. Embora estes estágios estejam bem descritos histologicamente, os aspectos bioquímicos e regulatórios permanecem incertos. É suposto que envolva interação complexa de reguladores autócrinos, parácrinos e endócrinos, tais como fatores de crescimento e diferenciação, hormônios, citocinas e componentes da matriz extracelular. Na ossificação intramembranosa áreas positivas para BMP são vistas imediatamente após a fratura, na camada celular do periosteio, aumentando em número à medida que a reação periosteal promove proliferação celular. Com o início da formação óssea imatura é descrita intensa presença de BMP nos osteoblastos. Após a substituição do osso imaturo por lamelar foi descrita diminuição da expressão de BMP. À medida que o tecido ósseo se torna mais maduro, ocorre apoptose dos tipos celulares não mais necessários, deixando o local com menor número de células e diminuindo a expressão de BMP. A imunolocalização de BMP mostrou positividade principalmente em citoplasma de osteoblastos, mas foi encontrada também na matriz osteóide e na face interna do periosteio próxima a osteoblastos em atividade. Na ossificação endocondral há expressão de BMP em poucas células mesenquimais indiferenciadas no hematoma e após a organização do coágulo, com

migração e proliferação celular no local da fratura maior número de células se tornaram positivas. As células precursoras de tecido cartilaginoso mostraram intensa coloração positiva, enquanto condrócitos hipertróficos e maduros expressaram menos BMP. Durante a ossificação, à medida que o tecido cartilaginoso foi substituído por tecido ósseo, houve diminuição gradativa da marcação da BMP. De forma geral, a expressão de BMP foi mais evidente em células indiferenciadas e diminuiu com a maturidade do tecido em formação, endocondral ou intramembranoso. O exame de hibridização *in situ* em fratura de costela em camundongo revelou presença de BMP em células semelhantes a fibroblastos no tecido muscular próximo ao local da fratura, células osteoprogenitoras menos diferenciadas no perióstio e dentro do espaço medular, mas não por osteoblastos diferenciados. Os receptores de BMP tipo I e II estariam presentes em células do perióstio, aumentando bastante quando o osso é fraturado. Células semelhantes a fibroblastos também expressaram receptores para BMP. Os autores encerram a revisão citando que a BMP parece ter uma participação importante no início da ossificação intramembranosa e estar envolvido na diferenciação de células mesenquimais e na reparação de fratura.

CARTER *et al.* (1998) realizaram revisão sobre as influências mecânicas sobre a diferenciação de células mesenquimais durante a fase inicial de reparação óssea. Os autores relataram que a proliferação e diferenciação são afetados fortemente pelo meio mecânico do tecido em regeneração. Mobilidade nos cotos da fratura e pressão local levam à formação de calo ósseo maior. No tecido ósseo em reparação a formação óssea intramembranosa é favorecida em áreas de pouca pressão e sem movimento. Já áreas pobremente vascularizadas e sob compressão hidrostática seriam estimuladas à reparação com formação de tecido cartilaginoso. Alta tensão seria um estímulo à produção de tecido fibroso, enquanto forças de tensão superpostas à de compressão hidrostática seria um estímulo ao desenvolvimento de fibrocartilagem.

HOLLINGER *et al.* (1998) estudaram o emprego de 35µg de BMP-2rh associada a colágeno tipo I para reparação de defeito não reparável espontaneamente segmentar de dois centímetros de extensão no osso rádio de coelho. O grupo controle foi submetido a enxerto autógeno ortotópico, sendo os animais sacrificados após quatro e oito semanas. Duas semanas após a cirurgia foi realizada tomada radiográfica para comparação com a do tempo

final. A imagem radiográfica foi digitalizada e submetida a exame para determinação da área radiopaca. O exame radiográfico mostrou união óssea com formação de calo no grupo controle, enquanto o grupo tratado com BMP-2rh mostrou grande formação radiopaca no tempo de duas e quatro semanas que voltou aos contornos normais no período de oito semanas. O estudo computadorizado mostrou semelhança entre os dois grupos. Os autores concluíram que a BMP-2rh pode substituir o enxerto autógeno em correção de defeito segmentar.

EINHORN (1998) realizou revisão sobre a reparação de fraturas ósseas. Foi citado que cerca de 6,2 milhões de indivíduos sofrem fraturas por ano nos Estados Unidos da América e a despeito dos avanços no seu tratamento, parte das fraturas irão reparar incompletamente ou levar um tempo muito longo para reparar. A reparação da fratura pode ser vista como uma série de respostas celulares distintas sob controle específico de vias de sinalização intercelular. Foi descrito que áreas de alta celularidade na fratura podem conter células endoteliais e mesenquimais que expressam fenótipo osteoblástico. Evidências sugerem que a função do hematoma é ser uma fonte de moléculas de sinalização que tenham a capacidade de iniciar a seqüência de eventos críticos para a reparação óssea. O perióstio é considerado uma fonte de células osteoblásticas, podendo ser visto em alta atividade osteogênica intramembranosa após uma semana de fratura. Sua reação pode ser estimulada pela mobilidade dos cotos e diminuída pela fixação rígida. Esta atividade parece diminuir consideravelmente após duas semanas. A formação de tecido cartilaginoso pode ser vista após uma semana e a localização dos primeiros condrócitos é adjacente à cortical óssea, sugerindo que eles possam ter origem em células derivadas do perióstio. Ao sofrer calcificação, a matriz cartilaginosa é alvo de invasão vascular, trazendo células perivasculares que aparentemente se diferenciam em osteoblastos. Uma vez alcançada a união óssea, a neoformação parece diminuir, estando os eventos celulares engajados na atividade de remodelação. A osteopontina, uma proteína de adesão da MEC pode ser detectada em osteócitos e células osteoprogenitoras e osteoclastos, no entanto parece não ser expressa em osteoblastos altamente ativos. A remoção de células durante e após a reparação parece envolver a morte celular programada, visto não ser notada áreas de necrose ou transdiferenciação celular. O número de células envolvidas na reparação

diminui consideravelmente com o início da remodelação. O entendimento dos eventos biológicos que governam a reparação óssea é importante para o avanço das técnicas de tratamento de fraturas.

KAPLAN & SHORE (1998) estudaram os erros biológicos e potencial farmacológico de genes envolvidos na esquelotogênese, através de revisão bibliográfica da fibrodissplasia ossificante progressiva (FOP). Nesta doença autossômica dominante rara, há formação óssea heterotópica progressiva após o nascimento, sobretudo em locais de trauma. Por ser capaz de induzir a formação de osso ectópico as BMPs e genes associados têm sido consideradas como potenciais participantes na etiologia da FOP. A expressão aumentada do gene BMP-4 em embrião de galinha foi acompanhada de osteogênese ectópica, reforçando a idéia da participação da BMP na FOP. Como a meia vida da BMP é curta, foi proposto que na FOP poderia ocorrer sua produção no local afetado por células mesenquimais e posterior ligação com colágeno tipo IV, resultando em maior gradiente de concentração. Além disso, exames laboratoriais demonstraram a presença em altas concentrações de BMP-4 em pacientes com FOP. Com base nestes fatos, os autores relataram necessidade de mais pesquisas das vias de sinalização das BMPs, que poderia levar a um tratamento efetivo para a FOP. Atualmente várias situações clínicas têm sido tratadas com BMP, por exemplo no auxílio da fusão da coluna vertebral, reparação de fraturas, adicionadas a enxertos e implantes, casos de osteoradionecrose e reconstrução facial. Os autores sugeriram que trabalhos com antagonistas de BMP poderiam ser de grande utilidade clínica para pacientes com FOP.

KING *et al.* (1998) estudaram o efeito de dois materiais carreadores de BMP-2rh em defeito periodontal na mandíbula de rato. Foram utilizados 0,5µg de BMP-2rh associados a gel de colágeno tipo I ou a membrana de colágeno tipo I. Os animais foram sacrificados após 10 dias, mostrando na avaliação histológica maior formação de cimento no grupo tratado com membrana, embora a formação óssea pareceu similar nos dois grupos. Os autores relataram necessidade de desenvolver sistema carreador mais adequado para a correção de defeitos periodontais.

REDDI (1998) em revisão sobre participação da BMP na reparação de fraturas relatou que estas proteínas são sinais primordiais no início da reparação. A indução da

reparação óssea segue uma cascata, iniciando com quimiotaxia, proliferação, diferenciação, ativação e apoptose. A quimiotaxia é a migração de células em resposta a um gradiente de concentração de sinais liberados pela matriz óssea nos cotos fraturados. Estes sinais estavam presentes no local, porém só foram liberados com a remoção do conteúdo mineral do osso e exposição da fase orgânica, estando associados principalmente ao colágeno tipo I. A diferenciação de osteoblastos é acompanhada da presença de invasão vascular e a formação óssea marcada pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina, uma enzima especificamente associada à função osteoblástica. O autor cita que a seqüência celular e molecular da cascata de osteoindução é similar na morfogênese do osso, na reparação de fraturas e nos enxertos ósseos. Aparentemente nem a fase solúvel das proteínas da matriz, contendo fatores de crescimento ou o colágeno são potentes osteoindutores quando utilizados sozinhos. A combinação dos dois torna-se osteoindutora. As BMPs ligam-se na matriz óssea ao colágeno tipo I, IV e glicosaminoglicanas. A combinação de BMP com o colágeno tipo IV pode em parte explicar sua participação na angiogênese durante reparação de fraturas. A ação da BMP pode variar segundo sua concentração. Em concentrações baixas há quimiotaxia para monócitos enquanto doses maiores podem levar à mitose. Doses ainda mais elevadas geram diferenciação celular. A célula alvo e o tipo de receptor também têm participação nas diferentes ações biológicas desta proteína. Desta forma a BMP atua em múltiplas funções, sendo considerada reguladora pleotrópica, atuando na quimiotaxia, mitose, diferenciação, ativação de síntese de matriz extracelular, manutenção do fenótipo e apoptose. O autor concluiu que o uso controlado de BMP com carreadores apropriados pode ser útil nas cirurgias ósseas.

WOZNEY & ROSEN (1998) em revisão sobre BMP na formação e reparo ósseo relataram que estas proteínas parecem atuar em três períodos distintos. O primeiro seria nos estágios iniciais da embriogênese direcionando os eixos de desenvolvimento corporal e na especificação dos tipos celulares. O segundo seria na organogênese, onde a BMP induz a formação de estruturas esqueléticas e seus tecidos de suporte em diferentes locais do corpo, assim como diversos outros órgãos. No terceiro período, já no indivíduo adulto, elas ajudam a controlar a reparação óssea, na manutenção e constante remodelamento ósseo encontrado no esqueleto. Defeitos nestes diferentes períodos têm ajudado a entender melhor

a participação da BMP em cada um deles. Embriões “knockout” para o gene BMP-4 morrem com graves defeitos na formação da mesoderme. Durante a organogênese a superexpressão de BMP-2 resulta em mudanças no formato e tamanho dos ossos. A BMP parece fazer parte de uma seqüência de sinais que controlam a ossificação, peptídeos como Shh regulam positivamente a expressão de BMP. Já em adultos a implantação ectópica de BMP-2 induz a formação de tecido ósseo. Para utilização clínica, a BMP deve ser implantada em combinação com um sistema de liberação ou material carreador que ajuda a definir a área na qual se deseja a neoformação óssea. Esta matriz atua ainda na liberação lenta da proteína no local da implantação. Preferencialmente esta matriz deve fornecer um substrato favorável para a infiltração e crescimento celular. Colágeno, derivados da matriz óssea desmineralizada, polímeros sintéticos reabsorvíveis e compostos de fosfato de cálcio têm sido utilizados com sucesso na indução óssea com BMP. Em estudos experimentais o osso neoformado parece estar integrado com o osso do leito receptor, levando a estabilidade funcional e biomecânica, fator importante no sucesso do enxerto. A revisão cita que a BMP possui aplicações potenciais na região maxilofacial em reparo de defeitos ósseos, aumento de volume ósseo, reparação de defeitos periodontais e na colocação de implantes.

FRIESS *et al.* (1999) estudaram o uso de esponjas de colágeno como material carreador para BMP-2rh. A perda de BMP durante sua manipulação no procedimento de implante e efeito potencial de carreador e liberador são importantes fatores para o uso clínico de BMP. Foi relatado que diminuir o pH ou adicionar íons na solução de BMP pode ajudar sua incorporação na esponja de colágeno. Contudo pH muito baixo ou alta concentração de íons podem causar precipitação da proteína. A concentração de BMP que mostrou maior incorporação ao colágeno foi a de 0,75mg/ml de solução. Massa maior de colágeno incorporou melhor a BMP, porém os autores citaram que deve se levar em conta a aplicação clínica do material. Foi demonstrado que repouso de 30 minutos após a aplicação do BMP no colágeno leva à incorporação de 90% da BMP, contra 44% quando utilizada logo após a adição de BMP ao colágeno. A farmacocinética da BMP marcada com isótopo radioativo após implantação ectópica em ratos não mostrou diferenças significativas entre as diversas formulações testadas. Os autores concluíram que embora a BMP possa se ligar

com o colágeno, esta ligação pode ser melhorada com o controle de pH, adição de íons e adequação da relação de massa da esponja de colágeno.

HIGUCHI *et al.* (1999) utilizaram o modelo proposto por KABAN & GLOWACKI (1981) para investigar o potencial reparador de BMP-2rh associada à mistura de copolímero de ácido polilático e poliglicólico com esponja de colágeno. Os animais foram sacrificados após quatro semanas. Os autores relataram presença de infecção em dois dos oito animais. O preenchimento total do defeito foi alcançado em somente quatro animais, estando o restante dos animais com o defeito parcialmente reparado. O estudo histológico mostrou grande quantidade de osso no leito receptor, formando trabéculas, com tecido hematopoético em seu espaço medular. Não houve evidência de tecido cartilaginoso e resíduos do material carreador foram encontrados em meio aos tecidos envolvidos na reparação. Os autores sugeriram que este modelo é confiável para o estudo da reparação óssea.

OKUBO *et al.* (1999) realizaram estudo comparativo de capacidade osteoindutora da BMP-2rh em leito ósseo e ectopicamente no músculo de rato. Foi utilizado material carreador de colágeno com 5µg de BMP-2rh implantado no músculo da perna ou em defeito ósseo mandibular não reparável espontaneamente. Os animais foram sacrificados após 21 dias, sendo a peça removida e submetida a avaliação histológica e bioquímica para atividade de fosfatase alcalina. Foi relatada a formação de trabéculas ósseas delineadas por osteoblastos no grupo intramuscular e ausência de osteoclastos. Tecido hematopoético com adipócitos e vasos linfáticos também foram relatados. No grupo do implante mandibular, a quantidade de osso neoformado pareceu maior, com aspecto mais maduro. A expressão de fosfatase alcalina foi maior neste grupo. Os autores sugeriram que a BMP-2rh encontrou ambiente mais propício à indução óssea no tecido esquelético.

KHAN *et al.* (2000) em revisão destacaram que dois mecanismos têm sido sugeridos como reguladores da reabsorção e formação óssea, hormônios como paratormônio (PTH) e calcitonina e fatores de crescimento locais encontrados na matriz óssea, incluindo BMP, TGF-β, IGF I e II, PDGF, aFGF e bFGF. Estes fatores atuam de forma autócrina e parácrina sobre osteoblastos e osteoclastos, afetando a proliferação celular, atividade anabólica e catabólica. Este rede de controle é utilizada na homeostasia

óssea e também nos processos patológicos. Fatores de crescimento são descritos como polipeptídeos específicos do tecido que regulam a atividade celular. Dentre estes fatores de crescimento a BMP tem chamado a atenção por sua capacidade de induzir a formação óssea. Descoberta por URIST em meados de 1960 foi clonada com tecnologia recombinante em 1988 por WOZNEY, permitindo a produção de grandes quantidades da proteína. BMP é um peptídeo de baixo peso molecular, pertencendo à superfamília das TGF- β , participando na embriogênese e morfogênese em vários tecidos. Similar a outros membros desta família, a BMP é sintetizada com uma cadeia amino-terminal com 15 a 20 aminoácidos, um domínio com 50 a 350 aminoácidos e um domínio carboxi-terminal com 110 a 140 aminoácidos. Degradação proteolítica deixa a proteína final com aproximadamente 130 aminoácidos. Cada BMP madura ativa é composta por duas cadeias com ligação dissulfeto formando um homodímero ou heterodímero de membros diferentes. Os heterodímeros são mais potentes osteoindutores que os homodímeros. A BMP e outros fatores de crescimento são sintetizados e incorporados na matriz óssea, ligados aos componentes protéicos não solúveis da matriz, como colágenos tipo I e IV ou heparina. Desta forma são estocados e quando o tecido ósseo sofre ação de osteoclastos, liberando o conteúdo mineral, seu potencial biológico é ativado. Este ciclo é utilizado no constante modelamento ósseo presente no esqueleto. Esta característica foi explorada por diversos pesquisadores, ao desmineralizar o osso antes do transplante para facilitar a ativação da BMP.

KIMURA *et al.* (2000) estudaram a eficácia da BMP-2rh expressa em *Escherichia coli* em estimular osteogênese no defeito mandibular não reparável espontaneamente em rato. Os autores citaram que o tipo de células expressando a BMP-2rh pode causar diferenças na sua ação biológica, pois quando produzida por células procariontas, como a *E. coli*, não contam com todo o aparato citoplasmático eucariota para as devidas modificações pós-transcripcionais, podendo haver falhas na molécula final. Foram testadas dois tipos de BMP-2rh, uma produzida por *E. coli* e outra por células de ovário de rato em diferentes quantidades por enxerto, sendo o material carreador colágeno tipo I. Após 24 dias foi mostrado preenchimento quase completo do defeito por tecido ósseo nos dois grupos, porém a dose para obter tal resultado foi de 10 μ g para a BMP-2rh produzida por *E. coli* e

1µg para a produzida por células eucariótica. A colocação de membranas sobre o defeito pode diminuir a quantidade de BMP necessária para reparar o defeito, segundo os autores, ao impedir a proteína de sair do defeito e manter as células do tecido mole afastadas do local. Foi concluído que BMP-2rh produzido em organismo procariota foi osteogênica *in vivo*, podendo ser uma alternativa à BMPrh produzida em células escariotas.

ALAM *et al.* (2001) relataram desenvolvimento de técnica para transformar tecido muscular vascularizado em tecido ósseo. Um molde de silicone com formato negativo da mandíbula foi usado como carreador de 25µg de BMP-2rh, sendo preenchido com tecido muscular vascularizado da coxa e reimplantado por um período de quatro semanas. Foi demonstrada a produção de tecido ósseo a partir do tecido muscular, com a permanência do pedículo vascular. O exame radiográfico mostrou massa radiopaca no formato da mandíbula. Os autores sugeriram que esta técnica pode ser utilizada construção de ossos para enxertos.

HORIUCHI *et al.* (2001) estudaram a melhora da indução óssea pela BMP-2rh implantada ectopicamente através de administração sistêmica de pentoxifilina. Esta droga foi capaz de inibir a atividade da fosfodiesterase, enzima que degrada o AMPc, molécula responsável por transdução de sinais em via intracelular. O implante foi removido após três semanas e a peça removida para exame histológico e radiográfico. A imagem radiográfica foi submetida a medição de área radiopaca, revelando maior área no grupo tratado com pentoxifilina. A avaliação histológica não mostrou diferença entre os dois grupos. Os autores relataram que a pentoxifilina teve efeito anabólico sobre a formação ectópica de osso pela BMP-2rh.

LEE *et al* (2001) realizaram extensa revisão bibliográfica sobre as aplicações biomédicas do colágeno. Os autores consideraram o colágeno como muito útil, pois tem excelente biocompatibilidade, segurança e ser biodegradável. Entre as aplicações do colágeno foram destacadas esponjas para proteção de feridas e queimaduras, barreira de proteção oftálmica, bandas para liberação de drogas via transdérmica, nanopartículas para liberação de genes, matriz para cultura celular, membranas para guiar reparação tecidual e formulações para liberação de proteínas em gel ou sólida. Os autores citaram a associação de BMP com colágeno como excelente para induzir a neoformação óssea, provendo meio

carreador, liberação gradual e ancoragem para células alvo da BMP. A atividade celular pode sofrer modificações com o tipo de colágeno, sendo relatado que o uso de BMP associado à atelocolágeno tipo I foi capaz de induzir formação óssea sem tecido cartilaginoso.

LEVY *et al.* (2001) estudaram a presença de células osteoprogenitoras no tecido esquelético em cultura celular de linhagem muscular isolada do músculo *semitendinosus* e *gracilis* de humanos adultos. A cultura foi mantida por quatro semanas e as células presentes tipadas por meio de imunocitoquímica para presença de células osteoprogenitoras, perícitos e células endoteliais. No início da cultura foi relatada positividade para marcadores de células osteoprogenitoras e perícitos. A atividade de fosfatase alcalina foi presente no início da cultura, mas foi relatado aumento com o decorrer do tempo, enquanto a marcação para células osteoprogenitoras declinou. Foi concluído que o tecido muscular contém células osteoprogenitoras, sugerindo os autores que possivelmente estas células estariam envolvidas na formação ectópica de osso por BMP implantado em tecido muscular e na ossificação muscular presente em pacientes com fibrodisplasia ossificante progressiva e miosite ossificante.

SETO *et al.* (2001) estudaram o uso de BMP-2rh na reparação de segmentação mandibular em primatas não humanos. A BMP-2rh foi associada ao ácido poliglicólico como material carreador e medula óssea de tíbia de primata, sendo o grupo controle o enxerto sem BMP-2rh. Em ambos grupos o defeito segmental foi fixado com tela de titânio. Os animais foram sacrificados após 16 semanas, as peças foram removidas e submetidas a exame macroscópico, radiográfico e histológico. Foi também implantado BMP-2rh associado ao ácido láctico poliglicólico no tecido subcutâneo de rato Wistar para confirmar o potencial osteindutor do material. Os animais foram sacrificados após duas semanas, sendo evidenciada a neoformação óssea através de exame histológico. Nos primatas que receberam BMP-2rh foi notado clinicamente aumento no local do enxerto, fato ausente no grupo controle. Após 16 semanas foi notada união óssea no grupo tratado com BMP-2rh no exame macroscópico e radiográfico, enquanto o leito receptor do controle estava preenchido por tecido fibroso e muscular e sem evidencia radiográfica de formação óssea. A avaliação histológica mostrou que a mistura de BMP-2rh com material carreador e

medula óssea induziu neoformação óssea que alcançou a altura e espessura das corticais do leito receptor enquanto o grupo controle não mostrou formação óssea no leito receptor. O osso neoformado mostrou padrão trabecular irregular, diferindo do padrão mandibular e com superfície cortical irregular, com diversas áreas de reabsorção. A organização lamelar estava presente em poucas áreas do osso neoformado. Os autores sugeriram que houve tempo para maturação do tecido ósseo, pois sua formação foi muito rápida, concluindo que a mistura de BMP-2rh, ácido láctico poliglicólico e medula óssea foi confiável para reconstrução de defeito segmentar neste modelo animal.

SPECTOR *et al.* (2001) estudaram a expressão de BMP durante a reparação do segmentação parcial do ramo mandibular de rato através de imunoistoquímica e hibridização *in situ*. Os animais foram sacrificados de uma a oito semanas para acompanhar a reparação do defeito. As BMP-2, 4 e 7 foram expressas em osteoblastos, osteoclastos e células osteoprogenitoras dentro do calo ósseo nos tempos iniciais. A maior parte da marcação foi intracelular, embora matriz tenha sido positiva para BMP-7 em algumas regiões ao redor de osteoblastos. Estas proteínas também foram expressas nos tempos tardios, porém com menos evidencia. A intensidade da positividade só voltou ao nível basal com o aparecimento de osso lamelar maduro. Osteócitos não exibiram marcação para BMP. Os autores concluíram que as BMPs possuem importante papel na regulação do reparo do osso intramembranoso, citaram ainda que os ossos do crânio devem reparar sem tecido cartilaginoso, pois são de origem intramembranosa.

MARUKAWA *et al.* (2002) avaliaram as propriedades funcionais do osso neoformado por osteoindução com BMP-2rh em defeito segmentar na mandíbula de macaco. Foi realizada remoção de bloco de três centímetros do corpo da mandíbula, sendo o defeito preenchido por 9mg de BMP-2rh associado à esponja de colágeno e copolímero de ácido poliláctico e poliglicólico e fixado com placa e parafusos de titânio. Implantes dentais foram colocados após 20 semanas sobre o local do enxerto, recebendo carga após oito semanas. Exames radiográfico e histológico foram utilizados para acompanhar a evolução do enxerto por 52 semanas. Na semana 10 o local do enxerto foi aberto para remoção das placas, mostrando neoformação óssea abundante e cobrindo as placas. A cortical mandibular estava irregular. O exame histológico de 20 semanas mostrou completa

reparação da mandíbula, com união óssea trabecular densa e falta de corticais. O exame radiográfico mostrou contínuo aumento da radiopacidade até a semana 12, vindo então lenta fase de remodelamento do osso neoformado que pareceu normal no tempo final de 52 semanas. Com 30 semanas o tecido ósseo estava mais maduro e já mostrava formação de corticais e aparecimento de espaço medular preenchido por tecido hematopoético e adipócitos. O implante estava circundado por tecido ósseo e bem adaptado. Os autores relataram que o osso trabecular foi mantido, tendo sofrido mudanças por causa da carga mastigatória que levaram ao aparecimento de corticais e aparência similar ao da mandíbula normal, concluindo que a BMP-2rh pode ser uma alternativa terapêutica aos enxertos autógenos na reconstrução mandibular.

GOUVENDER *et al.* (2003) realizaram um estudo prospectivo multicêntrico para avaliação da BMP-2rh no tratamento de fraturas complicadas de tíbia em humanos. A BMP-2rh foi empregada na tentativa de reduzir a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica. Foram acompanhados por um período médio de 12 meses 450 casos, tratados com 6 ou 12mg do fator de crescimento associado a esponja de colágeno sobre o traço de fratura antes do fechamento da ferida cirúrgica. Os autores relataram que houve redução da necessidade de uma segunda intervenção em 44% quando utilizado BMP-2rh na dose de 12mg em comparação ao grupo controle, concluindo os autores que a BMP-2rh foi segura e melhorou a reparação de fraturas complicadas na tíbia.

JUNG *et al.* (2003) realizaram estudo prospectivo acerca do aumento de volume, densidade e maturação óssea ao redor de implantes dentais com utilização de BMP-2rh e membranas para reparação óssea guiada. O grupo controle não recebeu a BMP-2rh. Após um período médio de acompanhamento de seis meses os defeitos residuais foram medidos e uma biópsia para avaliação da maturidade e densidade óssea por histomorfometria. O tratamento com BMP-2rh mostrou resultados melhores que os do grupo controle, concluindo os autores que a proteína pode melhorar o processo de maturação e aumenta a área de contato do implante com o osso.

NAKAGAWA *et al.* (2003) investigaram as características da matriz óssea condróide e células condrogênicas e osteogênicas durante indução óssea ectópica em ratos com BMP-2rh. Cinco µg de BMP-2rh associada a colágeno I foram implantadas no tecido

muscular e removidos após sete, 10, 14, 21 e 28 dias. Após sete dias foi notada numerosas células semelhantes a fibroblastos infiltrados em fibras colágenas e condrócitos em meio a matriz condróide. Colágeno II e fosfatase alcalina foram identificados nas células semelhantes a fibroblastos. No dia 10, condrócitos hipertróficos estavam presentes na matriz condróide e com 14 dias osteoblastos estavam presentes e em intensa produção de matriz osteóide concomitante à ossificação endocondral. Com 21 dias a ossificação mostrou células hematopoéticas nos espaços centrais do implante. Colágenos tipo I e II foram detectados ao redor de células semelhantes a osteócitos. Com 28 dias uma camada óssea foi formada ao redor do implante, que mostrava reabsorção e espaço medular preenchido com adipócitos. Baseados nos achados deste estudo, os autores sugeriram que as células semelhantes aos fibroblastos que invadiram o implante se diferenciaram em condrócitos e formaram a matriz condróide, e ainda que alguns condrócitos mudaram seu fenótipo, conservando a capacidade de produzir matriz osteóide e colágeno II ao mesmo tempo.

SYKARAS & OPPERMAN (2003) em extensa revisão sobre as BMPs, relataram que a BMP inicia sua sinalização intracelular quando se liga aos receptores transmembrana quinase treonina serina tipo I e II. Estes receptores são também utilizados por outros membros da família TGF- β , possuindo um domínio extracelular curto, uma cadeia transmembrana e um domínio intracelular ativo para treonina serina. O receptor tipo I é primeiro sítio de ligação e com sua ativação ocorre a fosforilação do domínio intracelular e propagação do sinal para seus substratos. O receptor tipo II parece atuar na estabilização e aceleração da ligação no receptor tipo I. Uma seqüência de moléculas chamadas SMADs parecem estar envolvidas no envio do sinal do receptor tipo I para o núcleo, onde o sinal será traduzido para mRNA e subsequente produção de proteínas ligadas á atividade da BMP. Os autores citaram que é difícil a caracterização da população celular que responde a BMP, visto que ela atua sobre diversos tipos celulares, como linhagem osteoblástica, fibroblastos, células mesenquimais do tecido conjuntivo, células musculares, astrogliais e muitos outros. Testes clínicos em humanos têm sido descritos na Europa e Estados Unidos, sendo citados regeneração periodontal, aumento do seio maxilar para colocação de implantes dentais, ao redor de implantes para melhorar o contato com o tecido ósseo e aumento do processo alveolar.

SOUTHWOOD *et al.* (2004) avaliaram um método de auxílio à reparação de fratura infectada em coelhos, utilizando transfecção viral da carga genética da BMP-2. Os autores relataram que o uso de transferência de genes com finalidade terapêutica com adenovírus tem potencial para superar as dificuldades usuais de produção e implantação de proteína recombinante em defeitos ósseos. Além disso citaram a técnica como fácil, barata e que células do organismo transfectado poderiam produzir BMP-2 mais potente que a BMP-2rh. Foi relatada ocorrência de formação rápida e intensa de calo ósseo no grupo tratado com transfecção, porém o grupo controle, tratado com o adenovírus sem a carga genética da BMP-2, mostrou maior ossificação no local da fratura no tempo final de avaliação. Os autores sugeriram que este resultado pode ter sido decorrente do dano tecidual causado pelo agente esclerosante utilizado para facilitar o desenvolvimento da osteomielite, que diminuiu a capacidade de resposta do tecido à BMP-2.

2.5 - REVISÃO DAS PROTEÍNAS INDIAN E SONIC HEDGEHOG

KRONMILLER & NGUYEN (1996) estudaram a distribuição espacial e temporal de Ihh na mandíbula de camundongo em desenvolvimento, através de hibridização *in situ* e RT/PCR (reverse transcriptase/ polimerase chain reaction). Foram utilizados embriões com nove a 14 dias de idade. Ihh estava presente na lâmina dental de regiões de molares e incisivos e nos pêlos do bigode. Embora quase restrita ao epitélio, marcação também foi encontrada no tecido mesenquimal adjacente. A expressão de Ihh foi mais evidente na região mediana. Os autores sugeriram que o Ihh possa estar envolvido na proliferação do epitélio durante a formação da lâmina dental, estando relacionado na linha média com a polarização dos incisivos.

CURRIE (1998) relatou que o gene hedgehog é regulador da segmentação e modelamento embrionário, inicialmente descrito em drosófila, sendo altamente conservado entre espécies, inclusive em humanos. No homem são descritos três membros, a Sonic hedgehog, Indian hedgehog e Desert hedgehog, participando da embriogênese do sistema nervoso central, odontogênese e formação e modelação membros e de ossos de origem endocondral e intramembranosa do esqueleto apendicular e axial. As Hh possuem aproximadamente 45kDa após sua tradução, porém a cadeia é clivada no sítio

autoproteolítico em dois polipeptídeos, ficando um peptídeo N-terminal com 19kDa e o outro com 26kDa. O fragmento N-terminal parece exercer todas as atividades biológicas da Hh, sendo ligado covalentemente a um lipídio, possivelmente colesterol, além de possuir um sítio catalítico com zinco. Essa composição é factível com a sua afinidade pela camada bilipídica das membranas celulares. O Ihh é classicamente expresso durante a ossificação endocondral, em condrócitos na passagem da fase seriada para a hipertrófica, sua ausência nesta fase pode acarretar formação de ossos com defeitos estruturais graves. Células mesenquimais indiferenciadas e células osteoblásticas expressam receptores para proteínas Hh, as quais induzem formação de osso e cartilagem *in vivo*, porém sua ação depende da população de células estudada. Mutações de um receptor do gene Ihh, o Ptc (patched), foi associada com o carcinoma basocelular, tanto em casos isolados quanto da Síndrome do carcinoma basocelular nevíde ou de Gorlin, cujos pacientes são acometidos por múltiplos carcinomas basocelulares, má formações cerebrais e do esqueleto cranial, polidactilia e defeitos esqueléticos, reconhecidas áreas de atuação das proteínas Hh.

IWASAKI *et al.* (1997) avaliaram a expressão de Ihh durante a morfogênese esquelética de camundongos. Ihh foi expresso logo após a condensação celular, juntamente com colágeno tipo II. No dia embrionário 14, onde os elementos ósseos estavam evidentes, colágeno tipo X e Ihh estavam presentes, assim permanecendo até o final da vida fetal. No dia oito pós-natal Ihh estava presente em condrócitos hipertróficos na placa de crescimento. A partir do dia 14 pós-natal o Ihh não foi mais expresso. A detecção de Ihh não pôde ser correlacionada com a atividade da placa de crescimento, pois após a extinção do seu sinal a placa ainda permanece ativa, sugerindo os autores que a partir da puberdade outros fatores como hormônios exerçam efeito regulatório sobre a placa de crescimento.

KINTO *et al.* (1997) investigaram a participação da proteína Shh na diferenciação de osteoblastos e formação óssea ectópica. Foi utilizada cultura celular de fibroblastos e osteoblastos de camundongo após co-cultura de fibroblastos transfectados com retrovírus para inserção de DNAc do domínio N-terminal de Shh. Após seis dias de co-cultura os fibroblastos e osteoblastos de camundongo exibiram aumento marcante de expressão de fosfatase alcalina. Os autores realizaram ainda transplante ectópico de fibroblastos expressando Shh em tecido muscular de camundongo. Após três dias foi notada expressão

de fosfatase alcalina em células próximas ao enxerto e com 14 dias tecido mineralizado. Não foi notada a presença de condrócitos durante a formação de osso ectópico. Neste experimento houve positividade para BMP-2, 4 e 7, sugerindo os autores que a Shh induz a expressão de BMP durante a diferenciação de osteoblastos e formação de osso ectópico.

MURAKAMI *et al.* (1997) estudaram a expressão de Ihh em cultura celular de linhagem osteoblástica. Não foi encontrada presença de RNAm de Ihh com adição de BMP-2, porém a adição de TGF- β 1 causou a expressão de RNAm de Ihh. Os autores concluíram que Ihh pode ser produzido por osteoblastos e que BMP-2 não afetou a expressão de Ihh em cultura celular de osteoblastos, ao passo que TGF- β 1 alterou positivamente sua expressão.

NAKAMURA *et al.* (1997) estudaram a indução de diferenciação osteogênica por proteínas hedgehog em cultura celular de linhagem mesenquimal ou osteoblástica de camundongo. A adição de Ihh e Shh em ambas culturas induziu a produção de fosfatase alcalina, um marcador de atividade osteoblástica. Ao se adicionar BMP-2 juntamente com Shh ou Ihh a atividade da fosfatase foi fortemente aumentada. Os autores citaram que estas duas proteínas possuem correlação temporal e espacial em vários tecidos em desenvolvimento, concluindo que Shh e Ihh poderiam atuar diretamente em células precursoras de osteoblastos e estimular sua diferenciação.

FERGUSON *et al.* (1998) estudaram as vias moleculares na morfogênese esquelética e no reparo ósseo de fratura. A formação de tecido ósseo é contínua ao longo da vida, começando no feto e persistindo na vida adulta. Em muitos aspectos a reparação recapitula os estágios de desenvolvimento ósseo embrionário, com condensação celular, diferenciação para células osteogênicas, formação óssea, remodelamento e apoptose. Uma diferença importante é a falta de inflamação no tecido embrionário. A expressão de mediadores embrionários do osso fraturado mostrou presença de colágeno II no local onde se formará o calo ósseo e Cbfa-1 em células do perióstio. Ihh e BMP-6 não foram expressos neste tempo inicial. Perto de uma semana Cbfa-1, Ihh e BMP-6 foram positivos em condrócitos do calo. Após 10 dias, o tecido cartilaginoso em maturação mostrou positividade para Ihh, BMP-6, Cbfa-1 e colágeno X. Cbfa-1 foi detectado em osteoblastos no osso recém formado. Estes marcadores não foram expressos após quatro semanas, ao final da fase reparadora,

indicando que a reparação óssea e sua formação embrionária compartilham as mesmas vias de mediadores.

HORTON *et al.* (1998) revisaram a participação de genes específicos de condrócitos no controle do desenvolvimento, envelhecimento e morte celular através da apoptose. O gene *Ihh* foi descrito como regulador da apoptose na placa de crescimento, sendo produzido por condrócitos pré-hipertrófico e estimulando células do pericôndrio a produzir a proteína relacionada ao paratormônio (PTHrp), que induz a morte celular programada dos condrócitos, regulando negativamente seu crescimento.

VORTKAMP *et al.* (1998) estudaram a expressão de sinais regulatórios da formação embrionária durante o crescimento pós-natal e reparo de fratura. O gene *Ihh* foi expresso na placa de crescimento nos dias nove e 13 pós-natal assim como seus mediadores PTHrp, *Ptc* e *Gli*. A expressão destes mediadores na reparação da fratura de tíbia em camundongos com seis dias de idade foi avaliada após três, sete, 14 e 21 dias. *Ihh* não foi expresso no terceiro dia. Com sete dias *Ihh* estava presente no calo cartilaginoso, assim como no tempo de 14 dias. Após 21 dias o gene *Ihh* não foi mais encontrado, nem fazia parte do quadro histológico o tecido cartilaginoso.

FERGUSON *et al.* (1999) estudaram comparativamente o processo reparativo da fratura instável de tíbia em camundongo com a formação do esqueleto embrionário. Foram pesquisados os genes que regulam os estágios fundamentais da ossificação endocondral, o *Ihh*, *Cbfa-1*, metaloprotease da matriz 13 (MMP) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Foi relatado que mesmo nos estágios iniciais da fratura os condrócitos expressavam sinais de *Ihh*, *Cbfa-1* e colágeno tipo II. Com a maturação dos condrócitos houve sinal para *Cbfa-1* e *Ihh*, ao passo que *Cbfa-1* foi expresso em células periostais. MMP-13 e VEGF foram presentes em abundância nos condrócitos antes de se submeterem à diferenciação terminal. Estes dados foram semelhantes na embriogênese e no reparo da fratura, sugerindo os autores que os mecanismos genéticos que regulam a esquelotogênese são reutilizados na reparação esquelética.

ITO *et al.* (1999) estudaram a presença de *Ihh* em fraturas de costela de camundongos através de RT/PCR e hibridização *in situ*. Foi relatado presença de RNAm de *Ihh* depois de oito horas da fratura, seguida de sinais de *Ptc*. Os sinais de *Ihh* aumentaram

consideravelmente após 48 horas e puderam ser detectados até o dia 21, em condrócitos vizinhos aos locais de ossificação. A proteína OPN também foi estudada, mostrando padrão de expressão temporal similar ao da Ihh. OPN foi encontrada em células do perióstio que posteriormente se diferenciaram em osteoblastos. A hibridização localizou os sinais de Ihh e Ptc nas células da medula óssea da costela fraturada, sugerindo os autores que Ihh possa atuar nos estágios iniciais da reparação da fratura.

IWAMOTO *et al.* (1999) relataram que as proteínas Hh participam na embriogênese e organogênese esquelética em mamíferos. Inicialmente descrita como gene controlador da polaridade em drosófilas, é altamente conservado em vertebrados. A proteína Ihh é expressa em cartilagem em desenvolvimento e parece ser reguladora da maturação de condrócitos. Sua ação pode variar de acordo com o a célula alvo, por exemplo, ela pode estimular a diferenciação condrogênica de células inativas ou fazer o oposto, inibindo a condrogênese em células do botão embrionário de membros. As expressões de proteína hedgehog e moléculas associadas são vistas em regiões condrogênicas e osteogênicas, sugerindo que elas possam regular a formação de osso e cartilagem. Os autores citaram ainda que a ossificação endocondral e intramembranosa são reguladas por uma complexa rede de fatores de crescimento, citocinas e hormônios, sendo Shh e Ihh apenas membros desta rede. Mais pesquisas são necessárias para desvendar o relacionamento dessas moléculas na esqueletogênese e no adulto.

IWASAKI *et al.* (1999) investigaram a expressão temporal e espacial da Ihh em placa de crescimento de costela de camundongos no período pós-natal através de hibridização *in situ*. Os autores também pesquisaram os efeitos da cadeia N-terminal da proteína Shh sobre a proliferação e diferenciação de condrócitos com três dias e três semanas em cultura celular, além da medição da atividade da BMP e PTH. Foi encontrada expressão do gene Ihh no terceiro dia pós-natal na parte superior da cartilagem hipertrófica da placa de crescimento, contudo estava ausente após três semanas. Na cultura celular de condrócitos removidos da placa de crescimento de camundongos com três dias de vida a adição de N-Shh elicitou aumento da proliferação e diferenciação celular, este achado não se repetiu quando a linhagem celular foi isolada de camundongos com três semanas de idade. Os autores relataram aumento da síntese de DNA e de proteoglicanas com a adição

de BMP e PTH na cultura, sem causar efeito sinérgico com a Shh na diferenciação e proliferação dos condrócitos. Os autores concluíram que o gene *Ihh* atua de forma direta sobre os condrócitos da zona hipertrófica e que a idade do camundongo tem participação importante nesta atuação. Foi também sugerido pelos autores que os efeitos do N-Shh sobre os condrócitos pouco provavelmente sejam mediados pelas proteínas BMP ou PTH.

ZHU *et al.* (1999) estudaram a ação das proteínas Shh e BMP-2 na proliferação e diferenciação em cultura celular da linhagem neural indiferenciada embrionária. O tratamento da cultura com Shh e FGF aumentou a proliferação celular, ao passo que o co-tratamento com Shh e BMP-2 exerceu efeito oposto na proliferação celular. Shh promoveu a diferenciação de linhagem oligodendroglial e neuronal sem mostrar efeitos sobre a linhagem astrogliar, ao passo que BMP-2 inibiu os efeitos do Shh e promoveu a diferenciação da linhagem astrogliar. Estas observações sugeriram que os dois fatores possam exercer efeitos opostos sobre uma via de sinais que regula múltiplos aspectos do desenvolvimento de células indiferenciadas. A natureza da interação entre Shh e BMP-2 parece ser altamente dependente de outros fatores, podendo a Shh induzir a expressão de BMP-2 ou ainda de NOGGIN, um reconhecido inibidor da BMP-2, dependendo do contexto celular. Os autores sugeriram que a interação da Shh e BMP-2 pode ser importante no desenvolvimento do sistema nervoso.

MURAKAMI & NODA (2000) estudaram a expressão de *Ihh* durante a reparação de fratura de fêmur em rato adulto através de imunistoquímica. Foi utilizado anticorpo policlonal dirigido para Shh, que segundo os autores possui reação cruzada para epítopos de *Ihh*. Condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos após uma e duas semanas da fratura expressaram *Ihh*. Após três semanas osteoblastos foram positivos para *Ihh* próximos à área de neoformação. Foi sugerido que *Ihh* possa participar da regulação da formação do osso endocondral na fratura, e que osteoblastos positivos para *Ihh* possam estar regulando a formação de tecido ósseo.

WEINSTEIN & MANOLOGAS (2000) citaram que células mesenquimais precursoras da linhagem osteoblástica são possivelmente levadas a se diferenciar em osteoblastos através da BMP. Secundariamente a BMP estimularia a transcrição do gene *Cbfa-1*, que é capaz de induzir a diferenciação osteoblástica pela ativação de genes

específicos que caracterizam os osteoblastos, tais como OPN, fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, osteocalcina e colágeno tipo I.

GRIMSRUD *et al.* (2001) estudaram a ação biológica da BMP sobre a maturação de condrócitos e a expressão de Ihh em cultura celular de condrócitos transfectados com receptor de BMP. Os condrócitos transfectados aumentaram a expressão de colágeno tipo X, um marcador de condrócitos hiperplásicos e de Ihh. Quando PTHrp, um inibidor de maturação de condrócitos, foi adicionado à cultura, cessou a produção de colágeno tipo X e Ihh em células controle, ao passo que as células transfectadas somente abaixaram o nível de produção de colágeno tipo X. A adição de BMP exógena foi capaz de aumentar novamente a produção de colágeno tipo X e Ihh. Os autores sugeriram que a BMP foi capaz de estimular a maturação de condrócito e aumentar a síntese de Ihh, podendo até mesmo superar parcialmente os efeitos inibitórios da PTHrp.

LE *et al.* (2001) estudaram a expressssão das moléculas hedgehog na reparação de fraturas estabilizadas ou não de tíbia em camundongos através de imunoistoquímica e hibridização *in situ*. Os resultados mostraram que Ihh foi expressa na fratura não estabilizada mais cedo e persistindo por mais tempo que nas fraturas estabilizadas. Os autores relataram que quando há estabilidade na fratura o reparo ocorre mais rapidamente, diminuindo a fase cartilaginosa e desta forma o tempo de expressão de Ihh. Os autores concluíram que a Ihh participaram do processo de reparo da fratura e que o ambiente mecânico afeta sua distribuição ao longo do experimento.

PATHI *et al.* (2001) estudaram a resposta biológica de diferentes células, tecidos e concentrações frente às proteínas Sonic, Desert e Indian Hedgehog e realizaram extensa revisão sobre as proteínas hedgehog. As três proteínas mostraram afinidade semelhante aos receptores e proteínas de ligação Ptc e proteína de interação Hedgehog (Hip). Elas também mostraram ter características semelhantes de estrutura protéica secundária e terciária, no teste de denaturação térmica. Em cultura celular da linhagem mesenquimal, que pode gerar diferentes fenótipos adultos, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos, foi testada a concentração de cada Hh para induzir a expressão de fosfatase alcalina. A concentração de 80nM de Shh foi suficiente para induzir a expressão desta enzima, enquanto a Ihh necessitou 500nM e a Dhh de uma concentração bem maior, 5µM. Achados

similares na potência também foram descritos na habilidade de induzir a diferenciação de condrócitos em botão embrionário de camundongos e na indução da proteína *nodal* na placa mesodérmica lateral em embrião de galinha. Na duplicação digital de embrião de galinha, utilizada para verificar atividade na zona de polarização, a Shh e a Dhh mostraram potência semelhante. Esses dados sugerem, segundo os autores, que as funções biológicas das proteínas Hh são controladas por mecanismo preciso e complexo dentro do organismo em desenvolvimento e no adulto.

COBOURNE & SHARPE (2003) relataram em revisão que a proteína Shh foi expressa no espessamento epitelial onde seria formado o germe dental, sugerindo que possa controlar o local de desenvolvimento do germe dental, pois sua expressão ectópica foi capaz de gerar tais espessamentos em ectoderme não dental e a inibição de Shh durante a embriogênese causou a ausência de órgãos dentais.

TAJBAKSH (2003), em recente revisão sobre características celulares e moleculares do tecido muscular, citou o gene Shh como participante da rede genética que controla as células progenitoras musculares, na vida embrionária e adulta. A miogênese esquelética seria iniciada por fatores sob controle das vias de sinalização da Shh.

2.6 - REVISÃO DA OSTEOPONTINA

COWLES *et al.* (1998) estudaram a expressão de proteínas da matriz óssea durante o desenvolvimento de calvária de ratos com 16 dias de gestação até cinco dias pós-natal através de hibridização *in situ* e RT/PCR. A primeira proteína a aparecer foi a fibronectina, coincidindo com a condensação celular de osteoblastos e início da mineralização. O aparecimento de colágeno tipo I coincidiu com o início da deposição mineral, expressão de sialoproteína óssea e fosfatase alcalina. A osteocalcina, osteonectina e OPN tiveram padrões similares de expressão no desenvolvimento da calvária de rato. A OPN também foi encontrada em linhas reversas do osso. A máxima expressão de OPN foi alcançada no período pós-natal, juntamente com a osteonectina, em estágios mais tardios do desenvolvimento ósseo, citando os autores que possa estar associada com remodelamento ósseo.

GORSKI (1998) relatou em revisão que a OPN pode ser expressa em osso cortical e trabecular e em linhas de cimentação, separando o osso neoformado do antigo durante reparação de fraturas. A OPN também pode ser expressa em células do periósteo, endósteo e osteócitos, mas não em osteoblastos altamente ativos com formato cúbico. Foi relatado que OPN parece atuar como inibidor da mineralização, ligando-se aos cristais de hidroxiapatita de maneira não específica e limitando seu crescimento. A OPN também é encontrada na urina, sendo sintetizada pelas células tubulares renais e atuando como proteína inibidora do crescimento de cristais na urina.

NOMURA & YAMAMOTO (2000) em revisão de resposta molecular causada por mudanças no ambiente mecânico no tecido ósseo relataram que a OPN foi relacionada como participante da MEC na mecanorrecepção. Foi citado que na remodelação óssea a OPN media a adesão dos osteoclastos, permitindo a criação do microambiente onde a reabsorção óssea é realizada. Esta adesão ocorre com auxílio de domínio com capacidade de ligação com a molécula integrina celular, encontrada na superfície externa da membrana plasmática dos osteoclastos. Durante o movimento fisiológico do dente a OPN é expressa em osteoclastos e osteócitos nos locais de reabsorção do septo dental, sugerindo que participe do remodelamento.

UEMURA *et al.* (2001) relataram em revisão sobre o envolvimento da OPN no remodelamento ósseo que esta proteína se liga à superfície celular via integrina $\alpha_v\beta_3$, atuando em osteoblastos e osteoclastos e participando da contínua modelação óssea do esqueleto. Os autores propuseram um modelo de participação da OPN para esta atividade. Osteoblastos ativados secretariam componentes da matriz como OPN, a qual é reconhecida e ligada pela integrina a outros osteoblastos induzindo sua ativação, concomitantemente ocorreria a adesão de osteoclastos na superfície óssea ao reconhecer a OPN na matriz óssea. Estas interações autócrinas e parácrinas entre osteoblastos e osteoclastos poderiam controlar o balanço de suas atividades. Os autores citaram que BMP-2 é uma boa candidata para promover a reparação óssea, no entanto, seria ainda muito caro se obter as grandes quantidades exigidas para o uso clínico.

PERRIEN *et al.* (2002) estudaram a expressão de OPN durante distração osteogênica na mandíbula de rato com uso de imunistoquímica. Após 14 dias de distração

foi mostrada expressão de OPN em células semelhantes a fibroblastos dentro da área central da distração. Em áreas de ossificação endocondral OPN foi expressa fortemente em células ovais. Na ossificação intramembranosa foi expressa em pre-osteoblastos e osteoblastos, mas não nos osteoblastos da borda da matriz osteóide. Segundo os autores a OPN foi virtualmente expressa em todos os osteócitos da neoformação e sua matriz óssea. Os autores sugeriram que a OPN estaria ligada à recepção de estímulos mecânicos do tecido ósseo e sua expressão durante a distração osteogênica seja similar àquela da embriogênese e sua presença no início da formação da matriz em pre-osteoblastos ajudaria a proliferação e migração deste tipo celular, enquanto a diminuição de sua expressão nas bordas da matriz osteóide permitiria a formação e crescimento dos cristais de hidroxiapatita.

3 - OBJETIVO

Avaliar a incorporação de enxerto de osso alógeno autoclavado associado a BMP-2rh em defeito ósseo não reparável espontaneamente na mandíbula de rato e a expressão das proteínas Shh, Ihh e OPN por meio de imunohistoquímica, além de avaliação da densitometria óptica da região do enxerto.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório Experimental da Disciplina de Traumatologia Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, utilizando 75 *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar adultos machos, com peso médio de 275 gramas e divididos em três grupos de 25 animais cada. Os animais foram alimentados com ração comercial granulada para roedores (Labina, Purina) e água *ad libitum*. O manuseio dos animais seguiu as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o projeto de pesquisa avaliado e aprovado pela Comissão de Ética em experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo protocolo número 50/2000.

Não foi utilizado um grupo sem enxerto, pois o mesmo modelo experimental já havia demonstrado a falta de reparação óssea na mandíbula do rato, mesmo em tempos prolongados (YAMAMOTO *et al.*, 1994). O grupo controle foi submetido a enxerto autógeno fresco removido da crista ilíaca (Figura 1.1) e transplantado para a mandíbula (Figura 1.2) no mesmo ato cirúrgico. No grupo experimental o enxerto foi removido da crista ilíaca de ratos doadores da mesma espécie, tratado por um ciclo de autoclavagem e implantado em outro animal, com ou sem a adição de BMP-2rh.

No grupo controle o enxerto foi removido sob anestesia geral, obtida por injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazine (Rompun®, Bayer) na dose de 8mg/kg de peso corporal e cloridrato de cetamina (Ketalar®, Parke-Davis) na dose de 80mg/kg de peso corporal. A anestesia geral para a cirurgia dos outros dois grupos foi idêntica à utilizada neste grupo. Após tricotomia da região dorsal próxima à cintura pélvica, antissepsia com polivinilpirrolidona-Iodo (PVPI) e colocação de campos estéreis, foi realizada incisão de cerca de dois centímetros, paralela e cerca de um centímetro de distância da coluna vertebral e acima da crista ilíaca, no lado esquerdo. Por divulsão e desinserção do tecido muscular, a superfície óssea do osso ilíaco foi exposta, sendo o fragmento ósseo removido com auxílio de aparelho de biópsia com quatro milímetros de diâmetro (Biopsy Punch 4, Laboratórios Stiefel LTDA.), através de pressão manual. O enxerto foi desgastado em uma de suas corticais para ficar com formato de seção de cone e mantido em gaze umedecida

com soro fisiológico até o momento do transplante para a mandíbula. Esta etapa da cirurgia foi finalizada com sutura por planos com fio de náilon monofilamentar agulhado (Mononylon 5.0, Ethicon).

Os animais doadores do grupo experimental foram sacrificados, tricotomizados na região dorsal sobre a crista ilíaca esquerda e direita e realizada antissepsia destas áreas com polivinilpirrolidona-Iodo (PVPI). Após o posicionamento de campos estéreis foi feita incisão dorsal paralela à coluna vertebral e acima do sítio doador, seguida de divulsão dos planos musculares e desinserção do periósteo. O osso ilíaco foi removido e blocos cilíndricos de osso bicortical foram obtidos com aparelho de biópsia de 4mm de diâmetro (Biopsy Punch, Laboratórios Stiefel Ltda.) sob pressão manual.

O bloco ósseo removido foi desgastado em uma de suas corticais para adquirir formato de seção de cone. O enxerto foi lavado com soro fisiológico para remoção do sangue e tecido medular presente em seu interior (Figura 1.3), condicionado em embalagem para autoclavagem e submetido a um ciclo de autoclavagem a 135°C e 1atm por 15 minutos, sendo após este procedimento implantado no defeito mandibular no primeiro grupo experimental. No segundo grupo experimental, após o enxerto ser autoclavado, foi adicionado em seu espaço medular solução de 20µg de BMP-2rh (Kamyia Biomedical Company, Seattle, WA, EUA) diluídos em 5µl de colágeno tipo IV (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, EUA). A diluição do BMP-2rh e sua inserção no enxerto foram realizadas sob condições estéreis dentro de capela de fluxo laminar. Após um tempo de aproximadamente 20 minutos para secagem, o enxerto do segundo grupo estava pronto para ser utilizado.

O acesso ao leito receptor nos três grupos foi igual, sendo obtido através de tricotomia da região submandibular, antissepsia com PVPI, colocação de campos estéreis, incisão submandibular, divulsão da musculatura e desinserção do periósteo e perfuração bicortical do ramo mandibular com trefina de 3mm de diâmetro (Trefina tamanho médio, Incol, Instrumental cirúrgico e oftalmológico Ltda.) em motor de baixa rotação, sob irrigação constante com soro fisiológico (Figuras 1.4 e 1.5). O enxerto foi então posicionado no defeito ósseo (Figura 1.6) e a ferida cirúrgica fechada com sutura por planos com fio agulhado de náilon monofilamentar (Mononylon 5-0, Ethicon).

Para conferir a capacidade osteoindutora do enxerto autoclavado tratado com BMP-2rh foi realizado o implante ectópico em musculatura dorsal de um rato adulto, tendo como controle um enxerto autoclavado implantado em outro animal no mesmo local. Os animais receberam anestesia geral, tricotomia da região, incisão, divulsão do tecido muscular e implantação dos enxertos e sutura por planos.

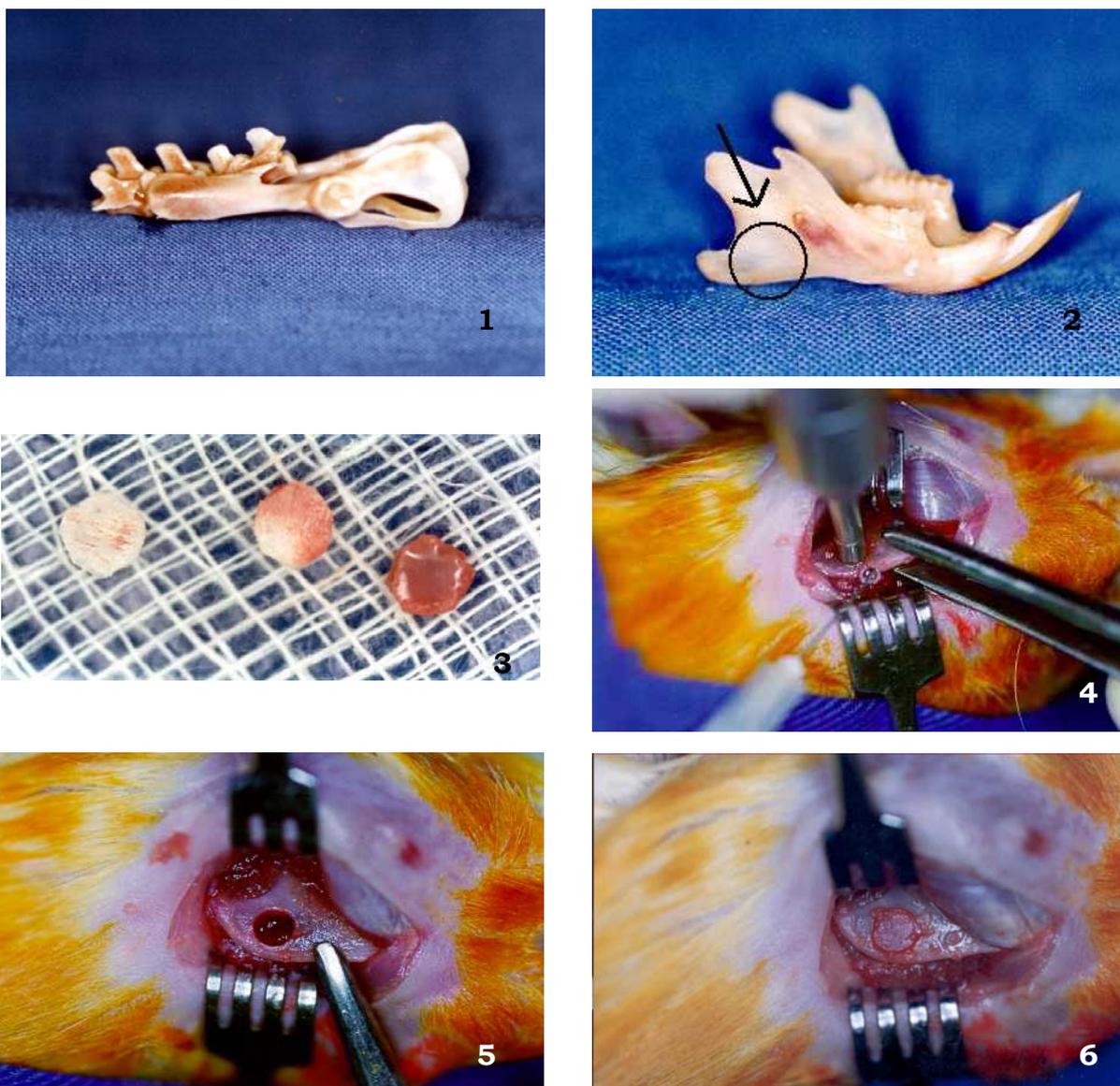


Fig. 1.1 - Detalhe do esqueleto pélvico do rato. Fig. 1.2 - Detalhe da mandíbula do rato, a seta indica o local do enxerto. Fig. 1.3 - Aparência do enxerto antes e após a limpeza do tecido presente no espaço medular, que lhe conferiu cor esbranquiçada. Fig. 1.4 - Uso da trefina sob irrigação para obtenção do defeito mandibular. Fig. 1.5 - Defeito bicortical no ramo mandibular. Fig. 1.6 - Defeito mandibular preenchido por enxerto ósseo.

Os animais foram sacrificados após duas semanas e os enxertos recuperados e preparados para coloração com hematoxilina e eosina, onde foi constatado a neoformação óssea no enxerto com BMP-2rh e ausência de formação óssea no outro enxerto.

Após a cirurgia os animais receberam antibioticoterapia com benzilpenicilina benzatina (Benzetacil 1.200.000UI, Fontoura-Wyeth S.A.) e penicilina G potássica e procaína (Despacilina 400.000UI, Bristol-Myers Squibb) na dose de 40.000 UI/kg de peso corporal cada, via intraperitoneal. Durante as duas semanas seguintes da cirurgia os animais receberam ração fragmentada para facilitar a alimentação.

Os animais foram sacrificados com dose letal de anestésico após um, sete, 14, 21 e 28 dias, sendo a mandíbula removida e fixada em formol tamponado a 10%. Em seguida a mandíbula foi radiografada em filme dental tamanho dois (Ektaspeed Plus, Kodak Co) durante 0,5 segundos a uma distância focal de 30cm em regime de 56KV e 10mA em aparelho de raios-x odontológico (Modelo XR 6010, Gnatus). Na parte lateral da radiografia foi posicionada uma escala de alumínio. A película radiográfica foi processada em reveladora automática (Level 360 X-ray automatic processor, Flat Co.).

A mandíbula direita foi descalcificada em ácido fórmico a 20% durante uma semana, emblocada em parafina, sendo obtido cortes com 5µm de espessura, de forma semi-seriada seguindo o plano frontal da mandíbula, para coloração com hematoxilina & eosina e com 3µm de espessura para os procedimentos de imunoistoquímica.

As radiografias foram digitalizadas com resolução de 400 dpi, e a imagem submetida à análise de densitometria óptica do local do enxerto pelo programa Imagelab (Softium, São Paulo - SP). A área de interesse foi escolhida por meio um círculo com área similar ao do enxerto. O valor encontrado pelo exame representou uma relação com a escala de alumínio posicionada na margem da radiografia. Os dados resultantes do exame foram submetidos ao teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis entre os diferentes grupos pelo programa EPI-INFO (Versão 6.04, CDC).

PROCEDIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS

Os procedimentos de imunoistoquímica foram realizados no Laboratório de Imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da

Universidade de São Paulo. A padronização da técnica foi obtida após otimização da concentração e recuperação antigênica.

Foram utilizados os anticorpos policlonais Sonic hedgehog e Indian hedgehog (Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, EUA) e osteopontina (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, EUA). A reação imunistoquímica foi desenvolvida sobre cortes de 3µm de espessura, montadas em lâminas de vidro, previamente limpas e desengorduradas, preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Chemical, Co., St.Louis, MO, EUA). Inicialmente, os cortes histológicos foram desparafinados em 2 banhos de xilol, sendo o primeiro a 57°C, durante 30 minutos, seguido de outro, em temperatura ambiente, por 20 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanol a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidas por etanol 95%, 85%, 80%, por 5 minutos cada, e imersos por 10 minutos em solução de hidróxido de amônia a 10% para remoção de pigmento formólico. Então, os preparados foram lavados em água corrente por 10 minutos e em 2 passagens de água destilada. Para expor melhor os antígenos Ihh e Shh, os cortes histológicos foram imersos em ácido cítrico 10mM, pH 6,0, em banho-maria a 95°C por 30 minutos, e em seguida lavados em água corrente por 10 minutos seguido por dois banhos de água destilada (método modificado de acordo com SHI *et al.* 1991). Para tanto, as lâminas, em número máximo de oito, foram acondicionadas em “berços” de vidro, de forma a sempre manter um espaçamento entre elas de cerca de 4mm. O antígeno OPN não necessitou recuperação antigênica, passando as lâminas diretamente para o bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida foi feito o bloqueio da peroxidase endógena tecidual através de duas passagens de cinco minutos cada em solução de H₂O₂ (20 volumes) em metanol (1:1, v/v). Lavagem em água corrente por cinco minutos e duas passagens por destilada. Todos os procedimentos a partir desse ponto foram seguidos por lavagens em tampão Tris-HCl (Tris-hidroxi-metil-aminometano, Sigma), pH 7,4. Nesse ponto, as secções histológicas foram submetidas à incubação dos anticorpos primários, diluídos na concentração de 1:100 para o Ihh, 1:150 para o Shh e 1:1200 para o OPN, em solução tampão Tris-HCl, pH 7,4, contendo 1% de albumina sérica bovina e azida sódica a 0,1% (BSA- Biotest S/A, São Paulo, Brasil), à temperatura ambiente. Foram realizadas duas lavagens em Tris-HCl por 5 minutos cada, e a incubação com o anticorpo secundário

biotinilado (Dakopatts, Dinamarca), desenvolvido contra camundongo ou coelho, por 30 min, à temperatura ambiente na diluição de 1:100. Posteriormente ao procedimento de lavagem já descrito, foi incubado o complexo streptoavidina-biotina (LSAB, Dakopatts, Dinamarca), na diluição de 1:100, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Tanto o anticorpo secundário quanto o LSAB foram diluídos em tampão Tris-HCl, pH 7,4. A revelação da reação foi desenvolvida a partir da imersão dos cortes histológicos em solução cromógena de diaminobenzidina (DAB) (3,3'-diaminobenzidina, Sigma) a 0,03%, adicionada a 0,6 ml de H₂O₂ (20 volumes), durante 3 minutos, seguida de uma passagem por solução de sulfato de cobre a 0,5%, para intensificar a marcação. Os cortes foram então lavados brevemente com Tris, em água corrente por 10 minutos, e em duas breves passagens em água destilada, para serem contra-corados com solução de hematoxilina de Mayer por 10 minutos. Finalmente, foi realizada a desidratação das secções histológicas, sendo recobertas com lamínula de vidro utilizando o meio de montagem Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). As reações tiveram como controle positivo cortes de crânio de rato com um dia de idade, já descrito na literatura como positivos para os anticorpos Shh e Ihh nas áreas próximas a condrócitos envolvidos na ossificação endocondral (IWASAKI *et al.*, 1997). Para o anticorpo OPN foram visualizadas áreas de marcação positiva em regiões de ossificação (COWLES *et al.*, 1998). Como controle negativo foi feita a substituição do anticorpo primário por solução de BSA a 1% em tampão Tris-HCl, pH 7,4.

5 - RESULTADOS

A recuperação pós-operatória dos ratos foi sem intercorrências, com boa cicatrização e deambulação normal. Nenhum animal mostrou sinais de infecção clinicamente. Durante o manuseio do enxerto autoclavado foi notado que sua dureza diminuiu quando em contato com o sangue no leito receptor. Os ratos do grupo tratado com BMP-2rh mostraram aumento de volume no local do enxerto após 7 e 14 dias. No tempo de um dia a média do peso final e inicial foi semelhante, enquanto nos demais tempos de avaliação os animais ganharam peso, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Peso médio inicial e final dos animais utilizados nesta pesquisa. Valores expressos em gramas.

Tempo	Grupo Controle		Grupo enxerto autoclavado		Grupo BMP	
	P I	P F	P I	P F	P I	P F
Um dia	300	300	255	260	250	245
Sete dias	265	275	260	300	275	295
14 dias	315	325	265	330	290	340
21 dias	305	320	270	340	240	380
28 dias	300	355	270	360	250	385

PI= peso inicial, PF= peso final.

Ao exame macroscópico, o enxerto no grupo controle mostrou estar bem adaptado ao leito receptor, sendo que nos tempos posteriores houve formação óssea ao redor do enxerto, unindo-o com a mandíbula. Nos dois primeiros tempos de avaliação o enxerto manteve seu formato e volume, já no tempo final foi notada diminuição do volume do enxerto. O local do enxerto estava com coloração mais escura do que o restante da mandíbula. O grupo tratado com enxerto autoclavado mostrou pouca diminuição do volume do enxerto ao longo dos 28 dias, porém estava unido ao leito receptor. O grupo tratado com

BMP-2rh mostrou aumento de volume sobre o local do enxerto na primeira semana, duro ao corte e se estendendo da mandíbula ao enxerto, pelos lados lingual e vestibular. O exame histológico revelou tecido ósseo imaturo no local. Nos demais tempos de avaliação houve diminuição contínua de volume e ao contrário dos outros grupos não foi possível identificar o enxerto na maior parte dos espécimes, pois estava recoberto por neoformação óssea.

5.1 - ESTUDO HISTOLÓGICO

GRUPO CONTROLE TRATADO COM ENXERTO AUTÓGENO

Após um dia o osso enxertado apresentou-se constituído por duas corticais paralelas dispostas externamente, uma do lado medial e outra do lateral da mandíbula, unidas por osso trabeculado com amplo espaço medular. O enxerto possuía espessura maior que a da mandíbula e estava bem adaptado ao leito receptor (Figura 2.1). Perióstio recobria a face externa das suas corticais. O espaço medular estava ocupado por diversos tipos celulares do tecido hematopoético, rede de fibrina e poucas células adiposas uniloculares. Na maioria dos espécimes a margem do defeito mandibular apresentou-se viável. Ao redor do enxerto e até mesmo nas bordas do espaço medular em contato com tecidos moles foi encontrado processo inflamatório agudo, com infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e exsudado serofibrinoso. As fibras musculares vizinhas estavam separadas umas das outras, com infiltração de PMN, edema e não inseridas no tecido ósseo. O perióstio da mandíbula estava separado do osso e diversas células com formato fusiforme estavam presentes em sua face interna.

Com sete dias a estrutura do enxerto pareceu similar ao tempo anterior, estando a maior parte do tecido ósseo desvitalizado, assim como parte do perióstio. O espaço medular estava preenchido em sua maior parte por tecido de granulação e áreas de neoformação óssea (Figura 2.2). A parte cortical do enxerto, entretanto, mostrou áreas de reabsorção, formando lacunas de Howship, sobretudo nos locais sem proteção do perióstio, o qual também estava sofrendo reabsorção nas extremidades. O coto mandibular estava desvitalizado, apresentando ao longo da cortical intensa atividade osteoblástica subperiostal, com produção de osso imaturo e grande número de células envolvidas na produção de matriz osteóide. Esta neoformação circunscreveu as trabéculas mais externas

do enxerto e deixou mandíbula e enxerto com altura semelhante. O processo inflamatório estava presente, embora bem menos evidente que na fase anterior, constituído por infiltrado PMN, mononuclear e macrofágico e rede de fibrina. O infiltrado inflamatório e edema entre as fibras musculares diminuíram em relação ao tempo anterior, porém as fibras não estavam inseridas no osso.

Depois de 14 dias o leito receptor estava envolvido na neoformação óssea, reabsorção do enxerto e remodelamento. O enxerto estava unido à mandíbula pela neoformação óssea (Figura 2.3). O perióstio estava presente, em quantidade menor que no tempo anterior e mostrando ainda reabsorção. O espaço medular estava ocupado por osteoblastos, tecido de granulação intensamente vascularizado e celularizado e levemente infiltrado por células inflamatórias mononucleares e macrofágicas. As corticais do enxerto mostraram sinais de reabsorção, presente também nas trabéculas posicionadas mais externamente. A margem do defeito mandibular estava coberta por neoformação óssea. A proliferação de tecido ósseo sobre a cortical mandibular mostrou aspecto mais maduro, apresentando-se mais compacta e menos celularizada. Junto ao enxerto, ela envolveu as trabéculas e ocupou o espaço medular vizinho à margem do defeito mandibular. O edema nas fibras musculares estava ausente, porém as fibras ainda não estavam inseridas.

Após 21 dias o enxerto mostrou contínua reabsorção, o que diminuiu ainda mais seu volume em relação ao tempo inicial. O processo de reabsorção quase eliminou o osso trabecular. O formato do enxerto se apresentou alterado pela reabsorção, tornando-se mais arredondado nas extremidades. O processo inflamatório não foi observado. A neoformação óssea estava presente no espaço medular do enxerto e subperiostal na mandíbula, mas de forma menos intensa, e o osso neoformado anteriormente estava mais maduro (Figura 2.4). O enxerto estava ligado à mandíbula pelo osso neoformado, apresentando alturas similares. O espaço medular estava preenchido por tecido hematopoético, tecido envolvido na neoformação óssea e em um espécime tecido de granulação ainda ocupava grande parte do espaço medular. O tecido muscular se aproximou mais da cortical e na proximidade do enxerto já estava inserido na cortical mandibular.

Após 28 dias o enxerto estava desvitalizado, tendo sofrido remodelamento intenso, o que lhe deixou com volume bem menor em relação ao tempo inicial. O processo

continuado de reabsorção das corticais e trabéculas ósseas do enxerto deixou o leito receptor ocupado principalmente pelo osso neoformado, que também mostrou sinais de remodelamento. Atividade osteoblástica foi vista em poucas áreas, quase restrita a regiões associadas ao local do enxerto. O espaço medular estava reduzido em relação ao tempo inicial, sendo ocupado principalmente por tecido hematopoético com poucos adipócitos (Figura 2.5). A espessura óssea no local do enxerto estava reduzida em relação ao tempo anterior, encontrando-se ao mesmo nível da altura da mandíbula. O perióstio estava presente, recobrando as corticais ósseas do local do enxerto e da mandíbula, mostrando em algumas áreas do enxerto espessamento em relação à mandíbula. A margem do defeito mandibular mostrou sinais de reabsorção e vitalidade na maioria dos espécimes, estando envolta por tecido ósseo neoformado, inclusive na face em contato com o enxerto. O tecido muscular estava parcialmente inserido no local do enxerto.

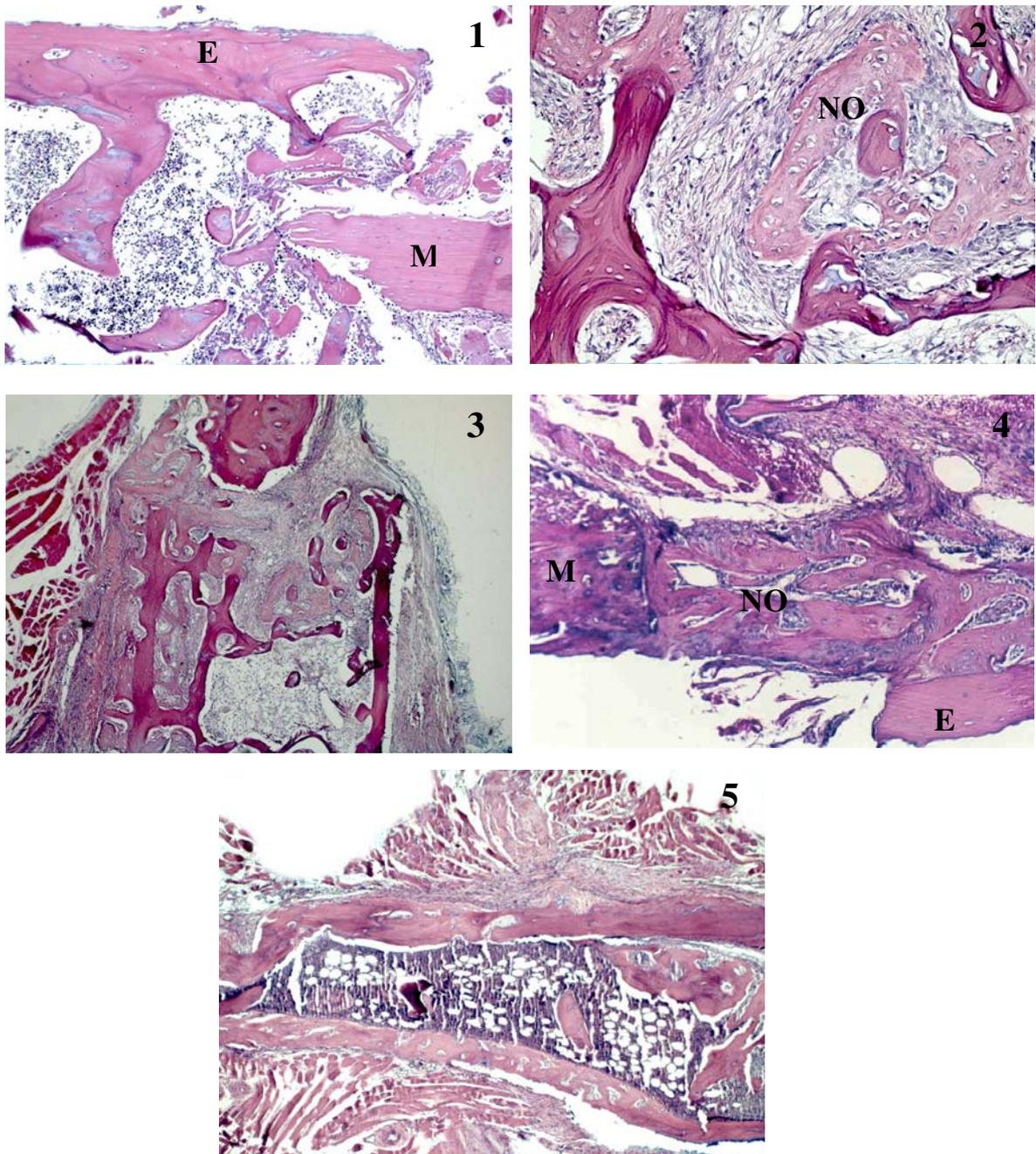


Fig. 2.1 - Um dia, enxerto (E) posicionado no defeito mandibular, a margem da mandíbula (M) está desvitalizada. Infiltrado inflamatório presente no espaço medular. HE, aumento de 10x. Fig. 2.2 - Sete dias, neoformação óssea (NO) ao redor das trabéculas do enxerto no espaço medular. HE, aumento de 20x. Fig. 2.3 - 14 dias, união do enxerto com o leito receptor com neoformação óssea do enxerto. HE, aumento de 5x. Fig. 2.4 - 21 dias, união entre mandíbula (M) e enxerto (E) através da neoformação óssea (NO), que se mostra mais compacta e menos celularizada. HE, aumento de 10x. Fig. 2.5 - 28 dias, remodelamento deixa o local do enxerto com menor espessura. O espaço medular é ocupado por tecido hematopoético. HE, aumento 5x.

GRUPO EXPERIMENTAL TRATADO COM ENXERTO AUTOCLAVADO

Após um dia o osso enxertado apresentou-se com estrutura similar ao do grupo controle, com corticais na parte externa e osso trabecular em seu interior. As lacunas do tecido ósseo do enxerto estavam vazias em sua maioria, ou apresentavam osteócitos em posição marginal. O enxerto estava adaptado ao leito receptor e possuía espessura maior que a da mandíbula (Figura 3.1). Poucos restos do perióstio foram encontrados sobre suas corticais, sem mostrar sinais de vitalidade. A coloração do osso autoclavado estava mais acidófila que o do osso autógeno do grupo controle e a mandíbula. O espaço medular estava ocupado por hemorragia recente, esparsas células inflamatórias, rede de fibrina e poucas áreas de tecido hematopoético necrosado. A maior parte do espaço medular estava vazia. Houve necrose da margem mandibular em parte dos espécimes. Ao redor do enxerto e nas bordas do espaço medular em contato com tecido mole foi encontrado processo inflamatório agudo, com infiltração de PMN e exsudado serofibrinoso. As fibras musculares vizinhas estavam separadas umas das outras, com infiltração PMN, edema e não inseridas no tecido ósseo. O perióstio da mandíbula estava separado do osso e diversas células com formato fusiforme estavam presentes em sua face interna.

Com sete dias, a estrutura do enxerto pareceu similar ao tempo anterior, no entanto áreas de reabsorção foram encontradas. As lacunas no tecido ósseo do enxerto estavam vazias. O espaço medular estava preenchido em sua maior parte por tecido de granulação (Figura 3.2), sendo que somente um espécime mostrou atividade osteoblástica. A parte cortical do enxerto, entretanto, mostrou áreas de reabsorção, assim como as trabéculas. O coto mandibular estava parcialmente desvitalizado, apresentado ao longo da cortical atividade osteoblástica subperiostal, com produção de osso imaturo. Esta neoformação não se uniu com o osso autoclavado, embora em alguns espécimes tenha chegado a envolver sua cortical. Os dois tecidos ósseos estavam separados por uma camada de tecido fibroso envolvendo o enxerto. Tecido condróide foi encontrado em três dos cinco espécimes deste grupo. Como no grupo controle a neoformação óssea, embora menos intensa, deixou o leito receptor e o enxerto com altura semelhante. O processo inflamatório estava quase ausente e constituído por infiltrado PMN, mononuclear e macrofágico. Foi notado que o infiltrado inflamatório e edema entre as fibras musculares diminuíram em relação ao tempo anterior,

porém as fibras não estavam inseridas no perióstio. O perióstio mandibular mostrou proliferação celular em sua camada mais interna, participando ativamente da neoformação óssea.

Depois de 14 dias o enxerto não mostrou união à mandíbula pela neoformação óssea, que se restringia à mandíbula (Figura 3.3). O espaço medular estava preenchido por tecido de granulação, com pouco osso trabecular, que mostrou sinais de contínua reabsorção. As corticais do enxerto mostraram sinais de reabsorção. A margem do defeito mandibular estava recoberta por neoformação óssea, mostrando aspecto mais maduro, apresentando-se mais compacta e menos celularizada. Tecido condróide foi encontrado em dois espécimes, na região entre o enxerto e o coto mandibular. O edema nas fibras musculares estava ausente, porém as fibras ainda estavam afastadas do local do enxerto. O perióstio mandibular estava espessado, altamente celularizado e envolvido em atividade osteoblástica.

Após 21 dias o enxerto continuava sendo lentamente reabsorvido (Figura 3.4). Seu formato estava pouco preservado e mostrou diminuição do seu volume, principalmente por reabsorção do osso trabecular. A neoformação óssea estava diminuída em relação ao tempo anterior, sempre associada à mandíbula. A neoformação subperiostal estava mais madura, com formato mais compacto e menor número de osteoblastos. O enxerto não estava ligado à mandíbula pelo osso neoformado, contudo apresentou altura similar devido à atividade osteoblástica mandibular. O espaço medular estava preenchido por células envolvidas na reabsorção do enxerto e tecido de conjuntivo frouxo. Áreas de neoformação óssea proveniente da mandíbula infiltraram o espaço medular em dois espécimes. O tecido muscular se aproximou mais da cortical do enxerto.

Após 28 dias o enxerto estava desvitalizado, sendo formado quase que somente pela cortical, pois a parte trabecular havia sido reabsorvida em sua maior parte. O espaço medular estava preenchido por tecido conjuntivo frouxo e tecido envolvido na reabsorção do enxerto. Não foi notada união óssea do enxerto com a mandíbula, mas o enxerto pareceu estar firmemente aderido ao leito receptor (Figura 3.5). Atividade osteoblástica foi encontrada em poucas áreas. O local apresentou remodelamento na área de neoformação óssea mandibular. O tecido ósseo removido pela reabsorção do enxerto aparentemente não

mostrou estar sendo reposto por neoformação óssea. A espessura do leito receptor estava reduzida em relação ao tempo anterior, ficando com altura similar à da mandíbula. O perióstio estava recobrimdo as corticais ósseas do enxerto e da mandíbula. A margem do defeito mandibular mostrou sinais de remodelamento, estando envolta por tecido ósseo neoformado, inclusive na face em contato com o enxerto. O tecido muscular estava parcialmente inserido no local do enxerto.

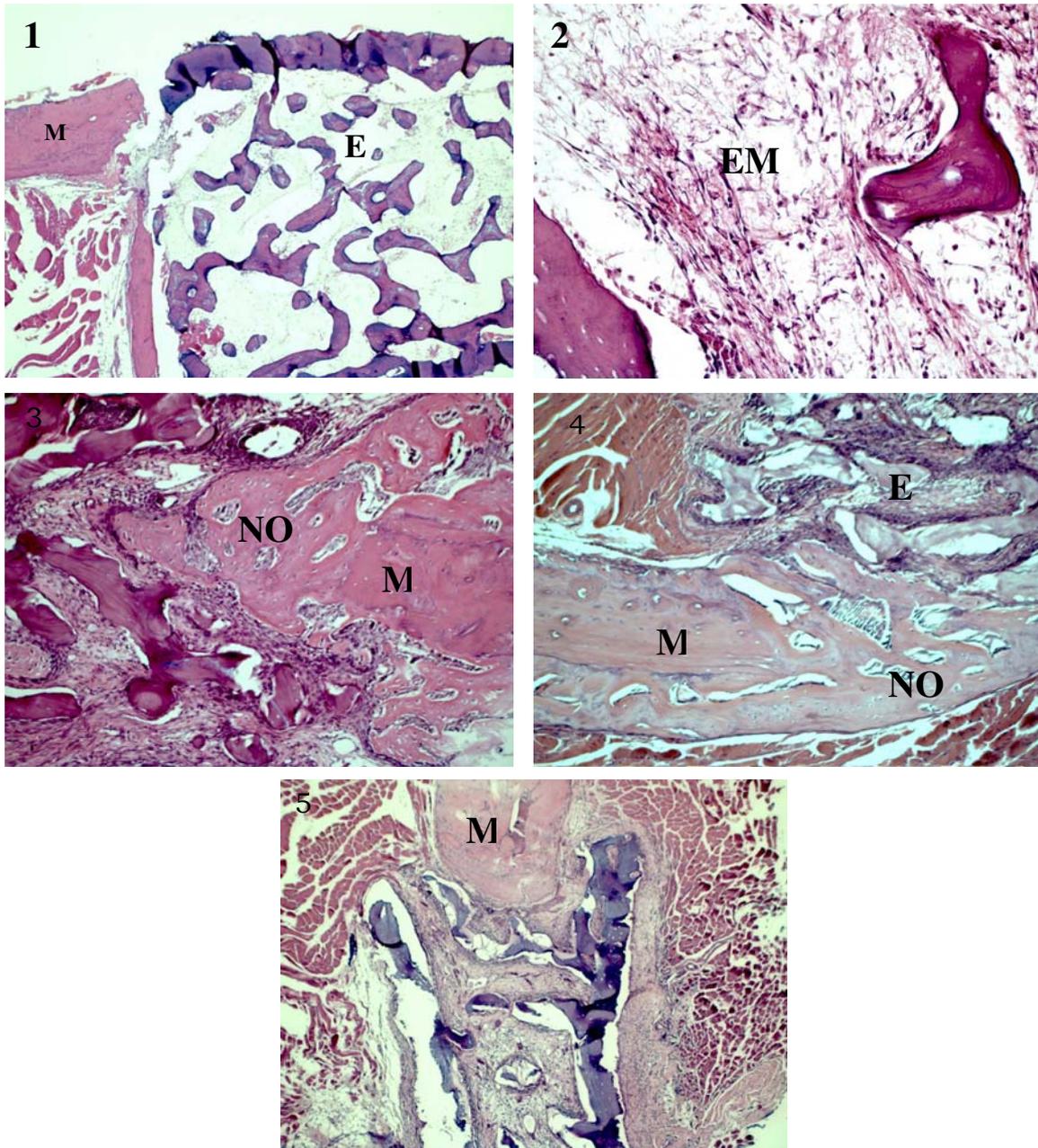


Fig. 3.1 - Um dia. O enxerto (E) está desvitalizado e posicionado na mandíbula (M), o espaço medular é ocupado por rede de fibrina. HE, aumento de 5x. Fig. 3.2 - Sete dias. O espaço medular (EM) está preenchido por tecido de granulação. HE, aumento de 10x. Fig. 3.3 - 14 dias. A neoformação óssea (NO) tem origem na mandíbula (M) e não entra em contato direto com o enxerto, que mostra sinais de reabsorção. HE, aumento de 10x. Fig. 3.4 - 21 dias. O enxerto (E) mostra sinais de reabsorção, enquanto a neoformação óssea (NO) a partir da mandíbula (M) não envolve as trabéculas do enxerto. HE, aumento de 10x. Fig. 3.5 - 28 dias. O enxerto está bem preservado, embora não esteja unido ao leito receptor. HE, aumento de 5x.

GRUPO EXPERIMENTAL TRATADO COM ENXERTO AUTOCLAVADO E BMP-2rh

Após um dia o osso enxertado apresentou-se com estrutura igual à do grupo autoclavado, com corticais na parte externa e seu interior formado por osso trabecular (Figura 4.1). O tecido ósseo do enxerto apresentava-se desvitalizado em quase toda sua extensão, porém em alguns locais osteócitos estavam presentes, deslocados para posição marginal. O enxerto estava bem adaptado ao leito receptor e possuía espessura maior que a da mandíbula. O perióstio estava ausente na maior parte das corticais. A coloração do osso autoclavado estava mais acidófila. O espaço medular estava ocupado por hemorragia recente, células inflamatórias PMN, poucas áreas de tecido hematopoético necrosado e rede de fibrina. Houve necrose da margem mandibular em parte dos espécimes. Ao redor do enxerto e nas bordas do espaço medular em contato com tecido mole foi encontrado processo inflamatório agudo, com infiltração de PMN e exsudado serofibrinoso. As fibras musculares vizinhas estavam separadas umas das outras, com infiltração de PMN, edema e não inseridas no tecido ósseo. O perióstio da mandíbula estava separado do osso e diversas células com formato fusiforme estavam presentes em sua face interna.

Com sete dias a estrutura do enxerto pareceu similar ao tempo anterior, com exceção das trabéculas, que sofreram intensa reabsorção. A parte cortical do enxerto também mostrou áreas de reabsorção nas extremidades, assim como os cotos da mandíbula. O espaço medular estava preenchido em sua maior parte por áreas de neoformação óssea, que uniu as trabéculas do enxerto com sua cortical e com o leito receptor. A neoformação óssea distribuída na forma de traves ósseas se estendeu além das corticais do enxerto, produzindo volumosa expansão sobre o leito receptor (Figura 4.2). A proliferação celular também chamou a atenção, pois o número de células produzindo tecido ósseo e indiferenciadas no local do enxerto foi numerosa. O tecido muscular foi afastado de sua posição pela neoformação óssea (Figura 4.3). Tecido condróide foi encontrado em três dos cinco animais deste tempo de avaliação. Processo inflamatório não estava evidente nesta fase. As fibras musculares não apresentaram infiltrado inflamatório, contudo estavam separadas pela proliferação das células envolvidas na atividade osteoblástica ou a própria matriz óssea. O perióstio sobre o enxerto não foi distinguido em meio à intensa atividade celular presente no local.

Depois de 14 dias o enxerto mostrava seu formato preservado, mesmo com a contínua reabsorção de suas trabéculas. Reabsorção foi evidente nos cotos mandibulares e na cortical do enxerto, mesmo na presença de intensa neoformação óssea. O enxerto estava unido à mandíbula pela neoformação óssea. O espaço medular estava ocupado por osteoblastos e matriz óssea, com poucas áreas de tecido de granulação (Figura 4.4). A margem do defeito mandibular estava coberta por neoformação óssea. Não foi encontrado infiltrado inflamatório nem tecido cartilaginoso neste tempo. A neoformação óssea deixou toda a região do enxerto e as margens do coto mandibular envolvidos por osso. As fibras musculares ainda não estavam inseridas. O periósteo estava afastado da mandíbula e envolvido na produção de tecido ósseo na sua face interna, enquanto ausente sobre o enxerto.

Após 21 dias o local do enxerto mostrou aparente diminuição de volume. O enxerto teve seu volume diminuído pela reabsorção, que quase eliminou o osso trabecular. O processo inflamatório estava ausente. A neoformação óssea estava presente no espaço medular do enxerto e subperiostal na mandíbula, mas de forma menos intensa, e o osso neoformado anteriormente estava mais maduro. O enxerto estava ligado à mandíbula pelo osso neoformado, apresentado maior altura sobre o leito receptor (Figura 5.1). O tecido ósseo neoformado estava com aspecto mais maduro, com diminuição do número de osteoblastos. Parte do espaço medular estava preenchida por tecido hematopoético, enquanto o restante mostrou tecido envolvido na neoformação óssea. O tecido muscular já apresentava áreas de inserção no local do enxerto. O periósteo acima do enxerto estava mais espesso que o periósteo normal da região.

Após 28 dias o enxerto mostrou remodelamento intenso, o que lhe deixou com volume menor em relação ao tempo anterior. O espaço medular estava reduzido e preenchido por tecido hematopoético com células adiposas esparsas (Figura 5.2). Em algumas regiões somente parte da cortical do enxerto foi encontrada (Figura 5.3). O processo continuado de reabsorção das corticais e trabéculas ósseas do enxerto deixou o leito receptor ocupado principalmente pelo osso neoformado e medula óssea. Pouca atividade osteoblástica foi vista, geralmente associada à remodelação, cujas linhas de cimentação marcavam todo o leito receptor. A espessura óssea no local do enxerto estava

ao mesmo nível que os do coto da mandíbula, porém maior que normal para a região. O perióstio estava presente, recobrendo as corticais ósseas do enxerto e da mandíbula. O tecido muscular estava parcialmente inserido no local do enxerto.

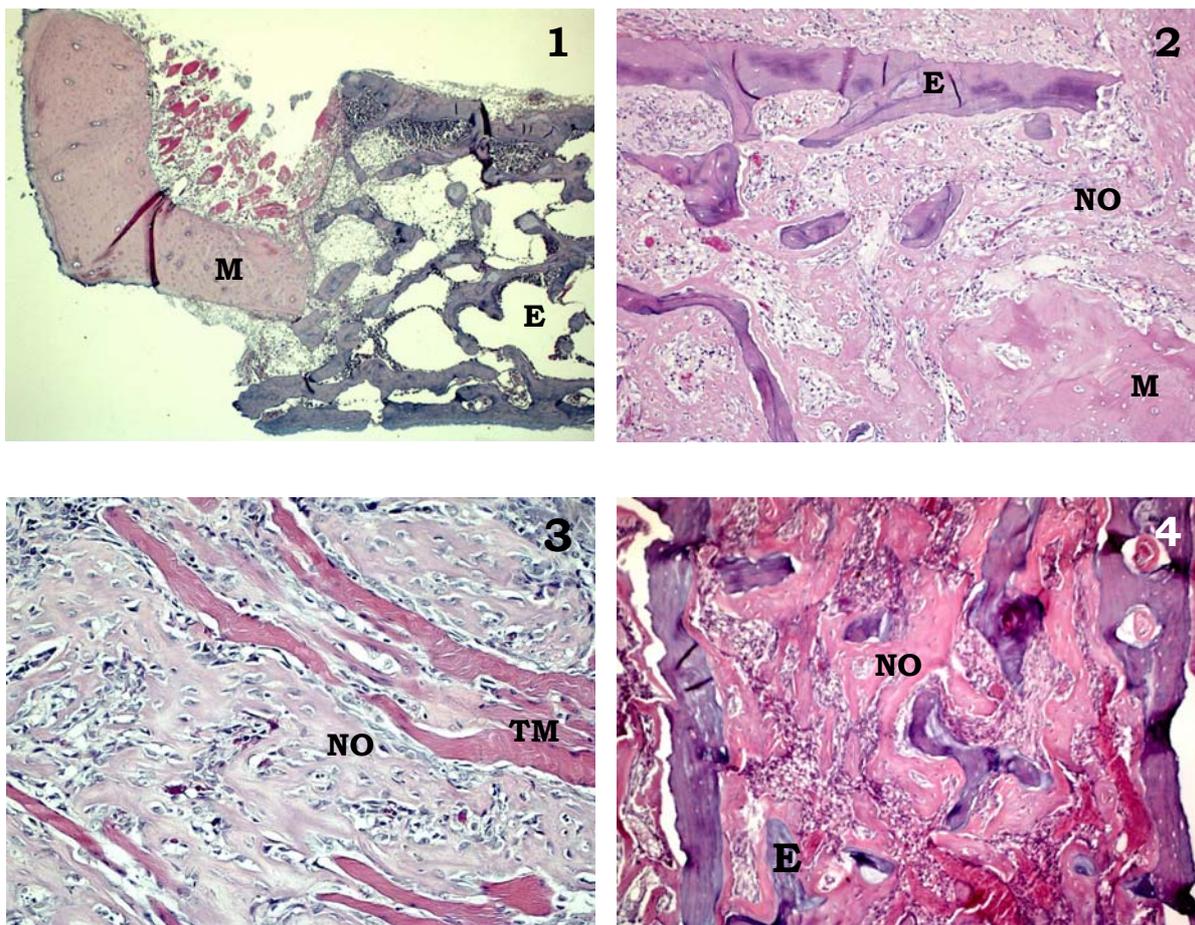


Fig. 4.1 – Um dia. Enxerto (E) posicionado na mandíbula (M). HE, aumento de 5x. Fig. 4.2 – Sete dias. Intensa neoformação óssea (NO) ocupa o espaço medular, ligando a mandíbula (M) com o enxerto (E). Fig. 4.3 – Sete dias. A neoformação óssea (NO) mantém íntimo contato com o tecido muscular (TM). HE, aumento de 10x. Fig. 4.4 – 14 dias. O espaço medular é ocupado pela neoformação óssea (NO), que envolve as trabéculas e parte interna do enxerto (E). HE, aumento de 10x.

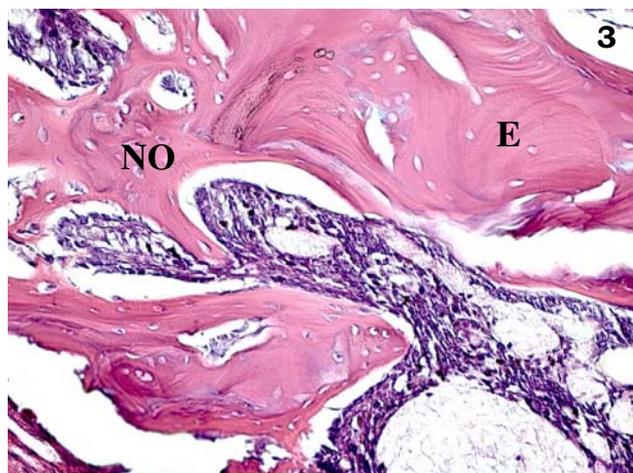
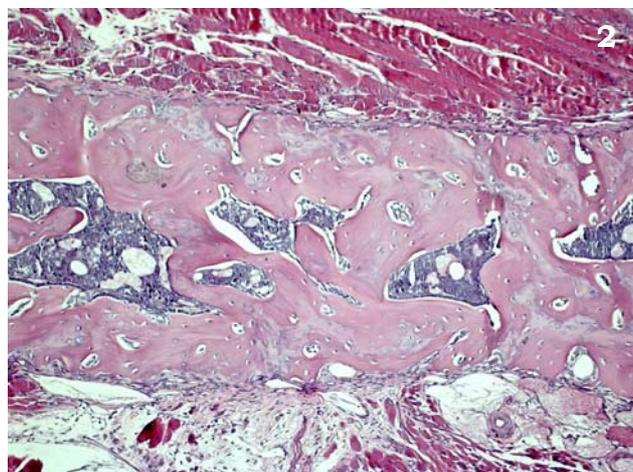
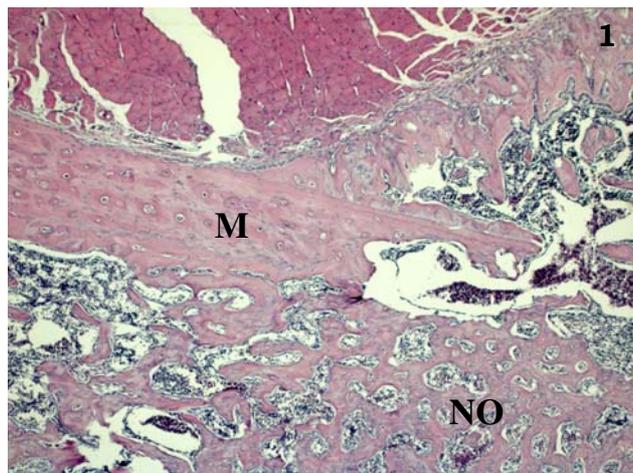


Fig. 5.1 – 21 dias. Grande volume de osso neoformado (NO) no enxerto e mandíbula (M). Presença de tecido hematopoético no espaço medular. HE, aumento de 5x. Fig. 5.2 – 28 dias. O remodelamento ósseo deixou o local do enxerto similar à mandíbula normal. HE, aumento de 10x. Fig. 5.3 – 28 dias. Mesmo em fase adiantada de reparação, ainda foi encontrado fragmentos do enxerto (E) entre as áreas de neoformação óssea (NO). HE, aumento de 20x.

5.2 - ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

As proteínas Shh, Ihh e OPN foram identificadas pela técnica de imunistoquímica, localizando sua distribuição na região do enxerto e sua presença nos diversos tempos de avaliação. A expressão de Shh e Ihh foi similar, sendo encontrada em citoplasma e núcleo de poucas células semelhantes a condrócitos (Figura 6-1 e 6-3), com formato circular e tamanho maior que os osteoblastos e células semelhantes a fibroblastos (Figura 6-5), com formato fusiforme, geralmente perto de regiões de neoformação óssea da mandíbula e enxerto. Em alguns cortes células semelhantes a osteoblastos estavam positivas para Ihh ou Shh (Figura 6-2). Em nenhum momento foi notada a presença de positividade em células dentro da matriz óssea e nem todo tecido cartilaginoso mostrou positividade para os marcadores (Figura 6-6). Células pequenas com núcleo redondo associadas às fibras do tecido muscular também mostraram positividade para Shh, em áreas próximas ao enxerto (Figura 6-4). O grupo do enxerto autoclavado mostrou o maior número de positividade na imunistoquímica. As marcações positivas para estas proteínas nos tempos de avaliação foram bem definidas, não havendo positividade no tempo de um dia e somente três animais positivos no tempo de 28 dias, dois do grupo do enxerto autoclavado e um do grupo BMP-2rh. A tabela 2 mostra os resultados do estudo imunistoquímico destes marcadores.

A expressão de OPN foi encontrada principalmente na matriz extracelular óssea recém produzida (Figura 7.1). Linhas reversas e remodelamento também mostraram positividade (Figura 7.2). Osteócitos e osteoblastos também mostraram marcação nuclear e intracelular para OPN (Figura 7.3). Dentro da neoformação óssea a marcação era encontrada na MEC mais interna, com osteócitos fortemente positivos, no entanto a matriz osteóide logo abaixo dos osteoblastos estava negativa (Figura 7.1), assim como parte dos osteoblastos envolvidos na sua síntese. Células com morfologia indiferenciada acima da área de neoformação óssea estavam positivas para OPN. Áreas onde o tecido ósseo e cartilaginoso eram vizinhos mostraram positividade para tecido ósseo e ausência de marcação para tecido cartilaginoso (Figura 7.4). Áreas positivas para este anticorpo foram encontradas em todos os grupos, principalmente no BMP-2rh, onde o processo de incorporação do enxerto gerou mais tecido ósseo (Figura 7.5). No grupo do enxerto autoclavado ficou evidente a separação da neoformação óssea com o osso autoclavado.

Células pouco diferenciadas associadas ao tecido muscular mostraram positividade para OPN (Figura 7.6) quando próximas a áreas de neoformação óssea. A positividade da OPN revelou pouca marcação no tempo de um dia, associadas à remodelação no tecido ósseo da mandíbula e do enxerto autógeno. Nos tempos de sete, 14 e 21 dias foi encontrada em abundância em todos os grupos e no tempo final estava mais associada com o remodelamento ósseo. Alguns cortes, principalmente do grupo tratado com enxerto autoclavado, mostraram neoformação óssea positiva para OPN no tempo final.

O controle positivo para o anticorpo Shh e OPN são mostrados nas figuras 8.1 e 8.2. O controle positivo para Ihh foi semelhante ao do Shh.

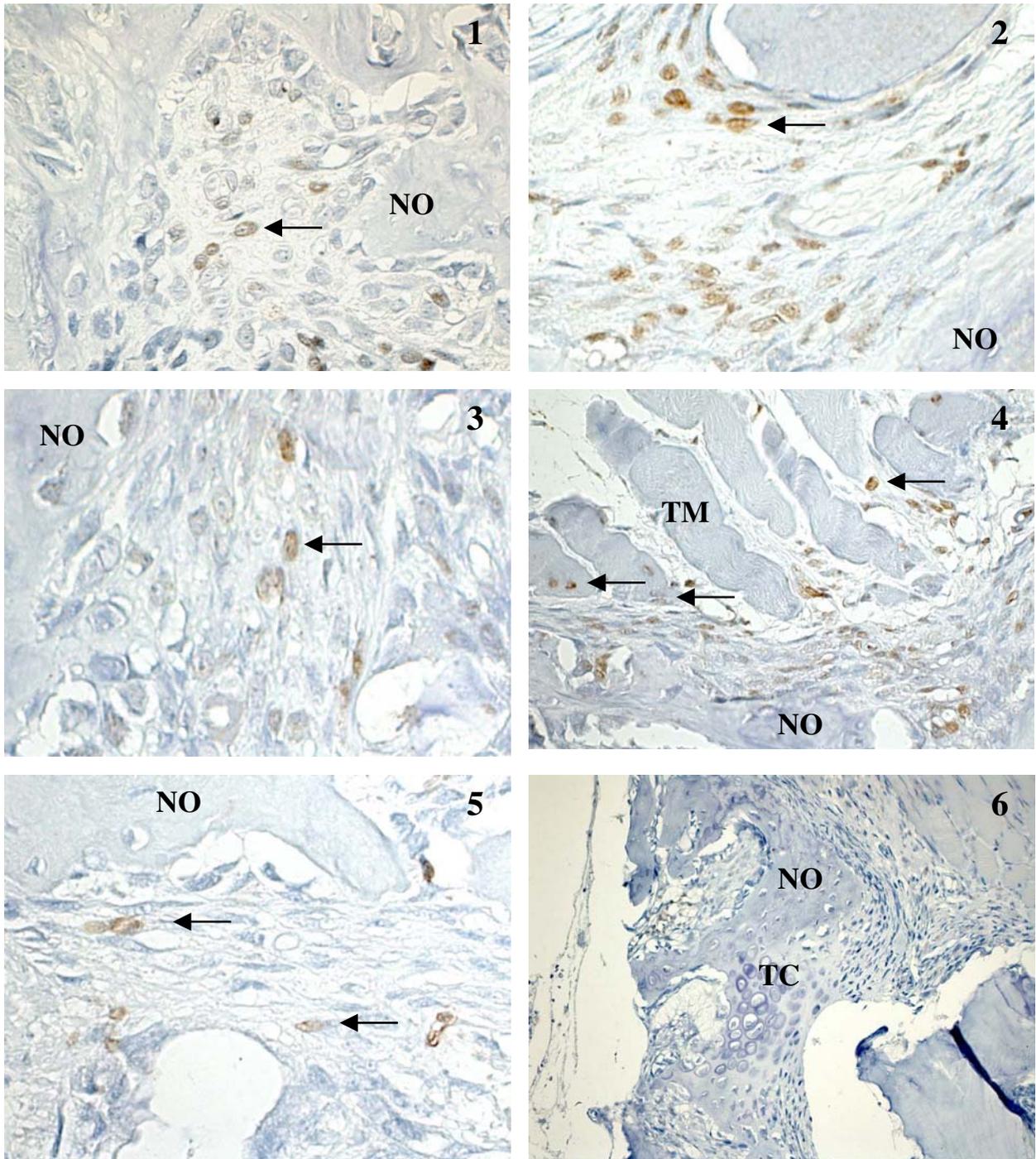


Fig. 6.1 – Grupo autoclavado, sete dias. Área de neoformação óssea (NO) com presença de células semelhantes a condrocitos positivas para Shh (seta). Aumento original 40x. Fig. 6.2 – Grupo autoclavado, sete dias. Área de neoformação óssea (NO) com presença de células osteoblásticas positivas para Ihh (seta). Aumento original 40x. Fig. 6.3 - Grupo BMP, 14 dias. Área de neoformação óssea (NO) com presença de células semelhantes a condrocitos positivas para Ihh (seta). Aumento original 40x. Fig. 6.4 – Grupo autoclavado, 14 dias. As setas indicam células positivas para Shh associadas ao tecido muscular (TM) e próximas a neoformação óssea (NO). Aumento original 40x. Fig. 6.5 – Grupo autoclavado, sete dias. Setas indicam células fusiformes positivas para Shh próximas a neoformação óssea (NO). Aumento original de 40x. Fig. 6.6 – Grupo autoclavado, sete dias. Área de neoformação óssea endocondral (NO) e tecido condróide (TC) negativos para Ihh. Aumento original 40x.

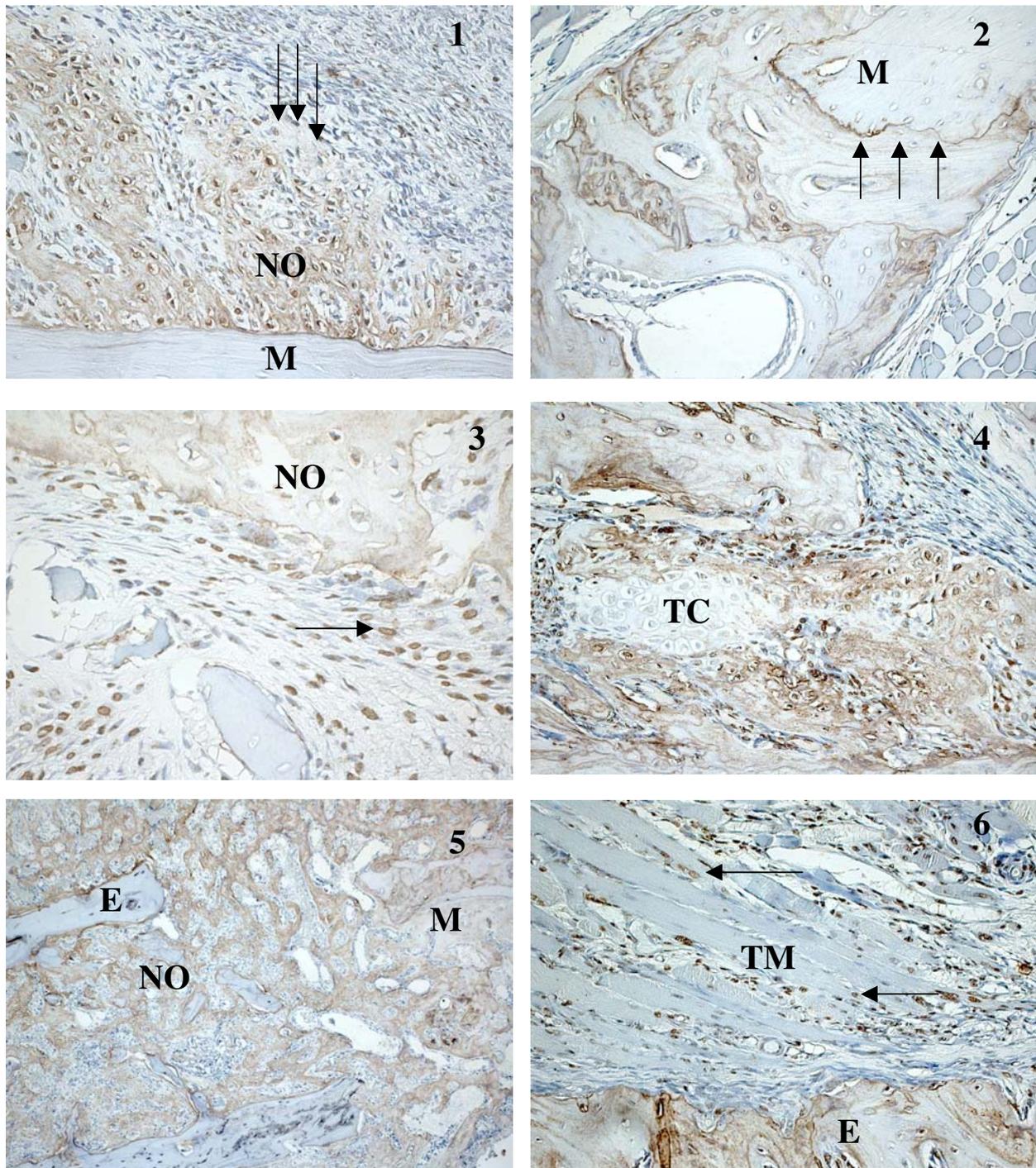


Fig. 7.1 – Grupo controle, sete dias. Área de neoformação óssea (NO) com MEC e osteócitos positivos para OPN sobre a cortical mandibular (M). As setas indicam área de NO negativa para OPN onde os osteoblastos começam a ser envolvidos pela matriz óssea. Aumento original de 40x. Fig. 7.2 – Grupo controle, 28 dias. Setas indicam linhas de cimentação entre mandíbula (M) e osso neoformado. Aumento original de 40x. Fig. 7.3 – Grupo autoclavado, sete dias. Núcleos ovóides positivos para OPN (setas) próximos a área de neoformação óssea (NO). Aumento original de 40x. Fig. 7.4 – Grupo autoclavado, sete dias. Tecido condróide (TC) negativo para OPN. Aumento original de 40x. Fig. 7.5 – Grupo BMP, 14 dias. Intensa neoformação óssea (NO) unindo o enxerto (E), negativo para OPN, com a mandíbula (M). Aumento original de 40x. Fig. 7.6 – Grupo BMP, sete dias. Tecido muscular (TM) com células associadas (setas) positivas para OPN próximas à cortical mandibular (M). Aumento de 40x.

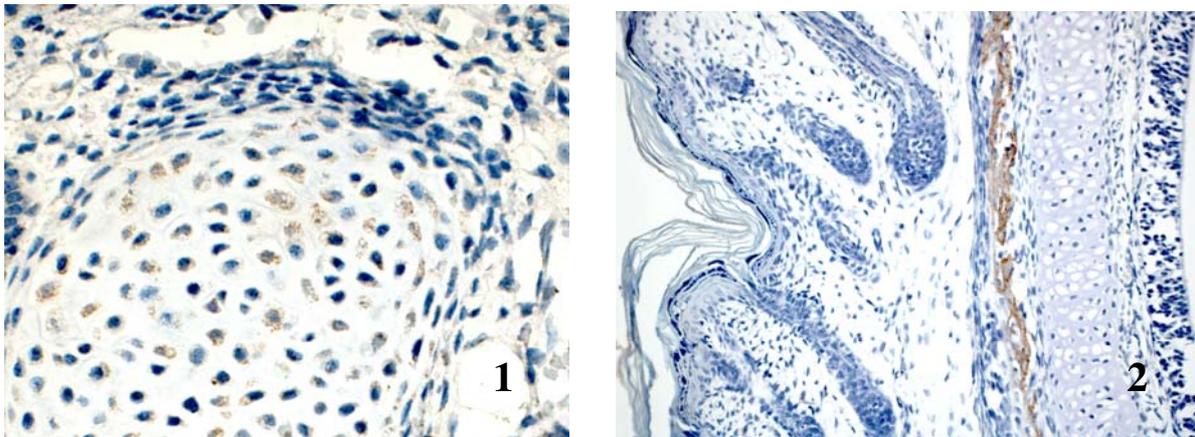


Fig. 8.1 – Crânio de feto de rato Wistar, mostrando condrócitos positivos para Shh em ossificação endocondral. Aumento de 40x. Fig. 8.2 – Crânio de feto de rato Wistar mostrando área de ossificação com marcação positiva para OPN. Aumento de 40x.

Tabela 2. Resultados do estudo imunoistoquímico para Shh e Ihh. O número indica a quantidade de animais do grupo positivos para cada anticorpo.

Tempo	Grupo controle		Grupo enxerto autoclavado		Grupo BMP-2rh	
	Shh	Ihh	Shh	Ihh	Shh	Ihh
Um dia	0	0	0	0	0	0
Sete dias	1	2	3	4	0	1
14 dias	2	0	3	2	3	3
21 dias	2	2	4	2	1	0
28 dias	0	0	1	1	1	0

5.3 - ESTUDO RADIOGRÁFICO E DE DENSITOMETRIA ÓPTICA

O exame radiográfico da mandíbula um dia após a cirurgia mostrou área radiopaca circular com diâmetro aproximado de três milímetros com bordas bem definidas no interior do ramo mandibular, próxima à região apical do dente incisivo inferior. Nesta fase os três grupos mostraram resultados semelhantes (Figura 9.1). Com sete dias o grupo controle mostrou área do enxerto menos radiopaca e formação de halo radiopaco ao redor do leito receptor, permanecendo as bordas do bloco ósseo enxertado bem definidas. No grupo do enxerto autoclavado houve diminuição da radiopacidade do enxerto, com formação de halo radiolúcido ao redor do leito receptor. No grupo tratado com BMP-2rh o enxerto estava envolvido por halo radiopaco (Figuras 9.3 e 9.5). Com 14 dias o grupo controle mostrou relativa perda na delimitação das bordas do enxerto, enquanto o halo radiopaco ao redor do enxerto estava mais evidente. No grupo do enxerto autoclavado houve aumento da radiopacidade ao redor do leito receptor. No grupo tratado com BMP-2rh foi notado crescente aumento da radiopacidade na região receptora, com perda parcial da delimitação do enxerto. Após 21 dias o grupo controle mostrou perda contínua de delimitação e aumento da radiopacidade ao redor do enxerto. No grupo do enxerto autoclavado foi notado aumento da radiopacidade ao redor do enxerto. O grupo tratado com BMP-2rh mostrou perda da delimitação do enxerto (Figura 9.6). No tempo final o grupo controle mostrou área radiopaca no leito receptor pouco delimitada cercada por halo radiopaco (Figura 9.2). No grupo do enxerto autoclavado foi notada área circular correspondente ao enxerto com halo radiopaco ao redor (Figura 9.4). No grupo tratado com BMP-2rh o enxerto não estava identificável, porém a área do enxerto era identificada pela radiopacidade maior que no restante do ramo mandibular.

O exame da densitometria óptica foi realizado sobre a região do enxerto, sendo os valores obtidos expressos em DO. A Tabela 3 e Gráfico 1 mostram os valores da média e desvio padrão encontrados em cada tempo de avaliação nos três grupos. De um modo geral, valores maiores foram obtidos pelo grupo tratado com BMP-2rh. Os dados obtidos pela densitometria foram submetidos ao teste estatístico de ANOVA ou Kruskal-Wallis, de acordo com a homogeneidade das amostras. Houve diferença significativa ao nível de 1% entre os diversos tempos de avaliação do grupo tratado com BMP-2rh, o que não se repetiu

dentro do grupo do enxerto autoclavado e do controle. Na avaliação do grupo BMP-2rh contra o grupo tratado com enxerto autoclavado houve diferença significativa ao nível de 1% no teste de ANOVA contra o grupo controle no teste Kruskal-Wallis. Entre os grupos controle e autoclavado não foi detectada diferença significativa. O teste estatístico considerando somente o tempo 28 dias dos três grupos não mostrou diferença significativa. Considerando o par tempo contra tempo de todos os grupos, houve resultados estatisticamente significativos ao nível de 1% no teste de ANOVA entre 14 e 21 dias e 21 e 28 dias. Os resultados dos testes estatísticos são mostrados na Tabela 4.

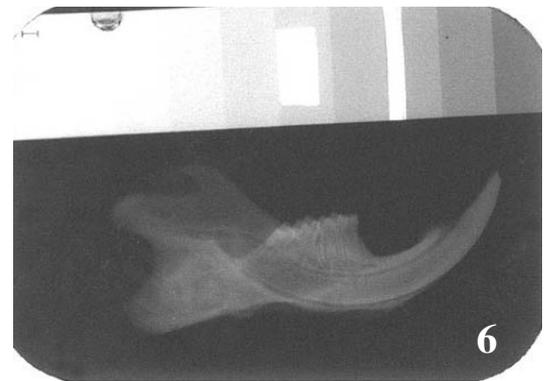
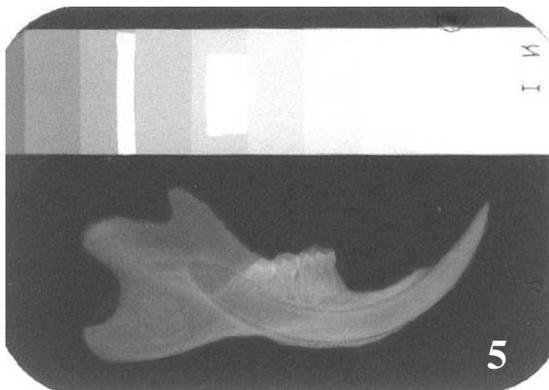
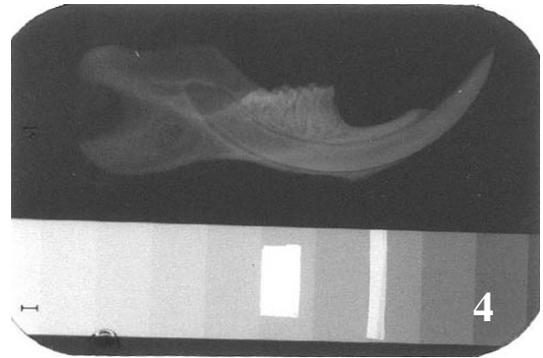
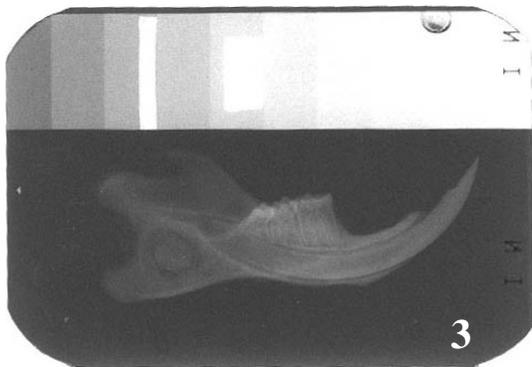
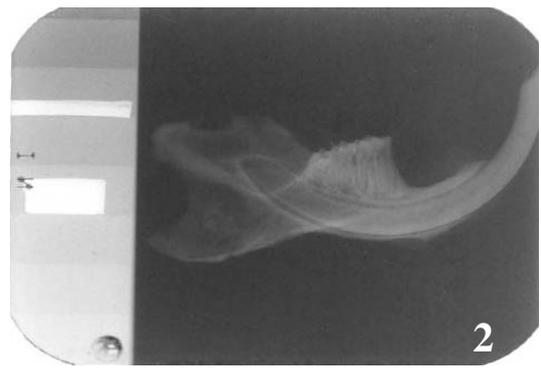
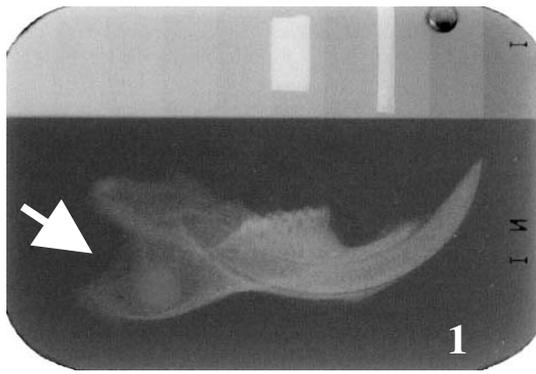


Fig. 9.1 - Grupo controle. Um dia. A seta indica o enxerto. Fig. 9.2 - Grupo controle. 28 dias. O enxerto mostra bordas pouco nítidas. Fig. 9.3 - Grupo autoclavado. Sete dias. Área radiolúcida ao redor do enxerto. Fig. 9.4 - Grupo autoclavado. 28 dias. Enxerto ainda pode ser distinguido da mandíbula. Fig. 9.5 - Grupo BMP. Sete dias. A margem do enxerto não está evidente. Fig. 9.6 - Grupo BMP. 21 dias. Extensa área radiopaca no local do enxerto. Em todas as imagens está presente a escala de alumínio utilizada na densitometria óptica.

Tabela 3. Média de densidade óptica nos grupos avaliados, com desvio padrão. Valores expressos em DO.

Tempo	Grupo controle		Grupo enxerto autoclavado		Grupo BMP-2rh	
	DO	dp	DO	dp	DO	dp
Um dia	1.670	0.312	1.914	0.150	1.924	0.140
Sete dias	1.730	0.197	1.640	0.284	2.496	0.067
14 dias	1.834	0.105	1.920	0.079	2.118	0.155
21 dias	1.672	0.132	1.888	0.060	1.700	0.070
28 dias	1.952	0.155	1.896	0.123	2.140	0.471

DO = densidade óptica; dp = desvio padrão

Gráfico 1. Média de densidade óptica nos grupos avaliados, com desvio padrão. Valores expressos em DO.

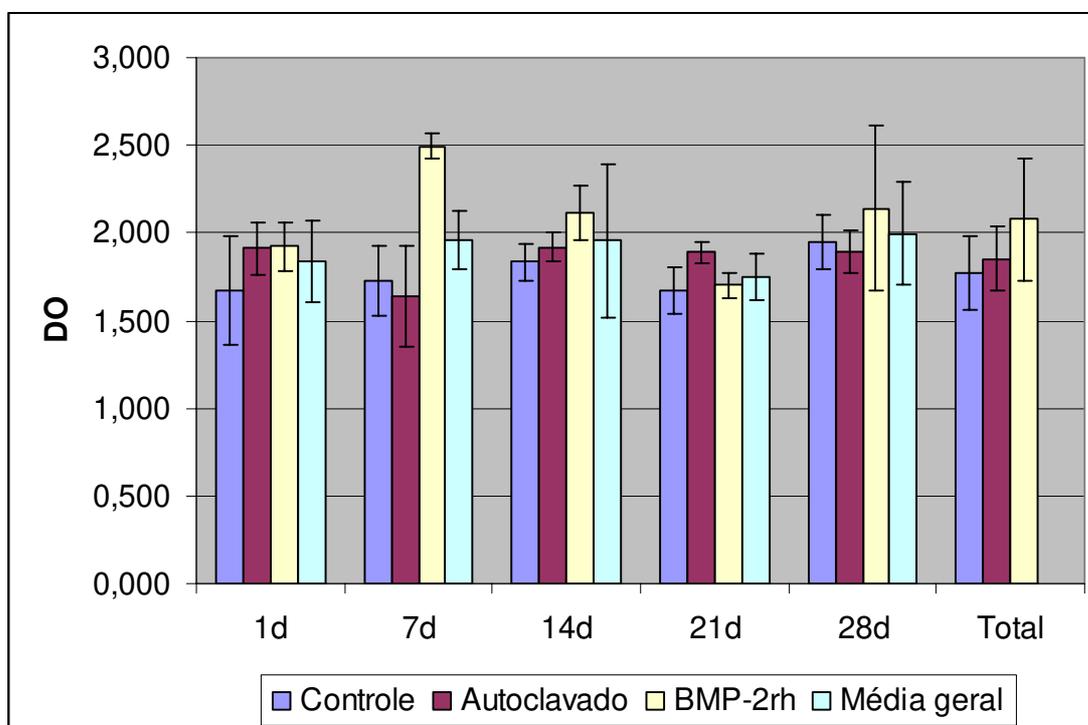


Tabela 4. Resultados dos testes estatísticos.

AMOSTRA TESTADAS	TESTE	SIGNIFICÂNCIA
Tempos de avaliação no grupo controle	ANOVA	p = 0,143
Tempos de avaliação no grupo autoclavado	Kruskal-Wallis	p = 0,281
Tempos de avaliação no grupo BMP-2rh	Kruskal-Wallis	p = 0,003
Tempo de avaliação 1 X 7 dias	Kruskal-Wallis	p = 0,755
Tempo de avaliação 7 X 14 dias	Kruskal-Wallis	p = 0,589
Tempo de avaliação 14 X 21 dias	ANOVA	p < 0,001
Tempo de avaliação 21 X 28 dias	ANOVA	p = 0,006
Tempo de avaliação 28 dias dos 3 grupos	Kruskal-Wallis	p = 0,907
Grupo BMP-2rh X grupo controle	Kruskal-Wallis	p = 0,002
Grupo autoclavado X grupo controle	ANOVA	p = 0,155
Grupo BMP-2rh X grupo autoclavado	ANOVA	p = 0,002

6 – DISCUSSÃO

A interferência da aplicação de BMP-2rh na incorporação de enxerto alógeno autoclavado e a expressão imunistoquímica das proteínas Ihh, Shh e OPN foram avaliadas neste estudo. Foi notado um processo de incorporação rápido e eficiente, com intensa capacidade osteoindutora e osteocondutora no grupo tratado com BMP-2rh, que com sete dias já se apresentou unido à mandíbula, enquanto que o grupo tratado com enxerto autoclavado mostrou incorporação lenta com capacidade osteocondutora relativa, sem mostrar união óssea com o leito receptor ao final do experimento. As proteínas Shh e Ihh não foram expressas no primeiro dia, no entanto marcação positiva foi encontrada principalmente entre 7 e 21 dias em células semelhantes a fibroblastos e células semelhantes a condrócitos próximas a áreas de neoformação óssea. A proteína OPN foi pouco expressa no primeiro e últimos tempo de avaliação, sendo fortemente positiva fase de neoformação óssea do grupo controle e do grupo tratado com BMP-2rh. O modelo adotado com defeito de não reparável espontaneamente permitiu a avaliação do processo de reparo ocorrido neste tipo de enxerto.

Os defeitos não reparáveis espontaneamente no esqueleto têm sido utilizados para estudo de novos materiais para enxerto (YAMAMOTO *et al.*, 1994; BOYNE, 1996; SCHRATT & SPYRA, 1997; JORGE, 1999; LUZ *et al.*, 1999; HOLLINGER *et al.*, 1998; ZELLIN *et al.*, 1998; SETO *et al.*, 2001), técnica cirúrgica (SANDBERG *et al.*, 1993; SHIROTA *et al.*, 1995; ZELLIN & LINDE, 1997; MARUKAWA *et al.*, 2002) e comportamento biológico (VILJANEN *et al.*, 1996; NAGAI *et al.*, 1998). Sua maior vantagem seria a evolução natural para fibrose do defeito, ficando assim claro que a formação óssea no local advém da técnica ou material empregados. Este conceito tem sido aplicado em estudo de diversos defeitos, entre eles cranial (VILJANEN *et al.*, 1996; ZELLIN *et al.*, 1998), mandibular (YAMAMOTO *et al.*, 1994; JORGE, 1999; LUZ *et al.*, 1999; KIMURA *et al.*, 2000; MARUKAWA *et al.*, 2002) e em ossos longos (WANGERIN *et al.*, 1986; SCHRATT & SPYRA, 1997; HOLLINGER *et al.*, 1998). Acredita-se que em defeitos não reparáveis espontaneamente os fatores de crescimento, como BMP e TGF- β 1 não alcançariam o centro do defeito ou não estariam presentes em quantidade suficiente,

deixando as células mesenquimais sem sofrerem diferenciação, proliferação e ativação para células produtoras de tecido ósseo, o que determinaria o preenchimento do defeito por tecido fibroso ou invasão por tecido muscular (SZACHOWICZ, 1995; ZELLIN & LINDE, 1997). Pesquisas com modelos experimentais sem este padrão poderiam ter parte dos resultados influenciados pelo potencial reparativo do leito receptor, o que dificultaria a avaliação do enxerto a ser testado (KABAN & GLOWACKI, 1981; GUTTU & LASKIN, 1989; HOLLINGER & KLEINSCHMIDT, 1990). Um exemplo destes modelos seria um defeito ósseo monocortical, cuja resolução espontânea é naturalmente a reparação óssea, mesmo sem tratamento. Por este motivo, em 1981, KABAN & GLOWACKI desenvolveram um modelo experimental com defeito não reparável espontaneamente no ramo mandibular, sendo que outros pesquisadores lançaram mão deste modelo para avaliar enxertos (YAMAMOTO *et al.*, 1994; JORGE, 1999), aglutinantes (LUZ *et al.*, 1999), membranas para reparação guiada (SANDBERG *et al.*, 1993; ZELLIN & LINDE, 1997) e fatores de crescimento (ZELLIN & LINDE, 1997; HIGUCHI *et al.*, 1999; OKUBO, 1999; KIMURA *et al.*, 2000). Embora este modelo já esteja estabelecido pela literatura (GUTTU & LASKIN, 1989; AABOE *et al.*, 1995), foi destacado (HOLLINGER & KLEINSCHMIDT, 1990) que a pouca espessura da mandíbula do rato dificultaria a retenção do material enxertado e limitaria o número de células mesenquimais envolvidas no processo da reparação. Na pesquisa aqui desenvolvida, não foi notada dificuldade de retenção do enxerto, porém é suposto que em pesquisas envolvendo partículas ou grânulos, a dificuldade seja manifesta (KABAN & GLOWACKI, 1981; YAMAMOTO *et al.*, 1994). Substâncias aglutinantes ou técnicas de retenção têm sido desenvolvidas para sanar este problema (LUZ *et al.*, 1999). Foi ressaltado que o menor número de células osteoprogenitoras no sítio receptor do enxerto confere maior destaque às capacidades de formação óssea do material a ser testado (AABOE *et al.*, 1995). Animais jovens ou em fase de crescimento possuem grande potencial reparativo ósseo, não sendo recomendada sua utilização para teste de enxertos, pois este potencial reparativo poderia mascarar a capacidade osteoindutora do material testado (HOLLINGER & KLEINSCHMIDT, 1990). Por este motivo os animais utilizados nesta pesquisa foram adultos. Porém, o modelo experimental deve reproduzir o melhor possível às peculiaridades da situação clínica que se

deseja estudar. Animais com idade avançada também devem ser evitados nestes tipos de pesquisa, pois foi relatado que possuem menor potencial reparador ósseo que animais adultos (GUTTU & LASKIN, 1989; NAGAI *et al.*, 1999). Estudos experimentais com finalidade de reparação de defeitos faciais têm utilizado ainda implante subperiosteal (SULLIVAN & SZWAJKUN, 1991) e defeitos segmentais da mandíbula (SHIROTA *et al.*, 1995; BOYNE, 1996; SETO *et al.*, 2001; MARUKAWA *et al.*, 2002). Além de estudos experimentais, outras metodologias têm contribuído para o estudo e desenvolvimento de materiais para enxerto, como a cultura celular para bioengenharia óssea (SYKARAS & OPPERMAN, 2003) e a transfecção viral (SOUTHWARD *et al.*, 2004).

A desvitalização do tecido ósseo transplantado no grupo controle foi um achado histológico já descrito pela literatura. A interrupção da irrigação sanguínea causada pela remoção no leito doador levou à necrose parcial do enxerto. Deve-se lembrar que este enxerto foi posicionado livre no leito receptor, sem uso de microcirurgia para revascularização. Desta forma, a única possibilidade de irrigação sanguínea foi através de perfusão local. Áreas trabeculares seriam mais favorecidas nesta hora, pois possuem menor espessura e os osteócitos estariam mais próximos da superfície. Este fato foi observado nesta pesquisa, onde parte do osso trabecular foi visto vitalizado após sete dias da cirurgia, enquanto o osso cortical, sendo mais espesso e compacto, sofreu necrose em maior área, restando muito pouco tecido viável após sete dias. A revascularização do local virá com a proliferação vascular endotelial trazida pelo tecido de granulação. A revascularização do osso trabecular ocorre antes que a do osso compacto, influenciando seu comportamento durante a incorporação (BURCHARDT, 1987; SULLIVAN & SZWAJKUN, 1991), pois a diferenciação osteoblástica é vista somente com a invasão vascular (REDDI, 1998). Este comportamento foi visto nesta pesquisa no grupo controle, enquanto a atividade do osso trabecular inicialmente foi produção de tecido ósseo seguida de reabsorção, o osso cortical mostrou inicialmente reabsorção das extremidades, passando posteriormente por neoformação óssea. O grupo tratado com enxerto autoclavado mostrou-se desvitalizado desde o primeiro dia e a revascularização foi muito lenta, podendo ser descrito que parte deste enxerto não se revascularizou, antes sofrendo encapsulação por tecido fibroso e reabsorção, tanto da parte trabecular quanto da cortical. O enxerto do grupo tratado com

BMP-2rh também se mostrou desvitalizado no primeiro dia, porém ocorreu rápida vascularização do osso trabecular acompanhada de neoformação óssea já na primeira semana. A revascularização do osso cortical foi mais lenta, sendo obtida com a sua reabsorção contínua e substituição por osso neoformado. Pesquisadores têm investido neste ponto para melhorar a incorporação do enxerto, acrescentando fatores de crescimento angiogênicos para acelerar a vascularização do local do enxerto. ZELLIN *et al.* (1998) relataram que a incorporação do enxerto autoclavado pode ser melhorada com uso de FGF-2, diminuindo o período necessário para a revitalização da área. A dose de BMP-2rh utilizada neste experimento aparentemente foi o suficiente para produzir vascularização que permitiu os eventos celulares pudessem ocorrer mais rapidamente que no grupo tratado somente com enxerto autoclavado.

A necrose óssea também foi encontrada na margem do defeito mandibular nos três grupos, podendo ser vista no primeiro dia em alguns espécimes e em todos a partir de sete dias. Esta necrose está relacionada possivelmente com o trauma térmico e mecânico ocasionado pelo uso da trefina durante a confecção do defeito. Foi descrita na literatura a morte de osteócitos próximos da área de osteotomia na mandíbula e enxerto, mesmo ao utilizar enxertos vascularizados (SHIROTA *et al.*, 1995) e livres (JORGE, 1999). A necrose óssea também é descrita nos cotos após fratura (TEIXEIRA *et al.*, 1998). As áreas de necrose do leito receptor não foram encontradas no tempo final de avaliação, pois sofreram reabsorção. Ao contrário, poucos remanescentes da cortical do enxerto autógeno e do grupo tratado com BMP-2rh permaneceram desvitalizados, ao passo que o grupo tratado com enxerto autoclavado mostrou extensa área desvitalizada no tempo final de 28 dias. Foi demonstrado que enxertos ósseos têm maior chance de sobreviver quando empregados vascularizados por microcirurgia (CHEN *et al.*, 1994; SHIROTA *et al.*, 1995, POGREL *et al.*, 1997). Mesmo empregando enxerto vascularizado necrose pode ocorrer na medula óssea e em parte da cortical (SHIROTA *et al.*, 1995). A utilização de enxertos vascularizados tem sido relacionada com a diminuição da reabsorção, ocorrendo preferencialmente a substituição da estrutura óssea original pela do osso receptor (SHIROTA *et al.*, 1995). A correção de defeitos extensos na mandíbula requer enxertos vascularizados, que desta forma poderiam sofrer processo de incorporação mais

rapidamente (CHEN *et al.*, 1994, POGREL *et al.*, 1996). Talvez a utilização de BMP-2 no enxerto possa, assim como mostrou neste experimento, acelerar a incorporação do enxerto, evitando a necessidade de utilização de enxertos vascularizados.

A produção de tecido ósseo durante a incorporação do enxerto foi relacionada principalmente com a atividade osteoblástica subperiosteal nos grupos controle e no tratado com enxerto autoclavado, embora neoformação óssea importante tenha sido encontrada no interior do enxerto autógeno. No grupo tratado com BMP-2rh a neoformação óssea estava presente em praticamente toda a região, sendo maior que nos outros dois grupos, tanto subperiosteal quanto naquela associada ao enxerto. A neoformação ligou a mandíbula ao enxerto no grupo autógeno e tratado com BMP-2rh, estabilizando-os, e desta forma teve função semelhante ao calo ósseo durante a reparação da fratura óssea (CARTER *et al.*, 1998; FERGUSON *et al.*, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 1998). No grupo tratado com enxerto autoclavado não houve união óssea, embora a neoformação a partir do leito receptor tenha envolvido a cortical do enxerto em alguns espécimes, fornecendo estabilidade parcial ao enxerto. Achado similar foi descrito para enxerto autoclavado e implantado em defeito de tíbia de rato (SCHRATT & SPYRA, 1997).

O enxerto autógeno mostrou ter potencial osteoindutor, com neoformação óssea principalmente associada ao osso trabecular, e osteocondutor, permitindo que sua estrutura fosse reabsorvida e utilizada para formação óssea a partir do leito receptor (JORGE, 1999). O enxerto autoclavado falhou em mostrar osteoindução, revelando possuir relativo potencial osteocondutor. Ao final de 28 dias o enxerto estava ainda pouco reabsorvido e o espaço cedido pela reabsorção não foi completamente preenchido por neoformação óssea, indicando uma possível reparação parcialmente fibrosa no local. Talvez um tempo de avaliação mais prolongado permitisse que sua incorporação ocorresse de forma mais completa, embora períodos de avaliação prolongados mostraram a não incorporação de enxerto autoclavado (SCHRATT & SPYRA, 1997). O enxerto tratado com BMP-2rh mostrou ser altamente osteoindutor, sendo que a quantidade de osso formado foi muito superior àquela necessária para promover a incorporação do enxerto autoclavado. Esta neoformação óssea estava ligada intimamente ao osso autoclavado e ao leito receptor, como

descrito por outros pesquisadores (WOZNEY & ROSEN, 1998). O tratamento do enxerto com BMP-2rh deixou-o também com capacidade osteocondutora, como visto no estudo histológico. A reparação deste grupo foi similar à do grupo autógeno, chegando os dois grupos ao tempo final com todos os defeitos reparados e em fase de remodelamento avançada. No grupo tratado com BMP-2rh o remodelamento pareceu estar mais adiantado, com presença de poucas áreas de osso do enxerto.

A presença de remanescentes de cortical ou trabéculas do enxerto no leito receptor pode diminuir a resistência mecânica do local (BURCHARDT, 1987; YASZEMSKI *et al.*, 1996), desta forma deve ser considerado como um dos objetivos do enxerto ser substituído completamente por osso neoformado. Quanto a este quesito o grupo tratado com BMP-2rh mostrou ser melhor, ao passo que o grupo tratado com enxerto autoclavado pode ser considerado deficiente. Numa situação clínica onde o leito receptor enxerto fosse submetido à torção ou pressão poderia haver fratura do enxerto ou do próprio leito receptor. De fato estudos clínicos com osso autoclavado relatam fratura como uma das complicações encontradas (ASADA *et al.*, 1997; BOHM *et al.*, 1998). O enxerto autógeno, considerado como a melhor opção no tratamento de defeitos ósseos, mostrou não estar completamente incorporado ao leito receptor com 28 dias, mas a avaliação após tempo superior talvez mostre resultados semelhantes entre este grupo e o tratado com BMP-2rh (JORGE, 1999). A persistência do volume ósseo criado nas fases iniciais do enxerto foi objeto de pesquisa de GORDH *et al.* (1999), relatando que o uso de BMP-2rh e osso autógeno sozinhos não foram capazes de manter o osso neoformado inicialmente sobre a calota craniana de ratos, necessitando de cobertura por membrana para osteopromoção. No mesmo experimento foi relatada rápida e extensa reabsorção do enxerto tratado com BMP-2rh. Tomando uma visão biomecânica para discutir estes resultados, eles não poderiam ser considerados como negativos, pois é esperado que o enxerto ósseo acima da calota craniana, sem função nem estímulo, seja continuamente reabsorvido até possuir estrutura óssea compatível com o local. A adição de BMP-2rh aparentemente acelerou a incorporação do enxerto autoclavado nesta pesquisa, sendo este resultado compatível com o encontrado por GORDH *et al.* (1999). O volume ósseo visto no período inicial nos grupos controle e tratado com BMP-2rh não é compatível com o ambiente biomecânico do ramo mandibular e o processo de

remodelamento guiou a formação e a reabsorção óssea para a diminuição do tecido ósseo. A neoformação motivou espessamento da mandíbula, na maioria dos casos até a altura do próprio enxerto, mesmo no grupo tratado com osso autoclavado. O remodelamento levou à diminuição da espessura do osso no leito receptor nos tempos finais de avaliação. SZACHOWICZ (1995) descreveu fatores que influenciam a taxa de incorporação do enxerto, citando a estabilidade do enxerto, idade do paciente, presença de infecção ou fibrose local, se o enxerto é cortical ou trabecular, história de irradiação e origem do enxerto, intramembranosa ou endocondral. A origem do enxerto deve ser levada em consideração segundo SZACHOWICZ (1995), pois os defeitos ósseos reparariam melhor quando tratados com enxerto da mesma origem. Defeitos em ossos do crânio, que na maioria são de origem intramembranosa, deveriam receber de preferência enxertos de origem intramembranosa, por exemplo a díploe. Diferenças na incorporação de ossos de origem intramembranosa e endocondral foram estudadas por SULLIVAN & SZWAJKUN (1991) sugerindo, ao contrário de SZACHOWICZ (1995), que estas diferenças estariam mais relacionadas com a estrutura do enxerto, trabecular ou cortical, e sua conseqüente capacidade de revascularização do que com sua origem.

O osso inicialmente formado foi imaturo, sem lamelas concêntricas, sem periósteo, com grande número de osteoblastos na periferia da matriz calcificada, estando os tipos celulares muito ativos, acidófilos e com núcleo grande em relação ao citoplasma. No tempo final de avaliação o osso neoformado estava mais maduro, se apresentando com menor volume, mais compacto, com menor número de células e presença de periósteo, ainda que não regular. Estes achados são aplicáveis aos três grupos, lembrando que a resposta biológica foi semelhante entre eles, no entanto os grupos controle e tratado com BMP-2rh produziram mais osso. EINHORN (1998) descreve que o número de células diminui consideravelmente com o início do remodelamento ósseo. O destino dessas células tem sido motivo de estudo, sendo reconhecido que parte dos osteoblastos serão envolvidos pela matriz, passando à condição de osteócitos. No entanto o grande número de células restantes não são vistas posteriormente, sendo relatado que elas possivelmente sofram morte celular programada, ou apoptose, com a maturidade do tecido ósseo (BOSTROM, 1998). REDDI (1998) citou que a apoptose faz parte da seqüência de reparo das fraturas, possivelmente

controlada pela BMP, enquanto FERGUSON *et al.* (1998) acrescentaram que a apoptose também faz parte da formação do osso embrionário. Foi descrito ainda que o gene *Ihh* regula a apoptose de condrócitos na placa de crescimento de ossos longos (HORTON *et al.*, 1998). Os condrócitos vistos na fase inicial deste experimento possivelmente cumpriram sua função biológica e, da mesma forma que os osteoblastos, foram removidos. Seria pouco provável que houvesse diferenciação de um tipo celular adulto em outro (EINHORN, 1998), desta forma sugerindo que foram removidos por apoptose, assim como na embriogênese de osso endocondral, na placa de crescimento de ossos longos e nas fraturas. O destino do osteoclasto, formado por fusão de monócitos, aparentemente também seria a apoptose (EINHORN, 1998).

A capacidade osteoindutiva de um enxerto é ligada à presença de sinais capazes de promover a formação óssea. Estes sinais são encontrados na matriz óssea, pois à medida que o tecido ósseo é formado fatores de crescimento como TGF- β 1, diversos tipos de BMP, VEGF, IGF I e II, PDGF, aFGF e bFGF são ligados a componentes da matriz, sendo liberados com a remoção do conteúdo mineral do osso na modelação do esqueleto e nas fraturas (ZELLIN *et al.*, 1998; KHAN *et al.*, 2000). Este fato condiz com os achados do grupo controle nesta pesquisa e na fratura de côndilo (TEIXEIRA *et al.*, 1998), onde as fases mais ativas de reabsorção são também aquelas mais ativas de formação óssea. No enxerto autógeno estes fatores exercem sua função biológica após serem liberados da matriz calcificada pelos osteoclastos, garantindo seu potencial osteoindutor.

O tratamento recebido pelo enxerto pode determinar a desnaturação das proteínas osteoindutoras presentes em sua matriz (BORCHERS *et al.*, 1998). O congelamento, aquecimento ou irradiação têm sido relatados como capazes de diminuir ou eliminar a osteoindução do enxerto (WANGERIN *et al.*, 1986; INOKUCHI *et al.*, 1991; ASADA *et al.*, 1997; SCHRATT & SPYRA, 1997). ASADA *et al.* (1997) descreveram que o processo de autoclavagem mantém a propriedade osteocondutora do enxerto, enquanto SCHRATT & SPYRA (1997) relataram que a autoclavagem pode eliminar até a capacidade osteocondutora do enxerto. O tratamento a 100°C por 10 minutos ou um ciclo de autoclavagem a 135°C por 10 minutos foram suficientes para eliminar a capacidade

osteointutora do enxerto (INOKUCHI *et al.*, 1991; ASADA *et al.*, 1997). BORCHERS *et al.* (1995) sugeriram que o calor denatura as proteínas do osso, eliminando seu potencial osteointutor. Já o enxerto autógeno tem a vantagem de possuir todos os fatores necessários para a reparação do defeito ósseo e, mesmo com os recentes avanços no entendimento da biologia óssea e seus mediadores, não há ainda um substituto à altura para o enxerto autógeno. Neste modelo experimental a escolha pela autoclavagem foi feita visando eliminar a possibilidade do sistema carreador possuir osteointução e interferir nos resultados obtidos pela BMP-2rh. Ao mesmo tempo foi necessário eliminar a capacidade do organismo receptor de reagir contra o enxerto, que foi removido de outro animal. SCHRATT & SPYRA (1997) relataram que a autoclavagem elimina a antigenicidade do enxerto. Foi demonstrado que a adição de BMP-2rh tornou o enxerto novamente osteointutor após o processo de autoclavagem neste experimento.

A origem dos osteoblastos que participam da incorporação do enxerto é incerta, mas diversos pesquisadores têm citado o perióstio (FERGUSON *et al.*, 1998; ZELLIN *et al.*, 1998; ITO *et al.*, 1999), perícitos (EINHORN, 1998), células mesenquimais indiferenciadas (REDONDO *et al.*, 1996; SI *et al.*, 1997; BOSTROM, 1998; FRANCESCHI, 1999; WEINSTEIN & MANOLOGAS, 2000), tecido muscular (ALAM *et al.*, 2001; LEVY *et al.*, 2001) e células semelhantes a fibroblastos (PERRIEN *et al.*, 2002; NAKAGAWA *et al.*, 2003) como fonte de atores para o palco da neoformação óssea. Tem sido demonstrada a capacidade da BMP-2rh induzir células indiferenciadas a se diferenciar em osteoblastos e condrócitos (SASANO *et al.*, 1996; BOSTROM, 1998; WEINSTEIN & MANOLOGAS, 2000). A diversidade de células que respondem à BMP, como osteoblastos, condrócitos, fibroblastos, fibras musculares, osteócitos e células mesenquimais indiferenciadas pode dificultar a avaliação da origem das células ativadas pelo enxerto com BMP-2rh (SYKARAS & OPPERMAN, 2003). LEVY *et al.* (2001) demonstraram em cultura celular a presença de células osteoprogenitoras em meio a fibras musculares, sendo possível supor que, devidamente estimuladas, possam participar da reparação óssea. Foi demonstrado que tecido muscular pode produzir tecido ósseo quando exposto a BMP-2rh (ALAM *et al.*, 2001). Neste experimento foi notado em alguns animais do grupo tratado com BMP-2rh que a neoformação óssea estava ocorrendo entre fibras musculares, sendo que marcação

positiva para OPN foi encontrada em células intimamente relacionadas com as fibras musculares. A expressão de OPN foi relatada em células se diferenciando em linhagem osteogênica (PERRIEN *et al.*, 2002). Foi relatado que a osteoindução da BMP é mais potente em tecido ósseo que em tecido muscular (OKUBO *et al.*, 1999). Neste estudo experimental aparentemente o tecido muscular participou da reparação cedendo células que respondiam à BMP-2rh. Num processo reparativo tão complexo, que envolveu tecido ósseo, cartilaginoso, vascular, muscular e inflamatório, talvez fosse possível que a origem dos osteócitos seja mais variada, não sendo somente do perióstio ou endóstio, mas também de células mesenquimais indiferenciadas, do tecido muscular e daquelas trazidas pela invasão vascular do tecido de granulação. A origem das células que irão formar o tecido condróide parece ser a mesma daquelas que irão formar o tecido ósseo. Foi relatado que os primeiros condróitos na reparação da fratura aparecem vizinhos à cortical, sendo sugerido por EINHORN (1998) que a origem dos condróitos na reparação óssea pode ser do perióstio. Contudo, experimentos têm demonstrado que BMP pode induzir células ósseas ou cartilaginosas dependendo do meio em que é expressa (SASANO *et al.*, 1996; SI *et al.*, 1997; NAKAGAWA *et al.*, 2003). Além das células do leito receptor, o enxerto autógeno contou com auxílio de células trazidas do osso ilíaco que possam ter sobrevivido ao transplante. Foi descrito que o tecido hematopoético abriga células mesenquimais que dariam origem às células osteogênicas (KHAN *et al.*, 2000), sendo um fator positivo para o sucesso do enxerto. Neste experimento foi notada resposta do perióstio já no primeiro dia de avaliação, com proliferação de tipos celulares semelhantes a osteoblastos ativos na camada interna do perióstio nos três grupos. A maior parte das células envolvidas na neoformação do grupo controle estavam associadas ao perióstio, embora neoformação tenha sido encontrada no espaço medular, associada a áreas vitalizadas do osso trabecular. No grupo tratado com enxerto autoclavado a neoformação ficou restrita basicamente ao leito receptor.

A presença de tecido cartilaginoso tem sido descrita na incorporação de enxertos ósseos (KABAN & GLOWACKI, 1981; SANDBERG *et al.*, 1993) e no calo formado durante a reparação de fraturas (SI *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 1998; VORTKAMP *et al.*, 1998). Alguns pesquisadores relacionaram a formação de tecido cartilaginoso durante a

reparação óssea com locais de vascularização deficiente (CARTER *et al.*, 1998). Além disso, a quantidade de tecido cartilaginoso formado pode aumentar se houver mobilidade no coto (LE *et al.*, 2001) e presença de pressão hidrostática (CARTER *et al.*, 1998). A presença do tecido cartilaginoso pode se prolongar na reparação se o fragmento não estiver bem imobilizado (LE *et al.*, 2001). VORTKAMP *et al.* (1998) relataram presença de cartilagem na reparação de fratura de osso longo até dia 14. Presença de cartilagem na reparação da fratura de mandíbula tem sido descrita (SI *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 1998), embora SPECTOR *et al.* (2001) tenham citado que ossos do crânio devam reparar sem formação de tecido cartilaginoso, pois são de origem intramembranosa. A estabilização da fratura diminui a formação de cartilagem, entretanto como este efeito mecânico é transformado em sinais biológicos que modificam a evolução da fratura para formação de cartilagem ou osso não é completamente conhecido. A população celular que participa destes eventos gerando tecidos diferentes possivelmente é a mesma, modificando apenas os sinais que causam a diferenciação celular para condrócitos ou osteoblastos.

A neoformação óssea com BMP-2rh tem sido relacionada com a presença de tecido cartilaginoso intermediário em local ectópico (SASANO *et al.*, 1996). No entanto a formação de tecido cartilaginoso pode estar ausente, dependendo do leito receptor e do sistema carreador (HIGUCHI *et al.*, 1999). Neste experimento houve formação intermediária de tecido condróide entre o dia sete e o dia 14, principalmente no grupo tratado com enxerto autoclavado e no grupo tratado com BMP-2rh. Nos tempos de um e de 28 dias o tecido cartilaginoso não estava presente. A presença de tecido condróide na reparação do enxerto não está completamente esclarecida, mas possivelmente estaria cumprindo as mesmas funções que o calo cartilaginoso na fratura, que é dar estabilidade ao coto até a formação do calo ósseo. Todavia, o tempo final de avaliação mostrou que a adição de BMP-2rh ao enxerto superou possíveis dificuldades com estabilidade. Após a calcificação da matriz cartilaginosa ocorre invasão vascular que leva células osteogênicas para o interior da cartilagem, que então é removida e substituída por tecido ósseo (EINHORN, 1998). Esse mecanismo é similar para formação de ossos endocondrais no período embrionário, na placa de crescimento e na reparação de fratura de osso longo. Aparentemente este mecanismo se repete quando há formação de cartilagem na

incorporação de enxertos. A via de sinalização que controla a formação e remoção de cartilagem possivelmente também se repete na incorporação de enxertos.

Assim como na fratura os cotos necessitam estar estabilizados, o enxerto deve permanecer firmemente posicionado ao leito receptor, caso contrário sua incorporação pode ser comprometida (BURCHARDT, 1987). A estabilidade do enxerto tem sido obtida através de fixação interna rígida (SHIROTA *et al.*, 1995; BOYNE, 1996; SETO *et al.*, 2001), pino intra-ósseo (ASADA *et al.*, 1997) ou ainda somente reposicionados sem aparato fixador (REDONDO *et al.*, 1995). Enxertos particulados apresentam dificuldade de fixação ao leito receptor (YAMAMOTO *et al.*, 1994; LUZ *et al.*, 1998). No experimento aqui desenvolvido, o enxerto foi posicionado com pressão sobre o leito receptor, fato conferido pelo formato do enxerto e pela plasticidade do osso ilíaco, composto por grande quantidade de osso esponjoso.

O osso ilíaco preserva-se no rato adulto com função hematopoética, enquanto a mandíbula mostra pouca ou quase nenhuma desta função, principalmente pelo espaço reduzido da medula óssea. A mudança da estrutura óssea do enxerto para aquela da mandíbula pode ser vista neste experimento, sugerindo que o direcionamento das atividades de remodelação é dado pelo leito receptor. Inicialmente houve diminuição do espaço medular decorrente da presença de tecido de granulação e neoformação óssea, que ocuparam o espaço entre as trabéculas mas, nos tempos finais, a diminuição estava associada à redução da estrutura óssea. Resultados similares foram descritos na literatura (SHIROTA *et al.*, 1995). No grupo controle e no tratado com BMP-2rh após 28 dias o espaço medular estava ocupado por tecido hematopoético e poucos adipócitos, com características celulares e de volume semelhantes à encontrada na mandíbula de um rato adulto. O grupo tratado com enxerto autoclavado mostrou pouca variação da estrutura do enxerto e seu espaço medular estava preenchido por tecido conjuntivo frouxo ou tecido envolvido na reabsorção do enxerto. A presença de tecido hematopoético e adipócitos no espaço medular é descrita como sinal de maturidade óssea do enxerto, indicando atraso na reparação em relação aos grupos controle e BMP-2rh.

O aumento do peso corporal é tido como uma das maneiras de avaliar o bem-estar dos ratos após alguma intervenção experimental. Nesta pesquisa todos os grupos mostraram ganho de peso, menos o de um dia, que manteve a média de peso. Assim, pode-se concluir que o experimento realizado na mandíbula não influenciou os processos normais de nutrição do rato e que a remoção do enxerto do íliaco não afetou a deambulação.

As regiões doadoras de enxertos autógenos tem sido o osso íliaco (SULLIVAN & SZWAJKUN, 1991; SHIROTA *et al.*, 1995), a mandíbula (REDONDO *et al.*, 1995), a calota craniana (SULLIVAN & SZWAJKUN, 1991) e a costela (WANGERIN *et al.*, 1986). No presente estudo no rato, a crista íliaca forneceu osso suficiente para preencher o defeito ósseo não reparável espontaneamente na mandíbula, sendo bem aceito pelo animal e não produzindo lesões visíveis duradouras. Desta forma, foi similar ao procedimento equivalente em seres humanos (BEIRNE *et al.*, 1996; KALK *et al.*, 1996; POGREL *et al.*, 1997). Outra semelhança encontrada em humanos foi o tipo anatômico de osso, constituído em sua maior parte por osso esponjoso, o que facilitou sua adaptação e maior estabilidade no defeito mandibular.

Embora a remoção de enxertos ósseos para procedimentos de reconstrução da região maxilo-facial possa ser feita na face medial da fíbula, escápula, na cortical craniana ou ainda na costela, o sítio doador mais freqüentemente utilizado e indicado é o osso íliaco (CHEN *et al.*, 1994). O volume de osso ali encontrado tem sido relatado ser suficiente para restaurar defeitos congênitos, causados por lesão traumática, remoção de tumores e extrema reabsorção da mandíbula edêntula (CHEN *et al.*, 1994; KALK *et al.*, 1996; POGREL *et al.*, 1997; STELLINGSMA *et al.*, 1998). A obtenção de enxerto ósseo no íliaco tem sido associada à ocorrência de hematoma, dor, edema, eritema, abscesso, febre, drenagem de material serosanguinolento, dificuldade de deambulação, parestesia do nervo cutâneo lateral da coxa, deformidade no contorno da crista íliaca e sensibilidade da pele e osso (BEIRNE *et al.*, 1996; KALK *et al.*, 1996). No entanto, estes problemas tendem à resolução em curto espaço de tempo (BEIRNE *et al.*, 1996). Os pacientes têm mostrado boa aceitação dos procedimentos de remoção do enxerto (KALK *et al.*, 1996). A boa resolução do ferimento cirúrgico da região dorsal do rato nesta pesquisa concorda com os relatos descritos em humanos.

O acompanhamento da evolução do enxerto por meio radiográfico é um método conveniente e adequado (LANE & SANDHU, 1987; GUTTU & LASKIN, 1989; VILJANEN *et al.*, 1996; HOLLINGER *et al.*, 1998; SETO *et al.*, 2001). Deve-se destacar que o exame radiográfico é secundário ao histológico em modelos experimentais, porém em humanos, onde os princípios de ética não permitem a obtenção sistemática de biópsias, a radiografia presta valioso auxílio na avaliação da reparação óssea.

A análise do conteúdo mineral através da densitometria tem sido utilizada para acompanhar a reparação de defeitos ósseos, tanto em animais quanto em humanos (LANE & SANDHU, 1987; BODNER *et al.*, 1993; FEIFEL *et al.*, 1994; BRESIN *et al.*, 1999; SOUTHARD *et al.*, 2000). A densitometria pode ser realizada diretamente sobre o indivíduo com aparelho densitométrico (SOUTHARD *et al.*, 2000) ou ainda a partir de película radiográfica convencional com auxílio de computador (BRESIN *et al.*, 1999). O uso de uma escala de alumínio como referencial para densitometria tem sido descrito como confiável (BODNER *et al.*, 1993; BRESIN *et al.*, 1999). SOUTHARD *et al.* (2000) encontraram resultados comparáveis entre o aparelho de densitometria convencional e a medição da densidade óssea com uso de radiografia dental com escala de alumínio. Foi destacado que a obtenção de radiografias odontológicas convencionais e sua utilização em densitometria é método de avaliação fácil de realizar, confiável e útil (BODNER *et al.*, 1993). Contudo, foi citado que os tecidos moles ao redor do osso, ou ainda a própria medula óssea, podem alterar o valor dos resultados, quando da utilização de radiografias convencionais (FEIFEL *et al.*, 1994).

Na análise das radiografias, a imagem encontrada foi condizente com os achados histológicos. O halo radiopaco presente a partir da primeira semana na margem do defeito está relacionado com a intensa proliferação óssea subperiostal. A redução do volume do enxerto foi acompanhada pela diminuição progressiva da opacidade do enxerto e dificuldade na delimitação do enxerto no tempo final. A área radiopaca no grupo tratado com BMP-2rh era neoformação óssea.

Os valores da DO no grupo controle sofreram aumento gradativo com o tempo, o que pode ser interpretado como aumento da radiopacidade local, com exceção do tempo de 21 dias, que mostrou diminuição da DO, dado encontrado também nos outros grupos e

possivelmente relacionado com atividade de reabsorção óssea. O teste estatístico de ANOVA não mostrou diferenças significativas neste grupo. No grupo tratado com enxerto autoclavado foi notada pouca variação da DO, resultado compatível com os achados histológicos. Dentro deste grupo também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. No grupo tratado com BMP-2rh chamou a atenção o aumento da DO na primeira semana. O teste estatístico de Kruskal-Wallis revelou diferenças estatisticamente significativas neste grupo. O grupo tratado com BMP-2rh mostrou diferenças significativas em relação ao grupo controle no teste de Kruskal-Wallis e ao grupo tratado com enxerto autoclavado no teste ANOVA. Testando um tempo de avaliação contra outro foram encontradas diferenças significativas entre o dia 21 e o dia 14 e 28 na análise de ANOVA. No tempo de 28 dias os três grupos não mostraram diferenças estatísticas, indicando que somente a medição do conteúdo mineral não é capaz de expressar o grau de incorporação do enxerto. Técnicas de análise densitométrica mais acuradas e adaptáveis a este tipo de pesquisa tornariam os resultados mais sensíveis às variações do conteúdo mineral encontrados neste modelo experimental.

A BMP-2 é reconhecida molécula indutora de osso (REDDI, 1998; WOZNEY & ROSEN, 1998), mantendo esta capacidade até mesmo em região ectópica (NAGAI *et al.*, 1996; OKUBO *et al.*, 1999). Sua utilização em enxertos tem sido estudada, tentando principalmente encontrar dosagem e material carreador eficiente para cada situação clínica (RIPAMONTI & REDDI, 1997) e definir uma formulação eficiente e desta forma evitar a remoção de enxerto autógeno, que embora possua os melhores resultados clínicos, carrega a desvantagem de provocar uma ferida cirúrgica e morbidade adicionais, ter limites de quantidade e qualidade e aumentar o tempo de cirurgia. Relatos na literatura indicam que a BMP-2rh pode substituir o enxerto autógeno na reparação de defeitos não reparáveis espontaneamente (HOLLINGER *et al.*, 1998; MARUKAWA *et al.*, 2002). Neste experimento os resultados encontrados permitem afirmar que a BMP-2rh associada com enxerto autoclavado promoveu a reparação do defeito mandibular, se equiparando ao enxerto autógeno. A BMP pode ser obtida a partir da purificação de matriz óssea de animais, sendo descrito que cerca de 100 quilos de osso podem gerar cerca de 1mg da proteína, no entanto sem apresentar alta pureza, podendo conter diversos tipos de BMP e

outras moléculas da matriz. Pesquisas têm indicado que a BMP obtida desta forma não apresenta antigenicidade importante quando implantada em animais de espécies diferentes (VILJANEN *et al.*, 1996). A BMP-2rh pode ser utilizada em diversos animais, pois é altamente conservada entre as espécies (SETO *et al.*, 2001). A BMP obtida por tecnologia recombinante apresenta maior grau de pureza, podendo ser produzida em grandes quantidades, mas atualmente ainda é um produto caro, o que dificulta sua indicação clínica (UEMURA *et al.*, 2001). Embora outros membros da família BMP tenham mostrado ser osteoindutores, como a BMP-4 e 7, a BMP-2 é a mais estudada com vistas à reparação de defeitos ósseos. Nova metodologia utilizando *E. coli* como organismo produtor da BMPrh foi desenvolvida para tentar diminuir os custos, mas mostrou ser menos potente que a produzida em células eucariotas (KIMURA *et al.*, 2000). A BMP-2rh utilizada nesta pesquisa foi produzida em *E. coli* e os resultados mostraram grande capacidade de osteoindução na dose de 20µg utilizada, podendo ser sugerido outras pesquisas para determinar se uma dose menor pode gerar os mesmos resultados. A dose de BMP a ser utilizada não deve levar em conta somente o tamanho do defeito a ser corrigido, mas também o ambiente do leito receptor, a pureza da BMP, o material carreador e a idade do animal, visto que estes fatores parecem influenciar a indução de osso (SASANO *et al.*, 1996; GORDH *et al.*, 1999; NAGAI *et al.*, 1999; KIMURA *et al.*, 2000). A utilização de BMP purificada pode requerer doses mais altas para correção de defeito ósseo, VILJANEN *et al.* (1996) implantaram 52mg de BMP extraída de osso de alce em defeito com 2,2cm na calota craniana de ovelha. MARUKAWA *et al.* (2002) utilizaram 9mg de BMP-2rh para correção de defeito segmental de 2cm em mandíbula de macaco. Experimentos empregando o mesmo modelo desta pesquisa utilizaram doses variadas. OKUBO *et al.* (1999) utilizaram 5µg, ZELLIN & LINDE (1999) 1 ou 8µg; KIMURA *et al.* (2000) 1 ou 10µg, enquanto HIGUCHI *et al.* (1999) empregaram uma concentração de 0,1mg/ml. De forma geral os melhores resultados são encontrados com doses maiores (BOYNE, 1996). RIPAMONTI & REDDI (1997) sugeriram a utilização da BMP produzida por tecnologia recombinante, pois a eficiência e a segurança da purificada ainda não são conhecidas.

O material carreador parece ter grande influência no comportamento biológico da BMP (SASANO *et al.* 1996; LEE *et al.*, 2001), sendo fundamental a associação de BMP

com o material carreador para produzir resposta biológica e definir a área na qual se deseja a neoformação óssea (WOSNEY & ROSE, 1998). RIPAMONTI & REDDI (1997) citaram que talvez o maior desafio para utilização da BMP seja desenvolver o material carreador adequado. O material mais utilizado nas pesquisas é o colágeno tipo I, na forma de esponja (SASANO *et al.*, 1996; BOYNE, 1996; OKUBO *et al.*, 1999; NAKAGAWA *et al.*, 2003) e gel (KING *et al.*, 1998). No entanto, o colágeno tipo IV tem sido descrito como eficiente material carreador (VILJANEN *et al.*, 1996; WOSNEY & ROSE, 1998; LEE *et al.*, 2001). Além de colágeno, copolímeros de ácido poliglicólico e polilático têm sido empregados, isoladamente (HIGUCHI *et al.*, 1999; MARUKAWA *et al.*, 2002) ou misturado com sangue ou medula óssea (ZELLIN & LINDE, 1999; SETO *et al.*, 2001). FRIESS *et al.* (1999) estudaram as propriedades do colágeno como carreador de BMP, indicando fortemente sua utilização, como material seguro e eficiente. Todas estas associações foram osteoindutoras. Além de levar a BMP até o local onde irá atuar nas células alvo, o material carreador também pode atuar na sua liberação contínua, sendo então considerado um sistema de liberação. A quantidade de BMP liberada e permanência no meio são fatores importantes, pois influenciam a diferenciação celular (REDDI *et al.*, 1998). Mais adequado ainda seria se o material fosse osteocondutor e facilitasse a infiltração, adesão e proliferação das células alvo da BMP. Neste experimento o material carreador testado foi osso autoclavado e colágeno tipo IV, sendo que o osso autoclavado pode guardar algum poder osteocondutor e a BMP ser naturalmente agregada às moléculas de colágeno tipo IV na matriz óssea (REDDI, 1998; KHAN *et al.*, 2000). KAPLAN & SHORE (1998) sugeriram que a associação de BMP com colágeno tipo IV pode aumentar sua concentração em sítio ectópico, aumentando o efeito osteoindutor. Dificuldades com o material carreador podem ser suplantadas no futuro através do aumento da expressão de BMP-2 endógena com a técnica de transfecção viral (SOUTHWOOD *et al.*, 2004) ou ainda com medicações que aumentem o efeito da BMP-2rh implantada (HORIUCHI *et al.*, 2001). O padrão de expressão de BMP-2 em segmentação parcial de mandíbula de rato indica que sua atividade é mais intensa nos períodos iniciais do reparo, voltando a valores básicos com o aparecimento do tecido ósseo lamelar maduro (SPECTOR *et al.*, 2001). Estes dados indicam que a necessidade maior de BMP-2 é no início da reparação, podendo a dose de

BMP-2 exógena diminuir após o período crucial do início da reparação da fratura e também na incorporação do enxerto, visto que os dois eventos parecem utilizar as mesmas vias de sinalização.

A presença de células positivas para BMP no tecido muscular próximo ao local da fratura pode denunciar a participação de células indiferenciadas deste tecido na reparação (BOSTROM, 1998). Seguindo esta hipótese, ALAM *et al.* (2001) induziram tecido muscular a se diferenciar em tecido ósseo com BMP-2rh. Dado que colabora ainda mais com esta possível participação das fibras musculares na reparação óssea foi apresentado por ZELLIN & LINDE (1997) ao descreverem que BMP formou mais tecido ósseo em defeito não reparável espontaneamente na mandíbula de rato quando o defeito não estava protegido por membrana, que reconhecidamente afasta o tecido muscular do leito receptor. Em um enxerto com pouca osteoindução talvez seja vantajoso separar o tecido muscular do defeito com membrana para reparação guiada, mas com o forte estímulo osteoindutor da BMP a presença de maior número possível de células alvo da BMP resultaria em mais osso formado. KAPLAN & SHORE (1998) em revisão sobre a fibrodisplasia ossificante progressiva relacionaram a BMP como fator causal da ossificação muscular encontrada nesta doença.

Células semelhantes a fibroblastos participam da reparação neste experimento, sendo encontradas em grande quantidade em diversos locais, e algumas com positividade para Shh, Ihh e OPN. BOSTROM, em 1998, descreveu positividade para BMP em tais células, sugerindo que atuam na diferenciação de osteoblastos. Além disso, NAKAGAWA *et al.* (2003) afirmaram que tais células expressaram colágeno II e fosfatase alcalina durante a indução óssea ectópica com BMP-2rh, podendo ser sugerido que estas células participem tanto na produção de matriz osteóide quanto da condróide, sendo seu fenótipo modificado com a necessidade ou presença de sinais para produção de osso ou cartilagem. Desta forma, pode ser sugerido que estas células sejam positivas para Shh e Ihh por apresentarem sinalização para diferenciação em condrócitos. Positividade para OPN nestas células estaria ligada à diferenciação para linhagem osteoblástica, pois OPN não é descrita em tecido cartilaginoso. A presença de receptores para BMP em linhagem osteoblástica, fibroblástica, mesenquimal e muscular (SYKARAS & OPPERMAN, 2003) colabora com a

idéia de que estes tipos celulares possam responder à BMP e participar da incorporação do enxerto.

O potencial clínico da BMP é grande e, embora mais pesquisa seja necessária para definir suas aplicações e limitações, o conhecimento atual já permite indicar seu uso em regeneração periodontal, colocação de implantes, levantamento do seio maxilar, aumento do processo alveolar, reparação de fraturas complicadas e enxertos ósseos (EINHORN, 1998; GOVENDER *et al.*, 2003; JUNG *et al.*, 2003; SYKARAS & OPPERMAN, 2003). A passagem do teste experimental para indicação em humanos deve levar em conta a similaridade do esqueleto entre as espécies, desta forma a realização de estudo em primatas não humanos é a mais indicada (YASZEMSKI *et al.*, 1996). O custo da BMP-2rh ainda é um fato limitador de sua indicação clínica, porém o desenvolvimento de novas tecnologias de obtenção pode diminuir seu custo (KIMURA *et al.*, 2000) e ainda novos materiais carreadores podem maximizar sua ação e diminuir a quantidade de BMP necessária e conseqüentemente seu custo (UEMURA *et al.*, 2001).

As proteínas hedgehog estão relacionadas com o controle da morfogênese e organogênese em diversas regiões do organismo humano (KRONMILLER & NGUYEN, 1996), mas atenção tem sido dada à sua participação na ossificação (CURRIE, 1998; IWAMOTO *et al.*, 1999). No ser humano foram identificados três membros desta família, a Indian, a Sonic e a Desert hedgehog. A Ihh e a Shh são expressas em condrócitos durante a formação embrionária do osso e na placa de crescimento de ossos longos até aproximadamente a puberdade (IWASAKI *et al.*, 1997; IWASAKI *et al.*, 1999). Ihh e Shh são membros de uma complexa rede que regula a ossificação endocondral e intramembranosa (IWAMOTO *et al.*, 1999). Recentemente foi descrita sua participação na reparação de fraturas de ossos longos (FERGUSON *et al.*, 1998; VORTKAMP *et al.*, 1998; FERGUSON *et al.*, 1999; MURAKAMI & NODA, 2000), que classicamente produzem grandes quantidades de tecido cartilaginoso. As hedgehogs são moléculas chave para a regulação da ossificação, controlando diversas outras proteínas, inclusive BMP. Embora não tenha sido ainda descrito na literatura, estas moléculas participam da incorporação do enxerto, atividade que possivelmente utiliza as mesmas vias de sinalização que as da reparação da fratura óssea.

A participação da Shh na reparação óssea parece ir além da regulação do tecido cartilaginoso, sendo relatado que esta proteína é capaz de causar a diferenciação de células de linhagem fibroblástica em células com função osteoblástica e sua expressão ectópica leva à ossificação sem a participação de tecido cartilaginoso, mas mediada por BMP-2, 4 e 7 (KINTO *et al.*, 1997; PATHI *et al.*, 2001), podendo ser sugerido neste experimento que Shh tenha atuado na diferenciação de células semelhantes a fibroblastos para a atividade osteoblástica. Cooperando com esta suposição, NAKAMURA *et al.* (1997) relataram que Ihh e Shh podem induzir a diferenciação de células de linhagem mesenquimal em osteoblástica. A BMP-2 não foi relacionada com a indução de Ihh (MURAKAMI *et al.*, 1997), portanto o número de células positivas para Ihh não deveria sofrer alteração pela presença da BMP-2 adicionada ao enxerto, hipótese não confirmada neste estudo, onde o grupo tratado com BMP-2rh mostrou número menor de positividade para Ihh que o tratado com enxerto autoclavado. No entanto esta variação talvez tenha ocorrido por outros fatores como a presença de tecido cartilaginoso ou a própria necessidade da expressão de Ihh. ZHU *et al.* (1999) relataram que a interação de Shh e BMP-2 pode variar conforme o ambiente onde atuam, pois na linhagem de células neurais embrionárias elas exercem função contrária, mas na reparação é suposto que atuem em conjunto numa mesma via de sinalização da formação óssea. A adição de BMP-2rh no enxerto autoclavado causou a diminuição da expressão de Shh. Baseado nos dados de KINTO *et al.* (1997) pode se supor que se BMP-2 já está presente no local, a produção de Shh será menor que aquela de um ambiente onde não há BMP-2 exógena. MURAKAMI & NODA (2000) relataram osteoblastos positivos para Ihh próximos a área de neoformação óssea durante a reparação de fratura de fêmur, fato semelhante ao descrito neste experimento. A produção de proteínas hedgehog por osteoblastos pode estar relacionada com a regulação da ossificação. As células expressando Ihh e Shh nas fraturas foram descritas próximas a áreas de ossificação. GRIMSRUD *et al.* (2001) publicaram estudo demonstrando que a BMP-2 pode estimular a maturação de condrócitos; talvez esta característica da BMP-2 tenha sido aproveitada durante a incorporação do enxerto ao acelerar a maturação do tecido cartilaginoso e sua conseqüente substituição por tecido ósseo. A expressão de Ihh na fratura óssea é similar à encontrada neste estudo (FERGUSON *et al.*, 1998; ITO *et al.*, 1999;

MURAKAMI & NODA, 2000), com ausência no início e positividade de sete a 21 dias. Ao contrário de FERGUSON *et al.* (1998) positividade para Ihh foi encontrada em um elemento do grupo tratado com enxerto autoclavado, onde talvez sua atividade biológica ainda fosse necessária, dado o atraso na incorporação visto neste enxerto. Resultado diferente foi relatado por ITO *et al.* (1999), onde a presença de Ihh foi detectada após oito horas da fratura de costela em camundongo. Outra função celular da Ihh seria o controle da apoptose de condrócitos na placa de crescimento (HORTON *et al.*, 1998), podendo estar desempenhando esta mesma função na fratura e incorporação de enxerto. Em outro estudo, a Ihh foi expressa mais cedo e por mais tempo em fraturas não estabilizadas que nas estabilizadas em tibia de rato (LE *et al.*, 2001), revelando que o ambiente mecânico também afeta a expressão de Ihh. Neste experimento a maior estabilidade obtida no grupo controle talvez tenha diminuído a expressão de Ihh, ao mesmo uma menor estabilidade nos grupos experimentais pode ter causado sua expressão por tempo prolongado. A descrição de células no tecido muscular com capacidade de se diferenciar em linhagem osteoblástica (LEVY *et al.*, 2001) explica em parte a positividade para Shh, Ihh e OPN. Além disso, a via de sinalização do gene Shh controla as células progenitoras musculares na vida embrionária e adulta (TAJBAKSH, 2003), havendo uma possibilidade que Shh induza a diferenciação de células indiferenciadas do tecido muscular para células osteoblásticas sob estímulo apropriado.

A expressão de OPN parece coincidir com o intervalo de atividade osteoblástica, desde sua diferenciação até o início do remodelamento. ITO *et al.* (1999) descreveram que OPN é expressa em abundância desde o início da reparação óssea em células indiferenciadas até a fase de remodelamento, quando sua expressão diminui consideravelmente. Neste estudo células indiferenciadas na região de periósteo, tecido de granulação e tecido muscular estavam positivas para OPN, com distribuição espacial similar à de ITO *et al.* (1999). Positividade foi também encontrada em linhas reversas do tecido ósseo, como descrito por COWLES *et al.* (1998). Chamou a atenção a ausência de positividade celular e da matriz na margem da neoformação óssea, pois logo abaixo onde os osteoblastos estavam sendo envolvidos pela matriz havia positividade para OPN. Estes dados são compatíveis com os descritos por COWLES *et al.* (1998) e PERRIEN *et al.* (2002), que

relataram a expressão de OPN não no início da ossificação, mas somente após a produção de parte da matriz osteóide e o começo da deposição mineral. GORSKI (1998) também relatou resultados similares, com ausência de expressão nos osteoblastos mais ativos com formato cúbico na periferia da neoformação óssea. A função biológica da OPN tem sido discutida, contudo seu papel não foi totalmente entendido. Estudos recentes indicam que possa atuar na mecanorrecepção, ajudando a transmissão de estímulos mecânicos para osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (NOMURA & YAMAMOTO, 2000; PERRIEN *et al.*, 2002), talvez através de sua ligação com o domínio extracelular da integrina encontrada nestes tipos celulares (UEMURA *et al.*, 2001). A OPN demonstrou limitar o crescimento dos cristais de hidroxiapatita através de ligação não específica (GORSKI, 1998), sendo esta a explicação para sua ausência na periferia da neoformação óssea, permitindo o desenvolvimento dos cristais de hidroxiapatita. Por meio deste estudo foi demonstrado que o enxerto alógeno autoclavado foi um eficiente meio carreador para BMP-2rh, sendo capaz de reparar o defeito ósseo mandibular no rato através de osteoindução e osteocondução com a participação das proteínas Indian e Sonic hedgehog e osteopontina.

7 – CONCLUSÕES

Através deste estudo sobre a influência da BMP-2rh na incorporação de enxerto autoclavado em defeito não reparável espontaneamente na mandíbula de rato e a participação das proteínas Shh, Ihh e OPN foi concluído que:

- 1 - O enxerto autógeno e o enxerto autoclavado associado com BMP-2rh levaram à reparação óssea do defeito não reparável espontaneamente na mandíbula do rato, mostrando atividade osteocondutora e osteoindutora.
- 2 - O enxerto autoclavado não estava incorporado ao leito receptor no tempo final de avaliação, mostrando pouca atividade osteocondutora.
- 3 - A adição de BMP-2rh ao enxerto autoclavado acelerou sua incorporação e induziu intensa neoformação óssea, unindo o enxerto ao leito receptor.
- 4 - O enxerto alógeno autoclavado mostrou ser eficiente meio carreador para a BMP-2rh.
- 5 - As proteínas Sonic hedgehog e Indian hedgehog foram expressas durante a incorporação do enxerto em condrócitos, osteoblastos e células semelhantes a fibroblastos e no tecido muscular acima do enxerto, estando presente do dia sete ao dia 28.
- 6 - A osteopontina foi expressa na matriz óssea, osteoblastos, osteócitos durante a incorporação do enxerto nos três grupos, sendo mais fortemente positiva no início da neoformação óssea e diminuindo com a maturidade óssea.
- 7 - O teste estatístico mostrou diferenças significativas nos valores de DO entre o grupo tratado com BMP-2rh e os outros dois, inferindo em maior formação óssea no grupo tratado com BMP-2rh.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABOE, M.; PINHOLT, E.M.; HJØRTING-HANSEN, E. Healing of experimentally created defects: a review. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 33, n. 5, p. 312-318, 1995.
- ALAM, I.; ASAHINA, I.; SETO, I.; ODA, M.; ENOMOTO, S. Prefabricated vascularized bone flap: A tissue transformation technique for bone reconstruction. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 108, n. 4, p. 952-958, 2001.
- ASADA, N., TSUCHIYA, H., KITAOKA, K., MORI, Y.; TOMITA, K. Massive autoclaved allografts and autografts for limb salvage surgery. A 1-8 year follow-up of 23 patients. **Acta Orthop. Scand.**, v. 68, n. 4, p. 392-395, 1997.
- BEIRNE, J.C.; BARRY, H.J.; BRADY, F.A.; MORRIS, V.B. Donor site morbidity of the anterior iliac crest following cancellous bone harvest. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 25, n. 4, p. 268-271, 1996.
- BODNER, L.; KAFFE, I.; COHEN, Z.; DAYAN, D. Long-term effect of desalivation on extraction wound healing: a densitometric study in rats. **Dentomaxillofac. Radiol.**, v. 22, n. 4, p. 195-198, 1993.
- BOHM, P.; SPRINGFELD, R.; SPRINGER, H. Re-implantation of autoclaved bone segments in musculoskeletal tumor surgery. Clinical experience in 9 patients followed for 1.1-8.4 years and review of the literature. **Arch. Orthop. Trauma Surg.**, v. 118, n. 1-2, p. 57-65, 1998.
- BORCHERS, R.E., GIBSON, L.J., BURCHARDT, H., HAYES, W.C. Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. **Biomaterials**, v. 16, n. 7, p. 545-551, 1995.
- BOSTROM, M.P.G. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. **Clin. Orthop. Related Res.**, v. 355, p. 116-123, 1998.
- BOYNE, P.J. Animal studies of the application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. **Bone**, v. 19, n. 1, suppl., p. 83-92, 1996.
- BRESIN, A.; KILIARIDIS, S.; STRID, K.G. Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 107, n. 1, p. 35-44, 1999.

- BURCHARDT, H. Biology of bone transplantation. **Orthop. Clin. North Am.**, v. 18, n. 2, p. 187-196, 1987.
- CARTER, D.R.; BEAUPRÉ, G.S.; GIORI, N.J.; HELMS, J.A. Mechanobiology of skeletal regeneration. **Clin. Orthop. Related Research.**, v. 355, p. 41-55, 1998.
- CHEN, Y.B.; CHEN, H.C.; HAHN, L.H. Major mandibular reconstruction with vascularized bone grafts: indications and selection of donor tissue. **Microsurgery**, v. 15, n. 4, p. 227-237, 1994.
- COBOURNE, M.T.; SHARPE, P. T. Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. **Arch. Oral Biol.**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2003.
- COWLES, E.A.; DeROME, M.E.; PASTIZZO, G.; BRAILEY, L.L.; GRONOWICZ, G.A. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. **Calfic. Tissue Int.**, v. 62, n. 1, p. 74-82, 1998.
- CURRIE, P.D. Hedgehog's escape from Pandora's box. **J. Mol. Med.**, v. 76, n. 6, p. 421-433, 1998.
- EINHORN, T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin. Orthop. Related Res.**, v. 355, p. 7-21, 1998.
- FEIFEL, H.; RIEDIGER, D.; WEISKE, R. Measurement of mandibular bone density after iliac crest grafting. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 23, n. 2, p. 104-109, 1994.
- FERGUSON, C.; ALPERN, E.; MICLAU, T.; HELMS, J.A. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? **Mech. Dev.**, v. 87, p. 57-66, 1999.
- FERGUSON, C.M.; MICLAU, T.; H.D., ALPERN, E.; HELMS, J.A. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 857, p. 33-42, 1998.
- FRANCESCHI, R.T. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: Role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 10, n. 1, p. 40-57, 1999.
- FRIESS, W.; ULUDAG, H.; FOSKETT, S.; BIRON, R.; SARGEANT, C. Characterization of absorbable collagen sponges as rhBMP-2 carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 187, n. 1, p. 91-99, 1999.

- GORDH, M.; ALBERIUS, P.; JOHNNELL, O.; LINDBERG, L.; LINDE, A. Effects of rhBMP-2 and osteopromotive membranes on experimental bone grafting. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 103, n. 7, p. 1909-1918, 1999.
- GORSKI, J.P. Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 9, n. 2, p. 201-223, 1998.
- GOVENDER, S.; CSIMMA, C.; GENANT, H.K. *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. **Bone Joint Surg. Am.**, v. 84, n. 12, p. 2123-2134, 2002.
- GRIMSRUD, C.D.; ROMANO, P.R.; SOUZA, M.; PUZAS, J.E.; SCHWARZ, E.M.; REYNOLDS, P.R.; ROISER, R.N.; O'KEEFE, R.J. BMP signaling stimulate chondrocyte maturation and the expression of indian hedgehog. **J. Orthop. Res.**, v. 19, n. 1, p. 18-25, 2001.
- GUTTU, R.L.; LASKIN, D.M. Animal research models in oral and maxillofacial surgery. In: Gay, W.I. (ed) **Methods of animal experimentations**, vol. 7, parte C, San Diego, Academic Press, 1989. P. 1-33.
- HIGUCHI, T.; KINOSHITA, A.; TAKAHASHI, K.; ODA, S.; ISHIKAWA, I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. **J. Periodontol.**, v. 70, n. 9, p. 1026-1031, 1999.
- HOLLINGER, J.O.; KLEINSCHMIDT, J.C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **J. Craniofac. Surg.**, v. 1, n. 1, p. 60-68, 1990.
- HOLLINGER, J.O.; SCHMITT, J.M.; BUCK, D.C.; SHANNON, R.; JOH, S-P.; ZEGZULA, H.D.; WOZNEY, J. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 43, n. 4, p. 356-364, 1998.
- HORIUCHI, H.; SAITO, N.; KINOSHITA, T.; WAKABAYASHI, S.; TSUTSUMIMOTO, T.; TAKAOKA, K. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced new bone

- formation in mice by the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline. **Bone**, v. 28, n. 3, p. 290-294, 2001.
- HORTON, W.E.; FENG, L.; ADAMS, C. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. **Matrix Biol.**, v. 17, n. 2, p. 107-115, 1998.
- INOKUCHI, T.; NINOMIYA, H.; HIRONAKA, R.; YOSHIDA, S.; ARAKI, M.; SANO, K. Studies on heat treatment for immediate reimplantation of resected bone. **J. Cranio-Max.-Fac. Surg.**, v. 19, n. 1, p. 31-39, 1991.
- ITO, H.; AKIYAMA, H.; SHIGENO, C.; IYAMA, K.; MATSUOKA, H.; NAKAMURA, T. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 262, n. 2, p. 443-451, 1999.
- IWAMOTO, M.; IWAMOTO, E.M.; KURISU, K. Actions of the Hedgehog proteins on skeletal cells. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 10, n. 4, p. 477-486, 1999.
- IWASAKI, M.; JIKKO, A.; LE, A.J. Age-dependent effects of hedgehog protein on chondrocytes. **J. Bone Joint Surg. Br.**, v. 81, n. 6, 1076-1082, 1999.
- IWASAKI, M.; LE, A.X.; HELMS, J.A. Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis. **Mech. Dev.**, v. 69, n. 1-2, p. 197-202, 1997.
- JORGE, R.S. Enxerto autógeno de osso ilíaco em defeito de tamanho crítico na mandíbula de rato. Piracicaba, 1999 (Tese de mestrado – FOP-UNICAMP).
- JUNG, R.E.; GLAUSER, R.; SCHARER, P.; HAMMERLE, C.H.; SAILER, H.F.; WEBER, F.E. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. **Clin. Oral Implant Res.**, v. 14, n. 5, p. 556-568, 2003.
- KABAN, L.B.; GLOWACKI, J. Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. **J. Dent. Res.**, v. 60, n. 7, p. 1356-1364, 1981.
- KALK, W.W.I.; RAGHOEBAR, G.M.; JANSMA, J.; BOERING, G. Morbidity from iliac crest bone harvesting. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 54, n. 12, 1424-1429, 1996.
- KAPLAN, F.S.; SHORE, E.M. Encrypted morphogens of skeletogenesis. Biological errors and pharmacologic potentials. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, n. 4, p 373-382, 1998.
- KHAN, S.N.; BOSTROM, M.P.G.; LANE, J.M. Bone growth factors. **Orthop. Clin. North Am.**, v. 31, n. 3, p. 375-387, 2000.

- KIMURA, M.; ZHAO, M.; ZELLIN, G.; LINDE, A. Bone-inductive efficacy of recombinant human bone morphogenetic protein-2 expressed in *Escherichia coli*. An experimental study in rat mandibular defects. **Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.**, v. 34, n. 4, p. 289-299, 2000.
- KING, G.N.; KING, N. HUGHES, F.J. Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration *in vivo*. **J. Periodont. Res.**, v. 33, n. 4, p. 226-236, 1998.
- KINTO, N.; IWAMOTO, M.; IWAMOTO, M. *et al.* Fibroblasts expressing Sonic hedgehog induce osteoblast differentiation and ectopic bone formation. **FEBS Letters**, v. 404, n. 2-3, p. 319-323, 1997.
- KRONMILLER, J.E.; NGUYEN, T. SPATIAL AND TEMPORAL DISTRIBUTION OF INDIAN HEDGEHOG mRNA in the embryonic mouse mandible. **Arch. Oral Biol.**, v. 41, n. 6, p. 577-583, 1996.
- LANE, J.M.; SANDHU, H.S. Current approaches to experimental bone grafting. **Orthop. Clin. North Am.**, v. 18, n. 2, p. 213-225, 1997.
- LAURITZEN, C.; ALBERIUS, P.; SANTANELLI, F.; VÄLLFORS, B.; LILJA, J.; STEPHENSEN, H. Repositioning of craniofacial tumorous bone after autoclaving. **Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.**, v. 25, n. 2, p. 161-165, 1991.
- LE, A.J.; MICLAU, T.; HU, D.; HELMS, J.A. Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. **J. Orthop. Res.**, v. 19, n. 1, p. 78-84, 2001.
- LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **Int. J. Pharmac.**, v. 221, n. 1, p. 1-22, 2001.
- LEVY, M.M.; JOYNER, C.J.; VIRDI, A.S.; REED, A.; TRIFFITT, J.T.; SIMPSON, A.H.R.W.; KENWRIGHT, J.; STEIN, H.; FRANCIS, M. J. O. Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: An *in vitro* study. **Bone**, v. 29, n. 4, p. 317-322, 2001.
- LIM, N.; MULHERN, M.G.; JOSHI, N.; WATERHOUSE, N.; PETERSON, D.; COGHLAN, B. The use of autologous autoclaved bone in orbital reconstruction after exenteration for invasive cutaneous carcinoma. **Orbit.**, v. 21, n. 3, p. 181-187, 2002.

- LUZ, J.G.C.; SANTIAGO, J.L.; JORGE, R.S.; ARAUJO, V.C. Effect of freeze-dried bone and a dextran agglutinant on the healing of defects in the rat mandible. **J. Oral Implantol.**, v. 25, n. 3, p. 203-206, 1999.
- MARUKAWA, E.; ASAHINA, I.; ODA, M.; SETO, I.; ALAM, M.; ENOMOTO, S. Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human morphogenetic protein-2. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 31, n. 3, p. 294-302, 2002.
- MURAKAMI, S.; NIFUJI, A.; NODA, M. Expression of indian hedgehog in osteoblasts and its posttranscriptional regulation by transforming growth factor- β . **Endocrinol.**, v. 138, n. 5, p. 1972-1978, 1997.
- MURAKAMI, S.; NODA, M. Expression of indian hedgehog during fracture healing in adult rat femora. **Calcif. Tissue Int.**, v. 66, n. 4, p. 272-276, 2000.
- NAGAI, N., QIN, C.L., NAGATSUDA, H., INOUE, M., ISHIWARI, Y. Age effects on ectopic bone formation induced by purified bone morphogenetic protein. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 28, n. 2, p. 143-150, 1999.
- NAKAGAWA, T.; FUGIYAMA, T.; SHIMIZU, K.; MURATA, T.; NARITA, M.; NAKAMURA, S.; TAGAWA, T. Characterization of the development of ectopic chondroid/bone matrix and chondrogenic/osteogenic cells during osteoconduction by rhBMP-2: a histochemical and ultrastructural study. **Oral Diseases**, v. 9, n. 5, p. 255-263, 2003.
- NAKAMURA, T.; AIKAWA, T.; ENOMOTO, M.; IWAMOTO, M. *et al.* Induction of osteogenic differentiation by hedgehog proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 237, n. 2, p. 465-469, 1997.
- NOMURA, S.; YAMAMOTO, T.T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. **Matrix Biol.**, v. 19, n. 1, p. 91-96, 2000.
- OKUBO, Y.; BESSHO, K.; FUJIMURA, K.; KUSUMOTO, K.; OGAWA, Y.; TANI, Y.; IIZUKA, T. Comparative study of intramuscular and intraskeletal osteogenesis by recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 87, n. 1, p. 34-38, 1999.

- PATHI, S.; WETPHAL, S.P.; BAKER, D.P. *et al.* Comparative biological response to human sonic, indian and desert hedgehog. **Mech. Dev.**, v. 106, n. 1-2, p. 107-117, 2001.
- PERRIEN, D.S.; BROWN, E.C.; ARONSON, J.; SKINNER, R.A.; MONTAGUE, D.C.; BADGER, T.M.; LUMPKIN, C.K. Immunohistochemical study of osteopontin expressing during distraction osteogenesis in the rat. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 50, n. 4, p. 567-574, 2002.
- POGREL, M.A.; PODLESH, S.; ANTHONY, J.P.; ALEXANDER, J. A comparison of vascularized and nonvascularized bone grafts for reconstruction of mandibular continuity defects. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 55, n. 11, p. 1200-1206, 1997.
- REDDI, A.H. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. **Clin. Orthop. Related Res.**, v. 355, p. 66-72, 1998.
- REDONDO, L.M.; CANTERA, J.M.G.; HERNÁNDEZ, A.V.; PUERTA, C.V. Effect of particulate porous hydroxyapatite on osteoinduction of demineralized bone autografts in experimental reconstruction of the rat mandible. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 24, n. 6, p. 445-448, 1995.
- RIPAMONTI U., REDDI A.H. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 8, n. 2, p. 154-163, 1997.
- SANDBERG, E.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 51, n. 10, p. 1106-1114, 1993.
- SASANO, Y., MIZOGUCHI, I., TAKAHASHI, I., KAGAYAMA, M., SAITO, T., KUBOKI, Y. BMPs induce intramembranous and/or endochondral ossification in ectopic sites depending on the physicochemical property of the carrier. **Connective Tis. Res.**, v 35, n 1-4, p 292, 1996.
- SCHRATT, H.E.; SPYRA, J.L. Experimental studies of healing and antigenicity of sterilized bone transplants. **Chirurg.**, v. 68, n 1, p 77-83, 1997.

- SETO, I.; ASAHINA, I.; ODA, M.; ENOMOTO, S. Reconstruction of the primate mandible with a combination graft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 59, n. 1, p. 53-61, 2001.
- SHI, S.R.; KEY, M.E.; KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 39, n. 6, p. 741-748, 1991.
- SHIROTA, T.; SCHMELZEISEN, R.; OHNO, K.; MICHI, K. Experimental reconstruction of mandibular defects with vascularized iliac bone grafts. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 53, n. 5, p. 566-571, 1995.
- SI, X.H.; JIN, Y.; YANG, L.J.; TIPOE, G.L.; WHITE, F.H. Expression of BMP-2 and TGF- β 1 mRNA during healing of the rabbit mandible. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 105, n. 4, p. 325-330, 1997.
- SOUTHARD, K.A.; SOUTHARD T.E.; SCHLECHTE, J.A.; MEIS, P.A. The relationship between the density of the alveolar processes and that of post-cranial bone. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 4, p. 964-969, 2000.
- SOUTHWOOD, L.L.; FRISBIE, B.B.; KAWCAK, C.E.; GHIVIZZANI, S.C.; EVANS, C.H.; McILWRAITH, C.W. Evaluation of Ad-BMP-2 for enhancing fracture healing in an infected defect fracture rabbit model. **J. Orthop. Res.**, v. 22, n. 1, p. 66-72, 2004.
- SPECTOR, J.A.; LUCHS, J.S.; MEHRARA, B.J.; GREENWALD, J.A.; SMITH, L.P.; LANGAKER, M.T. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 107, n. 1, p. 124-134, 2001.
- STELLINGSMA, C.; RAGHOEBAR, G.M.; MEIJAR, H.J.A.; BATENBURG, R.H.K. Reconstruction of extremely resorbed mandible with interposed bone grafts and placement of endosseous implants. A preliminary report on outcome and patient's satisfaction. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 36, n. 4, p. 290-295, 1998.
- SULLIVAN, W.G.; SZWAJKUN, P.R. Revascularization of cranial versus iliac bone grafts in the rat. **Plast. Rec. Surg.**, v. 87, n. 6, p. 1105-1109, 1991.

- SYKARAS, N.; OPPERMAN, L.A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? **J. Oral Sci.**, v. 45, n. 2, p. 57-73, 2003.
- SZACHOWICZ, E.H. Facial bone wound healing. An overview. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, v. 28, n. 5, p. 865-880, 1995.
- TEIXEIRA, A.C.B.; LUZ, J.G.C.; ARAÚJO, V.C.; ARAÚJO, N.S. Healing of the displaced condylar process fracture: an experimental study. **J. Cranio-maxillofac. Surg.**, v. 26, n. 5, p. 326-330, 1998.
- UEMURA, T.; NEMOTO, A.; LIU, Y.K. *et al.* Osteopontin involvement in bone remodeling and its effects on in vivo osteogenic potential of bone marrow-derived osteoblasts /porous hydroxyapatite constructs. **Mater. Sci. Eng.**, v. 17, p. 33-36, 2001.
- VILJANEN, V.V.; GAO, T.J.; LINDHOLM, T.C.; LINDHOLM, T.S.; KOMMONEN, B. Xenogeneic moose (*Alces alces*) bone morphogenetic protein (mBMP)-induced repair of critical-size skull defects in sheep. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 25, n. 3, p. 217-222, 1996.
- VORTKAMP, A.; PATHI, S.; PERETTI, G.M.; CARUSO, E.M.; ZALESKE, D.J.; TABIN C.J. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. **Mech. Dev.**, v. 71, n. 1, p. 65-76, 1998.
- WANGERIN, K.; EWERS, R.; WOTTGE, H-U.; RANDZIO, G. The autoclaved autogenous bone graft as a re-implant. Results of animal experiments. **J. Max.-Fac. Surg.**, v 14, n 3, p 132-137, 1986.
- WEINSTEIN, R.S.; MANOLOGAS, S.C. Apoptosis and osteoporosis. **Am. J. Med.**, v. 108, n. 2, p. 153-164, 2000.
- WOZNEY, J.M.; ROSEN, V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. **Clin. Orthop. Related Res.**, v. 346, p. 26-37, 1998.
- YAMAMOTO, M.K.; LUZ, J.G.C.; ARAÚJO, V.C. Resposta tecidual óssea frente à hidroxiapatita granular implantada em defeitos criados na mandíbula de ratos. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 8, n. 4, p. 281-286, 1994.

- YASZEMSKI, M.J.; PAYNE, R.G.; HAYES, W.C.; LANGER, R.; MIKOS, A.G.
Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 175-185, 1996.
- ZELLIN, G.; ALBERIUS, P.; LINDE, A. Autoclaved bone for craniofacial reconstruction: Effects of supplementation with bone marrow or recombinant human fibroblast growth factor-2. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 102, n. 3, p. 792-800, 1998.
- ZELLIN, G.; LINDE, A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. **J. Biomed. Mat. Res.**, v. 35, n. 2, p. 181-190, 1997.
- ZHU, G.; MEHLER, M.F.; ZHAO, J.; YUNG, S.Y.; KESSLER, J.A. Sonic hedgehog and BMP2 exert opposing actions on proliferation of embryonic neural progenitor cells. **Dev. Biol.**, v. 215, n. 1, p. 118-129, 1999.