



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



RUBENS MORENO DE FREITAS

**COMPARAÇÃO ENTRE ENXERTO ÓSSEO
AUTÓGENO E rhBMP-2 (INFUSE BONE GRAFT®) NA
RECONSTRUÇÃO DE MAXILA ATRÓFICA
ANTERIOR**

Araraquara

2013



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



RUBENS MORENO DE FREITAS

**COMPARAÇÃO ENTRE ENXERTO ÓSSEO
AUTÓGENO E rhBMP-2 (INFUSE BONE GRAFT®) NA
RECONSTRUÇÃO DE MAXILA ATRÓFICA
ANTERIOR**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Implantodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: *Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior*

Co-orientador: *Prof. Dr. Luís Antônio Violin D. Pereira*

Araraquara

2013

DADOS CURRICULARES

Rubens Moreno de Freitas

NASCIMENTO 30 de dezembro de 1986 – Ribeirão Preto/SP

FILIAÇÃO Rubens Reis de Freitas

Cecilia Moreno Torrecilha de Freitas

Graduação em Odontologia

2005 – 2008 Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Pós-graduação em Odontologia – Nível de Doutorado

2009 – 2013 Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Pós-Graduação – Doutorado “Sanduíche”

2012 – 2013 LAPCR, Department of Oral Biology
School of Dental Medicine
Georgia Regents University, Augusta/GA, EUA

Dedicatória

A **Deus**, fonte de bênçãos, força, proteção e inspiração, a Quem estou ligado antes de tudo, por colocar em meu caminho, no momento certo, as pessoas precisas para me compreender, orientar e mostrar novos horizontes.

Aos meus pais, Dr. **Rubens** e Dra. **Cecilia**, modelos de caráter e trabalho íntegro, pelo apoio em todas as dificuldades, por terem me ensinado valores que sempre farão parte da minha vida e do meu sucesso profissional. A vocês, minha gratidão, incondicional e eterna.

Ao meu irmão **Vitor**, amigo de todas as horas, sempre pronto a me incentivar e apoiar, dedico esse trabalho com carinho.

À **Telma (Tete)**, amada e companheira, por compreender e respeitar minha ausência necessária aos estudos e trabalhos. Serei eternamente grato pelo carinho e apoio em todos os momentos difíceis.

Agradecimentos Especiais

Ao meu mestre, **Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior**, por todo apoio e confiança depositados em mim, desde o momento em que conheci essa Faculdade. Agradeço por sua amizade, incentivo e oportunidades, por me ajudar a vencer desafios e a estabelecer metas. Minha eterna admiração e gratidão.

À **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, por ter participado de minha formação, dispondo de seu tempo a me ajudar a tomar decisões e a entender muitas das etapas desse estudo. Seu carinho, apoio, ajuda e atenção foram imprescindíveis.

Ao **Prof. Dr. Luís Antônio Violin Dias Pereira** meus mais profundos agradecimentos por ser meu co-orientador. Mesmo que a palavra "obrigado" signifique tanto, não expressará por inteiro o quanto sua atenção e dedicação foram importantes nesta caminhada.

Ao **Prof. Dr. Ulf M. E. Wikesjö** e **Prof. Dr. Cristiano Susin** por terem me acolhido em seu laboratório (LAPCR), compartilhando seus mais valiosos ensinamentos e amizade. A dedicação e o amor de vocês à ciência é um exemplo a ser seguido. Não existem palavras que expressem todos os momentos especiais que vivenciei, sou muito grato.

Ao **Prof. Dr. Elcio Marcantonio**, por toda sua dedicação à odontologia e compartilhamento de sua experiência com seus seguidores. Seu exemplo estará sempre presente ao longo de minha vida.

Ao amigo **Claudio Marcantonio**, meus sinceros agradecimentos por todo o suporte durante a realização deste estudo. Sua sincera opinião e conselhos foram motivadores. Pessoas como você são raras.

Ao **Prof. Dr. Rubens Spin Neto**, pela amizade, confiança, ensinamentos e pelo tempo dedicado me auxiliando.

Aos **pacientes** participantes deste estudo. Agradeço a confiança e o respeito de cada um, espero que a ética e o respeito por mim empregado no tratamento reabilitador possa trazer melhora a vida de vocês. Agradeço essa doação imensurável à ciência.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de seu Diretor, Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon, e Vice-Diretora, Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, e a todos os docentes do Curso de Pós- Graduação, pela formação e exemplo.

Aos docentes da Disciplina de Periodontia, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico e Profa. Dra. Daniela Leal Zandim Barcelos pela formação e orientação.

À todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, Cláudia, Leandro, Sra. Maria do Rosário, Maria José (Zezé), Regina Lúcia, Isabela e Esther, cujo trabalho, dedicação e compreensão possibilitaram a realização desse trabalho.

Ao Pedrinho, Leandro e à Claudinha, pela ajuda preciosa e dedicação na confecção dos cortes histológicos apresentados neste trabalho.

Aos demais funcionários e colegas do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela paciência e admirável interesse em nos ajudar.

À equipe da CAECO pelo apoio imprescindível na realização deste estudo.

Aos funcionários da APCD de São Carlos por gentilmente cederem a clínica quando necessário.

Aos amigos do curso de Especialização em Implantodontia da APCD de São Carlos e do Programa de Pós-graduação em Odontologia pela amizade sincera e inesquecíveis momentos de convivência, em especial ao Rafael Molon, João Paulo Steffens, Luiz Guilherme (Luizinho), Fausto Frizera Borges, Aloisio Junior, João Antonio Chaves, Pablo Ramalho, Elton Pichotano (Eltinho) e todos os outros que de alguma maneira também contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas que tive o prazer de conviver durante meu estágio de doutorado “Sanduíche” em Augusta, GA – EUA, em especial aos amigos Samuel, Jason, Hilde, Wagner e André.

Ao meu amigo Rodrigo Bracco da Silva, pelo companheirismo e amizade sincera.

À FAPESP, pelo apoio concedido, indispensável para a realização deste trabalho, e a CAPES e CNPq pela bolsa de estudo, permitindo me dedicar na realização deste estudo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho, minha mais sincera gratidão.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar.”

Voltaire

“Uma geração constrói uma estrada por onde a outra trafega.”

Eleanor Roosevelt

Freitas RM. Comparação entre enxerto ósseo autógeno e rhBMP-2 (INFUSE Bone Graft®) na reconstrução de maxila atrófica anterior [tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Resumo

O objetivo do estudo foi comparar o uso de rhBMP-2/ACS com o do enxerto ósseo autógeno para aumento ósseo em espessura na região anterior de maxila. 24 pacientes foram selecionados e divididos de forma randomizada em 2 grupos: Grupo 1 – rhBMP-2/ACS ou Grupo 2 – enxerto ósseo autógeno intraoral particulado. Uma malha de titânio foi utilizada para manutenção do arcabouço dos enxertos. O ganho ósseo clínico, a análise histológica/histomorfométrica (biópsia aos 6 meses), tomografias (pré-operatória, 3 e 6 meses) e PCR em tempo real (raspagem de osso neoformado obtida aos 6 meses) foram os métodos de avaliação. Clinicamente, o pós-operatório foi estável. O aumento ósseo médio em espessura clínica foi $3,2\pm 0,9$ vs. $3,7\pm 2,1$ mm ($p=0,31$) para o Grupo 1 e Grupo 2, respectivamente. O Grupo 1 apresentou aumento ósseo tomográfico significativo aos 2mm da crista óssea quando comparado ao Grupo 2 ($1,5\pm 0,7$ vs. $0,5\pm 0,9$ mm; $p=0,01$). Na análise histológica, o Grupo 1 apresentou uma medula óssea significativamente rica em células e vasos sanguíneos ($p=0,002$) quando comparado ao Grupo 2, entretanto, nenhuma diferença estatística foi encontrada para os outros parâmetros. PCR em tempo real resultou em maior expressão gênica de BMP2 e Runx2 ($p=0,001$ e $p=0,0021$, respectivamente) no Grupo 1 e RANKL:OPG, BSP e OPN no Grupo 2

($p=0,01$, $p=0,005$ e $p=0,0009$, respectivamente). Um total de 62 implantes foram instalados aos 6 meses. Em conclusão, o Grupo 1 apresentou um aumento ósseo clínico e tomográfico comparável ao Grupo 2, apresentando um resultado histológico e de expressão gênica superior, sugerindo ser uma alternativa viável ao enxerto ósseo autógeno.

Palavra – chaves: regeneração óssea, ensaio clínico controlado aleatório, aumento do rebordo alveolar.

Freitas RM. The use of autogenous bone graft and rhBMP-2 (INFUSE Bone Graft®) for alveolar ridge reconstruction of anterior atrophic maxilla [tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Abstract

The objective of this study was to compare bone augmentation in the anterior maxilla following implantation of rhBMP2/ACS vs. autogenous bone graft. In this study, 24 patients were selected and equally randomized into 2 groups: Group 1 - rhBMP2/ACS or Group 2 - intraoral particulated autogenous bone graft. A titanium mesh was used for space provision in both Groups. Average clinical bone gain, histological/histomorphometrical (core biopsy obtained at 6 month), CBCT (preoperative, 3 and 6 months follow-up) and real time PCR (new bone scraped at 6 months) were used as evaluation methods. Clinical healing was generally uneventful. Mean clinical ridge width increased 3.2 ± 0.9 vs. 3.7 ± 2.1 mm ($p=0.31$) for Group 1 and Group 2, respectively. Group 1 yielded statistically significant CBCT bone gain only at subcrestal level compared with Group 2 (1.5 ± 0.7 vs. 0.5 ± 0.9 mm; $p=0.01$). In the histological analysis, specimens from group 1 showed bone marrow significant richer in cells and capillaries ($p=0.002$) than Group 2, however no difference was found in other parameters. Real time PCR showed higher expression of genes BMP2 and Runx2 in Group 1 ($p=0,001$ e $p=0,0021$, respectively) and RANKL:OPG, BSP and OPN in Group 2 ($p=0,01$, $p=0,005$ and $p=0,0009$, respectively). A total of 62 implants were installed after 6 months. In conclusion, Group 1 supported clinically and tomographically relevant alveolar ridge augmentation of comparable magnitude to

Group 2, presenting more favorable histological and gene expression results, suggesting an alternative for autogenous bone graft.

Keywords: bone regeneration, controlled clinical trial, alveolar ridge augmentation

Sumário

1	Introdução.....	16
2	Proposição.....	20
3	Capítulos (Revisão e Resultados).....	21
	Capítulo 1: O uso de rhBMP-2 para aumento ósseo maxilar: relato de caso clínico.....	22
	Capítulo 2: Alveolar Ridge and Maxillary Sinus Augmentation Using rhBMP-2: Systematic Review.....	30
	Capítulo 3: Horizontal Ridge Augmentation of the Atrophic Anterior Maxilla Using rhBMP-2/ACS or Autogenous Bone Graft: A Randomized Clinical Trial.....	52
	Capítulo 4: Horizontal ridge augmentation in the anterior maxilla following rhBMP-2/ACS or Autogenous Bone Graft: histomorphometrical analysis and gene expression profile.....	70
4	Considerações Finais.....	94
5	Conclusões Gerais.....	98
	Referências.....	99
	Apêndice: Material e Método.....	104
	Anexos	
	Anexo 1 – Certificado Comitê de Ética.....	123
	Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	124

1 Introdução

O uso de implantes osseointegráveis é uma opção previsível nos tratamentos de reabilitação oral. O sucesso desse tipo de tratamento depende da disponibilidade óssea na região a ser reabilitada e requer, idealmente, cerca de 2 mm de espessura óssea ao redor do implante²⁹. Em casos onde o processo de remodelação óssea apresenta-se em desequilíbrio e há reabsorção óssea que possa comprometer a previsibilidade no curto e longo prazos da reabilitação, o enxerto ósseo pode ser indicado como parte do tratamento reabilitador.

O procedimento de enxerto ósseo pode ser realizado através de diversas técnicas cirúrgicas e associações de biomateriais. Dentre as características desses biomateriais, ao menos 3 são desejáveis: osteoindução, osteocondução e osteogênese^{14,15,16}, sendo que todas elas estão presentes no osso autógeno, que é considerado atualmente o “padrão-ouro” entre os enxertos ósseos nos maxilares^{6,11,23,27}. Outros biomateriais estão disponíveis como alternativa, porém, em sua maioria, eles apresentam somente propriedade osteocondutora, como é o caso dos materiais aloplásticos e dos enxertos de tecido ósseo homogêneo e xenógeno, entre outros²⁴. Um grupo de proteínas, denominado proteína morfogenética óssea (BMP – bone morphogenetic protein) e classificado como fator de crescimento e diferenciação celular, vem sendo amplamente estudado³⁵ devido à sua propriedade osteoindutora. Essas proteínas são capazes de estimular a quimiotaxia, mitose e diferenciação celular de células mesenquimais indiferenciadas em células de linhagem específica, como as de origem osteoblástica^{19,33}. Esse grupo de BMPs é composto por mais de 20 subtipos de proteínas⁸ sendo a BMP do subtipo 2 uma das associadas ao desenvolvimento e crescimento ósseo³⁸ e, por isso, amplamente

estudada e atualmente aplicada clinicamente em reabilitações ortopédicas e odontológicas^{2,3,25}.

O recombinante humano da BMP-2 (rhBMP-2) apresenta, como mencionado, propriedade osteoindutora. No entanto, devido à sua rápida degradação³⁹, há necessidade da associação com um carreador, um material com capacidade biológica de sustentar esta proteína. Esses carreadores são muito importantes no desenvolvimento e na aplicação clínica das BMPs e, por isso, são amplamente estudados^{21,30}. Para a aplicação clínica em humanos, a rhBMP-2 vem sendo associada a uma esponja reabsorvível de colágeno bovino do tipo-I (ACS – absorbable collagen sponge)³ e esta combinação é comercializada sob o nome de INFUSE Bone Graft® (rhBMP-2/ACS - INFUSE Bone Graft®, Medtronic, Memphis, TN, EUA).

A combinação dos materiais que compõem o INFUSE Bone Graft® apresentam uma forma física maleável e passível de ser comprimida pelos tecidos adjacentes (tecido mole), bem como próteses provisórias associadas ao tratamento. Por esse motivo, há a necessidade de se adicionar um mantenedor de espaço¹, cuja finalidade é criar um arcabouço livre de compressão, preenchido pela combinação rhBMP-2/ACS, para favorecer a neoformação óssea estimulada por este material^{36,37}.

O uso da rhBMP-2 é sensível à sua concentração, ou seja, a diluição da proteína (mg) em água estéril (mL) e à sua dosagem, que está relacionada à aplicação da proteína diluída na esponja de colágeno bovino. Clinicamente, a concentração de 1,5 mg/mL vem sendo utilizada em diferentes dosagens. Embora os estudos utilizados para a aprovação do rhBMP-2/ACS no Food and Drug Administration (FDA, órgão dos EUA responsável pela regulamentação de

medicamentos)^{4,12,32} tenham sugerido o uso da concentração de 1,5 mg/mL, outros estudos disponíveis na literatura relatam sucesso no aumento ósseo alveolar utilizando-se diferentes concentrações e dosagens^{4,5,7,12,18,32}. Portanto, não há uma indicação precisa da quantidade de material a ser utilizado por tipo de tratamento, ficando essa decisão à arbitrariedade do cirurgião.

A rhBMP-2/ACS na concentração de 1,5mg/mL foi inicialmente aprovada em 2002 para a área médica no tratamento de doenças e traumas ósseos na coluna vertebral em humanos, e em 2004 como tratamento coadjuvante em fraturas de tíbia. Em março de 2007, o produto foi aprovado para aumento ósseo alveolar em elevação da mucosa do seio maxilar e para o preenchimento de alvéolo dentário após extração²⁵. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a comercialização e uso clínico em humanos da rhBMP-2/ACS no ano de 2008.

Relatos de casos clínicos foram publicados na literatura utilizando-se a rhBMP-2/ACS para aumento ósseo alveolar em defeitos não relacionados aos aprovados pelos órgãos de regulamentação (FDA), sendo portanto considerados como uso “off-label” do produto. Em sua maioria estes relatos de casos são tratamentos realizados em mandíbula, apresentam diferentes tipos de defeitos ósseos e resultados promissores^{7,17,36}.

Com o objetivo de se colaborar com o avanço nas indicações clínicas da rhBMP-2/ACS como alternativa ao enxerto ósseo autógeno na odontologia, foi realizada uma revisão da literatura, onde, como resultado, foi possível perceber a carência de estudos clínicos randomizados e controlados comparando ambos materiais de enxertia óssea na indicação de aumento ósseo alveolar em espessura. Considerando esta carência de resultados, justificamos a necessidade de realizar

um estudo randomizado, comparando a aplicação da rhBMP-2/ACS para aumento de espessura óssea.

2 Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar, em humanos, a formação óssea através do uso de rhBMP-2/ACS (recombinante humano da Proteína Morfogenética Óssea/Esponja Reabsorvível de Colágeno) na região anterior de maxila atrófica parcialmente edêntula em comparação ao uso de enxerto ósseo autógeno.

3 Capítulos

A Revisão da Literatura e os resultados desta tese são apresentados através de 2 artigos de revisão e 2 artigos inéditos, informados a seguir.

Capítulo 1: Freitas RM, Spin-Neto R, Marcantonio C, Marcantonio RAC, Pereira LAVD, Marcantonio Jr E. O uso de rhBMP-2 para aumento ósseo maxilar: relato de caso clinico. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2012; 66:110-117.

Capítulo 2: Freitas RM, Spin-Neto R, Pereira LAVD, Marcantonio Jr E, Wikesjö UME, Susin C. Alveolar Ridge and Maxillary Sinus Augmentation Using rhBMP-2: Systematic Review. Artigo submetido à Clinical Implant Dentistry and Related Research, 2013.

Capítulo 3: Freitas RM, Susin C, Spin-Neto R, Marcantonio C, Wikesjö UME, Pereira LAVD, Marcantonio Jr E. Horizontal Ridge Augmentation of the Atrophic Anterior Maxilla Using rhBMP-2/ACS or Autogenous Bone Graft: A Randomized Clinical Trial. Artigo submetido à Journal of Clinical Periodontology, 2013.

Capítulo 4: Freitas RM, Susin C, Souza JAC, Marcantonio C, Wikesjö UME, Pereira LAVD, Marcantonio Jr E. Horizontal ridge augmentation in the anterior maxilla following rhBMP-2/ACS or Autogenous Bone Graft: histomorphometrical analysis and gene expression profile. Será submetido à Journal of Clinical Periodontology.

4 Considerações Finais

Nos últimos anos, o uso do recombinante humano da proteína morfogenética óssea - 2 (rhBMP-2), vem sendo amplamente estudado por representar um potencial regenerador ósseo alternativo ao enxerto ósseo autógeno, até então considerado como “padrão ouro” em uso odontológico. Nesta tese foram apresentadas 2 revisões da literatura, a primeira envolvendo o relato de um caso clínico¹³, abordando de maneira mais abrangente o desenvolvimento e mecanismo de ação da rhBMP-2, bem como suas indicações, limitações e efeitos adversos, sendo finalizada com o relato de um caso clínico. A segunda é uma revisão sistematizada dos estudos clínicos em humanos utilizando rhBMP-2/ACS, cujo critério de inclusão envolveu a participação de ao menos 11 pacientes, procedimento de enxertia óssea e instalação dos implantes osseointegráveis em 2 fases distintas, além de metodologia demonstrando resultado estimativo da neoformação óssea. O resultado foi a inclusão de 6 estudos (7 publicações), sendo, 4 estudos em elevação de seio maxilar^{4,5,22,32} e 2 estudos em aumento/preservação de rebordo ósseo pós exodontia^{10,12,18}; e dentre esses, apenas 4 foram classificados como sendo estudo clínico randomizado^{4,12,22,32}, uma vez que os outros se tratavam de séries de casos. Apenas 2 estudos^{4,32}, esses clínicos randomizados, tiveram um grupo controle utilizando o enxerto ósseo autógeno associado a biomaterial, o que evidencia a carência de estudos clínicos randomizados e controlados envolvendo a rhBMP-2/ACS e reitera a importância deste estudo.

O objetivo desta tese foi avaliar, em humanos, a formação óssea através do uso de rhBMP-2/ACS na região anterior de maxila atrófica parcialmente edêntula em comparação ao uso de enxerto ósseo autógeno, utilizando como metodologia a avaliação clínica, tomográfica, histológica, histomorfométrica e por

PCR em tempo real. Nossos resultados demonstraram que o uso de rhBMP-2/ACS pode ser comparado ao enxerto ósseo autógeno, apresentando superioridade em algumas das metodologias utilizadas para avaliação.

Clinicamente, a utilização da rhBMP-2/ACS facilita a realização do procedimento de enxertia óssea, pois não requer a criação de um segundo sítio cirúrgico, o que diminui os riscos de lesão ao nervo alveolar inferior, o desconforto pós-operatório e outros fatores adversos relacionados à obtenção do enxerto ósseo autógeno^{9,34}. Por outro lado, o uso da rhBMP-2/ACS necessita de estabilização e manutenção de um arcabouço cirúrgico que favoreça a regeneração óssea. Assim, apesar do risco de exposição pós-operatória do material enxertado, optou-se pela utilização de uma malha de titânio como parte do procedimento cirúrgico, no intuito de prover e manter um espaço para a formação óssea²⁰. O pós-operatório dos pacientes de ambos os grupos envolvidos no estudo ocorreu sem necessidade de intervenções, com um baixo índice de exposição parcial da malha de titânio (1 paciente no Grupo rhBMP-2/ACS e 2 no Grupo de enxerto ósseo autógeno), sensação dolorosa principalmente no segundo sítio cirúrgico referente à área doadora do enxerto ósseo autógeno, edema compatível ao procedimento realizado no Grupo de enxerto ósseo autógeno, porém exacerbado no Grupo rhBMP-2/ACS, como mencionado na nossa revisão da literatura¹³, e também já relatado anteriormente por outros autores^{4,5,12,32}. O edema facial provocado pelo uso da rhBMP-2/ACS é notório e deve ser motivo de pré-orientação cirúrgica aos pacientes. Como não foi prescrita medicação pré-operatória, não é possível dizer o efeito da mesma sobre a redução parcial deste edema, que na verdade, é, pelo menos em parte, justificável pelo próprio mecanismo de ação da proteína morfogenética óssea. O resultado referente ao ganho ósseo médio obtido através da mensuração clínica

da espessura do rebordo alveolar não apresentou diferença estatística entre ambos os grupos.

O uso da tomografia computadorizada (CBCT) foi parte importante do planejamento cirúrgico dos enxertos e da instalação dos implantes osseointegráveis. Como protocolo de acompanhamento, a mesma foi realizada antes do enxerto ósseo, aos 3 e 6 meses pós-operatório. Os exames tomográficos e as imagens deles oriundas foram padronizados, obtendo-se assim uma mensuração e posterior comparação nas mesmas regiões para os diferentes períodos. Nossos resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significante entre os Grupos aos 2 mm da crista óssea alveolar ($p=0.01$), o que pode estar relacionado ao posicionamento da malha de titânio, preparo do leito receptor, uso de prótese provisória ou mesmo pelo processo de remodelação óssea do enxerto ósseo autógeno. Nas mensurações aos 6 e 10 mm da crista óssea alveolar não houve diferença no resultado entre os Grupos. Chegou-se a considerar a possibilidade de mensuração da densidade óssea tomográfica, porém entendemos que a metodologia empregada na obtenção das imagens (CBCT – Cone Beam Computed Tomography) pode não ser constante nos resultados para este tipo de análise e induzir ao erro²⁸. Alguns estudos^{4,32} reportaram resultados referentes à densidade óssea tomográfica, porém, a metodologia empregada foi diferente.

As biópsias ósseas obtidas aos 6 meses de pós operatório foram importantes no entendimento histológico do tecido ósseo neoformado. Os resultados obtidos são comparáveis aos já mencionados em outros estudos^{4,5,10,12,18,32}. Em geral, os espécimes do Grupo rhBMP-2/ACS demonstraram uma arquitetura óssea e atividade celular compatível com um tecido em processo ativo de remodelação/maturação óssea e o Grupo de enxerto ósseo autógeno com pouca

atividade celular e uma maturação óssea evidente, contendo, inclusive, partículas de tecido ósseo não vital. Esse resultado histológico/histomorfométrico possui uma importante correlação com o PCR em tempo real, onde diferença estatística foi observada para as expressões gênicas avaliadas dos mRNA Runx2 e BMP2 ($p=0.0021$ e $p=0.001$, respectivamente) associadas ao processo de remodelação e atividade celular apresentado pelo Grupo rhBMP-2/ACS e a expressão gênica da razão RANKL:OPG, BSP e OPN ($p=0.01$, $p=0.005$ e $p=0.0009$, respectivamente) compatível com o observado histologicamente.

5 Conclusões Gerais

O uso clínico do recombinante humano da proteína morfogenética óssea associada a esponja de colágeno reabsorvível (rhBMP-2/ACS) representa uma opção de tratamento com potencial regenerador ósseo, apresentando resultados consolidados para alvéolo pós extração e elevação do seio maxilar, necessitando de novos estudos com a finalidade de se comprovar sua eficiência para outras indicações.

Dentro das limitações deste estudo, a rhBMP-2/ACS demonstrou resultado clínico e tomográfico comparável ao enxerto ósseo autógeno particulado para o aumento ósseo alveolar em espessura na região anterior de maxila, permitindo a instalação de implantes osseointegráveis em região atrófica. As características histológicas, histomorfométricas e de expressões gênicas demonstraram a possibilidade de melhores resultados biológicos com o uso da rhBMP-2/ACS, sugerindo uma potencial indicação em substituição ao enxerto ósseo autógeno particulado.

Referências*

1. Barboza EP, Caula AL, Caula Fde O, de Souza RO, Geolas Neto L, Sorensen RG, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in an absorbable collagen sponge with space-providing biomaterials on the augmentation of chronic alveolar ridge defects. *J Periodontol*. 2004; 75 (5): 702-8.
2. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med*. 2008; 2 (1): 1-13.
3. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med*. 2008; 2 (2-3): 81-96.
4. Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, et al. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63 (12): 1693-707.
5. Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lazaro E, Lilly LC, et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997; 17 (1): 11-25.
6. Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. *Periodontol 2000*. 1999; 19: 151-63.

* De acordo com o manual da FOAR/UNESP, adaptadas das normas Vancouver.

7. Carter TG, Brar PS, Tolas A, Beirne OR. Off-label use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) for reconstruction of mandibular bone defects in humans. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66 (7): 1417-25.
8. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004; 22 (4): 233-41.
9. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17 Suppl 2: 136-59.
10. Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, Fiorellini JP, Howell H. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol.* 2000; 71 (8): 1241-57.
11. Donovan MG, Dickerson NC, Mitchell JC. Calvarial bone harvest and grafting techniques for maxillary and mandibular implant surgery. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 1994; 2 (2): 109-22.
12. Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D, et al. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol.* 2005; 76 (4): 605-13.
13. Freitas RM, Spin-Neto R, Marcantonio C, Marcantonio RAC, Pereira LAVD, Marcantonio Jr E. O uso de rhBMP-2 para aumento ósseo maxilar: relato de caso clínico. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2012; 66 (2): 110-7.
14. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res.* 1987; Dec (225): 7-16.
15. Goldberg VM, Stevenson S. The biology of bone grafts. *Semin Arthroplasty.* 1993; 4 (2): 58-63.

16. Goldberg VM, Stevenson S. Bone graft options: fact and fancy. *Orthopedics*. 1994; 17 (9): 809-10, 21.
17. Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 66 (4): 616-24.
18. Howell TH, Fiorellini J, Jones A, Alder M, Nummikoski P, Lazaro M, et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997; 17 (2): 124-39.
19. Jimi E, Hirata S, Shin M, Yamazaki M, Fukushima H. Molecular mechanisms of BMP-induced bone formation: Cross-talk between BMP and NF- κ B signaling pathways in osteoblastogenesis. *Jpn Dent Sci Rev*. 2010; 46 (1): 33-42.
20. Jovanovic SA, Hunt DR, Bernard GW, Spiekermann H, Wozney JM, Wikesjo UM. Bone reconstruction following implantation of rhBMP-2 and guided bone regeneration in canine alveolar ridge defects. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18 (2): 224-30.
21. Jung RE, Glauser R, Scharer P, Hammerle CH, Sailer HF, Weber FE. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2003; 14 (5): 556-68.
22. Kao DW, Kubota A, Nevins M, Fiorellini JP. The negative effect of combining rhBMP-2 and Bio-Oss on bone formation for maxillary sinus augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2012; 32 (1): 61-7.
23. Keller EE, Triplett WW. Iliac bone grafting: review of 160 consecutive cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 1987; 45 (1): 11-4.

24. Kenley RA, Yim K, Abrams J, Ron E, Turek T, Marden LJ, et al. Biotechnology and bone graft substitutes. *Pharm Res.* 1993; 10 (10): 1393-401.
25. McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop.* 2007; 31 (6): 729-34.
26. Misch CM. Bone augmentation of the atrophic posterior mandible for dental implants using rhBMP-2 and titanium mesh: clinical technique and early results. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011; 31 (6): 581-9.
27. Misch CM, Misch CE. The repair of localized severe ridge defects for implant placement using mandibular bone grafts. *Implant Dent.* 1995; 4 (4): 261-7.
28. Parsa A, Ibrahim N, Hassan B, Motroni A, van der Stelt P, Wismeijer D. Influence of cone beam CT scanning parameters on grey value measurements at an implant site. *Dentomaxillofac Radiol.* 2013; 42 (3): 79884780, 1-7.
29. Qahash M, Susin C, Polimeni G, Hall J, Wikesjo UM. Bone healing dynamics at buccal peri-implant sites. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19 (2): 166-72.
30. Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16 (3): 329-45.
31. Spin-Neto R, Bedran TB, de Paula WN, de Freitas RM, de Oliveira Ramalho LT, Marcantonio E Jr. Incisive canal deflation for correct implant placement: case report. *Implant Dent.* 2009; 18 (6): 473-9.
32. Triplett RG, Nevins M, Marx RE, Spagnoli DB, Oates TW, Moy PK, et al. Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 67 (9): 1947-60.

33. Valcourt U, Moustakas A. BMP signaling in osteogenesis, bone remodeling and repair. *Eur J Trauma*. 2005; 31 (5): 464-79.
34. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010; 25 (3): 525-31.
35. Wikesjo UM, Qahash M, Huang YH, Xiropaidis A, Polimeni G, Susin C. Bone morphogenetic proteins for periodontal and alveolar indications; biological observations - clinical implications. *Orthod Craniofac Res*. 2009; 12 (3): 263-70.
36. Wikesjo UM, Qahash M, Thomson RC, Cook AD, Rohrer MD, Wozney JM, et al. Space-providing expanded polytetrafluoroethylene devices define alveolar augmentation at dental implants induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2 in an absorbable collagen sponge carrier. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003; 5 (2): 112-23.
37. Wikesjo UM, Qahash M, Thomson RC, Cook AD, Rohrer MD, Wozney JM, et al. rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2004; 15 (2): 194-204.
38. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev*. 1992; 32 (2): 160-7.
39. Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials*. 2003; 24 (24): 4375-83.

Apêndice

Material e Método

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CEP-FO/CAR), sob o protocolo nº 32/09.

AMOSTRA E DESENHO EXPERIMENTAL

Um total de 24 pacientes desejando realizar tratamento de reabilitação oral por meio de implantes osseointegráveis foram selecionados para participar do estudo. A seleção foi realizada no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP no período entre janeiro e outubro de 2011, seguindo os critérios de inclusão:

- edentulismo parcial na região anterior da maxila (canino – canino)
- espessura óssea alveolar ≤ 4 mm na região anterior da maxila avaliada clinicamente e/ou utilizando tomografia computadorizada (CBCT – cone beam computed tomography)
- ter mais de 18 anos de idade
- apresentar boas condições gerais de saúde, sem histórico de doenças associadas ao tecido ósseo ou uso de medicações que afetem o metabolismo ósseo
- ausência de histórico de Câncer
- não estar grávida ou lactando

- não ser fumante
- ausência de evidência clínica relacionada a periodontite e infecções orais

Uma vez selecionados e de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FO/CAR), os pacientes foram randomicamente alocados em 2 grupos (12 pacientes em cada): Grupo 1 (teste) – aumento ósseo utilizando rhBMP-2/ACS em uma concentração de 1,5 mg/mL e dose total de 4,2mg por paciente (INFUSE® Bone Graft, Medtronic, Memphis, TN, USA) e Grupo 2 (controle) – aumento ósseo alveolar com osso autógeno intraoral particulado (região retromolar da mandíbula). Uma malha de titânio foi adicionada em ambos os grupos objetivando a manutenção de um arcabouço favorável à formação óssea, reduzindo a compressão natural do tecido mole na região. A randomização foi realizada pelo método de sorteio e os pacientes foram alocados a um dos 2 grupos de estudo. Basicamente, 12 papéis numerados (de 1 a 12) de acordo com a legenda de cada Grupo (teste ou controle) foram armazenados em um recipiente não permitindo a leitura das legendas, e após inclusão dos pacientes no estudo, um papel era retirado contendo a indicação do tratamento a ser realizado.

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

A cirurgia para realização de aumento ósseo alveolar foi realizada após antissepsia extra (povidona-iodine 1%) e intra-bucal (digluconato de clorexidina 0,12%) do campo operatório. O procedimento cirúrgico foi realizado com anestesia local (Cloridrato de Articaina 4% + epinefrina 1:200.000, DFL, Rio de Janeiro, Brasil)

e executado seguindo protocolo padrão para este tipo de procedimento. Os pacientes não receberam nenhum tipo de medicação pré-operatória.

Após anestesia, foi realizada incisão em gengiva queratinizada seguindo a orientação anatômica da crista óssea do rebordo alveolar, incisão sulcular nos dentes adjacentes aumentando a visibilidade da região a ser enxertada, e incisões relaxantes verticais na distal do primeiro ou segundo dente adjacente a região edêntula. O tecido foi descolado (retalho mucoperiostal) até a região de soalho nasal por vestibular e até exposição do forame nasopalatino por palatina, proporcionando uma ampla visão do leito ósseo. Objetivando facilitar a instalação da malha de titânio e eventualmente ser uma região de instalação de implante osseointegrável, houve o esvaziamento do canal incisivo³¹.

Pacientes alocados no grupo controle (autógeno) foram anestesiados para remoção do tecido ósseo da região retromolar (linha oblíqua externa) de acordo com avaliação clínica e/ou por radiografia panorâmica. Após remoção do bloco ósseo (quantidade suficiente para preenchimento do defeito a ser enxertado), o mesmo foi particulado utilizando um particulador ósseo (Neodent, Curitiba, Brasil) (Figura 1). No caso do grupo teste (rhBMP-2/ACS), o material foi preparado seguindo orientação do fabricante, que resumidamente, consiste em distribuir igualmente 2,8 mL da solução rhBMP-2/água estéril em 2 esponjas de colágeno (2,5 x 5 cm cada) e aguardar 15 minutos antes da utilização (Figura 2).

Figura 1 – Fotografia representativa do procedimento de aquisição do enxerto ósseo autógeno na região retromolar da mandíbula.

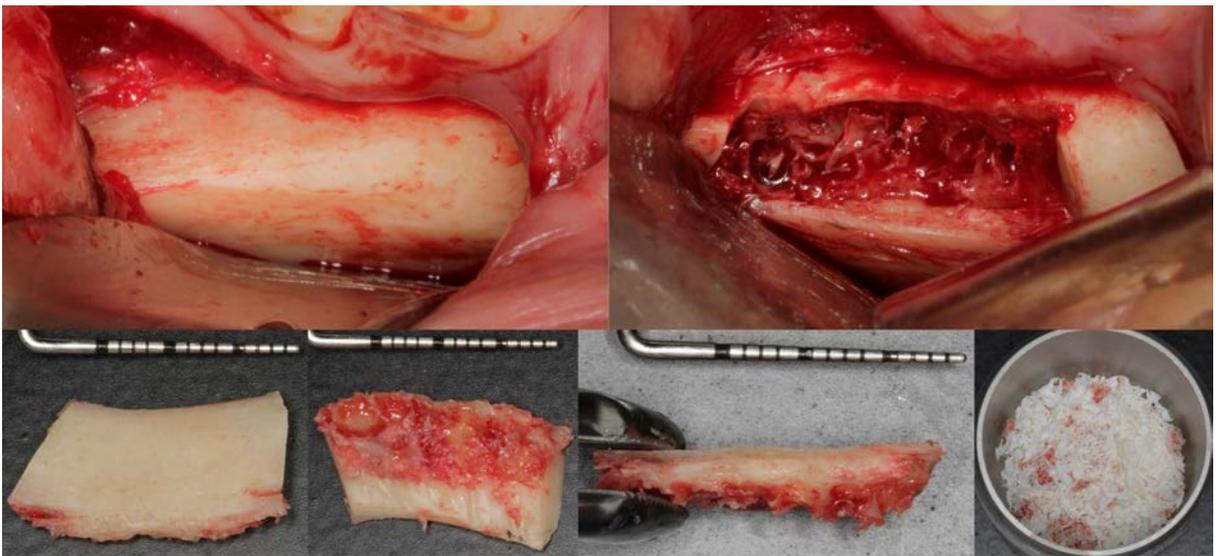
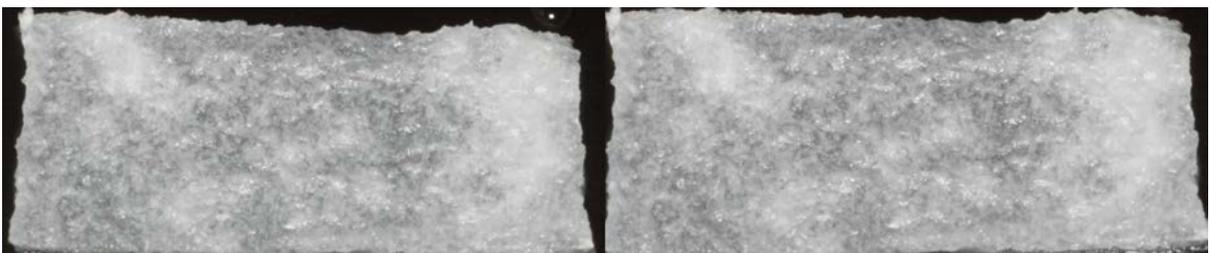


Figura 2 – Fotografia representativa da esponja reabsorvível de colágeno (ACS) embebida com a solução de rhBMP-2 previamente a sua inserção no sitio cirúrgico.



Após obtenção e/ou preparo do material a ser utilizado, o leito ósseo receptor foi decorticalizado com fresas cirúrgicas 700 e 701 (KG Sorensen, Cotia, Brasil) acopladas a uma peça de mão cirúrgica e um motor de implante, permitindo a liberação celular proveniente do tecido ósseo, bem como irrigação sanguínea para favorecer a neoformação óssea na região. Em seguida, uma malha de titânio de 0,2 mm de espessura (Stryker, Freiburg, Alemanha) foi moldada e adaptada na região de interesse, com o objetivo de atuar como mantenedor de espaço, propiciando um arcabouço livre de compressão dos tecidos moles, bem como estabilizar o material de enxertia na região. Esta malha de titânio foi fixada em posição por parafusos cirúrgicos de titânio (Neodent, Curitiba, Brasil).

Após o preparo do leito ósseo receptor, o material de enxertia foi posicionado de acordo com a randomização dos pacientes. Incisão no perióstio vestibular foi feita com o intuito de proporcionar um fechamento da região e sutura oclusiva livres de tensão. A sutura foi realizada com fio de politetrafluoretileno (e-PTFE, Gore-Tex, Flagstaff, EUA) combinado com fio mononylon (Ethicon, São José dos Campos, Brasil). Os pacientes receberam orientações referentes ao pós-operatório e foram medicados com analgésico (Paracetamol 750mg, via oral, a cada 6 horas em caso de dor), antiinflamatório (Nimesulida 100mg, via oral, a cada 12 horas por 5 dias) e antibiótico (Amoxicilina 500mg, via oral, a cada 8 horas por 7 dias), e orientados a fazer controle químico da placa bacteriana (digluconato de clorexidina 0,12%, solução de bochecho por 15 dias). As suturas foram removidas após 15 dias.

Instalação dos implantes e obtenção das biópsias

Os procedimentos de reabertura dos enxertos ósseos foram realizados após 6 meses de cicatrização sob anestesia local (Cloridrato de Articaina 4% + epinefrina 1:200.000, DFL, Rio de Janeiro, Brasil), descolamento de retalho total mucoperiosteal e em sequência remoção da malha de titânio. Tecido conjuntivo presente entre o tecido ósseo neoformado e a tela de titânio foi descolado expondo o leito ósseo. Implantes de 3,5 mm de diâmetro (Flash, Conexão Sistemas de Prótese, Arujá, Brazil) foram instalados seguindo orientação do fabricante e protocolo convencional de osteotomia.

Concomitante com o procedimento de reabertura, foi realizada a obtenção das biópsias ósseas. Essas biópsias foram obtidas após o posicionamento e instalação dos implantes, portanto, não influenciando no planejamento cirúrgico/protético e não representando prejuízo ao paciente. Foi utilizada uma fresa trefina de 3mm de diâmetro interno (Dentoflex, São Paulo, Brasil), montada em contra-ângulo redutor (20:1) e sob irrigação abundante com solução salina estéril, posicionada apicalmente a crista óssea alveolar, direcionada da região palatina sentido vestibular, de maneira à obter uma biópsia horizontal contendo tecido ósseo residente e neoformado no mesmo espécime. Após remoção das biópsias, as mesmas foram gentilmente demarcadas na região compatível com a palatina utilizando tinta nanquim, proporcionando um fácil reconhecimento espacial no momento da avaliação microscópica (Figura 3).

Após finalização do procedimento cirúrgico, o retalho foi reposicionado e suturado com fio não reabsorvível (seda 4-0, Ethicon, São José dos Campos,

Brasil) e os pacientes orientados e medicados seguindo o protocolo utilizado na primeira cirurgia.

Figura 3 – Fotografia representativa de uma biópsia coletada e marcada com tinta Nankin na face referente a região palatina, previamente ao processamento histológico.



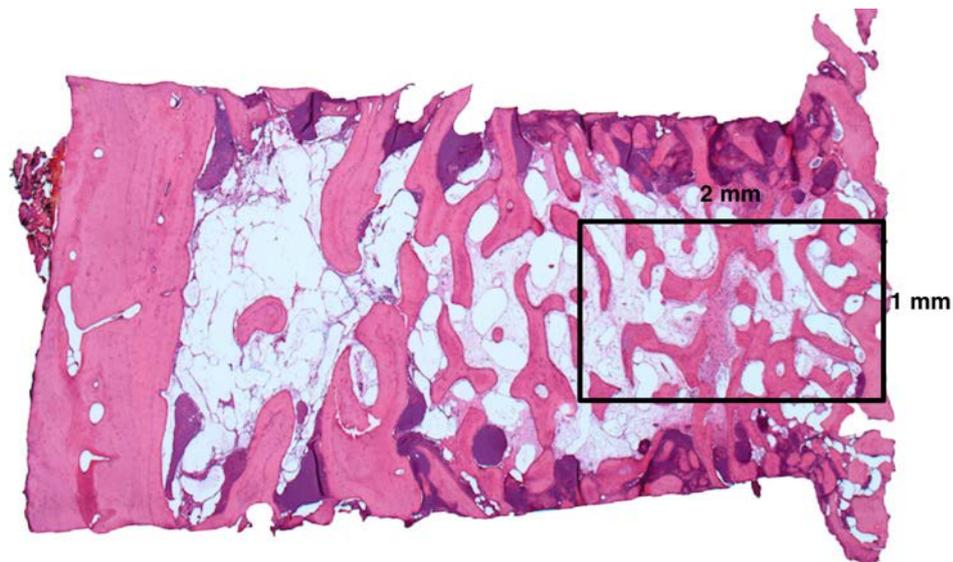
Processamento das biópsias, análise histológica e histomorfométrica

Essas biópsias foram fixadas em solução de formaldeído a 10%, tamponado a um pH 7.2 com 0.1 M de fosfato de sódio, em temperatura ambiente, por um período de 48 horas, as mesmas foram descalcificadas em solução de EDTA a 7% passando por processamento histológico de rotina (desidratação em concentrações crescentes de etanol) e inclusão em parafina. Cortes histológicos seriados de 5µm em espessura foram obtidos do material processado e corados com hematoxilina de Harri (HE) e uma coloração denominada “Oxone-Aldehyde Fuchsin-Halmi” (Magic Staining), ambas utilizadas para análise histológica e histomorfométrica.

A análise histológica e histomorfométrica foi realizada por 1 examinador calibrado (RMF) utilizando um microscópio de luz incandescente contendo adaptador para polarização (BX 51; Olympus America, Inc.), um sistema de câmera digital acoplado ao microscópio (Retiga 4000R QImaging, Burnaby, BC, Canada) e um software específico para análise de imagens (Image-Pro Plus; Media Cybernetic, Silver Spring, USA). Três cortes histológicos localizados na região central da biópsia a pelo menos 30 µm de distância entre si foram avaliados por paciente. A análise histológica foi realizada seguindo uma escala descritiva para os seguintes parâmetros: tipo de tecido ósseo (1 – somente osso osteóide a 5 – somente osso lamelar), espaço medular (1 somente fibrovascular a 5 somente adiposo), presença de células indiferenciadas e/ou osteoblastos na superfície do trabeculado ósseo (positivo ou negativo), reação inflamatória (positivo ou negativo), presença de células osteoclásticas (positivo ou negativo), remanescente de colágeno bovino (positivo ou negativo) e formação óssea cortical (1 – ausente a 3 – completamente presente).

Adicionalmente, utilizando o mesmo sistema de equipamentos já mencionados, foi mensurada a densidade óssea para cada um dos 3 cortes avaliados por paciente. Essa densidade foi expressa em porcentagem referente a uma fração de tecido ósseo mineralizado em uma área de 2 mm^2 contendo predominantemente osso neoformado, localizada o mais próximo possível da cortical óssea vestibular e ao centro da biópsia considerando sua espessura. (Figura 4)

Figura 4 – Imagem representando a área (2mm^2) de mensuração da densidade óssea expressa em fração de tecido ósseo mineralizado (%).



Avaliação quantitativa por transcrição reversa (PCR em tempo real)

O PCR em tempo real foi realizado em amostras de tecido ósseo neoformado coletadas no procedimento de instalação dos implantes e obtenção das biópsias (6 meses após o enxerto ósseo). Durante o procedimento cirúrgico, com o leito ósseo vestibular (osso neoformado) livre de periósteo e/ou tecido conjuntivo aderido, os implantes já instalados e a biópsia adquirida, uma amostra de tecido ósseo foi coletada com um raspador ósseo (Neodent, Curitiba, Brasil). Esses fragmentos ósseos foram então envoltos em papel alumínio e armazenados em eppendorfs devidamente rotulados com o nome e grupo de cada paciente, sendo posteriormente mantidos em freezer a temperatura de -80°C .

O RNA total do tecido foi extraído das amostras de tecido ósseo obtidas utilizando o método de coluna de purificação (*RNAqueous - 4PCR, Ambion Inc.*) segundo as instruções do fabricante. O tecido coletado foi macerado em 100 μL de tampão de lise em tubo de 1,5mL com o auxílio de pilão plástico fornecido com o kit. O mesmo volume (100 μL) de etanol 64% foi adicionado ao tecido lisado e misturado cuidadosamente. Essa mistura foi transferida para um filtro e centrifugada a 15000g por 1min. O filtrado foi descartado e o “cartucho” do filtro utilizado nos passos seguintes. 700 μL da solução de lavagem número 1 foram passados pelo filtro, utilizando à centrífuga, como no passo anterior. Do mesmo modo, o filtrado foi descartado e o filtro preservado. O mesmo procedimento foi repetido por 2 vezes com 500 μL de solução de lavagem número 2/3.

O filtro foi transferido para um novo tubo coletor e a solução de eluição (previamente aquecida a 70°C) pipetada no centro do filtro. Essa primeira alíquota foi de 40 μL . Em seguida, o filtro foi fechado. A solução obtida foi centrifugada por

30s, a 15000g, em temperatura ambiente. Uma segunda alíquota de 10 μ L foi pipetada no centro do filtro e a solução novamente centrifugada por 30s. (Essa segunda alíquota foi coletada no mesmo tubo da primeira.)

A solução obtida foi misturada cuidadosamente e tratada com 5 μ L de tampão de DNase 1 (volume igual a 10% do volume total da solução) e 1 μ L de DNase, para cada amostra. Em seguida, incubada por 30 min a 37°C.

Os passos seguintes removeram a DNase da preparação. Foram adicionados 5,6 μ L do reagente de inativação da DNase (quantidade igual a 10% do volume total da solução). O tubo foi agitado com cuidado (para dispersar o reagente) e incubado por 2min em temperatura ambiente, sendo que, durante esse tempo, foi agitado mais uma vez. Cada amostra foi centrifugada a 10000g por 1min para formar um pellet do reagente de inativação da DNase.

A quantidade e pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorbâncias a 260nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280nm, respectivamente.

A síntese de cDNA foi realizada subsequente em termociclador (Step One Plus), utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription. Foram utilizados 100ng de RNA total por amostra na presença de água livre de nucleases, buffer, dNTPs, inibidor de RNase e enzima de transcriptase reversa, de acordo com o protocolo do fabricante (Applied Biosystems) nas seguintes condições de ciclagem: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minuto.

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando 2 μ L do produto da reação de transcrição reversa (RT) num volume total de 20 μ L. Este volume incluiu, além do produto da reação de RT, 6 μ L água livre de nucleases, 10 μ L

TaqMan fast universal PCR master mix e 2 μ L TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) para detecção dos seguintes genes alvo: RANKL, OPG, RUNX2, BMP2, BSP e OPN. Os níveis relativos da expressão dos genes foram calculados de acordo com as instruções do fabricante utilizando GAPDH como gene normalizador. (Tabela 1).

Os dados foram expressos usando o método de ciclo limite (Ct ou *Cycle threshold*), ou seja, o número de ciclos no qual a curva logarítmica de PCR cruza uma linha de corte arbitrariamente calculada. Os valores foram normalizados subtraindo-se o Ct obtido da amplificação específica do gene alvo pelo Ct do gene normalizador (Δ Ct). Devido a característica logarítmica deste valor, houve a utilização do parâmetro $2^{-\Delta Ct}$ para expressão dos dados. Os valores obtidos das médias das duplicatas de cada amostra foram expressos como “*fold change*” em relação as amostras do Grupo enxerto ósseo autógeno. Os resultados foram submetidos ao teste paramétrico t-Student.

Tabela 1 - Relação dos genes avaliados no PCR em tempo real (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems).

Gene Alvo	Assay ID	Acession # (n=12)	Amplicon length (bp)
GAPDH	Hs02758991_g1	NM_002046.4	93
RANKL	Hs00243522_m1	NM_003701.3	67
OPG	Hs 00900358_m1	NM_002546.3	74
BSP	Hs00173720_m1	NM_004967.3	95
OPN	Hs00959010_m1	NM_001040058.1	84
BMP2A	Hs00154192_m1	NM_001200.2	60
RUNX2	Hs00231692_m1	NM_001015051.3	116

Avaliação tomográfica (CBCT – cone beam computed tomography)

A avaliação tomográfica foi feita com base em imagens obtidas em um tomógrafo de feixe cônico (“cone-beam”), I-CAT Classic (Imaging Sciences International, USA) programado com 120 kVp, 10 mA e 20 segundos de tempo de exposição. O tamanho de voxel utilizado na geração das imagens foi de 0.25 mm, em uma escala de cinza de 14 bits e resolução de 96 dpi. Dessa forma, o tamanho de cada pixel da imagem obtida é de 0.25 mm, e a espessura de corte mínima utilizada foi de 0.25 mm, ou seja, um voxel, aumentando a precisão das medidas que foram feitas sobre essas imagens.

Imagens parassagittais da região enxertada foram obtidas em 3 momentos diferentes para cada paciente: previamente ao procedimento de enxertia óssea (Inicial – In), 3 meses de acompanhamento pós operatório (3m) e aos 6 meses após o enxerto ósseo, previamente a instalação dos implantes osseointegráveis (6m). Essas imagens eram geradas em formato DICOM com uma resolução de 96 dpi, e reconstituídas utilizando um software dedicado (OnDemand 3D 1.0.7.0295, Cybermed, Seoul, South Korea).

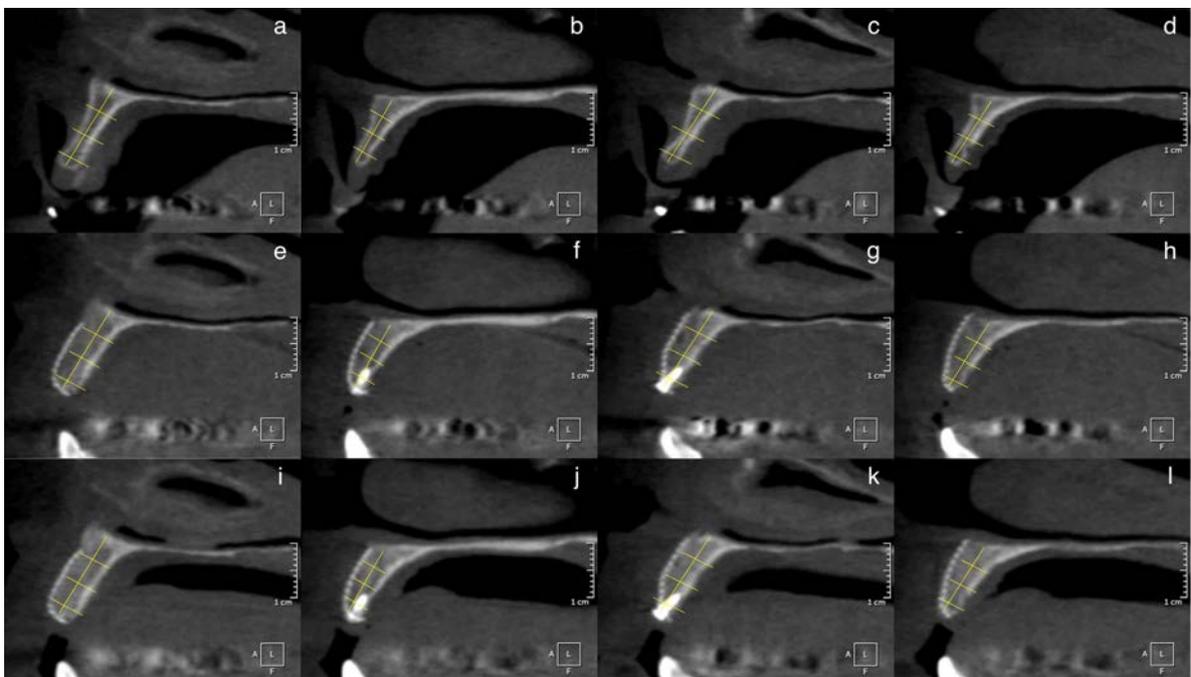
Objetivando uma padronização no processo de geração das imagens, bem como, a orientação espacial das mesmas, todas as imagens (In, 3m e 6m) foram reorientadas após sua aquisição utilizando o software específico. As imagens In e 3m foram reorientadas inicialmente em conjunto, e posteriormente, a imagem 6m foi orientada de acordo com a 3m, desta maneira, as imagens referentes aos 3 períodos (In, 3m e 6m) de cada paciente foram obtidas na mesma posição espacial.

Após a padronização espacial das imagens tomográficas, foram obtidas 4 imagens cross-seccionais com 0,25mm de espessura geradas

perpendicularmente ao plano oclusal refletindo uma distância aproximada de 7,5 e 12,5 mm em relação ao centro do forame incisivo bilateralmente, para cada um dos 3 períodos (In, 3m e 6m) por paciente. No final, cada paciente apresentava 4 imagens tomográficas da mesma região coincidindo entre os períodos (In, 3m, 6m).

Para cada uma das imagens seccionais padronizadas obtidas, foi gerada uma imagem em TIF (tagged image file) com resolução de 96 dpi, semelhante a resolução do tomógrafo, evitando-se distorções. As 3 imagens (1 por período) referentes a cada uma das 4 regiões avaliadas foram posicionadas juntas na forma de painel. Cada painel continha uma régua, permitindo a configuração linear de cada imagem, e 3 linhas de referencia para padronizar a posição de mensuração em 2, 6 e 10 mm acima da crista óssea alveolar (Figura 5). Um software específico (ImageJ, NIH, USA) foi utilizado para avaliação das imagens dos painéis em TIF. As mensurações feitas refletiam a espessura do tecido mineralizado nas alturas de rebordo pre-determinadas (2, 6 e 10 mm acima da crista óssea alveolar).

Figura 5 – Imagem tomográfica representativa do período inicial (a, b, c, d), 3 meses (e, f, g, h) e 6 meses pós-operatório (i, j, k, l) referente a uma paciente do Grupo rhBMP-2/ACS. As imagens a/e/i, b/f/j, c/g/k e d/h/l correspondem a mesma região em períodos diferentes. As marcações em amarelo no rebordo alveolar esquemmatizam a altura de mensuração óssea padronizada entre as imagens, por região e período, onde, o mais próximo da crista óssea alveolar corresponde a 2mm, no centro a 6mm e próximo ao palato 10mm.

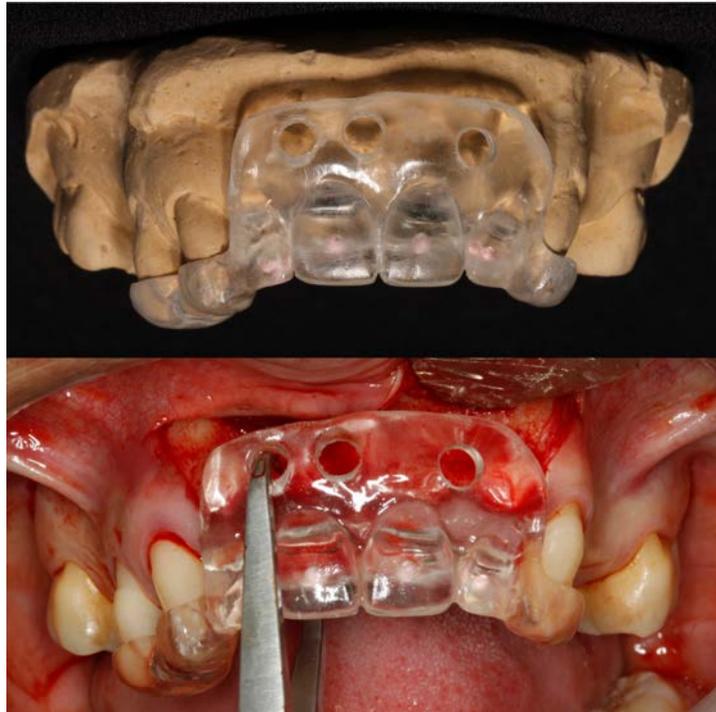


Avaliação clínica

A avaliação clínica, constituída da mensuração da espessura óssea alveolar, foi realizada no transcirúrgico do procedimento de enxertia óssea (Inicial) e no momento da instalação dos implantes e obtenção das biópsias (6 meses pós operatório) com objetivo de se avaliar o ganho ósseo médio em espessura entre os grupos estudados.

As mensurações foram realizadas no momento inicial da cirurgia, após exposição do leito ósseo vestibular. Um guia cirúrgico suportado pelos dentes adjacentes a região de interesse foi confeccionado previamente a cirurgia inicial para cada paciente (Figura 6). Este guia foi utilizado para padronização da região de mensuração clínica da espessura óssea alveolar inicial e aos 6 meses de pós operatório, que dependendo da extensão do defeito ósseo a ser avaliado, pode corresponder de 3 a 6 regiões mensuradas por paciente. Os valores em milímetros (mm) equivalentes a cada uma das regiões mensuradas foram obtidos através de um espessímetro analógico (Schwert, A. Schweickhardt GmbH & Co., Seitingen/Oberflacht, Germany).

Figura 6 – Representação do guia cirúrgico utilizado para padronização das mensurações da espessura óssea alveolar clínica.



Anexo 1 – Certificado Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Comitê de Ética em Pesquisa




Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**COMPARAÇÃO ENTRE ENXERTO ÓSSEO AUTÓLOGO E rBMP-2 (INFUSE Bone Graft) NA RECONSTRUÇÃO DE MAXILA ATRÓFICA ANTERIOR**", sob o protocolo nº **32/09**, de responsabilidade do Pesquisador (a) **ELCCIO MARCANTONIO JUNIOR**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 3 (três) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "**A COMPARISON OF rBMP-2 (INFUSE Bone Graft) AND AUTOLOGOUS BONE GRAFT FOR RECONSTRUCTION OF ANTERIOR ATROPHIC MAXILLA**", protocol number **36/09**, under Dr. **ELCCIO MARCANTONIO JUNIOR**, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAR-UNESP. Approval is granted for 03 (three) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 28 de agosto de 2009.

Maria Rita Brancini de Oliveira
Prof.ª Dr.ª Maria Rita Brancini de Oliveira
Vice-Coordenadora

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Protocolo CEP nº 5210
Aprovado em reunião c
06.10.8.2010
Secretaria do CEP-FO/CS

“Comparação entre enxerto ósseo autólogo e rhBMP-2 (INFUSE Bone Graft) na reconstrução de máxila atrófica anterior”

Nome do pesquisador responsável: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

Nome: _____ Idade: _____
RG: _____ Prontuário.Geral: _____ Telefone: _____
Endereço: _____ Cidade: _____
Responsável legal pelo paciente: _____
Idade: _____ RG: _____ Grau de parentesco: _____
Prova documental comprobatória da responsabilidade (Nos casos de autorização fornecida por responsável)

Eu estou ciente de que as pessoas que perdem os dentes apresentam, depois de um certo tempo, uma diminuição da quantidade de osso para a instalação de implantes osseointegráveis, os quais possibilitam a confecção de uma prótese onde antes isto não era possível. O tratamento da falta de osso pode ser feito por meio de enxerto de osso retirado do próprio paciente de áreas de dentro da boca (osso autólogo) ou por meio de um material, uma proteína, capaz de formar osso (rhBMP-2). Muitos estudos mostram que estes materiais são substâncias que se transformam em osso humano e não causam inflamação ou alergia, podendo ser usados com segurança em qualquer pessoa.

Assim sendo, fui informado sobre o objetivo desta pesquisa, que é avaliar, por meio de exames clínicos, imagens tomográficas (radiografia), análises laboratoriais e análise através de células do sangue (imunológico) os resultados da cirurgia de enxerto ósseo autólogo e de rhBMP-2 na região superior anterior (maxila anterior) e que a indicação do tratamento proposto nesta pesquisa será dado pelos pesquisadores e não conforme minha vontade.

Sei que para participar da pesquisa terei que comparecer, sempre que solicitado (a), no local indicado pelos pesquisadores, para controles cirúrgicos e novas avaliações, e estou ciente que serei submetido (a) a no mínimo 3 cirurgias. A primeira (1ª) cirurgia será a colocação do osso na região superior anterior, a segunda (2ª) será a colocação dos implantes na mesma região, e a terceira (3ª) será a colocação do cicatrizador nos implantes (capa protetora do implante que prepara a gengiva para receber os dentes – prótese). Sei que o tratamento será realizado em um tempo mínimo de 18 meses. Ficou claro também que o tratamento proposto pelos pesquisadores se restringe somente ao ganho de osso, colocação dos implantes e dos cicatrizadores, e não inclui a confecção da prótese. Fui informado dos valores previstos para a colocação das próteses, como também que estes valores poderão ser diferentes de acordo com os materiais que serão utilizados, tipo de prótese que será instalada e os valores dos profissionais (protéticos) no momento da colocação.

Para tanto, fui informado que o exame clínico será feito no momento da primeira (1ª) cirurgia e 6 meses depois, na segunda (2ª) cirurgia. Como parte do exame clínico, será feita a medição do osso da região com o uso de um espessímetro, instrumento de simples uso e que não causa desconforto. Para a medida exata do osso, será realizada uma moldagem da região para confeccionar um guia de posicionamento para este espessímetro. A moldagem será realizada com alginato (material usado pelos dentistas na maioria dos procedimentos clínicos), e um guia será confeccionado, este guia não será para uso diário e/ou contínuo. Sei que o procedimento de moldagem pode causar desconforto devido a moldeira, escoamento do material e eventual sensação de ânsia de vômito passageira, mas sei que todos os cuidados serão considerados visando meu bem estar. Fui informado que todo instrumental utilizado nas moldagens estarão esterilizados.

Estou ciente de que necessitarei comparecer em um instituto radiológico indicado pelos pesquisadores, sendo esse não vinculado a Faculdade de Odontologia – UNESP e portanto localizado fora desta instituição, para realizar três (3) tomografias: 1- uma antes da cirurgia para verificar o osso presente e planejar o enxerto. 2- uma logo após a realização do enxerto, para verificar a quantidade de osso imediatamente após a cirurgia e 3 – uma 6 meses depois da cirurgia de enxerto ósseo, para avaliar o ganho ósseo final e planejar o posicionamento dos implantes. Fui informado (a) que durante os procedimentos de tomada radiográfica, necessitarei de utilizar uma vestimenta confeccionada por chumbo (avental plumbífero) para proteção, minimização da radiação, procedimento utilizado rotineiramente nos consultórios odontológicos na hora de tirar Raio-X.

Fui informado que deverei comparecer 5 vezes em um Laboratório de Análises Clínicas escolhido pelos pesquisadores para coleta de sangue, sendo: 7 dias antes da cirurgia e 15, 30, 90 e 180 dias após a cirurgia. Ficou claro que o sangue coletado será analisado pelos pesquisadores com o objetivo único de detectar possíveis

alterações dos materiais estudados, e portanto fornecer uma maior segurança no meu tratamento. Portanto, autorizo os pesquisadores a realizarem um Hemograma Completo e um teste para verificar a presença de anticorpos (células prejudiciais ao organismo) ao material avaliado (rhBMP-2).

No momento da segunda cirurgia, será colhida, por meio de biópsia, uma pequena quantidade de osso, na região de preparação para colocação do implante sem prejuízo algum para o tratamento reabilitador. Esse procedimento de biópsia, não acarreta nenhuma agressão física, não aumenta o desconforto pós-operatório, não altera o planejamento cirúrgico dos implantes ou maior perda de osso na região, pois será realizado na região que já seria removido o osso para posicionamento do implante. Portanto, autorizo os pesquisadores a realizarem as análises laboratoriais necessárias ou seja, o estudo científico das biópsias (osso coletado).

Também fui informado sobre a possibilidade de ocorrer transtornos durante ou após a cirurgia. Essa possibilidade é pequena, mas pode haver, em casos raros, falta de integração do enxerto, reações inflamatórias e/ou infecciosas pelo material de enxerto, ao anestésico local ou à medicação prescrita após a cirurgia. A medicação será prescrita pelos pesquisadores conforme indicação de uso para cada paciente, e normalmente é um analgésico (para dor), um anti-inflamatório (para inchaço – inflamação) e um antibiótico (para combater a infecção - bactérias).

O pesquisador responsável pela pesquisa bem como os demais profissionais responsáveis pelo tratamento em questão (citados abaixo como demais pesquisadores) se comprometem a dar resposta a qualquer pergunta e esclarecimento a qualquer dúvida relacionada. Sei que posso deixar de participar da pesquisa a qualquer tempo, sem prejuízo do atendimento, cuidados e tratamento pela equipe da especialidade da FOAr-UNESP. O sigilo e o caráter confidencial das informações serão mantidos, zelando pela minha privacidade e garantindo que minha identificação não será exposta nas conclusões ou publicações.

Nome do pesquisador Responsável: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

Nome do responsável pela equipe cirúrgica: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

Nome dos demais pesquisadores: Rubens Moreno de Freitas, Prof. Dr. Luis Antônio Violin D. Pereira e Profa. Dra. Rosemary Adriana C. Marcantonio

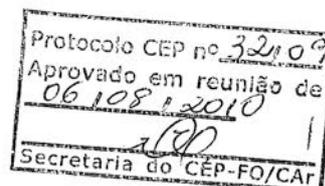
Telefone para contato: 3301-6369/8165-8309

Telefone do Comitê de Ética: 3301-6434/3301-6432

Assinatura do profissional responsável

Assinatura do paciente

Araraquara, ____/____/____



Autorizo a reprodução deste trabalho

(Direitos de publicação reservados ao autor).

Araraquara, 25 de junho de 2013.

Rubens Moreno de Freitas