



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**CRANIOPLASTIA COM PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA,
FOSFATO DE CÁLCIO, MATRIZ DÉRMICA ACELULAR E
ALGINATO DE CÁLCIO: ESTUDO EXPERIMENTAL.**

Autor: **Ciro Paz Portinho, MD, MS.**

Orientador: **Prof. Dr. Marcus Vinícius Martins Collares, MD, PhD.**

Tese de Doutorado

2014



Ciro Paz Portinho, MD, MS

**CRANIOPLASTIA COM PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA,
FOSFATO DE CÁLCIO, MATRIZ DÉRMICA ACELULAR E
ALGINATO DE CÁLCIO: ESTUDO EXPERIMENTAL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração Ciências Cirúrgicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Martins Collares, MD, PhD.

Tese de Doutorado

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Portinho, Ciro

Cranioplastia com proteína morfogenética óssea, fosfato de cálcio, matriz dérmica acelular e alginato de cálcio: estudo experimental. / Ciro Portinho. -- 2014.

146 f.

Orientador: Marcus Collares.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. anormalidades craniofaciais. 2. transplante ósseo. 3. engenharia tecidual. 4. matriz óssea. I. Collares, Marcus, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**Ciro Paz Portinho**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração Ciências Cirúrgicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Aos pacientes com deformidades craniofaciais:

Que possamos pesquisar e aplicar o conhecimento da Medicina e das áreas afins para o reestabelecimento de suas funções, de sua harmonia estética, de sua integração social e de sua dignidade.

Que outros paradigmas de reconstrução surjam, superando os atuais, modificando e/ou destruindo o conhecimento vigente. Que novas gerações de pesquisadores tragam ideias marcantes e inovadoras.

Assim, um dia, quando não mais empunharmos o bisturi, nem mais existirmos neste mundo, teremos nos tornado parte da história da cirurgia plástica reparadora, quando esta terá evoluído sobremaneira com as descobertas e aprimoramentos que o futuro lhe reserva.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcus Vinícius Martins Collares.

Ao Prof. Dr. Luís Alberto Santos – Laboratório de Biomateriais e Cerâmicas Avançadas (LABIOMAT) – Departamento de Materiais – Engenharia de Materiais – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao Prof. Dr. Thadeu Cerski e à Dra. Raquel Camara Rivero – Serviço de Patologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Aos meus mestres da Medicina, da Cirurgia Plástica e da Pesquisa.

Aos meus alunos.

À minha esposa, Juliana Ribeiro Berteli.

À minha família.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas.

Aos animais deste estudo.

Ao Prof. Dr. Roberto Amaral, *in memoriam*.

Ao Prof. Dr. Hilberto Correa de Almeida, *in memoriam*.

“Me interessa o futuro, porque é o lugar onde vou passar o resto da minha vida.” (Woody Allen)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios histológicos para a avaliação de regeneração óssea.

Tabela 2 – Resultados da avaliação histológica por grupos e por animais.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Camundongo Balb-C57 isogênico adulto, utilizado nesta pesquisa.

Figura 2 – Embalagens de alginato de cálcio (LABIOMAT, Departamento de Materiais, Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

Figura 3 – Fosfato de cálcio, utilizado na forma de grânulos (LABIOMAT, Departamento de Materiais, Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

Figura 4 – Embalagem de matriz dérmica acelular Matriderm®.

Figura 5 – Embalagem de proteína morfogenética óssea humana (Immuno®, MP Biomedicals, Solon, Ohio EUA).

Figura 6 – Esquema gráfico da incisão no escalpo (linha vermelha) e da área de craniotomia e cranioplastia no osso parietal esquerdo do camundongo (retângulo).

Figura 7 – Imagem transoperatória. Abertura do escalpo e exposição da área de cranioplastia.

Figura 8 – Imagem transoperatória da craniotomia já realizada.

Figura 9 – Imagem transoperatória. Reconstrução da cranioplastia realizada com alginato de cálcio.

Figura 10 – Imagem transoperatória da cranioplastia com fosfato de cálcio.

Figura 11 – Necropsia. Reabertura do escalpo para retirada do enxerto de reconstrução.

Figura 12 – Peça cirúrgica retirada após a eutanásia, contendo a área de cranioplastia e osso nativo circunjacente.

Figura 13 – Imagem histológica da reconstrução com osso autógeno. Note-se a neoformação óssea (N) na área reconstruída. Coloração: HE. Aumento: 50 vezes.

Figura 14 – Imagem histológica da reconstrução com alginato de cálcio. Note-se a presença de neoformação óssea (N) a partir das margens da falha óssea, onde há osso nativo da calota craniana. Coloração: HE. Aumento: 50 vezes.

Figura 15 – Imagem histológica da reconstrução com alginato de cálcio. Note-se a presença de neoformação óssea (N) a partir das margens da falha óssea, onde há osso nativo da calota craniana. Neste caso, também houve formação de osso na área reconstruída (*). Coloração: HE. Aumento: 50 vezes.

Figura 16 – Imagem histológica da reconstrução com alginato de cálcio (ALG) e proteína morfogenética óssea tipo 2. Note-se a presença de neoformação óssea (N), com fusão de corticais ósseas (F). Coloração: HE. Aumento: 100 vezes.

Figura 17 – Imagem histológica da reconstrução com matriz dérmica (MDM) e proteína morfogenética óssea tipo 2. Note-se a presença de trabéculas de matriz neoformada (N) e medula óssea (MO) dentro da região da reconstrução. Há também fusão de corticais (F). Coloração: HE. Aumento: 200 vezes.

Figura 18 – Imagem histológica da reconstrução com matriz dérmica (MDM) e proteína morfogenética óssea tipo 2. Note-se a presença de neoformação óssea em (N) algumas regiões e a intensa neovascularização (V). Coloração: HE. Aumento: 400 vezes.

Figura 19 – Imagem histológica da reconstrução com fosfato de cálcio (TCP). Percebe-se neoformação óssea (N) e fusão de corticais (F). Coloração: HE. Aumento: 50 vezes.

Figura 20 – Imagem histológica da reconstrução com fosfato de cálcio. Note-se a fusão de corticais (F), a presença de trabéculas de matriz neoformada (N) e medula óssea (MO). Coloração: HE. Aumento: 100 vezes.

Figura 21 – Imagem histológica da reconstrução com fosfato de cálcio. Note-se a fusão de corticais (F), a presença de trabéculas de matriz neoformada (N) e medula óssea (MO). Ainda há matriz em reabsorção (O). Coloração: HE. Aumento: 200 vezes.

Figura 22 – Imagem histológica da reconstrução com fosfato de cálcio e proteína morfogenética tipo 2. Note-se a fusão de corticais, a presença de trabéculas de matriz neoformadas e medula óssea. Coloração: HE. Aumento: 200 vezes.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Frequência relativa (em porcentagem) da infecção de ferida operatória por grupo. (AEN=autoenxerto; ALG=alginato de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular; TCP=fosfato de cálcio; BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG; BM=BMP+MDM; BT=BMP+TCP.)

Gráfico 2 – Pontuação da escala histológica por grupo (pontos). (AEN=autoenxerto; ALG=alginato de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular; TCP=fosfato de cálcio; BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG; BM=BMP+MDM; BT=BMP+TCP.)

Gráfico 3 – Frequência relativa da fusão de corticais por grupo (porcentagem). (AEN=autoenxerto; ALG=alginato de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular; TCP=fosfato de cálcio; BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG; BM=BMP+MDM; BT=BMP+TCP.)

Gráfico 4 – Avaliação de matriz neoformada por grupo (média de pontos). (AEN=autoenxerto; ALG=alginato de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular; TCP=fosfato de cálcio; BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG; BM=BMP+MDM; BT=BMP+TCP.)

Gráfico 5 – Neovascularização por grupo (pontos). (AEN=autoenxerto; ALG=alginato de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular; TCP=fosfato de cálcio;

BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG; BM=BMP+MDM;
BT=BMP+TCP.)

Gráfico 6 – Formação de medula óssea na área receptora (média de pontos).
(AEN=autoenxerto; ALG=alginato de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular;
TCP=fosfato de cálcio; BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG;
BM=BMP+MDM; BT=BMP+TCP.)

LISTA DAS ABREVIATURAS

AEN: autoenxerto; enxerto autógeno.

ALG: alginato de cálcio.

ASC: adipose stem cell.

BA: combinação de BMP e alginato de cálcio.

BM: combinação de BMP e matriz dérmica.

BT: combinação de BMP e TCP.

BMP: proteína morfogenética óssea.

CA: combinação de CTM e alginato.

CT: células-tronco.

CTM: células-tronco mesenquimais.

CTTA: células-tronco de tecido adiposo.

DP: desvio-padrão.

FC: fator de crescimento.

FGF: fibroblast growth factor; fator de crescimento do fibroblasto.

HE: Hematoxilina-eosina.

IGF: insulin growth fator; fator de crescimento similar à insulina.

MDM: Matriderm ®; matriz dérmica.

PDGF: platelet-derived growth factor; fator de crescimento derivado da plaqueta.

PRP: plasma rico em plaquetas.

TCP: fosfato de cálcio.

UEA: Unidade de Experimentação animal.

VEGF: vascular endotelial growth fator; fator de crescimento do endotélio vascular.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Reconstruções Ósseas Craniofaciais	18
1.2. Autoenxertos ou Enxertos Autógenos	19
1.3. Aloenxertos e Xenoenxertos	20
1.4. Engenharia Tecidual	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1. Enxertos Ósseos	27
2.2. Cranioplastias	29
2.3. Cultivos Celulares	31
2.4. Alginato (ALG)	33
2.5. Fosfato de Cálcio (TCP)	33
2.6. Matriz Dérmica (MDM)	34
2.7. Proteína Morfogenética Óssea (BMP) e Outros Fatores de Crescimento (FC)	35
3. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	38
4. OBJETIVOS	46
4.1. OBJETIVO PRINCIPAL	46
4.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	46
5. ARTIGO ORIGINAL	47
5.1. ARTIGO EM LÍNGUA PORTUGUESA	48
5.2. ARTIGO EM LÍNGUA INGLESA	118

1. INTRODUÇÃO

1.1. Reconstruções Ósseas Craniofaciais

A reconstrução óssea, incluindo a cranioplastia, é feita rotineiramente nas cirurgias craniofaciais. Os autoenxertos (AEN) ósseos ou cartilagosos são necessários para muitas destas reconstruções e são o padrão-ouro.¹ A reconstrução da calota craniana é importante não só por questões estéticas, mas também para restituir proteção ao encéfalo e evitar alterações de fluxo cerebral por causa da pressão atmosférica.²

O tecido ósseo é capaz de regenerar após sofrer dano.³ Em condições ideais, há refazimento da arquitetura óssea, ao invés de uma cicatriz fibrosa que ocorre em outros tecidos.⁴ Entretanto, a restituição tecidual óssea pode tornar-se desafiadora para neurocirurgiões e cirurgiões plásticos em alguns casos.⁵ A disponibilidade de AEN pode ser escassa em certos pacientes.⁶⁻⁸ Em outros, a cicatrização osteocartilaginosa pode ser ineficiente por condições congênitas¹ ou adquiridas.⁹ Ainda, diversos problemas podem interferir na cicatrização óssea natural: infecções; medicamentos; radioterapia; tumores; etc.^{1,10} A partir disso, alternativas vêm sendo buscadas.

1.2. Autoenxertos ou Enxertos Autógenos

O estudo dos enxertos ósseos para reconstruções em seres humanos é antigo e as primeiras publicações datam do Século XVII¹¹ e XVIII¹², mas as bases científicas para o transplante ósseo homólogo ou heterólogo foram estabelecidas no Século XIX.¹³

Um enxerto ósseo é definido como um material implantável que promove a cicatrização óssea, sozinho ou em combinação com outro material, através de osteogênese, osteoindução ou osteocondução. Independentemente da sua fonte, os enxertos ósseos passam por cinco estágios: inflamação, revascularização ou neovascularização, osteoindução, osteocondução e remodelamento. A duração de cada estágio, outrossim, vai depender das características do enxerto utilizado.^{3,14}

A osteogênese é a capacidade do tecido em produzir osso novo por osteoblastos, por diferenciação de células progenitoras ósseas, que podem vir da área receptora ou estar presentes no enxerto.

A osteoindução é a capacidade do material em induzir a formação óssea através de células-tronco mesenquimais (CTM) multipotentes. As proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) têm esta propriedade, entre outros fatores de crescimento (FC).¹⁵⁻¹⁷

A osteocondução é a característica do enxerto em permanecer como uma estrutura capaz de suportar mecanicamente o crescimento ósseo e a formação de osso novo, a partir das bordas e em direção ao seu centro.

Por fim, a osteointegração é a propriedade que permite ao enxerto fundir-se ao tecido ósseo vizinho circunjacente, sem que haja a formação de camadas de tecido fibroso.³

Dentre todas as características apresentadas, somente os AEN as possuem completamente.³ Eles continuam sendo o padrão-ouro, mas apresentam alguns vieses: a sua retirada provoca uma morbidade variável na área doadora; eles não estão disponíveis prontamente em todos os casos; e podem ser de moldagem difícil para uma determinada área receptora (1). A sua reabsorção pode ser significativa em algumas regiões anatômicas ou tipos de reconstrução.⁴ O osso de calota craniana congelado pode ter mais reabsorção e infecção do que outras reconstruções.¹⁸ O advento dos enxertos heterólogos e dos materiais sintéticos aumentou a oferta de material, mas também trouxe consigo problemas, como a falta de osteoindução, a imprevisibilidade de reabsorção e propriedades mecânicas desfavoráveis.^{17,19-21} O transplante ósseo é o segundo mais realizado nos Estados Unidos da América, após o de transplante de células sanguíneas.³ Os custos associados a procedimentos de AEN e aloenxertos aproximam-se de US\$ 2,5 bilhões de dólares por ano naquele mesmo país.¹

1.3. Aloenxertos e Xenoenxertos

Os aloenxertos, homoenxertos ou enxertos homólogos são derivados outros indivíduos da mesma espécie. Já os xenoenxertos, heteroenxertos ou enxertos heterólogos são derivados de indivíduos de espécies diferentes. Ambos têm características osteoindutivas e osteocondutivas, mas não têm as propriedades osteogênicas de um AEN.^{3,22,23}

Tanto os aloenxertos como os xenoenxertos têm grande disponibilidade, reduzem o tempo cirúrgico e diminuem a morbidade de uma área doadora. Por

outro lado, estão associados a rejeição, transmissão de doenças e custo mais elevado.³

1.4. Engenharia Tecidual

Há muitas pesquisas em andamento que visam a diminuir ou prescindir de áreas doadoras. A engenharia tecidual (ET) tem estudado o uso combinado de células com potencial regenerativo, matrizes ou carreadores e fatores de crescimento (FC). Os primeiros trabalhos publicados sobre ET são atribuídos a Vacanti e cols. em 1988 (*apud* Slaughter e cols. [2009])²⁴, que propuseram esta tríade (célula, matriz, FC), vigente até hoje. Há novos campos de estudo que estão surgindo, que poderão ser associados à ET futuramente: terapia gênica; impressoras biológicas e nanotecnologia. As terapêuticas com ET deverão reduzir a morbidade cirúrgica e aumentar a oferta de material de reconstrução.^{25,26}

As células com potencial regenerativo têm sido amplamente estudadas. Destacam-se as células-tronco mesenquimais (CTM), tanto da medula óssea quanto do tecido adiposo (CTTA).^{1,27,28} Embora as CTM sejam o destaque atual dos estudos, os fibroblastos e as células pré-diferenciadas ainda são objetivo de vários outros.²⁹ Existe um conceito de que a presença de células dentro de um enxerto ou matriz é um dos fatores mais importantes para a sua integração e regeneração.³⁰⁻³⁴ Entretanto, há estudos demonstrando falha na reconstrução de cranioplastias quando se utilizou CTTA.^{35,36} Ainda, vários outros estudos utilizando BMP demonstraram a sua capacidade osteocondutiva e osteoindutiva sem o acréscimo de células, o que desafia a obrigatoriedade das

mesmas.³ Assim, deve-se avaliar as interações entre FC (ex.: BMP) e matrizes, sem a adição de células regenerativas.

Os FC interagem no metabolismo celular. No tecido ósseo, as células proliferam significativamente *in vitro* em resposta aos seguintes FC: BMP – principalmente 2 e 7; FC de fibroblastos-2 (FGF-2); FC derivado de plaquetas (PDGF); FC tipo insulina-1 (IFG-1); e o FC endotelial vascular (VEGF).^{1,4} Dentre estes, a BMP tem sido considerada o maior mediador da osteogênese e regeneração óssea atualmente.³⁷

As BMP são membros da superfamília do FC transformante-beta (TGF-beta). O genoma humano decodifica 20 BMP. As sequências de aminoácidos indicam três subclasses. A primeira classe contém a BMP-2 e a BMP-4, sendo a primeira de interesse para este estudo. A BMP-2 foi a primeira a demonstrar a indução de formação de novos tecidos ósseos e cartilagosos.^{15,38}

As BMP podem induzir proliferação, diferenciação, inibição de crescimento e de maturação em diversas células, dependendo do microambiente celular e das interações com outros fatores regulatórios.¹⁵⁻¹⁷ Falando em termos mais ortopédicos, acredita-se que esta molécula possa iniciar a cicatrização de uma fratura, assim como diminuir o risco de uma não-união óssea. De fato, a não-união óssea em pacientes parece estar relacionada a alterações genéticas no sistema de sinalização das BMP. Por fim, há indícios que o tratamento com BMP também possa acelerar a cicatrização óssea.³⁹

As desvantagens vigentes das BMP são: necessidade de dose suprafisiológica para ser clinicamente efetiva; incapacidade de sustentar atividade biológica adequada quando não se consegue manter concentrações

estáveis por um bom período de tempo; custo alto. Assim, mesmo para a BMP alternativas ou combinações vêm sendo estudadas.³⁷ Ainda, há evidências experimentais que mostram sua capacidade para promover a invasão neoplásica, através do estímulos de fibroblastos estromais.¹⁶ Este tipo de avaliação foge ao espectro deste estudo.

Os hidrogéis são estruturas tridimensionais, formadas por homopolímeros hidrofílicos, copolímeros ou macrômeros (cadeias macromoleculares pré-formadas), polimerizadas para formar matrizes insolúveis. Eles podem ser sintéticos ou biológicos. Dentre estes últimos, existem o alginato (ALG), a agarose, o quitosan, o hialuronato, a fibrina, o colágeno, entre outros.²⁴

O ALG é um polímero natural de heteropolissacarídeos, sendo um dos mais utilizados em trabalhos de ET.⁴⁰ Ele é abundante na natureza, sendo encontrado em algas marinhas e em algumas bactérias. Ele tem algumas propriedades únicas: comportamento de gel; biodegradabilidade; biocompatibilidade; facilidade de encapsulamento celular e de recuperação celular e versatilidade química.³⁷ Suas desvantagens são: a baixa estabilidade e a porosidade alta que pode dificultar a adesão celular.⁴¹ Alguns trabalhos demonstram sucesso em reconstruções experimentais ósseas com ALG.^{26,42,43} Um estudo recente, combinando uma matriz tridimensional de ALG e BMP-2, demonstrou efetividade na osteoindução *in vitro* e *in vivo*. O ALG parece ser útil na confecção de matrizes tridimensionais por causa de sua viscosidade, compatibilidade celular e polimerização.¹⁷ Nosso estudo não foi projetado para a construção de uma matriz tridimensional de ALG.

O fosfato de cálcio (TCP) é uma matriz bastante utilizada clinicamente. Ele é representado pela fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, motivo pelo qual é chamado também de difosfato de tricálcio ou tricálcio difosfato. A sua degradação resulta em íons de cálcio e de fósforo, que são favoráveis à regeneração óssea.⁴⁴ Há três formas do TCP: beta-TCP de baixa temperatura; alfa-TCP e alfa-linha-TCP de alta temperatura. As formas alfa e beta estão em uso clínico bastante difundido atualmente. O beta-TCP é o componente de diversas biocerâmicas comerciais, enquanto que o alfa-TCP é o constituinte principal dos cimentos em pó.⁴⁵ A última apresentação (alfa-linha-TCP) não tem interesse prático porque só existe em temperaturas acima de 1430 graus Celsius. Há estudos mais recentes que demonstram ser possível confeccionar esqueletos (*scaffolds*) tridimensionais de TCP com impressoras 3-D.⁴⁶

O uso isolado do TCP em cranioplastias é relativamente comum, mas não é livre de complicações. Uma revisão de várias séries de casos demonstrou que há complicações em 13% dos casos, sendo que isso pode ocorrer anos depois da reconstrução.⁴⁷ A radioterapia e a comunicação com seios paranasais aumentam significativamente os riscos. A associação de TCP com hidroxiapatita tem apresentado bons resultados em cranioplastias experimentais⁴⁸ e a associação de TCP, hidroxiapatita e BMP-2 também demonstrou ser positiva.⁴⁴

A interação do TCP com células progenitoras parece positiva em alguns estudos. O TCP possui uma arquitetura tridimensional favorável, assim como o diâmetro de seus poros. Como já foi dito, ele está presente comercialmente na forma de blocos ou grânulos. Há vários estudos combinando TCP com FC, com resultados positivos e negativos.^{49,50}

As matrizes dérmicas (MDM) acelulares vêm sendo utilizadas cada vez mais em cirurgia plástica reparadora. Usa-se, por exemplo, para a cobertura de áreas de retração cicatricial em articulações, na face para melhorar o aspecto estético, na cobertura de exposições tendinosas e em procedimentos odontológicos regenerativos periodontais.^{51,52} A MDM bovina foi desenvolvida por Burke e cols. em 1981 (*apud* Simão, 2012).⁵³ Na preparação da MDM, há a remoção da epiderme e das células da derme, mas preserva-se o complexo da membrana basal e da estrutura do colágeno e da elastina.⁵¹ Em ferimentos cutâneos de espessura total, a reconstrução da derme é fundamental para os resultados estéticos e funcionais. As matrizes ou substitutos dérmicos são estruturas fabricadas com componentes da matriz extracelular: colágeno e glicosaminoglicanas ou ácido hialurônico.⁵⁴ Algumas matrizes podem receber enxerto de pele parcial no mesmo tempo cirúrgico de sua implantação, outras não, dependendo de sua porosidade e espessura. As matrizes mais finas permitem a passagem de sangue e nutrientes ao enxerto, enquanto as mais espessas precisam ser invadidas por neovascularização antes de estarem prontas como leito de enxertia. A combinação de MDM acelulares e matrizes ósseas funciona melhor do que as primeiras sozinhas.³⁴ Entretanto, seu uso em falhas ósseas não está bem avaliado. As MDM parecem ter propriedades mecânicas inferiores às matrizes ósseas e serem suscetíveis a deslocamento e compressão durante várias etapas, tanto da intervenção cirúrgica quanto da cicatrização.³ Além disso, são biomateriais bastante suscetíveis à degradação em presença de contaminação bacteriana ou fúngica.^{52,53} O seu uso isoladamente deve ser feito em áreas de baixa contaminação, mas não se sabe

se a sua associação com FC ou culturas celulares é capaz de aumentar a sua resistência a um quadro de contaminação importante ou mesmo infecção.

A estrutura tridimensional de uma matriz é muito importante para uma regeneração óssea adequada e para evitar o colapamento da falha em algumas situações.^{23,28,51} O tamanho dos poros de uma matriz são também de grande importância. Considera-se ótimo um diâmetro entre 250 e 300 micrômetros, para que haja crescimento ósseo e osteocondução competente.^{3,55} Os quesitos para uma matriz eficiente, fabricada por ET são: (1) facilidade em ser produzida com geometria apropriada; (2) culturas *in vitro* bem sucedidas, nas quais as células proliferam suficientemente e diferenciam-se em tipos celulares apropriados, com expressão fenotípica também adequada; (3) controle do cultivo e da distribuição destas células e de outros componentes dentro do construto.³² Em uma combinação de BMP com matrizes, fica a dúvida do quanto a estrutura tridimensional é importante e do quanto da capacidade regenerativa desta combinação vem da BMP.

Existe ainda um outro fator (além de células, matrizes e FC), que foge ao espectro deste trabalho, mas que poderá ganhar mais importância, que é a terapia gênica, associada ou não à terapia celular com CT.¹ Há diversas possibilidades para estas combinações, que precisam focar em características biológicas, mas também em relações de custo-benefício e realidades econômicas diferentes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Enxertos Ósseos

O primeiro procedimento descrito, que primeiro incluiu um enxerto ósseo heterólogo (de um cão) teria sido em 1668 por Van Meekeren.¹¹ Macewen, em 1880, foi pioneiro ao descrever o uso do homoenxerto como forma de reconstituir o tecido ósseo.¹² Nesse procedimento, ele utilizou com sucesso a tíbia de uma criança para reconstruir o úmero de um menino de quatro anos. A base científica do transplante ósseo foi estabelecida mais tarde, na metade do século XIX, com as observações feitas por Ollier, em 1867, sobre as propriedades osteogênicas do osso e perióstio.¹³

Em 1997, Ferreira¹⁴ avaliou a reconstrução do arco zigomático de coelhos Nova Zelândia com três tipos de enxerto ósseo: autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados. Ele demonstrou que os transplantes do grupo homogêneo fresco apresentaram os maiores índices de atividade osteoclástica e os menores índices de atividade osteoblástica, com tendência ao balanço negativo na integração óssea. Já os transplantes do grupo homogêneo congelado apresentaram os menores índices de atividade osteoclástica tardiamente, acompanhados de índices relativamente altos de atividade osteoblástica, o que demonstrou a manutenção de sua propriedade de osteoindução, justificando seu uso clínico.

Em 2000, Sailer e Pajarola³⁰ descreveram as características de um material de substituição óssea ideal. Os vários tipos de biomateriais podem ser tanto incorporados no interior do tecido ósseo do hospedeiro quanto substituídos por tecido ósseo. A conversão completa do material de preenchimento em osso autógeno, segundo eles, poderia ser esperada somente após um período de dois anos.

Em 2002, Kuboki e cols.⁵⁵ realizaram um estudo sobre os poros em diferentes matrizes (*scaffolds*). Eles demonstraram que em poros de 0,1 mm há crescimento de cartilagem, seguida de tecido ósseo. Já em poros de 0,35 mm há crescimento direto de tecido ósseo. Eles concluíram que há uma geometria indutora de vascularização, que seria crucial para a osteogênese.

Em 2007, Orsi e cols.²¹ avaliaram a confecção de retalhos osteomiocutâneos, combinando osso liofilizado e CTM derivadas de medula óssea. Eles não demonstraram diferença entre a adição ou não daquelas células na osteocondução ou osteoindução dentro do bloco de osso liofilizado.

Em 2007, Malafaya e cols.⁴⁰ publicaram uma extensa revisão sobre matrizes e carreadores.

Em 2009, Slaughter e cols.²⁴ publicaram um artigo de revisão sobre os hidrogéis como matrizes para reconstruções com ET. Além disso, estes polímeros permitem o controle da liberação de drogas e proteínas a tecidos e células e servem como barreiras entre tecidos e biomateriais.

Em 2012, Azi e cols.¹⁰ realizaram um estudo experimental de infecção óssea em coelhos, demonstrando a incapacidade das falhas ósseas em regenerarem sem tratamentos adicionais. A sua escala histológica consistia

dos seguintes critérios: presença de bactérias intraósseas; inflamação intraóssea; neoformação óssea.

Em 2014, Oryan e cols.³ publicaram uma revisão extensa sobre ET óssea, destacando as opções terapêuticas atuais e as pesquisas mais recentes.

2.2. Cranioplastias

Miyake e cols.² (2000) descreveram resultados satisfatórios com a combinação de TCP e hidroxiapatita. Amaral²³ (2013) apresentou um estudo experimental de reconstrução de um defeito de calvária em ratos, reconstruído com hidroxiapatita sintética ou tendão bovino mineralizado. A análise foi por histologia e microtomografia computadorizada. Os resultados foram mais favoráveis com a hidroxiapatita. A microtomografia apresentou baixa especificidade e alta sensibilidade, enquanto que a histologia distinguia os materiais e o tecido adjacente, sem quantificá-los de maneira fácil e precisa; assim, os métodos foram considerados complementares. Rocque e cols.¹⁸ (2013) fizeram uma revisão de vários artigos de séries de casos sobre cranioplastias. Em uma junção de 441 casos, houve reabsorção óssea significativa em 77 (17,5%) e infecção em 30 (6,8%). Destes casos, 214 cranioplastias foram de osso congelado, dos quais houve infecção em 74 (34,6%) e infecção em 16 (7,5%), incidências portanto mais elevadas do que a média de todos os grupos. Afifi e cols.⁴⁷ (2010) demonstraram que há cerca de 13% de complicações em cranioplastias realizadas com TCP isoladamente. Neste estudo, a radioterapia e a comunicação com os seios paranasais

aumentava a incidência de complicações. Thesleff e cols.⁵ (2011) publicaram uma série de casos demonstrando resultados clínicos satisfatórios nas cranioplastias feitas a partir da combinação de TCP e CTTA.

Sousa⁴⁸ (2010) apresentou um estudo experimental de cranioplastias em ratos com a associação de TCP e hidroxiapatita. A matriz óssea neoformada foi maior nos defeitos ósseos preenchidos pelos biomateriais do que no grupo controle.

Dudas e cols.³⁵ (2006) estudaram cranioplastias experimentais também em coelhos. Os grupos de estudo foram os seguintes: esponja de gelatina; a mesma esponja com CTTA indiferenciadas; a mesma esponja com CTTA diferenciadas para a linhagem óssea. Apenas o último grupo mostrou maior indução de cicatrização óssea.

Portinho e cols.¹⁹ (2006) estudaram a reconstrução de calota craniana em camundongo, utilizando osso liofilizado e CTM derivadas de medula óssea. Eles demonstraram que os enxertos de osso liofilizado contendo aquelas células regeneram melhor do que os enxertos acelulares.

Oliveira e cols.²⁰ (2007) publicaram um estudo comparando cranioplastias realizadas com osso liofilizado bovino, osso homólogo congelado e osso autógeno. O osso autógeno foi melhor em todas as aferições de regeneração óssea. O osso liofilizado foi pior que o congelado em seis semanas, mas superior em 15 semanas.

Portinho e cols.³³ (2007) estudaram os níveis de FA dentro de enxertos ósseos de osso liofilizado utilizados em cranioplastias. Eles demonstraram que a adição de CTM derivadas de medula óssea aumenta significativamente os níveis de FA.

Chiarello e cols.⁸ (2013) publicaram um artigo de revisão sobre a reconstrução de defeitos ósseos com enxertos autógenos, alógenos e sintéticos.

Arias-Gallo e cols.⁴ (2013) publicaram um estudo experimental de cranioplastias, combinando ou não os seguintes elementos: osso mineral bovino (Bio-Oss ®); esponja de gelatina (Spongostan ®) e FC de fibroblastos (FGF). A reconstrução combinada com Spongostan ® e FGF foi significativamente melhor do que a dos demais grupos.

2.3. Cultivos Celulares

Ito e cols.³¹ (2003) estudaram a interação entre células e a gelatina com transglutaminase como carreador. Eles demonstraram que o aumento da expressão de duas proteínas de adesão celular, vitronectina e de fibronectina, aumentam significativamente a proliferação celular.

Lucarelli e cols.⁶ (2004) revisaram a possibilidade de reconstruções ósseas com CTM. Eles destacam a importância das CTM autógenas adultas, que facilitam as questões éticas e não requerem imunossupressão. Os autores também apresentam duas abordagens pré-clínicas que precisam ser estudadas: as CTM da medula óssea e as de outros tecidos. Assim, novas fontes foram consideradas e eleitas para técnicas de ET óssea.

Brodie e cols.⁷ (2005) estudaram a proliferação celular de osteoblastos de ratos após a colocação de colágeno tipo I em matrizes de hidroxiapatita e TCP. A avaliação foi feita por fluorescência com carboxifluoresceína. Eles registraram aumento desta proliferação quando há a cobertura de colágeno.

Schantz e cols.³² (2005) avaliaram o comportamento de CTM humanas cultivadas *in vitro* sobre polímeros de policaprolactona combinada a cerâmica de TCP. Eles demonstraram que houve adesão, migração e diferenciação destas células após oito semanas de cultivo.

Padoin e cols.³⁰ (2008) avaliaram qual área doadora de CTTA, coletadas por lipoaspiração, tinha maior potencial de integração e regeneração. As melhores áreas foram a região abdominal infraumbilical e o terço superior da face interna das coxas.

Monaco e cols.¹ (2011) realizaram uma revisão, comparando as CTTA e as CTM de medula óssea. Eles demonstraram que há um grande potencial em utilizar as CTTA associadas a matrizes como substitutos de enxertos ósseos.

Ge e cols.³⁴ (2013) compararam o crescimento e a diferenciação de CT humanas, derivadas dos ligamentos periodontais, colocadas em matriz dérmica porcina acelular, associada ou não a hidroxiapatita nanoestruturada. Eles demonstraram que a adição de hidroxiapatita aumenta: a viabilidade celular; os níveis de FA; a expressão dos marcadores *runt-related transcription factor-2* (*Runx2*), osteopontina e osteocalcina.

Sommar e cols.³⁴ (2013) apresentaram um estudo experimental de reconstrução de defeitos ósseos femorais em ratos atímicos. As reconstruções foram feitas com fibroblastos humanos derivados da derme, plasma rico em plaquetas e microcarreadores de gelatina. Eles demonstraram que os fibroblastos sobreviveram na falha óssea e estimularam a regeneração óssea.

Nae e cols.²⁸ (2013) publicaram um artigo de revisão sobre CTTA e enfatizaram o potencial regenerativo destas células.

2.4. Alginato (ALG)

Smidsrod e cols.⁴¹ (1990) publicaram um artigo descrevendo as características biológicas do ALG, pormenorizando seus aspectos tanto positivos quanto negativos como carreador celular.

Galateanu e cols.²⁵ (2012) avaliaram a expansão de CTTA. Eles compararam a expansão de culturas sobre matrizes de gluconato de cálcio contra hidrogel de ALG. As primeiras demonstraram vantagem quanto a proliferação e diferenciação, mas houve crescimento similar de células em ambas as matrizes.

2.5. Fosfato de Cálcio (TCP)

Pound⁴³ (2004), Xu²⁶ (2005) e Simmons⁴² (2006) estudaram reconstruções combinando alginato e CTM da medula óssea. Houve regeneração tecidual em todos estes experimentos.

Carrodegua e De Aza⁴⁵ (2011) publicaram um estudo comparativo entre alfa-TCP e beta-TCP, mostrando propriedades e aplicações possíveis para ambas as formas moleculares.

Ozdemir e cols.⁴⁹ (2012) estudaram a reconstrução de calotas cranianas em coelhos, com a utilização de plasma rico em plaquetas (PRP). Os grupos nos quais utilizou-se TCP, independentemente do uso do PRP, obtiveram melhores resultados.

Ozdemir e Okte⁵⁰ (2012) estudaram clinicamente a combinação de TCP e PRP. Foram incluídos 14 pacientes com periodontite crônica. Não houve diferença clínica nem radiológica na adição de PRP ao TCP.

Inzana e cols.⁴⁶ (2014) publicaram um estudo experimental de nove semanas, demonstrando otimização da osteocondutibilidade de esqueletos de TCP fabricados em impressoras 3-D, nos quais foi adicionado colágeno tipo 1.

2.6. Matriz Dérmica (MDM)

Pereima e cols.⁵² (2005) publicaram uma série retrospectiva de casos do uso de MDM em crianças e demonstraram uma média de 86,36% de integração destas matrizes em áreas cruentas secundárias a queimaduras, mas com perda de cerca de 50% da área das matrizes em casos de infecção bacteriana. Simão e cols.⁵³ (2012) citam, em sua revisão de série de casos, os pilares da utilização de matrizes dérmicas acelulares: manter a circulação, prevenir infecções, obter cobertura adequada para as feridas, preservar ou obter funcionalidade e reabilitação do membro.

Fernandes⁵¹ (2010) publicou um estudo clínico em que comparou o uso de MDM, associada ou não a uma matriz óssea inorgânica, nas falhas alveolares surgidas após extrações dentárias. Demonstrou-se que a associação das matrizes favoreceu de maneira significativa a manutenção da espessura no sentido horizontal da crista alveolar, em comparação com a MDM apenas.

Philandrianos e cols.⁵⁴ (2012) publicaram um estudo experimental, comparando cinco matrizes dérmicas acelulares (Integra®, Proderm®,

Renoskin®, Matriderm® e Hyalomatrix®), colocadas em ferimentos agudos de 16 cm² nas regiões paraespinhais de porcos. Após 21 dias, os animais foram randomizados para receber enxerto de pele parcial fina ou autoenxerto de células epiteliais. Não houve diferença entre os grupos após 2 meses da reconstrução.

2.7. Proteína Morfogenética Óssea (BMP) e Outros Fatores de Crescimento (FC)

Mackenzie e cols.²² (2001) reconstruíram defeitos ósseos em rádios de coelhos, combinando FGF tipo 1, matriz óssea desmineralizada de coelhos e fibrina. Os animais foram sacrificados após quatro ou oito semanas. A combinação entre os três elementos foi melhor que eles sozinhos ou com outras combinações, tanto do ponto de vista histomorfométrico como radiomorfométrico.

Issack e Di Cesare⁹ (2003) examinaram o efeito das BMP em reparos ósseos e cartilagosos. Tais proteínas têm a capacidade de induzir a formação, até mesmo ectópica, de osso e cartilagem *in vivo*. Trabalhos em animais têm demonstrado que as BMP aumentam fusões espinhais, aceleram uniões ósseas e otimizam cicatrizações cartilagosas.

López-Morales e cols.³⁸ (2010) realizaram reconstruções experimentais de defeitos femorais em coelhos, combinando BMP (tipo 2 ou 4) e células em um gel de ALG. Os grupos com BMP-2 apresentaram regeneração óssea subcondral e os com BMP-4, regeneração cartilaginosa hialina.

Smith e cols.³⁶ (2011) estudaram cranioplastias experimentais em coelhos. Eles montaram grupos de estudo com cinco modalidades: controle (sem reparo); esponja de colágeno acelular (controle do veículo); a mesma esponja com BMP-2; a mesma esponja com CTTA; a mesma esponja com CTTA diferenciadas para a linhagem óssea. A maior porcentagem de regeneração ocorreu no grupo com BMP-2.

Jang e cols.⁴⁴ (2012) realizaram reconstruções de cranioplastias em ratos, combinando TCP, hidroxiapatita e BMP-2 e comparando esta associação com seus controles, após duas e oito semanas de cicatrização, com concentrações variáveis de BMP-2, de 0,025 a 0,2 mg/ml. Houve regeneração maior com a associação citada em relação aos controles, não sendo dose-dependente.

Moshaverinia e cols.³⁷ (2013) demonstraram regeneração de falhas cranianas de camundongos com a combinação de CTM humanas da medula óssea e BMP-2.

Jain e cols.¹⁵ (2013) publicaram uma revisão sobre BMP. O artigo descreve o histórico da descoberta da BMP, a sua síntese no tecido ósseo, a sua classificação e as funções já descobertas e atribuídas a cada subtipo.

Poldervaart e cols.¹⁷ (2013) realizaram um estudo de seis semanas, combinando BMP-2 e ALG e comparando a liberação rápida *versus* lenta do BMP-2. O último grupo apresentou melhores resultados.

Aspenberg³⁹ (2013) apresentou uma revisão sobre a cicatrização de fraturas e demonstrou que o uso ortopédico de BMP apresenta alguns pontos positivos, mas outros controversos. Ele cita que a BMP pode reduzir a

incidência de infecção em regiões de fratura, mas que nenhum estudo com BMP mostrou superioridade desta molécula ao osso autólogo medular.

Owens e cols.¹⁶ (2013) realizaram um trabalho experimental *in vitro*, que demonstrou que a BMP-4 pode aumentar a invasão de células de carcinoma mamário.

3. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Monaco E, Bionaz M, Hollister SJ, Wheeler MB. Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology* 2011; 75(8): 1381-99.
2. Miyake H, Ohta T, Tanaka H. A new technique for cranioplasty with L-shaped titanium plates and combined hydroxyapatite and tricalcium phosphate (Cerattice). *Neurosurg* 2000; 46(2): 414-8.
3. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2014; 9(18): 1749-99.
4. Arias-Gallo J, Chamorro-Pons M, Avedaño C, Giménez-Gallego G. Influence of acidic fibroblast growth factor on bone regeneration in experimental cranial defects using Spongostan and Bio-Oss as protein carriers. *J Craniofac Surg* 2013; 24(5): 1507-14.
5. Thesleff T, Lehtimäki K, Niskakangas T, Mannerström B, Miettinen S, Suuronen R, Öhman J. Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: a novel method for cranial reconstruction. *Neurosurg* 2011; 68(6): 1535-40.
6. Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A, Fornasari PM. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfus Apher Sci* 2004; 30(2): 169-74.

7. Brodie JC, Goldie E, Connel G, Merry J, Grant MH. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. *J Biomed Mater Res* 2005; 73(4): 409-21.
8. Chiarello E, Cadossi M, Tedesco G, Capra P, Calamelli C, Shehu A, Giannini S. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. *Aging Clin Exp Res* 2013; 25(Suppl.1): S101-3.
9. Issack PS, DiCesare PE. Recent advances toward the clinical application of bone morphogenetic proteins in bone and cartilage repair. *Am J Orthop.* 2003; 32(9): 429-36.
10. Azi ML, Junior MK, Martinez R, Salata LA, Paccola CAJ. Desenvolvimento de um modelo experimental de falha óssea infectada na ulna de coelhos. *Acta Ortop Bras* 2012; 20(3): 136-8.
11. Andersen JR, Detlie T, Griffiths HJ. The radiology of bone allografts. *Radiol Clin North Am* 1995; 33(2): 391-400.
12. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft and bone graft substitutes. *Clin Orthop Rel Res* 1999; 360: 71-86.
13. Volpon JB, Costa RMP. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. *Rev Bras Ortop* 2000; 35(6): 219-24.
14. Ferreira JCR. Avaliação cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados do arco zigomático. Estudo experimental em coelhos. 128 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, 1997.
15. Jain AP, Pundir S, Sharma A. Bone morphogenetic proteins: the anomalous molecules. *J Indian Soc Periodontol* 2013; 17(5): 583-6.

16. Owens P, Polikowsky H, Pickup MW, Gorska AE, Jovanovic B, Shaw AK, Novitskiy SV, Hong CC, Moses HL. Bone morphogenetic protein stimulates mammary fibroblasts to promote mammary carcinoma cell invasion. *Plos One* 2013; 8(6): e67533.
17. Poldervaart MT, Wang H, van der Stok J, Weinans H, Leeuwenburgh SC, Oner FC, Dhert WJ, Alblas J. Sustained release of BMP-2 in bioprinted alginate for osteogenicity in mice and rats. *PLoS One* 2013; 8(8): e72610.
18. Rocque BG, Amancherla K, Lew SM, Lam S. Outcomes of cranioplasty following decompressive craniectomy in the pediatric population. *J Neurosurg Pediatr* 2013; 12(2): 120-5.
19. Portinho CP, Collares MVM, Silva FH, Nardi NB, Pinto RDA, Siqueira E, Morellato G, Sumino K. Reconstrução de calota craniana com células-tronco mesenquimais indiferenciadas: estudo experimental. *Rev Bras Cir Plast* 2006; 21(3): 161-5.
20. Oliveira ACP, Collares MVM, Galia CR, Edelweiss MI, Pinto RDA, Knebel L. Comparação entre enxerto ósseo autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em modelo experimental de cranioplastia. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac* 2007; 10(4): 140-6.
21. Orsi VV, Collares MVM, Nardi NB, Pinto RDA, Meirelles LS, Meurer L, Pilla C, Portinho CP, Riboldi M, Auer TB. Osso liofilizado bovino não-desmineralizado com células-tronco mesenquimais para engenharia tecidual: estudo experimental em sítio heterotópico. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac* 2007; 10(4): 133-9.

22. Mackenzie DJ, Sipe R, Buck D, Burgess W, Hollinger J. Recombinant human acidic fibroblast growth factor and fibrin carrier regenerates bone. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107(4): 989-6.
23. Amaral MB. Capacidade de regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária: análise histológica e microtomografia computadorizada. 110 f. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
24. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater* 2009; 21(32-33): 3307-29.
25. Galateanu B, Dimonie D, Vasile, Nae S, Cimpean A, Costache M. Layer-shaped alginate hydrogels enhance the biological performance of human adipose-derived stem cells. *BMC Biotechnol* 2012; 12(35): 1-14.
26. Xu XL, Lou J, Tang T, Ng KW, Zhang J, Yu C, Dai K. Evaluation of different scaffolds for BMP-2 genetic orthopedic tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 75(2): 289-303.
27. Padoin AV, Braga-Silva J, Martins P, Rezende K, Rezende AR, Grecchi B, Gehlen D, Machado DC. Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration. *Plast Reconstr Surg* 2008; 122(2): 614-8.
28. Nae S, Bordeianu I, Stancioiu AT, Antohi N. Human adipose-derived stem cells: definition, isolation, tissue-engineering applications. *Rom J Morphol Embryol* 2013; 54(4): 919-24.

29. Sommar P, Junker JP, Strandenes E, Ness C, Hansson T, Johnson H, Kratz G. Osteogenically-induced human dermal fibroblasts as a tool to regenerate bone. *J Plast Surg Hand Surg* 2013; 47(1): 8-13.
30. Sailer HF, Pajarola GF. *Cirurgia Bucal*. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2000. pp. 213-20.
31. Ito A, Mase A, Tazikawa Y, Shinkai M, Honda H, Hata K, Ueda M, Kobayashi T. Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 2003; 95(2): 196-9.
32. Schantz JT, Brandwood A, Hutmacher DW, Khor HL, Bittner K. Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymeric-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition modeling. *J Mater Sci Mater Med* 2005 Sep; 16(9): 807-19.
33. Portinho CP, Riboldi M, Pilla C, Collares MVM, Silva FH, Meirelles LS, Nardi NB, Pinto RDA. Fosfatase alcalina em enxertos ósseos contendo células-tronco. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac* 2007; 10(3): 97-100.
34. Ge S, Zhao N, Wang L, Liu H, Yang P. Effects of hydroxyapatite nanostructure on channel surface of porcine acellular dermal matrix scaffold on cell viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Int J Nanomedicine* 2013 May;8:1887-95. doi: 10.2147/IJN.S44695.
35. Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, Penascino VM, Mooney MP, Jiang S, Rubin JP, Losee JE. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. *Ann Plast Surg* 2006;56(5):543-8.

36. Smith DM, Cooper GM, Afifi AM. Regenerative surgery in cranioplasty revisited: the role of adipose-derived stem cells and BMP-2. *Plast Reconstr Surg* 2011; 128(5): 1053-60.
37. Moshaverinia A, Ansari S, Chen, Xu X, Akiyama K, Snead ML, Zadeh HH, Shi S. Co-encapsulation of anti-BMP2 monoclonal antibody and mesenchymal stem cells in alginate microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2013;34(28):6572-9.
38. Lópiz-Morales Y, Abarategi A, Ramos V, Moreno-Vicente C, López-Durán L, López-Lacomba JL, Marco F. In vivo comparison of the effects of rhBMP-2 and rhBMP-4 in osteochondral tissue regeneration. *Eur Cell Mater* 2010;20:367-78.
39. Aspenberg P. Special review: accelerating fracture repair in humans: a Reading of old experiments and recent clinical trial. *BoneKEy Reports* 2013; 2:244.
40. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Delivery Rev* 2007; 59: 207-33.
41. Smidsrod O, Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Tibtech* 1990; 8(3): 71-8.
42. Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 2004; 35(2): 562-9.
43. Pound JC, Green DW, Chaudhuri JB, Mann S, Roach HI, Oreffo RO. Strategies to promote chondrogenesis and osteogenesis from human

- bone marrow cells and articular chondrocytes encapsulated in polysaccharide templates. *Tissue Eng* 2006; 12(10): 2789-99.
44. Jang JW, Yun JH, Lee KI, Jang JW, Jung UW, Kim CS, Choi SH, Cho KS. Osteoinductive activity of biphasic calcium phosphate with different rhBMP-2 doses in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 113(4): 480-7.
45. Carrodeguas RG, De Aza S. Alfa-tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia* 2011; 7(10): 3536-46.
46. Inzana JA, Olvera D, Fuller SM, Kelly JP, Graeve OA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials* 2014; 35(13): 4026-34.
47. Afifi AM, Gordon CR, Pryor LS, Sweeney W, Papay FA, Zins JE. Calcium phosphate cements in skull reconstruction: a meta-analysis. *Plast Reconstr Surg* 2010; 126(4): 1300-9.
48. Sousa CDFS. Estudo histomorfométrico da reparação óssea em ratos após o uso de biomaterial de origem sintética (hidroxiapatita + beta-tricalciofosfato). 76 f. Monografia. Faculdade de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2010.
49. Özdemir B, Kurtis B, Tüter G, Sengüven B, Tokman B, Pinar-Özdemir S, Demirel I, Özcan G. Double-application of platelet-rich plasma on bone healing in rabbits. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17(1): e171-7.

50. Özdemir B, Okte E. Treatment of intrabony defects with beta-tricalcium phosphate alone and in combination with platelet-rich plasma. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 2012; 100(4): 976-83.
51. Fernandes PG. Utilização da matriz dérmica acelular e matriz óssea inorgânica/P-15 na preservação das deformidades da crista óssea alveolar após extração dentária em humanos. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2010, 84 pp.
52. Pereima MJ, Capella MR, Goldberg P, Quaresma E, Araújo EJ, Souza JA, Azevedo M, Colombeli EM, Feijó RS, Souza VA Jr, Perdomo HAR. Uso de matrizes dérmicas no tratamento de queimaduras em crianças: análise de 11 casos. *Arq Catarin Med* 2012; 34(1): 38-46.
53. Simão TS, Pitol DN, Máximo FR, Mattar CA, Faiwichow L. Uso de matriz dérmica bovina no tratamento de contraturas pós-queimaduras de membros superiores. *Rev Bras Queimad* 2012; 11(3): 142-5.
54. Philandrianos C, Andrac-Meyer L, Mordon S, Feuerstein JM, Sabatier F, Veran J, Magalon G, Casanova D. Comparison of five dermal substitutes in full-thickness skin wound healing in a porcine model. *Burns* 2012; 38(6): 820-9.
55. Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, Mamood J, Takita H. Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *Connect Tissue Res* 2002; 43(2-3): 529-34.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar, por escala histológica, a regeneração óssea de uma cranioplastia parietal em camundongos, que foram submetidos a reconstruções com BMP-2, associada a TCP, MDM ou ALG.

4.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Comparar o uso de TCP, MDM e ALG, associado ou não à BMP.

Comparar as combinações de reconstrução com ET em relação ao AEN, o padrão-ouro.

Avaliar a incidência de infecção de área receptora entre os grupos, principalmente no caso da matriz dérmica.

Avaliar a capacidade da escala histológica em comparar combinações diferentes de reconstrução óssea, inclusive com matrizes e carreadores não-ósseos, no caso MDM e ALG.

5. ARTIGO ORIGINAL

5.1. ARTIGO EM LÍNGUA PORTUGUESA

CRANIOPLASTIA COM PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA, FOSFATO DE CÁLCIO, MATRIZ DÉRMICA ACELULAR E ALGINATO DE CÁLCIO: ESTUDO EXPERIMENTAL.

Ciro Paz Portinho(1), Luís Alberto Santos(2), Thadeu Cerski(3), Raquel Câmara Rivero(3), Marcus Vinícius Martins Collares(1).

(1) Serviço de Cirurgia Plástica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

(2) Laboratório de Biomateriais e Cerâmicas Avançadas (LABIOMAT) – Departamento de Materiais – Engenharia de Materiais – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

(3) Serviço de Patologia – HCPA.

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob número 12-0199.

Autor correspondente:

Dr. Ciro Paz Portinho

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Serviço de Cirurgia Plástica

Rua Ramiro Barcelos, 2350/600E - Bairro Santa Cecília – CEP 90035-003

Porto Alegre – RS

E-mail: cportinho@hotmail.com

F: (51) 9998-3979 / (51) 3359-8232

RESUMO

INTRODUÇÃO: As reconstruções ósseas craniofaciais utilizam enxertos ósseos rotineiramente. Entretanto, pode haver problemas na disponibilidade ou na cicatrização óssea. A engenharia tecidual visa a solucionar problemas como este, através da produção de órgãos e tecidos pela combinação entre matrizes, células e fatores de crescimento. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi avaliar cranioplastias experimentais, através da combinação entre proteína morfogenética óssea tipo 2 (BMP-2) e diferentes matrizes e carreadores. **MÉTODO:** Realizamos um estudo experimental prospectivo, comparativo e aberto, dividido em sete grupos: 1 – BT: BMP-2 e fosfato de cálcio (TCP); 2 – BM: BMP-2 e matriz dérmica acelular Matriderm® (MDM); 3 – BA: BMP-2 e alginato de cálcio (ALG); 4 – TCP; 5 – MDM; 6 – ALG; 7 – Enxerto autógeno ou autoenxerto (AEN). Uma falha de 3 x 5 mm foi criada no osso parietal esquerdo de camundongos machos adultos, com mais de 3 meses. No mesmo tempo cirúrgico, uma das sete reconstruções foi realizada. Após cinco semanas, os animais foram submetidos a eutanásia e um bloco ósseo, envolvendo a cranioplastia e uma margem de osso nativo circunjacente, foi retirado e preparado para análise histológica. Utilizamos o teste de Kruskal-Wallis para a análise estatística, com nível de significância de $P < 0,05$. Os critérios histológicos utilizados foram: fusão de corticais; neoformação óssea; neovascularização e formação de medula óssea. **RESULTADOS:** Foram estudados 38 animais. Em todos os animais, houve permanência do material utilizado para reconstrução. Não houve retração cicatricial nem deiscência em

nenhum dos casos. Uma incidência elevada de infecção ocorreu no grupo MDM (57%, $P=0,037$). Houve diferença estatística na maioria dos critérios avaliados. No critério fusão de corticais, os grupos AEN, TCP e BT obtiveram as melhores pontuações em relação aos demais ($P=0,00846$). No critério neoformação óssea, os grupos BT, AEN e TCP obtiveram as melhores pontuações ($P=0,00835$). Já no quesito neovascularização, os grupos melhor pontuados foram BM, BA, TCP e MDM em relação aos demais ($P=0,001695$). Por fim, no critério formação de medula óssea, o AEN liderou a pontuação, seguido dos grupos BT e TCP ($P=0,008317$). CONCLUSÕES: O uso de BMP-2 melhorou a regeneração óssea de cranioplastias experimentais, principalmente com a associação de TCP, que foi comparável ao AEN, o padrão-ouro, em alguns critérios histológicos. Ademais, a associação BM aumentou significativamente a neovascularização na área receptora e diminuiu a incidência de infecção em relação à MDM isolada.

PALAVRAS-CHAVE

Anormalidades craniofaciais; transplante ósseo; engenharia tecidual; matriz óssea.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Bone craniofacial reconstructions employ bone grafts routinely. Nevertheless, there may be troubles either in availability or healing. Tissue engineering aims to solve such problems, building either organs or

tissues through combination among matrices, cells and growth factors.

OBJECTIVE: The aim of this study was to evaluate experimental cranial vault reconstructions, by combining bone morphogenetic protein type 2 (BMP-2) and different matrices or cell carriers.

METHOD: We performed an experimental, open, prospective and comparative study, divided in seven groups: 1 – BT: BMP-2 and calcium phosphate (TCP); 2 – BM: BMP-2 and acellular dermal matrix Matriderm® (MDM); 3 – BA: BMP-2 and calcium alginate (ALG); 4 – TCP; 5 – MDM; 6 – ALG; 7 – Bone autograft (BAG). A bone failure, measuring approximately 3 x 5 mm was created in left parietal bone of adult male mice, aging more than 3 months old. At the same procedure, one of the seven reconstructions was performed. After five weeks, animals were sacrificed and a bone block, including cranial vault reconstruction area and nearby native bone was removed and processed to histological analysis. Statistics was made with Kruskal-Wallis test, and significance was considered when $P < 0.05$. Histological criteria were: cortical fusion; new bone formation; neovascularization; and bone marrow formation.

RESULTS: Thirty-eight animals were evaluated. In all of them, materials used to reconstruction remained at the receptor site. There has been neither dehiscence nor wound retraction in any case. A higher incidence of infection has occurred in MDM group (57%, $P = 0.037$). There has been significant difference in most of the studied histological criteria. In cortical fusion, groups BAG, TCP, and BT have got the best scores, comparing to the others ($P = 0.00846$). In new bone formation, groups BT, BAG, and TCP have presented the best scores ($P = 0.00835$). When neovascularization was considered, best groups were BM, BA, TCP, and MDM ($P = 0.001695$). At last, BAG group has been the best in bone marrow formation, followed by groups BT

and TCP ($P=0.008317$). CONCLUSIONS: BMP-2 has increased bone regeneration in experimental skull reconstruction, especially when combined to TCP. Such association was even comparable to BAG, the gold-standard treatment, in some histological criteria. Besides, BM group has increased significantly neovascularization in receptor area and decreased the incidence of infection, when compared to MDM alone.

KEYWORDS

Craniofacial abnormalities; bone transplantation; tissue engineering; bone matrix.

INTRODUÇÃO

As reconstrução ósseas craniofaciais frequentemente empregam enxertos ósseos e cartilagosos.¹ A reconstrução da calota craniana é importante não só por questões estéticas, mas também para restituir proteção ao encéfalo e evitar alterações de fluxo cerebral por causa da pressão atmosférica.²⁻⁴ O tecido ósseo é capaz de regenerar após sofrer dano.⁵ Em condições ideais, há refazimento da arquitetura óssea, ao invés de uma cicatriz fibrosa que ocorre em outros tecidos.⁶ Entretanto, a restituição tecidual óssea pode tornar-se desafiadora, à medida que as áreas doadoras tornam-se escassas ou a cicatrização é ineficiente.^{1,7-11} A partir disso, alternativas vêm sendo buscadas há muito tempo.¹²⁻¹⁴

Os autoenxertos (AEN) continuam sendo o padrão-ouro, mas apresentam alguns vieses, tais como: morbidade variável na área doadora; indisponibilidade imediata em todos os casos; moldagem difícil para determinadas área receptoras; reabsorção importante em algumas regiões anatômicas.^{1,6,15} O advento dos enxertos heterólogos e sintéticos aumentou a oferta de materiais, mas também trouxe consigo problemas, como a falta de osteoindução, a imprevisibilidade de reabsorção e propriedades mecânicas desfavoráveis.^{1,16-21}

Há muitas pesquisas em andamento que visam a diminuir ou prescindir de áreas doadoras.^{22,23} A engenharia tecidual (ET) tem estudado o uso combinado de células com potencial regenerativo, matrizes ou carreadores e

fatores de crescimento (FC).^{1,24-36} Há estudos demonstrando falha na reconstrução de cranioplastias quando se utilizou células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTA).^{37,38} Ainda, vários estudos utilizando proteína morfogenética óssea (BMP) demonstraram a sua capacidade osteocondutiva e osteoindutiva sem o acréscimo de células, o que desafia o conceito da necessidade obrigatória das mesmas.²¹ Assim, deve-se avaliar as interações entre FC (ex.: BMP) e matrizes, independentemente de células regenerativas.

A estrutura tridimensional de uma matriz pode ser importante para uma regeneração óssea adequada e para evitar o colapamento da reconstrução em algumas situações.^{33,39,40} Em uma combinação de BMP com matrizes, fica a dúvida do quanto a estrutura tridimensional é importante e do quanto da capacidade regenerativa desta combinação vem da BMP.

Os FC interagem no metabolismo celular. No tecido ósseo, as células proliferam significativamente *in vitro* em resposta aos seguintes FC: BMP – principalmente 2 e 7; FC de fibroblastos-2 (FGF-2); FC derivado de plaquetas (PDGF); FC tipo insulina-1 (IGF-1); e o FC endotelial vascular (VEGF).^{1,6} Dentre estes, as BMP têm sido considerada o maior mediador da osteogênese e regeneração óssea atualmente.²⁰ Elas são membros da superfamília do FC transformante-beta (TGF-beta) e têm sido muito estudadas na ET óssea.^{20,21,41-43} Acredita-se que esta molécula possa iniciar e acelerar a cicatrização de uma fratura, bem como diminuir o risco de não-união óssea.⁴⁴

O objetivo principal deste estudo é avaliar, por escala histológica, a regeneração óssea de uma cranioplastia parietal em camundongos, que foram submetidos a reconstruções com BMP-2, associada a TCP, MDM ou ALG.

MÉTODO

Delineamento

Estudo experimental, comparado e prospectivo.

População

Camundongos Balb-C57 isogênicos, machos, com mais de 3 meses de idade, obtidos conforme os critérios da Unidade de Experimentação Animal do HCPA - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Figura 1). Durante o experimento, os animais foram mantidos em instalações adequadas, em ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo ração comercial e água potável *ad libitum*. A manutenção dos animais seguiu a Lei 11.794, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

Locais de Realização

As cirurgias e o alojamento dos animais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal – Centro de Pesquisa Experimental.

Grupos de Estudo

- G1 = BMP + TCP = BT

- G2 = BMP + MDM = BM
- G3 = BMP + ALG = BA
- G4 = ALG [controle]
- G5 = MDM [controle]
- G6 = TCP [controle]
- G7 = AEN [controle; padrão-ouro]

Para facilitar o entendimento, utilizaremos as siglas ao invés do número do grupo neste estudo.

Cálculo do Tamanho da Amostra

Utilizamos como base artigos de cranioplastias e reconstruções ósseas já publicados e consagrados na literatura. Arias-Gallo e cols.⁶ (2013) estudaram cranioplastias em 48 animais, divididos em 6 grupos (8 animais por grupo). Ozdemir e cols.⁴⁵ (2012) utilizaram 28 animais, divididos em 6 grupos (4 animais por grupo). Lópiz-Morales e cols.⁴¹ (2010) utilizaram 26 animais (52 falhas ósseas divididas desigualmente em nove grupos). Moshaverinia e cols.²⁰ (2013) utilizaram 20 animais, divididos em 5 grupos (4 animais por grupo). Poldervaart e cols.²¹ (2013) utilizaram 16 animais, divididos desigualmente em três grupos. Além disso, as normas internacionais para estudos experimentais sugerem um número reduzido de animais por estudo. Assim, utilizamos 49 animais, divididos em 7 grupos, ou seja, 7 animais por grupo, permitindo ainda uma perda de dois animais por grupo, o que ainda estaria de acordo com os trabalhos já publicados na literatura internacional.

O cálculo do tamanho mínimo da amostra, para a média de uma população, com nível de confiança de 95%, erro máximo desejado de 3 pontos e desvio-padrão de 3 pontos seria de 4 animais por grupo.

Matrizes e Carreadores Celulares

A fim de obtermos uma comparação consistente, incluímos uma matriz óssea (TCP), uma matriz dérmica (MDM), um carreador celular (ALG) e o enxerto padrão-ouro (AEN). O ALG (Figura 2) e o TCP (Figura 3) foram fabricados pelo Laboratório de Biomateriais e Cerâmicas Avançadas – Departamento de Materiais – UFRGS. A MDM utilizada (Figura 4) foi a Matriderm® (distribuidora Endosul, fabricada por Skin&Health Co., Billerbeck, Alemanha). O AEN utilizado foi simplesmente aquele criado durante a confecção da falha. Ele foi totalmente separado da calota e depois reposicionado.

Proteína Morfogenética Óssea

A BMP recombinante humana tipo 2 (BMP-2) foi utilizada nos Grupos BA, BM e BT (Distribuidora Interprise, Immuno®, MP Biomedicals, Solon, Ohio EUA) (Figura 5). O frasco de BMP continha 25 µg, que foram hidratados com 2,5 ml de soro fisiológico 0,9%, obtendo a concentração de 10 µg/ml. A dose mínima com atividade recomendada pelo fabricante era de 1 µg/ml; assim, utilizamos uma concentração 10 vezes maior. Em cada animal, foram aplicados 10 UI (0,1 ml).

Cirurgia

Os animais foram operados de acordo com as rotinas da Unidade de Experimentação Animal (UEA). O modelo cirúrgico foi o mesmo utilizado em outros projetos deste grupo¹⁷, conforme descrito a seguir.

A anestesia foi feita com isoflurano. A indução era feita com 100 ml/minuto e a manutenção com 30 ml/minuto.

A incisão foi arciforme no escalpo, sobre o osso parietal direito no lado oposto à região da falha óssea, para que não houvesse risco de comunicação direta entre a área estudada, a incisão e o meio externo (Figura 6). O retalho de escalpo foi rebatido e o periósteo foi descolado, até o osso parietal esquerdo ficar bem exposto (Figura 7).

Uma falha craniana de 3 x 5 mm foi criada no osso parietal esquerdo, utilizando-se uma broca de corte nº 701. Esta falha já foi estudada em trabalhos prévios e não houve regeneração espontânea.¹⁷ O periósteo foi descolado com um descolador de periósteo delicado. A dura-máter foi mantida intacta sempre que possível (Figura 8).

O animal recebeu uma das combinações de reconstrução, de acordo com o grupo (Figuras 9 e 10). Nos animais reconstruídos com TCP, fez-se uma preparação transoperatória de 1 cc do cimento com 1 cc de soro fisiológico 0,9%. Após, o retalho do escalpo foi suturado com nylon 4-0.

Os animais passaram por recuperação anestésica em sala apropriada, em berço de neonatologia aquecido (entre 30 e 35 graus Celsius), com analgesia com tramadol, 10 mg/kg, administrado por via subcutânea ou

intramuscular a cada 6 horas. Não foram utilizados antibióticos, a fim de determinar a capacidade das reconstruções em resistir à contaminação e à infecção.

Após cinco semanas da cirurgia, os animais foram mortos com superdosagem de xilazina e tramadol, conforme protocolo da UEA. A incisão foi reaberta (Figura 11) e o conteúdo das falhas cranianas foi retirado em bloco e colocado em formalina para a preparação histológica (Figura 12).

O período de cinco semanas foi escolhido por ser intermediário entre outros trabalhos já realizados (quatro ou seis semanas). Preferimos este delineamento, uma vez que não projetamos grupos com análises mais tardias.

Histologia e Digitalização das Imagens

As peças cirúrgicas retiradas das calotas, após eutanásia, foram colocadas em formol (paraformaldeído a 4%) e assim deixadas por cerca de uma semana. Elas foram submetidas à descalcificação em uma solução de ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 10%, na proporção 1:1. Depois de mais uma semana, foram submetidas ao processamento histológico, com inclusão em parafina e cortes histológicos no sentido laterolateral. A coloração foi realizada com hematoxilina-eosina (HE).

A digitalização das imagens foi realizada com o programa QCapture Pro® (QImaging Pro Corporation, 2003), versão 5.1.1.14 para Windows 2000/XP Professional.

Variáveis em Estudo

A avaliação foi feita por uma escala histológica já estabelecida, proposta por Ferreira⁴⁶ (1997) e modificada por Portinho e cols.¹⁷ (2006). Ela consistia dos critérios apresentados na Tabela 1. A soma possível ficaria entre -3 e 15 pontos. Os critérios utilizados foram similares a outras escalas de trabalhos recentes,^{3,4} ou até mais detalhados.⁴⁷

Avaliou-se estes critérios em aumentos de microscopia óptica de 200 e 400 vezes. A análise foi feita por dois médicos patologistas. O cegamento não pode ser total, uma vez que as imagens histológicas apresentavam clara diferença entre reconstruções com matrizes ósseas (AEN e TCP) daquelas sem tais matrizes. No entanto, o cegamento foi mantido para a presença ou não de BMP-2.

O critério presença de matriz antiga (não-reabsorvida) foi colocado com pontuação negativa, porque representa uma ausência ou deficiência de atividade metabólica.

O critério fusão de corticais representava o surgimento de uma ponte de osso neoformado entre a margem de osso nativo do crânio e a área reconstruída. Como a avaliação histologicamente consistia de um corte em que apareciam duas margens nativas e a área de falha óssea, era possível determinar bidimensionalmente fusão em nenhum, um ou ambos os lados.

Análise Estatística

Utilizamos o Teste de Kruskal-Wallis para a avaliação de diferenças entre os grupos, com nível de significância de $P < 0,05$.

Medidas de Biossegurança

No projeto, foram aplicadas as Normas de Segurança e Procedimentos de Boas Práticas de Laboratório. As medidas de proteção necessárias foram asseguradas aos pesquisadores, tanto na manipulação dos animais, quanto no trabalho de bancada em laboratório.

Aspetos Éticos

Os procedimentos *in vivo* foram realizados conforme a legislação vigente no Brasil, Lei 11.794 (Diário Oficial da União - 08/10/2008), que estabelece Procedimentos para o Uso Científico de Animais e regulamenta o registro dos biotérios e centros de experimentação. Todos os procedimentos são embasados no *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* - ILAR/EUA (2011) - e no Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA/Brasil, 1996), planejados para minimizar dor e desconforto. Os experimentos obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27/01/1978) e Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations for Medical Sciences – CIOMS*).⁴⁸

Este projeto foi aprovado no Comitê de Bioética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e registrado sob número 12-0199.

Financiamento

A maior parte deste estudo foi financiada pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A compra de BMP foi autofinanciada por questões de agilidade administrativa e impossibilidade de esperar pelos prazos públicos. A matriz dérmica acelular Matriderm® foi doada pela Empresa Endosul®.

RESULTADOS

O período de regeneração foi de cinco semanas. Em todos os animais estudados houve colonização celular na falha óssea. Da mesma forma, em todos houve a permanência do material utilizado como matriz ou carreador celular (inclusive naqueles onde houve infecção). Não houve retração cicatricial em nenhuma falha óssea.

A calcificação macroscópica do enxerto, caracterizada pelo endurecimento de parte ou todo material colocado na falha óssea parietal, foi percebida nos grupos AEN, TCP, BT e BM. Essa mensuração não foi submetida à estatística porque a histologia demonstraria isso com mais precisão.

Houve 11 perdas entre todos os grupos. A distribuição dessas foi a seguinte: AEN=2; ALG=1; MDM=4; BA=1; BT=2; BM=1. A distribuição de óbitos foi a seguinte: AEN=1; ALG=1; BT=2; BM=1. Em relação à infecção, a distribuição foi a seguinte: AEN=1; MDM=4; BA=1. A infecção só foi computada nos animais que sobreviveram. A incidência de infecção foi notória no grupo com MDM (Gráfico 1). A incidência disso no grupo MDM foi estatisticamente significativa ($P=0,037$). As avaliações e cálculos a seguir referem-se ao animais remanescentes, após a exclusão dos casos de infecção.

Todos os grupos foram avaliados por critérios histológicos (Figuras 13 a 22). A Tabela 2 apresenta todos os resultados por grupo e por animal, de maneira detalhada.

Na soma dos critérios histológicos, houve diferença estatística entre os grupos ($P=0,000275$) (Gráfico 2). O AEN obteve o melhor resultado, com 10,8

pontos e o ALG o pior, com 3,3 pontos. De maneira mais detalhada, ambos os grupos com ALG (ALG isolado e BA) obtiveram pior pontuação. O que chamou a atenção foi para o fato de o grupo BT (6,4 pontos) ter ficado atrás do próprio controle, TCP (8,1 pontos), com a avaliação da soma da escala histológica, o que foi esclarecido com a análise separada dos critérios histológicos.

No critério fusão de corticais, houve diferença estatística entre os grupos ($P=0,000846$) (Gráfico 3). Desta vez, o grupo com TCP isolado alcançou a mesma pontuação do AEN (2 pontos), enquanto que o grupo BT veio logo a seguir (1,6 pontos), com uma diferença não-significativa entre estes três primeiros grupos ($P=0,301$). Os grupos com ALG (ALG isolado e BA) obtiveram a pior pontuação (0,2 e 0,7 pontos respectivamente). Os grupos com MDM (MDM isolado e BM: 1,3 e 1,2 pontos respectivamente) ficaram em uma situação intermediária, demonstrando vantagem no uso desta matriz em relação ao ALG. Aqui, as matrizes ósseas, associadas ou não à BMP, foram superiores às demais.

No critério matriz neoformada (ou formação de novas trabéculas ósseas), houve diferença estatística entre os grupos ($P=0,00835$) (Gráfico 4). Os grupos com matrizes ósseas (BT, AEN e TCP) obtiveram as melhores pontuações, ficando o BT em primeiro (3 pontos). O grupo BT equiparou-se ao AEN ($P=0,317$). Houve diferença estatística entre BT e TCP (3,0 x 2,3 pontos, $P=0,018$), privilegiando assim a associação com BMP. A seguir, os grupos com BMP, mas sem matrizes ósseas – BM e BA – ficaram em situação intermediária (1,8 e 1,3 pontos respectivamente), junto com o grupo MDM (1,3 pontos). A última posição ficou com o ALG, com 0,8 pontos.

No critério neovascularização, houve diferença estatística entre os grupos ($P=0,001695$) (Gráfico 5). Os grupos BM, BA, TCP e MDM obtiveram a mesma pontuação máxima, 3 pontos. Os grupos AEN e ALG ficaram em situação intermediária (2,4 e 2,3 pontos respectivamente) e o grupo BT ficou em último lugar, com 1 ponto de média.

No critério formação de medula óssea, houve diferença estatística entre os grupos ($P=0,008317$) (Gráfico 6). O grupo AEN liderou a pontuação com 1 ponto (formação de medula óssea em todos os casos), seguido dos grupos BT (0,8 pontos) e TCP (0,6 pontos) ($P=0,241$). A partir do grupo BM (0,5 pontos) começa a haver diferença estatística com o grupo AEN ($P=0,004689$). Os grupos mais fracos foram BM (0,5 pontos), MDM (0,3 pontos), BA (0,2 pontos) e ALG, sendo que este último não apresentou formação em nenhum caso.

Em todos os grupos, a concentração celular na área de reconstrução foi intensa. Não houve diferença entre os grupos ($P=0,359$). Não houve diferença também quanto à presença de osteoclastos na área de reconstrução ($P=0,315$).

Por fim, no critério de presença de matriz óssea não-reabsorvida, o AEN obteve a melhor colocação. Neste caso, por ser um critério de pontuação, negativa, o grupo-controle e padrão-ouro do AEN obteve a menor pontuação (média de -0,4 pontos), sendo um resultado significativo ($P=0,00000961$) em comparação com os demais grupos.

DISCUSSÃO

A regeneração óssea, conforme avaliada por uma escala histológica, ocorreu em todos os grupos, em maior ou menor intensidade. À abertura da área reconstruída, todas as falhas estavam cobertas por algum tipo de tecido, às vezes com predomínio ósseo, às vezes com predomínio fibroso à inspeção e palpação.

Chamou a atenção dos patologistas que o padrão de osso avaliado em cinco semanas, nos grupos com BMP-2, era de um osso maduro. Além disso, não havia mais tanta atividade inflamatória. Isso denota a capacidade desta molécula em acelerar a regeneração óssea. Este diagnóstico foi objetivo à avaliação histológica, mas não foi mensurado, uma vez que não fazia parte desta pesquisa. Idealmente, um estudo futuro semana a semana poderia apresentar com mais detalhes as propriedades positivas do BMP-2. A aceleração da cicatrização óssea já foi constatada em um estudo prévio do nosso grupo,²⁸ em que se comparou reconstruções com osso liofilizado, associados ou não a CTM da medula óssea. No grupo com células, houve diminuição da fase de inflamação. Desta forma, seria possível levantar a hipótese que tanto CTM quanto BMP-2 são aceleradores da cicatrização óssea, mas a sua confirmação precisa de novos estudos.

A fusão de trabéculas neoformadas com pelo menos um dos lados da margem nativa do osso ocorreu nos grupos de AEN, TCP e nos quais houve a inserção de BMP-2. A fusão representa a propriedade de osteointegração de um enxerto,⁵ e isso pôde ser demonstrado nos grupos supracitados. Estes achados constituem, por enquanto, alternativas promissoras, principalmente no

que diz respeito ao grupo BT. Uma revisão recente de estudos sobre BMP-2⁴⁴ demonstrou que não há estudos ortopédicos comprovando que a esta molécula supera o enxerto de osso autógeno medular.

A BMP-2 e a MDM estimularam significativamente a neovascularização na falha óssea. Na avaliação deste critério, os grupos BM e BA foram deslocados para cima, demonstrando aumento de atividade regenerativa, mas não necessariamente óssea. O grupo BT foi o menos pontuado, mas a formação óssea apresentava-se avançada, o que pode indicar uma regeneração e amadurecimento ósseo mais rápidos. Entretanto, o delineamento deste estudo não visava a avaliar estas variáveis.

O grupo AEN foi superado em pontuação de neovascularização quando se utilizou BMP e/ou MDM. Isso deve ser estudado futuramente com outras associações, principalmente com matrizes de arquitetura similar ao osso. Talvez, a associação entre TCP, BMP-2 e MDM produzisse uma regeneração ainda mais consistente.

A associação entre TCP e BMP-2 conferiu uma pontuação satisfatória nos critérios histológicos analisados, mantendo este grupo de estudo entre os quatro melhores na pontuação total e na neoformação óssea. O grupo BT (BMP-2 + TCP) teve o menor índice de neovascularização. Entretanto, a avaliação dos patologistas evidenciou que esta reconstrução encontrava-se em um estado mais adiantado de regeneração, com osso mais maduro, o que pode justificar este achado. Jang e cols.⁴⁹ (2012) publicaram recentemente um estudo demonstrando reconstrução significativamente melhor com a associação de BMP-2, TCP e hidroxiapatita (proporção 80/20 de TCP/hidroxiapatita), em relação aos seus controles. As concentrações de BMP-

2 utilizadas neste estudo foram maiores do que a nossa, variando de 0,025 a 0,2 mg/ml. Entretanto, os autores não demonstraram diferença significativa entre as concentrações.

Chama a atenção a capacidade dos grupos com TCP – associado ou não a BMP – em estar associado à medula óssea na área regenerativa. Ainda, os grupos contendo MDM (MDM isolado e BM), apesar de estarem desprovidos de uma matriz óssea, foram capazes de gerar medula óssea após as cinco semanas. De fato, o grupo BM é uma associação inovadora apresentada neste estudo e com resultados promissores. As MDM oferecem uma estrutura arquitetônica que permite a migração celular e a neovascularização provenientes do leito receptor,^{40,50,51} e isso pôde ser visto também em uma falha óssea neste caso.

A interação do TCP com células progenitoras parece positiva em alguns estudos. O TCP possui uma arquitetura tridimensional favorável, assim como o diâmetro de seus poros. Ele está presente comercialmente na forma de blocos ou grânulos. Há vários estudos combinando TCP com FC, com resultados positivos e negativos.^{45,52} Afifi e cols.⁵³ (2010) demonstraram que o TCP tem uma incidência não-desprezível de complicações em cranioplastias, principalmente quando colocado em áreas irradiadas e em comunicação com os seios paranasais. No entanto, ainda é um material com possibilidade de uso clínico e no qual há muita pesquisa a respeito. Mais recentemente, Inzana e cols.⁵⁴ (2014) realizaram um estudo experimental de nove semanas, em que demonstraram otimização da cicatrização óssea com a introdução de esqueletos (*scaffolds*) de TCP confeccionados em impressoras 3-D e associados a colágeno tipo 1.

A arquitetura tridimensional e a porosidade de uma matriz óssea são consideradas características fundamentais para sua capacidade regenerativa.^{1,35,55} Isso pode ser visto nas pontuações elevadas mantidas pelo AEN e pelo TCP. Não obstante, a BMP-2 garantiu formação óssea e neovascularização, mesmo em combinações com estruturas sem características de matriz óssea, que foram a MDM e o ALG. Isso denota o grande poder regenerativo da BMP-2 e a sua possibilidade de ser utilizada em combinações com biomateriais mais maleáveis, em falhas mais irregulares. Assim, teríamos uma versatilidade nas ferramentas terapêuticas.

A introdução de células regenerativas na reconstrução óssea é um paradigma até o momento,^{25,39} mas pode começar a ser discutido. Os achados deste estudo demonstram que todas as técnicas utilizadas foram capazes de conduzir células para dentro da área receptora (propriedade denominada osteocondução). Não obstante, houve formação significativa de tecido ósseo nos grupos BT e TCP, provavelmente comparáveis àqueles de estudos em que se utilizou cultivos celulares.²⁸ Este questionamento também deverá ser fonte de estudos futuros.

MDM vêm sendo utilizadas cada vez mais em cirurgia plástica reparadora. Usa-se, por exemplo, para a cobertura de áreas de retração cicatricial em articulações, na face para melhorar o aspecto estético e na cobertura de exposições tendinosas. Em ferimentos cutâneos de espessura total, a reconstrução da derme é fundamental para os resultados estéticos e funcionais. As matrizes ou substitutos dérmicos são estruturas fabricadas com componentes da matriz extracelular: colágeno e glicosaminoglicanas ou ácido hialurônico.⁵¹ Algumas matrizes podem receber enxerto de pele parcial no

mesmo tempo cirúrgico de sua implantação, outras não, dependendo de sua porosidade e espessura. As matrizes mais finas permitem a passagem de sangue e nutrientes ao enxerto, enquanto as mais espessas precisam ser invadidas por neovascularização antes de estarem prontas como leito de enxertia. A combinação de matrizes dérmicas acelulares e matrizes ósseas funciona melhor do que as primeiras sozinhas.³⁵ Entretanto, seu uso em falhas ósseas não está bem avaliado. Além disso, são biomateriais bastante suscetíveis à degradação rápida em presença de contaminação bacteriana ou fúngica.^{50,56} O seu uso isoladamente deve ser feito em áreas de baixa contaminação, mas não se sabe se a sua associação com FC ou culturas celulares é capaz de aumentar a sua resistência a um quadro de contaminação importante ou mesmo infecção.

A incidência de infecção na área das reconstruções apenas com MDM foi discrepante. Isso demonstra a fragilidade deste produto quando usado de maneira isolada ou em condições inadequadas. Por outro lado, a associação BM reduziu de 57% (4/7) para zero a incidência de infecção de ferida operatória na falha óssea reconstruída, o que também é um achado importante e inovador. É provável que a neovascularização promovida pela BMP-2 traga mais resistência à infecção, em relação à MDM isolada. A revisão de Aspenberg⁴⁴ (2013) cita estudos clínicos onde houve menos infecção em osteossíntese em quem se utilizou BMP-2, corroborando com este achado.

Um dos maiores achados deste estudo foi a regeneração óssea significativa resultante da associação de BMP-2 e MDM. Este achado é pouco estudado ainda na literatura e abre uma janela de possibilidades de estudos experimentais e clínicos com esta combinação. Como já foi dito antes,

combinação de BMP-2, TCP e uma superfície com MDM talvez seja uma possibilidade para a criação de “superenxertos”. Fernandes⁴⁰ (2010) relata que o uso de MDM isolada em falhas ósseas alveolares pode levar ao colapso da reconstrução, motivo pelo qual associou matriz óssea inorgânica em seu estudo. Em nossa pesquisa, não evidenciamos perda de espessura mesmo na ausência de uma matriz óssea mais rígida, mas a área da calota tem menos carga do que o aparelho estomatognático, de forma que esta comparação pode ser inadequada, embora levante novas hipóteses de trabalho.

No critério de presença de matriz velha (não reabsorvida), o AEN teve resultado significativamente melhor que os demais grupos. Este critério, no entanto, pode receber críticas, uma vez que utilizamos matrizes e carreadores de diferentes origens e conformações, talvez não-comparáveis diretamente quanto à capacidade de absorção. Ainda, a dose utilizada de BMP-2 pode ter sido relativamente baixa, não acelerando a cicatrização a ponto de estimular a reabsorção em alguns grupos.⁴⁹

A escala histológica utilizada neste estudo e previamente por nosso grupo necessitou ser dividida para uma análise mais precisa. Embora a soma dos critérios tenha mantido o AEN como o grupo melhor pontuado, a análise em separado demonstra que há vantagens regenerativas que variam com as combinações. Para trabalhos em que se utilize apenas matrizes ósseas, a escala ainda parece ser uma opção adequada. Ela é composta de vários critérios, muitas vezes não incluídos em outros estudos. Sousa³ (2010) fez uma escala que continha os seguintes critérios: inflamação e vascularização; atividade osteoblástica; neoformação óssea; reação de corpo estranho; tecido conjuntivo fibroso. A sua pontuação não era por campos de microscopia, como

a nossa, e sim variando de ausente ou presente ou de leve a completa. Amaral⁴ (2013) fez uma escala com os seguintes critérios histomorfométricos: tecido ósseo neoformado; remanescente de biomaterial (que seria o nosso critério de presença de matriz); neovascularização; tecido conjuntivo; células osteoblásticas. Neste estudo, a pontuação foi de nenhum (zero) a intenso (quatro). De modo geral, os critérios destas escalas são parecidos, exceto pelo fato de que priorizamos mais critérios regenerativos do que inflamatórios (primeira fase da cicatrização). Azi e cols.⁴⁷ (2012) montaram uma escala apenas com três critérios (presença de bactérias intraósseas; inflamação intraóssea; neoformação óssea) para a análise de falhas ósseas infectadas. Jang e cols.⁴⁹ (2012) utilizaram avaliaram apenas o osso novo formado e a quantidade de matriz remanescente. Todos estes autores analisaram os critérios separadamente, e não por uma soma dos mesmos, como já fizemos em estudos anteriores.^{17,18} Empregamos uma pontuação que pareceu ser de fácil execução, baseada em terços do campo microscópico analisado pelos patologistas.

Os resultados e as dúvidas geradas por este estudo, bem como o conhecimento atual em ET óssea, levam-nos às seguintes perspectivas de estudo:

- BMP em diversas concentrações.
- MDM em combinações com matrizes ósseas tridimensionais.
- Comparar células e diferentes fase de diferenciação.
- Continuar combinações entre matrizes, moléculas e células.
- Associar ET e terapia gênica.
- Iniciar trabalhos clínicos em ET.

- Estudos de custo-benefício.
- Segurança da BMP em pacientes oncológicos.
- Impressoras biológicas (*bioprinters*) em ET óssea.

CONCLUSÕES

O uso de BMP-2 melhorou a regeneração óssea parietal de cranioplastias de osso parietal em camundongos, conforme avaliação histológica, com a associação de TCP, MDM e ALG, sendo melhor do que estes isoladamente e comparável ao AEN em alguns critérios histológicos, que continua sendo o padrão-ouro.

REFERÊNCIAS

1. Monaco E, Bionaz M, Hollister SJ, Wheeler MB. Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology* 2011; 75(8): 1381-99.
2. Miyake H, Ohta T, Tanaka H. A new technique for cranioplasty with L-shaped titanium plates and combined hydroxyapatite and tricalcium phosphate (Cerattice). *Neurosurg* 2000; 46(2): 414-8.
3. Sousa CDFS. Estudo histomorfométrico da reparação óssea em ratos após o uso de biomaterial de origem sintética (hidroxiapatita + beta-tricalciofosfato). 76 f. Monografia. Faculdade de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2010.

4. Amaral MB. Capacidade de regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária: análise histológica e microtomografia computadorizada. 110 f. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
5. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2014; 9(18): 1749-99.
6. Arias-Gallo J, Chamorro-Pons M, Avedaño C, Giménez-Gallego G. Influence of acidic fibroblast growth factor on bone regeneration in experimental cranial defects using Spongostan and Bio-Oss as protein carriers. *J Craniofac Surg* 2013; 24(5): 1507-14.
7. Issack PS, DiCesare PE. Recent advances toward the clinical application of bone morphogenetic proteins in bone and cartilage repair. *Am J Orthop.* 2003; 32(9): 429-36.
8. Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A, Fornasari PM. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfus Apher Sci* 2004; 30(2): 169-74.
9. Brodie JC, Goldie E, Connel G, Merry J, Grant MH. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. *J Biomed Mater Res* 2005; 73(4): 409-21.
10. Thesleff T, Lehtimäki K, Niskakangas T, Mannerström B, Miettinen S, Suuronen R, Öhman J. Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: a novel method for cranial reconstruction. *Neurosurg* 2011; 68(6): 1535-40.

11. Chiarello E, Cadossi M, Tedesco G, Capra P, Calamelli C, Shehu A, Giannini S. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. *Aging Clin Exp Res* 2013; 25(Suppl.1): S101-3.
12. Andersen JR, Detlie T, Griffiths HJ. The radiology of bone allografts. *Radiol Clin North Am* 1995; 33(2): 391-400.
13. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft and bone graft substitutes. *Clin Orthop Rel Res* 1999; 360: 71-86.
14. Volpon JB, Costa RMP. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. *Rev Bras Ortop* 2000; 35(6): 219-24.
15. Rocque BG, Amancherla K, Lew SM, Lam S. Outcomes of cranioplasty following decompressive craniectomy in the pediatric population. *J Neurosurg Pediatr* 2013; 12(2): 120-5.
16. Mackenzie DJ, Sipe R, Buck D, Burgess W, Hollinger J. Recombinant human acidic fibroblast growth factor and fibrin carrier regenerates bone. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107(4): 989-6.
17. Portinho CP, Collares MVM, Silva FH, Nardi NB, Pinto RDA, Siqueira E, Morellato G, Sumino K. Reconstrução de calota craniana com células-tronco mesenquimais indiferenciadas: estudo experimental. *Rev Bras Cir Plast* 2006; 21(3): 161-5.
18. Oliveira ACP, Collares MVM, Galia CR, Edelweiss MI, Pinto RDA, Knebel L. Comparação entre enxerto ósseo autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em modelo experimental de cranioplastia. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac* 2007; 10(4): 140-6.
19. Orsi VV, Collares MVM, Nardi NB, Pinto RDA, Meirelles LS, Meurer L, Pilla C, Portinho CP, Riboldi M, Auer TB. Osso liofilizado bovino não-

- desmineralizado com células-tronco mesenquimais para engenharia tecidual: estudo experimental em sítio heterotópico. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac* 2007; 10(4): 133-9.
20. Moshaverinia A, Ansari S, Chen, Xu X, Akiyama K, Snead ML, Zadeh HH, Shi S. Co-encapsulation of anti-BMP2 monoclonal antibody and mesenchymal stem cells in alginate microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2013; 34(28): 6572-9.
21. Poldervaart MT, Wang H, van der Stok J, Weinans H, Leeuwenburgh SC, Oner FC, Dhert WJ, Alblas J. Sustained release of BMP-2 in bioprinted alginate for osteogenicity in mice and rats. *PLoS One* 2013; 8(8): e72610.
22. Xu XL, Lou J, Tang T, Ng KW, Zhang J, Yu C, Dai K. Evaluation of different scaffolds for BMP-2 genetic orthopedic tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 75(2): 289-303.
23. Galateanu B, Dimonie D, Vasile, Nae S, Cimpean A, Costache M. Layer-shaped alginate hydrogels enhance the biological performance of human adipose-derived stem cells. *BMC Biotechnol* 2012; 12(35): 1-14.
24. Smidsrod O, Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Tibtech* 1990; 8: 71-8.
25. Sailer HF, Pajarola GF. *Cirurgia Bucal*. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2000. pp. 213-20.
26. Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 2004; 35(2): 562-9.

27. Pound JC, Green DW, Chaudhuri JB, Mann S, Roach HI, Oreffo RO. Strategies to promote chondrogenesis and osteogenesis from human bone marrow cells and articular chondrocytes encapsulated in polysaccharide templates. *Tissue Eng* 2006; 12(10): 2789-99.
28. Portinho CP, Riboldi M, Pilla C, Collares MVM, Silva FH, Meirelles LS, Nardi NB, Pinto RDA. Fosfatase alcalina em enxertos ósseos contendo células-tronco. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac* 2007; 10(3): 97-100.
29. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Delivery Rev* 2007; 59: 207-33.
30. Padoin AV, Braga-Silva J, Martins P, Rezende K, Rezende AR, Grecchi B, Gehlen D, Machado DC. Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration. *Plast Reconstr Surg* 2008; 122(2): 613-6.
31. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater* 2009; 21: 3307-29.
32. Carrodeguas RG, De Aza S. Alfa-tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia* 2011; 7(10): 3536-46.
33. Nae S, Bordeianu I, Stancioiu AT, Antohi N. Human adipose-derived stem cells: definition, isolation, tissue-engineering applications. *Rom J Morphol Embryol* 2013; 54(4): 919-24.
34. Sommar P, Junker JP, Strandenes E, Ness C, Hansson T, Johnson H, Kratz G. Osteogenically-induced human dermal fibroblasts as a tool to regenerate bone. *J Plast Surg Hand Surg* 2013; 47(1): 8-13.

35. Ge S, Zhao N, Wang L, Liu H, Yang P. Effects of hydroxyapatite nanostructure on channel surface on porcine acellular dermal matrix scaffold on cell viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Int J Nanomed* 2013; 8: 1887-95.
36. Ito A, Mase A, Tazikawa Y, Shinkai M, Honda H, Hata K, Ueda M, Kobayashi T. Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. *J Bioscience Bioengineering* 2003; 95(2): 196-9.
37. Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, Penascino VM, Mooney MP, Jiang S, Rubin JP, Losee JE. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. *Ann Plast Surg* 2006; 56(5): 543-8.
38. Smith DM, Cooper GM, Afifi AM. Regenerative surgery in cranioplasty revisited: the role of adipose-derived stem cells and BMP-2. *Plast Reconstr Surg* 2011; 128(5): 1053-60.
39. Schantz JT, Brandwood A, Hutmacher DW, Khor HL, Bittner K. Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymeric-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition modeling. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16(9): 807-19.
40. Fernandes PG. Utilização da matriz dérmica acelular e matriz óssea inorgânica/P-15 na preservação das deformidades da crista óssea alveolar após extração dentária em humanos. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2010, 84 pp.

41. Lópiz-Morales Y, Abarrategi A, Ramos V, Moreno-Vicente C, López-Durán L, López-Lacomba JL, Marco F. In vivo comparison of the effects of rhBMP-2 and rhBMP-4 in osteochondral tissue regeneration. *Eur Cell Mater* 2010; 20: 367-78.
42. Jain AP, Pundir S, Sharma A. Bone morphogenetic proteins: the anomalous molecules. *J Indian Soc Periodontol* 2013; 17(5): 583-6.
43. Owens P, Polikowsky H, Pickup MW, Gorska AE, Jovanovic B, Shaw AK, Novitskiy SV, Hong CC, Moses HL. Bone morphogenetic protein stimulate mammary fibroblasts to promote mammary carcinoma cell invasion. *Plos One* 2013; 8(6): e67533.
44. Aspenberg P. Special review: accelerating fracture repair in humans: a Reading of old experiments and recent clinical trial. *BoneKEy Reports* 2013; 2:244.
45. Özdemir B, Kurtis B, Tüter G, Sengüven B, Tokman B, Pinar-Özdemir S, Demirel I, Özcan G. Double-application of platelet-rich plasma on bone healing in rabbits. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17(1): e171-7.
46. Ferreira JCR. Avaliação cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados do arco zigomático. Estudo experimental em coelhos. 128 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, 1997.
47. Azi ML, Junior MK, Martinez R, Salata LA, Paccola CAJ. Desenvolvimento de um modelo experimental de falha óssea infectada na ulna de coelhos. *Acta Ortop Bras* 2012; 20(3): 136-8.

48. Goldim JR, Raymundo MM. Pesquisa em Saúde e Direitos dos Animais (Cartilha). 2a. Edição, Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Grupo de Pesquisa e Pós-graduação, Porto Alegre, 1997. 29 pp.
49. Jang JW, Yun JH, Lee KI, Jang JW, Jung UW, Kim CS, Choi SH, Cho KS. Osteoinductive activity of biphasic calcium phosphate with different rhBMP-2 doses in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 113(4): 480-7.
50. Pereima MJ, Capella MR, Goldberg P, Quaresma E, Araújo EJ, Souza JA, Azevedo M, Colombeli EM, Feijó RS, Souza VA Jr, Perdomo HAR. Uso de matrizes dérmicas no tratamento de queimaduras em crianças: análise de 11 casos. *Arq Catarin Med* 2012; 34(1): 38-46.
51. Philandrianos C, Andrac-Meyer L, Mordon S, Feuerstein JM, Sabatier F, Veran J, Magalon G, Casanova D. Comparison of five dermal substitutes in full-thickness skin wound healing in a porcine model. *Burns* 2012; 38(6): 820-9.
52. Özdemir B, Okte E. Treatment of intrabony defects with beta-tricalcium phosphate alone and in combination with platelet-rich plasma. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 2012; 100(4): 976-83.
53. Afifi AM, Gordon CR, Pryor LS, Sweeney W, Papay FA, Zins JE. Calcium phosphate cements in skull reconstruction: a meta-analysis. *Plast Reconstr Surg* 2010; 126(4): 1300-9.
54. Inzana JA, Olvera D, Fuller SM, Kelly JP, Graeve OA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials* 2014; 35(13): 4026-34.

55. Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, Mamood J, Takita H. Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *Connect Tissue Res* 2002; 43(2-3): 529-34.
56. Simão TS, Pitol DN, Máximo FR, Mattar CA, Faiwichow L. Uso de matriz dérmica bovina no tratamento de contraturas pós-queimaduras de membros superiores. *Rev Bras Queimad* 2012; 11(3): 142-5.

TABELAS

Tabela 1 – Critérios histológicos para a avaliação de regeneração óssea.

Critério	Detalhamento	Intervalo de pontuação
Matriz neoformada (ou trabéculas ósseas neoformadas)	Ausente:	0
	Até 1/3 do campo microscópico:	1
	Até 2/3 do campo microscópico:	2
	Mais de 2/3 do campo microscópico:	3
Presença de matriz velha não reabsorvida	Ausente:	0
	Até 1/3 do campo microscópico:	-1
	Até 2/3 do campo microscópico:	-2
	Mais de 2/3 do campo microscópico:	-3
Presença de células	Ausente:	0
	Até 1/3 do campo microscópico:	1
	Até 2/3 do campo microscópico:	2
	Mais de 2/3 do campo microscópico:	3
Atividade osteoclástica	Ausente:	0
	Até 1/3 do campo microscópico:	1
	Até 2/3 do campo microscópico:	2
	Mais de 2/3 do campo microscópico:	3
Neovascularização	Ausente:	0
	Até 1/3 do campo microscópico:	1
	Até 2/3 do campo microscópico:	2
	Mais de 2/3 do campo microscópico:	3
Presença de medula	Ausente:	0

óssea	Presente:	1
Fusão de corticais	Ausente:	0
	Presente em um lado:	1
	Presente em ambos os lados:	2

Tabela 2 – Resultados da avaliação histológica por grupos e por animais.

CRITÉRIO	FUSÃO DE CORTICAIS	MATRIZ NEOFORMADA	VELHA	CÉLULAS	OSTEOCLASTOS	NEOVASCULARIZAÇÃO	MEDULA	SOMA
PONTUAÇÃO	[0;2]	[0;3]	[-3;0]	[0;3]	[0;3]	[0;3]	[0;1]	[-3;15]
GRUPO								
AEN1	2	3	-1	3	1	1	1	10
AEN2	2	2	-1	2	0	2	1	8
AEN3	2	3	0	3	0	3	1	12
AEN4	2	3	0	3	0	3	1	12
AEN5	2	3	0	3	0	3	1	12
média	2,0	2,8	-0,4	2,8	0,2	2,4	1,0	10,8
mediana	2,0	3,0	0,0	3,0	0,0	3,0	1,0	12,0
dp	0,0	0,4	0,5	0,4	0,4	0,9	0,0	1,8
ALG1	0	0	-3	3	0	3	0	3
ALG2	1	1	-3	3	0	3	0	5
ALG3	0	1	-3	3	0	2	0	3
ALG4	0	0	-3	3	0	2	0	2
ALG5	0	1	-3	3	0	2	0	3
ALG6	0	2	-3	3	0	2	0	4
média	0,2	0,8	-3,0	3,0	0,0	2,3	0,0	3,3
mediana	0,0	1,0	-3,0	3,0	0,0	2,0	0,0	3,0
dp	0,4	0,8	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	1,0
TCP1	2	2	-3	3	1	3	1	9
TCP2	2	2	-3	3	0	3	0	7

TCP3	2	2	-3	3	0	3	0	7
TCP4	2	2	-3	3	1	3	1	9
TCP5	2	3	-3	3	0	3	1	9
TCP6	2	3	-3	3	0	3	1	9
TCP7	2	2	-3	3	0	3	0	7
média	2,0	2,3	-3,0	3,0	0,3	3,0	0,6	8,1
mediana	2,0	2,0	-3,0	3,0	0,0	3,0	1,0	9,0
dp	0,0	0,5	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5	1,1
MDM1	2	2	-3	3	1	3	0	8
MDM2	1	1	-2	3	0	3	1	7
MDM3	1	1	-3	3	0	3	0	5
média	1,3	1,3	-2,7	3,0	0,3	3,0	0,3	6,7
mediana	1,0	1,0	-3,0	3,0	0,0	3,0	0,0	7,0
dp	0,6	0,6	0,6	0,0	0,6	0,0	0,6	1,5
BA1	0	2	-3	3	0	3	0	5
BA2	0	0	-3	3	0	3	0	5
BA3	0	2	-3	3	0	3	0	3
BA4	1	1	-3	3	0	3	1	6
BA5	2	2	-3	3	0	3	0	7
BA6	1	1	-3	3	0	3	0	5
média	0,7	1,3	-3,0	3,0	0,0	3,0	0,2	5,2
mediana	0,5	1,5	-3,0	3,0	0,0	3,0	0,0	5,0
dp	0,8	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	1,3
BT1	2	3	-3	3	0	0	1	6
BT2	2	3	-3	3	0	3	1	9
BT3	2	3	-3	3	0	1	1	7
BT4	0	3	-3	3	0	0	0	3
BT5	2	3	-3	3	0	1	1	7

FIGURAS

Figura 1 – Camundongo Balb-C57 isogênico adulto, utilizado nesta pesquisa.

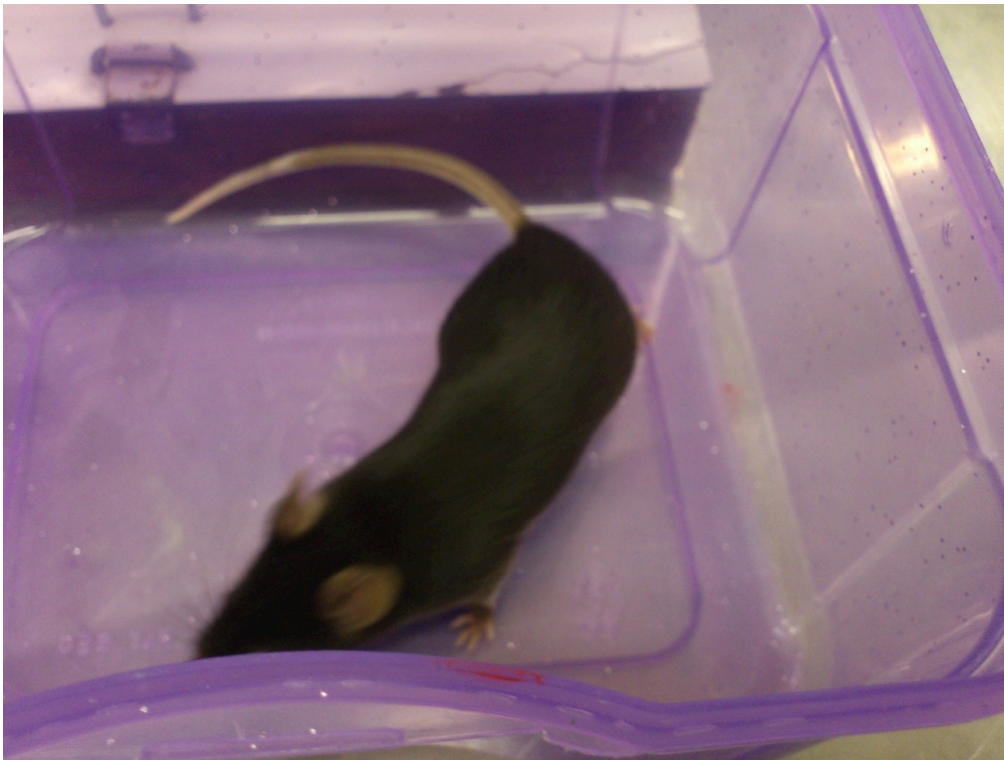


Figura 2 – Embalagens de alginato de cálcio (LABIOMAT, Departamento de Materiais, Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).



Figura 3 – Fosfato de cálcio, utilizado na forma de grânulos (LABIOMAT, Departamento de Materiais, Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).



Figura 4 – Embalagem de matriz dérmica acelular Matriderm®.



Figura 5 – Embalagem de proteína morfogenética óssea humana (Immuno ®, MP Biomedicals, Solon, Ohio EUA).

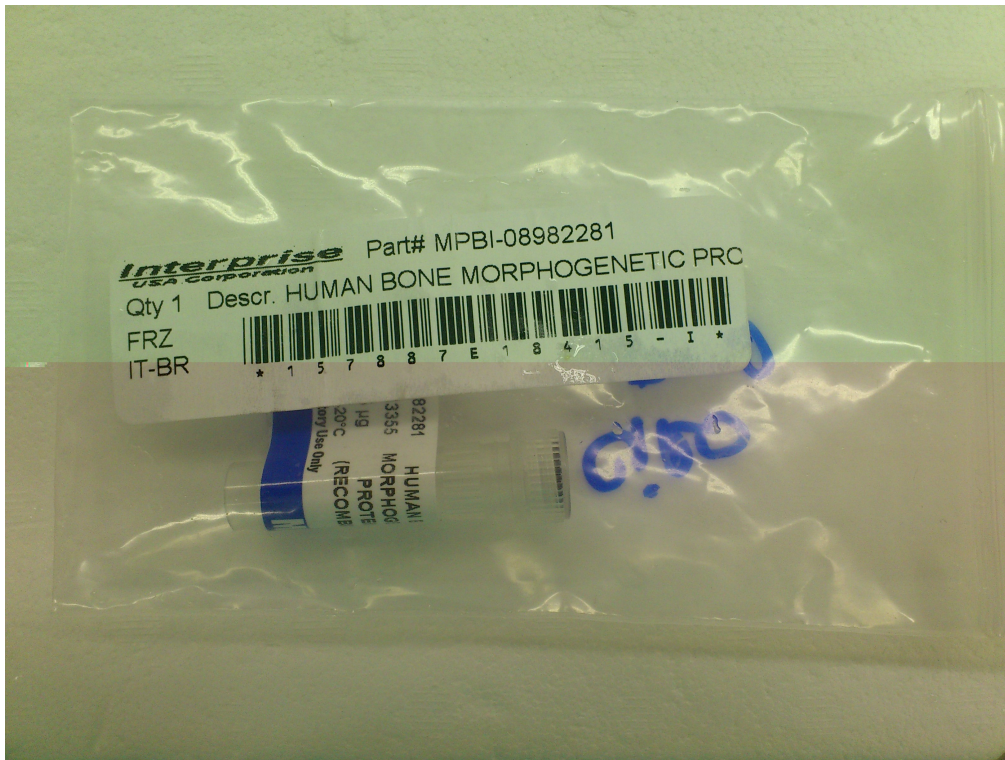


Figura 6 – Esquema gráfico da incisão no escalpo (linha arciforme) e da área de craniotomia e cranioplastia no osso parietal esquerdo do camundongo (retângulo).

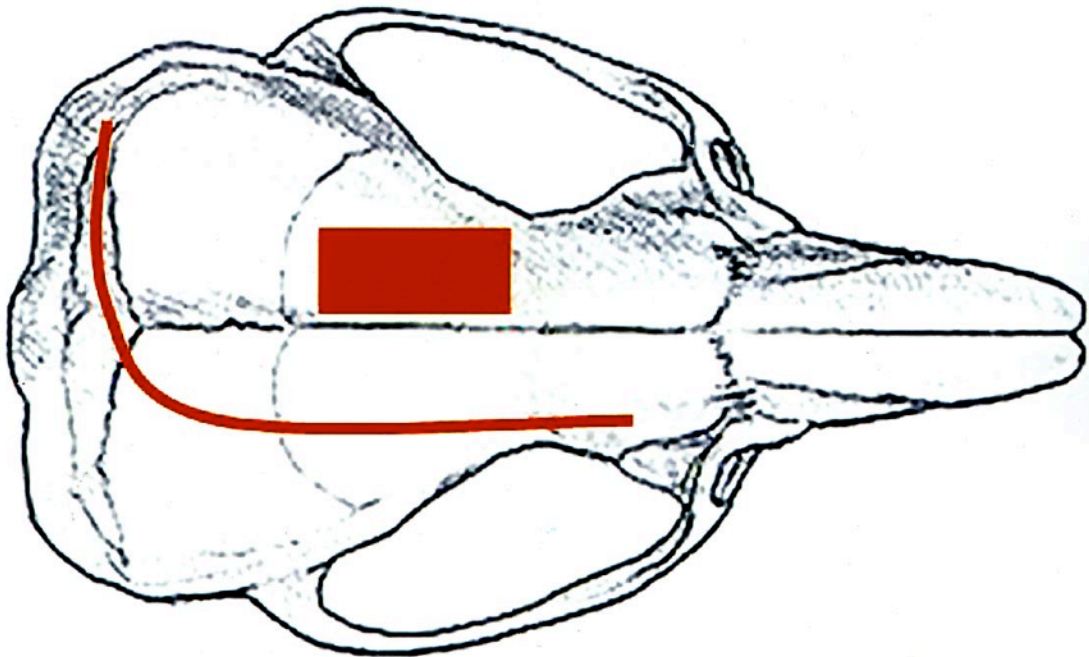


Figura 7 – Imagem transoperatória. Abertura do escalpo e exposição da área de cranioplastia.



Figura 8 – Imagem transoperatória da craniotomia já realizada.



Figura 9 – Imagem transoperatória. Reconstrução da cranioplastia realizada com alginato de cálcio.



Figura 10 – Imagem transoperatória da cranioplastia com fosfato de cálcio.

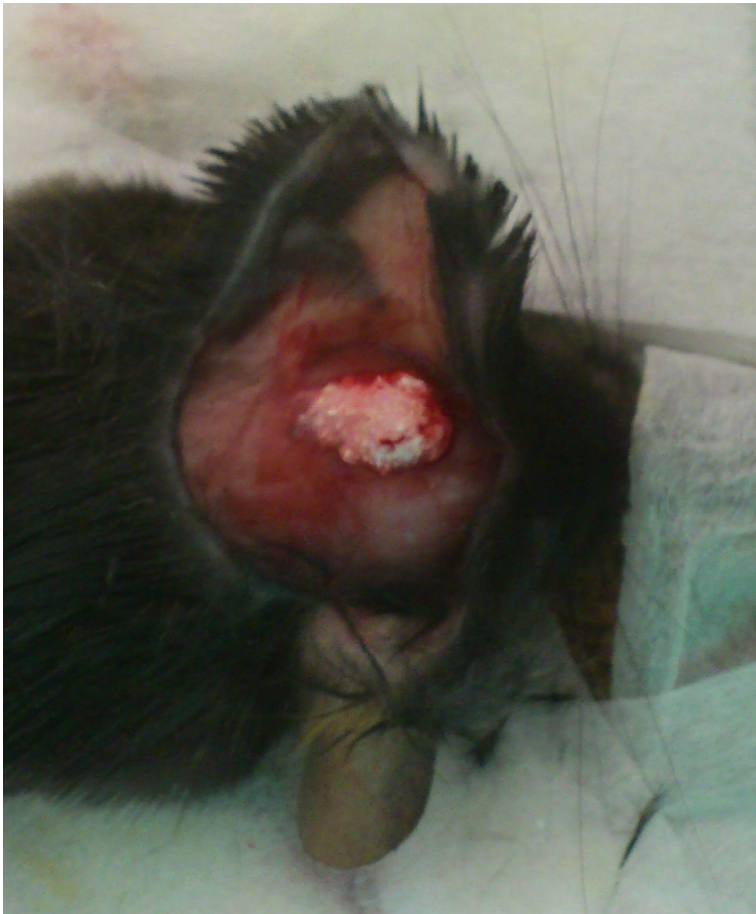


Figura 11 – Necropsia. Reabertura do escalpo para retirada do enxerto de reconstrução.



Figura 12 – Peça cirúrgica retirada após a eutanásia, contendo a área de cranioplastia e osso nativo circunjacente.



Figura 13 – Imagem histológica da reconstrução com osso autógeno. Note-se a neoformação óssea (N) na área reconstruída. Coloração: HE. Aumento: 50 vezes.

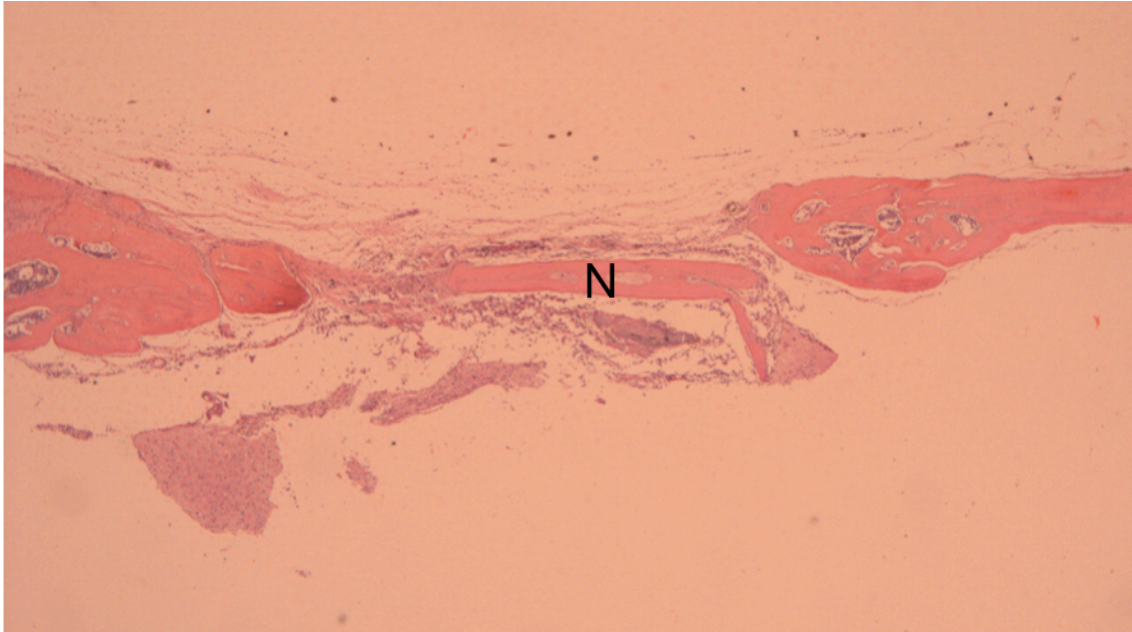


Figura 14 – Imagem histológica da reconstrução com alginato de cálcio. Note-se a presença de neoformação óssea (N) a partir das margens da falha óssea, onde há osso nativo da calota craniana. Coloração: HE. Aumento: 50 vezes.

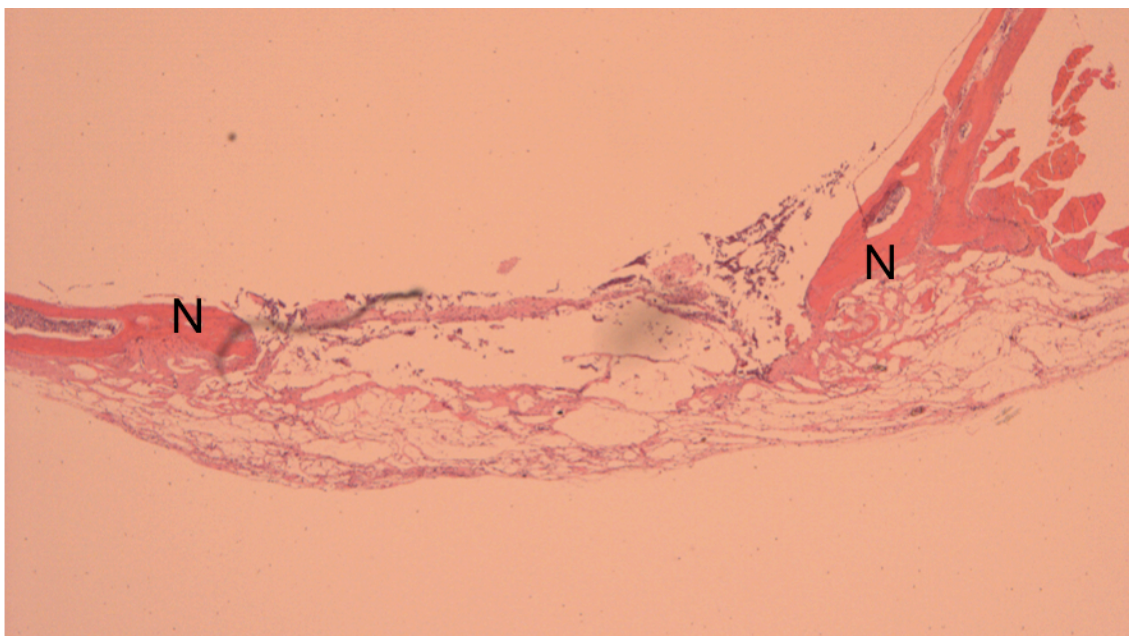


Figura 15 – Imagem histológica da reconstrução com alginato de cálcio. Note-se a presença de neoformação óssea (N) a partir das margens da falha óssea, onde há osso nativo da calota craniana. Neste caso, também houve formação de osso na área reconstruída (*). Coloração: HE. Aumento: 50 vezes.

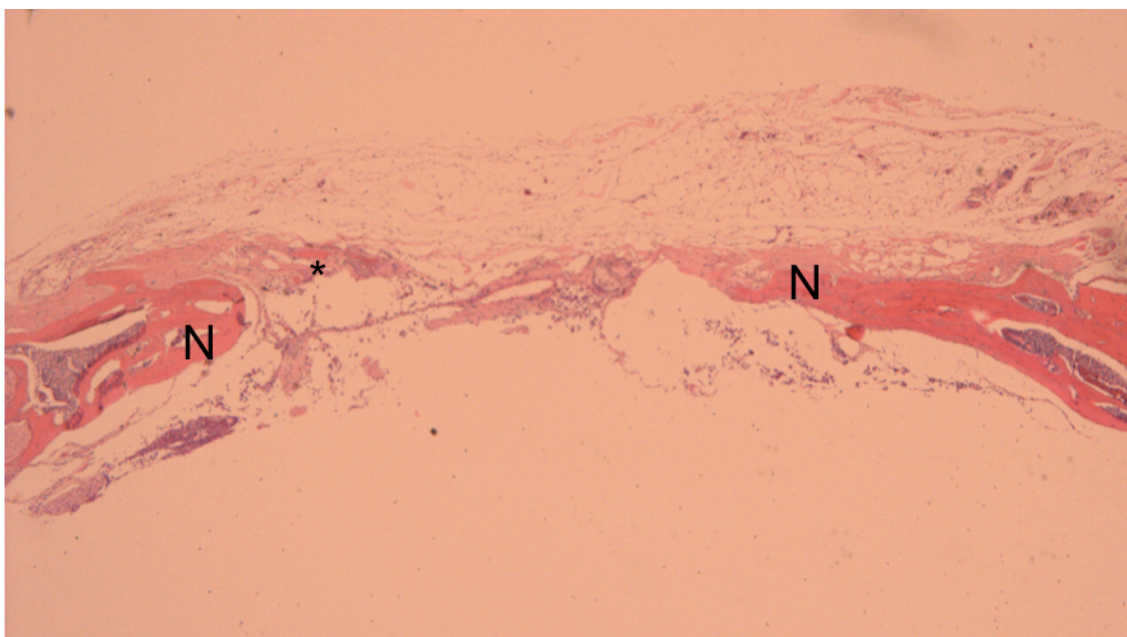


Figura 16 – Imagem histológica da reconstrução com alginato de cálcio (ALG) e proteína morfogenética óssea tipo 2. Note-se a presença de neoformação óssea (N), com fusão de corticais ósseas (F). Coloração: HE. Aumento: 100 vezes.

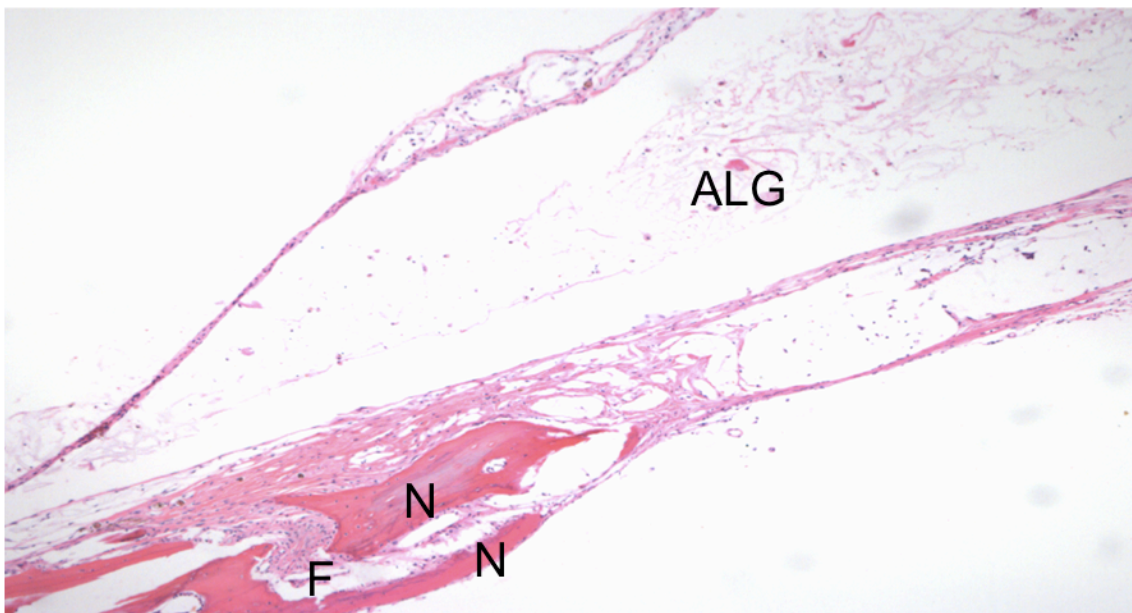


Figura 17 – Imagem histológica da reconstrução com matriz dérmica (MDM) e proteína morfogenética óssea tipo 2. Note-se a presença de trabéculas de matriz neoformada (N) e medula óssea (MO) dentro da região da reconstrução. Há também fusão de corticais (F). Coloração: HE. Aumento: 200 vezes.

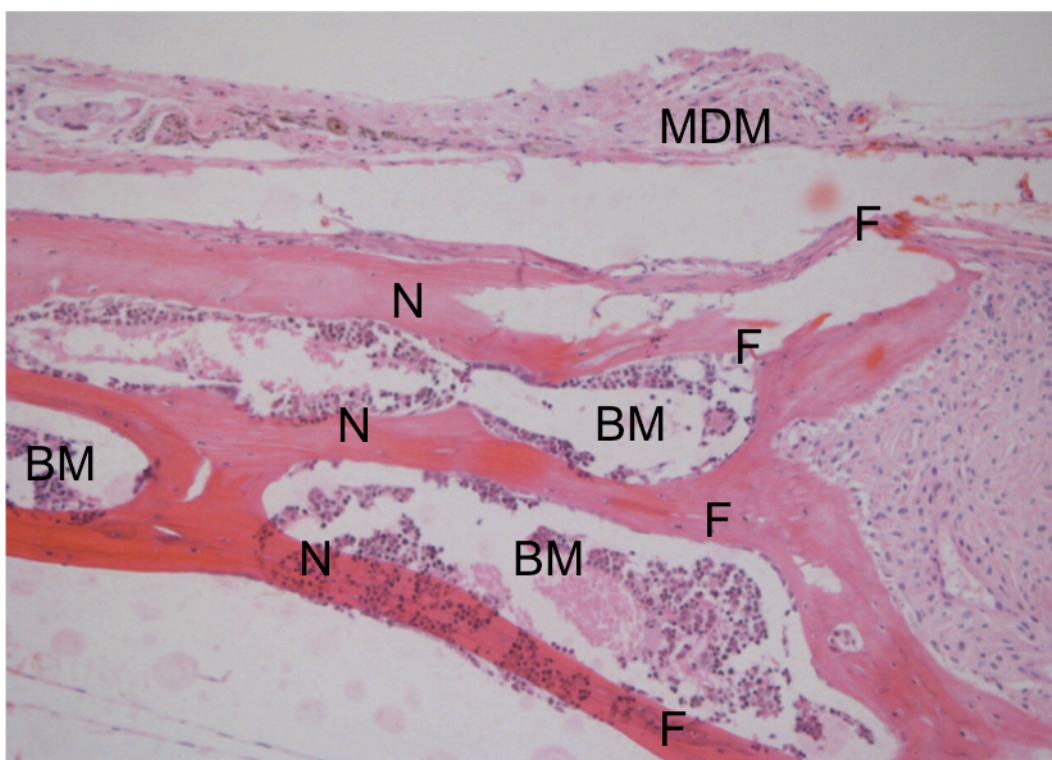


Figura 18 – Imagem histológica da reconstrução com matriz dérmica (MDM) e proteína morfogenética óssea tipo 2. Note-se a presença de neoformação óssea em (N) algumas regiões e a intensa neovascularização (V). Coloração: HE. Aumento: 400 vezes.

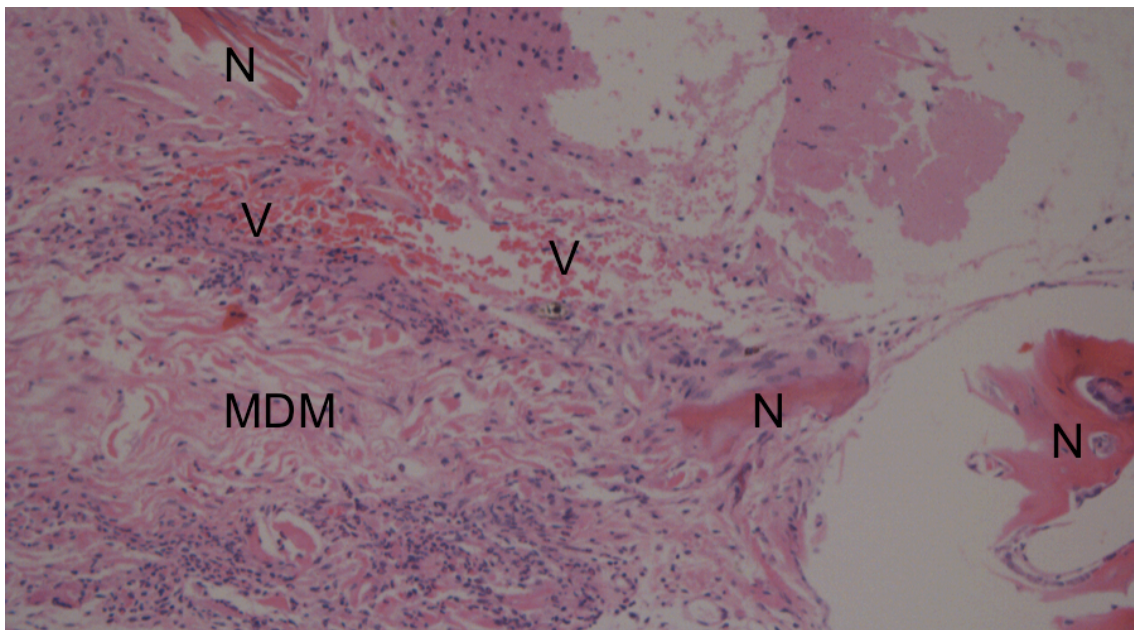


Figura 19 – Imagem histológica da reconstrução com fosfato de cálcio (TCP).

Percebe-se neoformação óssea (N) e fusão de corticais (F). Coloração: HE.

Aumento: 50 vezes.

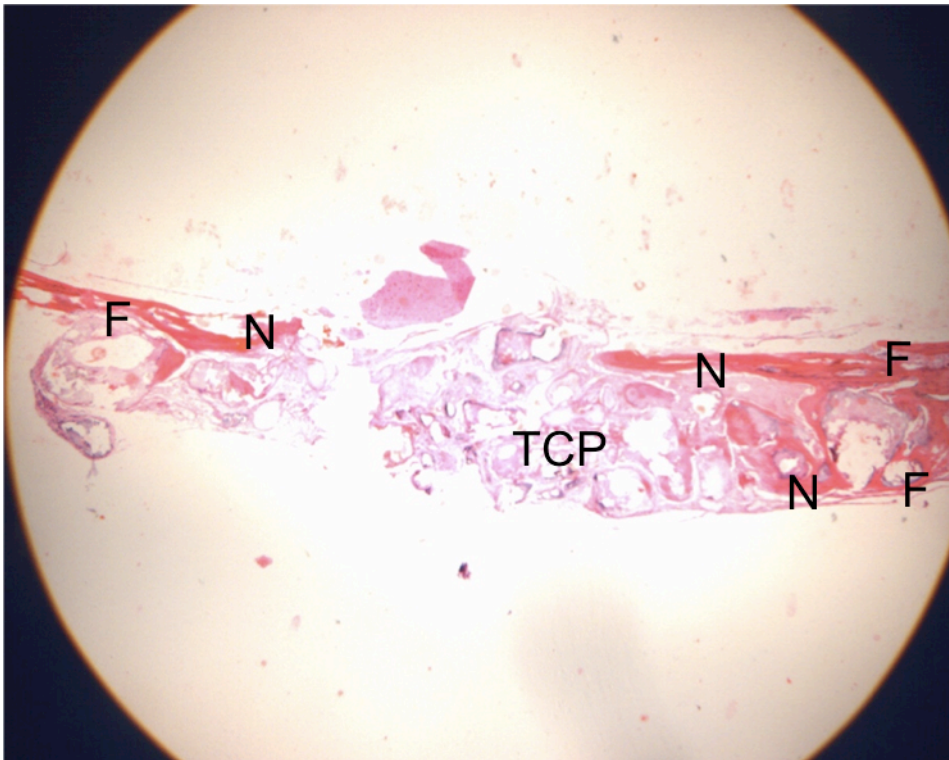


Figura 20 – Imagem histológica da reconstrução com fosfato de cálcio. Note-se a fusão de corticais (F), a presença de trabéculas de matriz neoformada (N) e medula óssea (MO). Coloração: HE. Aumento: 100 vezes.

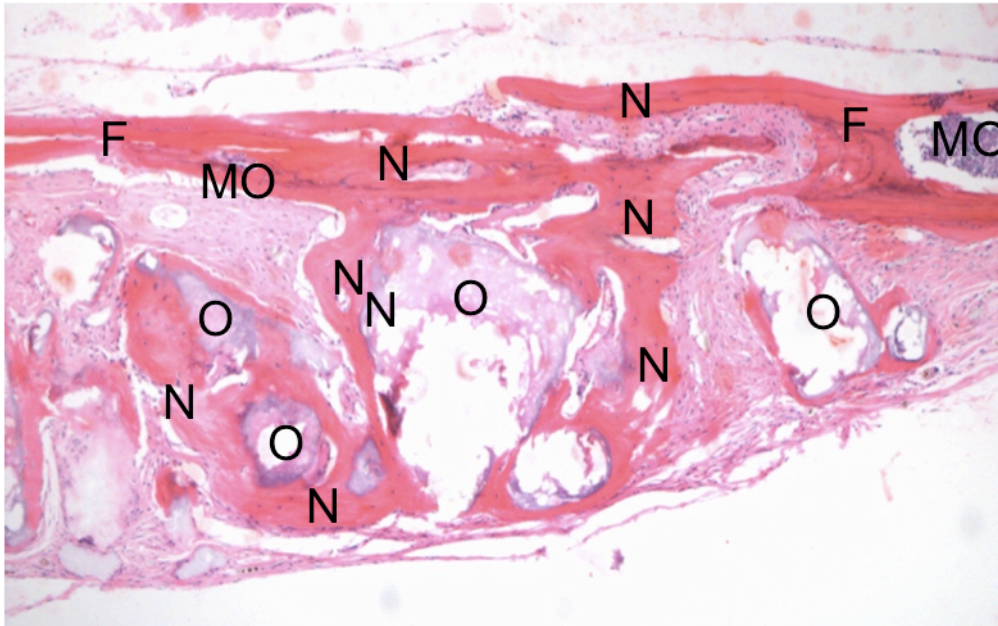


Figura 21 – Imagem histológica da reconstrução com fosfato de cálcio. Note-se a fusão de corticais (F), a presença de trabéculas de matriz neoformada (N) e medula óssea (MO). Ainda há matriz em reabsorção (O). Coloração: HE. Aumento: 200 vezes.

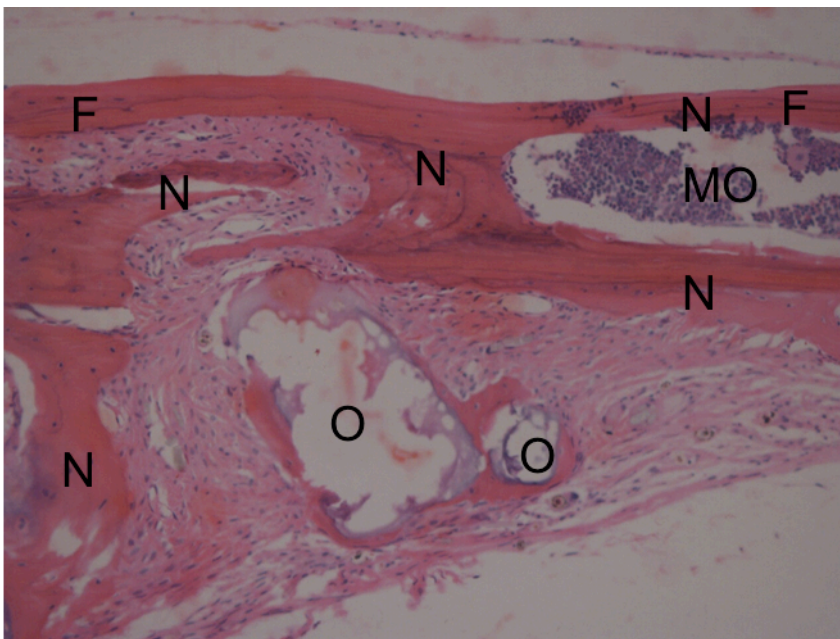
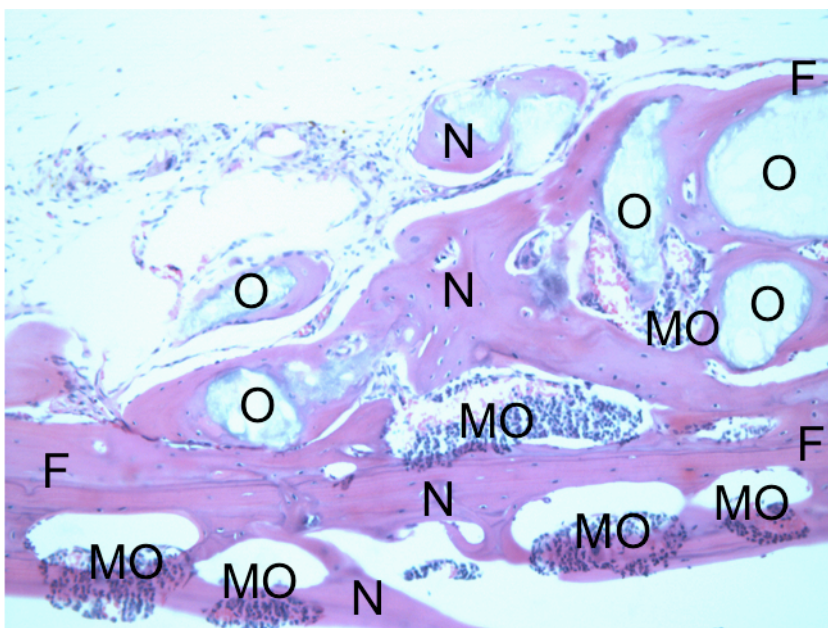
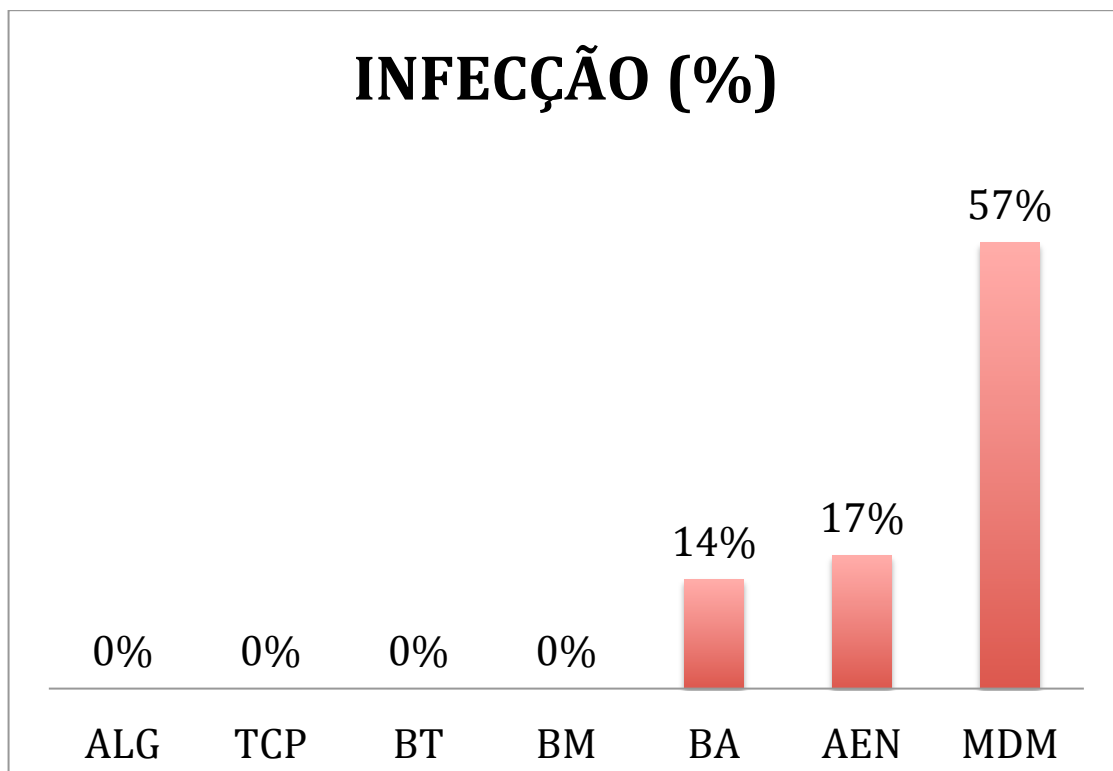


Figura 22 – Imagem histológica da reconstrução com fosfato de cálcio e proteína morfogenética tipo 2. Note-se a fusão de corticais (F), a presença de trabéculas de matriz neoformada (N) e medula óssea (MO). Ainda há matriz em reabsorção (O). Coloração: HE. Aumento: 200 vezes.



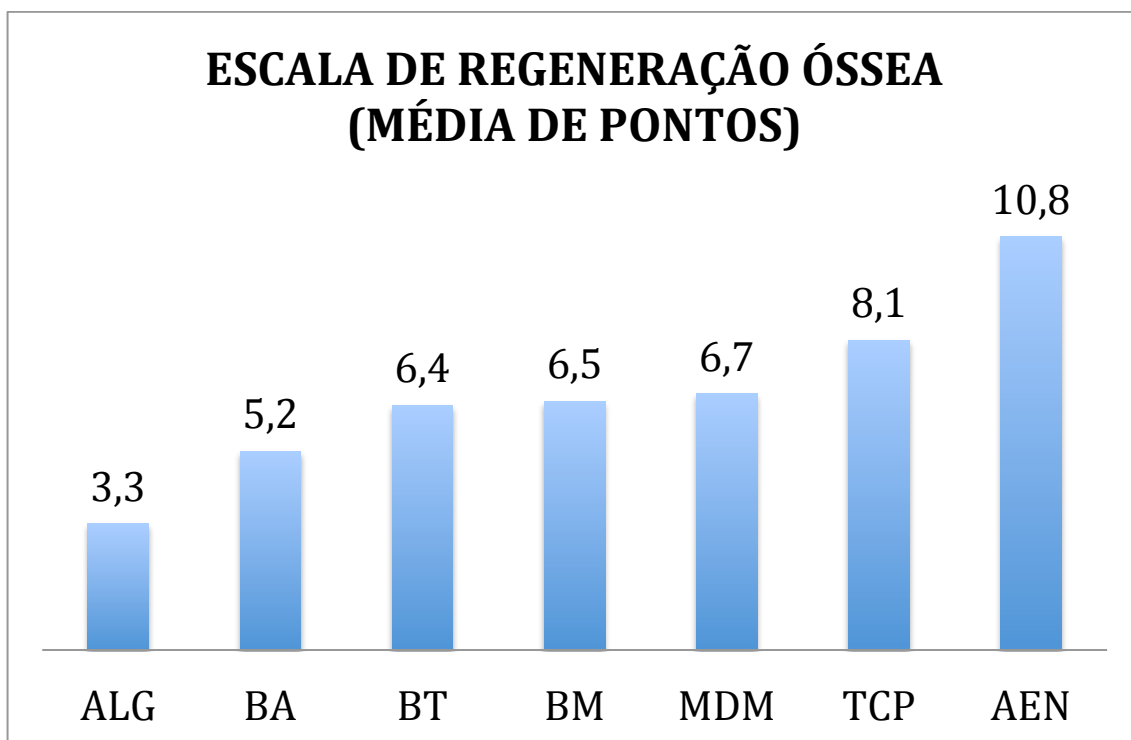
GRÁFICOS

Gráfico 1 – Frequência relativa (em porcentagem) da infecção de ferida operatória por grupo. (AEN=autoenxerto; ALG=alginate de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular; TCP=fosfato de cálcio; BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG; BM=BMP+MDM; BT=BMP+TCP.)



Teste de Kruskal-Wallis: $P=0,037^*$.

Gráfico 2 – Pontuação da escala histológica por grupo (pontos).
(AEN=autoenxerto; ALG=alginate de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular;
TCP=fosfato de cálcio; BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG;
BM=BMP+MDM; BT=BMP+TCP.)



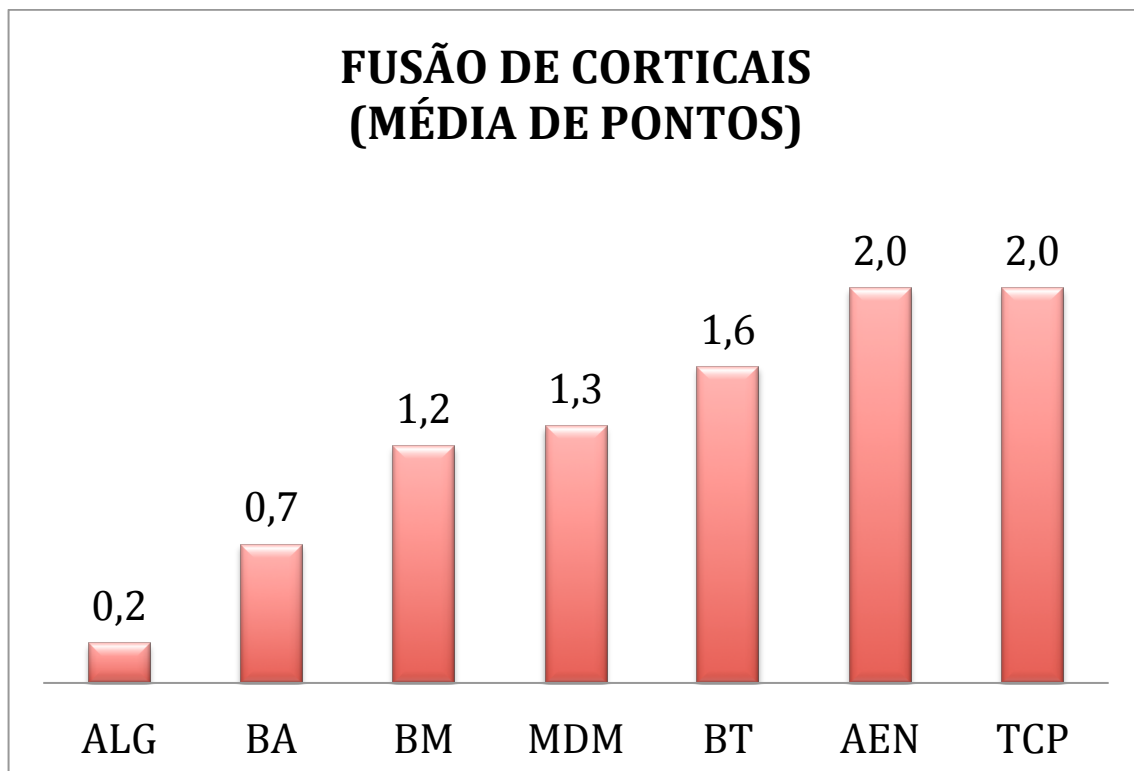
Teste de Kruskal-Wallis: $P=0,000275^*$.

Gráfico 3 – Frequência relativa da fusão de corticais por grupo (porcentagem).

(AEN=autoenxerto; ALG=alginato de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular;

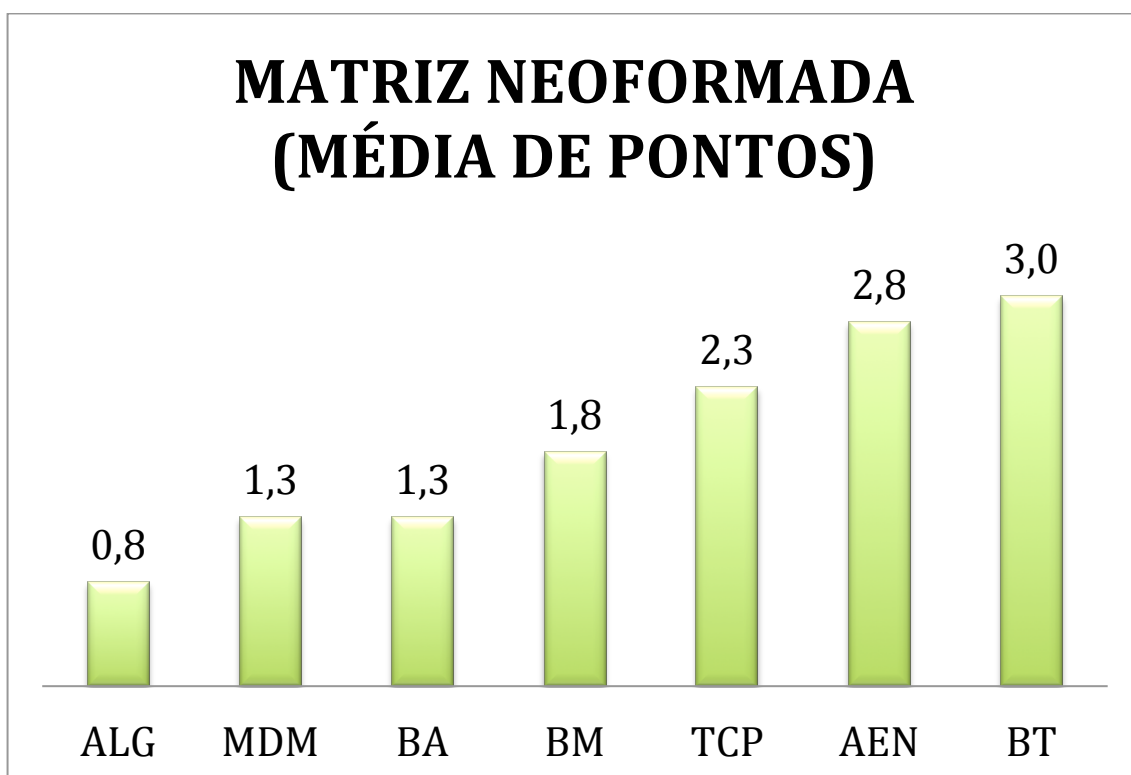
TCP=fosfato de cálcio; BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG;

BM=BMP+MDM; BT=BMP+TCP.)



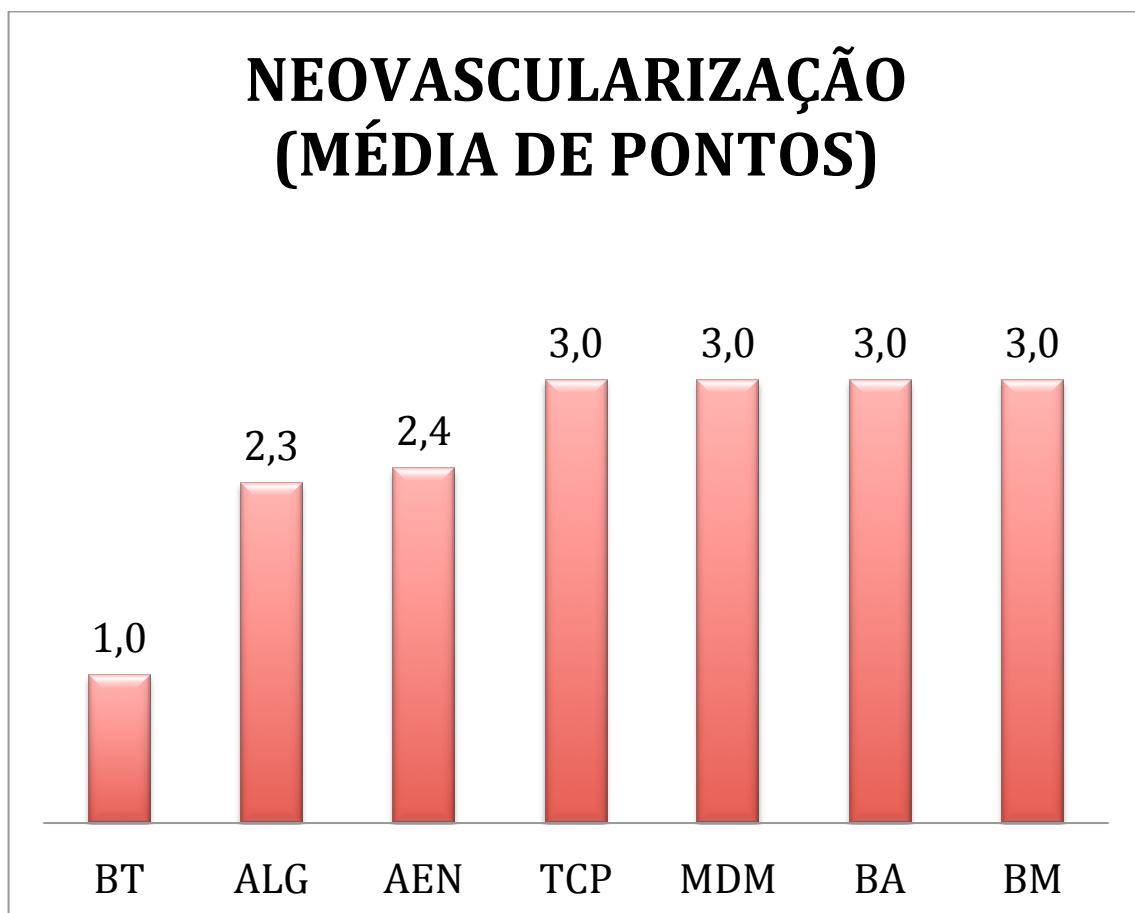
Teste de Kruskal-Wallis: $P=0,000846^*$.

Gráfico 4 – Avaliação de matriz neoformada por grupo (média de pontos).
(AEN=autoenxerto; ALG=alginato de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular;
TCP=fosfato de cálcio; BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG;
BM=BMP+MDM; BT=BMP+TCP.)



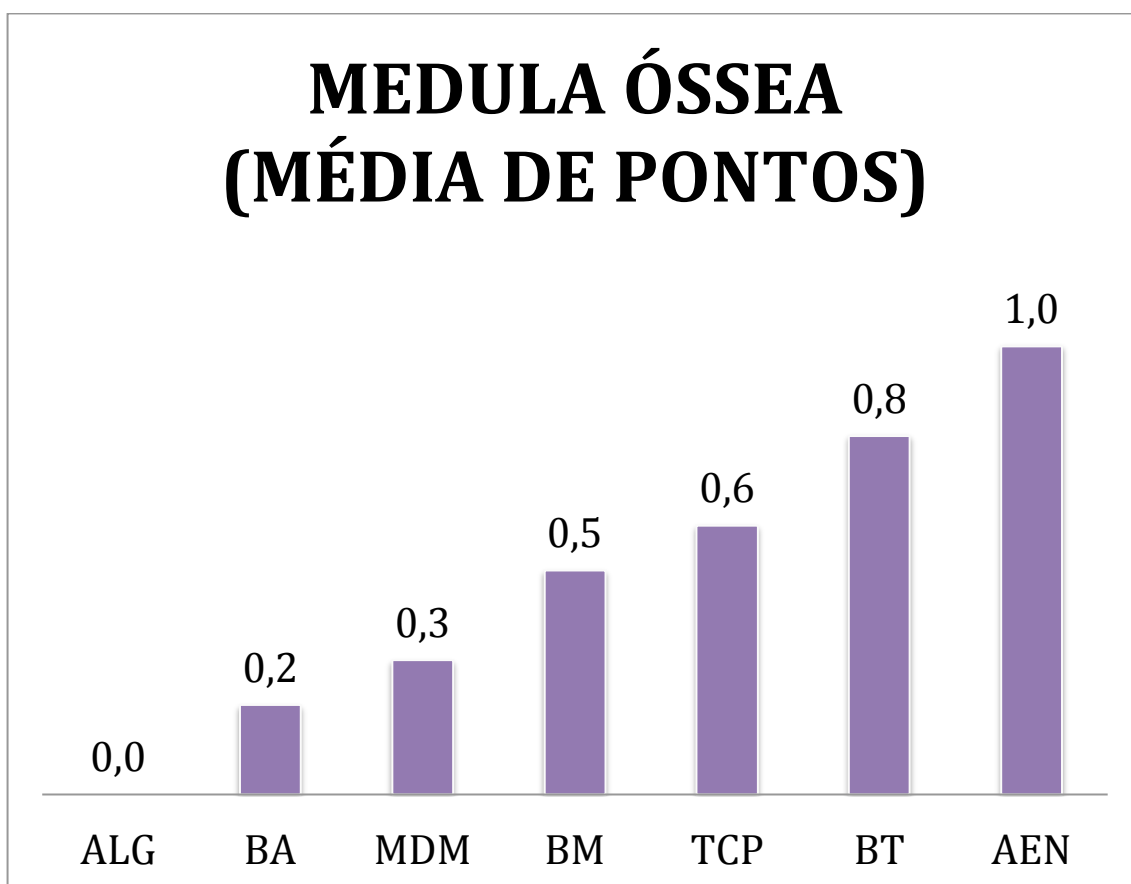
Teste de Kruskal-Wallis: $P=0,000835^*$.

Gráfico 5 – Neovascularização por grupo (pontos). (AEN=autoenxerto; ALG=alginate de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular; TCP=fosfato de cálcio; BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG; BM=BMP+MDM; BT=BMP+TCP.)



Teste de Kruskal-Wallis: $P=0,001695^*$.

Gráfico 6 – Formação de medula óssea na área receptora (média de pontos).
(AEN=autoenxerto; ALG=alginato de cálcio; MDM=matriz dérmica acelular;
TCP=fosfato de cálcio; BA=proteína morfogenética óssea tipo 2 [BMP]+ALG;
BM=BMP+MDM; BT=BMP+TCP.)



Teste de Kruskal-Wallis: $P=0,008317^*$.

5.2. ARTIGO EM LÍNGUA INGLESA

FORMATAÇÃO CONFORME REGRAS DA REVISTA

ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

CRANIAL VAULT RECONSTRUCTION WITH BONE MORPHOGENETIC PROTEIN, CALCIUM PHOSPHATE, ACELLULAR DERMAL MATRIX, AND CALCIUM ALGINATE: AN EXPERIMENTAL STUDY¹.

Ciro Paz Portinho^I, Luís Alberto Santos^{II}, Thadeu Cerski^{III}, Raquel Camara Rivero^{IV}, Marcus Vinícius Martins Collares^V.

^IFellow PhD degree, Postgraduate Program in Surgical Sciences, Medical School, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. Master, Attending Physician, Plastic Surgery Department, Porto Alegre Clinics Hospital (HCPA), Brazil. Concept and design of the study, acquisition and interpretation of data, supervised all phase of the study, manuscript writing and responsible for English version.

^{II}PhD Associate Professor, Head of Laboratory of Biomaterials and Advanced Ceramics (LABIOMAT), Material Engineering Department, UFRGS, Brazil. Scientific and intellectual content of the study, scaffold design, critical revision.

^{III}PhD Assistance Professor, Head of Pathology Department, HCPA/UFRGS, Brazil. Histopathological examinations, critical revision.

^{IV}Master, Associate Professor, Pathology Department, HCPA/UFRGS, Brazil. Histopathological examinations, critical revision.

^VPhD Assistance Professor, Head of Plastic Surgery Department, HCPA/UFRGS, Brazil. Scientific and intellectual content of the study, critical revision.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate experimental cranial vault reconstruction by combining bone morphogenetic protein type 2 (BMP-2) with different matrices.

METHODS: We designed an experimental, open, prospective and comparative study, divided in seven groups: 1 – BMP-2+calcium phosphate (TCP); 2 – BMP-2+acellular dermal matrix (MDM); 3 – BMP-2+calcium alginate (ALG); 4 – TCP; 5 – MDM; 6 – ALG; 7 – Bone autograft (BAG). A bone defect was created in left parietal bone of adult male mice. In the same procedure reconstruction was performed. After five weeks, animals were sacrificed, and reconstruction area was removed to histological analysis.

RESULTS: Thirty-eight animals were evaluated. A higher incidence of infection has occurred in MDM group (57%, $P=0.037$). For cortical fusion, groups BAG, TCP, and BMP-2+TCP (BT) obtained the best scores, in comparison with the others ($P=0.00846$). Concerning new bone formation, groups BT, BAG, and TCP have presented the best scores ($P=0.00835$). When neovascularization was considered, best groups were BMP-2+MDM (BM), BMP-2+ALG (BA), TCP, and MDM ($P=0.001695$). BAG group was the best in bone marrow formation, followed by groups BT and TCP ($P=0.008317$).

CONCLUSIONS: BMP-2 increased bone regeneration in experimental skull reconstruction, especially when combined to TCP. Such association was even comparable to BAG, the gold-standard treatment, in some histological criteria.

Key words: Bone and bones. Bone Transplantation. Tissue Engineering. Bone Matrix. Craniofacial Abnormalities.

INTRODUCTION

Craniofacial reconstructions often need either bone or cartilage autografts.¹ Cranial reconstruction is important not only for cosmetic concerns, but also to re-establish protection to brain and prevent central blood flow imbalance due to atmospheric pressure.² Bone tissue is able to regenerate after damage.³ Under ideal conditions, bone architecture is rebuilt, instead of a fibrous scar, which is the common final route of other tissues.⁴ However, bone restitution may be challenging, especially when donor areas become scarce or healing is inefficient.⁵⁻⁹ From this, alternatives have been researched so long.¹⁰⁻¹²

Bone autografts (BAG) keep on going as the gold standard grafts, but they carry some bias: their harvesting produce a variable degree of morbidity in donor area; they are not promptly available in many cases; they may be difficult to sculpt and fit for a certain receptor area.^{1,4,13} The advent of both heterologous and synthetic grafts has increased the offer of material, but has also brought other problems, as follows: lack of osteoinduction, resorption unpredictability, and unfavourable mechanical properties.^{1,14-19}

There are many ongoing researches, which intend to decrease or even prescind donor areas.^{20,21} Tissue engineering (TE) has looked for the combined use of regenerative cells, matrices or cell carriers, and growth factors (GF).^{1,22-33} There are some controversial evidences showing lack in cranial vault reconstructions when ADSCs are used.^{34,35} Yet, studies with bone morphogenetic protein (BMP) and no cell addition have demonstrated the great osteoconductive and osteoinductive capacity of this growth factor. These findings challenge the concept of cell culture inclusion.¹⁹ This way, it has become important to evaluate the effects of combining GF (e.g., BMP) and matrices, without adding regenerative cells.

GF interact with cell metabolism. In bone tissue, cell proliferate significantly *in vitro* in response to the following growth factors: BMP – especially type 2 and 7; fibroblast growth factor-2 (FGF-2); platelet-derived growth factor (PDGF); insulin-like growth factor-1 (IFG-1); and vascular endothelial growth factor (VEGF).^{1,4} Among them, BMP have been considered the greatest mediators either in osteogenesis and bone regeneration.¹⁸ BMP belong to transforming growth factor-beta (TGF-beta) family, and they have been intensively studied.^{18,19,36-38} BMP are believed to start and accelerate a fracture healing, and also to decrease the risk of bone nonunion.³⁹

The aim of this paper was to evaluate, through a histological scale, bone regeneration of a parietal cranial vault reconstruction in mice, which have been submitted to reconstructions with BMP-2, associated to TCP, MDM, or ALG.

METHODS

This project has been approved by Bioethics Committee from Porto Alegre Clinics Hospital, and registered as # 12-0199.

We have designed an experimental, comparative and prospective study. We have used isogenic Balb-C57 mice. They were all adults and males. They

were included following the criteria of Animal Experimental Research Department (AERD) – Porto Alegre Clinics Hospital – Federal University of Rio Grande do Sul. During experiences, the animals have been kept in adequate places, under a 12-hour cycle of light/darkness, receiving proper food and potable water *ad libitum*. Animal care has followed the Law 11,794, which determines protocols for animal research. Surgeries and lodgement were made at AERD.

We have divided the mice population into seven groups:

- G1 = BMP + TCP = BT
- G2 = BMP + MDM = BM
- G3 = BMP + ALG = BA
- G4 = ALG [control]
- G5 = MDM [control]
- G6 = TCP [control]
- G7 = AEN [control; gold standard]

We have determined the number of animals to be included based on previous published articles, in which cranioplasties and craniofacial bone reconstructions have been made. Arias-Gallo et al. (2013)⁴ included 48 animals, divided by 6 groups (8 animals per group). Özdemir et al.⁴⁰ included 28 animals, divided by 6 groups (4 animals per group). López-Morales et al.³⁶ included 26 animals (52 bone failures; 9 groups). Moshaverinia et al.¹⁸ included 20 animals, divided by 5 groups (4 animals per group). Poldervaart et al.¹⁹ included 16 animals, unequally divided by three groups. Besides, international rules for experimental studies suggest a reduced number of animals per research. This way, we have decided to use 49 animals, divided by 7 groups, what means 7 animals per group. This would respect such rules, and even a lost of 2 animals per group would not compromise statistics.

Matrices and Cell Carriers

In order to obtain a consistent comparison, we have included a bone matrix (TCP), a dermal matrix (MDM), a cell carrier (ALG), and the gold-standard graft (BAG). Both ALG and TCP were manufactured by Laboratory of Biomaterials and Advanced Ceramics (LABIOMAT), Material Engineering Department, UFRGS, Brazil. MDM chosen was Matriderm® (Endosul distribution, manufactured by Skin&Health Co., Billerbeck, Germany). BAG was that simply made during the cranial failure creation. It has been totally separated from cranial vault and soon sent back to the failure area.

Bone Morphogenetic Protein

Human recombinant bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) has been used in groups BA, BM, and BT (25 µg, Interprise Distributor, Immuno®, MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA). Commercial presentation has been diluted into 2.5 mL 0.9% NaCl, obtaining a concentration at 10 µg/mL. Minimal concentration recommended by the manufacturer was 1 µg/mL. A volume of 10 UI (0.1 mL) was applied in every animal bone failure.

Surgical Procedure

Animals have undergone surgery, according to AERD protocol. Surgical model was the same as previously performed in other studies from our research group.¹⁶ Anaesthesia has been made with isoflurane. Induction has been made with 100 ml/min, and maintained with 30 ml/min. Scalp incision has been arciforme, over left parietal bone, opposed to bone failure region (left parietal bone), in order to prevent straight communication between the study site and environment (Figure 1). Scalp flap has been displaced, and periosteum has been detached, till left parietal bone has been totally exposed.

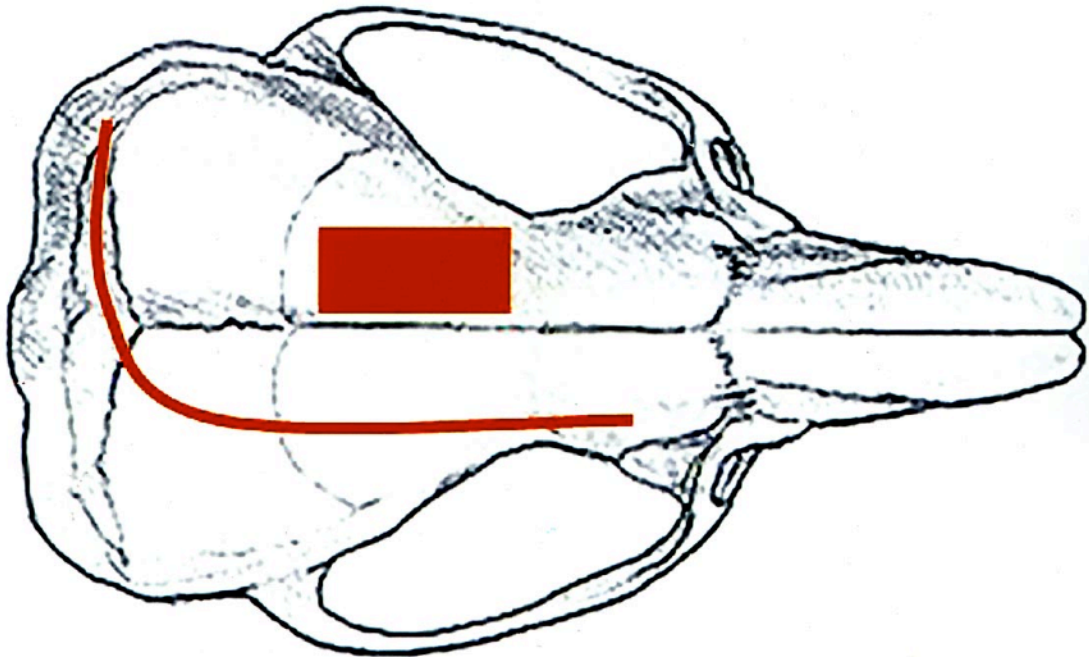


Figure 1 – Scalp incision (arcuate line) and left parietal bone region of failure creation (rectangle).

A cranial failure, sizing 3 x 5 mm, has been created in left parietal bone, with a drill. This failure has already been studied in previous publications, presenting no spontaneous regeneration.¹⁶ Periosteum has been detached delicately with a Freer detacher. Dura has been preserved as possible. Mice have been reconstructed with some of the combinations previously described (Figure 2). For TCP reconstruction a transoperative preparation was made, combining 1 cc of cement to 1 cc of 0.9% saline solution. Thereafter, scalp flap has been sutured with nylon 4-0.



Figure 2 – Surgical procedure. Bone failure reconstruction with TCP.

Postoperative recovery has been made in appropriate room, in neonatal warmed cradles (temperature between 25 and 30 degrees Celsius). Analgesia has been made with tramadol, 10 mg/kg, subcutaneous or intramuscular each 6 hours. We did not use antibiotics, in order to determinate the capacity of reconstructions to resist against either contamination or infection.

Five weeks after surgery, euthanasia has been made with an overdose of both xylazine and tramadol, according to our institution protocol. Incision was reopen, and the failure content was removed en bloc and kept in formalin for histological preparing.

The five-week period has been chosen because it is intermediate between other studies periods (four or six weeks). We have preferred such design, once we have not projected the analysis of late groups.

Histology and Image Digitalization

Surgical samples taken from cranial vaults have been put away in formalin for about one week. After, there has been histological preparation. Staining was made with hematoxylin-eosin (HE).

Imaging digitalization has been made with QCapture Pro ® (QImaging Pro Corporation, 2003), version 5.1.1.14 for Windows 2000/XP Professional.

Outcomes Determination

The outcomes have been evaluated by a previously validated histological scale.¹⁶ It consisted on criteria presented in Table 1. Possible sum could range from -3 to 15 points.

TABLE 1 – Histological criteria for bone regeneration.

CRITERIA	DETAILS	SCORING
NEW BONE FORMATION	Absent:	0
	Until 1/3 of microscopic field:	1
	Until 2/3 of microscopic field:	2
	More than 2/3 of microscopic field:	3
OLD AND UNABSORBED MATRIX	Absent:	0
	Until 1/3 of microscopic field:	-1
	Until 2/3 of microscopic field:	-2
	More than 2/3 of microscopic field:	-3
PRESENCE OF CELLS	Absent:	0
	Until 1/3 of microscopic field:	1
	Until 2/3 of microscopic field:	2
	More than 2/3 of microscopic field:	3
OSTEOCLASTS	Absent:	0
	Until 1/3 of microscopic field:	1
	Until 2/3 of microscopic field:	2
	More than 2/3 of microscopic field:	3
NEOVASCULARIZATION	Absent:	0
	Until 1/3 of microscopic field:	1
	Until 2/3 of microscopic field:	2
	More than 2/3 of microscopic field:	3
BONE MARROW	Absent:	0
	Present:	1
CORTICAL FUSION	Absent:	0
	Present in one side:	1
	Present in both sides:	2

Evaluation of these criteria has been made in 200 and 400 times optical microscope amplification. Analysis has been made by two pathologists. Blinding could not be complete, once histological images showed a clear difference between reconstruction with bone matrices and others without it. However, blinding could be sustained between the presence of BMP-2 or not.

The criterion “old matrix presence” (not resorbed) has received a negative punctuation, once it represented the absence of deficiency of metabolic activity.

The criterion “cortical fusion” represented the emergence of a new-bone formed bridge between native skull bone and reconstruction area. As the histological evaluation was made so that two native margins could be visualized, it has been possible to determine, in a two-dimensional way, if there has happened no fusion, or fusion in one or both sides.

Statistical Analysis

Statistical analysis has been made by Kruskal-Wallis test for evaluate differences between groups, with significance level for $P < 0.05$.

Biosecurity Protocols

In this project, we have followed *Normas de Segurança e Procedimentos de Boas Práticas de Laboratório* (Safety Standards and Procedures for Good Laboratory Practice). The necessary security measures were ensured to researchers, either for animal manipulation or stand research.

Ethical Aspects

In vivo procedures has been performed according to present Brazilian legislation (Law #11,794 – Oct. 8th, 2008), which has established *Procedures for the Scientific Use of Animals* and regulates the register of vivariums and research centers. All the procedures are based on *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals – ILAR/USA* (2011), and on *Manual for Vivarium Technicians* (COBEA/Brazil, 1996), projected to diminish pain and discomfort.

RESULTS

All the animals presented cell colonization in bone failure. Also, all of them had reconstruction material available in receptor area. There has been no scar retraction in any failure.

Macroscopic calcification of parietal failure has been perceived in groups BAG, TCP, BT, and BM. This measure has not been submitted to statistics because histology would do it with much more precision.

There have been 11 losses through all groups. Incidence of infection has been notorious in MDM group. There have been 4/7 cases (57%) in MDM group, 1/6 in BAG group (17%), and 1/7 (14%) in BA group. This analysis was

statistically significant ($P=0.037$). Evaluations and calculations hereafter refer to remaining animals, after excluding cases of orbit and infection.

All the groups have received histological evaluation (Figures 3 to 11). Table 2 presents all the results by group and by animal in detail.

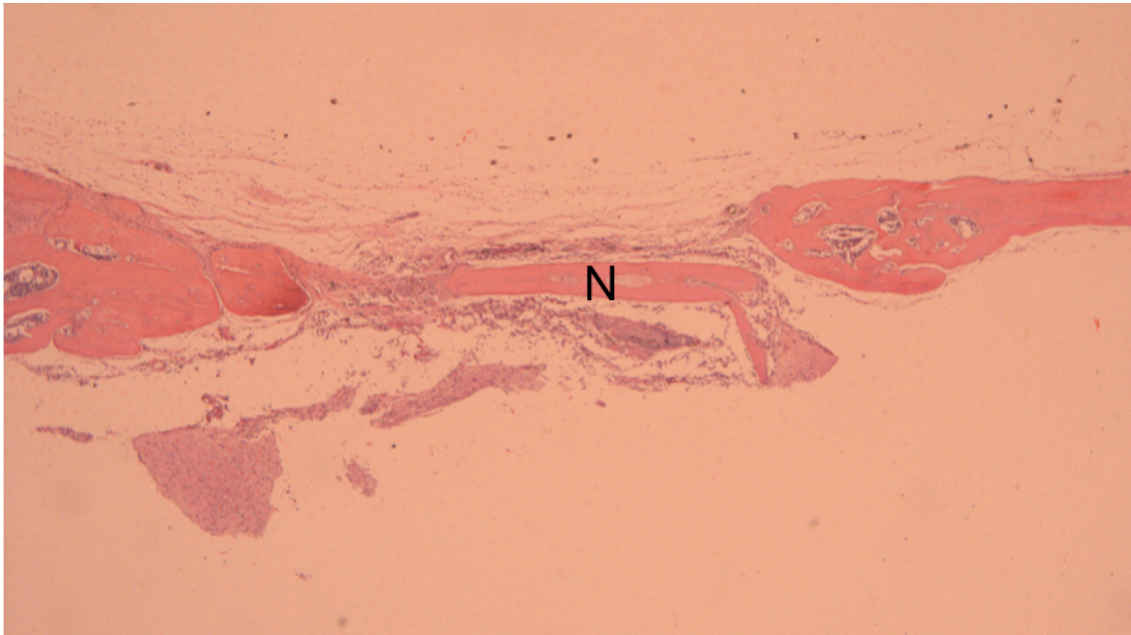


Figure 3 – Histological aspect of reconstruction with bone autogenous graft. There is new bone formation (N) in reconstructed area (50 x).

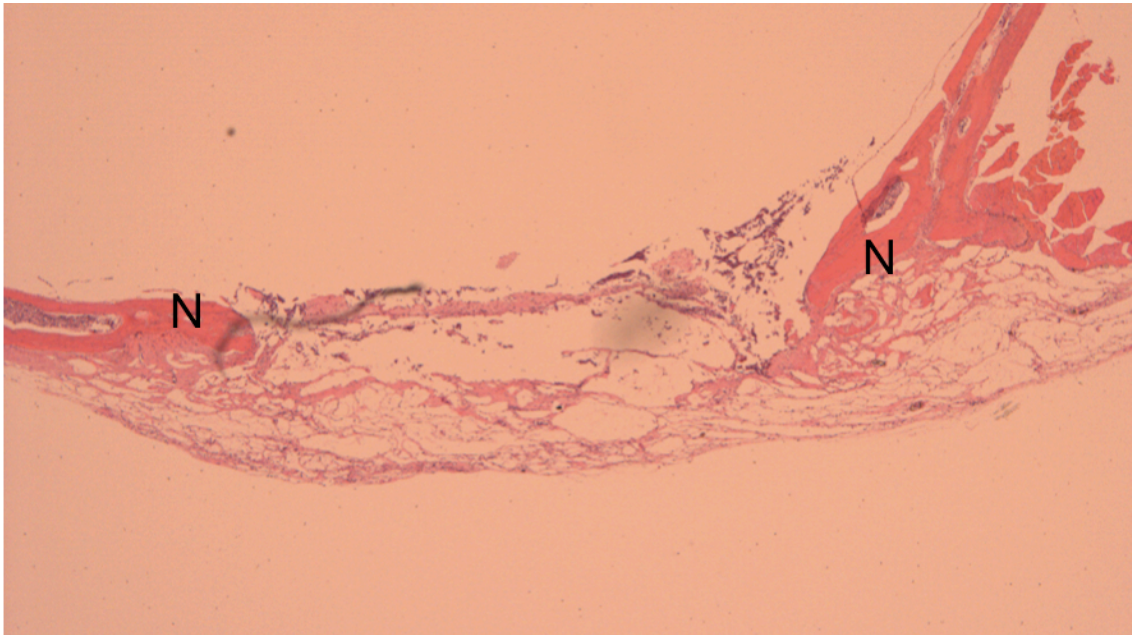


Figure 4 – Histological aspect of reconstruction with alginate. There is new bone formation (N) in the border of the failure, where native cranial vault bone can be seen (50x).

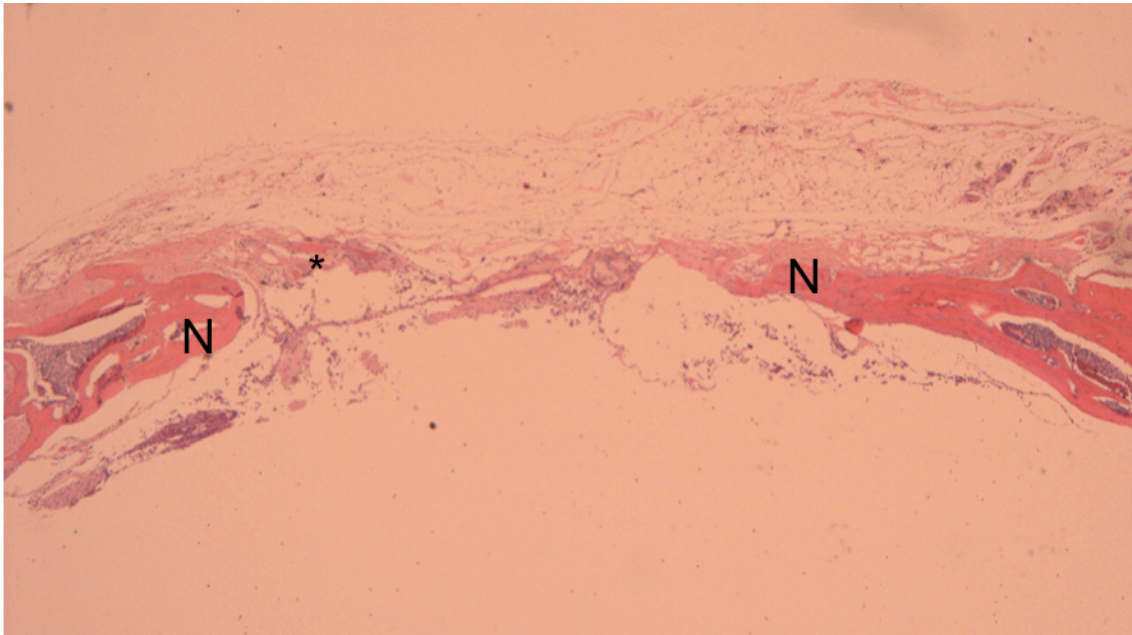


Figure 5 – Histological aspect of reconstruction with alginate. This time, there is new bone formation (N) in the border of the failure and also in the middle of reconstructed area (*) (50x).

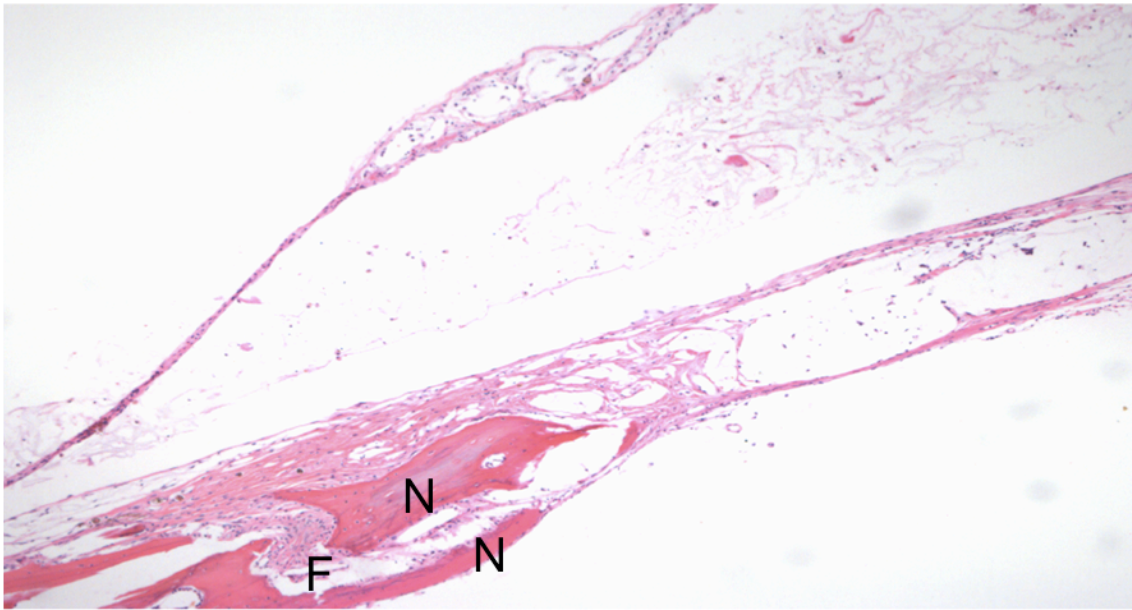


Figure 6 – Histological aspect of reconstruction with alginate and bone morphogenetic protein-2. There is new bone formation (N), and cortical fusion (F) (100 x).

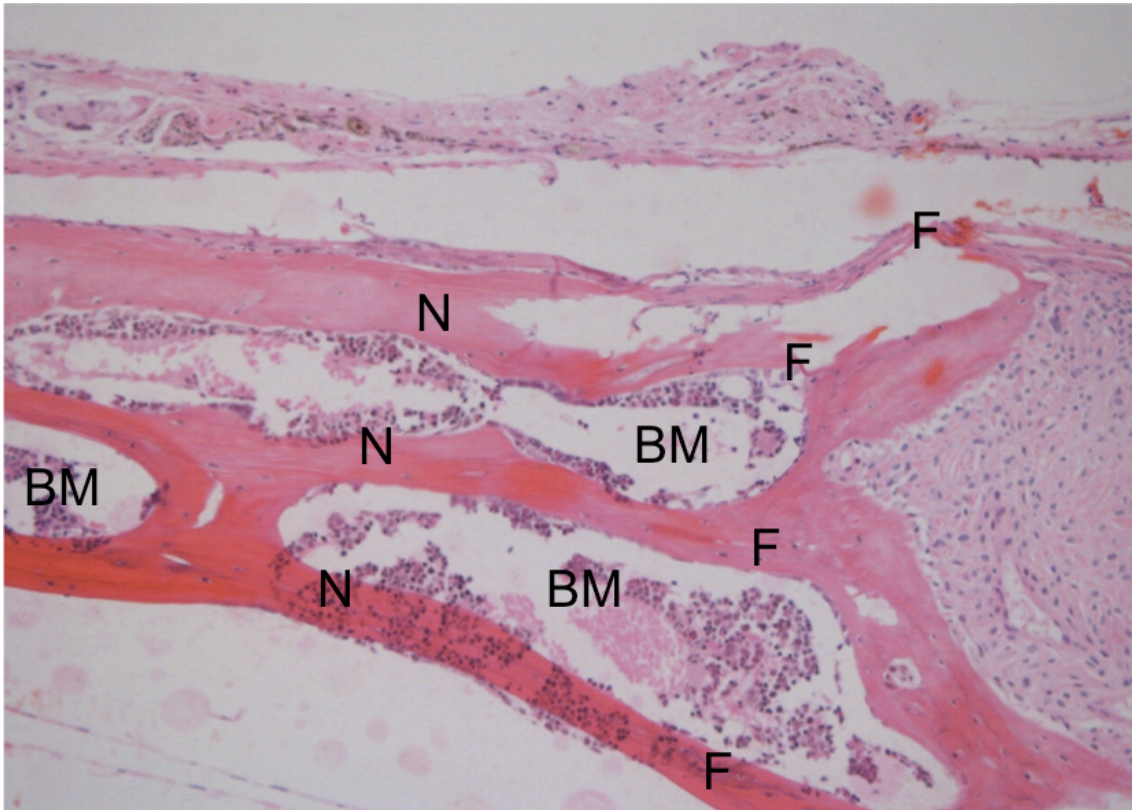


Figure 7 – Histological aspect of reconstruction with dermal matrix and bone morphogenetic protein-2. There is new bone formation (N), cortical fusion (F) and the presence of bone marrow (BM) in the reconstructed area (200 x).

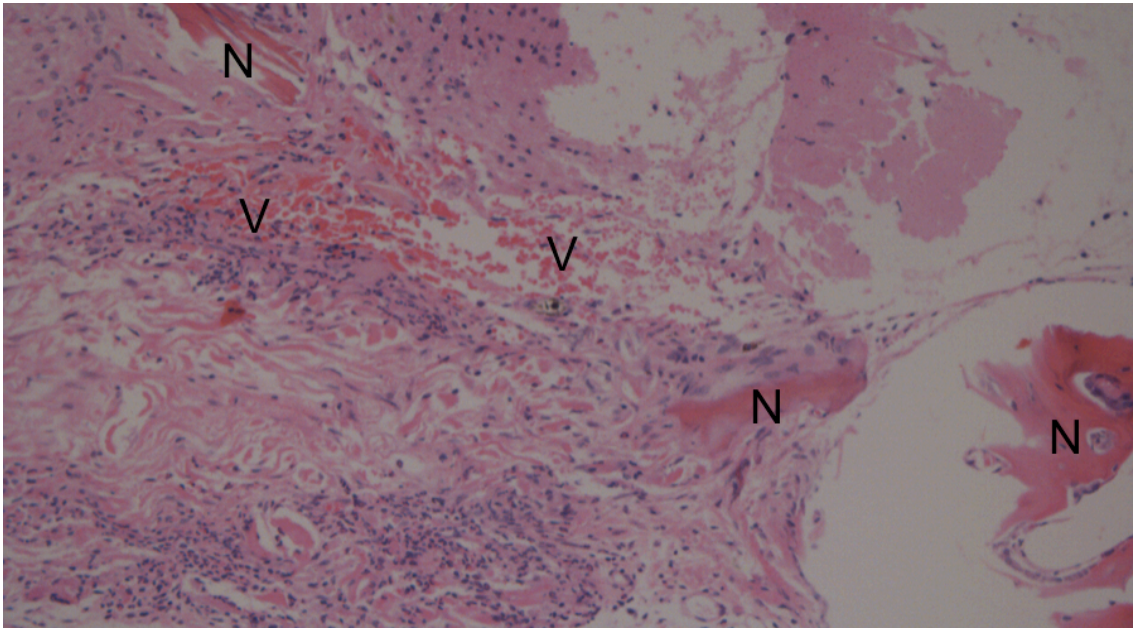


Figure 8 – Histological aspect of reconstruction with dermal matrix and bone morphogenetic protein-2. There is new bone formation (N) in some areas and intense neovascularization (V) (400x).



Figure 9 – Histological aspect of reconstruction with calcium phosphate. There is cortical fusion (F), new bone formation (N), presence of bone marrow (BM) and old and unabsorbed matrix (O) (100 x).

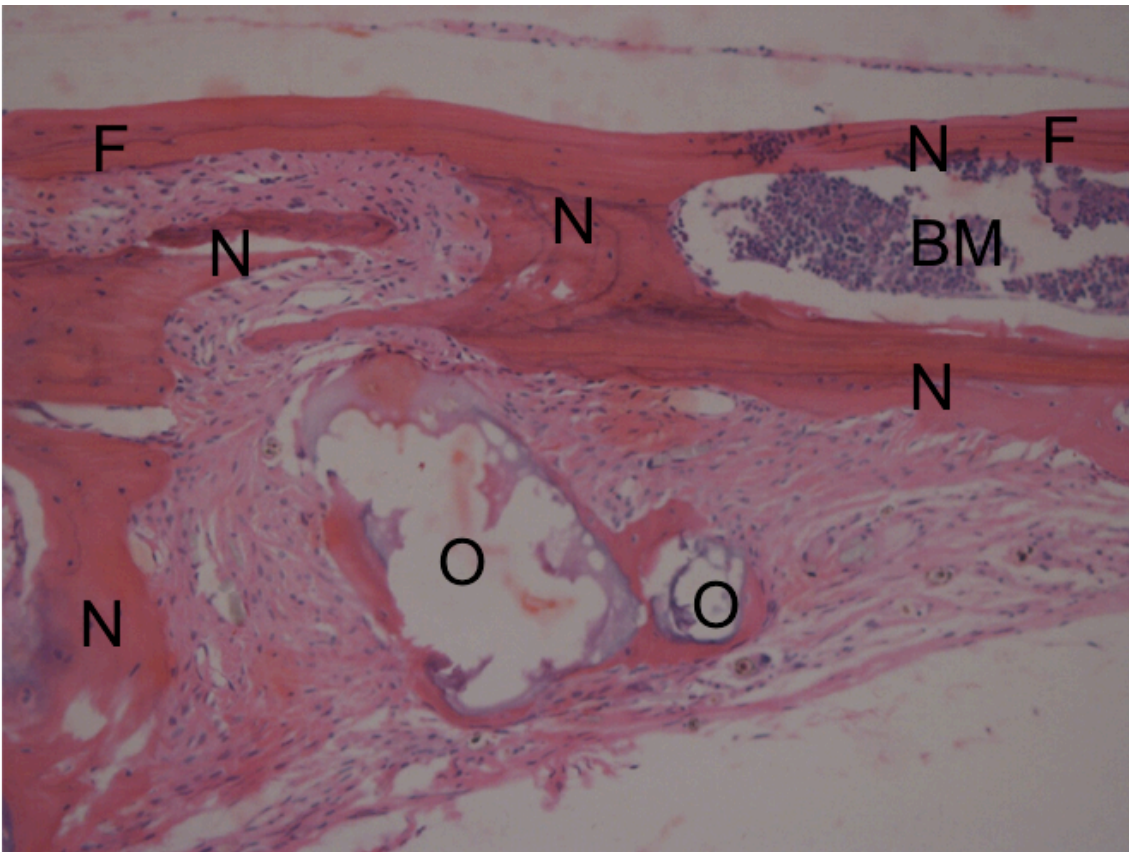


Figure 10 – Histological aspect of reconstruction with calcium phosphate. There is cortical fusion (F), new bone formation (N), and presence of bone marrow (BM) and old and unabsorbed matrix (O) (200 x).

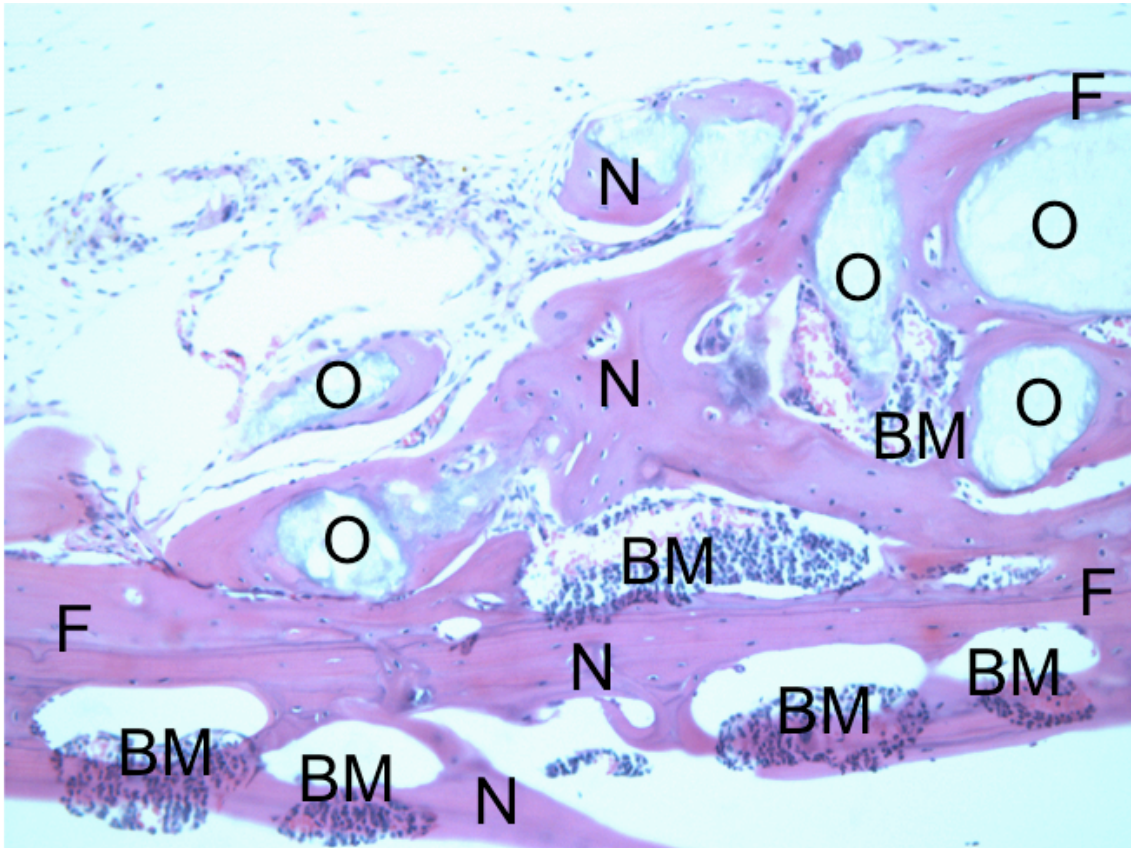


Figure 11 – Histological aspect of calcium phosphate and bone morphogenetic protein-2. There is cortical fusion (F), new bone formation (N), and presence of bone marrow (BM) and old and unabsorbed matrix (O) (200 x).

TABLE 2 – Histological analysis.

CRITERIA	CORTICAL FUSION	NEW BONE FORMATION	PRESENCE OF OLD UNABSORBED	PRESENCE OF CELLS	OSTEOCLASTS	NEOVASCULARIZATION	BONE MARROW	SUM
SCORING GROUP	[0;2]	[0;3]	[-3;0]	[0;3]	[0;3]	[0;3]	[0;1]	[-3;15]
BAG								
average	2.0	2.8	-0.4	2.8	0.2	2.4	1.0	10.8
median	2.0	3.0	0.0	3.0	0.0	3.0	1.0	12.0
sd	0.0	0.4	0.5	0.4	0.4	0.9	0.0	1.8
ALG								
average	0.2	0.8	-3.0	3.0	0.0	2.3	0.0	3.3
median	0.0	1.0	-3.0	3.0	0.0	2.0	0.0	3.0
sd	0.4	0.8	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	1.0
TCP								
average	2.0	2.3	-3.0	3.0	0.3	3.0	0.6	8.1
median	2.0	2.0	-3.0	3.0	0.0	3.0	1.0	9.0
sd	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	1.1
MDM								
average	1.3	1.3	-2.7	3.0	0.3	3.0	0.3	6.7
median	1.0	1.0	-3.0	3.0	0.0	3.0	0.0	7.0
sd	0.6	0.6	0.6	0.0	0.6	0.0	0.6	1.5
BA								
average	0.7	1.3	-3.0	3.0	0.0	3.0	0.2	5.2
median	0.5	1.5	-3.0	3.0	0.0	3.0	0.0	5.0
sd	0.8	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	1.3
BT								
average	1.6	3.0	-3.0	3.0	0.0	1.0	0.8	6.4
median	2.0	3.0	-3.0	3.0	0.0	1.0	1.0	7.0
sd	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.4	2.2
BM								
average	1.2	1.8	-3.0	3.0	0.0	3.0	0.5	6.5
median	1.0	1.5	-3.0	3.0	0.0	3.0	0.5	5.5
sd	0.8	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	2.0

Abbreviations: ALG: alginate; BA: BMP+ALG; BAG: bone autograft; BM: BMP+MDM; BMP: bone morphogenetic protein; BT: BMP+TCP; MDM: acellular dermal matrix; sd: standard deviation; TCP: calcium phosphate.

After summing the histological criteria, there has been difference among groups ($P=0.000275$). BAG has obtained the best result, 10.8 points, and ALG the worst, 3.3 points. In more detail, both groups with ALG (ALG and BA) have presented the worst punctuation. What draws attention is the fact that BT group

(6.4 points) has stand back its own control group, TCP (8.1 points), after final sum of criteria. This has been clarified after separated analysis of criteria.

Cortical fusion criterion has showed statistical difference among groups ($P=0.000846$). This time, TCP group has reached the same punctuation as BAG (2 points), while BT group, has come soon after them (1.6 points), a non-significant difference ($P=0.301$). The groups ALG and BA have had the worst scoring (0.2 and 0.7 points respectively). MDM groups (MDM alone and BM: 1.3 and 1.2 points respectively) have remained in an intermediate position, demonstrating advantage in using such matrix, when compared to ALG. In this case, bone matrices have been superior to others, independently of BMP association.

The criterion new bone formation (or new bone trabeculae formation) has also demonstrated statistical difference among groups ($P=0.00835$). The groups containing bone matrices (BT, BAG, and TCP) have got the best scores, with BT in first place (3 points). BT group has equated BAG ($P=0.317$). There has been significance between BT and TCP (3.0 vs. 2.3 points, $P=0.018$), privileging BMP association. After that, BMP groups, combining with non-bone matrices – BM and BA – have remained in an intermediate situation (1.8 and 1.3 points respectively), together with MDM group (1.3 points). ALG has stand in the last position with 0.8 points.

The criterion neovascularization has also presented significant differences among groups. The groups BM, BA, TCP, and MDM have obtained the same maximal score, 3 points. The intermediate positions have been got by AEN and ALG (2.4 and 2.3 points respectively), and last position has been occupied with BT, with 1 point.

The criterion bone marrow formation has also presented significant difference among groups ($P=0.008317$). BAG group has led the punctuation with 1 point (bone marrow formation in all the cases), followed by BT (0.8 points) and TCP (0.6 points) ($P=0.241$). As from BM (0.5 points), differences have become significant, when compared to AEN ($P=0.004689$). The weaker groups have been BM (0.5 points), MDM (0.3 points), BA (0.2 points, and finally ALG, which presented no case of marrow formation.

In all groups, cellular concentration and colonization was intense in reconstructed area. There has been no difference among groups ($P=0.359$). Yet, there has been no difference as for the presence of osteoclasts in such area ($P=0.315$).

At last, the criterion presence of unabsorbed matrix has been led by BAG. In this case, BAG has got the best scoring (-0.4 points), which was significant ($P=0.00000961$).

DISCUSSION

Bone regeneration has occurred in all of the studied groups, as evaluated by a histological scale. In the opening of reconstructed area, all of the failures have been fulfilled by some material, either fibrosis or bone.

It has draw attention of pathologists for the fact that BMP-2 groups have showed mature bone. Besides, inflammatory activity had been decreased. It denotes the ability of such molecule to accelerate bone regeneration. This diagnosis has been objective by the time of histological evaluation, but has not been measured, once it did not belong to the initial design of this study. Ideally, a future research, comparing bone changings weekly, could demonstrate BMP-2 properties in detail. Bone healing acceleration has already been evidenced in a previous study of ours,²⁵ in which an association between freeze-dried bone and mesenchymal stem cells has been compared to the matrix alone. In the group with cells, there has been a decrease in inflammatory phase duration. So, it would be possible to hypothesize than either stem cells or BMP-2 are healing accelerators, but such theory needs further research.

Fusion of new-formed trabeculae, at least at one side of the healing border, has occurred in groups BAG, TCP, and those with BMP-2. Fusion represents the property of osteointegration in a graft and this has been demonstrated in these groups.³ Such findings represent promising alternatives, especially BT combination. A recent review about BMP-2 has argued that there are no orthopaedic studies demonstrating that BMP-2 alone overcomes BAG containing cancellous bone.³⁹

BMP-2 and MDM have significantly stimulated neovascularization in bone failure. During the evaluation of this criterion, groups BM and BA have been upgraded, what can mean an increase in regenerative activity, but not necessarily a bone healing. BT group was the least scored, but bone formation was advanced, what may represent a faster bone regeneration and maturation. Nevertheless, our study design was not made to such evaluation.

Other groups, containing either BMP-2 or MDM, have overcome BAG group in the neovascularization criterion. This should be studied in other associations, especially with bone-like matrices. Perhaps, combining TCP, BMP-2, and MDM could produce a greater regeneration than such components alone.

The association between TCP and BMP-2 has conferred a satisfactory punctuation in histological analysis, keeping this group (BT) among the four better in scale final sum and also in new bone formation score. BT group has presented the lowest neovascularization score. However, the pathologists' analysis has evidenced that bone was in a later stage of regeneration, with a more mature bone. This could justify such findings. Jang et al. (2012)⁴¹ have recently published a study in which reconstruction significantly improves by combining BMP-2, TCP, and hydroxyapatite (in a proportion 80/20 of TCP/hydroxyapatite), when compared to their control groups. BMP-2 concentrations were higher than ours, ranging from .025 to .2 mg/ml. However, the authors have not seen statistical differences in such concentration effects.

The capacity of TCP groups – either combined or not to BMP-2 – is notorious in producing bone marrow in regenerative area (Figures 9 through 11). Yet, groups that contained MDM (either combined or not to BMP-2) were

able to generate bone marrow after five weeks, despite the fact of been devoid of a bone matrix. In fact, BM group is an innovative association showed in this study, and its results are promising. MDM offer a structure that allows for both cell migration and neovascularization.^{42,43}

TCP interaction with progenitor cells seems positive in some publications. TCP has a favourable tridimensional architecture, as well as the diameter of its pores. It is commercially available as blocks or granules. There are several papers combining TCP to GF, with positive and negative results (Ozdemir, 2012; Ozdemir e Okte, 2012).^{40,44} Afifi et al. (2010)⁴⁵ have demonstrated that TCP alone has a non-negligible tax of complications in cranioplasties, especially when inserted in previously irradiated areas, or for those in contact with paranasal sinuses. However, it is an intensively studied biomaterial with many possibilities of therapeutic indications. Recently, Inzana et al. (2014)⁴⁶ made an experimental 9-week study, in which they have showed bone healing optimization by introducing TCP scaffolds, manufactured in 3-D printers and combined to type-1 collagen.

Tridimensional architecture and porosity of a bone matrix are considered fundamental characteristics for its regenerative ability.^{1,32,47} It may be seen in BAG and TCP groups, which have maintained a high score. Nevertheless, BMP-2 has secured bone formation and neovascularization, even when combined to scaffolds without bone features, as MDM and ALG. This finding denotes the great regenerative capability of BMP-2, as well as the possibility of associating it with malleable scaffolds for irregular failures. This way, we could obtain a versatile tool for reconstruction.

The introduction of regenerative cells in bone reconstruction is still a paradigm, but it may be discussed.⁴⁸ Our outcomes demonstrate that all the techniques have been able to conduct cells and tissue into receptor area (osteoconduction). However, there has been significant bone formation in groups BT and TCP, despite no regenerative cells were inserted. These group findings are probably comparable to those studies that employed cell cultures.²⁵ Such concern should be the base for future researches.

MDM have been increasingly used in reconstructive surgery. They may be employed, e.g., for covering joint areas with scar retractions, to increase facial aesthetics after burns, and to cover exposed tendons. In total-thick skin wounds, dermal reconstruction is fundamental for good aesthetical and functional outcomes. Dermal matrix or bone substitutes are manufactured with components of extracellular matrix: collagen and glycosaminoglycanes or hyaluronic acid.⁴³ Some matrices may receive a skin graft over it at the same time of implantation, other do not. It depends on their porosity and thickness. Thin matrices allow for transit of blood and nutrients into the graft, while the thick ones need vascular invasion before been ready to become a graft receptor layer. Combining MDM and bone matrices works better than the first alone.³² Meantime, its use in bone failures is not well studied. Furthermore, MDM are susceptible to fast degradation in presence of bacterial or fungal contamination.^{42,49} Its usage alone must be made only in low contaminated areas, but it is unknown if association to either GF or cell cultures increases resistance to contamination of even infection.

Incidence of infection in reconstruction areas was higher with MDM alone. This find represents the weakness of this material when not associated with other substances or in inadequate conditions. On the other hand, its

association with BMP-2 (BM group) has reduced infection rate from 57% (4/7 cases) to zero, a new and innovative finding. It's likely that neovascularization promoted by BMP-2 may improve infection resistance, when comparing to MDM isolated. The review of Aspenberg (2013)³⁹ mentions clinical trials where there has been less osteosynthesis in patients who have undergone BMP-2 treatment, corroborating to this data.

Besides, one of the greatest outcomes of this study was significant bone regeneration with BMP-2 and MDM association. This find has not often been found in medical literature, and may represent a great opportunity for either new experimental or clinical projects. As we have said before, combining BMP-2, TCP, and a covering of MDM may create "supergrafts".

BAG had the best result in the criterion presence of matrix. Meantime, such criteria may be criticized because we employed very different matrices and carriers. Still, BMP-2 concentration may have been relatively low, not accelerating healing to point of promoting a great resorption in some groups.⁴¹

Histological scale used in this study has been divided in order to increase precision. Although sum of criteria has kept BAG as the best scored group, separated analysis has showed several positive aspects in other groups.

The outcomes found and doubts aroused in this study take us to the following perspectives for new projects:

- BMP in different concentrations.
- MDM combined to tridimensional bone matrices.
- Cells in diverse stages of differentiation.
- Other associations among matrices, molecules, and cells.
- Associations between TE and gene therapy.
- Clinical trials in TE.
- Cost-benefit studies.
- BMP safety in oncological patients.
- Bioprinters in bone TE.

CONCLUSIONS

BMP-2 usage has improved parietal bone regeneration of cranial vault reconstructions in mice, according to histological evaluation, when combined with TCP, MDM or ALG. Results were better with association than with these materials alone. Also, scores have been similar to BAG in some histological criteria, although BAG still remains the gold standard treatment.

REFERENCES

1. Monaco E, Bionaz M, Hollister SJ, Wheeler MB. Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology* 2011 May;75(8):1381-99. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.020.
2. Miyake H, Ohta T, Tanaka H. A new technique for cranioplasty with L-shaped titanium plates and combined hydroxyapatite and tricalcium phosphate (Cerattice). *Neurosurg* 2000 Feb;46(2):414-8. PubMed PMID: 10690731.
3. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2014 Mar;9(18):1749-99. doi: 10.1186/1749-799X-9-18.
4. Arias-Gallo J, Chamorro-Pons M, Avedaño C, Giménez-Gallego G. Influence of acidic fibroblast growth factor on bone regeneration in experimental cranial defects using Spongostan and Bio-Oss as protein carriers. *J Craniofac Surg* 2013 Sep;24(5):1507-14. doi: 10.1097/SCS.0b013e31828f2469.
5. Issack PS, DiCesare PE. Recent advances toward the clinical application of bone morphogenetic proteins in bone and cartilage repair. *Am J Orthop* 2003 Sep;32(9):429-36. PubMed PMID: 14560824.
6. Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A, Fornasari PM. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfus Apher Sci* 2004 Apr;30(2):169-74. PubMed PMID: 15062758.
7. Brodie JC, Goldie E, Connel G, Merry J, Grant MH. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. *J Biomed Mater Res* 2005 Jun;73(4):409-21. PubMed PMID 15892144.
8. Thesleff T, Lehtimäki K, Niskakangas T, Mannerström B, Miettinen S, Suuronen R, Öhman J. Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: a novel method for cranial reconstruction. *Neurosurg* 2011 Jun;68(6):1535-40. doi: 10.1227/NEU.0b013e31820ee24e.
9. Chiarello E, Cadossi M, Tedesco G, Capra P, Calamelli C, Shehu A, Giannini S. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. *Aging Clin Exp Res* 2013 Oct;25(Suppl.1):S101-3. doi: 10.1007/s40520-013-0088-8.
10. Andersen JR, Detlie T, Griffiths HJ. The radiology of bone allografts. *Radiol Clin North Am* 1995 Mar;33(2):391-400. PubMed PMID: 7871175.
11. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res* 1999 Mar; 360:71-86. PubMed PMID: 10101312.
12. Volpon JB, Costa RMP. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. *Rev Bras Ortop* 2000;35(6):219-24.
13. Rocque BG, Amancherla K, Lew SM, LAM S. Outcomes of cranioplasty following decompressive craniectomy in the pediatric population. *J Neurosurg Pediatr* 2013 Aug;12(2):120-5. doi: 10.3171/2013.4.PEDS12605.
14. Mackenzie DJ, Sipe R, Buck D, Burgess W, Hollinger J. Recombinant human acidic fibroblast growth factor and fibrin carrier regenerates bone. *Plast Reconstr Surg* 2001 Apr;107(4):989-6. PubMed PMID: 11252093.

15. Oliveira ACP, Collares MVM, Galia CR, Edelweiss MI, Pinto RDA, Knebel L. Comparação entre enxerto ósseo autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em modelo experimental de cranioplastia. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac* 2007;10(4):140-6.
16. Portinho CP, Collares MVM, Silva FH, Nardi NB, Pinto RDA, Siqueira E, Morellato G, Sumino K. Reconstrução de calota craniana com células-tronco mesenquimais indiferenciadas: estudo experimental. *Rev Bras Cir Plast* 2006;21(3):161-5.
17. Orsi VV, Collares MVM, Nardi NB, Pinto RDA, Meirelles LS, Meurer L, Pilla C, Portinho CP, Riboldi M, Auer TB. Osso liofilizado bovino não-desmineralizado com células-tronco mesenquimais para engenharia tecidual: estudo experimental em sítio heterotópico. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac* 2007;10(4):133-9.
18. Moshaverinia A, Ansari S, Chen, Xu X, Akiyama K, Snead ML, Zadeh HH, Shi S. Co-encapsulation of anti-BMP2 monoclonal antibody and mesenchymal stem cells in alginate microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2013 Sep;34(28):6572-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.048.
19. Poldervaart MT, Wang H, van der Stok J, Weinans H, Leeuwenburgh SC, Oner FC, Dhert WJ, Alblas J. Sustained release of BMP-2 in bioprinted alginate for osteogenicity in mice and rats. *PLoS One* 2013 Aug; 8(8): e72610. doi: 10.1371/journal.pone.0072610
20. Xu XL, Lou J, Tang T, Ng KW, Zhang J, Yu C, Dai K. Evaluation of different scaffolds for BMP-2 genetic orthopedic tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005 Nov; 75(2): 289-303. PubMed PMID: 16025445.
21. Galateanu B, Dimonie D, Vasile, Nae S, Cimpean A, Costache M. Layer-shaped alginate hydrogels enhance the biological performance of human adipose-derived stem cells. *BMC Biotechnol* 2012 Jun;12(35):1-14. doi: 10.1186/1472-6750-12-35.
22. Smidsrod O, Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* 1990 Mar; 8(3): 71-8. PubMed PMID: 1366500.
23. Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 2004 Aug;35(2):562-9. PubMed PMID: 15268909.
24. Pound JC, Green DW, Chaudhuri JB, Mann S, Roach HI, Oreffo RO. Strategies to promote chondrogenesis and osteogenesis from human bone marrow cells and articular chondrocytes encapsulated in polysaccharide templates. *Tissue Eng* 2006 Oct;12(10):2789-99. PubMed PMID: 17518648.
25. Portinho CP, Riboldi M, Pilla C, Collares MVM, Silva FH, Meirelles LS, Nardi NB, Pinto RDA. Fosfatase alcalina em enxertos ósseos contendo células-tronco. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac* 2007;10(3):97-100.
26. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 May;59(4-5):207-33. PubMed PMID: 17482309.
27. Padoin AV, Braga-Silva J, Martins P, Rezende K, Rezende AR, Grecchi B, Gehlen D, Machado DC. Sources of processed lipoaspirate cells:

- influence of donor site on cell concentration. *Plast Reconstr Surg* 2008 Aug;122(2):614-8. doi: 10.1097/PRS.0b013e31817d5476.
28. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater* 2009 Sep;21(32-33):3307-29. doi: 10.1002/adma.200802106.
 29. Carrodeguas RG, De Aza S. Alfa-tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater* 2011 Oct;7(10):3536-46. doi: 10.1016/j.actbio.2011.06.019.
 30. Nae S, Bordeianu I, Stancioiu AT, Antohi N. Human adipose-derived stem cells: definition, isolation, tissue-engineering applications. *Rom J Morphol Embryol* 2013;54(4):919-24. PubMed PMID: 24398986.
 31. Sommar P, Junker JP, Strandenes E, Ness C, Hansson T, Johnson H, Kratz G. Osteogenically-induced human dermal fibroblasts as a tool to regenerate bone. *J Plast Surg Hand Surg* 2013 Feb;47(1):8-13. doi: 10.3109/2000656X.2012.731411.
 32. Ge S, Zhao N, Wang L, Liu H, Yang P. Effects of hydroxyapatite nanostructure on channel surface of porcine acellular dermal matrix scaffold on cell viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Int J Nanomedicine* 2013 May;8:1887-95. doi: 10.2147/IJN.S44695.
 33. Ito A, Mase A, Tazikawa Y, Shinkai M, Honda H, Hata K, Ueda M, Kobayashi T. Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 2003;95(2):196-9. PubMed PMID: 16233392.
 34. Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, Penascino VM, Mooney MP, Jiang S, Rubin JP, Losee JE. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. *Ann Plast Surg* 2006 May;56(5):543-8. PubMed PMID: 16641633.
 35. Smith DM, Cooper GM, Afifi AM, Mooney MP, Cray J, Rubin JP, Marra KG, Losee JE. Regenerative surgery in cranioplasty revisited: the role of adipose-derived stem cells and BMP-2. *Plast Reconstr Surg* 2011 Nov;128(5):1053-60. doi: 10.1097/PRS.0b013e31822b65e4.
 36. López-Morales Y, Abarrategi A, Ramos V, Moreno-Vicente C, López-Durán L, López-Lacomba JL, Marco F. In vivo comparison of the effects of rhBMP-2 and rhBMP-4 in osteochondral tissue regeneration. *Eur Cell Mater* 2010 Dec;20:367-78. PubMed PMID: 21154243.
 37. Jain AP, Pundir S, Sharma A. Bone morphogenetic proteins: the anomalous molecules. *J Indian Soc Periodontol* 2013 Sep;17(5):583-6. PubMed PMID: 24174749.
 38. Owens P, Polikowsky H, Pickup MW, Gorska AE, Jovanovic B, Shaw AK, Novitskiy SV, Hong CC, Moses HL. Bone morphogenetic protein stimulate mammary fibroblasts to promote mammary carcinoma cell invasion. *Plos One* 2013 Jun;8(6):e67533. doi: 10.1371/journal.pone.0067533.
 39. Aspenberg P. Special review: accelerating fracture repair in humans: a reading of old experiments and recent clinical trial. *BoneKEy Rep* 2013 Jan;2:244. PubMed PMID: 24404375.
 40. Özdemir B, Kurtis B, Tüter G, Sengüven B, Tokman B, Pinar-Özdemir S, Demirel I, Özcan G. Double-application of platelet-rich plasma on bone

- healing in rabbits. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012 Jan;17(1):e171-7. PubMed PMID: 22157673.
41. Jang JW, Yun JH, Lee KI, Jang JW, Jung UW, Kim CS, Choi SH, Cho KS. Osteoinductive activity of biphasic calcium phosphate with different rhBMP-2 doses in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012 Apr; 113(4): 480-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.04.013.
 42. Pereira MJ, Capella MR, Goldberg P, Quaresma E, Araújo EJ, Souza JA, Azevedo M, Colombeli EM, Feijó RS, Souza VA Jr, Perdomo HAR. Uso de matrizes dérmicas no tratamento de queimaduras em crianças: análise de 11 casos. *Arq Catarin Med* 2012;34(1):38-46.
 43. Philandrianos C, Andrac-Meyer L, Mordon S, Feuerstein JM, Sabatier F, Veran J, Magalon G, Casanova D. Comparison of five dermal substitutes in full-thickness skin wound healing in a porcine model. *Burns* 2012 Sep; 38(6): 820-9. doi: 10.1016/j.burns.2012.02.008.
 44. Özdemir B, Okte E. Treatment of intrabony defects with beta-tricalcium phosphate alone and in combination with platelet-rich plasma. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012 May;100(4):976-83. doi: 10.1002/jbm.b.32660.
 45. Afifi AM, Gordon CR, Pryor LS, Sweeney W, Papay FA, Zins JE. Calcium phosphate cements in skull reconstruction: a meta-analysis. *Plast Reconstr Surg* 2010 Oct;126(4):1300-9. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181ead057.
 46. Inzana JA, Olvera D, Fuller SM, Kelly JP, Graeve OA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials* 2014 Apr;35(13): 4026-34. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.064.
 47. Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, Mamood J, Takita H. Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *Connect Tissue Res* 2002; 43(2-3): 529-34. PubMed PMID: 12489210.
 48. Schantz JT, Brandwood A, Huttmacher DW, Khor HL, Bittner K. Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymeric-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition modeling. *J Mater Sci Mater Med* 2005 Sep; 16(9): 807-19. PubMed PMID: 16167109.
 49. Simão TS, Pitol DN, Máximo FR, Mattar CA, Faiwichow L. Uso de matriz dérmica bovina no tratamento de contraturas pós-queimaduras de membros superiores. *Rev Bras Queimad* 2012;11(3):142-5.

Acknowledgements

The authors thank all the members of Animal Experimental Division – Research Center – Porto Alegre Clinics Hospital.

Corresponding Author:

Ciro Paz Portinho, MD, MS
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Cirurgia Plástica
Rua Ramiro Barcelos, 2350/600E
Bairro Santa Cecília – CEP 90035-003
Porto Alegre – RS
E-mail: cportinho@hotmail.com
F: (51) 9998-3979 / (51) 3359-8232

The authors declare no conflict of interests.

Most of this research has been funded by *Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos* (Incentive Fund for Research and Events) – FIPE, from *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*. BMP buying has been self-financed, once public procedures and deadlines could not be expected.

¹Research performed at: Animal Experimental Division – Research Center, Plastic Surgery Department, and Pathology Department, Porto Alegre Clinics Hospital – Brazil; and Laboratory of Biomateriais and Advanced Ceramics – Material Engineering Department – Federal University of Rio Grande do Sul – Brazil.

This research has been part of PhD degree thesis, Postgraduate Program in Surgical Sciences, Medical School, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. Tutor: Prof. Dr. Marcus Vinícius Martins Collares, MD, PhD.