ANGEL EDUARDO GARRIDO CISNEROS

**Estudo imuno-histoquímico da reparação óssea na calvaria
de ratos em defeitos preenchidos com xenoenxerto porcino ou
 β -fosfato tricálcico adicionados com Alendronato sódico ou
plasma rico em fibrina**

São Paulo

2018

ANGEL EDUARDO GARRIDO CISNEROS

**Estudo imuno-histoquímico da reparação óssea na calvaria de
ratos em defeitos preenchidos com xenoenxerto porcino ou β -fosfato
tricálcico adicionados com alendronato sódico ou plasma rico em
fibrina**

Versão Corregida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biomateriais e Biologia oral). para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Garrido Cisneros, Angel Eduardo.

Estudo imuno-histoquímico da reparação óssea na calvaria de ratos em defeitos preenchidos com xenoenxerto porcino ou β -fosfato tricálcico adicionados com alendronato sódico ou plasma rico em fibrina / Angel Eduardo Garrido Cisneros; orientador Victor Elias Arana-Chavez -- São Paulo, 2018.

119 p.: fig.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biomateriais oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão Corregida

1. Regeneração óssea. 2. Substitutos ósseos. 3. Xenoenxertos.
4. Osteopontina. 5. Plasma rico em fibrina. I. Arana-Chavez, Victor Elias. II. Título.

Garrido E. Estudo imuno-histoquímico da reparação óssea na calvaria de ratos em defeitos preenchidos com xenoenxerto porcino ou β -fosfato tricálcico adicionados com alendronato sódico ou plasma rico em fibrina. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 12/12/2018

Banca Examinadora

Profa. Dra. Márcia Martins Márquez

Instituição: FOU SP. Julgamento: Aprovado.

Prof. Dr. Rafael Yagüe Ballester

Instituição: FOU SP. Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Lorraine Braga

Instituição: Universidade de Berlin. Julgamento: Aprovado

À minha esposa, pais e filhos amados, pelo meu imenso orgulho de fazer
parte dessa família abençoada...

AGRADECIMENTOS

Obrigado meu Deus, ficando ao meu lado em todos os momentos, me dando saúde e força para seguir em frente.

À minha esposa Paola pelo suporte na minha ausência e seu apoio constante para meu esforço; e meus filhos Pablo, Pamela, Gabriel e Camila: Vocês são a minha razão de tudo e sem vocês nada disso seria possível e nenhum esforço teria significação.

Aos meus pais Maruja e Eduardo, e a meus irmãos pelo apoio e amor incondicional durante toda minha caminhada até aqui, sempre me dando carinho e apoio.

Ao meu orientador Victor Arana Chavez, pelos valiosos ensinamentos durante estes dois anos. Obrigado pelo apoio total, paciência e pelos conselhos que vou levar comigo durante toda a vida.

À Profa. Dra. Marcia Martins Marques, pelo seu apoio, mais por tudo o que ela fez para que o DINTER seja exitoso. Obrigado para sempre,

Aos professores do DINTER e da FOUSP, por acreditar neste projeto. Vocês mudaram nossa faculdade lá no Equador. Espero que sua semente de fruto em breve.

A Juan Carlos pela ajuda desinteressada na metodologia do trabalho.

À Elis e ao Douglas pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa, sua ajuda sempre oportuna foi indispensável para o nosso trabalho.

À minha colega e amiga Blanca pelo apoio, em todas as frentes, e pelo trabalho para que o DINTER de certo.

Aos meus colegas do departamento de Biologia Oral pela ajuda quando se precisar.

À Thais pela ajuda final para que meu trabalho de certo, pelo seu apoio e carinho na caminhada na USP, lembrarei sempre de você.

À Geisianne Marcondes, pela ajuda na calibração cirúrgica e seu suporte com os animais.

À Rosa e Elidamar, pelo seu silencioso e eficiente apoio todos esses anos.

À Universidade Central do Equador pela oportunidade de me superar e cumprir um sonho.

*“O Cientista encontra sua recompensa no que Henri Poincaré
chama o prazer da compreensão, mas não nas possibilidades da
aplicação que qualquer descoberta possa implicar”*

(Albert Einstein)

RESUMO

Garrido Cisneros A.E. Estudo imuno-histoquímico da reparação óssea na calvaria de ratos em defeitos preenchidos com xenoenxerto porcino ou β -fosfato tricálcico adicionados com alendronato sódico ou plasma rico em fibrina. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Versão Corregida.

Em procedimentos de regeneração óssea guiada (ROG) as membranas de colágeno são os materiais mais utilizados como barreira; porém, sua tendência ao colapso faz indispensável a utilização de materiais de suporte. Para este propósito, os xenoenxertos são substitutos ósseos considerados padrão-ouro, embora apresentem um período longo de reabsorção que impede grande formação do osso. Em contrapartida o β -fosfato tricálcico (β -TCP) permite boa formação do osso, mas é reabsorvido rapidamente e fracassa quando precisa dar suporte à membrana. O alendronato, um bisfosfonato nitrogenado, é uma droga antirreabsortiva para o tratamento da osteoporose e outras doenças ósseas porque inibe a função dos osteoclastos. O plasma rico em fibrina (PRF) é um concentrado de fibrina sem adição de químicos que consegue estimular processos de cicatrização pelos fatores que fazem parte de sua composição. Neste estudo qualitativo de ROG em defeitos de 5 mm no osso parietal de ratos foi avaliado: 1) o efeito na formação óssea da administração local de 1g/ml de alendronato sódico adicionado a xenoenxerto porcino e a β -TCP; 2) a adição local de alendronato e PRF a β -TCP na possibilidade de diminuir a rápida reabsorção do material e impedir o colapso da membrana. Foram usados 100 ratos adultos Wistar distribuídos em 5 grupos (n=20): Xenoenxerto controle (XE-C); xenoenxerto adicionado com alendronato (XE-AL); β -TCP controle (TCP-C); β -TCP adicionado com alendronato (TCP-AL); e, β -TCP adicionado com PRF (TCP-F). Em todos os grupos o enxerto foi coberto com membrana. Dois tempos de estudo de quatro e oito semanas foram considerados para cada grupo (n=10). Ao final de cada tempo, os animais foram sacrificados e as amostras foram fixadas, descalcificadas e processadas para seu estudo em microscopia de luz por meio de análise histológica, histoquímica TRAP e imuno-histoquímica para osteopontina (OPN). Os resultados mostraram maior formação do osso tanto para xenoenxerto como para β -TCP quando foram adicionados com alendronato local, em ambos tempos de estudo. Nos grupos do β -TCP a adição de

alendronato local permitiu diminuir a reabsorção dos grânulos, melhorando o suporte à membrana ao final dos tempos de estudo; no entanto, no grupo do PRF a reabsorção foi maior e teve pouca formação de osso, provocando colapso da membrana. Adicionalmente, regiões de osso primário subjacentes à membrana de colágeno foram observadas em todos os grupos.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Substituto ósseo. B-TCP. Xenoenxerto porcino. Osteopontina. Plasma Rico em Fibrina

ABSTRACT

Garrido Cisneros A.E. Immunohistochemical study of bone repair in rat calvaria in defects filled with porcine xenograft or tricalcium phosphate added with alendronate sodium or fibrin-rich plasma. Thesis presented to the School of Dentistry of the University of São Paulo to obtain the title of PhD in Sciences. Original version.

Collagen membranes are the most used materials as a barrier in guided bone regeneration (GBR) procedures; however, its tendency to collapse makes indispensable the use of support materials. For this purpose, xenografts, which are bone substitutes, although they have a long period of resorption that prevents large bone formation, are still considered the gold standard support material. In contrast, tricalcium β -phosphate (β -TCP) allows good bone formation, but is rapidly reabsorbed and fails when it needs to support the membrane. Alendronate, a nitrogenated bisphosphonate, is an anti-resorptive drug for treatment of osteoporosis and other bone diseases because it inhibits the function of osteoclasts. Fibrin-rich plasma (FRP) is a fibrin concentrate with no added chemicals that can stimulate healing processes by the factors that are part of its composition. In this qualitative study of ROG in 5 mm defects in the rat parietal bone, was evaluated: 1) the effect on bone formation of local administration of 1g / ml sodium alendronate added to porcine xenograft and β -TCP; 2) the local addition of alendronate and PRF to β -TCP in the possibility of diminishing the rapid reabsorption of the material and preventing the collapse of the membrane. A 100 adult Wistar rats distributed in 5 groups was used (n = 20): Xenograft control (XE-C); xenograft added with alendronate (XE-AL); β -TCP control (TCP-C); β -TCP added with alendronate (TCP-AL); and, β -TCP added with PRF (TCP-F). In all groups the graft was covered with membrane. Two study times of four and eight weeks were considered for each group (n = 10). At the end of each time, the animals were sacrificed and the samples were fixed, decalcified and processed for light microscopy by histological analysis, TRAP histochemistry and immunohistochemistry for osteopontin (OPN). Results showed higher bone formation for both xenograft and β -TCP when added with local alendronate at both study times. In the β -TCP groups the addition of local alendronate allowed to decrease grain resorption, improving membrane support at the end of the study times; however, in

the PRF group the resorption was greater and had little bone formation, causing membrane collapse. In addition, primary bone formed in the underlying collagen membrane were observed in all groups.

Key words: Bone regeneration. Bone substitute. B-TCP. Porcine xenograft. Osteopontin. Platelet rich fibrin

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4-1 – Protocolo de obtenção do PRF: A: aquecimento da cauda. B e C: punção e coleta do sangue 0,5 ml. D e E: centrifugação, 12 min a 2.900 rpm 61
- Figura 4-2 – Procedimento cirúrgico 63
- Figura 4-3 – Preparação do enxerto com alendronato (A, B, C) e PRF (F até I). É importante recalcar a diferença na consistência entre XEP e β -TCP (DE)..... 64
- Figura 4-4 – Protocolo padronizado do corte das amostras 66
- Figura 5-1 – Blocos de osso parietal após terem sido removidos da calvária e antes de sua fixação, A: Bloco da amostra de β -TCP-C 30 dias, observe-se o espalhamento do material (setas amarelas) fora da membrana (M). B: Bloco da amostra de XEP-C sem espalhamento. C: integridade da membrana (M) em todos os tempos cirúrgicos e todos os grupos. A membrana se encontra bem delimitada embaixo do periósteo (asterisco) e a pele..... 70
- Figura 5-2 – XE-C 30: A: as setas mostram as bordas do defeito delimitando a área. O XEP ocupa o espaço com grânulos de tamanho heterogêneo entre os quais se observa tecido conjuntivo (TC). Osso primário (asteriscos) é observado nas bordas, em pouca quantidade. A membrana (M) delimita toda a área superior. B: é possível distinguir os grânulos rodeados por tecido conjuntivo denso com alguns osteoblastos (OB) aderidos à superfície do xenoenxerto. C: pode-se apreciar osso primário (asteriscos) aderido às bordas do defeito. D: a marcação para TRAP apresentou poucas células clásticas (OTC) aderidas aos grânulos. E: o tecido conjuntivo que envolve os grânulos é mais denso e organizado que aquele que se encontra entre os grânulos, como é evidenciado, em azul, pelo tricrômico de Mallory. A: 40X; B: 200X; C: 100X; D: 400X; E:200 X..... 72
- Figura 5-3 – XE-AL 30. A: observa-se grânulos de xenoenxerto (XE) de tamanho heterogêneo distribuídos uniformemente entre as bordas do osso (setas) que mostram pouca formação do osso primário, os grânulos rodeados por tecido conjuntivo (TC) com áreas de condensação (TCd). A membrana (M) apresenta zonas isoladas de condensação de fibras na face inferior. B: mostra-se a borda do defeito e alguns grânulos de XE com formação de osso primário (asterisco) na sua superfície e tecido conjuntivo fibroso (TC) entre estes. C: observa-se grânulos de XE

revestidos por tecido conjuntivo denso com presença de osteoblastos (OB). Na parte superior a membrana apresenta condensação de fibras, sem relação aos grânulos de enxerto. D: marcação positiva de poucos osteoclastos para TRAP, se observam dois osteoclastos (OTC) com distinta marcação. E: tricrômico de Mallory permite evidenciar, em azul, o tecido conectivo e sua diferente organização, sendo mais denso no osso primário (asterisco). A: 40X, B: 100X, C: 200X, D: 400X, E: 200X..
.....74

Figura 5-4 – TCP-C 30. A: entre as bordas do defeito (setas), pequenos grânulos de β -TCP estão rodeados por osso primário (asterisco) ou por tecido conjuntivo denso (TCd). B: observa-se pontes de osso (setas vermelhas) entre alguns grânulos. O defeito está coberto pela membrana (M), no entanto existe depressão respeito às bordas. C: β -TCP mostra na sua superfície condensação de células (osteoblastos) formando matriz de osso primário. D: A histoquímica para TRAP permite observar uma grande quantidade de OTC rodeando os grânulos. E: em tricrômico de Mallory mostra-se, em azul, matriz do osso primário (asterisco) e fibras colágenas do tecido conjuntivo fibroso. A: 40X, B: 100X, C: 400X, D: 400x, E:200X.76

Figura 5-5 – TCP-AL 30. A: Entre as setas que limitam o defeito pode-se observar distribuídos uniformemente no defeito grânulos de β -TCP (TCP) com formação de osso primário (asterisco). A membrana (M) cobre o defeito completamente. B: Osso primário (asterisco) se forma com preferência sobre os grânulos da zona inferior do defeito, próximos à dura-máter. C: algumas pontes de osso primário se formam entre os grânulos (asteriscos). Tecido conjuntivo denso com osteoblastos (TCd) rodea o β -TCP. D: TRAP permite observar osteoclastos (OTC) na superfície dos grânulos. E: No tricrômico de Mallory observou-se, em azul, matriz do osso primário que rodeia os grânulos (TCd) de β -TCP, bem como as fibras colágenas do tecido conjuntivo (TC) entre estes. A: 40X, B: 10X, C: 200X, D: 400X, E: 20X.....78

Figura 5-6 – TCP-F 30. A: observa-se a área delimitada pelas bordas (setas) com grânulos pequenos de β -TCP (TCP), distribuídos irregularmente. O tecido conjuntivo (TC) predomina e não se observa formação de osteóide em torno dos grânulos. A membrana (M) cobre toda a área, mas se encontra deprimida, até a metade do comprimento vertical do defeito. B: formação de osso primário (asterisco) está localizada nas bordas do defeito (setas). C: Algumas partículas de β -TCP se encontram rodeadas por células clásticas, o que é confirmado em D: marcação intensa de células clásticas na coloração TRAP, rodeando os grânulos. E: em azul observa-se que o tecido conjuntivo não se condensa em torno dos grânulos de enxerto. A: 40X, B: 100X, C: 400X, D: 400X, e: 200X.80

Figura 5-7 – XE-C 60. A: os grânulos de XEP (XE) se encontram uniformemente distribuídos no defeito, envoltos em tecido conjuntivo (TC) que apresenta grandes áreas de condensação (TCd). Observa-se osso primário (OP) em zonas pequenas, unido aos grânulos de XEP e nas bordas. A membrana (M) é mantida na área superior do defeito e pode apresentar zonas de condensação de tecido fibroso (TCd) e formação de osso primário. B: e C: formação de osso primário em contato com o XEP, no qual estão presentes osteócitos (OC) e uma camada de osteoblastos (OB) secretando matriz óssea. D: poucos osteoclastos TRAP-positivos aparecem aderidos ao enxerto. E: Em azul, com tricrômico de Mallory, evidencia-se como o tecido conjuntivo se condensa em torno dos grânulos de XEP. A: 40X, B: 100X, C: 200X, D: 400X, E: 20x. 82

Figura 5-8 – XE-AL 60. A: XE ocupa a maior parte do defeito, o tecido conjuntivo que rodeia os grânulos é mais denso (TCd) em torno de alguns grânulos, observa-se formação do osso primário (asterisco). B: Observa-se osso primário, e zonas de condensação do tecido conjuntivo. C: se pode observar formação de osso primário (asterisco) e áreas de maturação com presença de osteócitos (OC), pontes de osso entre os grânulos têm sido formados. D: na marcação para TRAP se encontrou positividade em poucas células, as quais estão aderidas à superfície dos grânulos do enxerto. E: em azul se observa a disposição característica do tecido conjuntivo em torno dos grânulos de XEP. A: 40X, B: 100X, C: 200X, D: 400X, E: 200X. 84

Figura 5-9 – TCP-C 60. A: o osso formado predomina no defeito, enquanto tecido conjuntivo (TC) está presente em pouca quantidade e permanece entre osso formado e a borda do defeito (lado direito). O osso formado é principalmente primário (asterisco) com zonas isoladas de osso secundário (OM). B: observa-se osso primário (asterisco) e osso maduro (OM). C: observa-se poucos grânulos de β -TCP, pode-se distinguir osteoblastos (OB) depositando matriz em torno dos grânulos e osteócitos (OC) dentro da matriz do osso maduro (OM). D: a marcação para TRAP de osteoclastos (OTC) participando do processo de remodelação do osso primário. E: no tricrômico de Mallory, em azul observa-se uma camada de osso maduro depositado sobre o osso primário (*). A: 40X, B: 100X, C: 200X, D: 400X, E: 200X. 86

Figura 5-10 – TCP-AL 60. A: pode-se observar osso primário (asterisco) ocupando a maior parte do defeito, bem como grânulos de β -TCP sem reabsorver e osso maduro (OM). A membrana mostra osso primário, com espaços medulares em formação. B: pontes de osso formando-se entre osso da membrana e osso que rodeia os grânulos. C: formação de osso maduro, no qual se observam lamelas e osteócitos. D: Pelo TRAP é possível observar osteoclastos no osso da membrana e junto a alguns grânulos que ainda não se reabsorveram. E: em azul pelo tricrômico de Mallory mostra-se tecido conjuntivo organizado no osso primário (asterisco) e

osso maduro (OM), bem como no tecido conjuntivo (TC) entre os grânulos. A: 40X, B: 100X, C: 400X, D: 400X, E: 200X.88

Figura 5-11 – β -TCP F 60. A: o tecido conjuntivo (TC) predomina no defeito. Observam-se poucas partículas de β -TCP (TCP) rodeadas por fibras colágenas e, eventualmente, por osso. B: osso primário (asterisco) e osso maduro (OM) formados na face inferior da membrana. Tecido conjuntivo (TC) é o tecido predominante neste grupo. C: um grânulo de β -TCP rodeado de fibras colágenas permite observar o padrão de regeneração de este grupo, no qual foi pobre a formação de osso. Se observam fibras colágenas que envolvem o grânulo. D: osteoclastos (OTC) aderidos à superfície de um grânulo e no osso formado em processo de remodelação. E: em azul, pelo tricrômico de Mallory, mostra-se osso primário formado na membrana e em torno de dois grânulos de TCP. A: 40x, B: 200X, C: 400X, D: 200X, E: 200X.....90

Figura 5-12 – OPN 30 DIAS: As fotomicrografias permitem observar marcação de OPN (setas) nos grupos do estudo. A: marcação positiva na superfície do grânulo de XEP e osteóide. B: marcação de OPN na superfície do grânulo como interface e no osso primário formado. C: OPN na interface entre os grânulos de β -TCP e o osso primário. D: OPN marcando a interface entre osteóide (OS) e a superfície do grânulo de β -TCP. E: marcação de OPN na superfície de osso primário formado ao redor de um grânulo de β -TCP.....92

Figura 5-13 – OPN 60 DIAS: nos grupos de XE se observa formação do osso primário (OP). A OPN marca o contorno dos grânulos de enxerto como uma interfase cimentante. Nos grupos do β -TCP controle e AL se observa marcação em zonas de remodelação e em linhas de aposição do osso maduro. No grupo β -TCP-F observa-se marcação mínima em uma zona de remodelação no osso formado em relação à membrana. 94

Figura 5-14 – A: marcação positiva de OPN em regiões da membrana. B. condensação de fibras e células na face inferior da membrana (setas). C: remodelado do osso primário (OP) e formação do osso maduro (OS). D: pontes de osso entre o osso formado na membrana e o osso formado em torno dos grânulos de enxerto.96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Alendronato local
BFs	Bisfosfonatos
BMP	Siglas do inglês para Proteínas Morfogênicas do Osso
BSP	Siglas do inglês para Sialo Proteína Óssea
β-TCP	Siglas do inglês para Beta Fosfato Tricálcico
CEUA	Comité de Ética em Animais
DTC	Defeitos de Tamanho Crítico
et al.	e outros
ePTFE	Poli Tetra Fluoroetileno expandido
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GAGs	Glucosaminoglicanos
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-eosina
IM	Intramuscular
OPN	Osteopontina
pH	Potencial hidrogénio
PRF	Plasma rico em fibrina
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PTFE	Poli tetra flúor etileno
RANK	Siglas do inglês para Receptor ativador de fator nuclear kappa-β
RANKL	Siglas do inglês para Receptor ativador de fator kappa-β ligando
ROG	Regeneração Óssea Guiada
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
TRAP	Siglas do inglês para fosfatase ácida resistente ao tartarato
XEB	Xenoenxerto bovino
XEP	Xenoenxerto porcino

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Ca	Cálcio
g	gramas
ml*	Mililitro(s)
mm	Milímetros
M	Mol
P	Fosfato
pH	Potencial hidrogênio
Rpm	Revoluções por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1	TECIDO ÓSSEO	29
2.2	ROG.....	35
2.3	ENXERTOS ALOPLÁSTICOS: B -TCP	40
2.4	XENOENXERTO.....	43
2.5	BISFOSFONATOS: ALENDRONATO	46
2.6	PLASMA RICO EM FIBRINA.....	51
2.7	DEFEITOS NA CALVÁRIA DE RATOS	52
3	PROPOSIÇÃO	57
3.1	PROPOSIÇÃO GERAL	57
3.2	PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS	57
4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1	ANIMAIS	59
4.2	MÉTODOS	60
4.2.1	Protocolo Pré-Operatório	60
4.2.2	Protocolo Operatório.....	62
4.2.3	Cuidados Pós-Operatorios	65
4.2.4	Coleta de Amostras e Processamento Histológico	65
4.2.5	Análise Histológica	68
5	RESULTADOS	69
5.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA	69
5.2	ANALISE HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA TRAP	70
5.2.1	Grupos de 30 Dias.....	71
5.2.1.1	Xenoenxerto - Controle (XE-C 30)	71
5.2.1.2	Xenoenxerto - Alendronato Sódico (XE-AI 30)	73
5.2.1.3	β -TCP – Controle (TCP-C 30).....	75
5.2.1.4	β -TCP – Alendronato Sódico (TCP-AL 30).....	77
5.2.1.5	β -TCP – PRF (TCP-F 30)	79
5.2.2	Grupo 60 Días	81
5.2.2.1	Xenoenxerto – Controle (XE-C 60)	81

5.2.2.2	Xenoenxerto – Alendronato Sódico (XE-AL 60)	83
5.2.2.3	β -TCP – Controle (TCP-C 60)	85
5.2.2.4	β -TCP – Alendronato Sódico (TCP-AL 60)	87
5.2.2.5	β -TCP – PRF (TCP-F 60)	89
5.3	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA OPN	91
5.3.1	Grupo 30 Dias	91
5.3.2	Grupo 60 Dias	93
5.4	FORMACAO DO OSSO NA MEMBRANA	95
6	DISCUSSÃO	97
7	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXO A	117
	ANEXO B	119

1 INTRODUÇÃO

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) é na atualidade o procedimento mais usado e estudado para regeneração de defeitos ósseos, com significativa evidência de sucesso na regeneração do osso perdido (1). No conceito básico, a ROG procura uma área fechada por uma membrana em torno de um defeito ósseo como uma barreira que preserve o sangue, permitindo a ativação dos osteoblastos que formarão osso novo (2, 3). A aplicação de uma membrana é a chave principal do processo regenerativo porque exclui tecidos não osteogênicos (4).

Foi estabelecido cedo na técnica de ROG que defeitos ósseos grandes requerem materiais de enxerto ósseo granulado para auxiliar na manutenção do espaço e melhorar a formação do osso; estes materiais além de impedir o colapso da membrana têm sido utilizados para apoiar e fornecer uma rede para osteocondução permitindo que proteínas indutoras ósseas estimulem osseointegração (2). O enxerto ósseo autólogo tem sido considerado o enxerto ideal pelas propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas ao possuir todos os elementos do tecido ósseo, porém, o aumento da morbidade e do tempo cirúrgico, problemas de sensibilidade, a quantidade limitada e uma reabsorção imprevisível são complicações que promoveram o desenvolvimento de substitutos ósseos (5). Distintos substitutos ósseos de diferente procedência (alógeno, xenógeno e sintético) foram desenvolvidos na procura de substituir ao osso autólogo (1, 4).

A maioria dos xenoenxertos utilizados atualmente tem origem porcina e bovina, devido à sua semelhança com o osso humano na composição química e estrutura. O enxerto ósseo porcino é um material poroso, constituído predominantemente por fosfato de cálcio. Estes são fornecidos na forma granular e são produzidos pela remoção dos componentes orgânicos. A matriz mineral óssea inorgânica é biocompatível, possuindo estrutura porosa macro e microscópica interconectada que suporta a formação e o crescimento de tecido ósseo no local da implantação (6).

Os substitutos baseados em CaP possuem propriedades bioativas e osteocondutoras. O beta-fosfato tricálcico (β -TCP) é um material aloplástico

cerâmico que serve como um arcabouço para as células formadoras de osso enquanto proporciona um espaço no qual a formação óssea pode ocorrer. Porém, o β -TCP é caracterizado pela rápida reabsorção e substituição pelo tecido do hospedeiro; mas, a rápida reabsorção do fosfato tricálcico resulta na redução do volume formado (1, 7).

Os bisfosfonatos (BFs) são drogas antirreabsortivas amplamente utilizadas para a prevenção e tratamento de diversas doenças ósseas; os BFs nitrogenados são mais potentes que os não nitrogenados. O alendronato sódico é um BF nitrogenado que uma vez administrado se deposita nos cristais de hidroxiapatita da matriz mineralizada e é incorporado pelas células clásticas à medida que degradam a matriz acumulando-se intracelularmente, conseguindo assim a inibição da função dos osteoclastos (8). O efeito inibindo a reabsorção óssea não é o único efeito farmacológico, também é prevenida a apoptose de osteócitos e osteoblastos. Assim, a preservação da formação do osso por osteoblastos maduros e a manutenção do trabalho dos osteócitos abriu novas possibilidades terapêuticas para os bisfosfonatos (9).

Com base nestes critérios a aplicação local e sistêmica dos bisfosfonatos tem sido proposta na ROG. A adição do alendronato sobre substitutos ósseos cerâmicos foi capaz de exercer um efeito benéfico sobre os osteoblastos e inibiu a reabsorção por osteoclastos, *in vitro*. Há relatos de que os BFs em baixas concentrações estimulariam a proliferação e diferenciação de osteoblastos (10).

O plasma rico em fibrina (PRF) ou a fibrina rica em plaquetas, pertence a uma segunda geração de concentrados de plaquetas, com processamento simplificado e sem controle bioquímico do sangue (não contem anticoagulante ou outras substâncias). Entre as aplicações clínicas conhecidas do PRF se destacam a aceleração na cicatrização tecidual devido ao desenvolvimento de neovascularização efetiva, o fechamento acelerado da ferida com rápida remodelação do tecido cicatricial e a quase ausência total de eventos infecciosos (11). O PRF adicionado com HA / β -TCP tem mostrado um efeito positivo em formação óssea em defeitos de calvária (12).

O presente estudo em defeitos de 5 mm na calvaria de ratos avaliou por histologia, histoquímica para TRAP e imuno-histoquímica para OPN o efeito da adição local do alendronato sódico ao XE e β -TCP na sua capacidade de estimular a formação do osso; além disso, foi avaliada a adição local de alendronato sódico e PRF ao β -TCP na procura de diminuir a rápida reabsorção dos grânulos e melhorar o suporte à membrana. De acordo com estudos prévios foram considerados tempos de 4 e 8 semanas depois da colocação do biomaterial para a avaliação da ROG nos defeitos críticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O entendimento dos aspectos relacionados com a Regeneração Óssea Guiada (ROG) é fundamental para a compreensão do presente estudo, assim, será feita uma breve revisão da literatura de diferentes tópicos envolvidos no processo regenerativo.

2.1 TECIDO ÓSSEO

Os ossos são órgãos que em conjunto constituem o sistema esquelético; estão compostos por tecido ósseo, um tecido conectivo especializado caracterizado pela mineralização de sua matriz com cristais de hidroxiapatita (13). O osso é formado por uma série de eventos complexos rigorosamente coordenados por diferentes tipos de células ósseas interagindo entre si e com a matriz extracelular (14). Segundo Arana e Bradashia (2012), os componentes característicos do tecido ósseo são:

- Células: osteoblastos, osteócitos, células de revestimento e osteoclastos.
- Matriz óssea: fase mineral e fase orgânica.

Os osteoblastos são células formadoras de osso que se originam nas células mesenquimais (ou ectomesenquimais, na região craniofacial); quando ativos os osteoblastos são formadores da matriz do tecido ósseo, alguns ficam imersos na matriz e se transformam em osteócitos, os quais, interconectados por canalículos, mantem a capacidade de regular a homeostase do tecido; quando os osteoblastos não estão ativos adotam uma forma plana e se conhecem como células de revestimento, estes se pavimentam sobre a última camada de tecido produzido. Diferentemente, os osteoclastos têm sua origem na fusão de células da linhagem monocítica quando são estimuladas pelos fatores indutores a partir dos osteócitos e são os responsáveis pela reabsorção óssea (13).

O processo pelo qual a matriz do tecido ósseo se desenvolve é denominado ossificação ou osteogênese, pode ser de tipo endocondral ou, como a maioria dos ossos da região craniofacial, intramembranoso. Neste, uma matriz ectomesenquimática por estímulos de fatores indutores como Runx, Osterix e proteínas morfogênicas (BMPs) agrupa células indiferenciadas que são transformadas em osteoblastos, estes secretam vesículas da matriz junto a proteoglicanos e concentram íons cálcio que ingressam a traves de anexinas ao interior da vesícula onde também se liberam íons fosfato devido à ação da fosfatase alcalina. A união de íons de fosfato e cálcio da origem a cristais de hidroxiapatita, os quais pelo estímulo da osteopontina (OPN) e sialoproteína óssea (BSP) mineralizam o interior das fibras colágenas e os espaços interfibrilares formando globos de mineralização que crescem e se fundem com outros até mineralizar a matriz toda. Os osteoblastos continuam secretando matriz orgânica denominada osteóide, a mineralização da matriz avança gradualmente formando uma frente de mineralização. Alguns osteoblastos são recrutados e ficam no interior da matriz, cessam sua atividade secretora e se transformam em osteócitos, os quais por meio de prolongações mantém o contato com osteoblastos e outros osteócitos (13).

O osso formado inicialmente (osso primário) é desorganizado e apresenta fibras colágenas dispostas de maneira irregular, os espaços entre as fibras são numerosos e contém abundantes quantidades de proteínas não colágenas especialmente OPN e BSP (15). Posteriormente por meio de um processo de remodelação óssea o osso primário é substituído por um osso mais organizado e lamelar chamado osso secundário ou maduro (16).

Uma vez formado o osso secundário, a relação entre as diferentes células do tecido é mantida. A interação entre células formadoras de osso (osteoblastos), as reguladoras da homeostase óssea (osteócitos) e as responsáveis da reabsorção (osteoclastos), permite que a remodelação do tecido ósseo permaneça, mesmo após o término do crescimento e a modelagem do esqueleto (17).

Os osteoclastos são células multinucleadas formadas pela fusão de progenitores mononucleares da família dos monócitos / macrófagos; eles são a principal célula de reabsorção de osso desempenhando um papel central na regulação de sua massa, atuam em conjunto com osteoblastos e osteócitos. A

reabsorção óssea é um processo de várias etapas iniciado pela proliferação de precursores de osteoclastos imaturos, o comprometimento dessas células com o fenótipo dos osteoclastos, sua ativação e finalmente a degradação das fases orgânicas e inorgânicas do osso (18). Os componentes orgânicos, principalmente proteínas não colágenas da matriz liberados pelos osteoclastos também estão envolvidos na regulação local de outras células ósseas e no controle sistêmico da homeostase do organismo. O rompimento dessa malha regulatória causa doenças ósseas, que podem resultar em massa óssea reduzida ou aumentada, frequentemente associada à baixa qualidade óssea (19).

Os osteoclastos se polarizam para causar a reabsorção óssea extracelular e a liberação dos produtos da matriz óssea digerida na circulação. Ao lado de outros órgãos, incluindo rins, intestinos, glândulas tireoide e paratireoide, eles também afetam a calcemia e fosfatemia. Os osteoclastos são muito sensíveis aos estímulos pró-inflamatórios, têm estreita ligação com o sistema imunológico, contribuem para o nicho de células-tronco hematopoiéticas controlando a concentração local de cálcio e regulando o turnover de fatores essenciais para a mobilização de células-tronco hematopoiéticas. Finalmente, os osteoclastos são importantes reguladores da atividade dos osteoblastos e da angiogênese, tanto pela liberação de fatores armazenados na matriz óssea, como pela secreção de clastocinas que regulam a atividade das células vizinhas (20).

Os precursores de osteoclastos respondem a estímulos de diferentes fatores como interleucina 3 (IL3), fator estimulante de colônias da linhagem monocítica (M-CFS) e RANK-L, estes fatores produzem a proliferação de células tronco, as quais fundindo-se originam células multinucleadas chamadas osteoclastos. Em contato com osso se polarizam e formam uma face que se adere à matriz mineralizada chamada podossomo, em cuja periferia se produz o selamento com uma borda chamada zona clara ou zona de selamento dentro da qual a membrana forma dobras que determinam a formação da borda em escova ou pregueada em contato com a superfície a ser reabsorvida. A dissolução dos cristais de hidroxiapatita ocorre devido ao bombeamento de íons de hidrogênio que levam a uma queda do pH para 4 ou 5. Após a dissolução mineral os osteoclastos liberam uma série de enzimas proteolíticas (cisteína proteases, metaloproteinases, catepsinas e fosfatase ácida resistente ao tartarato (13).

Para regular a ativação da osteoclastogênese, células do estroma e osteoblastos secretam a osteoprotegerina (OPG), conhecida por ser um receptor “chamariz” solúvel que compete com o RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B) por RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand). De fato, é o equilíbrio entre a expressão do RANKL, e seu inibidor OPG, que determinam a quantidade de osso reabsorvido. O RANKL também é expressado em abundância por linfócitos T ativados. Essas células podem desencadear diretamente a osteoclastogênese e provavelmente são fundamentais para a degeneração das cartilagens das articulações na artrite reumatoide (18).

Os osteoblastos se originam de progenitores mesenquimais que também dão origem a outras células como condrócitos e adipócitos. A linhagem osteoblástica se desenvolve quando proteínas morfogênicas ativam células mesenquimais. A principal função dos osteoblastos é secreção proteica da matriz e mineralização óssea. Os osteoblastos maduros ativos são reconhecidos pela sua localização na superfície óssea e suas características morfológicas típicas de células secretoras de altos níveis de proteínas: células com grandes núcleos localizados próximos à membrana basal da célula, aparelho de Golgi aumentado na superfície apical dos núcleos e extenso retículo endoplasmático. Os osteoblastos expressam altos níveis de fosfatase alcalina e osteocalcina, as concentrações circulantes dessas proteínas refletem a taxa de formação óssea; além disso secretam abundante colágeno tipo I e outras proteínas de matriz especializadas, que formam osteóide. Esta fase orgânica do osso serve como modelo para o depósito subsequente de mineral na forma de hidroxiapatita. Todo o processo pode ser dividido em etapas que incluem proliferação, desenvolvimento de matriz extracelular e maturação, mineralização e apoptose. Cada estágio é caracterizado pela ativação de fatores de transcrição específicos e genes que levam a uma sucessão de marcadores fenotípicos de osteoblastos (21).

A diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos se deve à liberação de proteínas Axina e Frat-1, as quais inibem a atividade da enzima glicogênio sintetase quinase 3 e produzem a hipofosforilação da β -catenina que desloca para o núcleo e ativa transcrição de alguns genes como Osterix e Runx2. As BMPs exercem um importante efeito indutor sobre as células ósseas. (BMPs 2, 4, 6 e 7), em tanto BMP 3 tem efeito inibidor (13).

Os osteócitos são antigos osteoblastos que ficaram envolvidos pela matriz durante o processo de deposição óssea e são regularmente distribuídos por toda a matriz óssea mineralizada. Os osteócitos são as células mais abundantes no osso, compreendendo mais de 90% das células dentro da matriz ou nas superfícies ósseas. Os osteócitos coordenam a função dos osteoblastos e osteoclastos em resposta a sinais mecânicos e hormonais (21). O osteócito é o sensor mestre de sinal, integrador e transdutor do esqueleto. Osteócitos, osteoblastos e osteoclastos são as principais células ósseas que orquestram o crescimento, a manutenção e a cicatrização óssea. A esclerostina, uma glicoproteína secretada predominantemente por osteócitos em condições fisiológicas é um importante regulador negativo da massa óssea por meio da inibição da formação óssea pelos osteoblastos. A expressão da esclerostina é regulada por uma ampla variedade de fatores, incluindo a sensibilização mecânica, citocinas locais e fatores endócrinos (22).

A matriz mineralizada contém numerosas lacunas onde são alojados os corpos celulares dos osteócitos e milhares de canálculos que contém seus prolongamentos formando o sistema lacuno-canalicular que permite intenso tráfego de fluido ósseo no interior da matriz mineralizada estimulando a expressão de esclerostina, a qual mantém a massa óssea e inibe atividade osteoblástica. Contrariamente a redução do fluido ósseo estimula apoptose de osteócitos e liberação de RANKL o qual dará início à diferenciação dos osteoclastos (13).

As superfícies ósseas nas quais não têm mais formação óssea e não ocorre deposição de matriz são recobertas por osteoblastos em repouso denominados células de revestimento ósseo, por sua similaridade com o epitélio simples pavimentoso. As células de revestimento podem voltar a atividade e se transformar em osteoblastos secretores (16).

A matriz extracelular do tecido ósseo é caracterizada pela presença da fase mineral constituída por fosfato cálcico mineralizado em forma de cristais de hidroxiapatita precipitados na porção orgânica por um fenómeno conhecido como nucleação, produzido por supersaturação local de cálcio e fosfato iônico e controlado por osteoblastos (13). O colágeno provavelmente não seja o receptor direto da deposição de hidroxiapatita (nucleação). Estudos físico-químicos preveem que o núcleo de mineralização deve ter uma estrutura beta, uma característica que não é

encontrada na estrutura da molécula de colágeno (tem estrutura Alfa). Existem proteínas não colágenas na matriz que se ligam ao colágeno, regulando assim a formação de fibrilas e provavelmente o colágeno sirva de andaime sobre o qual os nucleadores estão orientados. Consequentemente, os componentes não colágenos da matriz participam na nucleação de cristais de hidroxiapatita (23).

A matriz orgânica está constituída 90% por colágeno, principalmente de tipo I, contendo também tipo III e V, o restante 10% são proteínas não colágenas, a maioria das quais se associa ao colágeno e permite sua mineralização. Los componentes mais importantes na matriz mineralizada são OPN e sialoproteína óssea BSP, ambas altamente fosforiladas e com alta afinidade pela hidroxiapatita. Também OPN e BSP se ligam ao colágeno e outras proteínas da matriz, razão pela qual sua presença é importante nas linhas cimentantes. Outras proteínas não colágenas presentes são osteonectina, osteocalcina, proteoglicanos ricos em leucina (decorin, biglican, lumican, osteoaderin) além das proteínas morfogenéticas ósseas (13). Embora estas proteínas não colágenas não sejam tão abundantes quanto os chamados elementos estruturais (colágeno), sua importância na fisiologia óssea não pode ser subestimada. Isto foi sublinhado pela identificação de mutações em várias destas proteínas que resultam em alterações ósseas. As proteínas não colágenas da matriz podem-se agrupar em três grandes grupos: proteoglicanos, glicoproteínas e proteínas contendo ácido glutâmico γ (23).

A OPN é uma glicofosfoproteína altamente fosforilada, tem características ácidas e é rica em ácido aspártico. A OPN é liberada em tecidos mineralizados, incluindo ossos e dentes, é produzida por células osteoclásticas e osteoblásticas em altos níveis. No osso, está ligada à frente de mineralização do osteóide onde possui 3 funções principais: modulação da aderência das células ósseas, modulação da função osteoclástica e modulação da mineralização da matriz (24). OPN é encontrada em osteoblastos na frente de mineralização e pode controlar a mineralização, é encontrada também em osteócitos e osteoclastos em áreas de remodelado ósseo (25).

A OPN é multifuncional pode ser secretada por diferentes tecidos, tem muitos efeitos controversos sobre a saúde. Pode-se considerar que a OPN aumenta a inflamação em doenças inflamatórias agudas e crônicas, devido a seu papel no

aumento de macrófagos e células T em locais de inflamação. Além disso, pode reduzir o risco de fraturas ósseas, modulando a aderência das células ósseas e a mineralização da matriz. Embora os mecanismos ainda não estejam claros, um dos efeitos positivos da OPN na saúde é o efeito anti-litogênico (24).

2.2 ROG

Há relatos do conceito de regeneração de tecidos mais de 50 anos atrás (26, 27); sua aplicação para o reparo de defeitos periodontais começou em 1980, a partir de estudos biológicos de cicatrização de tecidos afetados por doença periodontal que permitiram entender que o tipo de tecido que se forma depende das células que primeiro ocupam o espaço da lesão (28, 29). Depois, se desenvolveram membranas que impediam que células não desejadas invadissem a ferida e ao mesmo tempo permitiam que células com possibilidade de formar o tecido desejado ingressassem ao espaço da lesão. Esta técnica foi chamada “Regeneração Tissular Guiada” (30, 31). Essa estratégia foi pouco tempo depois aplicada ao osso como Regeneração Óssea Guiada (ROG), onde a osteogênese ocorre sem interferência de outro tipo de células que são isoladas por uma membrana que faz de barreira (32). Assim, a ROG melhorou a previsibilidade do aumento ósseo e forneceu estabilidade a longo prazo ao local recém-aumentado (33). O uso de uma barreira permite o crescimento do osso novo formado (34).

Os resultados bem-sucedidos da ROG baseiam-se na manutenção do espaço, proteção de coágulos, isolamento do coágulo, manutenção do fechamento primário dos tecidos moles e controle das forças pós-operatórias subjacentes (35). Para procedimentos regenerativos as membranas devem cumprir certos critérios de desenho: biocompatibilidade (o requisito mais importante a ter em conta na escolha de uma membrana), capacidade de manutenção do espaço, oclusividade celular, fácil manuseio, deve ser amigável com os materiais da bioativação (36) e ter boa capacidade de se integrar apropriadamente aos tecidos circundantes (26).

As membranas podem ser classificadas como não reabsorvíveis e reabsorvíveis e estas últimas como naturais ou sintéticas (1, 37). As membranas não

reabsorvíveis resistem a degradação enzimática e microbiológica e não se solubilizam quando colocadas in vivo (27), as mais usadas foram de ePTFE, e aquelas com reforço de titânio têm boa estabilidade mecânica y podem ser individualmente formadas, permitindo aumento ósseo lateral e vertical (38). Entretanto, apresentam como desvantagens a necessidade de uma segunda cirurgia e a possibilidade de terem uma exposição precoce requerendo sua retirada que resulta em menor porcentagem de regeneração. Para superar tais desvantagens e simplificar os protocolos cirúrgicos foram desenvolvidas membranas reabsorvíveis que não precisam de uma segunda cirurgia e não se removem se forem expostas (39, 40), têm melhor custo efetividade e diminuem a morbidade do paciente (1). Diversos estudos têm reportado que não existe diferença na quantidade de formação óssea entre membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis (37, 41, 42), e a reação inflamatória pode ser similar (43).

Tabela 1.- Classificação das membranas para ROG.

GRUPO	MATERIAL	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Polímeros sintéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Politetrafluoroetileno (PTFEe e PTFEe + Ti) • Poliésteres (PLA – PGA – PCL) 	<ul style="list-style-type: none"> • Inerte e Estável • Reabsorvíveis • Manipulação fácil • Capacidade de encapsular drogas 	<ul style="list-style-type: none"> • Não reabsorvível • Sem Ti falta de rigidez • Falta de rigidez e estabilidade • Reabsorção variável • Custo maior
Polímeros naturais	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno e matrizes extracelulares (diferente origem) • Quitosano 	<ul style="list-style-type: none"> • Reabsorvíveis • Melhor custo benefício • manipulação fácil • Incorporação de componentes biológicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Falta de rigidez e estabilidade • Reabsorção variável
Metais	<ul style="list-style-type: none"> • Titânio e ligas de titânio • Liga CrCo 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta dureza e plasticidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Não reabsorvível
Componentes inorgânicos	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfato de cálcio • Fosfato de cálcio (HA) 	<ul style="list-style-type: none"> • Reabsorvível • Osteocondução 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa dureza e plasticidade

Adaptação de (4).

O material bioabsorvível pode ter limitações para o tratamento de defeitos grandes, onde o colapso da barreira pode ser a causa de pobres resultados (39), um requisito prévio é que uma membrana seja suficientemente rígida durante tempo suficiente para manter o espaço em que o osso vai ser formado, assim vários graus de reparo ósseo podem ser vistos sob diferentes membranas devido à diferencia na eficácia na promoção da formação óssea mesmo que sua composição química seja similar (41). No entanto, quando expostas podem retardar a cicatrização (44).

As membranas de colágeno têm sido usadas por décadas. Os benefícios da utilização deste material absorvível incluem a promoção da cicatrização de feridas através da estabilização do coágulo, estabilidade da ferida e hemóstase; aumentam a cobertura primária da ferida através da sua capacidade quimiotática para atrair fibroblastos; e podem aumentar a espessura do retalho fornecendo um suporte de colágeno, também têm a capacidade de excluir tecidos ou células indesejáveis (tecido conjuntivo e epitélio). Como as membranas de colágeno cumprem todos esses critérios, ela se tornou um dos materiais usados preferentemente nos procedimentos de ROG (42).

No entanto, a dificuldade de manter a função de barreira por um período de tempo apropriado foi considerada uma grande desvantagem das membranas reabsorvíveis (1). Tem sido reportado um tempo curto de presença da membrana no defeito (≤ 1 mês); mas foram desenvolvidas as membranas reticuladas que com uma taxa de degradação mais lenta, proporcionam mais tempo para que as células seletivas desejadas (ósseas) repovoem as áreas do defeito (42).

Embora atualmente as membranas naturais de colágeno sejam as que oferecem as indicações mais amplas, devemos considerar que elas não são adequadas para cada procedimento, e que o clínico deve estar ciente da situação necessária para escolher a membrana certa o qual depende principalmente do tipo de defeito (36). É muito importante para o sucesso do procedimento regenerativo que a membrana não se movimente e não se colapse. Tanto membranas não reabsorvíveis quanto as reabsorvíveis apresentaram a intrusão de camadas de tecido mole pela ruptura da superfície do coágulo diminuindo a quantidade do osso regenerado, além disso o isolamento das partículas de enxerto pode interferir na sua reabsorção (35).

Um grande problema é se uma membrana tem uma tendência para colapso no defeito ósseo; isso limitaria o espaço no qual o osso deve-se regenerar porque a membrana não tem capacidade mecânica de suportar a pressão dos tecidos moles (26). Defeitos ósseos grandes nos quais as paredes não podem dar suporte à membranas devem usar enxertos ósseos como suporte à barreira e prevenção do colapso (39). Além disso, a formação do osso é maior na ROG com membrana mais osso que quando é usada somente a membrana (45).

O osso esponjoso autógeno fresco e, em menor grau, o osso cortical são os materiais de enxerto padrão-ouro (46), eles têm propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutivas (47). No entanto, a morbilidade e complicações com o sitio doador, o incremento do tempo cirúrgico, a limitada quantidade disponível de enxerto e a imprevisível reabsorção são deficiências que promoveram o desenvolvimento de substitutos ósseos como terapia adjuvante ou em substituição ao osso autólogo para procedimentos de regeneração óssea (1, 48, 49); reportes clínicos têm demonstrado grande reabsorção buco lingual de blocos do osso autólogo, 25% em 4 meses até 60% em 6 meses (50). Enxerto ósseo (autólogo) e substitutos de enxertos ósseo podem ser classificados segundo sua origem. O enxerto ósseo é autólogo e os substitutos ósseos podem ser: aloenxertos, de outro indivíduo da mesma espécie com diferente genótipo; xenoenxertos, de outras espécies; e aloplastos, produzidos sinteticamente. O xenoenxerto bovino desproteinizado é considerado o padrão ouro dos substitutos ósseos (51). Os materiais substitutos do osso como propriedade principal devem estar integrados ao processo natural de remodelação óssea que envolve reabsorção pelos osteoclastos e nova formação óssea o pelas células osteoblásticas. Se os monócitos se aderem a uma superfície de fosfato de cálcio (osso ou material substituto do osso), elas podem se fundir e formar células multinucleadas liderando o processo de regeneração (17).

É razoável supor que nem todos os substitutos do enxerto ósseo terão o mesmo desempenho. A validação de qualquer substituto de enxerto ósseo em um local clínico pode não necessariamente prever seu desempenho em outro local (46). A grande variabilidade de materiais com diferentes características morfológicas tem influência no comportamento in vivo dos substitutos. Muitas vezes, elas não são levadas em consideração quando o desempenho biológico das amostras é avaliado.

Isso pode ser responsável pelos resultados conflitantes frequentemente encontrados na literatura (52).

Aloenxertos têm a possibilidade de transmissão de doenças (46); também foi relatada a possibilidade de transmissão de príons em xenoenxertos devido à capacidade limitada de rastrear príons dentro do genoma animal, juntamente com um longo período de latência para a manifestação da doença, neste contexto o desenvolvimento de substitutos ósseos aloplásticos têm-se convertido num grande polo de pesquisa na ROG (53). Recentemente novos substitutos ósseos, porcinos e equinos têm sido desenvolvidos; os estudos pré-clínicos e ensaios clínicos sugerem que, devido à sua condutividade e biocompatibilidade, podem ser usados sem alterar o processo reparador do osso, assim como os xenoenxertos de origem bovino (1, 54).

Os enxertos aloplásticos são uma grande família de substitutos ósseos sintéticos com uma diversa composição química e propriedades biológicas. Os fosfatos de cálcio porosos estão em investigação há mais de 20 anos. O problema do β -TCP é sua rápida reabsorção, o que impede o crescimento completo de osso novo e provoca, como resultado, menor aumento do volume ósseo (1).

Tabela 2. - Enxertos e substitutos ósseos de acordo a sua origem.

MATERIAL DE ENXERTO	ORIGEM	EXEMPLOS
AUTÓENXERTO	Tecido do próprio paciente.	Obtidos de locais intraorais ou extraorais.
ALOENXERTO	Tecidos de indivíduos da mesma espécie.	Osso fresco congelado, osso fresco seco, DFDB.
XENOENXERTO	Tecido de outras espécies.	Derivado mineral bovino, suíno, equino.
ALOPLASTICO	Material sintético.	TCP, hidroxiapatita, cimento cálcio fosfato, cálcio-sulfato, vidro bioativo, polímeros.

Adaptação do (1)b

O uso de material de enxerto em combinação com membranas de colágeno parece melhorar os desfechos clínicos em certos defeitos quando comparados ao uso de membranas isoladamente (40, 42). Com o tempo, os espaços entre as partículas de enxerto serão preenchidos conformação de novo osso. Alguns biomateriais serão completamente reabsorvidos, enquanto outros permanecerão mais ou menos intactos com o tempo (55).

Os substitutos ósseos têm entrado como complemento importante na terapia genética e engenharia de tecidos formando parte de novas construções portadoras de fatores de crescimento, desenvolvimento de estruturas biológicas e incorporação de células-tronco mesenquimais, seu desenvolvimento produziria substitutos de engenharia de tecidos ex vivo para uso clínico (46).

2.3 ENXERTOS ALOPLÁSTICOS: B-TCP

Para evitar as principais deficiências dos aloenxertos e xenoenxertos, produtos de origem sintética estão sendo cada vez mais desenvolvidos com o objetivo de fabricar biomateriais que mimetizam a matriz extracelular do osso não apenas com relação à composição química, mas também às propriedades estruturais e funcionais. Os substitutos ósseos aloplásticos representam uma grande família de enxertos sintéticos com diferente composição química, dentro de este grupo encontram-se os CaP, os materiais preferidos pela composição química muito similar ao osso humano (56). A hidroxiapatita (HÁ), o β -TCP e o fosfato cálcico bifásico (HÁ+ β -TCP em um grânulo só) são os materiais que caracterizam este grupo. A principal diferencia entre eles é seu padrão de reabsorção. A HÁ é o mais resistente à reabsorção fisiológica, em contraste o β -TCP é o mais biodegradável. Os fosfatos cálcicos bifásicos têm sido desenvolvidos para combinar as características de mantimento do espaço e reabsorção (1). A rápida degradação do β -TCP é devido a uma combinação de dissolução e reabsorção mediada por células (7).

As cerâmicas desempenham um papel fundamental dentro de várias aplicações biomédicas, uma é o enxerto ósseo. As cerâmicas baseadas em cálcio e fosfato são muito utilizadas pela composição química similar ao osso, também porque têm alta bioreabsorvibilidade e bioatividade (56). Os materiais aloplásticos são usados em ROG e são bem aceitados devido que não há possibilidade de transmissão de doenças (57), situação que é discutida e é provável com os xenoenxertos (53), e com os aloenxertos que tem um importante risco de transmissão viral e de imunogenicidade (46).

As cerâmicas, particularmente as baseadas em fosfato de cálcio, mostraram propriedades osteocondutoras e osteoindutivas suficientes. Os cimentos de fosfato de cálcio (CPCs) têm mostrado resultados promissores para o preenchimento de defeitos ósseos devido à sua similaridade entre a composição mineral e os tecidos ósseos. CPCs apresentam características combinadas como osteocondutividade, osteoindutividade, biocompatibilidade e formabilidade (a capacidade de selar cavidades complexas) (14).

A cerâmica de fosfato tricálcico tem uma composição semelhante aos precursores ósseos amorfos, enquanto a hidroxiapatita tem uma estequiometria semelhante à do mineral ósseo. A cerâmica não existe naturalmente, mas eles foram fabricados para induzir uma resposta biológica semelhante à do osso. As cerâmicas sintéticas, sozinhas, não possuem propriedades osteogênicas ou osseoindutivas e demonstram suporte estrutural mínimo imediato. Quando ligado ao osso saudável, o osteóide é produzido diretamente nas superfícies da cerâmica na ausência de uma interface de tecido mole. Consequentemente, o osteóide mineraliza e o novo osso resultante sofre remodelação (46).

Materiais baseados em cálcio e fosfato (CaP) foram desenvolvidos pela similaridade na composição com a porção mineral do osso, principalmente na forma de carbonato apatita, a qual tem o mesmo tamanho e morfologia que a apatita óssea. Além disso, os biomateriais de CaP são similares ao mineral ósseo em sua biodegradabilidade, bioatividade e osteocondutividade. Para ter uma morfologia similar ao tecido e uma adequada macro e micro porosidade podem-se introduzir trabéculas ao material por métodos físicos e químicos, o que permitirá a

possibilidade de concentrar fatores osteogénicos, o que propicia sua utilização como “carriers” ou transportadores e substitutos ósseos (14).

Tanto o TCP como a HA são altamente biocompatíveis. Eles diferem, no entanto, na resposta biológica criada no local do hospedeiro: o TCP poroso é removido do local do implante à medida que o osso cresce no suporte; HA é mais permanente. As camadas superficiais do TCP aumentam a ligação com o osso hospedeiro adjacente. Isso estimula a reabsorção osteoclástica e a formação de novo osso dentro do implante reabsorvido (46). Além de demonstrar uma boa osseocondutividade, uma vantagem do β -TCP e sua alta taxa de reabsorção, além disso paralelamente a sua diminuição é substituído progressivamente com matriz óssea (47).

Uma precoce formação do osso (5-7 dias) foi encontrada em torno dos grânulos de β -TCP implantados em tíbia de ratos, marcação positiva para OPN e outras proteínas de matriz em células intimamente aderidas aos grânulos do β -TCP, demonstrando a biocompatibilidade do β -TCP (25).

É motivo de debate o tipo de células que provocam a biodegradabilidade do β -TCP, para alguns pesquisadores existem diferenças a serem levadas em consideração entre OC e células gigantes multinucleadas. Os OC são fenotipicamente diferentes às células gigantes multinucleadas encontradas no osso. Para que as células gigantes multinucleadas expressem o fenótipo dos osteoclastos, sinais ambientais específicos do osso são necessários. Assim sendo, a expressão de TRAP dentro de um tecido ectópico não identifica necessariamente uma célula gigante multinucleada como um osteoclastos (58).

Esses resultados enfatizam que um tamanho médio dos grânulos de 150-500 μ m e uma forma poligonal podem iniciar a geração de células gigantes multinucleadas mais rapidamente que os grânulos esféricos e polimórficos de tamanho maior. A ativação de células gigantes multinucleadas parece ser independente da porosidade dos grânulos (59).

O β -TCP é amplamente usado e considera-se um adequado transportador ou “carrier” de proteínas indutoras da formação óssea. Mesmo que ainda não foi determinado um transportador ideal, existem vários estudos que reportam a utilidade

do β -TCP como transportador (60, 61). O resultado terapêutico das moléculas indutoras de osso depende de sua concentração, quantidade e tempo de aplicação, mas sua solubilidade e rápida difusão faz que se precise de um adequado transportador que permita a retenção, distribuição e liberação da substância para conseguir o efeito ósseo-indutivo. (61).

Para melhorar a biodegradabilidade dos materiais baseados em CaP, nas últimas décadas foram pesquisados tratamentos complementários, vários estudos demonstraram diferentes resultados com a adição de alendronatos (locais e sistêmicos) (62-64), plasma rico em fibrina (PRF) (12, 65) e fatores de crescimento ósseo ou BMPs onde os materiais baseados em CaP tem importante papel como transportadores ou “carriers” (66-68).

2.4 XENOENXERTO

Os xenoenxertos são substitutos ósseos minerais derivados de animais, corais ou algas. Os XE têm sido considerados alternativas promissoras aos enxertos autólogos, uma vez que representam uma oferta ilimitada de material disponível e podem reduzir a morbidade ao eliminar a área doadora; mas, por causa dos riscos de imunogenicidade foram deixados de lado na escolha de materiais substitutos de osso (52). Porém, o desenvolvimento de métodos mais seguros, como o tratamento térmico ($>650^{\circ}\text{C}$), no qual toda a matéria orgânica pode ser destruída o que consegue a desproteinização das partículas ósseas (69), obtendo resultados favoráveis em todos os níveis de evidência clínica permitindo assim que o XEB deproteinizado seja considerado o “Gold Standard” dos substitutos ósseos (1, 51).

O tratamento para o osso porcino (OsteoBiol®. Tecnooss Dental, Itália) também é térmico, no entanto tem diferença na temperatura chegando máximo a 130°C com o propósito de manter a estrutura de colágeno; quando comparado com Bio-oss®, apresentou menor quantidade e tamanho dos poros; esta diferença é explicada pelas diferenças na temperatura do tratamento, o Bio-oss® tem um tratamento térmico maior o que aumenta a porosidade e o tamanho dos poros, mas não conserva o colágeno (52).

Os materiais de origem bovina apresentam biocompatibilidade e condutividade (52). No entanto a reabsorção do osso bovino é baixa (34, 54, 70), o processo é lento, estudos no BioOss® demonstraram que sua degradação pode demorar anos, mas os xenoenxertos permitem formação do osso novo construindo uma rede conjunta entre o enxerto e o osso novo formado que fica em íntimo contato com o enxerto (71). Estas baixas taxas de reabsorção e formação de novo osso do XE bovino foram relatadas em distintos estudos em animais (34, 49, 54, 72) e clínicos (35, 73).

Além da lenta reabsorção, a formação óssea em torno dos grânulos é pobre; as partículas de XE mostram uma média de 15% a 30% da fração de área ocupada pelas partículas de XEB enxertadas, dependendo da observação do tempo de cicatrização e da localização da retirada da amostra. Com XEB, deve-se antecipar que pelo menos 25% do tecido duro regenerado envolverá partículas enxertadas, porém as partículas enxertadas ocuparam parte da fração da área geralmente ocupada pela medula de tecido mole. No entanto, parece que a presença a longo prazo das partículas desempenha um papel importante na “rede esponjosa” de tecidos duros. A presença das partículas minerais incorporou completamente o osso e fortaleceu a massa do tecido ósseo, criando uma densa rede esponjosa, melhorando assim sua capacidade biológica de suportar as forças de carga transmitidas pelos implantes colocados nesses locais (74).

O xenoenxerto porcino enriquecido com 10% de colágeno tipo I puro, o que pode favorecer sua reabsorção no leito receptor do enxerto, tem sido apresentado como um osso com sucesso clínico e proposta uma alta taxa de remodelação óssea (6). Embora, quando comparado com XEB o comportamento de ambos XE parece ser similar (52).

MP3® (OsteoBiol, Itália), é um xenoenxerto de origem porcina ou equina, usado como grânulos de 600-1000 µm, processado a baixa temperatura (máximo de 130°C) para eliminar completamente quaisquer elementos patogênicos. A preservação da estrutura e composição do colágeno natural e hidroxiapatita foi mantida, como tem sido reportado pelo fabricante. O tamanho dos grânulos teve às distribuições de tamanho mais amplo (455-1260 µm) embora esteve próximo a informação do fabricante. XEP está composto por osso cortiço-esponjoso, no

entanto XEB é só esponjoso, portanto sua área é maior, uma característica do substituto ósseo porcino (OsteoBiol®. Tecnoss Dental, Itália) é o mantimento do colágeno na sua estrutura, o que foi comprovado com espectrometria infravermelha, a análise para colágeno tipo I, mostrou ser muito similar quando comparado com o osso humano. Além disso, a comparação da composição química como duas-fases (hidroxiapatita-colágeno) do XEP foi muito similar ao osso humano (52).

Sucesso clínico tem sido reportado em aumento de assoalho do seio com XEP. Num estudo retrospectivo de 5 anos encontraram resultados similares a outros materiais em levantamento do assoalho de seio com xenoenxerto porcino (75). Além disso, Barone et al. (2005), compararam o uso de osso autógeno sozinho ou misturado com osso porcino suíno cortical - esponjoso (1:1) para aumento do assoalho do seio maxilar antes da colocação do implante em 18 pacientes. As biópsias foram realizadas na colocação do implante 5 meses depois e processadas para histologia. Não houve diferenças óbvias entre os dois tratamentos, e os autores relataram sinais de reabsorção das partículas ósseas porcinas, a análise histológica mostrou a presença de algumas partículas ósseas córtico-esponjoso; o material ósseo enxertado foi facilmente distinguido do osso natural por coloração. O enxerto ósseo incompletamente reabsorvido foi bem integrado nas amostras de biópsia e estava em completa continuidade com a nova formação de tecido ósseo. Na área medular, observou-se aumento da densidade do tecido conjuntivo vascular. Nenhuma evidência de infiltrado inflamatório, necrose ou reação de corpo estranho foi observada em nenhum dos espécimes. O volume ósseo médio nos locais experimentais foi de $67\% \pm 14,9\%$ (76).

O processo regenerativo com XEP é lento, com similaridade ao XEB, o aumento da área óssea com o tempo está em paralelo com a diminuição da área do enxerto. Isto é provavelmente devido à reabsorção osteoclástica porque a presença de células multinucleadas nas lacunas de reabsorção na superfície das partículas de têm sido um achado comum após 4 e 8 semanas. Além disso, unidades de metabolização óssea foram vistas dentro dos grânulos, indicando remodelação e formação de ósteons (55).

Para melhorar a integração do XEB não deve ser compactado no local cirúrgico. Se o XEB for muito compactado, sua estrutura trabecular é esmagada,

resultando em uma massa mais densa de material que é reabsorvida apenas de sua superfície externa dando um curso mais longo de reabsorção para remover efetivamente as partículas de Bio-Oss® do local de regeneração. Foi um achado consistente de que, quando o Bio-Oss® foi comprimido e embalado com mais força, a reabsorção adequada demorou mais tempo para ocorrer (35).

Do ponto de vista biológico, parece que os biomateriais xenógenos funcionam bem, embora suas propriedades de reabsorção/degradação ainda estejam em debate. A maioria desses materiais está disponível como grânulos e pode ser difícil de aplicar no local cirúrgico. A mistura com solução salina, sangue ou cola de fibrina pode facilitar o manuseio clínico. Além disso, a adição de gel de colágeno nos grânulos ósseos cria um material pegajoso e moldável, o que simplifica a aplicação. Não houve sinais de reações adversas, e tanto a osteogênese quanto a angiogênese seguiram os prazos normais (55). As apresentações em forma de massa (putty) são fáceis de moldar e adaptar na cavidade óssea (77). A agregação do gel colágeno melhora o manejo clínico do material, no entanto, a capacidade regenerativa é a mesma (55).

Não é conhecida a forma como a diferenciação dos OTC é afetada pela exposição ao colágeno (principalmente tipo I), foi achado que a exposição aos fragmentos de degradação do colágeno inibe a formação de osteoclastos que atuam através do LAIR-1, fornecendo um novo mecanismo para o controle negativo da osteoclastogênese (78).

2.5 BISFOSFONATOS: ALENDRONATO

As drogas antirreabsortivas mais conhecidas são os bisfosfonatos (BFs), foram introduzidas para prevenir e tratar doenças relacionadas com reabsorção do osso há mais de 40 anos, embora seu mecanismo de ação tenha sido melhor entendido só nos últimos 15 anos. Os BFs que contêm nitrogênio são mais utilizados atualmente (por exemplo: alendronato, risendronato, ibandronato, pamidronato e zoledronato), eles ligam-se prontamente à hidroxiapatita e são depositados no osso interferindo na ação dos osteoclastos, exercem ação antirreabsortiva inibindo o desenvolvimento do

progenitor e perturbando a função deles (isto é, recrutamento, adesão e atividade), enquanto também reduzem sua vida útil (79).

A farmacocinética do alendronato é semelhante com outros bisfosfonatos nitrogenados. Após da administração, as concentrações plasmáticas de alendronato diminuem dentro de 6 h para $\leq 5\%$ dos valores iniciais. Cerca de 50% da dose sistêmica é excretada inalterada na urina nas 72 horas após administração, o restante é assumido para ser tomado pelo esqueleto. Posteriormente ao sequestro no osso, a eliminação de o alendronato é muito prolongado. A semivida terminal foi estimado em mais de 10 anos (80). Depois de sua absorção pelo organismo, se apresentam altas concentrações na matriz do tecido ósseo onde fica impregnado até quando é iniciada a reabsorção do osso, os BFs liberam-se das superfícies minerais e acumulam-se intracelularmente nos osteoclastos. A diferencia dos BFs simples, que são incorporados em análogos não hidrolisáveis do trifosfato de adenosina e que induzem a apoptose dos osteoclastos. O alendronato igual que os bisfosfonatos que contem nitrogênio e não são metabolizados, inibem potencialmente a enzima farnesilpírofosfato (FPP) sintase, uma enzima chave da via do mevalonato. Isso impede a síntese de lipídios isoprenóides necessários para a prenilação pós-translacional de pequenas GTPases, interrompendo assim a localização subcelular e a função normal dessas proteínas sinalizadoras essenciais. A inibição da FPP sintase também resulta na acumulação do metabólito do isopentenil difosfato, que é incorporado no metabólito nucleótido tóxico Apppl. Juntas, essas propriedades explicam a capacidade das drogas bifosfonadas para inibir a reabsorção óssea por interromper a função e a sobrevivência dos osteoclastos. (8).

Pesquisas recentes forneceram uma explicação do efeito benéfico dos bisfosfonatos no esqueleto devido à prevenção do apoptose de osteoblastos e osteócitos in vitro e in vivo. O efeito anti-apoptose é conseguido pelo estímulo em hemicanais de conexina 43, os quais permanecem abertos levando à ativação de kinase Src seguido pela fosforilação do sistema extracelular regulador de kinase resultando em inibição de apoptose (9). Mesmo que ainda a inibição da apoptose de osteoblastos e osteócitos não seja bem compreendida, seu efeito foi comprovado com análogos de BFs que não afetam os osteoclastos e previnem a apoptose de osteoblastos e osteócitos e a perda óssea induzida por glicocorticoides em ratos (81).

A adição do alendronato a enxertos cerâmicos sintéticos foi testada com o fosfato cálcico bifásico. Os pesquisadores não encontraram diferença entre aplicação local e sistêmica, além disso, a formação do osso não foi maior que o controle em defeitos de calvária de ratos (63). É interessante que o resultado fora diferente quando o alendronato local e sistêmico foram administrados a autoenxertos, onde aumentou significativamente a neoformação óssea em comparação ao grupo de enxerto ósseo autógeno, sem diferença significativamente entre o uso local ou sistêmico. O alendronato local e o uso de enxerto ósseo autógeno aumentaram significativamente a área óssea total em comparação com o enxerto ósseo autógeno (82).

Com o propósito de avaliar se a liberação local do alendronato pode melhorar a formação óssea depois de enxertar vidro bioativo em ratos, este substituo ósseo sintético foi embebido em solução do alendronato e colocado em um defeito no ângulo da mandíbula. Após 4 semanas foi quantificado o número de osteoclastos e a quantidade de osso novo formado. O grupo experimental tinha maior formação do osso que o controle, mas não houve diferença em relação ao número de osteoclastos. A afinidade dos bisfosfonatos pelo mineral ósseo possibilita sua aplicação local, permitindo a administração de altas doses na região de interesse (83).

A administração local de alendronato foi avaliada em porcos que receberam blocos do ramo da mandíbula tentando prevenir a reabsorção da superfície, que em um enxerto autógeno pode ser imprevisível. Alendronato foi usado em solução aquosa (1mg/ml): em membrana do colágeno, em grânulos de xenoenxerto bovino e diretamente no bloco de enxerto. Observou-se um efeito inibitório da remodelação óssea e uma quantidade estatisticamente significativa menor de lacunas de reabsorção. Contudo, houve necrose do periósteo, enfatizando-se a importância de um teste pré-clínico e a otimização da dose (84).

O efeito do alendronato local pelo carregamento de alendronato sobre grânulos de fosfato octacálcico, é capaz de exercer um efeito benéfico sobre os osteoblastos e inibir a reabsorção de osteoclastos in vitro. Além disso, os resultados indicaram que a promoção da diferenciação de osteoblastos é aumentada na

combinação do fosfato octacálcico-alendronato em relação à hidroxiapatita-alendronato (62).

Há relatos com bisfosfonato de baixa concentração que estimula a proliferação e diferenciação de osteoblastos. O curto período de aplicação sistêmica ou local do bisfosfonato melhora a regeneração óssea devido a efeitos farmacológicos in vivo, como foi reportado pela aplicação do BFs de baixa concentração e proteína morfogenética do fator recombinante humano 2 (rhBMP-2) que tiveram efeito sinérgico na regeneração óssea e isso é resultado da diminuição da atividade de RANKL de osteoblastos (10).

Um estudo tipo prova de conceito ministrou pamidronato (90mg/ml) adsorvido em um substituto ósseo porcino colagenado granulado, e aparentemente atrasou a cicatrização do alvéolo, sugerindo-se que poderia reduzir as mudanças dimensionais de largura horizontal do alvéolo. Além disso, pareceu obstruir a reabsorção do substituto ósseo. Os autores tomaram apenas um número limitado de animais porque a dose de alendronato em modelo canino não era conhecida (85).

Foi também avaliada a formação de novo osso com administração local do BF mais potente: o ácido zolendrónico, associado a β -fosfato tricálcico e sangue autógena sob membranas rígidas de titânio. Após três meses, as quantidades de novo osso foram avaliadas histomorfometricamente, encontrando-se maior formação óssea, estatisticamente significativa em relação aos grupos controle (86).

2.6 PLASMA RICO EM FIBRINA

Existe uma grande variedade de concentrados plaquetários, que podem ser classificados em relação a três parâmetros principais: densidade da fibrina, teor de leucócitos e grau de padronização do procedimento. O plasma rico em plaquetas (PRP) pertence à primeira geração, havendo apresentado um efeito positivo na cicatrização das feridas e regeneração de tecidos, no entanto, a adição de anticoagulante e soro bovino limitam sua aplicabilidade clínica (87). Além disso, o

PRP pode ser usado como adjuvante de materiais de enxerto, mas não em combinação com ROG para o tratamento de defeitos ósseos (88).

A fibrina rica em plaquetas ou plasma rico em fibrina (PRF) pertence a uma geração de concentrados plaquetários com processamento simplificado que é preparado através de um método simples que não requer a adição de produtos químicos nas amostras do sangue antes da centrifugação. O PRF de Choukroun é um concentrado de segunda geração, o produto final é uma matriz de fibras autólogas contendo plaquetas, fatores de crescimento e leucócitos que são obtidos do coágulo de fibrina. Um coágulo de fibrina de alta densidade pode servir como uma matriz de cura biológica, apoiando a migração celular e a liberação de citocinas, expandindo enormemente o alcance de suas possíveis aplicações (89).

O PRF contém vários fatores de crescimento como o fator derivado de plaquetas (PDGF), fator transformador Beta ($TGF\beta$), fator dependente da Insulina (ILGF), fator epitelial (EGF) e fator endotelial vascular (EVGF) que tem efeitos positivos em situações clínicas que requer uma rápida cicatrização e regeneração óssea (3). Foi planteada a possibilidade do que o PRF é capaz de liberar esses fatores e melhorar o grau e a qualidade de novo osso formado com uma taxa de sucesso semelhante aos substitutos ósseos quando é usado com barreiras de titânio (90). Embora, estudos posteriores recomendam que o PRF não se deva usar sozinho para regeneração tissular guiada (3). O PRF demonstrou melhores resultados quando é usado em combinação com BCP que o BCP ou PRF sozinhos (12).

Durante o processamento de PRF, os leucócitos também poderiam secretar citocinas em reação aos fenômenos hemostáticos e inflamatórios artificialmente induzidos no tubo centrifugado. A quantificação de 5 mediadores celulares significativos no sobrenadante de plasma pobre em plaquetas e no soro de exsudato de coágulo PRF: 3 citocinas pró-inflamatórias (IL-1b, IL-6 e $TNF-\alpha$), uma citocina anti-inflamatória (IL-4) e uma chave promotor de crescimento de angiogênese (VEGF) foram avaliadas, os dados foram correlacionados com os obtidos no plasma (sangue não ativado) e no soro (sangue ativado). Estas análises revelaram que o PRF pode ser um nódulo de regulação imunológica com capacidade de retro controle da inflamação. Esse conceito poderia explicar a redução de infecções pós-operatórias quando o PRF é usado como aditivo cirúrgico (89).

Há ainda uma falta de evidências sobre o efeito do PRF em combinação com materiais de enxerto e ROG. Os concentrados de plaquetas podem ser usados vantajosamente como um complemento custo-efetivo para a terapia regenerativa cirúrgica, mesmo em combinação com enxertos ósseos, embora eles não mostrem nenhuma vantagem quando usados em conjunto com ROG (88).

Existem duas possibilidades de usar PRF em combinação com procedimento de ROG. A primeira age como uma membrana que realiza funções de barreira natural autóloga com tempo de reabsorção entre 10 e 14 dias, melhorando a cicatrização dos tecidos moles. A segunda consiste em seccionar pequenos fragmentos de PRF que são mesclados com materiais de enxertia óssea na procura de melhorar as propriedades de manipulação deles, fornecendo adicionalmente proteínas e fatores de crescimento responsáveis da angiogênese (91).

A evidência da utilidade do PRF em procedimentos de ROG é limitada e controversa. Distintas pesquisas têm apresentado resultados opostos; assim, foi relatado que a combinação de PRF e β -TCP pode acelerar a cicatrização óssea mais do que quando esses materiais são usados isoladamente. O uso combinado de PRF e β -TCP para a consolidação óssea é uma alternativa de tratamento potencial para uma cura mais rápida do que o uso somente desses biomateriais (92). No entanto, outro estudo com o mesmo material de enxertia apresenta que a adição de P-PRP ou PRF ao substituto do enxerto de β -TCP não foi benéfica na neoformação e regeneração de osso novo, e o P-PRP mais β -TCP ou PRF mais β -TCP não é superior ao β -TCP (93).

Quando o PRF foi adicionado a XEB, não apresentou melhora na formação do osso até os 6 meses do estudo, os autores concluíram que não teve um efeito sinérgico com o xenoenxerto e não se encontrou vantagem ou desvantagem com o adicionamento do PRF a Bio-Oss® (65).

O PRF não pode ser usado isoladamente para aumento horizontal ou vertical do osso, deve ser combinado com materiais de enxertia óssea. O PRF tem pouco potencial para melhorar a neoformação óssea na ROG; no entanto, há melhora da vascularização precoce nos tecidos ósseos e melhora o manejo dos enxertos

ósseos, favorecendo a estabilidade do material. Ainda os dados são escassos e é preciso mais pesquisas do PRF na ROG (91).

2.7 DEFEITOS NA CALVÁRIA DE RATOS

A pesquisa in vivo estabelece uma ligação entre estudos in vitro e ensaios clínicos. Diferentes modelos animais estão disponíveis para pesquisa pré-clínica, Se os dados podem ser validados e confiáveis, os animais colocados na extremidade inferior da escala filogenética devem ser usados preferencialmente, neste caso, os roedores são a primeira opção de escolha em relação aos mamíferos de grande porte (94). Embora nenhuma espécie preencha os requisitos de um modelo animal ideal, uma compreensão das diferenças nos atributos macroscópicos, microscópicos e de remodelação óssea permite uma melhor escolha das espécies animais e a interpretação dos resultados de estudos in vivo (95). Coelho e rato são os animais mais utilizados, enquanto fêmur e calvária são os sítios anatômicos mais implantados (96).

Modelos experimentais pré-clínicos têm sido amplamente usados para avaliar a eficácia de materiais y técnicas propostas para regeneração óssea, muita informação pode ser obtida do modelo animal que não pode ser realizado em uma investigação humana, os testes pré-clínicos orientam ao pesquisador na escolha racional de medidas substitutivas ao osso autólogo; neste contexto, roedores podem apresentar algumas vantagens como boa relação custo-benefício, habitação e manuseio mais fáceis e permitem a padronização de procedimentos em indivíduos geneticamente semelhantes (97). Os modelos de roedores têm provado ser bastante úteis em pesquisas relacionadas ao osso, estando entre os modelos de primeira escolha para testes in vivo de abordagens regenerativas e / ou terapêuticas para o tecido ósseo (94, 98). Além disso se podem considerar uma população com características biológicas chaves que se consideram suficientemente análogas para permitir que as inferências tenham aplicação; no entanto, as inferências tenham pouco poder pelo tamanho da amostra por razões éticas (99).

Os defeitos de tamanho crítico (DTC) foram desenvolvidos pela necessidade de estabelecer modelos pré-clínicos padronizados para avaliação da cicatrização óssea, são os modelos experimentais mais utilizados (98), o termo: “defeito de tamanho crítico” é definido como: “A ferida de menor tamanho em um osso e em uma espécie particular que não irá se curar espontaneamente durante a vida do animal”, o reparo resulta na formação de tecido conectivo não mineralizado (100). Nesse sentido, o DTC pode ser considerado o protótipo de defeitos de descontinuidade, no qual falha a osteogênese por ultrapassar o limiar do processo fisiológico de reparo (94). Estes modelos padronizados são componentes cruciais na translação de muitas terapêuticas à clínica (101).

Morfologicamente e embriologicamente, a calvária se desenvolve por ossificação intramembranosa e, portanto, se assemelha à formação dos ossos da face. Anatomicamente, a calvária consiste em duas placas corticais com regiões de osso esponjoso intermediário, semelhantes à mandíbula. Fisiologicamente, o osso cortical na calvária assemelha-se a uma mandíbula atrófica (100). A calvária do rato fornece um defeito reprodutível que pode ser gerado rapidamente e não requer fixação para a estabilização do esqueleto, como é exigido com defeitos femorais. No entanto, como um local anatômico que recebe menos carga do que os ossos longos, o teste funcional de uma estratégia de regeneração óssea destinada a resistir a forças biomecânicas não é viável no defeito da calota craniana. Além disso, o defeito serve como um modelo de formação óssea intramembranosa e, portanto, pode ser menos aplicável a biomateriais ou estratégias para a formação óssea endocondral (101).

A quantidade de tecidos disponível para avaliação histológica ou outra, pode ficar limitada durante as fases iniciais da cicatrização (98), além disso existem limitações quando se tenta extrapolar a eficácia das observações pré-clínicas a defeitos ósseos em humanos que precisam seguir os procedimentos realizados em animais (33, 102), principalmente pela falta de padronização dos DTC em animais (103).

O uso do modelo de calvaria implica a seleção do tamanho do defeito, particularmente o conhecimento do tamanho crítico do defeito, que varia de acordo com o animal. espécie, estirpe, sexo, idade, sítio anatômico, integridade do

periósteo, forma, tamanho e ambiente micro mecânico (100). Há controvérsias na literatura quanto ao que tamanho é o mais adequado na dimensão para um defeito de calvária a ser considerado crítico (104, 105). Diferentes tamanhos de defeitos têm sido relatados na literatura como críticos, com defeitos de 5,0 e 8,0 mm de diâmetro, os mais comumente realizados (94).

O defeito de 8 mm em ratos pode ser feito na região central e inclui a sutura interparietal (106-108). Estes, têm o problema que incluem o tecido conectivo da sutura sagital na avaliação da regeneração óssea; não é possível fazer dos defeitos laterais no desenho no mesmo animal; e o risco de danificar o seio sagital e muito alto, incrementando a possibilidade de hemorragia (105). Porém, a meta análise não encontrou diferença entre médias de nova formação óssea entre defeitos de 5 e 8 mm (98).

Vagjel et al. (2014), propuseram em sua revisão sistemática que existe evidência significativa para definir os defeitos de 5 mm como “críticos”, encontraram que só o 1,6% (5 mm) fecha completamente com novo osso formado. Para defeitos de menor diâmetro eles concluíram que não existia evidência suficiente para considera-los como DTC. Quando os defeitos foram realizados na porção central da calvária, nenhum fechamento completo foi relatado (98). Em procedimentos de RTG em DTC de 5 mm na calvária, os controles negativos fecharam apenas um 0,8% em um mês e 0,9% aos 2 meses (109). Bosh et al. (1998), demonstraram que após 12 meses, formação óssea mínima foi observada nas margens do defeito em ratos. Concluíram que as vantagens deste defeito de 5 mm são a capacidade de induzir dois defeitos por animal e evitar a sutura sagital.

Outro fator importante a ter em conta é a idade dos animais envolvidos na pesquisa, modelos que usam animais muito jovens com menos de 3 meses de idade não deveriam ser considerados apropriados para estudo de materiais promotores de osso, eles, por estarem em crescimento, têm imenso potencial regenerativo, é preferível o uso de animais maduros (98, 105).

Com relação ao período de avaliação, a maior proporção da formação óssea total parece ocorrer na 4ª semana, diminuindo a partir de então. Em defeitos de tamanho crítico e não crítico de ratas Wistar, a formação do osso na reparação

cessa dentro de 24 semanas independentemente da conclusão do reparo do defeito. A diferenciação de progenitores de osteoblastos declina as 24 semanas (110).

Os dados mais heterogêneos referem-se à quantidade de osso formado pois os reportes apresentam uma grande variabilidade; várias explicações têm sido propostas na revisão da literatura: idade, raça do rato, localização anatômica do defeito, trauma cirúrgico, técnica para fazer o defeito, questões relacionadas ao operador, danificação da dura-máter (98).

Existe a possibilidade de que a dura-máter seja danificada pela trefina durante a conformação do defeito, porém, segundo Cooper et al. (2010), não existiu diferencia no reparo ósseo quando a dura-máter foi danificada. A participação de componentes teciduais endocranianos foi avaliada e se observou se a presença da dura-máter poderia influir no processo regenerativo, assim, quando a dura-máter e o perióstio foram excluídos por uma membrana a formação e mineralização óssea foi semelhante à observada em locais onde esses componentes teciduais estiveram presentes; tendo os mesmos resultados com a presença ou não do perióstio (111). Isso é uma característica dos defeitos chamados críticos que não tem a capacidade de formar osso suficiente e fechar o defeito, nos quais a formação óssea é restrita só as bordas (105).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar qualitativamente o efeito na formação óssea da administração local do alendronato sódico quando adicionado a dois substitutos ósseos: XEP e β -TCP, e da adição de AL e PRF ao β -TCP na possibilidade de diminuir sua rápida reabsorção e melhorar o suporte à membrana em defeitos de calvaria de ratos Wistar por análise histológica e imuno-histoquímica após quatro e oito semanas. Proposição geral

3.2 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

- Analise histológico (HE e Mallory) e histoquímico (TRAP) da formação de osso novo quando AL é adicionado no XEP e β -TCP em defeitos críticos de calvária de ratos Wistar.
- Analise histológico (HE e Mallory) e histoquímico (TRAP) do efeito da adição de AL e PRF na reabsorção dos grânulos de β -TCP e sua capacidade de melhorar o suporte à membrana em defeitos críticos de calvária de ratos Wistar.
- Estudar a imunomarcação de OPN no processo de neoformação e maturação óssea em defeitos de calvária quando o AL é adicionado a XEP e β -TCP e quando PRF é adicionado ao β -TCP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida de acordo com os princípios éticos e legais de pesquisa de uso de animais (NIH publicação 85-23, 1985) e leis nacionais (nº 11.794) sobre o uso de animais que foram observados para o presente estudo. Manejo e protocolo cirúrgico foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), Brasil, registrado com o N° 010/2017.

Dois tipos de substituto do osso para ROG foram usados para sua avaliação em defeitos de calvária de ratos Wistar adultos machos:

1. Xenoenxerto porcino granulado (XEP) com partículas hidratadas com gel de colágeno (granulometria 600–1000 μm , MP3®, Osteobiol, Itália).
2. Fosfato Tricálcico beta granulado (β -TCP), partículas de cerâmica sintética de fase pura (granulometria 100-500 μm , Beta TCP®, Bioinnovation, Brasil).

A membrana utilizada para ROG foi material de colágeno de lenta reabsorção (Evolution®, Osteobiol, Itália) de origem porcino, com espessura de 0.5 ± 0.1 mm.

O Alendronato de sódio (5 g) foi obtido de farmácia de manipulação (Fórmula & Ação, São Paulo, Brasil).

4.1 ANIMAIS

Cem ratos albinos machos da linhagem Wistar (idade >3 meses, peso 300 a 400 g) foram utilizados no estudo. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Oral da FOUSP, em salas com temperatura e umidade controladas, e ciclos de luz de 12/12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*. Cinco grupos de estudo foram estabelecidos para a pesquisa:

1. GRUPO XE-C: Controle, xenoenxerto porcino granulado, hidratado em gel de colágeno (MP3®, Osteobiol, Itália), 30 dias (n=10) e 60 dias (n=10).
2. GRUPO XE-AL: Xenoenxerto porcino granulado, hidratado em gel de colágeno (MP3®, Osteobiol, Itália) embebido em alendronato sódico (1g/ml) por 5 minutos, 30 dias (n=10) e 60 dias (n=10).
3. GRUPO TCP-C: Controle, β -TCP, cerâmica sintética de fosfato tricálcico beta (Beta TCP®, Bioinnovation, Brasil). 30 dias (n=10) e 60 dias (n=10).
4. GRUPO TCP-AL: β -TCP, cerâmica sintética de fosfato tricálcico beta (Beta TCP®, Bioinnovation, Brasil) embebido em alendronato sódico (1g/ml) por 5 minutos, 30 dias (n=10) e 60 dias (n=10).
5. GRUPO TCP-PRF: β -TCP, cerâmica sintética de fosfato tricálcico beta (Beta TCP®, Bioinnovation, Brasil) adicionado com PRF, 30 dias (n=10) e 60 dias (n=10).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Protocolo Pré-Operatório

Os instrumentos cirúrgicos foram inicialmente esterilizados em uma autoclave e a mesa cirúrgica desinfetada com etanol a 90% vol. (101).

Os animais foram pesados para o cálculo da quantidade de solução anestésica a ser injetada. A indução da anestesia geral foi pela via intramuscular com cloridrato de xilazina (Anasedan, Ceva Santé Animale, Brasil.) (0,85 ml/kg), e cloridrato de ketamina (Quetamina, Vetnil, Brasil) (0,85 ml/Kg)(112); em proporção de 1: 1 (34). Após constatado o efeito anestésico pela falta de reflexo para a pinça do dedo do pé, começou-se o barbeado com cortador elétrico da pele que reveste a calota do rato, limpando a área barbeada com clorexidina 0,2%.

Figura 2-1.- Protocolo de obtenção do PRF. A: aquecimento da cauda. B: punção e coleta do sangue. C: Sangue coletado: 0,5 ml. D e E: centrifugação, 12 min a 2900 rpm. F: PRF obtido depois da centrifugação. G1: composição do sangue centrifugado segundo Dohan et al. (89). G2: comparação do PRF obtido com G1.

Fonte: A – F: Autor. G1: adaptação de (89) para G2 amostra do autor.

Para o grupo do PRF, prévio à cirurgia se preparou o animal aquecendo por um minuto a cauda do rato em água morna, a 35°C. O sangue foi obtido por médio de punção superficial com um bisturi 15C na região ventral entre a porção proximal e médio da cauda, mantendo pressão na porção distal para estimular o sangrado,

conseguindo 0,5 ml de sangue com pipeta estéril descartável e coletados em micro tubo cônico de centrifugação tipo eppendorf sem exceder o tempo de um minuto e meio para prevenir a coagulação sem necessidade de adicionar anticoagulantes. Imediatamente o sangue coletado foi levado a uma microcentrífuga (Mini-Spin-Eppendorf, Alemanha) e centrifugado por 12 min a 2900 rpm (58) (Figura 2-1). O PRF obtido ficou no micro tubo até sua utilização.

4.2.2 Protocolo Operatório

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo investigador, quem foi calibrado no procedimento.

Usando um bisturi 15c, foi feita uma incisão lineal no plano sagital de aproximadamente 1,5-2 cm sobre a pele, até o periósteeo, desde o osso nasal até a crista sagital média. Dividiu-se nitidamente o periósteeo pela linha média sagital com o bisturi e, então, foi levantado lateralmente o retalho de espessura total com legira Molt. As inserções da parte anterior e posterior (frontal e occipital) do periósteeo foram liberadas. Uma pinça de campo manteve afastados os tecidos moles como retrator expondo o osso subjacente (Figura 2-1 B). Ao elevar o periósteeo, foram encontradas bordas laterais, além das quais o periósteeo não pôde ser elevado; estas definiram os limites do campo cirúrgico / exposição (101).

Uma perfuração ao longo de toda a espessura da díploee foi realizada com uma trefina cirúrgica de 5 mm de diâmetro externo (Dentoflex®, Brasil) montada num motor operando a 800 RPM (Driller®, Brazil) e com irrigação constante com solução de cloreto de sódio a 0,9% (Lab. Tayuna, Brasil). O defeito foi preparado na região central do osso parietal direito (112). Uma pressão suave foi aplicada para aprofundar a trefina até perceber falta de resistência tomando cuidado de não danificar a dura-máter (82).

Figura 2-2.- Procedimento cirúrgico. A: indução da anestesia. B: osso exposto. C: defeito crítico de 5 mm. D: confirmação do diâmetro da trefina para estandardização do procedimento. E: dura-máter intacta. F: colocação d material de enxerto. G: colocação da membrana.

Fonte: Autor

Uma Legra Molt foi usada para levantar cuidadosamente a margem do defeito e desprender o osso. A liberação do disco foi obtida com movimentos leves como alavanca no contorno, posteriormente se realizou a lavagem do defeito com soro fisiológico e procedeu-se à colocação do material de enxerto (Figura 2-2 F):

- 1) Nos grupos controle, os defeitos foram preenchidos com partículas de osso porcino pré-hidratado com gel de colágeno (MP3®, Osteobiol, Itália) ou β -TCP (Beta TCP®, Bioinnovation, Brasil) sem adicionamento de nenhuma substância.
- 2) Para os grupos do AL, os defeitos foram preenchidos com enxerto porcino ou sintético (MP3® e Beta TCP®) que ficaram imersos previamente em solução de alendronato sódico (1 g/ml) por 5 minutos (82), (Figura 2-3 A, B e C).

- 3) Para o grupo PRF, o coágulo preparado na centrífuga foi tirado do micro tubo. Logo a fibrina foi separada com tesouras do coágulo. Posteriormente, num vaso dappen estéril, a fibrina foi misturada com osso e colocada no defeito (Figura 2-3 F até H).

Figura 2-3.- Hidratação com alendronato (A, B, C). β -TCP (D) e XEP (E) preenchendo o defeito. Separação do PRF do coágulo (F e G), colocação no defeito (H). Diferença na consistência entre XEP e β -TCP (D-E). Hemostasia com esponja de colágeno na cauda (I)

Finalmente foi posicionada a membrana (Evolution®, Osteobiol, Itália) sobre o defeito, cobrindo o material (Figura 2-2 G). Nos grupos adicionados com AL a membrana foi hidratada junto com o enxerto. O procedimento cirúrgico foi concluído com a reposição cuidadosa do retalho com o periósteo incluso e verificando que a membrana não se movimentou. Foi realizada uma sutura simples interrompida com fio de sutura Nylon 4-0 monofilamento. (Nylon, Technofio, Brasil) seguido pela limpeza da pele com soro fisiológico.

4.2.3 Cuidados Pós-Operatórios

Uma vez concluído o procedimento cirúrgico se administrou pela via subcutânea 10 µl de dipirona sódica (solução-500 mg/50 ml, Zoetis, Brasil) para analgesia pós-operatória, transferindo os ratos para gaiolas individuais, sob observação pós-operatória (mantida até por 2 horas). A administração de antibiótico não foi considerada por quanto se tratava de ratos adultos saudáveis e o procedimento cirúrgico foi desenvolvido com cuidados de assepsia. Além disso, procurou-se evitar a administração de substâncias que possam interferir com a avaliação do estudo. Na cauda, foi colocada uma membrana de colágeno hemostática (Hemospon cote, Technew, Brasil), para favorecer a hemostasia e cicatrização (Figura 2-3 I).

4.2.4 Coleta de Amostras e Processamento Histológico

Ao final de cada tempo estabelecido, os animais foram anestesiados como foi descrito e sacrificados. Os defeitos e as áreas vizinhas removeram-se em bloco com cuidado de não danificar a área de estudo. Os blocos foram fixados em uma solução contendo glutaraldeído a 0,1% (Electron Microscopy Sciences, EUA) + formaldeído a 4% (Sigma chemical, EUA), tamponados em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2, preparada anteriormente no mesmo dia do sacrifício. Os espécimes foram imersos rapidamente em um frasco de vidro contendo 5 ml da solução fixadora a temperatura ambiente, e posteriormente colocados em um recipiente maior de vidro cheio de gelo

e submetidos à irradiação de micro-ondas em forno de laboratório Pelco 3440 (Ted Pella, Redding, C.A. USA), a uma temperatura máxima de 37 °C (113). O material foi exposto a 3 ciclos de 5 minutos a 100% de potência, trocando a solução fixadora em cada ciclo e mantendo gelo no recipiente (114). Em seguida esse material foi imerso em nova solução fixadora e permaneceu durante a noite. Após esse procedimento, no dia seguinte o material foi lavado em 6 ciclos de 10 minutos de tampão fosfato 0.05 M e colocado para ser descalcificado em EDTA (Merk, Alemanha) a 4,13% pH 7,2 durante quarenta e cinco dias aproximadamente com trocas semanais da solução, completado este tempo as amostras foram reduzidas sequencialmente com lâminas de barbear até completar o corte final padronizado (Figura 2-4).

Figura 2-4.- Padronização da redução progressiva das amostras após a descalcificação para posterior inclusão em parafina. Sequencia demonstrada de A para F.

Fonte: Autor.

Posteriormente as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e diafanizados em xilol, embebidas em parafina com a borda principal da amostra em posição paralela ao plano horizontal. Cortes de 4,5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo (Microm HM-360, Alemanha) (112, 115).

As lâminas foram submetidas a protocolos padronizados do laboratório de Biologia Oral da FOU SP para coloração com as técnicas de hematoxilina-eosina.

Para a técnica de tricrômico de Mallory, as lâminas foram sequencialmente desparafinizadas com xilol em estufa a 60°C, hidratadas em concentrações decrescentes de etanol e coradas com tricrômico de Mallory: solução A (fucsina ácida), lavagem, solução B (azul de anilina e orange G) , desidratadas (etanol-xilol) e montadas com EntellanVR (Merck, Alemanha).

Seções adicionais de todos os grupos foram incubadas para histoquímica TRAP. As seções foram incubadas a banho maria em meio completo de Burstone (substrato de fosfato de Naftol As-Bi + NN-dimetilformamida + tampão acetato 0,2M + FastRed Violet LB + 10% MgCl + 50 mM D (-) ácido tartárico) a 37° C (Sigma Chemical, EUA) durante 3 h, enxaguados em água corrente e contrastados com hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas com Entellan VR (Merck, Alemanha) (115).

Para detecção imuno-histoquímica de OPN outras seções adicionais foram coletadas em lâminas de vidro revestidas com silano pela solução de 3-aminopropytriethoxy-silane (Sigma Chemical CO, St Louis, Mo/USA) a 20% em álcool absoluto. Para o procedimento foram desparafinizados em xilol, a 60°C e em seguida à temperatura ambiente e finalmente hidratados em concentrações decrescentes de etanol; para remoção do pigmento do fixador, os cortes foram imersos em solução preparada com hidróxido de sódio a 10% e álcool absoluto (1:1) durante 5 minutos. Posteriormente, foram lavados em água destilada, antes do bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio a 30% e metanol (1:1), foram lavados com água destilada em duas passagens e posteriormente tiveram dois banhos de solução de Tris pH 7,4, por 2 minutos cada.

As incubações foram realizadas com anticorpo monoclonal IgG1 [anti-OPN 1:1000 (Santa Cruz Biotechnologysc- 21742)] durante 3 horas à temperatura ambiente dentro de uma câmara húmida. Depois de enxaguar com tampão TRIS, pH 7,4, a detecção foi conseguida com anticorpos de cabra HRP por 30 minutos (Dualk like system- EnVision, DAKO). Depois foi realizada imersão em solução Tris pH 7,4, por 5 minutos cada. Para a revelação, foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina

(DAB, 3,3'diaminobenzidina, Dako) como substrato e contrastada com a hematoxilina de Mayer. As lâminas foram montadas com Entellan VR (Merck, Alemanha).

4.2.5 Análise Histológica

Após a coloração com HE, Mallory, histoquímica TRAP e imuno-histoquímica para OPN, todas as análises neste estudo foram realizadas com distintas ampliações em microscópio binocular de luz Olympus BX-60 (Olympus, Japão) equipado com uma câmara Olympus DP72 CCD (Japão). A capacidade osteocondutora dos biomateriais foi avaliada verificando nova formação óssea diretamente na superfície das partículas e nos bordos do defeito; além disso foi avaliada a reabsorção dos grânulos de β -TCP nos dois tempos de estudo (30 e 60 dias); e a membrana na sua integridade e posicionamento em relação à área do defeito e sua capacidade de formar osso independentemente dos grânulos.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

A cura pós-operatória transcorreu sem intercorrências e todos os animais preencheram os períodos de estabelecidos. A pele da ferida se apresentou clinicamente saudável sem sinais de infecção, cobriu os defeitos em todos os animais e fechou sem inconveniências. Remanescentes da sutura reabsorvível foram vistos entre 2 e 4 semanas. Nos animais do grupo PRF, a reparação da cauda foi rápida, observando-se que a ferida fechou em no máximo 7 dias.

Nos grupos do β -TCP adicionados com PRF foi possível obter uma massa uniforme, esta consistência melhorou a manipulação, transporte e colocação do material. Nos outros grupos do β -TCP, foi difícil manipular e manter o material no defeito durante o procedimento cirúrgico; além disso, foi observado nas amostras o espalhamento dos grânulos para fora da área do defeito, assim, nos espécimes obtidos aos 30 dias, nos grupos não adicionados com o PRF, foi possível observar macroscopicamente o material fora da área do defeito (Figura 5-1).

Nos grupos do XEP, a manipulação foi ótima e não existiu espalhamento do material, principalmente pela consistência como resultado da adição do gel de colágeno e a apresentação do produto em seringa.

A preservação da membrana foi evidente em todos os grupos e tempos planejados, em todas as amostras foi observada a membrana entre a pele e o osso depois dos tempos de estudo (4 e 8 semanas).

Figura 5-1.- Blocos de osso parietal após terem sido removidos da calvária e antes de sua fixação, A: Bloco da amostra de β -TCP-C 30 dias, observe-se o espalhamento do material (setas amarelas) fora da membrana (M). B: Bloco da amostra de XEP-C sem espalhamento. C: integridade da membrana (M) em todos os tempos cirúrgicos e todos os grupos. A membrana se encontra bem delimitada embaixo do periósteo (asterisco) e a pele

Fonte: Autor.

5.2 ANALISE HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA TRAP

O corte transversal típico dos defeitos de calvária de ratos compreendia as bordas do defeito e a área regenerativa limitada pela dura-máter e a membrana. A membrana de colágeno permaneceu em geral bem posicionada ao longo da porção superior do defeito durante os tempos do estudo (30 e 60 dias). A análise histológica mostrou que a membrana tinha cumprido sua função e estava em contato com os tecidos moles sobrepostos. Foi observada a infiltração de células na membrana de colágeno, o que pode ser considerado parte do processo de reabsorção; nos grupos de β -TCP observou-se tendência ao colapso da membrana.

5.2.1 Grupos de 30 Dias

5.2.1.1 Xenoenxerto - Controle (XE-C 30)

O grupo controle apresentou grânulos de XEP de tamanho heterogêneo uniformemente distribuídos e ocupando a maior área do defeito. Entre os grânulos se observou fibras de tecido conjuntivo não mineralizadas, bem organizadas e concentradas maiormente em torno dos grânulos.

Foi possível observar osso primário aderido às bordas do defeito, maiormente formado na face da dura-máter. A membrana se encontrava bem posicionada e suportada pelo enxerto, evidenciando invasão de células em toda sua extensão, sem sinais de colapso (Figura 5-2 A, B e C).

Através do método de histoquímica para TRAP se observou pouca quantidade de células clásticas aderidas aos grânulos de XEP, o que evidencia a pouca reabsorção do enxerto (Figura 5-2 D).

No tricrômico de Mallory pode ser observado que o tecido conectivo é o tecido predominante na ROG. Não existiu presença de outros tecidos, o que é resultado do selamento do defeito pela membrana, o tecido conjuntivo se apresentou ocupando os espaços entre os grânulos, com maior concentração de fibras colágenas em torno dos grânulos de XEP (Figura 5-2 E).

Figura 5-2.- XE-C 30: A: as setas mostram as bordas do defeito delimitando a área. O XEP ocupa o espaço com grânulos de tamanho heterogêneo entre os quais se observa tecido conjuntivo (TC). Osso primário (asteriscos) é observado nas bordas, em pouca quantidade. A membrana (M) delimita toda a área superior. B: é possível distinguir os grânulos rodeados por tecido conjuntivo denso com alguns osteoblastos (OB) aderidos à superfície do xenoenxerto. C: pode-se apreciar osso primário (asteriscos) aderido às bordas do defeito. D: a marcação para TRAP apresentou poucas células clásticas (OTC) aderidas aos grânulos. E: o tecido conjuntivo que envolve os grânulos é mais denso e organizado que aquele que se encontra entre os grânulos, como é evidenciado, em azul, pelo tricrômico de Mallory. A: 40X; B: 200X; C: 100X; D: 400X; E:200 X.

Fonte: Autor.

5.2.1.2 Xenoenxerto - Alendronato Sódico (XE-AI 30)

O grupo xenoenxerto adicionado com alendronato apresentou grânulos de XE de tamanho heterogêneo, distribuídos uniformemente no defeito. Pequenas quantidades de osso primário foram observadas em contato com os grânulos e nas bordas do defeito, principalmente do lado da dura-máter (Figura 5-3 A e B). Em torno dos grânulos, uma matriz densa de fibras rodeia os grânulos e se observa osteoblastos aderidos à superfície do enxerto (Figura 5-3 C).

A membrana esteve presente cobrindo toda a área do defeito suportada pelo material de enxerto. Foi possível observar pequenas zonas de condensação de fibras e células na face inferior da membrana em contato com a zona de regeneração (Figura 5-3 A e C).

A histoquímica para TRAP mostrou marcação positiva em somente alguns grânulos, com poucos osteoclastos por grânulo (até dois) (Figura 5-3 D).

No tricrômico de Mallory foi possível observar tecido conjuntivo com condensação variável, sendo mais denso e organizado na matriz de osso primário e menos denso entre os grânulos (Figura 5-3 E).

Figura 5-3.- XE-AL 30. A: observa-se grânulos de xenoenxerto (XE) de tamanho heterogêneo distribuídos uniformemente entre as bordas do osso (setas) que amostram pouca formação do osso primário, os grânulos rodeados por tecido conjuntivo (TC) com áreas de condensação (TCd). A membrana (M) apresenta zonas isoladas de condensação de fibras na face inferior. B: mostra-se a borda do defeito e alguns grânulos de XE com formação de osso primário (asterisco) na sua superfície e tecido conjuntivo fibroso (TC) entre estes. C: observa-se grânulos de XE revestidos por tecido conjuntivo denso com presença de osteoblastos (OB). Na parte superior a membrana apresenta condensação de fibras, sem relação aos grânulos de enxerto. D: marcação positiva de poucos osteoclastos para TRAP, se observam dois osteoclastos (OTC) com distinta marcação. E: tricrômico de Mallory permite evidenciar, em azul, o tecido conectivo e sua diferente organização, sendo mais denso no osso primário (asterisco). A: 40X, B: 100X, C: 200X, D: 400X, E: 200X.

5.2.1.3 β -TCP – Controle (TCP-C 30)

No grupo β -TCP controle observa-se um padrão diferente de formação óssea do descrito previamente para o grupo de XEP.

A membrana cobre totalmente o defeito, no entanto, podem ser observadas áreas de depressão em locais sem suporte adequado do enxerto pelo espalhamento do material.

Entre as bordas, a área do defeito está ocupada por grânulos pequenos de β -TCP e distribuídos uniformemente. As partículas de enxerto são rodeadas por feixes densos de fibras colágenas, com osteoblastos e formação do osso primário em torno de alguns grânulos (Figura 5-4 A-B e C). Algumas “pontes” de osso entre os grânulos podem ser observadas.

Através do método de histoquímica para TRAP podem ser observados osteoclastos em grande quantidade, cobrindo toda a superfície dos grânulos (Figura 5-4 D).

Nos cortes histológicos tratados pela coloração tricrômico de Mallory se pode observar a disposição desorganizada das fibras colágenas do osso primário formado em íntimo contato com os grânulos de enxerto (Figura 5-4 E).

Figura 5-4.- TCP-C 30. A: entre as bordas do defeito (setas), pequenos grânulos de β -TCP estão rodeados por osso primário (asterisco) ou por tecido conjuntivo denso (TCd). B: observa-se pontes de osso (setas vermelhas) entre alguns grânulos. O defeito está coberto pela membrana (M), no entanto existe depressão respeito às bordas. C: β -TCP mostra na sua superfície condensação de células (osteoblastos) formando matriz de osso primário. D: A histoquímica para TRAP permite observar uma grande quantidade de OTC rodeando os grânulos. E: em tricrômico de Mallory mostra-se, em azul, matriz do osso primário (asterisco) e fibras colágenas do tecido conjuntivo fibroso. A: 40X, B: 100X, C: 400X, D: 400x, E:200X.

Fonte: Autor.

5.2.1.4 β -TCP – Alendronato Sódico (TCP-AL 30):

No grupo β -TCP adicionado com alendronato sódico observou-se o defeito preenchido com tecido conjuntivo e grânulos de enxerto distribuídos uniformemente.

A membrana cobre uniformemente toda a região superior do defeito; bem suportada pelos grânulos de β -TCP. Poucas áreas com leve depressão foram observadas. Alguns grânulos parecem manter seu volume sem serem reabsorvidos.

Nas bordas se observou formação de osso primário, principalmente do lado da dura-máter. Tecido conjuntivo denso e organizado, bem como zonas de formação do osso primário rodeando dos grânulos foram observadas (Figura 5-5).

Na superfície dos grânulos de β -TCP se encontravam numerosas células clásticas marcadas positivamente para TRAP. (Figura 5-5 D).

O tricrômico de Mallory mostrou, em azul, matriz do osso primário densamente organizado que se diferencia do tecido conjuntivo entre os grânulos, que é menos denso (Figura 5-5 E).

Figura 5-5.- TCP-AL 30. A: Entre as setas que limitam o defeito pode-se observar distribuídos uniformemente no defeito grânulos de β -TCP (TCP) com formação de osso primário (asterisco). A membrana (M) cobre o defeito completamente. B: Osso primário (asterisco) se forma com preferência sobre os grânulos da zona inferior do defeito, próximos à dura-máter. C: algumas pontes de osso primário se formam entre os grânulos (asteriscos). Tecido conjuntivo denso com osteoblastos (TCd) rodeia o β -TCP. D: TRAP permite observar osteoclastos (OTC) na superfície dos grânulos. E: No tricrômico de Mallory observou-se, em azul, matriz do osso primário que rodeia os grânulos (TCd) de β -TCP, bem como as fibras colágenas do tecido conjuntivo (TC) entre estes. A: 40X, B: 10X, C: 200X, D: 400X, E: 20X.

Fonte: Autor.

5.2.1.5 β -TCP – PRF (TCP-F 30)

No grupo β -TCP adicionado com PRF mostra diferencia com os grupos β -TCP C e AL pela intensa reabsorção dos grânulos de enxerto, o escasso número destes e a mínima formação do osso.

Neste grupo a área do defeito foi preenchida predominantemente por tecido conjuntivo, foram observados poucos grânulos de β -TCP os que apresentam reabsorção intensa, o que trouxe como consequência grânulos muito pequenos que não ofereciam suporte adequado à membrana (Figura 5-6 A).

A membrana cobria completamente toda a superfície do defeito, no entanto apresenta uma depressão importante.

A formação do osso novo esteve restrita as bordas do defeito. O tecido conjuntivo não apresentou zonas de condensação em torno dos grânulos nem se observaram osteoblastos ao redor dos grânulos.

A marcação histoquímica para TRAP permitiu distinguir grande quantidade de osteoclastos reabsorvendo as partículas de β -TCP.

Os cortes histológicos com a coloração de tricrômico de Mallory amostraram que o tecido conjuntivo predomina em todo o defeito e não é mais concentrado ao redor dos grânulos (Figura 5-6).

Figura 5-6.- TCP-F 30. A: observa-se a área delimitada pelas bordas (setas) com grânulos pequenos de β -TCP (TCP), distribuídos irregularmente. O tecido conjuntivo (TC) predomina e não se observa formação de osteóide em torno dos grânulos. A membrana (M) cobre toda a área, mas se encontra deprimida, até a metade do comprimento vertical do defeito. B: formação de osso primário (asterisco) está localizada nas bordas do defeito (setas). C: Algumas partículas de β -TCP se encontram rodeadas por células clásticas, o que é confirmado em D: marcação intensa de células clásticas na coloração TRAP, rodeando os grânulos. E: em azul observa-se que o tecido conjuntivo não se condensa em torno dos grânulos de enxerto. A: 40X, B: 100X, C: 400X, D: 400X, e: 200X.

Fonte: Autor.

5.2.2 Grupo 60 Dias

5.2.2.1 Xenoenxerto – Controle (XE-C 60)

Nos cortes histológicos do grupo XE-C 60, observou-se que os grânulos de enxerto neste tempo de estudo praticamente não foram reabsorvidos. Estes, ainda ocupavam a maior área do defeito mantendo suporte adequado à membrana até o fim do tempo do estudo.

A membrana estava bem posicionada e em íntimo contato com a zona de regeneração. Observou-se algumas zonas de condensação e formação do osso primário

Houve a presença de osso primário com poucos osteócitos em íntimo contato com os grânulos. Observou-se grande quantidade de células e zonas de intensa atividade do tecido conjuntivo que se condensa em torno aos grânulos do enxerto onde foi possível observar osteoblastos e osteócitos no osso formado.

Na histoquímica para TRAP foram marcadas poucas células clásticas, a reabsorção dos grânulos é lenta pela escassa presença de osteoclastos ativos (Figura 5-7 D).

A coloração do tricrômico de Mallory mostrou grânulos de tamanho similar que os grupos de 30 dias com tecido conjuntivo denso rodeando as partículas de XE (Figura 5-7 E).

Figura 5-7.- XE-C 60. A: os grânulos de XEP (XE) se encontram uniformemente distribuídos no defeito, envoltos em tecido conjuntivo (TC) que apresenta grandes áreas de condensação (TCd). Observa-se osso primário (OP) em zonas pequenas, unido aos grânulos de XEP e nas bordas. A membrana (M) é mantida na área superior do defeito e pode apresentar zonas de condensação de tecido fibroso (TCd) e formação de osso primário. B: e C: formação de osso primário em contato com o XEP, no qual estão presentes osteócitos (OC) e uma camada de osteoblastos (OB) secretando matriz óssea. D: poucos osteoclastos TRAP-positivos aparecem aderidos ao enxerto. E: Em azul, com tricrômico de Mallory, evidencia-se como o tecido conjuntivo se condensa em torno dos grânulos de XEP. A: 40X, B: 100X, C: 200X, D: 400X, E: 20x.

Fonte: Autor

5.2.2.2 Xenoenxerto – Alendronato Sódico (XE-AL 60)

Os cortes histológicos do grupo XE-AL 60 permitiram observar a presença dos grânulos de enxerto ocupando a maior parte da área do defeito com tecido conectivo entre as partículas do material de enxerto.

Foi generalizada a presença de osso primário em contato com os grânulos e, entre estes, existiu pouca quantidade de osso maduro. Se pode encontrar que a formação do osso relacionado com os grânulos foi maior no lado da dura-máter e esteve distribuído sempre em contato com os grânulos. Em algumas zonas de tecido conjuntivo foi possível observar zonas de condensação e acumulação de células. Na face inferior da membrana observou-se regiões de ossificação, sem relação com os grânulos do enxerto.

A histoquímica para TRAP mostrou que a presença de osteoclastos foi baixa, como se pode observar na Figura 5-8 D.

Os cortes histológicos preparados com tricrômico de Mallory apresentaram em azul a presença de grânulos de XEP rodeados por tecido conjuntivo mais denso, como é característico dos grupos de XEP.

Figura 5-8.- XE-AL 60. A: XE ocupa a maior parte do defeito, o tecido conjuntivo que rodeia os grânulos é mais denso (TCd) em torno de alguns grânulos, observa-se formação do osso primário (asterisco). B: Observa-se osso primário, e zonas de condensação do tecido conjuntivo. C: se pode observar formação de osso primário (asterisco) e áreas de maturação com presença de osteócitos (OC), pontes de osso entre os grânulos têm sido formados. D: na marcação para TRAP se encontrou positividade em poucas células, as quais estão aderidas à superfície dos grânulos do enxerto. E: em azul se observa a disposição característica do tecido conjuntivo em torno dos grânulos de XEP. A: 40X, B: 100X, C: 200X, D: 400X, E: 200X.

Fonte: Autor.

5.2.2.3 β -TCP – Controle (TCP-C 60)

No grupo β -TCP-60 observou-se que os grânulos de enxerto praticamente foram completamente reabsorvidos e que o defeito estava ocupado principalmente por osso formado com pouco tecido conjuntivo. No entanto entre o osso formado e as bordas do defeito foi possível observar feixes de fibras colágenas impedindo a união do osso novo com as bordas do defeito

Foi possível observar predomínio de osso primário, tendo relação com a membrana e com o osso formado em torno dos grânulos de β -TCP. O osso formado em relação à membrana foi imaturo, mas se observou a formação de pequenos espaços medulares dentro dos quais foi possível observar zonas de remodelação. O osso formado nos grânulos de β -TCP mostra disposição lamelar e osteócitos, características do osso maduro ou secundário (Figura 5-9).

A marcação para TRAP mostrou que a atividade de células clásticas esteve restrita a restos de grânulos e à remodelação do osso primário formado (Figura 5-9D).

Os cortes histológicos corados com tricrômico de Mallory permitiram diferenciar como o tecido conjuntivo do osso maduro se formou a partir do processo de remodelado do osso primário (Figura 5-9 E).

Figura 5-9.- TCP-C 60. A: o osso formado predomina no defeito, enquanto tecido conjuntivo (TC) está presente em pouca quantidade e permanece entre osso formado e a borda do defeito (lado direito). O osso formado é principalmente primário (asterisco) com zonas isoladas de osso secundário (OM). B: observa-se osso primário (asterisco) e osso maduro (OM). C: observa-se poucos grânulos de β -TCP, pode-se distinguir osteoblastos (OB) depositando matriz em torno dos grânulos e osteócitos (OC) dentro da matriz do osso maduro (OM). D: a marcação para TRAP de osteoclastos (OTC) participando do processo de remodelação do osso primário. E: no tricrômico de Mallory, em azul observa-se uma camada de osso maduro depositado sobre o osso primário (*). A: 40X, B: 100X, C: 200X, D: 400X, E: 200X.

Fonte: Autor.

5.2.2.4 β -TCP – Alendronato Sódico (TCP-AL 60)

No grupo de β -TCP embebido com alendronato observou-se a presença de alguns grânulos de β -TCP sem reabsorver. O defeito foi predominantemente ocupado com osso novo formado na face inferior da membrana e em torno dos grânulos de enxerto.

Os grânulos de β -TCP ainda presentes estavam rodeados por osso maduro de aparência lamelar, com osteócitos presentes dentro da matriz. Zonas de condensação de tecido conjuntivo e células mostraram que o processo de formação de osso ainda estava ativo. Algumas pontes se formaram entre o osso formado na face inferior da membrana e o osso dos grânulos, que quase formam uma sola estrutura óssea (Figura 5-10 B). Feixes de tecido conjuntivo normalmente separavam as bordas do defeito do osso formado. Na região superior de defeito observaram-se espaços medulares com zonas de remodelação.

A histoquímica TRAP permitiu observar osteoclastos ativos em torno dos grânulos e nas zonas da membrana onde o osso primário estava em processo de maturação.

A coloração do tricrômico de Mallory mostrou, em azul, as distintas formas de organização do tecido conjuntivo denso e organizado no osso maduro; denso e irregular no osso primário e pouco denso e irregular no tecido que preenchia o espaço entre o osso e os grânulos.

Figura 5-10.- TCP-AL 60. A: pode-se observar osso primário (asterisco) ocupando a maior parte do defeito, bem como grânulos de β -TCP sem reabsorver e osso maduro (OM). A membrana mostra osso primário, com espaços medulares em formação. B: pontes de osso formando-se entre osso da membrana e osso que rodeia os grânulos. C: formação de osso maduro, no qual se observam lamelas e osteócitos. D: Pelo TRAP é possível observar osteoclastos no osso da membrana e junto a alguns grânulos que ainda não se reabsorveram. E: em azul pelo tricrômico de Mallory mostra-se tecido conjuntivo organizado no osso primário (asterisco) e osso maduro (OM), bem como no tecido conjuntivo (TC) entre os grânulos. A: 40X, B: 100X, C: 400X, D: 400X, E: 200X.

Fonte: Autor.

5.2.2.5 β -TCP – PRF (TCP-F 60)

No grupo β -TCP adicionado com PRF se observou a ausência de formação óssea. (Figura 5-11). O tecido conjuntivo foi o predominante no preenchimento do defeito. Alguns grânulos pequenos de TCP foram observados, no entanto, a formação de osso em torno destes foi escassa.

Poucas zonas do defeito apresentaram osso primário formado em torno de alguns grânulos sem reabsorver. A maior parte do osso primário formado foi dependente da face inferior da membrana, com formação de espaços medulares onde se observou remodelação.

A marcação histoquímica para TRAP permitiu observar osteoclastos ativos em torno dos grânulos ainda presentes e nos espaços de remodelação de osso primário.

Com a coloração de tricrômico de Mallory se observou, em azul, a predominância do tecido conjuntivo preenchendo o defeito. A disposição característica das fibras colágenas foi evidente nos dois tipos de osso, primário e maduro.

Figura 5-11.- β -TCP F 60. A: o tecido conjuntivo (TC) predomina no defeito. Observam-se poucas partículas de β -TCP (TCP) rodeadas por fibras colágenas e, eventualmente, por osso. B: osso primário (asterisco) e osso maduro (OM) formados na face inferior da membrana. Tecido conjuntivo (TC) é o tecido predominante neste grupo. C: um grânulo de β -TCP rodeado de fibras colágenas permite observar o padrão de regeneração de este grupo, no qual foi pobre a formação de osso. Se observam fibras colágenas que envolvem o grânulo. D: osteoclastos (OTC) aderidos à superfície de um grânulo e no osso formado em processo de remodelação. E: em azul, pelo tricrômico de Mallory, mostra-se osso primário formado na membrana e em torno de dois grânulos de TCP. A: 40x, B: 200X, C: 400X, D: 200X, E: 200X.

Fonte: Autor

5.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA OPN

5.3.1 Grupo 30 Dias:

Não houve diferencia na marcação de OPN nos grupos de xenoenxerto. Esta proteína não colágena esteve restrita às bordas do defeito e na superfície de alguns grânulos de XEP onde o osso primário inicia sua formação, considerada como interface entre os grânulos de XEP e osteóide formado em torno dos grânulos, o que demonstra a presença de osteoblastos secretando matriz (Figura 5-12).

Rodeando os grânulos de β -TCP foi possível observar uma linha de marcação positiva como interface cimentante entre os grânulos e osteóide, e entre os grânulos e osso primário formado. No grupo de β -TCP adicionado com PRF a marcação foi quase inexistente pela pobre formação de osso primário neste grupo (Figura 5-12).

Figura 5-12.- OPN 30 DIAS: As fotomicrografias permitem observar marcação de OPN (setas) nos grupos do estudo. A: marcação positiva na superfície do grânulo de XEP e osteóide. B: marcação de OPN na superfície do grânulo como interface e no osso primário formado. C: OPN na interface entre os grânulos de β -TCP e o osso primário. D: OPN marcando a interface entre osteóide (OS) e a superfície do grânulo de β -TCP. E: marcação de OPN na superfície de osso primário formado ao redor de um grânulo de β -TCP.

Fonte: Autor.

5.3.2 Grupo 60 Dias:

Nos grupos de XEP se observou marcação de OPN na superfície, envolvendo as partículas de enxerto como linhas cimentantes entre os grânulos de enxerto e o osso formado. No osso primário a marcação esteve entre as fibras da matriz quando esta foi pouco organizada (Figura 5-13).

Nos grupos de β -TCP a marcação de OPN esteve localizada em linhas de aposição no osso maduro e em linhas de formação na remodelação do osso. Na zona da membrana se observaram espaços medulares que concentraram zonas de maturação do osso primário. A marcação no grupo β -TCP-PRF foi mínima, apenas nas regiões donde a membrana formou osso e começou a remodelação do osso primário.

A marcação da OPN foi intensa nas linhas cimentantes entre os grânulos de ambos os tipos de enxerto e o osso primário.

Figura 5-13.- OPN 60 DIAS: nos grupos de XE se observa formação do osso primário (OP). A OPN marca o contorno dos grânulos de enxerto como uma interfase cimentante. Nos grupos do β -TCP controle e AL se observa marcação em zonas de remodelação e em linhas de aposição do osso maduro. No grupo β -TCP-F observa-se marcação mínima em uma zona de remodelação no osso formado em relação à membrana.

5.4 FORMACAO DO OSSO NA MEMBRANA

Na face inferior da membrana, em todos os grupos, se observou formação de osso com um padrão diferente ao tipo aposicional que se apresentou em torno dos grânulos. A formação de osso esteve precedida pela concentração de células e fibras na face interna da membrana.

Normalmente, o osso se forma ao redor dos grânulos em íntimo contato e com uma linha cimentante como é evidenciado pela OPN, no entanto, na face inferior da membrana observou-se acumulação de células e posteriormente formação do osso primário em todos os grupos, este osso novo não esteve em contato com os grânulos de enxerto.

A OPN demonstrou marcação positiva na membrana de colágeno, onde se observou glóbulos de mineralização e osteoblastos secretando matriz orgânica. Foi possível encontrar osso primário e posteriormente osso secundário. Osteoclastos foram diferenciados pelo TRAP reabsorvendo osso primário antes da maturação óssea (Figura 5-14).

Figura 5-14.- A: marcação positiva de OPN em regiões da membrana. B. condensação de fibras e células na face inferior da membrana (setas). C: remodelado do osso primário (OP) e formação do osso maduro (OS). D: pontes de osso entre o osso formado na membrana e o osso formado em torno dos grânulos de enxerto.

Fonte: Autor

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou maior e mais rápida formação de osso nos grupos XEP e β -TCP quando adicionados com AL do que nos grupos controle. Além disso, o AL teve um efeito inibidor da reabsorção dos grânulos de β -TCP, apresentando melhor suporte para a membrana do que no grupo controle, no entanto, não foi tão efetivo na inibição do colapso da mesma como no grupo XEP. Geralmente, nos grupos do β -TCP se observou maior formação do osso em ambos os tempos de estudo em relação com os grupos do XEP. A adição do PRF permitiu uma manipulação mais fácil e com menor espalhamento do β -TCP, porém este grupo apresentou pouca formação óssea e mais rápida reabsorção dos grânulos, fracassando no processo da ROG. Além disso, foi observado formação de osso adjacente à membrana, independentemente do biomaterial de preenchimento do defeito.

O modelo utilizado foi o defeito crítico no osso parietal do rato, conveniente para o estudo da regeneração óssea, uma vez que é fácil de manejar, estável e tem risco mínimo de complicações (111); é um modelo ortotópico para estudo da regeneração óssea, é amplamente utilizado e permite uma comparação precisa das substâncias enxertadas; parece ser dos poucos modelos em que o tamanho e o trauma podem ser padronizados (105). Todavia, a principal vantagem do defeito de 5,0 mm de diâmetro é o fato que permite a criação de dois defeitos na região central dos ossos parietais, onde os locais de controle e experimental poderiam ser realizados no mesmo animal de forma padronizada sem envolver a sutura sagital onde, sabidamente, existem células indiferenciadas (98). Além disso, foi planejada a realização de apenas um defeito crítico por animal, no parietal direito, considerando o potencial para interatuar destes dois defeitos que poderiam contaminar o defeito vizinho (101), devido à utilização do alendronato local e a consistência fluida do β -TCP.

Foram utilizados ratos adultos de 3 meses de idade com a finalidade de evitar o imenso potencial regenerativo que os animais de menor idade possuem por estarem em crescimento (98, 105). Na procura da utilização do menor número de animais e seguindo os princípios éticos quando animais são utilizados em pesquisa (redução,

refinamento e substituição ou 3Rs) (33, 116, 117) nenhum grupo sem preenchimento com biomaterial foi incluído, considerando que existe evidência suficiente na literatura para considerar como críticos defeitos de 5 mm (98). Além disso, a utilização dos animais somente no número necessário para a avaliação microscópica da regeneração óssea não permitiu análises quantitativas, as quais precisariam da utilização de muitos animais por grupo, tendo em vista as características dos defeitos que nem sempre se apresentam homogêneos na sua regeneração.

Xenoinxertos porcino e β -TCP têm sido amplamente estudados como materiais que podem ser usados em procedimentos de ROG (1, 6, 7, 14). Para este propósito, em estudos anteriores *in vivo*, utilizando o modelo da presente pesquisa, tempos de 4 e 8 semanas foram considerados (63, 70, 118). Porém, foi verificado em nosso estudo que para os XEs este período é insuficiente, devido ao heterogêneo e lento processo de degradação destes substitutos e que períodos mais longos devem ser considerados. Nos XEs, as partículas mostram muito pouca ou nenhuma reabsorção após um período de 8 semanas (106). Além disso, o osso novo formado geralmente é primário, precisando sofrer um processo de remodelação ainda mais longo, cuja observação deveria ser parte dos objetivos de pesquisa.

Semelhante com o XEB, que apresenta lenta atividade e pouca ou nenhuma reabsorção (34, 49, 71, 72, 118), foi observado que o XEP tem uma reabsorção muito baixa e pouca neoformação óssea. Poucos pesquisadores observaram a completa substituição pelo osso hospedeiro, porém após 45 meses de avaliação (73).

A marcação com OPN demonstrou que o XEP e o β -TCP são enxertos que tem um comportamento e padrão diferentes na formação óssea, havendo-se observado resultados distintos nos dois tempos de estudo. Assim, às 4 semanas, o β -TCP formou osso primário mais rápido em torno de alguns grânulos, o que não foi observado no XE no mesmo tempo. Às 8 semanas, o β -TCP quase preencheu completamente o defeito e se observou osso secundário maduro, enquanto ao redor do XEP formou-se apenas osso primário. Independentemente da quantidade variável entre os grupos, como foi observado na marcação da OPN, o osso novo foi produzido em íntimo contato com os grânulos como uma linha cimentante em torno destes sem presença de tecido conjuntivo, o que demonstra a bioatividade de

ambos os enxertos e confirma que XE e β -TCP são bons osteocondutores (46). Os materiais bioativos estimulam a formação de tecido ósseo e, portanto, se ligam diretamente ao osso e, assim, formam uma interface biomaterial/osso forte (14).

Apesar de que nos grupos do β -TCP, se observou maior quantidade de osso formado que nos grupos do XEP, analisando em conjunto o osso formado mais o enxerto o resultado é inverso. Como os grânulos de XEP se reabsorvem pouco e o osso formado se adere a estes por meio de uma espécie de linha cimentante, a área ocupada pelo conjunto é maior do que no β -TCP. Jensen et al. (2006), já explicaram que defeitos enxertados com XE demonstraram significativamente menos formação óssea do que aqueles enxertados com β -TCP ou autoenxerto às 8 semanas; no entanto, a fração total de tecido mineralizado foi maior no XE (71%) que no β -TCP (65%) e no autoenxerto (59%).

A incorporação quase completa das partículas de XEB no osso criam uma rede trabecular como é no osso esponjoso (7). Porém, este modelo que se forma não corresponde à estrutura compacta do osso parietal. Os resultados encontrados no presente estudo até 8 semanas sugerem que o modelo de formação óssea do XEP não deveria ser avaliado em defeitos de calvaria que apresenta uma estrutura típica dos ossos planos compactos.

Por sua vez, o β -TCP, embora apresente maior formação do osso primário, também é reabsorvido mais rapidamente, pelo que, em conjunto, a área formada pelo o enxerto mais o osso novo diminui, permitindo que a membrana se deprima, o que é diferente com o XE que fornece melhor suporte. A pouca capacidade de impedir o colapso da membrana pela rápida reabsorção do β -TCP (7), e o comportamento diferente dos materiais utilizados no presente estudo (XEP e β -TCP) deve ser considerada quando se trate de eleger o material substituto de osso, levando em consideração o tipo de defeito, a capacidade de dar suporte à membrana e o tempo no qual se poderia conseguir regeneração. É bem estabelecido que o tipo de defeito determina a técnica e os materiais de escolha na ROG (1, 5).

Além do efeito inibidor na função dos osteoclastos, a análise histológica revelou que nos grupos do XEP e β -TCP adicionados com AL a formação do osso foi maior

e mais rápida, sugerindo que pode ter exercido um efeito favorável na formação do osso, talvez pela preservação de osteócitos e principalmente osteoblastos do AL (9).

No grupo β -TCP adicionado com AL, a histoquímica para TRAP mostrou menor quantidade de osteoclastos em torno dos grânulos do que no grupo controle, conseguindo retardar a reabsorção dos grânulos de β -TCP que ainda estiveram presentes ao final do estudo às 8 semanas. Nesses espécimes, o suporte outorgado à membrana foi melhor quando se adicionou AL ao β -TCP.

A formação óssea no grupo controle e no grupo adicionado com AL do β -TCP quase preencheu o defeito no tempo final do estudo. No entanto foi observado que não existia continuidade entre o osso formado com as bordas do defeito. Existe a possibilidade de movimentação da membrana pelo tipo de defeito o que teria permitido que tecido conjuntivo de fora penetrasse entre o osso novo e as bordas do defeito. O movimento e a reabsorção da membrana se combinam para romper a superfície do coágulo e permitir o desenvolvimento mais fácil de uma camada de tecido conjuntivo entre a membrana e o coágulo rompido, diminuindo a quantidade de osso regenerado. Além disso, tal ruptura de coágulo e intrusão da camada de tecido conjuntivo podem resultar no isolamento de partículas de enxerto dentro de uma matriz de tecido mole, evitando assim a sua reabsorção (35).

Em relação à adição do PRF ao β -TCP, embora alguns relatos tenham apresentado um efeito benéfico da sua adição a este ou outros biomateriais de enxerto (119, 120), foi observado grande reabsorção dos grânulos e pouca formação de osso no grupo β -TCP + PRF. Como resultado desses eventos a membrana colapsou, apresentando uma grande diminuição da área regenerativa. Isso foi evidenciado pela alta marcação para TRAP que mostrou nos dois tempos de estudo grânulos cobertos por numerosos osteoclastos o que resultou na sua acelerada reabsorção. Estes resultados concordam com outros estudos que não revelaram vantagens clínicas (93, 106, 121), Kiliç et al. (2016), encontraram que a adição do PRF ao β -TCP apresentava menor densidade de células osteoprogenitoras que o grupo controle β -TCP sem PRF, no entanto, a densidade média de células ósseas incluindo osteoclastos não apresentava diferenças significantes. Pode-se inferir em nosso estudo que uma baixa quantidade de células osteoprogenitoras não conseguiu estimular formação óssea senão a diferenciação de células clásticas que

acelerou a reabsorção dos grânulos. No modelo utilizado para nosso estudo, a adição de PRF no β -TCP permitiu uma melhor manipulação do material e se observou a diminuição do espalhamento além do defeito ósseo; no entanto, o resultado do processo regenerativo foi pobre.

Nesta pesquisa no modelo de defeito de calvaria de ratos foi utilizada uma membrana reticulada de colágeno porcino, que permaneceu estável até o tempo máximo do estudo (60 dias). É uma condição indispensável o uso de membrana na ROG, defeitos sem membrana e sem preenchimento de osso, bem como defeitos com preenchimento de osso e sem membrana têm apresentado uma quantidade significativa menor de osso formado em relação a defeitos com membrana e preenchidos com biomaterial (45). As membranas reticuladas possuem uma taxa de degradação mais lenta e permitem que células seletivas repovoem as áreas da ferida (42). O padrão de formação óssea observado em relação à membrana mostrou-se diferente do tipo de osso que se forma em torno dos grânulos dos enxertos (XEP e β -TCP) nos quais osteoblastos formam osso diretamente sobre os grânulos, no entanto, a marcação com OPN permitiu observar formação do osso sem dependência do material de enxerto. Agindo a membrana como um “scaffold” ou arcabouço que permite a invasão de células que são diferenciadas em osteoblastos dando início à formação do osso independentemente dos grânulos.

O alendronato demonstrou melhorar a formação do osso quando adicionado localmente em ambos enxertos (XE e β -TCP), além de ter sido relatado o efeito benéfico na utilização conjunta com implantes dentais (122), a possibilidade de complementar procedimento de ROG deve ser considerada. O β -TCP teve uma reabsorção mais lenta no grupo adicionado com AL, melhorando o suporte deste material à membrana. No entanto tempos de estudo mais longos, são necessários para confirmar os resultados do presente estudo.

7 CONCLUSÕES

Em procedimentos de regeneração óssea guiada em defeitos críticos do osso parietal de ratos e nas condições do presente estudo é possível concluir que:

- O alendronato sódico quando adicionado localmente no xenoenxerto porcino e no β -TCP permite uma maior e mais rápida formação do osso.
- O alendronato sódico quando adicionado localmente ao β -TCP consegue diminuir a reabsorção dos grânulos desse biomaterial nos defeitos, no entanto, não consegue impedir completamente o colapso da membrana.
- O PRF adicionado ao β -TCP estimula maior reabsorção dos grânulos de enxerto e promove menor formação do osso que o grupo controle.

REFERÊNCIAS¹

1. Benic GI, Hammerle CH. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol 2000*. 2014;66(1):13-40.
2. Mellonig JT, Nevins M. Guided Bone Regeneration of Bone Defects Associated With Implants: An Evidence-Based Outcome Assessment. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 1995;15(2):168-85.
3. Ezirganli S, Kazancioglu HO, Mihmanli A, Sharifov R, Aydin MS. Effects of different biomaterials on augmented bone volume resorptions. 2015;26(12):1482-8.
4. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. 2017;125(5):315-37.
5. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. 2006;17(S2):136-59.
6. Calvo Guirado JL, Ramírez Fernández MP, Negri B, Delgado Ruiz RA, Maté Sánchez de-Val JE, Gómez-Moreno G. Experimental Model of Bone Response to Collagenized Xenografts of Porcine Origin (OsteoBiol® mp3): A Radiological and Histomorphometric Study. 2013;15(1):143-51.
7. Jensen SS, Broggini N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. 2006;17(3):237-43.
8. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*. 2011;49(1):34-41.
9. Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: Preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone*. 2011;49(1):50-5.
10. Kim H-C, Song J-M, Kim C-J, Yoon S-Y, Kim I-R, Park B-S, et al. Combined effect of bisphosphonate and recombinant human bone morphogenetic protein 2 on bone healing of rat calvarial defects. *Maxillofacial plastic and reconstructive surgery*. 2015;37(1):16-.
11. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e56-e60.

12. Acar AH, Yolcu U, Gul M, Keles A, Erdem NF, Altundag Kahraman S. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Archives of oral biology*. 2015;60(4):606-14.

13. Arana V, Bradaschia-Correa V. *Biologia Celular e Tecidual para Odontologia: Moléculas, células e Tecidos* 2012. 328 p.

14. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev*. 2008;108(11):4742-53.

15. Nanci A. Content and Distribution of Noncollagenous Matrix Proteins in Bone and Cementum: Relationship to Speed of Formation and Collagen Packing Density. *Journal of Structural Biology*. 1999;126(3):256-69.

16. Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral*. 2a ed 2004, .

17. Detsch R, Mayr H, Ziegler G. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomaterialia*. 2008;4(1):139-48.

18. Teitelbaum SL. Bone Resorption by Osteoclasts. 2000;289(5484):1504-8.

19. Rucci N, Teti A. The “love–hate” relationship between osteoclasts and bone matrix. *Matrix Biology*. 2016;52-54:176-90.

20. Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A. The Great Beauty of the osteoclast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2014;558:70-8.

21. Bellido T, Plotkin LI, Bruzzaniti A. Chapter 2 - Bone Cells. In: Burr DB, Allen MR, editors. *Basic and Applied Bone Biology*. San Diego: Academic Press; 2014. p. 27-45.

22. Compton JT, Lee FY. A Review of Osteocyte Function and the Emerging Importance of Sclerostin. 2014;96(19):1659-68.

23. Gehron Robey P. Chapter 17 - Noncollagenous Bone Matrix Proteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ, editors. *Principles of Bone Biology (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2008. p. 335-49.

24. Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clinical Biochemistry*. 2018;59:17-24.

25. Ohsawa K, Neo M, Matsuoka H, Akiyama H, Ito H, Kohno H, et al. The expression of bone matrix protein mRNAs around β -TCP particles implanted into bone. 2000;52(3):460-6.
26. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *Journal of Prosthodontic Research*. 2013;57(1):3-14.
27. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. 2010;21(6):567-76.
28. Nyman S, Karring T, Lindhe J, Plantén S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. 1980;7(5):394-401.
29. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. 1982;9(4):290-6.
30. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennström J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration Case reports. 1986;13(6):604-16.
31. Pontoriero R, Lindhe J, Nyman S, Karring T, Rosenberg E, Sanavi F. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars. 1989;16(3):170-4.
32. Nyman S. Bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration. 1991;18(6):494-8.
33. Donos N, Dereka X, Mardas N. Experimental models for guided bone regeneration in healthy and medically compromised conditions. 2015;68(1):99-121.
34. Accorsi-Mendonça T, Zambuzzi WF, Bramante CM, Cestari TM, Taga R, Sader M, et al. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. 2011;22(4):997-1004.
35. Fugazzotto PA. GBR Using Bovine Bone Matrix and Resorbable and Nonresorbable Membranes. Part 1: Histologic Results. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2003;23(4):360-9.
36. Caballé-Serrano J, Munar-Frau A, Ortiz-Puigpelat O, Soto-Penalzoa D, Peñarrocha M, Hernández-Alfaro F. On the search of the ideal barrier membrane for guided bone regeneration. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2018;10(5):e477-e83.
37. Imbronito AV, Todescan JH, Carvalho CV, Arana-Chavez VE. Healing of alveolar bone in resorbable and non-resorbable membrane-protected defects. A histologic pilot study in dogs. *Biomaterials*. 2002;23(20):4079-86.

38. Simion M, Dahlin C, Rocchietta I, Stavropoulos A, Sanchez R, Karring T. Vertical ridge augmentation with guided bone regeneration in association with dental implants: an experimental study in dogs. 2007;18(1):86-94.
39. Mellonig JT, Nevins M, Sanchez R. Evaluation of a Bioabsorbable Physical Barrier for Guided Bone Regeneration. Part I. Material Alone. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 1998;18(2):128-37.
40. Chen C-C, Wang H-L, Smith F, Glickman GN, Shyr Y, O'Neal RB. Evaluation of a Collagen Membrane With and Without Bone Grafts in Treating Periodontal Intrabony Defects. 1995;66(10):838-47.
41. Zellin G, Gritli-linde A, Linde A. Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. *Biomaterials*. 1995;16(8):601-9.
42. Bunyaratavej P, Wang H-L. Collagen Membranes: A Review. 2001;72(2):215-29.
43. Korzinskas T, Jung O, Smeets R, Stojanovic S, Najman S, Glenske K, et al. In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Macrophage Response of a Non-Resorbable PTFE Membrane for Guided Bone Regeneration. 2018;19(10):2952.
44. Almazrooa SA, Noonan V, Woo S-B. Resorbable collagen membranes: histopathologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2014;118(2):236-40.
45. Bornstein MM, Heynen G, Bosshardt DD, Buser D. Effect of Two Bioabsorbable Barrier Membranes on Bone Regeneration of Standardized Defects in Calvarial Bone: A Comparative Histomorphometric Study in Pigs. 2009;80(8):1289-99.
46. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury*. 2005;36(3):S20-S7.
47. Buser D, Hoffmann B, Bernard J-p, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. 1998;9(3):137-50.
48. Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Kloss F, Neukam FW, Radespiel-Tröger M. Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. 2001;12(5):495-502.
49. Maciel J, Momesso GAC, Ramalho-Ferreira G, Consolaro RB, Perri de Carvalho PS, Faverani LP, et al. Bone Healing Evaluation in Critical-Size Defects Treated With Xenogenous Bone Plus Porcine Collagen. 2017;26(2):296-302.

50. Widmark G, Andersson B, Ivanoff CJ. Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants: Presentation of a surgical method. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1997;26(2):106-9.
51. Jensen SS, Terheyden H. Bone Augmentation Procedures in Localized Defects in the Alveolar Ridge: Clinical Results with Different Bone Grafts and Bone-Substitute Materials. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2009;24:218-36.
52. Figueiredo M, Henriques J, Martins G, Guerra F, Judas F, Figueiredo H. Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes—Comparison with human bone. 2010;92B(2):409-19.
53. Kim Y, Rodriguez AE, Nowzari H. The Risk of Prion Infection through Bovine Grafting Materials. 2016;18(6):1095-102.
54. Schwarz F, Ferrari D, Balic E, Buser D, Becker J, Sager M. Lateral ridge augmentation using equine- and bovine-derived cancellous bone blocks: a feasibility study in dogs. 2010;21(9):904-12.
55. Nannmark U, Sennerby L. The Bone Tissue Responses to Prehydrated and Collagenated Cortico-Cancellous Porcine Bone Grafts: A Study in Rabbit Maxillary Defects. 2008;10(4):264-70.
56. Chaair H, Labjar H, Britel O. Synthesis of β -tricalcium phosphate. *Morphologie*. 2017;101(334):120-4.
57. Sager M, Ferrari D, Wieland M, Dard M, Becker J, Schwarz F. Immunohistochemical characterization of wound healing at two different bone graft substitutes. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2012;41(5):657-66.
58. Ghanaati, Booms, Orlowska, Kubesch, Lorenz, Rutkowski, et al. Advanced Platelet-Rich Fibrin: A New Concept for Cell-Based Tissue Engineering by Means of Inflammatory Cells. 2014;40(6):679-89.
59. Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, et al. Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(12):4476-87.
60. Jung U-W, Choi S-Y, Pang E-K, Kim C-S, Choi S-H, Cho K-S. The Effect of Varying the Particle Size of Beta Tricalcium Phosphate Carrier of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-4 on Bone Formation in Rat Calvarial Defects. 2006;77(5):765-72.
61. Kim C-S, Kim J-I, Kim J, Choi S-H, Chai J-K, Kim C-K, et al. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic proteins-2 using

absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers. *Biomaterials*. 2005;26(15):2501-7.

62. Boanini E, Torricelli P, Gazzano M, Fini M, Bigi A. The effect of alendronate doped calcium phosphates on bone cells activity. *Bone*. 2012;51(5):944-52.

63. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. A comparative evaluation of the systemic and local alendronate treatment in synthetic bone graft: a histologic and histomorphometric study in a rat calvarial defect model. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2012;114(5, Supplement):S146-S52.

64. von Knoch F, Eckhardt C, Alabre CI, Schneider E, Rubash HE, Shanbhag AS. Anabolic effects of bisphosphonates on peri-implant bone stock. *Biomaterials*. 2007;28(24):3549-59.

65. Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: A histological and histomorphometric study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012;40(4):321-8.

66. Lee EU, Lim HC, Hong JY, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Bone regenerative efficacy of biphasic calcium phosphate collagen composite as a carrier of rhBMP-2. *Clinical oral implants research*. 2016;27(11):e91-e9.

67. Wang D, Tabassum A, Wu G, Deng L, Wismeijer D, Liu Y. Bone regeneration in critical-sized bone defect enhanced by introducing osteoinductivity to biphasic calcium phosphate granules. *Clinical oral implants research*. 2017;28(3):251-60.

68. Kim BJ, Kwon TK, Baek HS, Hwang DS, Kim CH, Chung IK, et al. A comparative study of the effectiveness of sinus bone grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium phosphate and platelet-rich fibrin-mixed tricalcium phosphate in rabbits. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2012;113(5):583-92.

69. Etok SE, Valsami-Jones E, Wess TJ, Hiller JC, Maxwell CA, Rogers KD, et al. Structural and chemical changes of thermally treated bone apatite. 2007;42(23):9807-16.

70. Yang S, Lan L, Miron RJ, Wei L, Zhang M, Zhang Y. Variability in Particle Degradation of Four Commonly Employed Dental Bone Grafts. 2015;17(5):996-1003.

71. Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone Reactions to Anorganic Bovine Bone (Bio-Oss) Used in Sinus Augmentation Procedures: A Histologic Long-Term Report of 20 Cases in Humans. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 1999;14(6):835-40.

72. Arias-Gallo J, Chamorro-Pons M, Avendaño 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. 2013;24(5):1507-14.
73. Khatiblou F. Histologic and Histometric Evaluation of Bovine Cancellous Bone and Beta-Tricalcium Phosphate 45 Months After Grafting in Maxillary Sinus. 2011;37(6):727-33.
74. Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, et al. Biomaterial Resorption Rate and Healing Site Morphology of Inorganic Bovine Bone and β -Tricalcium Phosphate in the Canine: A 24-month Longitudinal Histologic Study and Morphometric Analysis. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2004;19(3):357-68.
75. Scarano A, Piattelli A, Assenza B, Quaranta A, Perrotti V, Piattelli M, et al. Porcine Bone Used in Sinus Augmentation Procedures: A 5-Year Retrospective Clinical Evaluation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010;68(8):1869-73.
76. Barone A, Crespi R, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Covani U. Maxillary Sinus Augmentation: Histologic and Histomorphometric Analysis. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2005;20(4):519-25.
77. Clokie CML, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GKB. Closure of Critical Sized Defects With Allogenic and Alloplastic Bone Substitutes. 2002;13(1):111-21.
78. Boraschi-Diaz I, Mort JS, Brömme D, Senis YA, Mazharian A, Komarova SV. Collagen type I degradation fragments act through the collagen receptor LAIR-1 to provide a negative feedback for osteoclast formation. *Bone*. 2018;117:23-30.
79. Stavropoulos A, Bertl K, Pietschmann P, Pandis N, Schiødt M, Klinge B. The effect of antiresorptive drugs on implant therapy: Systematic review and meta-analysis. 2018;29(S18):54-92.
80. Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, Matuszewski BK, Porras AGJOI. Clinical pharmacology of alendronate sodium. 1993;3(3):13-6.
81. Plotkin LI, Bivi N, Bellido T. A bisphosphonate that does not affect osteoclasts prevents osteoblast and osteocyte apoptosis and the loss of bone strength induced by glucocorticoids in mice. *Bone*. 2011;49(1):122-7.
82. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Archives of Oral Biology*. 2012;57(11):1545-50.
83. Srisubut S, Teerakapong A, Vattraphodes T, Taweekaisupapong S. Effect of local delivery of alendronate on bone formation in bioactive glass grafting in rats. *Oral*

Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. 2007;104(4):e11-e6.

84. Moller B, Wiltfang J, Acil Y, Gierloff M, Lippross S, Terheyden H. Prevention of the surface resorption of bone grafts by topical application of bisphosphonate on different carrier materials. *Clinical oral investigations*. 2014;18(9):2203-11.

85. Fischer KR, Stavropoulos A, Calvo-Guirado JL, Schneider D, Fickl S. Influence of local administration of pamidronate on extraction socket healing--a histomorphometric proof-of-principle pre-clinical in vivo evaluation. *Clinical oral implants research*. 2015;26(10):1135-42.

86. Dundar S, Ozgur C, Yaman F, Cakmak O, Saybak A, Ozercan I, et al. Guided bone regeneration with local zoledronic acid and titanium barrier: An experimental study. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*. 2016.

87. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*. 2009;27(3):158-67.

88. Panda S, Doraiswamy J, Malaiappan S, Varghese SS, Del Fabbro M. Additive effect of autologous platelet concentrates in treatment of intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. 2016;7(1):13-26.

89. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e51-e5.

90. Ozdemir H, Ezirganli S, Isa Kara M, Mihmanli A, Baris E. Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. *Archives of oral biology*. 2013;58(5):537-44.

91. Miron RJ, Choukroun J. Fibrina Rica em Plaquetas na Odontologia e Medicina Regenerativa e Estética - Bases Biológicas e Aplicações Clínicas. 1a ed 2018.

92. Yilmaz D, Dogan N, Ozkan A, Sencimen M, Ora BE, Mutlu I. Effect of platelet rich fibrin and beta tricalcium phosphate on bone healing. A histological study in pigs %J *Acta Cirurgica Brasileira*. 2014;29:59-65.

93. Kiliç SC, Güngörmüş M. Cone Beam Computed Tomography Assessment of Maxillary Sinus Floor Augmentation Using Beta-Tricalcium Phosphate Alone or in Combination with Platelet-Rich Plasma: A Randomized Clinical Trial. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2016;31(6):1367-75.

94. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. 2011;45(1):14-24.
95. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. Eur Cell Mater. 2007;13:1-10.
96. Xu W, Spilker G, C W. Methodological Consideration of Various Intraosseous and Heterotopic Bone Grafts Implantation in Animal Models. J Tissue Sci Eng. 2015 6:161.
97. Pellegrini G, Seol YJ, Gruber R, Giannobile WV. Pre-clinical Models for Oral and Periodontal Reconstructive Therapies. 2009;88(12):1065-76.
98. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. 2014;25(8):879-93.
99. Parker RM, Browne WJ. The place of experimental design and statistics in the 3Rs. ILAR J. 2014;55(3):477-85.
100. Schmitz JP HJ. The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. clinical orvlopædics and Related Research 1986(205):299–308.
101. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. Nature Protocols. 2012;7:1918.
102. McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. Dis Model Mech. 2018;11(4).
103. Schemitsch EH. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! 2017;31:S20-S2.
104. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. Plast Reconstr Surg. 2010;125(6):1685-92.
105. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the Critical-Size Bone Defect in Testing Bone-Regenerating Materials. 1998;9(4):310-6.
106. Sindel A, Dereci O, Toru HS, Tozoglu S. Histomorphometric Comparison of Bone Regeneration in Critical-Sized Bone Defects Using Demineralized Bone Matrix, Platelet-Rich Fibrin, and Hyaluronic Acid as Bone Substitutes. J Craniofac Surg. 2017;28(7):1865-8.

107. Hong S-J, Kim C-S, Han D-K, Cho I-H, Jung U-W, Choi S-H, et al. The effect of a fibrin-fibronectin/ β -tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein-2 system on bone formation in rat calvarial defects. *Biomaterials*. 2006;27(20):3810-6.
108. Pang E-K, Im S-U, Kim C-S, Choi S-H, Chai J-K, Kim C-K, et al. Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-4 Dose on Bone Formation in a Rat Calvarial Defect Model. 2004;75(10):1364-70.
109. Abou Fadel R, Samarani R, Chakar CJO, Surgery M. Guided bone regeneration in calvarial critical size bony defect using a double-layer resorbable collagen membrane covering a xenograft: a histological and histomorphometric study in rats. 2018;22(2):203-13.
110. Honma T, Itagaki T, Nakamura M, Kamakura S, Takahashi I, Echigo S, et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. 2008;14(5):457-64.
111. Verna C, Dalstra M, Wikesjö UME, Trombelli L. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. 2002;29(9):865-70.
112. Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Marques ND, Arana-Chavez VE. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. 2015;29(7):965-76.
113. Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *European journal of oral sciences*. 2000;108(1):74-7.
114. Arana-Chavez VE, Nanci A. High-resolution immunocytochemistry of noncollagenous matrix proteins in rat mandibles processed with microwave irradiation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2001;49(9):1099-109.
115. Moreira MM, V. Bradaschia-Correa, N. D. Marques, Ferreira LB, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunohistochemical study of the effect of sodium alendronate in the progression of experimental periodontitis in rats. *Microsc Res Tech*. 2014 77.(11):902-9.
116. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX*. 2002;19(2):73-8.
117. Mandal J, Parija SC. Ethics of involving animals in research. *Trop Parasitol*. 2013;3(1):4-6.
118. Tovar N, Jimbo R, Gangolli R, Perez L, Manne L, Yoo D, et al. Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: an experimental

calvaria defect study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2014;43(2):251-60.

119. Abdullah WA. Evaluation of bone regenerative capacity in rats claverial bone defect using platelet rich fibrin with and without beta tri calcium phosphate bone graft material. *The Saudi Dental Journal*. 2016;28(3):109-17.

120. Oliveira MR, deC. Silva A, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR, Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2015;44(5):649-55.

121. Yassibag-Berkman Z, Tuncer O, Subasioglu T, Kantarci A. Combined Use of Platelet-Rich Plasma and Bone Grafting With or Without Guided Tissue Regeneration in the Treatment of Anterior Interproximal Defects. 2007;78(5):801-9.

122. Kellesarian SV, Abduljabbar T, Vohra F, Malignaggi VR, Malmstrom H, Romanos GE, et al. Role of local alendronate delivery on the osseointegration of implants: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2017;46(7):912-21.

ANEXO A – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FOUSP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

 Comissão de Ética no Uso de Animais
 Tel. (11) 3091-1942
 ceuafo@usp.br
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Regeneração Óssea na Calvária de Ratos em Defeitos Preexistentes com Versamento porção do 3º batido titulação adicional com atendimento ad hoc", registrada com o nº 0100017, sob a responsabilidade de Victor Elias Arana-Chaves, Angel Eduardo Garido Clenaro, Bianca Engenheira Ruel López, Elvengela Chineni que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao Rio Cheridada, subfília Vertébrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com as premissas da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.088, de 15 de julho de 2008, e com as normas editadas pela Comissão Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 30/05/2017.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/05/2017 A 06/05/2020
Espécie/inóculo/raça	Rato heterogêneo / filiar
Nº de animais	60
Peso/idade	280g a 300g / 3 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Biotério do ICB-USP

São Paulo, 10 de maio de 2017.

 Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chaves
 Coordenador da CEUA/FOUSP

ANEXO B – Autorização do Protocolo (CEUA/FOUSP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
CETEA/FOUSP
cetef@usp.br

São Paulo, 01 de outubro de 2017.

CEUA/FOUSP/DL-23

Senhor Procurador,

Em resposta à solicitação de alteração de Protocolo já aprovado pela CEEA/FOUSP sob o número 0100017, no qual foi suscitado ao acolhimento de um grupo experimental (n=20) informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da USP em reunião ordinária realizada em 02 de outubro de 2017, aprovou sua solicitação.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chaves
Coordenador da CEEA/FOUSP

Em anexo
Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chaves
OOB