**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

JEFFERSON TOMIO SANADA

**Avaliação da resistência a tração de diferentes enxertos em
calvária de ratos**

**BAURU
2010**

JEFFERSON TOMIO SANADA

**Avaliação da resistência a tração de diferentes enxertos em
calvária de ratos**

Tese apresentada a Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor
em Odontologia.

Área de concentração: Reabilitação Oral
Orientador: Prof. Dr. Accácio Lins do Valle

BAURU

2010

Sanada, Jefferson Tomio

Sa52a Avaliação da resistência a tração de diferentes enxertos em calvária de ratos / Jefferson Tomio Sanada. – Bauru, 2010.
133 p. : il.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Accácio Lins do Valle

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 23/2007
Data: 10/12/2007

DADOS CURRICULARES

JEFFERSON TOMIO SANADA

Nascimento	25 de Janeiro de 1980 Londrina – PR
Filiação	Edson Yoshinobu Sanada Iracema Kimi Muraguchi Sanada
2000 – 2003	Curso de Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.
2005 – 2007	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral em nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.
2007 – 2010	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral em nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.
Associações	ABO-AL – Associação Brasileira de Odontologia, seção Alagoas. SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

DEDICATÓRIA

*A **Deus** que sempre me guiou para os caminhos certos da vida.*

*Aos meus pais, **Edson e Iracema**, fundamentais nos momentos mais difíceis da minha vida, sempre acreditando, confiando e compartilhando com a idealização dos meus sonhos. Hoje, mesmo com a distância sinto vocês muito perto e presentes na minha vida. Amo vocês com toda a força deste mundo, alicerces na minha vida, essa é uma conquista nossa.*

*A minha esposa, **Ingrid**, quando começamos a nossa história não pensamos que hoje seríamos um casal e que nossa relação se tornaria tão forte. Nosso amor se alicerça a cada dia através do nosso CARINHO, RESPEITO, COMPANHEIRISMO e PAIXÃO. Tenho certeza que nessa etapa da minha vida você foi primordial me apoiando e fazendo acreditar que sou capaz de muita coisa, sou muito grato a você, linda!!!! Amor eterno! Te amo!!!.*

*A todos os meus familiares, pelo apoio sempre dado nas minhas decisões, principalmente, minha **Tia Eunice, Neusa, Pedro e Batiam** que nunca negaram esforços na minha formação, estiveram e sempre estarão nas minhas conquistas, sempre penso em vocês em cada vitória que transformo em uma alegria para todos.*

Este trabalho dedico a vocês, pessoas fundamentais neste trabalho e na minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Accácio Lins do Valle, um mestre e amigo que em todos os momentos da minha vida acadêmica me orientou e guiou meus pensamentos. Devo muito dos meus conhecimentos e da minha maturidade a este grande orientador, ou melhor, um grande amigo. Agradeço pela sua paciência e dedicação dada durante estes anos de convívio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, exemplo de sensatez, pela condução de seus ensinamentos e princípios.

Ao Prof. Dr. Pedro de Oliveira, pessoa de enorme coração, sempre que precisei estava presente. Seu caráter só me faz admirá-lo cada vez mais.

Ao Prof. Dr. Gerson Bonfante, pela disponibilidade e valiosas orientações e exemplo de caráter e senso crítico.

Ao Prof. Dr. José Henrique Rubo, pela transmissão de conhecimentos e convívio. Pelo exemplo de uma pessoa serena e disciplinada.

Ao Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti, responsabilidade e transmissão de conhecimento.

Ao Prof. Dr. Paulo Martins, pela amizade e companheirismo desde a graduação.

Aos Profs. Drs. Salvador e Lucimar, pelos seus ensinamentos desde a graduação e que sou grato para sempre, pessoas de grande coração.

Ao Prof. Dr. Vinícius Porto, pela amizade, estima e exemplo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Marins de Carvalho, mesmo com pouco tempo de departamento soube demonstrar todo o seu conhecimento, agradeço pela sua amizade e exemplo de vida.

*Aos Professores do Departamento de Prótese, **Renato, Wellington e Carlos Araújo** por tudo que me ensinaram.*

*Aos amigos da época de mestrado, **Dudu Adriana, Ana Paula, Daniel Bayardo, Fernando, Gabriela, Paola, Valéria**. Vocês sempre estarão guardados nas minhas lembranças.*

*Aos amigos do doutorado, **Romão, Daniel Sartoreli, Rafael Moreti, Eduardo Meira, Luciana, Flora, Leandro, Thiago Pegoraro**. Pessoas completamente heterogêneas, mas que ao final se mostraram unidos e que desejo muito sucesso na vida de vocês.*

***Dudu, Romão, Thiago Pegoraro, Fábio (Budinha)**, essas quatro pessoas são aquelas que Deus coloca na sua vida para te mostrar que no nosso mundo temos pessoas boas e que podemos confiar. Esses não foram somente companheiros de pós-graduação, foram parceiros em vida. Agradeço muito por tudo que vocês fizeram.*

***Cíntia**, palavras vão ser poucas para descrever o carinho que sinto por você. A amizade da faculdade (afilhada) estendeu-se ao mestrado e agora você é minha madrinha de casamento, saiba que você não é somente mais uma amiga, vai ser eterna no meu coração.*

*Aos colegas de pós-graduação, **Cíntia, João Paulo, Marcelo, Hugo Vidotti, Zezo**, pela disponibilidade em sempre nos auxiliar e pelo convívio, e principalmente o **Fábio (Budinha)** amigo de muito trabalho.*

Aos funcionários da biblioteca pela solicitude e profissionalismo.

*Aos funcionários do Departamento, **Cláudia, Deborah, Rivanildo, Marcelo Giatti e Valquíria**, pelo profissionalismo e gentileza em todos os momentos.*

*Aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), principalmente a **Dona Neusa e Marcelo** que sempre ajudaram e auxiliaram nos momentos importantes dessa pesquisa.*

Aos funcionários do Biotério da FOB, pela compreensão, calma e ajuda com uma das peças fundamentais deste trabalho que foram os meus animais.

*Aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação da FOB, pela atenção e sempre disponibilidade, obrigado **Giane, Letícia e Margareth**.*

*Aos funcionários da Clínica de Pós-Graduação da FOB, pela paciência e calma nas clínicas “demoradas”, obrigado **Cleusa, Hebe**.*

*À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, representada por seu Diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, e à sua Comissão de Pós-Graduação, representada pelo **Prof. Dr. Paulo Cesar Conti**.*

*Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro tornando exeqüível este trabalho.*

A todas as pessoas que de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram com esta conquista.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A perda do osso alveolar como resultado de doença periodontal ou secundariamente à cirurgia são fontes de inúmeras complicações para os cirurgiões dentistas, e a solução para tal problema se baseiam em procedimentos regenerativos, que é realizada através de enxertos ósseos que estabelecem um arcabouço para a reparação tecidual, aumentando os tecidos ósseos nos defeitos resultantes de trauma ou cirurgias, preenchendo os alvéolos após extração para preservar a altura e espessura do rebordo alveolar e aumentando e/ou reconstruindo o rebordo alveolar. Este projeto tem como objetivo determinar a resistência à tração do osso neoformado com a utilização de diferentes biomateriais. Foram utilizados 60 animais divididos em 3 grupos. O grupo 1A (n=10): GenO; Grupo 1B (n=10): GenMix; Grupo 1C (n=10): Bio-Oss; Grupo 2a (n=10): PerioGlas; Grupo 2b (n=10): Polímero de mamona e Grupo 3 (n=10): coágulo. Após 3 meses de nascimento os animais foram submetidos a anestesia intraperitoneal e confecção de defeito não crítico (3mm de diâmetro) na calvária dos animais, que foram preenchidos com os biomateriais correspondentes a cada grupo. Após 6 meses da cirurgia foi realizada a morte dos animais, os espécimes foram coletados e submetidos ao teste em uma máquina de teste universal. Observa-se que o grupo que obteve maior média de resistência à tração foi o grupo de polímero de mamona ($10,932 \pm 4,529$ MPa). Consequentemente, obteve-se uma comparação decrescente na seguinte ordem: Coágulo ($9,563 \pm 3,74$ MPa), Bio-Oss ($8,706 \pm 4,087$ MPa), GenMix ($8,587 \pm 3,602$ MPa), GenOx ($7,709 \pm 2,416$ MPa), PerioGlas ($7,185 \pm 6,837$ MPa), não notando-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Nas microscopias eletrônicas de varredura na maioria dos grupos observou-se presença de fibras colágenas ao redor do tecido ósseo neoformado e dos remanescentes de enxerto. Conclui-se que o material foi indiferente para o resultado final da resistência à tração, demonstrando uma boa qualidade dos materiais utilizados, tanto quando comparamos os produtos quanto a sua origem (xenogênica, polimérica ou coágulo), ou a sua procedência de fabricação (nacional ou importado).

Palavras-chave: Implantes dentários. Osso. Materiais biocompatíveis.

ABSTRACT**Evaluation of the tensile strength of different grafts in rat calvaria**

The loss of alveolar bone as a result of periodontal disease or secondary to surgery are numerous sources of complications for the dentists, and the solution to this problem are based on regenerative procedures, which is conducted through bone grafts that provide a scaffold for tissue repair by increasing the bone tissues in the defects resulting from trauma or surgery, filling the alveoli after extraction to preserve the height and thickness and increasing the alveolar ridge and/or reconstructing the alveolar ridge. This project aims to determine the tensile strength of newly formed bone with the use of different biomaterials. We used 60 animals divided into three groups. Group 1A (n = 10): GenOx; Group 1B (n = 10): GenMix; Group 1C (n = 10): Bio-Oss; Groups 2a (n = 10): PerioGlas; Group 2b (n = 10): castor bean polymer; Group 3 (n = 10): clot. After 3 months of birth the animals were anesthetized intraperitoneally and making non critical defect (3mm diameter) in the calvaria of the animals, which were filled with biomaterials for each group. After 6 months of surgery was performed the animals' death, the specimens were collected and tested in a universal testing machine. It is observed that the group had a higher average tensile strength was the castor oil polymer group (10.932 ± 4.529 MPa). Consequently, we obtained a comparison descended in the following order: Clot (9.563 ± 3.74 MPa), Bio-Oss (8.706 ± 4.087 MPa), GenMix (8.587 ± 3.602 MPa), GenOx (7.709 ± 2.416 MPa), PerioGlas (7.185 ± 6.837 MPa), not noticing a significant difference between the groups. In scanning electron microscopies in most groups there was presence of collagen fibers around the newly formed bone and remaining graft. It is concluded that the material was irrelevant to the final result of the tensile strength, showing a good quality of materials used, both when comparing products as their source (xenogenic, polymeric or clot), or its origin of manufacture (national or imported).

Key words: Implant. Bone. Biocompatible materials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	GenOx [®] Inorgânico Microgranular (0,25 – 1,0mm), osso bovino desproteínizado medular em grânulos - Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil, Registro Ministério da Saúde: 103.455.00001.....	75
Figura 2 -	GenMix [®] Composto Microgranular (0,25 – 1,0mm), osso bovino desproteínizado medular em grânulos - Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil, Registro Ministério da Saúde: 103.455.00080.....	76
Figura 3 -	Bio-Oss [®] Inorgânico Microgranular (0,25 – 1,0mm), osso bovino desproteínizado medular em grânulos - Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil, Registro Ministério da Saúde: 103.455.00001.....	76
Figura 4 -	Polímero vegetal extraído de “Ricinus Communis” oleogénicas da classe dicotiledóneas, origem geraniales, família das euphorbiaceae – Poliquil Araraquara Polímeros Químicos LTDA., Araraquara, SP, Brasil, Registro Ministério da Saúde: 1.03.056.9.0009.....	77
Figura 5 -	Polímero de vidro bioativo sintético (PerioGlas [®] , NovaBone Products LLC, Alachua, FL, USA).....	77
Figura 6 -	Defeito na calvária do rato com a presença do coágulo.....	78
Figura 7 -	Animais obtidos do Biotério Central (Faculdade de Odontologia de Bauru - USP).....	79
Figura 8 -	Defeito ósseo de 3mm de diâmetro realizado com broca trefina.....	79
Figura 9 -	Anestésicos: Dopalen [®] (SESPO - Divisão vetbrands saúde animal, Jacareí, São Paulo, Brasil) e Anasedan [®] (SESPO - Divisão vetbrands saúde animal, Jacareí, São Paulo, Brasil).....	81

Figura 10 -	Tricotomia na região frontal da cabeça do animal e antissepsia.....	82
Figura 11 -	Incisão e periósteo rebatido na forma semilunar.....	82
Figura 12 -	Trefina de 3 mm e contra-ângulo. A) Trefina acoplada no contra-ângulo de implante. B) Realização da perfuração numa das parietais com a trefina.....	83
Figura 13 -	Vista da região parietal. A) Marcação inicial da perfuração. B) Defeitos não críticos realizados nas duas parietais.....	83
Figura 14 -	Colocação dos biomateriais nos defeitos. A) GenOx. B) GenMix. C) Bio-Oss. D) PerioGlas. E) Polímero de mamona.....	84
Figura 15 -	Biomaterial hidratado com soro fisiológico no pote Dappen esterilizado.....	84
Figura 16 -	Vista periférica da sutura com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson). A) Sutura com ponto simples. B) Antissepsia da região.....	85
Figura 17 -	Coágulo preenchendo o defeito da calvária do animal.....	86
Figura 18 -	Disco diamantado dupla face para a remoção da calota.....	87
Figura 19 -	Calota craniana com os cortes realizados com o disco diamantado.....	87
Figura 20 -	Esquema para o preparo do espécime. A) calota craniana após dissecação, pronto para o preparo do corpo-de-prova. B) Corpo-de-prova dividido ao meio para confecção do espécime. C) padronizado nas dimensões adequadas para teste mecânico (12 x 4 x 1mm), seta azul demonstrando a região utilizada para mensuração da secção transversal (largura).....	88
Figura 21 -	Máquina Vitrodyne, V-1000 (Liveco Inc., Burlington,VT), com dispositivo de teste Bencor-Multi-T.....	89
Figura 22 -	Correlação de Person do grupo 1-A (GenOx). O coeficiente de correlação (r) = - 0,6563.....	93

Figura 23 -	Correlação linear de Person do grupo 1-B (GenMix). O coeficiente de correlação (r) = - 0,01210.....	94
Figura 24 -	Correlação linear de Person do grupo 1-C (Bio-Oss). O coeficiente de correlação (r) = - 0,8196.....	94
Figura 25 -	Correlação linear de Person do grupo 2-a (PerioGlass). O coeficiente de correlação (r) = - 0,4224.....	95
Figura 26 -	Correlação linear de Person do grupo 2-b (Polímero de Mamona). O coeficiente de correlação (r) = - 0,1766.....	95
Figura 27 -	Gráfico ilustrando a resistência à tração do osso, de acordo com o grupo experimental. As colunas representam a média e as barras o desvio padrão da média.....	99
Figura 28 -	Grupo 1 A (GenOx). A) Aumento de 20x, observa-se a presença de material enxertado na região fraturada e fibras colágenas. B) Aumento de 3000x, observam-se fibras colágenas com pequenas formações ósseas no seu interior.....	100
Figura 29 -	Grupo 1 C (BioOss). A) Aumento de 20x, observa-se a presença de material enxertado compactado e poucas fibras colágenas. B) Aumento de 3000x, presença de uma maior uniformidade de tecido ósseo e menor quantidade de fibras colágenas.....	100
Figura 30 -	Grupo 2a (PerioGlas). A) Aumento de 20x, observa-se a presença de material enxertado compactado e poucas fibras colágenas; nota-se que houve um desprendimento total do enxerto com a área receptora. B) Aumento de 100x, presença de material enxertado muito compactado.....	101
Figura 31 -	Grupo 2b (Polímero de mamona). A) Aumento de 2000x, área do enxerto após a fratura, presença de uma superfície uniforme de tecido ósseo. B) Aumento de 800x, área do leito receptor após fratura, pouco remanescente de tecido ósseo.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores individuais para cada espécime do grupo 1-A (GenOx) em relação teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm ²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área.....	96
Tabela 2 -	Valores individuais para cada espécime do grupo 1-B (GenMix) relativamente ao teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm ²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área.....	96
Tabela 3 -	Valores individuais para cada espécime do grupo 1-C (Bio-Oss) relativamente ao teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm ²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área.....	97
Tabela 4 -	Valores individuais para cada espécime do grupo 2a (PerioGlas) relativamente ao teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm ²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área.....	97
Tabela 5 -	Valores individuais para cada espécime do grupo 2b (Polímero de mamona) relativamente ao teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm ²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área.....	98
Tabela 6 -	Valores individuais para cada espécime do grupo 3 (Coágulo) relativamente ao teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm ²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área.....	98
Tabela 7 -	Valores das médias e desvio padrão de todos os grupos.....	99
Tabela 8 -	Valores médios do osso humano. Adaptação de Bilezikian, Raisz, Rodan (2002).....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BMP	Proteína morfogénica óssea (bone morphogenic proteins)
hBMP	Proteína morfogenética óssea humana
rhBMP	Proteína morfogenética óssea recombinante humana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus)
FDBA	Enxerto alógeno de osso liofilizado
DFDBA	Enxerto alógeno de osso liofilizado desmineralizado
RGD	Regeneração Guiada Óssea
RTG	Regeneração tecidual guiada
TGF	Fator de crescimento transformante
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
IGF	Fator de crescimento similar a insulina
PDGF	Fatores de crescimento derivados das plaquetas
FCDM	Fator de crescimento derivados dos macrófagos
HA	Hidroxiapatita
PTI	Prótese total imediata
PTFE-e	Tetrafluoretileno expandido
MHPC	Metil-hidroxi-propil-celulose
PBBM	Osso bovino poroso mineral
DBM	Matriz óssea desmineralizada
TCP	Trifosfato de cálcio
ACS	Esponja de colágeno absorvível
DVS	Di-vinil-estireno
HCl	Ácido clorídrico

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
rhTGF –β1	Fator de transformação de crescimento humano recombinante B
PRP	Plasma rico em plaqueta
hPDLF	Fibroblasto do ligamento periodontal humano
MMT	3-(4,5-dimetil-tiazole-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolio
RT-PCR	Reação de cadeia de transcrição-polimerase reversa
ALPase	Atividade de fosfatase alcalina
FFSS	Sistema de selamento de fibina-fibronectina
cm	Centímetro
mm	Milímetro
cm²	Centímetro quadrado
μm	Micrometros
mg/mL	Miligramas por mililitros
g/cm³	Grama por centímetro cúbico
KgF	Quilograma força
MPa	Megapaschal
GPa	Gigapaschal
M	Molaridade (relação molar)
<	Menor
>	Maior
$\leq$	Menor ou igual
$\geq$	Maior ou igual
β	Beta
%	Porcentagem
p	Nível de significância
TM	Marca registrada (Trade market)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	ENXERTO ÓSSEO.....	29
2.2	MECANISMO DE AÇÃO DOS ENXERTOS	30
2.3	UTILIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS EM ALVÉOLOS.....	31
2.4	TESTES EXPERIMENTAIS EM CALVÁRIAS DE COBAIAS	43
2.5	COMPORTAMENTO MECÂNICO DOS OSSOS	60
3	PROPOSIÇÃO	69
4	MATERIAL E MÉTODO	73
4.1	MATERIAIS	75
4.2	ANIMAIS.....	78
4.3	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	81
4.3.1	Grupos 1 e 2.....	81
4.3.2	Grupo 3.....	85
4.4	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	86
4.5	PREPARO DAS PEÇAS PARA O TESTE DE MICROTRAÇÃO.....	87
4.6	TESTE DE MICROTRAÇÃO	88
4.7	ANÁLISE DA ÁREA FRATURADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	89
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	90
5	RESULTADOS.....	91
6	DISCUSSÃO	103
7	CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS.....	115
	ANEXO	131

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Quando se tem a perda do elemento dentário, seja por cárie dentária, doença periodontal, traumas, trepanações, lesões endodônticas, entre outras, ocorre o desencadeamento de um processo fisiológico de reabsorção do tecido ósseo nessa área, a qual pode ser em altura ou espessura, denominada de reabsorção do rebordo alveolar (SCHEER; BOYNE, 1987; HOWELL; FIORELLINI; JONES, 1997; JAHANGIRI; DEVLIN; TING, 1998).

Após a extração dentária há uma série de eventos fisiológicos, levando a uma resposta inflamatória juntamente com o preenchimento do alvéolo pelo coágulo sanguíneo. Os tecidos epiteliais iniciam sua proliferação e migração na primeira semana. Após duas semanas, observa-se a presença de tecido ósseo na porção mais profunda do alvéolo, a qual será preenchido lentamente por um novo tecido ósseo num período de 6 meses. Em média, a maxila perde cerca de 2 a 4 mm de osso no primeiro ano após a exodontia e 0,1mm por ano nos anos subsequentes. Na mandíbula, a perda óssea no primeiro ano é de 4 a 6mm e a média anual passa a ser de 0,4mm. Essa remodelação óssea afeta o funcionamento de qualquer prótese que se apoie sobre o rebordo residual, dificultando a reabilitação protética desses pacientes, seja através de próteses totais, parciais removíveis ou próteses sobre implantes (fixas ou removíveis) (JAHANGIRI et al., 1998; AMLER, 1969; SIMPSON, 1969).

Devido a essa dificuldade, a literatura tem demonstrado que a utilização de biomateriais no preenchimento desses alvéolos, após a exodontia, pode contribuir na manutenção tanto da altura como em espessura (HOWELL et al., 1997). Com o avanço da tecnologia médica e odontológica observa-se um crescimento, em pesquisas, dos biomateriais no intuito de se buscar uma melhoria em relação à reabsorção óssea causada pela extração dentária.

Os biomateriais encontrados no mercado são inúmeros, com indicações de uso de acordo com seu mecanismo de ação e origem.

O mecanismo de ação desses enxertos ósseos ocorre de quatro maneiras: osteogênese, osteoindução, osteopromoção e osteocondução (FRAME, 1987; LANE, 1995; MELLONIG; PREWETT; MOYER, 1992; PINTO; BROSCO; TAGA,

2000). A osteogênese é a formação e desenvolvimento do osso a partir de células ósseas presentes no material utilizado, o osso autógeno. Dessa forma, o enxerto osteogênico é derivado de tecido ósseo de um local diferente do sítio receptor. Células osteogênicas podem favorecer a formação óssea em tecidos moles ou ativarem rapidamente o crescimento ósseo em sítios com presença do tecido ósseo, uma vez que agregam as propriedades de osteogênese, osteoindução e osteocondução, definidas a seguir:

- Osteoindução é a ação ou processo de estímulo à osteogênese. Enxertos osteoindutores são utilizados como intensificadores da regeneração óssea, e o osso pode crescer ou estender-se dentro de áreas onde normalmente não se encontra tal tecido. O potencial de osteoindução é disparado por proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) isoladas da matriz óssea (WOZNEY, 1995) ou pela própria matriz óssea (URIST, 1965);
- Osteocondução é dependente de uma matriz física ou de um arcabouço capaz de guiar as células envolvidas no processo de reparo, promovendo a angiogênese e a deposição de novo osso. Esses materiais, entretanto, são incapazes de induzir a formação óssea ectópica, como ocorre com os enxertos osteoindutores.

Dependendo da origem, os materiais para enxerto ósseo podem ser classificados como: autógeno, alógeno e aloplástico.

O enxerto autógeno é, ainda, a referência (“gold standard”) devido a vantagens biológicas, por possuir alto poder osteogênico e preencher adequadamente os requisitos referentes à estrutura de arcabouço, essencial para a regeneração óssea (BECKER; BECKER; CAFFESSE, 1994). O osso autógeno pode ser obtido da crista ilíaca ou sítios intraorais (sínfise mandibular, tuberosidade maxilar, ramo e exostoses) (KOOLE; BOSKER; VAN DER DUSSEN, 1989; MISCH; DIETSH, 1993). Porém, uma série de inconvenientes, como um maior período de convalescença, morbidade e susceptibilidade a infecções no sítio doador e a reabsorção progressiva e constante do enxerto, estimulou a busca de novos materiais para substituir esse tipo de enxerto (GOSAIN, 1997).

O aloenxerto é obtido de outro indivíduo da mesma espécie, apresentando-se em várias formas para a utilização, de acordo com o processamento laboratorial:

congelados, liofilizados, desmineralizados juntamente com a liofilização ou irradiados. Esses materiais, potencialmente, podem transmitir o HIV, mas estudos têm demonstrado, que por meio do congelamento ou utilização de agentes antiviróticos e a desmineralização, ocorre a inativação do agente patogênico (BUCK; RESNICK; SHAH, 1990; DIES; ETIENNE; ABBOD, 1996), e a possibilidade de transmissão, atualmente, é de aproximadamente 1:1.600.000 (BUCK; MALININ; BROWN, 1989).

Os derivados inorgânicos como o fosfato tricálcico e a hidroxiapatita (enxertos autoplásticos) receberam grande atenção como materiais de preenchimento, espaçadores e substitutos para os enxertos ósseos, principalmente devido à sua biocompatibilidade, bioatividade e características de osteocondução em relação ao tecido hospedeiro (BURSTEIN; COHEN; HUDGINS, 1997; DE GROOT, 1980). Porém, foi relatado que a hidroxiapatita sintética (biomaterial aloplástico) possui microestrutura e tamanho do cristal, diferente do osso natural, podendo produzir resposta biológica indesejada (STEPHAN; JIANG; LYNCH, 1999), pois a falta de padronização do tamanho da partícula interfere no processo de reparo ósseo.

Na busca por alternativas em relação à realização do segundo leito cirúrgico (enxerto autógeno) ou aos riscos de contaminação e custos com exames laboratoriais (enxerto alógeno), o enxerto xenogênico (obtido de outra espécie) vem apresentando resultados promissores. Alicerçado na fácil aquisição, baixo custo do osso bovino e no processamento mecânico e químico adequados, diversas empresas vêm produzindo biomateriais de origem bovina, utilizando-os como substituto ósseo (Gen-Ox[®], Baumer S.A., Mogi Mirim, Brasil; Keil Bone[™], Braun Milsungen, Milsungen, Alemanha; Bio-Oss[™], Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça; e Surgibone[™], Unilab Surgibone, Mississauga, Ontário, Canadá) (ZHAO; MENDES; SYMINGTON, 1999).

Todos esses biomateriais exigem diversos processos de avaliações laboratoriais, experimentos em animais e humanos para serem integrados ao meio mercadológico. Dentre os processos laboratoriais, temos a avaliação de cultura de células, citotoxicidade, análises imunológicas, sendo esses processos muitas vezes distantes do meio odontológico, necessitando de laboratórios bem equipados e

equipe multidisciplinar (biólogos, farmacêuticos, engenheiros, cirurgiões-dentistas, técnicos de laboratório, dentre outros).

Por outro lado, observa-se uma grande participação da área odontológica nos procedimentos experimentais clínicos e em animais, muitas vezes para não depender de profissionais de outras áreas. Dentre os experimentos em animais temos diversos modelos (ratos, macacos, cães, porcos, cobaias, coelhos), os quais podem avaliar esses biomateriais de várias formas biológicas (biocompatibilidade, tempo de reparo ósseo, resposta imunológica, resposta inflamatória, contagem e tipo celular).

Um dos modelos experimentais para a avaliação do reparo de áreas enxertadas é a calvária de ratos, cujo modelo consta da realização de defeitos na calvária do animal e preenchimento com diversos biomateriais, avaliando-se assim sua biocompatibilidade, tempo de reparo, tipo celular, qualidade e quantidade de tecido ósseo formado, dentre outros.

O defeito na calvária de ratos pode ser classificado em 2 tipos: críticos (maiores que 6mm de diâmetro) ou não críticos (menores que 6mm de diâmetro) (GLOWACKI; ALTOBELLI; MULLIKEN, 1981; AABOE; PINHOLT; HJORTING-HANSEN, 1995; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; VERNA; DALSTRA; WIKESJO, 2002; FOWLER; CUENIN; HOKETT, 2002; AHN; KIM; SUK, 2003; FRANCIS; MCPHERSON; CUENIN, 2003; MATZENBACHER; MAILHOT; MCPHERSON, 2003; LEE; NAM; SEOL, 2003; TAMURA; FUKASE; GOKE, 2005; PRYOR; YANG; POLIMENI, 2005; HYUN; HAN; CHOI, 2005; PANG; PAIK; KIM, 2005; HAN; KIM; JUNG, 2005; PRYOR; SUSIN; WIKESJO, 2006; TAMIMI; TORRES; TRESGUERRES, 2006; HONG; KIM; HAN, 2006; JUNG; CHOI; PANG, 2006; POEHLING; PIPPIG; HELLERBRAND, 2006). A realização de um defeito crítico está indicado para casos em que se verifica a necessidade de o biomaterial possuir capacidade de induzir e/ou conduzir a uma formação óssea em casos onde não haja fechamento natural dessa área, ou seja, o biomaterial teria capacidade induzir e/ou conduzir uma formação óssea além da capacidade fisiológica do organismo em se reparar. Esse tipo de experimento é classificado em grupos de diferentes períodos de sacrifício para possibilitar acompanhamento histológico e radiográfico do reparo ósseo, podendo-se, assim, quantificar o tempo de reparo do defeito.

No caso de defeitos não críticos em calvária de ratos, o objetivo é a avaliação da qualidade e quantidade de tecido formado pelo biomaterial, seja pelo seu papel osteoindutor, osteocondutor ou osteogênico, pois nesse modelo experimental temos a certeza do fechamento do defeito criado, avaliando-se somente o tipo celular, quantidade e qualidade óssea.

Existem outros fatores importantes na avaliação desses biomateriais como, por exemplo, as suas propriedades mecânicas (resistência, módulo de elasticidade, tenacidade, plasticidade, etc). A literatura mostra-se vasta quando se quer a avaliação do tecido ósseo na área ortopédica, principalmente nos casos de ossos longos, como por exemplo, fêmures ou tíbias humanas ou bovinas, e os testes realizados em geral são de tração ou compressão de ossos longos, nanoindentação, mensurações ultrassônicas e microtração.

Em odontologia não se tem a avaliação dos tecidos neoformados quanto a sua resistência, embora seja de grande importância, principalmente quando se relaciona à implantodontia. Isso porque, quando ocorre a perda do elemento dentário, há a previsibilidade da colocação de implantes osseointegrados, nessa área, com a utilização dos biomateriais para a preservação do tecido ósseo do alvéolo, sendo grande o estudo na literatura para a avaliação histológica dessa área, tanto em experimentos animais como em humanos. Observa-se a ausência da avaliação das propriedades mecânicas dessas áreas enxertadas, seja em experimentos animais ou em humanos.

Após a recuperação da estrutura óssea perdida, verifica-se a necessidade de se conhecer as propriedades mecânicas do osso neoformado que vai receber o implante osseointegrável. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar os testes de resistência à tração do osso neoformado em defeitos não críticos provocados em calvária de ratos, os quais receberam enxertos poliméricos e xenogênicos tendo como parâmetro o osso do grupo controle, que recebeu somente coágulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENXERTO ÓSSEO

Os enxertos podem ser classificados quanto à origem e quanto ao mecanismo de ação. Em relação à origem, os enxertos ósseos podem ser: autógeno, alógeno, xenógeno e aloplástico. O autógeno é removido do próprio paciente, de regiões doadoras extrabuciais (ilíaco, calota craniana, clavícula) ou intrabuciais (região do mento, região da linha oblíqua externa, tuberosidade), de acordo com a quantidade necessária. A vantagem deste último, além da ausência de rejeição, é a presença de células osteoprogenitoras e osteoblastos viáveis junto a matriz orgânica e inorgânica (HUNT; JOVANOVIĆ, 1999).

Dentre as desvantagens do enxerto autógeno estão: necessidade de um segundo sítio cirúrgico, morbidade pós-operatória, volume ósseo limitado e a possibilidade de sequelas (OREFFO; TRIFFITT, 1999).

Apesar da ausência de rejeição apresentada pelos enxertos autógenos (BURG; PORTER; KELLAM, 2000), afirmaram que esses materiais apresentam um alto risco de reabsorção, podendo ocorrer antes mesmo de se completar a osteogênese.

O alógeno é adquirido a partir de osso humano, através de bancos de ossos humanos, e se apresenta em duas formas: enxerto alógeno de osso liofilizado e enxerto alógeno de osso liofilizado desmineralizado. Esse tipo de enxerto caracteriza-se por estimular resposta imune no receptor.

O xenógeno é oriundo de outras espécies, principalmente de origem bovina. Exigem processamento adequado para eliminar o potencial antigênico, pois o grande problema desses materiais está na possibilidade da transmissão do príon, proteína causadora da encefalopatia espongiforme bovina (doença da “vacca louca”). Wenz, Oesch, Horst (2001) comentaram que esse risco diminui à medida que o osso passa por um tratamento acima de 300°C ou com álcalis, seguido de neutralização, removendo-se praticamente toda possibilidade da presença de príon

porventura existente na amostra, assegurando-se, assim, a proteção contra a transmissão.

O material aloplástico é de origem sintética e pode ser apresentado em textura, tamanho e formas diversas. O desenvolvimento desses materiais é cada vez maior, em função das dificuldades encontradas em outros tipos de enxerto. Entre suas vantagens, estão o controle dos riscos biológicos, suas propriedades físico-químicas e seu baixo custo.

2.2 MECANISMO DE AÇÃO DOS ENXERTOS

Os mecanismos de ação do enxerto são classificados em três categorias distintas, porém um mesmo tipo de enxerto pode possuir mais de um mecanismo de ação e ainda, os materiais de origens diferentes podem assumir o mesmo mecanismo de ação requerido no tipo de tratamento desejado: osteoindução, osteocondução e osteopromoção. A osteoindução é o mecanismo pelo qual o tecido é estimulado a formar elementos que permitem a osteogênese, principalmente a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos. O estímulo pode partir do próprio enxerto em um ambiente favorável para a osteogênese. Em condições ideais à osteoindução estimula a osteocondução, criando então uma aceleração do processo em relação aos demais materiais não viáveis ou não biológicos.

Osteocondução é dependente de uma matriz física ou um arcabouço capaz de guiar as células envolvidas no processo de reparo, promovendo a angiogênese e a deposição de novo osso. Esses materiais, entretanto, são incapazes de induzir a formação óssea ectópica, como ocorre com os enxertos osteoindutores.

A osteopromoção é a capacidade de um material proporcionar a proliferação tecidual sem que haja interferência de fatores externos ou internos para tal evento, promovendo uma proliferação óssea (Regeneração Óssea Guiada – ROG) ou tecidual/conjuntivo (Regeneração Tecidual Guiada – RTG).

A osteogênese define-se como a transferência de células viáveis do enxerto para o leito receptor. Neste aspecto, há controvérsias sobre o início do processo de cicatrização, pois existe a hipótese de que as células ósseas do espaço criado pelo

enxerto tenham origem no hospedeiro, estimuladas pelo enxerto. De qualquer maneira, ambas as origens devem contribuir para a população celular (MILLER; ISHIDA; KOBAYASHI, 1991). Após a instalação do enxerto, iniciar-se-á a reparação óssea pela liberação dos fatores de crescimento no enxerto e pela degranulação das plaquetas. Os fatores liberados são: Fator de Crescimento Transformante (TGF- β), o Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF), e o Fator de Crescimento Similar à Insulina (IGF), que são responsáveis pela migração de células endoteliais e pela proliferação e formação de capilares além de outros eventos celulares. Os fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF) estimulam a mitogênese e inicia a angiogênese do complexo capilar. Suas ações nos osteoblastos são de mitose e de quimiotaxia (GAMAL; MAILHOT; GARNICK, 1998; HAASE; CLARKSON; WATERS, 1998; MATSUDA; LIN; KUMAR, 1992). Os TGF- β s são fatores de crescimento e de transformação. São cinco os membros dessa família (β 1 a β 5), dos quais apenas o β 1 e o β 2 estão ligados à regeneração óssea. Suas funções mais importantes são a quimiotaxia e a mitogênese dos osteoblastos. O IGF atua nos osteoblastos do endóstio para limitar o enxerto ósseo. Uma resposta coordenada de várias células é desencadeada nos tecidos biológicos. Essas células são responsáveis pela defesa humoral que neutralizam e eliminam moléculas estranhas, trocando sinais para ativar os processos de sobrevivência do organismo. Na segunda fase, os fatores de crescimento contribuem no processo de regeneração, principalmente na mitogênese das células do canal medular e angiogênese capilar. Caracterizam-se pela consolidação clínica do enxerto. Na fase final, o enxerto já é vascularizado e a regeneração óssea está em fase final. O estágio chamado de remodelação é caracterizado pela liberação de proteína morfogenética óssea (BMP) e IGF e proteínas ácido-insolúveis. A arquitetura óssea já é madura, havendo a presença de sistemas haversianos, endóstio e perióstio, portanto considerada autossustentada.

2.3 UTILIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS EM ALVÉOLOS

A realização da revisão da utilização dos biomateriais em alvéolos se dá devido à comparação do experimento proposto neste trabalho, que são os defeitos não críticos em calvárias de ratos, os quais simulariam uma situação de alvéolo

fresco preenchido com biomaterial, já que se observa na literatura que os alvéolos frescos podem ser considerados defeitos não críticos, ou seja, haveria o reparo do alvéolo pela própria formação de coágulo.

Okamoto, Perri de Carvalho, Milanezi (1974) desenvolveram uma linha de pesquisa sobre reparo alveolar em relação a vários fatores, sejam intrínsecos ou extrínsecos. Utilizaram o biomaterial BOPLANT, osso bovino desprovido das frações orgânicas, em alvéolos de ratos, para avaliar o comportamento do processo de reparo em feridas após extração dental. Foram utilizados 24 ratos divididos em 6 grupos, o material colocado em alvéolos dos incisivos superiores, sendo compactado no interior do coágulo em formação, preenchendo parcialmente o alvéolo. Os animais foram sacrificados em 1, 3, 6, 9, 15 e 21 dias após o enxerto. Recolhido o material da biópsia, foram confeccionadas lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Com base nos resultados histológicos, concluíram que o reparo alveolar foi retardado pela presença do material, que provocou intensa reação inflamatória nos estágios iniciais, não estimulando a osteogênese; porém na reconstrução de cristas alveolares ou para perda por lesões periodontais, o material mostrou bons resultados.

Scheer, Boyne (1987), em revisão de literatura sobre alguns biomateriais para manutenção de osso do rebordo alveolar, enfatizaram o uso da hidroxiapatita (HA) sintética e osso bovino inorgânico. A HA sintética é um material compatível e osteofílico, não osteogênico, e possui a função de um mantenedor de espaço ou um arcabouço para a proliferação celular e formação óssea. O osso bovino inorgânico demonstrou ser biocompatível e com reabsorção mais lenta do que a HA sintética. O rebordo alveolar enxertado com osso bovino inorgânico apresentou melhor conformidade e com menores ângulos do que o rebordo que recebeu a HA sintética.

Bonachela, Molo, Taga (1992) relataram um caso clínico em que na extração dos dentes 31, 32, 41, 42, 43, 44, 45 foi usada a HA sintética microgranular (Biohidroxi – Inodon), em seus respectivos alvéolos, para auxiliar na manutenção do rebordo alveolar. Um protocolo cirúrgico foi realizado para propiciar o menor dano possível aos tecidos adjacentes o qual levaria a um melhor reparo da ferida cirúrgica. Após as exodontias, o biomaterial foi inserido no alvéolo e o tecido gengival suturado, buscando-se uma boa coaptação das margens do retalho. A função mastigatória do paciente foi restabelecida com a instalação de uma prótese

total imediata (PTI), seguida de avaliação radiográfica e clínica. Após 7 dias, foram notadas ulcerações provocadas pela PTI, mas a área da intervenção cirúrgica seguia o processo normal de reparação. Aos 3 meses, a mucosa estava firme à palpação e com uma coloração normal, sem ulcerações. A análise radiográfica evidenciou o aumento da radiopacidade na região apical dos alvéolos e também na manutenção do nível ósseo original.

Becker, Lynch, Lekholm (1992) compararam a formação de osso ao redor de implantes colocados em alvéolos de cães, imediatamente após exodontia, em cujos alvéolos foram realizadas deiscências nas paredes vestibulares, com o uso de brocas. Os grupos foram divididos da seguinte forma; 1) Implante + Membrana de Politetrafluoretileno expandida (PTFE-e); 2) Implante + PTFE-e + osso alógeno cortical desmineralizado liofilizado; 3) Implante + PTFE-e + fatores de crescimento de plaqueta + fatores de crescimento insulino-dependente 1. Após 18 meses, os animais foram sacrificados e submetidos a processos laboratoriais histológicos para futura análise histológica. Após a análise dos resultados no grupo 2 o nível ósseo manteve-se inalterado. No grupo 1 e 3 foram encontrados resultados diferentes, ocorrendo crescimento ósseo ao redor do implante. Histologicamente, o grupo 3 apresentou maior densidade óssea comparado aos outros grupos.

Becker, Becker, Caffesse (1994) avaliaram a capacidade de formação óssea do osso desmineralizado liofilizado colocado em alvéolos humanos após exodontia. Os pacientes deveriam apresentar 2 sítios com dentes peridontalmente condenados, sendo que sete pares de sítio foram enxertados com osso desmineralizado liofilizado ou osso autógeno. Os sítios foram reabertos entre 3 e 13 meses para a obtenção de biópsias e colocação de implantes. O material para biópsia foi coletado da seguinte forma: 1 biópsia após 3 meses; 2 após 4 meses da cirurgia; 2 após 7 meses da cirurgia; 1 após 8 meses da cirurgia e 1 após 13 meses da cirurgia. Nos sítios que receberam osso desmineralizado liofilizado constatou-se a presença de partículas do enxerto sem nenhuma evidência de formação óssea em sua superfície e nenhuma evidência de reabsorção por osteoblastos de partículas ósseas. Já na biópsia de 6 sítios autógenos, observaram-se canais vasculares com osso medular e lamelar, formação óssea secundária e sinais de reabsorção. Alguns espécimes apresentavam esquirolas ósseas não vitais, que estavam sendo reabsorvidas por osteoclastos.

Dies et al. (1996) analisaram 12 casos clínicos submetidos à regeneração tecidual guiada (RTG) com ou sem biomaterial (Bio-Oss ou DFDBA) sob uma membrana de Tefé. Histologicamente observou-se que houve formação óssea em todos os casos, mas com variações individuais na quantidade de osso formado, confirmando os dados obtidos radiográfica e clinicamente. Nos sítios tratados apenas com membrana, havia osso lamelar com grande espaço medular nos períodos de 6 meses, enquanto que aos 9 meses observava-se boa densidade óssea. Nos sítios com membrana e biomaterial, observou-se tecido ósseo mineralizado e com grande quantidade de xenoenxerto após 6 meses, demonstrando o maior tempo necessário para a regeneração óssea.

Becker, Clokie, Sennerby (1998) realizaram um levantamento de casos clínicos de 7 diferentes clínicas e observaram clinicamente 15 pacientes e o aspecto microscópico de 21 biópsias. Os enxertos de osso autógeno foram retirados da região intraoral e aplicados a 6 sítios, osso desmineralizado liofilizado a 7 sítios, osso mineralizado liofilizado a 7 sítios ou a combinação de osso autógeno com osso desmineralizado liofilizado e membrana aplicada a 1 sítio. Esses sítios consistiram em alvéolos ou em recobrimento de implantes. Foi determinado um escore de 0-4 para avaliar a presença de restos de materiais implantados, vasos sanguíneos, ilhas de cartilagem, osteoblastos e formação de novo osso. Os resultados demonstraram que o osso desmineralizado liofilizado e o osso mineralizado liofilizado proporcionaram valores inferiores a 1 devido à retenção de partículas de enxerto não vital dentro de tecido fibroso conjuntivo. Em biópsias adjacentes, o leito hospedeiro demonstrou incorporação de aloenxerto (osteocondução), levando a conclusão de que o aloenxerto pode atuar como carreador biológico e, aparentemente, não contribui para osteoindução.

Howell et al. (1997) avaliaram a BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) em associação a uma esponja de colágeno absorvível, utilizadas para preservação do rebordo alveolar depois da extração dentária, ou aumento ósseo de defeitos localizados. Os autores avaliaram a segurança e a facilidade técnica da implantação da rhBMP-2. Foram monitorados 12 pacientes, sendo 6 para preservação de rebordo e 6 para aumento do rebordo alveolar. A facilidade da técnica foi avaliada pela coleta de informação relatada pelos cirurgiões quanto às propriedades do manejo da rhBMP-2. Observaram que a manipulação foi fácil e a adaptação nos

rebordos e alvéolos, adequados. A análise clínica evidenciou que a rhBMP-2 foi bem tolerada sistemicamente (ausência de resposta alérgica ou imunológica) e localmente (ausência de edema ou rejeição do enxerto). Todos os sítios demonstraram firmeza e integridade à palpação na 4ª semana, evidenciando, porém, uma perda de volume em algumas áreas entre a 4ª e a 8ª semana.

Perri de Carvalho, Okamoto, Garcia Jr. (1998) testaram a HA policristalina porosa não reabsorvível (Osteosynt, Einco BHZ, Brasil) associada ou não com uma membrana de teflon (Regetec, Brasil) em alvéolo de ratos, com o objetivo de comparar histologicamente a evolução do processo de reparo em feridas de extração dental com alveolectomia parcial. Verificou-se que o colágeno não preencheu uma de suas finalidades, que seria a de auxiliar na fixação e manutenção da HA na área implantada. O tempo de reparo foi mais lento no grupo em que se empregou a membrana.

Becker et al. (1998) realizaram um estudo comparativo entre osso bovino inorgânico (n=5 sítios), osso desmineralizado liofilizado (n=3 sítios), osso autógeno (n=3 sítios) ou BMP humana (hBMP) associada osteocalcina/osteonectina (n=2 sítios), em 3 pacientes que receberam 6 microparafusos fixados nos alvéolos implantados com o osso bovino (3 sítios), osso humano liofilizado desmineralizado (DFDBA) (2 sítios) ou osso autógeno intraoral (1 sítio). Na biópsia do grupo que recebeu o osso bovino havia partículas do enxerto ao redor do tecido conjuntivo. Foi possível também observar o osso do hospedeiro em contato com partículas de osso bovino. No grupo com DFDBA havia partículas do enxerto entrelaçadas com tecido conjuntivo denso. Biópsias de hBMP exibiram combinação de osso medular e lamelar. Com os microparafusos e osso bovino houve uma interface de tecido conjuntivo entre o parafuso e o tecido ósseo circundante. Os parafusos associados ao DFDBA estavam circundados com tecido conjuntivo e com partículas de osso envolvendo o tecido fibroso. Os parafusos associados ao osso autógeno estavam primariamente circundados por osso vital e com interface de tecido conjuntivo. Observaram que nos alvéolos que receberam somente os enxertos de osso bovino e DFDBA havia resquícios de materiais, enquanto que em alvéolos com hBMP foi possível observar a formação de osso lamelar e medular.

Lekovic, Camargo, Klokkevold (1998) utilizaram membranas bioabsorvíveis feitas de ácido polilático e poliglicólico para melhorar a preservação de rebordo

alveolar em 16 pacientes com indicação de exodontia de dentes anterior ou pré-molares. Foram realizadas as exodontias, buscando-se preservar as estruturas adjacentes, e em seguida as membranas foram colocadas seguindo-se a técnica de RTG e fixadas com pinos de titânio. A análise clínica evidenciou pequena perda em altura do rebordo alveolar nos sítios que receberam a membrana, em comparação ao controle, sem membrana.

Tal (1999) utilizou o osso bovino desproteinizado e osso desmineralizado liofilizado (aloenxerto), ambos recobertos com enxerto de mucosa queratinizada obtida do palato do paciente. A sua avaliação foi baseada em parâmetros clínicos, julgando estes como: vital, o alvéolo deve estar totalmente selado com tecido conjuntivo após 2 semanas e o tecido gengival sem aspecto de necrose; parcialmente vital, quando parte do enxerto gengival tem sinal de vitalidade e outra com possível sinal de necrose e o alvéolo deve estar parcialmente preenchido de tecido conjuntivo após 2 semanas; não vital, o enxerto gengival é facilmente removido sem sinal de vitalidade e com exposição de coágulo e perda espontânea do enxerto ósseo durante as primeiras 2 semanas. Os resultados demonstraram que, após 1 mês, todas as áreas encontravam-se com selamento da mucosa. Os alvéolos preenchidos com osso desmineralizado liofilizado apresentaram uma porcentagem maior quando considerado vital ou parcialmente vital em relação ao osso bovino desproteinizado (86% x 62%).

Thompson (1999) demonstrou um protocolo minucioso na utilização de biomateriais em alvéolos após exodontia, relatando desde a aceitação do paciente até o controle pós-operatório. Foi utilizado vidro bioativo associado à membrana não absorvível de PTFE-e. Após 10 meses, observou-se radiograficamente o alvéolo intacto e pronto para o restabelecimento protético final ou para a colocação de um implante osteointegrado.

Gauthier, Boix, Grimandi (1999) utilizaram um polímero derivado de celulose (metil-hidroxi-propil-celulose, MHPC) associado a grânulos de fosfato de cálcio bifásico implantados em alvéolos de pré-molares superiores e inferiores de cachorros. Após 3 meses da implantação, foi realizada a biopsia dos alvéolos e observaram uma quantidade maior de osso formado na mandíbula, tanto do lado controle quanto do experimental. Histologicamente, foi observada intensa mineralização constituída de osso lamelar em volta de todo grânulo do polímero. A

quantidade de osso formado, tanto no grupo controle como no experimental, não foi estatisticamente significativa, sendo o controle $56,19\% \pm 12,17\%$ e o experimental $59,15\% \pm 8,61\%$.

Smukler, Landi, Setayesh (1999) utilizaram DFDBA (American Red Cross, St. Luis, MO) com membrana não reabsorvível de PTFE-e (GTAM, WL Gore, Flagstaff, AZ) para avaliar a quantidade de osso formado em alvéolo após extração dentária e aumento no rebordo alveolar. Em um período entre 8 e 23 meses realizaram a biópsia e a colocação de implantes na região do enxerto. Clinicamente a espessura e altura óssea em todos os casos permitiram a colocação dos implantes. Histologicamente, não se observou nenhuma resposta inflamatória ou encapsulamento fibroso das partículas do enxerto, encontrando, porém, alguns osteoclastos em volta do remanescente do DFDBA.

Artzi, Tal, Dayan (2000) avaliaram histomorfometricamente a evolução do reparo alveolar preenchido com osso bovino mineral poroso após 5 meses. O estudo foi realizado em 15 alvéolos de 15 pacientes, onde foram mensuradas as alturas iniciais dos rebordos. Após 9 meses, realizaram outra mensuração e obteve-se um valor de 82,3% de aumento do rebordo. Histologicamente, verificou-se que na área coronal havia uma quantidade de osso formado com abundantes células medulares, enquanto que na região apical observou-se somente um arranjo lamelar. O tecido conjuntivo diminuiu de 52,4% para 9,5% da crista para a região apical, enquanto que para o tecido ósseo foi de 15,9% coronal para 63,9% apical.

Em um estudo *in vivo* utilizando poros de HA pré-incubados em solução de bifosfonato, os quais foram inseridos em alvéolos de cabra, para avaliar a osteocondução e o reparo alveolar, Denissen; Montanari; Martinetti (2000) observaram que houve uma total integração do material acompanhado de uma boa vascularização e osteocondução para o crescimento de osso em volta e dentro da estrutura porosa.

Pinto et al. (2000) em relato de um caso clínico utilizando BMPs bovina associada a HA absorvível (BMP[®] - Dentoflex) e matriz orgânica de osso bovino liofilizado (Osseobond[®] - Dentoflex) em alvéolo, após exodontia, e recoberto com uma membrana absorvível de cortical óssea bovina liofilizada (Bioplant[®] - Dentoflex), verificaram que os resultados histológicos demonstraram osso em quantidade e

qualidade satisfatória para futura instalação de implantes, rico em células (osteócito) e rodeadas por fibras colágenas dispostas paralelas umas às outras, boa vascularização, com atividade osteoclástica e presença de resquícios de matriz orgânica.

Camargo, Lekovic, Weinlaender (2000) utilizaram vidro bioativo em alvéolos, após exodontia, para verificar a influência deste no processo de reparo alveolar. Após a colocação do material foram instalados pinos de titânio nas áreas, tanto de controle como na experimental, sendo um parâmetro de medição. Os resultados demonstraram uma quantidade intensa de osso preenchendo o alvéolo nas áreas experimentais e uma menor reabsorção em altura quando comparado com o controle. Em relação à reabsorção horizontal, houve uma similar diminuição em ambos.

Cordioli, Pustiglioni, Georgetti (2000), estudaram a reparação óssea alveolar pós-exodontia em cães, com ou sem o uso de membrana de PTFE-e, e observaram que o tecido ósseo neoformado nos alvéolos apresentou características de osso imaturo, tanto no lado com membrana quanto no lado sem membrana, e os alvéolos mostraram um padrão de reparação óssea semelhante, com ou sem membrana. Porém, nos casos onde a membrana sofreu deslocamento, observou-se um retardo na reparação quando comparado aos demais.

Calixto, Teofilo, Brentegani (2001) testaram partículas de resina de mamona (AUG-EX; Poliquil Polímeros químicos, LTDA, Araraquara, SP) em alvéolo dental de ratos, para verificar a sua biocompatibilidade e a sua interferência na cronologia de reparo alveolar. Os resultados histológicos demonstraram a localização das partículas na região média e cervical a qual, com o decorrer do período, foi circundada por tecido conjuntivo frouxo e posteriormente por tecido ósseo e algumas células gigantes do tipo corpo estranho aderidos à sua superfície. Observaram, ainda, que houve menor neoformação óssea, sendo que o reparo foi retardado em 13% a 20%.

Artzi, Nemcovsky, Tal (2001) publicaram a segunda parte do trabalho apresentado em 2000, onde utilizaram o osso bovino mineral poroso em alvéolos. A metodologia e material foram os mesmos do primeiro artigo, exceto quanto ao processamento histológico, onde foi utilizado outro tipo de corante na avaliação da quantidade de osso lamelar em comparação ao osso medular na superfície, meio e

profundidade dos espécimes. Em todos os métodos notou-se a neoformação óssea aderida ao redor do material enxertado. Com o corante Tricômio de Mallory, observaram-se osteoblastos presentes, com uma camada osteóide entre as partículas de PBBM (porous bovine bone mineral) e o novo tecido ósseo. Com o Picro Sírius Vermelho observou-se um aumento de tecido ósseo na direção corono-apical. A quantidade de tecido ósseo na região superficial é de 17,1% com proporção de 1:12,9 de osso lamelar/medular. Na região média a quantidade de osso foi de 48,3% com uma proporção 1:3,8 em um aumento ósseo de 63,9% com proporção de 1:1,7 de osso lamelar/medular. As partículas do material não foram significativamente absorvidas após 9 meses.

Froum, Cho, Rosenberg (2002) compararam o vidro bioativo e o osso desmineralizado liofilizado quando utilizados em alvéolos dentários. Utilizaram 30 pacientes, divididos em 3 grupos de 10 indivíduos cada; um grupo recebeu o vidro bioativo, 10 receberam osso desmineralizado liofilizado e 10 com coágulo (controle). Após 8 meses, retirou-se uma amostra da área antes da colocação do implante. Na análise histológica, observou-se que a quantidade de osso neoformado com o uso do vidro bioativo foi de 59,5%, com o osso desmineralizado liofilizado 34,7% e no grupo controle, 32, 4%. Não houve diferença estatística quanto ao volume de osso neoformado, mas em relação ao material implantado residual foi significativamente maior no grupo com osso desmineralizado liofilizado (13,5%) quando comparado ao vidro bioativo (5,5%).

Brandao, Brentegani, Novaes Junior (2002) implantaram em alvéolos de ratos HA, associada ou não a BMPs. Nesse estudo utilizaram-se 45 ratos que foram divididos em 3 grupos de 15 animais: controle (não tratados), implantados com HA pura e implantados com HA acrescida de BMPs. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados nos períodos de 7, 21 e 42 dias após procedimentos cirúrgicos. Realizadas a análise histológica e a histométrica, observou-se que o reparo alveolar sofreu um atraso em ambos os grupos com material (HA pura ou HA/BMPs), principalmente no grupo que recebeu HA/BMPs e no período de 21 dias, ou seja, ao ser comparado com o grupo controle, o reparo alveolar sofreu retardo com a utilização desses materiais.

Norton, Odell, Thompson (2003) avaliaram 15 pacientes de uma clínica privada especializada. Após extração dental e colocação de Bio-Oss (Geistlich

Pharma, Wolhusen, Switzerland) e dentro do tempo de reparo, as áreas foram abertas e através de uma trefina foram retiradas biópsias para análise histológica, com a finalidade de avaliar a porcentagem de osso formado, o remanescente de Bio-Oss, o tecido conjuntivo na área e porcentagem de contato entre o enxerto e o tecido ósseo. A formação óssea foi de 26.9%, a porcentagem de remanescente de Bio-Oss foi de 25,6% e o tecido conjuntivo foi de 47,4%. A média do contato entre o Bio-Oss e o tecido ósseo foi de 34%. A taxa de sucesso dos implantes colocados após a cicatrização completa dos enxertos foi de 97%.

Fisher, Lalani, Bossano (2004) utilizaram um gel de polímero hidrofílico em alvéolos de coelhos para impedir o processo de reabsorção e adesão celular. Após a remoção do incisivo central o alvéolo foi preenchido com o biomaterial, em períodos experimentais de 4 dias, 1, 2, 4 e 8 semanas após a cirurgia. Os animais foram sacrificados e os realizados processamentos histológicos, obtendo-se lâminas coradas com hematoxilina e eosina, e realizou-se imuno-histoquímica. Os resultados enfatizaram a necessidade de considerar as propriedades do biomaterial e os efeitos diferentes sobre os fatores de crescimento endógenos e a cicatrização óssea, juntamente com desenvolvimento da engenharia tecidual.

Serino, Rao, Iezzli (2008) avaliaram o grau de mineralização óssea nos alvéolos três meses após o uso de um material bioabsorvível e o grau de reabsorção do material enxertado. Todos os pacientes necessitavam da extração de um ou mais dentes unirradiculares, e os dentes extraídos foram substituídos com implantes dentários. Após a elevação de retalhos de espessura total e extração de dentes, os alvéolos foram preenchidos com esponja de ácido polilático-bioabsorvível polyglycolide (Fisiografts) (Grupo Teste - T) ou alvéolo preenchido com coágulos (grupo controle - C) Os retalhos foram suturados sem nenhuma tentativa de conseguir o fechamento primário da ferida cirúrgica. A cirurgia de implante foi realizada três meses após as extrações. Quinze biópsias (sete e nove T C) foram colhidas dos locais onde os implantes foram colocados. As biópsias colhidas a partir dos sites T revelaram que os alvéolos se apresentavam com novo osso trabecular, mineralizado e muito bem estruturado. Partículas do material enxertado não puderam ser identificadas em nenhuma das biópsias T. O osso formado nos sítios C também foi bem estruturado, com uma porcentagem ligeiramente menor do osso mineralizado. Em ambos T e biópsias C, a parte apical apresentou maior grau de

mineralização em relação à porção coronal. Os resultados desse estudo indicam que o uso de uma esponja bioabsorvível sintética de ácido polilático-polyglycolide não interfere na formação de osso novo nos alvéolos, e que as características dos 3 meses de formação de novo osso parecia ser o ideal para a inserção de implantes dentários. A biocompatibilidade, segurança e característica do Fisiograft sugerem que o material é adequado para o preenchimento dos alvéolos após as extrações a fim de se evitar a redução do volume e do colapso do tecido que recobre a ferida.

Fickl, Zuhr, Wachtel (2008) estudaram sobre a influência dos enxertos xenogênicos na preservação do contorno do alvéolo. Em cinco cães da raça beagle, a raiz distal do terceiro e quarto pré-molares inferiores foi extraídas. Os seguintes tratamentos (Tx) foram aleatoriamente designados para a tomada de extração. Tx 1: Colágeno BioOss. Tx 2: BioOss colágeno e enxerto de tecido gengival livre. Tx 3: Nenhum tratamento. Tx 4: A parte vestibular foi coberta com uma membrana de colágeno experimental, o alvéolo foi preenchido com BioOss colágeno e a membrana dobrada em cima do enxerto. As impressões foram obtidas no início, 2 e 4 meses após a cirurgia. Medições Buco-linguais foram realizadas através de análise de imagem digital e todos os grupos apresentaram uma retração no contorno gengival. Houve somente diferença entre os dois grupos de teste (Tx 1, Tx 2) e o grupo controle (Tx 3) foram significativas na vestibular ($p < 0,001$). Técnicas de preservação alveolar, utilizadas no presente experimento, não foram capazes de compensar inteiramente as alterações após a extração do dente. No entanto, a incorporação de colágeno BioOss parece ter o potencial de limitar, mas não de evitar, o encolhimento do contorno pós-operatório.

Fickl, Zuhr, Wachtel (2008) publicaram, em outro periódico, um trabalho muito parecido com o descrito anteriormente, apenas diferindo o método de avaliação. Nesse trabalho avaliou-se histomorfometricamente o reparo alveolar após a colocação de BioOss em alvéolos de cães. Quatro meses após a cirurgia, os cães foram sacrificados e de cada local da extração realizaram-se de dois cortes histológicos que foram selecionados para a análise histomorfométrica. Os parâmetros avaliados foram: (1) a dimensão vertical foi determinada pela colocação de uma linha horizontal sobre a parede óssea lingual. Então, a distância entre esta linha para a parede óssea bucal foi medida. (2) A dimensão horizontal foi avaliada em três áreas diferentes medidas a partir do topo da crista lingual: 1 mm (valor 1), 3

mm (valor 3) e 5 mm (valor 5). A média de perda vertical do osso bucal para um grupo Tx 1 foi de $2,8 \pm 0,2$ mm. O Tx 2 apresentou perda vertical de $3,3 \pm 0,2$ mm. O grupo Tx 3 demonstrou $3,2 \pm 0,2$ mm de perda vertical média. A dimensão horizontal do processo alveolar foi de $4,4 \pm 0,3/6,1 \pm 0,2/7,2 \pm 0,1$ milímetros nos três níveis diferentes do grupo Tx 1. O grupo Tx 2 apresentou dimensões de $4,8 \pm 0,2/6,0 \pm 0,2/7,1 \pm 0,1$ mm. A dimensão horizontal da 3 Tx grupo foi de $3,7 \pm 0,3/6,2 \pm 0,2/7,0 \pm 0,1$ mm. Quando os resultados das medições horizontais foram testados com análise de variância (ANOVA), um valor significativo de 1,0mm foi encontrado entre os grupos Tx 1, Tx 2 e Tx 3 ($P < 0,001$).

Araujo, Linder, Lindhe (2009) avaliaram o efeito sobre a formação óssea precoce, resultante da colocação de um xenoenxerto em alvéolos frescos em cães. Foram utilizados 5 cães beagle, das quais as raízes distais do terceiro e quartos pré-molares inferiores foram removidas. Em um quadrante, um enxerto composto por Bio-Oss colágeno foi colocado no alvéolo fresco, enquanto os sítios correspondentes pré-molar do quadrante maxilar contra-lateral não foram enxertadas. Após 2 semanas de cicatrização, os cães foram perfundidos com fixador, as mandíbulas removidas, os sítios experimentais dissecados, desmineralizados, seccionados no plano méso-distal e corados em hematoxilina-eosina. A parte central das tomadas não enxertadas foi ocupada por uma matriz provisória formada por camada densa de fibras do tecido conjuntivo e células mesenquimais. A parte apical e lateral foi ocupada com uma matriz provisória óssea e o tecido recém-formado ocupando a maior parte das tomadas. Na parte apical do alvéolo enxertado não se observaram partículas do xenoenxerto, mas osso recém formado esteve presente nessa parte do site experimental. Além disso, um número limitado de trabéculas ósseas teciduais ocorreu ao longo da tomada lateral das paredes. Os segmentos central e marginal dos alvéolos enxertados, no entanto, estavam ocupados.

Araujo, Liljenberg, Lindhe (2010) analisaram os processos envolvidos na incorporação de partículas de fosfato beta-tricálcio (TCP) no tecido do hospedeiro, durante a cicatrização, após extração dentária e enxertia. Cinco cães beagle foram utilizados e os quartos pré-molares na maxila (3P3, 2P2) foram semisseccionados, as raízes distais foram removidas e o alvéolo da extração fresco preenchido com TCP. A extração de dentes e os procedimentos foram programados no sentido de que as biópsias representando 1 e 3 dias, bem como 1, 2 e 4 semanas de reparo pudessem

ser obtidas e os elementos de tecidos, como células, fibras, vasos, leucócitos e osso mineralizado foram determinados. Foram expressas através de biomarcadores a fosfatase alcalina, osteoponina e o ácido fosfórico resistente tartare. A porosidade das partículas de TCP foi inicialmente preenchida com eritrócitos que, posteriormente, foram substituídos por osso mineralizado. Parte do material do enxerto foi invadido por células mesenquimais e inflamatórias e se desintegrou. Assim, pequenos grânulos de membrana apareceram no tecido de granulação e na matriz óssea provisória. No processo de formação de tecido duro, parcialmente mineralizado, partículas de TCP estavam rodeadas por ilhas de tecido ósseo. Foi demonstrado que o reparo de um alvéolo enxertado com b-TCP apresentava restos do enxerto envolvidos por matriz óssea e a formação de um coágulo foi substituído com tecido de granulação e uma matriz provisória. Nesse processo, o biomaterial estava aparentemente envolvido.

2.4 TESTES EXPERIMENTAIS EM CALVÁRIAS DE COBAIAS

Glowacki, Altobelli, Mulliken (1981) avaliaram através, de defeitos ósseos de 4 mm de diâmetro em calvária de ratos, o fator de reparo ósseo, tipo celular presente nessas áreas enxertadas com osso mineralizado e desmineralizado alogênicos. Após 2 semanas, verificaram um preenchimento do defeito em 100% no grupo desmineralizado e que através de histomorfometria, pequenas partículas desse biomaterial induziam mais a formação óssea do que as partículas de maiores tamanhos. Já no grupo mineralizado observaram reabsorção total do enxerto após 3 semanas sem o preenchimento total do defeito, encontrando muitas células multinucleadas e tecido conjuntivo.

Bosch, Melsen, Vargervik (1998) provocaram defeitos bilateralmente críticos de 5 mm em calvária de ratos Wistar, sendo que um lado serviu de controle, não recebendo nenhum tipo de material, enquanto que o outro lado recebeu um material osteopromotor. Os animais foram sacrificados após 6 e 12 meses pós-cirurgia e avaliadas a formação e o fechamento da calvária. Os fechamentos foram classificados em total, parcial ou sem fechamento. Após 6 ou 12 meses, observaram um fechamento parcial dos defeitos no lado controle, apresentando somente tecido

ósseo na periferia do defeito. Concluíram que a utilização de um defeito bilateral de 5 mm é eficaz como defeito crítico, possibilitando uma avaliação pareada de materiais, já que nessa dimensão de defeito tem-se a possibilidade de confeccionar dois defeitos, um em cada parietal.

Majzoub, Berengo, Giardino (1999) avaliaram a influência da perfuração da cortical externa da calvária no reparo ósseo, realizando defeitos bilaterais circulares, com o auxílio de uma trefina nas calvárias de ratos, penetrando somente 1 mm na cortical de ambos os lados: no lado teste, realizaram-se perfurações na cortical externa da calvária com o auxílio de brocas esféricas, com a finalidade de criar uma comunicação da região do osso medular da calvária com o espaço criado acima com uma cápsula de titânio pré-fabricada de 4,8 mm de diâmetro e altura de 3,0 mm; no lado controle colocou-se somente a cápsula. Com isso avaliar-se-ia a influência do tecido medular na formação óssea em áreas confinadas, ou seja, áreas que receberam exclusivamente nutrição da cortical externa ou da medula óssea. Os animais foram sacrificados em 10, 21, 42 e 60 dias, sendo avaliada a formação óssea pela análise de histomorfometria. Foi observada, também, uma maior neogênese em todos os períodos no grupo teste (perfuração do cortical – influência da medula) quando comparado ao grupo controle e, quanto à densidade, esta foi maior no grupo teste do que no grupo controle, ou seja, tem-se uma influência positiva da medula na regeneração óssea, acelerando esse processo e aumentando a quantidade e qualidade de tecido ósseo neoformado.

Verheggen, Merten (2001), na área médica, realizaram um trabalho clínico e experimental em animais (miniporcos), avaliando um cimento de HA em defeitos em calvária. Avaliaram-se 10 pacientes que necessitavam de enxertos na área do crânio e que receberam o cimento de HA. Essa avaliação ocorreu através de radiografias após 6 meses do enxerto; no caso dos animais, estes foram sacrificados após 12, 18 e 40 semanas após a cirurgia. Histologicamente (através dos porcos), observou-se que houve uma total reabsorção do cimento de HA após 40 semanas, acompanhada de uma formação de tecido ósseo na área, sem a perda no tamanho ou volume ósseo. Clinicamente (em humanos), não houve caso de hematoma ou fístula pós-operatória e, após 6 meses da cirurgia, o cimento de HA mostrou-se densamente radiopaco nas radiografias.

Verna et al. (2002) avaliaram o padrão de cicatrização nos defeitos ósseos em calvárias de ratos seguidas de regeneração tecidual guiada, por meio de uma análise de varredura por micro-CT, induzindo defeitos críticos em 48 ratos machos Wistar, que receberam membrana de politetrafluoretileno expandida (PTFE-e) oclusiva exo e endocranial (OO; n=12); outro grupo recebeu uma membrana oclusiva exocranial e uma membrana perfurada endocranial (OP; n=12); uma membrana perfurada exocranial e uma membrana (PP; n=12). Os animais foram sacrificados após 4 semanas e observou-se que havia um volume ósseo de 31,4%(OP) e 24,5%(PP). A fração volumétrica óssea e a mineralização na área média foi significativamente maior no grupo OP do que o grupo PP e na área central o grupo OO e PO foram maiores do que o grupo PP, sugerindo que o uso de uma membrana oclusiva de PTFE-e aumenta a formação óssea e maturação do esqueleto da calvária.

Mardas, Kostopoulos, Karring (2002) avaliaram o efeito da regeneração tecidual guiada (RTG) sozinho, implantação da matriz óssea desmineralizada (DBM) sozinha e do tratamento combinado na cicatrização dos defeitos em crânios que envolvem a sutura cranial sagital, buscando avaliar o crescimento da calvária subsequente. Sessenta ratos foram usados no estudo e foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (A-E) de 12 animais. Em quatro grupos (A-D), foram realizados defeitos nas calvárias (5.0 mm) que envolviam a sutura sagital, trabalhando da seguinte forma: Grupo A: defeito deixado sem tratamento. Grupo B: DBM implantado no defeito. Grupo C: dura-máter e o defeito superficial coberto com uma membrana do PTFE-e. Grupo D: defeito tratado com a técnica de dupla membrana combinada com a implantação de DBM. Grupo E: Os animais eram operados sem a realização de defeito. Em todos os grupos, dois pontos de guta-percha foram colocados para indicar as bordas laterais dos ossos parietais. A análise histológica, realizada após 4 meses pós-cirurgia, mostrou que o defeito cranial sem tratamento (A) cicatrizou com a presença de um tecido conjuntivo fibroso na porção mediana do defeito. Os defeitos enxertados com DBM (B) cicatrizaram completamente contendo partículas de DBM ou parcialmente com osso e o tecido conjuntivo. Os defeitos (D) tratados com o DBM combinado com o RTG cicatrizaram completamente com o osso, quando os defeitos (C) foram tratados com as membranas sozinhas cicatrizaram com osso, mas a sutura estava com tecido similar

à sutura sagital normal dos animais do grupo controle (E) sempre presente na porção mediana do defeito. A radiografia cefalométrica demonstrou que o grupo tratado com membrana (C) e os animais controle (E) exibiram o crescimento coronal similar do crânio depois do tratamento. Os resultados demonstraram que a cicatrização óssea incluiu uma formação da sutura sagital podendo ser realizada em defeitos em calvária pela técnica da RTG, e o crescimento ósseo da calvária não é uniforme. O tratamento dos defeitos com o DBM sozinho ou o DBM combinado com a RTG resulta na craniosinostose e um crescimento cranial reduzido.

Fowler et al. (2002) avaliaram a evolução do polióleo plurônico como carreador para materiais de enxerto em calvária de ratos. Os polióleos plurônicos são uma família dos agentes de superfícies ativos não-iônicos usados atualmente como carreadores de droga para os agentes do antibiótico, antiinflamatórios e antineoplásicos. A administração terapêutica desses agentes de superfícies ativos não-iônicos facilita a síntese do colágeno e microcirculação, promovendo assim a cicatrização da ferida. Cento e cinquenta (150) ratos Sprague Dawley machos, com a idade de 95 a 105 dias, com peso entre 375 e 425 g foram distribuídos aleatoriamente e uniformemente em 15 grupos de diferentes tratamentos. Após serem anestesiados, foram realizados defeitos críticos na calvária (8 milímetros). Pluriônico F-68 (F-68) ou Pluriônico F-127 (F-127) foram administrados topicamente ou sistemicamente e associado com pó de osso desmineralizado (DBP), trifosfato de cálcio (TCP), ou sem enxerto (controle). Os polióleos pluriônicos são misturados facilmente com o DBP ou o TCP para melhorar a administração do material. As calvárias foram colhidas após 12 meses pós-cirurgia e avaliado histomorfometricamente e radiograficamente pelo contato radiográfico com subsequente análise de densitometria, através de espectrometria de energia, que utiliza um microscópio de elétron de exploração, e por fluorescência microscópica. Por meio dos resultados foi possível observar uma diferença significativa na porcentagem do osso preenchido entre o controle, grupos do TCP e do DBP ($p < 0,05$). A única diferença significativa, dentre todos os grupos, foi entre o controle do TCP e o TCP mais F-127 sistêmico ($p < 0,05$). Embora houvesse diferenças isoladas, a tendência total foi a de que o polióleo pluriônico e o modo de administração não resultassem em uma mudança significativa no processo de cicatrização óssea medidas pela porcentagem de osso preenchido. Os polióleos

pluriônicos podem ser considerados como carreadores para materiais de enxerto ósseo.

Ahn et al. (2003) realizaram um estudo avaliando o efeito da proteína morfogenética recombinante óssea humana-4 (rhBMP-4) como carreadora em defeitos em calvária de ratos. As proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) estão sendo avaliadas como candidatas para a terapia regenerativa periodontal e óssea. Entretanto, as pesquisas sobre a proteína morfogenética recombinante óssea-4 (rhBMP4) são insuficientes para avaliar sua capacidade real na formação óssea e o seu efeito carreador. Foram realizados defeitos (8 mm de diâmetro) nas calvárias de 100 ratos Sprague Dawley machos, e os animais foram divididos em 5 grupos (n=20 animais). Os defeitos do lado direito foram tratados com rhBMP-4 associado com uma esponja de colágeno absorvível (ACS) (0,05mg/mL de rhBMP-4), rhBMP-4 associado com Fosfato tricálcio β (β -TCP) (0,05mg/mL de rhBMP-4), ACS sozinha, β -TCP sozinha e o lado esquerdo de todos os animais permaneceu sem tratamento. Os ratos foram sacrificados após 2 ou 8 semanas da cirurgia, e os resultados foram avaliados pela radiodensitometria, histologicamente, e histomorfometricamente. Em relação a radiodensitometria, o grupo de rhBMP-4/ACS e o rhBMP-4/ β -TCP foram mais radiopacos que os outros grupos tanto para o período de 2 ou 8 semanas ($P<0,01$). Histologicamente, os grupos de rh/BMP-4/ACS e o rhBMP-4/ β -TCP apresentaram uma formação óssea maior em ambos os períodos quando comparados aos outros grupos. Os resultados histomorfométricos demonstraram que os grupos rh/BMP-4/ACS e o rhBMP-4/ β -TCP obtiveram maior porcentagem de osso formado em ambos os períodos quando comparados aos demais grupos ($p<0,01$). A implantação cirúrgica de rhBMP-4/ACS pode ser usada como suporte para a regeneração óssea em defeitos críticos na calvária de ratos, e o rhBMP-4/rh/BMP-4/ACS e o rhBMP-4/ β -TCP podem permitir uma regeneração óssea em defeitos de calvária de ratos sem complicações, demonstrando que ambos biomateriais podem servir como carreadores para as rhBMP-4.

Rupprecht, Merten, Kessler (2003) avaliaram o reparo de defeito crítico em calvária de miniporcos de Goettingen com a utilização de um cimento de HA (BoneSourceTM). O BoneSourceTM foi aplicado em defeitos bicortical de vários tamanhos nas testas de seis miniporcos de Goettingen, possibilitando a utilização desse material em blocos de tamanhos diferenciados. As áreas foram avaliadas

radiográfica e histologicamente após 12, 18 e 40 semanas da cirurgia. Após 40 semanas, aproximadamente, 90% do cimento de HA foi absorvido e substituído por osso. Após 12 semanas, aproximadamente, 30% tinham sido degradados e 40% após 18 semanas. Em defeitos ósseos pequenos, a mucosa da cavidade óssea frontal alinhou o substituto do osso (BoneSourceTM). Em reconstruções de grandes áreas, uma membrana foi usada para estabilizar o material. Apesar dessa sustentação pela membrana, o material de BoneSourceTM sofreu um colapso na cavidade óssea frontal. Observa-se que o cimento de HA pode ser utilizado para reparo de defeitos ósseos e moldado para dar forma nas reconstruções, porém seu uso é limitado ao tamanho do defeito e pela necessidade de um leito propício. Portanto, o BoneSourceTM serve bem para reparar defeitos pequenos com biocompatibilidade comprovada, entretanto, em defeitos grandes, o material não é suficientemente estável.

Francis et al. (2003) avaliaram um material aloplástico ósseo regenerativo em calvária de ratos. Aloplástico é um corpo estranho inerte que age como mantenedor de espaço osteocondutor durante a cicatrização óssea, podendo também funcionar como carreador para o fator de crescimento, a qual possui a função de melhorar a neovascularização e a osteoindução; o fator de transformação de crescimento humano recombinante β (rhTGF- β 1) é um desses fatores. A finalidade do estudo foi avaliar os grânulos de di-vinil estireno (DVSb) na regeneração óssea, em calvária de rato, num modelo com defeito crítico. Os grânulos de di-vinil estireno (DVSb), com ou sem rhTGF- β 1, foram colocados entre a membrana de filme gel em defeitos críticos em calvária de ratos (*Rattus norvegicus*). Preenchimento ósseo; porcentagem de preenchimento ósseo; taxa de formação óssea (TFO) e mineralização em 3, 6 e 12 semanas pós-cirurgia foram mensurados usando-se densitometria, histomorfometria, microscopia eletrônica de varredura e marcação com tetraciclina-HCl. A média da densidade e da porcentagem foram estatisticamente maiores para os grupos com tratamento de DVSb em comparação ao grupo controle ($P \leq 0,05$). A taxa de formação óssea foi consistente entre 3 e 7 μ m para todos os grupos; o grupo aloplástico teve uma taxa de formação óssea significativamente maior na semana 6 ($P \leq 0,05$); entretanto, em 3 e 12 semanas, a taxa de formação óssea no grupo controle e o material ósseo de preenchimento eram maiores do que nos grupos com tratamento ($P \leq 0,05$). As membranas

frequentemente colabaram e pouco preenchimento ósseo ou mineralização ocorreram nos defeitos sem DVSb. A mineralização aparentemente ocorreu adjacente ao aloplástico no período de 12 semanas, vista nos cortes histológicos e microscopia eletrônica de varredura. No DVSb ocorreu uma ligação fibrosa em alguns espécimes, não havendo evidências de resposta inflamatória. O DVSb, com ou sem rhTGF- β 1, aumentou significativamente a regeneração óssea no modelo de defeito crítico em calvária de ratos.

Matzenbacher et al. (2003) realizaram um estudo *in vivo* da efetividade de uma composição de glicerol com osso desmineralizado e liofilizado xenogênico em calvária de ratos. O osso desmineralizado liofilizado (DFDB) geralmente é hidratado com água esterilizada, formando uma consistência de pasta, melhorando a manipulação clínica ou utilizada com barreiras biodegradáveis, tais como o glicerol, para promover estabilidade da ferida de cirurgias periodontais humana. Para essa pesquisa foram utilizados 48 (quarenta e oito) ratos Sprague Dawley do gênero masculino e adulto, os quais foram divididos em 4 grupos ($n=12$), de acordo com o tratamento realizado: glicerol, DFDB, DFDB mais o glicerol, ou controle sem enxerto. Os materiais foram implantados em defeitos críticos (8 mm de diâmetro) nas calvárias dos animais e coletados após 8 semanas da cirurgia e avaliados histomorfometricamente. Um aumento significativamente estatístico de preenchimento de osso foi detectado no grupo de glicerol/DFDB quando comparado com os demais grupos, e obteve-se ainda uma diferença estatística entre os grupos DFDB > glicerol > grupo controle. Nenhuma diferença significativa foi anotada entre o grupo DFDB/glicerol e o grupo com somente DFDB. A adição do glicerol ao DFDB resulta na regeneração óssea comparável ao DFDB sozinho, e baseado em um julgamento clínico, as características do DFDB foram grandemente melhoradas.

Lee et al. (2003), através do conceito de regeneração tecidual guiada, realizaram um experimento em calvária de ratos para avaliar o efeito da BMP-2 adjunto a uma membrana bioabsorvível. Utilizaram 5 μ m de rhBMP-2 dentro de uma membrana, na forma de redoma esférica feita de poli (L-láctico) e Fosfato tricálcio (PPLA/TCP). A cinética de liberação de rhBMP-2 da membrana foi determinada *in vitro* usando-se uma BMP-2 humana recombinante. Doze membranas com rhBMP-2 (grupo teste) e 12 membranas controles (grupo controle) foram colocadas num defeito parcial em espessura na calvária de 24 coelhos. Os animais foram

sacrificados após 4 e 8 semanas da cirurgia e as calvárias descalcificadas para a preparação das lâminas histológicas. A área de formação óssea e altura foram mensuradas por histomorfometria e calculada pela taxa de porcentagem do total do espaço submembranoso e altura abaixo da membrana. Os resultados *in vitro* da liberação demonstraram que rhBMP-2 foi consistentemente liberado por um período de 4 semanas, seguindo uma liberação elevada inicial no primeiro dia. Em 4 e 8 semanas, a análise histomorfométrica revelou que o grupo teste evidenciou alturas e áreas maiores, que se mostraram estatisticamente significantes em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). No grupo controle, a altura do novo osso formado foi de 36,3% da altura membrana e a área do novo osso formado alcançou 8,2% da área submembranosa do espaço em 8 semanas, enquanto que o grupo do teste alcançou 87.3% e 35.4%, respectivamente. Esses resultados sugerem que o uso das membranas associadas com o rhBMP-2, PLLA/TCP pode resultar no aumento adicional do osso, devido às propriedades osteoindutoras do rhBMP-2 liberadas da membrana durante a cicatrização.

Ferreira, Cestari, Granjeiro (2004), utilizando o defeito crítico em calvária de ratos, avaliaram a capacidade da formação óssea pela BMP bovina associada com uma HA microgranular bioabsorvível. Um defeito de 8 milímetros do diâmetro foi criado na calvária de 25 ratos, sendo que em 15 ratos os defeitos foram preenchidos com o BMPb-HA homogeneizados com sangue (grupo experimental), e em 10 ratos os defeitos foram preenchidos somente com o coágulo sanguíneo (controle). As calvárias dos ratos experimentais foram coletadas em 1, 3 e 6 meses após a cirurgia; dos ratos do grupo controle a coleta foi feita ao fim da cirurgia (imediate) e após 6 meses da cirurgia. Os resultados morfogenéticos obtidos nas radiografias mostraram uma ausência da formação óssea em 1 e 3 meses pós-cirurgia e, histologicamente, os defeitos foram preenchidos com o tecido conjuntivo fibroso e numerosos focos de corpo estranho em torno dos aglomerados de HA. No fim de 6 meses, o número e o tamanho dos focos granulomatosos diminuíram e a área dos defeitos foi reduzida a 22% quando comparada ao controle (tipo imediato), devido à formação do osso novo em suas bordas, embora a média da área fosse similar ao controle de 6 meses. O uso do BMPb-HA no tratamento de defeitos críticos do osso de tamanho crítico de ratos conduz à formação de corpo estranho e uma reação

granulomatosa que inibe a formação óssea, sugerindo que o HA microgranular sintética não representa um bom carreador para as BMPs na formação óssea.

Tamura et al. (2005) avaliaram a regeneração óssea através de um tampão de titânio oclusivo na calvária do coelho usando imagens de tomografia computadorizada microfocada. Em 10 coelhos, as calvárias foram expostas e um sulco circular foi preparado. Após ter penetrado na medular, um tampão de titânio hemisférico padrão foi colocado no sulco e coberto com retalho cutâneo. Após 1 ou 3 meses, os animais foram sacrificados e as calvárias e os tampões de titânio foram dissecados. Após a tomada das imagens de tomografia computadorizada microfocada, cortes histológicos foram realizados. Os espécimes foram observados usando as imagens tridimensionais construídas das imagens da tomografia computadorizada microfocada, e os cortes histológicos foram examinados para obter parâmetros do osso. As imagens tridimensionais e os espécimes histológicos mostraram que o osso formado deu-se na forma plana, na forma de copo, e na forma da abóbada. Os parâmetros ósseos, como a espessura trabecular e a proporção do espaço medular, através da capacidade do tampão de titânio aumentaram, visto que a densidade do osso diminuiu, havendo diferença significativa entre os grupos do 1 e 3 meses. O osso trabecular formou-se ao longo das paredes da cápsula de titânio e houve preenchimento de osso na cápsula em 3 meses.

Pryor, Polimeni, Koo (2005) realizaram uma avaliação radiográfica da formação local de osso, seguido da implantação cirúrgica de um preparado de PRP usando um modelo do defeito na calvária de rato de tamanho crítico. Trinta ratos Sprague Dawley masculinos com 22 semanas de idade foram usados. A preparação de PRP foi obtida de 10ml do sangue extraídos de um rato fornecedor. Usando técnicas assépticas, a preparação de PRP foi embebida em uma esponja de colágeno absorvível (ACS) ou ACS sozinho implantado cirurgicamente em defeitos críticos 6 milímetros do lado contralateral da calvária do rato (n=18). Doze animais receberam ACS sozinho contra cirurgia controle contralateral. Os animais foram sacrificados em 4 e 8 semanas após a cirurgia, coletadas as calvárias e obtidas as radiografias. Setenta e cinco por cento dos sítios (PRP/ACS ou ACS) mostraram o fechamento parcial em 4 semanas; o sítio (ACS) exibiu fechamento completo sem diferenças entre o protocolo ($p=0,1797$). Cinquenta por cento dos sítios que receberam PRP/ACS exibiram completo fechamento, 20% fechamento parcial e 30%

não tiveram o fechamento em 8 semanas, enquanto que o grupo que recebeu somente ACS apresentou valores de 20% para o completo fechamento e 80% para fechamento incompleto ($P=0,07532$). Não havia nenhuma diferença notável entre os sítios que recebem ACS contra a cirurgia controle em 4 ou 8 semanas. Os resultados sugerem que a preparação de PRP não tem um efeito significativo na osteogênese.

Hyun et al. (2005) analisaram e compararam a atividade de formação óssea das rhBMP usando um modelo pré-clínico. Consequentemente, o objetivo do estudo foi avaliar e comparar o potencial osteogênico da rhBMP-2, de -4, e de -7 carregada por uma esponja de colágeno absorvível (ACS) em casos precoces (2 semanas) e finais (8 semanas) de cicatrização dos defeitos críticos em calvária de ratos. Os defeitos foram feitos sob medida crítica de 8,0 mm em 30 ratos Sprague Dawley masculinos. Os animais foram divididos em três grupos de 10 animais cada um. Os defeitos foram tratados com os 0.025 mg/ml rhBMP-2/ACS, rhBMP-4/ACS, ou rhBMP-7/ACS. Os ratos foram sacrificados em 2 ou 8 semanas ($n=5$ para cada período) após a cirurgia, e os resultados foram avaliados histologicamente, histomorfometricamente e imuno-histoquimicamente. A implantação cirúrgica de rhBMP-2/ACS, de rhBMP-4/ACS, ou de rhBMP-7/ACS resultou na formação local de osso nos defeitos dos ratos em 2 e 8 semanas. A quantidade de fechamento do defeito, a área nova de osso e a densidade foram similares nos três grupos em cada período ($P > 0.05$). Em relação à densidade do osso e à área nova do osso, houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos em 2 semanas e os aqueles obtidos em 8 semanas em todos os grupos ($P < 0,05$). Análise de variação a dois critérios (ANOVA) revelou que não há nenhuma correlação entre o tempo e as condições ($P > 0,05$), mas o tempo demonstrou ter uma forte influência no fechamento do defeito, na área nova do osso e na densidade do osso ($P < 0,05$). Indiferente ao tipo do rhBMP, houve uma resposta positiva na imuno-reação para o osteopontin (OPN) e de osteocalcin (OCN) em 2 e 8 semanas. Intenso OPN e marcações de OCN foram observados perto do osso neoformado como também algumas células dentro do osso neoformado. Dentre os tipos de rhBMP usados, a concentração do rhBMP e o intervalo da observação não parecem influenciar diretamente no potencial regenerativo do osso. Todas as rhBMPs usadas nesse estudo podem ser consideradas fatores eficazes para induzir à formação óssea.

Pang et al. (2005) avaliaram *in vitro* o efeito de citosan com fibroblastos do ligamento periodontal humano (hPDLF) na formação óssea em defeitos de calvárias de rato. As populações de fibroblastos foram obtidas de indivíduos com um periodonto saudável. Para os grupos experimentais, as células foram cultivadas nas concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; ou 2,0 mg/ml. Os 3-(4,5-dimetil-tiazole-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolol, a reação da cadeia da transcrição-polimerase reversa e a atividade da fosfatase alcalina foram executados. Foram realizados defeitos de 8 mm na calvária de 30 ratos Sprague Dawley masculinos. Os animais foram divididos em três grupos de 10 animais. Os defeitos foram tratados com esponja de citosan/esponja de colágeno absorvível (ACS) ou o ACS sozinho nos grupos experimentais, ou deixados sem tratamento (controles cirúrgicos). Os animais foram sacrificados em 2 ou 8 semanas pós-cirurgia e os resultados do tratamento foram avaliados usando-se parâmetros histológicos e histomorfométricos. As respostas proliferativas induzidas pelo citosan do hPDLF alcançaram um platô em uma concentração de 0.1 mg/ml ($P < 0,05$). Quando o hPDLF foi estimulado com 0.1 mg/ml de citosan, tanto a expressão do mRNA do colágeno tipo I quanto a atividade ALP foi significativamente maior ($P < 0,05$). A implantação cirúrgica de citosan/ACS aumentou a formação óssea no período de 8 semanas pós-cirurgia. A quantidade de formação de tecido ósseo no grupo citosan/ACS foi significativamente maior do que ambos os grupos, controle e ACS sozinho ($P < 0,01$). A área do novo osso e o fechamento do defeito no grupo de citosan/ACS foram significativamente maiores do que o grupo somente com ACS e o grupo controle no período de 8 semanas ($P < 0,01$). Entretanto, o grupo citosan/ACS exibiu significativa perda de densidade óssea em relação ao grupo com somente ACS e o grupo controle no período de 8 semanas ($P < 0,01$). Citosan (0,1mg/mL) aumentou a síntese de colágeno tipo I e facilitou a diferenciação de células osteogênicas.

Han et al. (2005) avaliaram a possibilidade de um sistema de selamento de fibrina-fibronectina (FFSS) como um carreador para uma BMP-4 recombinante humana (rhBMP-4) e também o potencial osteocondutor do FFSS em um defeito em calvária de rato, com 8 mm de diâmetro, estudo esse realizado em 30 ratos Sprague Dawley masculinos. Três grupos de 10 animais foram assim constituídos: rhBMP-4 (0.025 mg/ml) em FFSS, de FFSS controle, ou cirurgia controle. Os grupos foram avaliados usando-se os parâmetros histológicos e histométricos que seguem

intervalos de cicatrização de 2 e 8 semanas (cinco animais por grupo por intervalo de cicatrização). A implantação cirúrgica de rhBMP-4/FFSS resultou na formação local de osso em 2 e 8 semanas. A formação nova do osso era também evidente no controle de FFSS; entretanto, a quantidade de fechamento do defeito, de área nova do osso e de densidade do osso era significativamente maior no grupo de rhBMP-4/FFSS ($P < 0,05$). Em 8 semanas, a quantidade do osso novo era maior do que aquela observada em 2 semanas, e os espécimes mostraram um estágio mais avançado de remodelação e consolidação em ambos os grupos ($P < 0,05$). Somente no controle observou-se uma formação muito limitada de osso. Os resultados do estudo atual indicaram que o FFSS tem o potencial osteocondutor e pode ser empregado como um carreador para as BMPs.

Pryor, Susin, Wikesjo (2006) validaram as avaliações radiográficas de formação de osso em um modelo de defeito ósseo em calvária de ratos em tamanho crítico (6 milímetros). Foi realizada osteotomia bilateral em 30 ratos Sprague Dawley adultos tratados com PRP preparado de ratos controle, e foram avaliados por medidas radiográficas e histológicas depois de 4 ou 8 semanas após a cirurgia. A parcela mais central de cada local do defeito era sujeita à análise histológica, usando-se um sistema de análise de imagem PC. As avaliações radiográficas da formação do osso são associadas com as fraquezas significativas que representam o evento atual de cicatrização; $k = 0.17$, que denota um ligeiro acordo além da possibilidade. Houve perfeita concordância entre a análise histológica e a radiográfica para os locais do defeito que mostraram completo ou parcial preenchimento ósseo, que foi de 63% e 50% de acordo com os tempos, respectivamente. A concordância alcançou somente 20% para locais com nenhum ou limitado preenchimento ósseo. Quando nenhum ou limitado preenchimento ósseo ocorreu, a análise radiográfica tendeu a sobreestimar o preenchimento ósseo. Quando ocorreu o preenchimento completo dos locais de defeito, houve uma subestimação. A exatidão baixa foi observada quando as avaliações radiográficas foram empregadas para identificar e caracterizar o preenchimento dos defeitos ósseos na calvária dos ratos. A avaliação do osso formado no modelo animal deve ser realizada através de análises histológicas e não somente radiográficas.

Tamimi et al. (2006) compararam a capacidade da regeneração óssea de um carreador de Fosfato tricálcio- β (β -TCP)/Fosfato dicálcio hidratado (DCPD)

sintetizado no laboratório e Bio-Oss. Foram fixados 2 cilindros de titânio de cada lado da calvária de 14 coelhos de Nova Zelândia: um cilindro foi deixado vazio (controle negativo) e o outro foi preenchido com os grânulos de Bio-Oss ou β -TCP/DCPD (cilindro de teste). Quatro semanas após a intervenção, os animais foram sacrificados e, posteriormente, feita a biópsia e encaminhada para exame. Os seguintes parâmetros foram analisados: aumento de tecido ósseo, densidade do osso e reabsorção de minerais do biomaterial. A comparação dos dados entre os grupos foi executada usando-se o teste de Mann-Whitney com um nível de significância de $p < 0,05$. A média da densidade mineral do osso e o aumento de tecido mineral dentro dos cilindros testes foram similares, mas maiores do que o controle negativo. A reabsorção do material e o aumento de tecido ósseo foram significativamente maiores nos defeitos tratados com β -TCP/DCPD ($p < 0,05$). Os grânulos de β -TCP/DCPD foram mais reabsorvíveis e geraram maior tecido ósseo do que Bio-Oss dentro dos cilindros de titânio colocados em calvária de coelho.

Hong et al. (2006) avaliaram o efeito osteogênico de um sistema fibrina-fibronectina (FFSS) combinado com o Fosfato tricálcio- β (β -TCP) como um sistema de carreador para as proteínas morfogenéticas de osso humano recombinante (rhBMP-2) em defeitos na calvária de ratos, de 8 mm. Foram utilizados 100 ratos Sprague Dawley masculinos, divididos em cinco grupos de 20 animais. Os defeitos foram tratados com o rhBMP-2/FFSS, o rhBMP-2/FFSS/b β -TCP, FFSS e de FFSS/ β -TCP como carreador controle ou o lado esquerdo não foi tratado, servindo como controle. Os defeitos foram avaliados por parâmetros histológicos depois do 2 e 8 semanas após a cirurgia (10 animais do grupo, para cada intervalo de cicatrização). O grupo FFSS/b-TCP foi significativamente maior na área em osso novo em 2 semanas ($p < 0,05$) e na área de tecido novo em 2 e 8 semanas ($p < 0,01$) comparado ao grupo FFSS. O osso novo e a área nova do tecido no grupo de rhBMP-2/FFSS/ β -TCP foi significativamente maior do que no grupo de rhBMP-2/FFSS em 8 semanas ($p < 0,01$). Na observação histológica, os restos de FFSS estavam presentes no período de 2 semanas, mas nos de 8 semanas o FFSS pareceu estar totalmente reabsorvido. O rhBMP-2 associado com FFSS/ β -TCP produziu significativamente mais osso novo e tecido na calvária de ratos. Na conclusão, FFSS/ β -TCP pode ser considerado como um carreador disponível para rhBMP-2.

Jung et al. (2006) realizaram um estudo variando o tamanho das partículas de β -TCP associadas com um rhBMP-4 em calvária de ratos. Para isso, foram utilizados 100 animais da raça Sprague Dawley masculinos, cinco grupos de 20 animais assim distribuídos: rhBMP-4 (2,5 μ g) usando β -TCP com partículas de 50 a 150 μ m, rhBMP-4 (2,5 μ g) usando β -TCP com partículas de 150 a 500 μ m, um controle de β -TCP com partículas de tamanho 50 a 150 μ m, controle de β -TCP com partículas de 150 a 500 μ m, ou uma cirurgia controle, sendo avaliados por medidas histológicas e parâmetros histomorfométricos, através dos períodos de 2 e 8 semanas de cicatrização. Não houve nenhuma diferença significativa no fechamento do defeito, na área nova do osso, ou no aumento da área entre os dois grupos de rhBMP-4/ β -TCP ou entre os dois grupos controles de β -TCP (50 a 150 μ m e 150 a 500 μ m) em 2 e 8 semanas. A rhBMP-4 combinada com partículas pequenas ou grandes de β -TCP teve um efeito significativo na indução da formação do osso comparada ao controle de β -TCP com partículas pequenas ou grandes ou do controle cirúrgico. Dentro dos parâmetros do estudo, variar o tamanho de partícula do β -TCP não parece ter um efeito significativo na formação do osso.

Poehling et al. (2006) avaliaram o MD05 (biomaterial substituto ósseo), um biomaterial com dois componentes: uma síntese inorgânica osteocondutora fosfato tricálcio- β (β -TCP), revestido com um fator de crescimento recombinante, rhGDF-5 que é uma proteína humana que ocorre naturalmente e que atua promovendo o crescimento do osso como um material osteoindutor e osteocondutor. Utilizaram-se ratos adultos Sprange Dawley, realizando defeito críticos (6,0 mm de diâmetro) dos dois lados da calvária, e os grupos foram divididos de acordo com o material utilizado: 1) MD05; 2) osso bovino mineral; 3) osso bovino e colágeno; 4) osso bovino mineral e peptídeo sintético; 5) β -TCP (de dois fabricantes diferentes); ou 6) sem material de preenchimento. Análise cega macroscópica, análise histopatológica e análise histomorfométrica foram realizadas 6 semanas após a implantação. A formação de osso novo, quando avaliada histomorfometricamente, foi aproximadamente cinco vezes maior com MD05 do que com os outros substitutos ósseos testados, e o reparo ósseo foi bem avançado nos defeitos preenchidos com MD05 após 6 semanas. Os grânulos residuais e a extensão do tecido fibroso foram significativamente mais baixos no grupo MD05. Em contraste aos outros materiais, o uso de MD05 foi associado a uma completa ossificação do defeito e com presença

de uma medular normal. O efeito osteoindutor do rhGDF-5 foi aparente e houve um grande crescimento ósseo com o MD05 comparado com o carreador de β -TCP sozinho, e todos os materiais demonstraram boa biocompatibilidade. O MD05 conseguiu uma regeneração óssea superior quando comparada aos materiais convencionais e demonstrou ser um promissor substituto ósseo para a aplicabilidade odontológica e maxilofacial.

Segundo Yu, Li, Mu (2008), o número de pacientes com defeitos ósseos tem aumentado progressivamente nos últimos anos, e tornou-se imperativo desenvolver um osso artificial que possa substituir o autoenxerto. Os ossos da face apresentam características morfológicas especiais devido à variedade das lesões, dificultando a decisão a ser tomada por causada complexidade e da variedade de métodos de reparação do defeito. Utilizaram em sua experiência três tipos de biomateriais e concluíram que a estrutura tridimensional, a porosidade e o diâmetro dos poros do arcabouço produzido pelos biomateriais utilizados foram idênticos às do osso humano normal. O arcabouço apresentou uma certa resistência biomecânica. A estrutura porosa permitiu uma boa fixação dos osteoblastos. Seis semanas após o implante do material de enxerto, a estrutura original do arcabouço já tinha desaparecido e, 24 semanas, após o material implantado tinha se degradado quase que totalmente, sendo esse período de degradação coerente com o tempo de cura dos ossos naturais, e que, ao biodegradar-se em tempo oportuno, o biomaterial não comprometeu a ação osteogênica.

Artzi, Weinreb, Carmeli (2008) avaliaram, através de histomorfometria, o peptídeo sintético análogo ao P-15, vinculado ao mineral inorgânico bovino (Pepgen/P15) em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos. Um defeito crítico de 5 mm de diâmetro foi realizado no crânio de 48 ratos, divididos em 4 grupos: partículas Pepgen/P15 coberto por uma membrana, partículas de Pepgen/P15 descoberto, sítios não enxertados e protegidos por membrana, e não enxertados descobertos (sítio de controle). Ao fim de 12 semanas, análises histomorfométricas foram realizadas, avaliando-se o osso recém-formado e partículas residuais, o comprimento dos ossos internos e externos de transição e de forma linear, a neoformação marginal e central e o aumento da altura total do tecido. Os sítios não enxertados e os sítios protegidos por membrana ganharam 60,6% de osso recém-formado, seguido por 50,6% (enxertados e recoberto com membrana) 44,2% (sítios

descobertos) ($P < 0,05$). Todos os sítios experimentais tiveram um ganho significativo ($P < 0,005$) de osso do que os sítios controle (19,9%). Em ambos os tipos de sítios enxertados, a área das partículas Pegen/P15 foi semelhante. O comprimento médio interno e externo do osso foi de 76,7% e 71,2%, respectivamente, para o sítio protegido com membrana, que foram significativamente maior ($P < 0,005$) do que os sítios recobertos e enxertados (43,95% e 51,8%, respectivamente), enxertados e descobertos (28,7% e 23,9%, respectivamente) e o grupo controle (28% e 25,5%, respectivamente). O aumento das alturas marginais e centrais (0,92 milímetros e 1,02 mm, respectivamente) foram maiores nos grupos enxertados cobertos, seguida pela não-enxertadas e membrana (0,88 milímetros e 0,51 mm, respectivamente), e os sítios descobertos e enxertados (0,89 mm e 0,12 mm, respectivamente).

Torres, Tamimi, Tresguerres (2008) avaliaram os benefícios do uso do PRP, quando utilizado, e compararam-no com o Bio-Oss® (Biomateriais Geistlich, Wolhusen, Suíça), da capacidade de reposição do osso vertical. O estudo foi realizado na calvária de oito fêmeas adultas de coelhos Nova Zelândia, com cilindro de titânio. Dois cilindros de titânio foram fixados no osso parietal de cada coelho. Em cada coelho, uma camada foi enxertada com Bio-Oss, e o contralateral foi preenchido com o PRP. Os animais foram sacrificados 4 semanas após a intervenção e as biópsias foram tomadas. Densitometria, histológico e histomorfométrico foram realizadas para avaliar a densidade mineral óssea, aumento ósseo vertical e o restante volume do enxerto, respectivamente. As análises estatísticas foram realizados com o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de $p < 0,05$. A densitometria óssea e a análise dos dados revelou que a densidade óssea mineral e aumento ósseo foram significativamente menores nos cilindros tratados com PRP ($p < 0,0001$) quatro semanas após o implante. Esse estudo não mostrou nenhum efeito benéfico da utilização do PRP na regeneração óssea. Além disso, foi enfatizado que a Bio-Oss apresenta boas propriedades osteocondutora, atingindo valores de volume adequado de osso.

Lee, Kim, Kweon (2010) determinaram a capacidade de fibroína de seda como um modelo de biomaterial para a formação óssea, quando misturado com fibrina rica em plaquetas (PRF) in vivo. Dez coelhos da Nova Zelândia brancos foram usados para esse estudo, e defeitos foram formados no osso parietal (9,0 milímetros de diâmetro). A fibroína de seda foi digerido pelo ácido e transformado

em pó (peso molecular 1,0 kDa). O lado direito (grupo experimental) recebeu a fibroína de seda mais o PRF e o lado esquerdo (grupo controle) não recebeu enxerto. Os animais foram sacrificados em seis semanas e 12 semanas. Os espécimes foram examinados por tomografia computadorizada microscópica (μ -CT). Posteriormente, foram descalcificados e corados para análise histológica. Não houve diferença significativa entre os grupos em seis semanas após a operação. Nos resultados μ -CT, no entanto, o conteúdo mineral do tecido no grupo experimental de 12 semanas após a operação foi $132,09 \pm 4,41$ e no grupo controle foi $126,42 \pm 6,62$ ($P=0,011$). A densidade mineral do grupo experimental foi $2088,88 \pm 648,34$ e no grupo controle foi de $2029,72 \pm 668,22$ ($P=0,013$). Os resultados da análise histomorfométrica estão de acordo com os resultados μ -CT. O osso novo total foi $49,86 \pm 7,49\%$ no grupo controle, 12 semanas após a operação e $59,83 \pm 10,92\%$ no grupo experimental ($P=0,021$). A aplicação combinada de PRF com fibroína de seda ácido-digeridas apresentaram cicatrização óssea mais rápida do que o controle no que se refere ao preenchimento ósseo.

Nagata, Messora, Pola (2010) analisaram a influência da proporção de partículas de osso autógeno (AB) / plasma rico em plaquetas (PRP) na cicatrização óssea em defeitos criados de tamanho crítico (CSD) em calvária de ratos. Cinquenta ratos foram divididos em cinco grupos: Grupo C (controle), Grupo AB, AB/PRP-50 Group, Grupo AB/PRP-100 e Grupo AB/PRP-150. O defeito realizado foi de 5 mm de diâmetro na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido por coágulo sanguíneo. No Grupo AB, com 0,01 mL de enxerto AB. Nos Grupos AB/PRP-50, AB/PRP-100 e AB/PRP-150, os defeitos foram preenchidos com 0,01 mL de enxerto AB combinado com 50, 100 e 150 mL de PRP, respectivamente. Todos os animais foram sacrificados aos 30 dias pós-operatório. Histomorfometria, usando-se o software de análise de imagem, histologia e análises foram realizadas. Osso novo neoformado (NBA) e os restantes do enxerto ósseo (RPA) foram calculados como uma porcentagem da área total do defeito original. Valores percentuais foram transformados em arco-cosseno para análise. Nenhum defeito regenerou completamente com o osso. Grupo AB/PRP-50 ($41,78 \pm 13,48\%$) teve um NBA significativamente maior do Grupos C ($19,29 \pm 5,11\%$), AB ($27,43 \pm 10,90\%$) ou AB/PRP-150 ($19,17 \pm 8,45\%$) ($p < 0,05$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos AB/PRP-50 e AB / PRP-100 e entre os grupos AB,

AB/PRP-100 e AB/PRP-150 que diz respeito à NBA ($p > 0,05$). Grupo AB/PRP-150 ($31,59 \pm 3,22\%$) teve um RPA significativamente superior aos grupos AB ($19,09 \pm 5,21\%$), AB/PRP-50 ($17,33 \pm 4,43\%$), e AB/PRP-100 ($19,72 \pm 3,62\%$) ($p < 0,001$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos AB, AB/PRP-50 e AB/PRP-100 no que diz respeito à RPA ($p > 0,05$). A relação enxerto AB / PRP influencia a cicatrização óssea criada cirurgicamente CSD em calvária de ratos.

2.5 COMPORTAMENTO MECÂNICO DOS OSSOS

Devido à função estrutural que os ossos desempenham nos animais vertebrados, eles são constantemente submetidos a diversos tipos de esforços, à semelhança de uma estrutura utilizada na engenharia. Portanto, o estudo do comportamento mecânico dos ossos pode ser realizado usando-se os mesmos princípios e conceitos utilizados na engenharia.

As propriedades mecânicas definem o comportamento de um material quando sujeito a esforços de natureza mecânica e correspondem às propriedades que, num determinado material, determinam a sua capacidade de transmitir e resistir aos esforços aplicados, sem se romper ou sem que se produzam deformações incontroláveis.

A relação entre a carga aplicada em uma estrutura e a deformação em resposta à carga podem ser observadas em uma curva traçada num gráfico, “carga x deformação”, ou, num gráfico “tensão x deformação” quando a estrutura ensaiada for um corpo-de-prova com dimensões conhecidas. Essa curva pode ser dividida em duas regiões: a região de deformação elástica (fase elástica) e a região de deformação plástica (fase plástica). O limite entre as duas regiões é chamado de limite de proporcionalidade ou limite elástico.

A região de deformação elástica imita o comportamento de uma mola, onde a deformação aumenta linearmente com o aumento da carga e, após a retirada da carga, retorna à forma original. Mas, nos ossos, essa característica de mola perfeita não se aplica, pois, efeitos viscoelásticos durante a deformação, em função dos

flúidos presentes na matriz óssea, causam perda de energia elástica, que pode ser observada quando se realiza um ensaio de carregamento e descarregamento. As curvas de carregamento e a de descarregamento não fazem o mesmo caminho, formando um ciclo fechado, o que representa um ciclo de histerese (SHIMANO; SHIMANO; VOLPON, 2002).

Na região plástica, o material estará com deformações permanentes, mas em muitos casos, essa região é importante, principalmente quando a ruptura não pode ocorrer imediatamente após o limite elástico. Ou seja, o material deverá absorver mais energia antes de romper. A inclinação da curva carga x deformação na região elástica determina a rigidez, que pode ser rigidez extrínseca ou estrutural, onde os ossos possuem uma maior rigidez. Ao converter a carga em tensão e a deformação em deformação relativa, obtém-se uma curva tensão x deformação relativa. A inclinação dessa curva na região elástica é o módulo de elasticidade ou módulo de Young e representa a rigidez intrínseca do material (TURNER; BURR, 1993). Essa diferença pode ser observada ao comparar ensaios em ossos inteiros (rigidez extrínseca) com ensaios realizados em corpos-de-prova de osso (rigidez intrínseca).

O tecido ósseo, por ser formado de materiais de diferentes naturezas (colágeno e HA), distribuídos de diferentes formas (lamelas ósseas, trabéculas, etc), dá aos ossos comportamentos mecânicos característicos como a viscoelasticidade, a anisotropia e a não homogeneidade. O comportamento de um material viscoelástico pode ser considerado como sendo um conjunto dos comportamentos de um material elástico com o de um material viscoso. Um material com comportamento elástico ideal é caracterizado pelo armazenamento de toda energia fornecida a ele durante o processo de deformação mecânica, na forma de energia potencial elástica, e é devolvida ao retirar-se o esforço que a causou, podendo ser exemplificado pelo comportamento de uma mola. Um material com comportamento viscoso caracteriza-se por ter toda a energia a ele fornecida, no processo de deformação mecânica, dissipada na forma de calor, o mesmo comportamento de um amortecedor. Uma caracterização dos materiais viscoelásticos é a dependência do comportamento mecânico com a taxa de carregamento, ou seja, velocidade de aplicação de carga.

Burstein, Wright (1994) realizaram testes numa série de três corpos-de-prova de osso cortical, sendo cada um submetido a uma velocidade diferente de aplicação da carga, e confirmaram a influência da velocidade de aplicação da carga nas propriedades mecânicas dos ossos.

A alta concentração de colágeno da fase orgânica permite ao osso resistir a tensões de tração. E a fase inorgânica dá ao osso excelente resistência às tensões de compressão. Para o osso trabecular, a definição de rigidez é mais difícil, pois ele é formado por trabéculas individuais, com rigidez própria, que forma toda a estrutura com uma única rigidez. O osso trabecular possui uma rigidez material que é a rigidez de cada trabécula e uma rigidez estrutural que é a rigidez da estrutura trabecular disposta espacialmente. A maioria dos estudos concentra-se nas propriedades estruturais devido à grande dificuldade do estudo em trabéculas individuais. As propriedades estruturais variam para as diferentes regiões anatômicas, pois dependem da densidade e da orientação trabecular (TUREK, 1991).

Rho, Flaitz, Swarnakar (1997) realizaram um experimento investigador para mensurar as propriedades elásticas intrínsecas dos diversos componentes microestruturais do osso vertebral humano trabecular e osso cortical de tíbia pela técnica de nanoindentação. Espécimes de duas vértebras torácicas (T-12) e duas tíbias foram obtidos de cadáveres humanos congelados. Após a secagem e embebição em resina epóxica, os testes de nanoindentação foram conduzidos para medir o módulo de Yong e a dureza do osso trabecular da vértebra em únicos ósteons e osso lamelar intersticial da tíbia. As mensurações do osso trabecular da vértebra foi realizado na transversal e o módulo de Yong foi de $13,5 \pm 2,0$ GPa. Os espécimes da tíbia foram testados no sentido longitudinal e o módulo de Yong foi $22,5 \pm 1,3$ GPa para os ósteon, e de $25,8 \pm 0,7$ GPa para as lamelas intersticiais. A análise de variância demonstrou que a diferença na medida de módulo de elasticidade foi estatisticamente significativa entre eles.

Turner, Rho, Takano (1999) avaliaram e compararam o módulo de elasticidade do osso humano cortical e trabecular de um mesmo doador através de duas técnicas: nanoidentação e microscopia acústica. O corpo-de-prova foi obtido através de um bloco (2 cm) do osso medular do côndilo femoral distal e uma secção (1 mm) do osso cortical da epífise femoral esquerda. Para a avaliação do módulo de elasticidade utilizou-se a mensuração da velocidade acústica que foi realizada

através de um microscópio de varredura acústica, e através da nanoindentação, onde se realizou a dureza permanente com um indentador sobre os espécimes. O módulo de elasticidade do osso cortical na direção longitudinal foi 40% maior ($p < 0,01$) do que o módulo na direção transversal. O módulo de elasticidade no tecido ósseo trabecular foi ligeiramente maior que o módulo transversal do osso cortical. Os resultados encontrados foram consistentes em ambas as mensurações e sugere-se que o módulo de elasticidade do osso trabecular é maior que o osso cortical. Observou-se que em ambas as técnicas houve similaridade de resultados, assim considerando a nanoindentação como uma possibilidade de mensuração do módulo de elasticidade.

Zysset, Guo, Hoffer (1999) quantificaram as propriedades elásticas do osso lamelar e compararam-nas propriedades com as microestruturas trabecular, intersticial e ósteons da epífise e diáfise femoral humano. A técnica de nanoindentação com sistema de irrigação constante foi usada simultaneamente à mensuração da força. O módulo elástico isotrópico foi calculado através da curva de não-carga, assumindo uma proporção de Poisson de 0,3, enquanto a dureza foi definida como a máxima força dividida pela área de contato. O módulo elástico variou entre $6,9 \pm 4,3$ GPa no tecido trabecular da cabeça do fêmur de humano feminino de 74 anos e $25,0 \pm 4,3$ GPa no tecido intersticial da córtex da diáfise humano feminino de 69 anos. A média do módulo de elasticidade encontrada foi significativamente influenciada pelo tipo lamelar e pelo doador. A interação entre o tipo lamelar e o doador foi altamente significativa ($p < 10^{-6}$). A dureza seguiu uma similar distribuição como o módulo de elasticidade, mas com baixo contraste estatístico. Concluiu-se que a nanoestrutura do tecido ósseo deve diferir substancialmente pelo tipo lamelar, sítio anatômico e indivíduos, sugerindo que a heterogeneidade tecidual é um potencial importante na fragilidade óssea e adaptação.

Van Rietbergen, Weinans, Huiskes (1995) determinaram um novo método de avaliação das propriedades elásticas através de um modelo de elemento finito. O tamanho do espécime e a possibilidade do efeito são fatores complicadores quando se utilizam métodos tradicionais de testes mecânicos. Um cubo de 5 mm de osso trabecular foi utilizado nesse método de avaliação tridimensional, constituindo um modelo com 296.679 elementos. O resultado encontrado no trabalho foi de 2,23

GPa, enquanto que na literatura observa-se um valor de módulo de elasticidade de 10,1 GPa. Conclui-se que o modo de deformação da trabécula no presente cubo foi predominantemente na compressão. De acordo com os autores, o novo método ofereceu uma nova perspectiva do estudo do osso trabecular.

Beck, Canfield, Haddock (1997) avaliaram o osso trabecular por método tridimensional desenvolvido no trabalho cuja resolução é independente do tamanho do espécime. Finas camadas foram serialmente removidas de um espécime, usando-se uma máquina computadorizada controlada numericamente milimetrada em que cada secção foi exposta à imagem usando-se uma câmera digital de baixa magnificação. Espécimes espessos foram digitalizados sem a perda de resolução pelo movimento do espécime sobre a câmera. As imagens de cada campo foram facilmente registradas, secções de alto contraste foram impregnadas pela coloração preta do osso com nitrato de prata e embebidas em metilmetacrilato branco. A principal limitação dessa técnica foi a de que os espécimes foram destruídos e o processo foi relativamente lento. Entretanto, devido a sua precisão, independentemente da resolução da imagem e do tamanho do espécime ser de fácil implantação, essa nova técnica é um excelente método para determinar a arquitetura do osso trabecular, particularmente quando a alta resolução é requerida.

Rho, Pharr (1999) avaliaram propriedades mecânicas do osso, após a secagem, através do método de nanoindentação. Os testes foram conduzidos para medir o módulo elástico e dureza de dois espécimes corticais de seção transversal obtidos das áreas adjacentes do fêmur de bovinos. Um espécime foi seco completamente no ar antes de ser testado, enquanto o outro foi armazenado em água deionizada. As propriedades dos ósteons e das lamelas intersticiais mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Nos espécimes que sofreram a secagem, observou-se um aumento do módulo de elasticidade de 9,7% para as lamelas intersticiais e de 15,4% para os ósteons. Em relação à dureza houve, um aumento de 12,2% para a lamela intersticial e 17,6% para os ósteons.

Van der Linden, Verhaar, Weinans (2001) investigaram o efeito das diferentes distribuições minerais através de um modelo de elemento finito 3D do osso trabecular humano e calcularam a rigidez aparente desses modelos. Quando o modelo linear foi usado, a distribuição mineral mudou ligeiramente a rigidez aparente, variando entre uma diminuição de 8% e um aumento de 4% comparados

ao modelo uniforme. O modelo exponencial resultou na rigidez aparente aumentada até 20% no sentido do longo eixo principal. Uma fina camada mineralizada (28 μm) e o osso altamente mineralizado resultaram na rigidez mais elevada, isso leva a reduções do risco da fratura. A distribuição mineral não uniforme nas trabéculas afeta as propriedades mecânicas do osso esponjoso e a rigidez do tecido. Usando um modelo de elemento finito, poder-se-ia melhorar incluindo a informação detalhada sobre a distribuição mineral dos modelos trabeculares.

Embora os estudos recentes do nanoindentação revelem a existência de variações substanciais no módulo de elasticidade, pouco é sabido a respeito dos efeitos biomecânicos de tais variações intraespécimes. Jaasma, Bayraktar, Niebur (2002) utilizaram o modelo de elemento finito para investigar esses efeitos. Com informação de literatura limitada na distribuição espacial de intraespécimes das variações no módulo tecidual, duas distribuições espaciais plausíveis foram avaliadas. Além disso, três espécimes (pescoço femoral humano, corpo vertebral humano e tíbia proximal de bovinos) foram estudados para avaliar o papel da arquitetura trabecular. Os resultados indicaram que para todas as combinações do espécime/distribuição, o módulo aparente do espécime inteiro diminuiu não linearmente com coeficiente de variação crescente (COV) do módulo do tecido dentro do espécime. O módulo aparente diminuiu 4% enquanto que o módulo COV do tecido foi aumentado de 0% a 20%, mas diminuiu de 7-24%, dependendo da suposta distribuição espacial, para um aumento no módulo COV do tecido de 20% a 50%. Para o carregamento compressivo ao limite elástico, o módulo crescente COV do tecido de 20% a 50% causou até um aumento de 28 dobras na quantidade de tecido falhado, dependendo da distribuição espacial suposta e da arquitetura trabecular. As variações intraespécimes no módulo tecidual, se grandes, podem ter efeitos apreciáveis na falha aparente trabecular do módulo.

Ratier, Gibson, Best (2001), avaliaram a influência da incorporação de tetraciclina em cimento ósseo de fosfato de cálcio. Foram confeccionados espécimes do cimento contendo diversas concentrações de tetraciclina tratada (0, 0,6, 1, 2 e 7%). Os testes realizados foram a caracterização química, análise de difração de raio-x, força de compressão e tensão. Para a realização das avaliações, foram confeccionados corpos-de-provas cilíndricos, que foram armazenados em água destilada a 38°. Os resultados de tensão e compressão demonstraram que com

maior introdução de tetraciclina há uma redução nos valores, porém sem significância.

Fan, Swadener, Rho (2002) investigaram os efeitos da anisotropia elástica através de medidas por nanoindentação no osso cortical tibial humano. A nanoindentação foi conduzida em 12 sentidos diferentes em três planos principais para os ósteons e lamelas intersticiais. O módulo experimental do recorte foi encontrado para variar com sentido do recorte e mostrou a anisotropia óbvia (análise de variância a um critério, $P < 0,0001$), porque os módulos experimentais do recorte em um sentido específico podem ser determinados por todas as constantes elásticas do osso cortical e um modelo teórico complexo é requerido para analisar os resultados experimentais. Uma análise recentemente desenvolvida do recorte para as propriedades de materiais anisotrópicos foi usada para quantificar o módulo do recorte, usando-se a matriz da rigidez do osso cortical tibial humano, o qual foi obtido dos estudos precedentes de ultrassom. Após permitir os efeitos da preparação de espécime (os espécimes desidratados na nanoindentação testados contra espécimes úmidos em testes de ultrassom) e as propriedades estruturais do osso (microcomponentes diferentes com propriedades mecânicas diferentes), não houve nenhuma diferença estatística significativa entre o módulo experimental do recorte corrigido e o módulo do recorte correspondente (t-teste não pareado, $P > 0,5$). A variação do módulo do recorte correspondente que foi encontrada exibiu as mesmas tendências que os dados do módulo experimental do recorte corrigido. Esses resultados mostram que os efeitos da anisotropia em medidas por nanoindentação podem ser avaliados quantitativamente.

Kasiri, Taylor (2008) aplicaram a teoria das distâncias críticas em vários tipos de ossos, utilizando cargas concentradas tipo torção, flexão e tração pelo método de elementos finitos, e determinaram a carga necessária para romper o osso. Constataram que a distância crítica foi de 0,3 a 0,4 mm para todos os ossos estudados. O estresse crítico necessário para causar a ruptura foi calculado a partir de um fator constante $F = 1,33$ e relataram, ainda, que o resultado desse estudo poderá ser de grande valia nas cirurgias de correção de defeitos ósseos.

Insaurralde, Sanada, Delben (2010) avaliaram a resistência à tração de calotas cranianas preenchidas com biomateriais (polímero de mamona e GenOx) e o osso mineralizado e desmineralizado. Para o estudo foram realizados defeitos não

críticos em calvária de ratos. Após 6 meses do enxerto, os animais foram sacrificados e removida as calotas cranianas. Os espécimes foram submetidos a teste de tração numa máquina de ensaio universal e assim obtidos os resultados de módulo de elasticidade e resistência à tração. Os resultados demonstraram que o polímero de mamona e o GenOx possuíram resultados semelhantes de resistência e módulo de elasticidade, porém foram estatisticamente inferiores do grupo mineralizado e estatisticamente maior que o grupo desmineralizado.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Determinar a resistência à tração do osso neoformado com a utilização dos biomateriais: osso bovino (GenOx, GenMix e Bio-Oss), materiais poliméricos (polímero de mamona e PerioGlas) e o coágulo.

Caracterizar a área rompida através de microscopia eletrônica de varredura a fim de determinar padrões de fraturas.

Hipótese nula:

- A) Não haverá diferença estatística entre os grupos testados em relação à resistência à tração;
- B) Não haverá discrepâncias entre os grupos após a avaliação de microscopia eletrônica de varredura.

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados foram de ossos bovinos, materiais poliméricos e coágulo.

Dentre os biomateriais de origem xenogênica foram utilizados dois nacionais e um importado. Os dois materiais nacionais foram enxerto ósseo bovino inorgânico medular microgranular (GenOx[®], Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil, Registro Ministério da Saúde: 103.455.00001) (Figura 1), um enxerto ósseo bovino composto microgranular (GenMix[®], Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil, Registro Ministério da Saúde: 103.455.00080) (Figura 2) e um material de enxerto ósseo bovino inorgânico medular microgranular importado (Bio-Oss[®], Geistlich Pharma AG, Suíça) (Figura 3).

Figura 1 - GenOx[®] Inorgânico Microgranular (0,25 – 1,0mm), osso bovino desproteínizado medular em grânulos - Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil, Registro Ministério da Saúde: 103.455.00001

Figura 2 - GenMix® Composto Microgranular (0,25 – 1,0mm), osso bovino desproteinizado medular em grânulos - Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil, Registro Ministério da Saúde: 103.455.00080

Figura 3 - Bio-Oss® Inorgânico Microgranular (0,25 – 1,0mm), osso bovino desproteinizado medular em grânulos - Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil, Registro Ministério da Saúde: 103.455.00001

Outros materiais utilizados foram os poliméricos. Dentro dessa categoria, os contemplados nesta tese foram o polímero vegetal extraído de “*Ricinus Communis*” oleogenosas da classe dicotiledôneas, origem geraniales, família das euphorbiaceae (Poliquil Araraquara Polímeros Químicos LTDA., Araraquara, SP, Brasil, Registro Ministério da Saúde: 1.03.056.9.0009) (Figura 4) e o polímero de vidro bioativo sintético (PerioGlas[®], NovaBone Products LLC, Alachua, FL, USA.) (Figura 5).

Figura 4 - Polímero vegetal extraído de “*Ricinus Communis*” oleogenosas da classe dicotiledôneas, origem geraniales, família das euphorbiaceae – Poliquil Araraquara Polímeros Químicos LTDA., Araraquara, SP, Brasil, Registro Ministério da Saúde: 1.03.056.9.0009

Figura 5 - Polímero de vidro bioativo sintético (PerioGlas[®], NovaBone Products LLC, Alachua, FL, USA)

Para obtermos um grupo controle, foi utilizado o coágulo do próprio animal, estimulado através de microestimulações no periósteo, favorecendo a irrigação de sangue para a região do defeito ósseo (Figura 6).

Figura 6 - Defeito na calvária do rato com a presença do coágulo

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 70 ratos albinos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*), machos adultos, com aproximadamente 250 a 300g, fornecidos pelo biotério central da Faculdade de Odontologia de Bauru (Figura 7). Esses animais foram utilizados para experimentos após 3 meses de vida, idade adulta dos mesmos. Os 70 animais foram divididos em 7 grupos de 10 ratos cada um, e em todos os grupos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de criação de defeito não crítico na calvária (3mm de diâmetro) (Figura 8) e colocação do material de enxertia (GenOx[®], GenMix[®], Bio-Oss[®], PerioGlas ou Polímero de mamona) ou coágulo.

Figura 7 - Animais obtidos do Biotério Central (Faculdade de Odontologia de Bauru - USP)

Figura 8 - Defeito ósseo de 3mm de diâmetro realizado com broca trefina

Para melhor ilustração, os grupos foram agrupados de acordo com o tipo de material de enxertia utilizado para o preenchimento do defeito criado:

Grupo 1 – enxertos de osso bovino:

- Subgrupo A: GenOx[®];
- Subgrupo B: GenMix[®];
- Subgrupo C: Bio-Oss[®].

Grupo 2 – enxertos poliméricos:

- Subgrupo a: PerioGlas;
- Subgrupo b: Polímero de mamona.

Grupo 3 – coágulo

O diagrama abaixo ilustra melhor os grupos e subgrupos apresentados neste trabalho:

4.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

4.3.1 Grupos 1 e 2

Os animais, após 3 meses de nascimento, foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para a realização dos defeitos não críticos e colocação dos enxertos (biomateriais).

O anestésico utilizado foi o uma solução composta de Anasedan® (SESPO - Divisão vetbrands saúde animal, Jacareí, São Paulo, Brasil) cujo princípio ativo é a Xilazina (Cloridrato de Xilazina), considerado como um anestésico e sedativo, apresentando-se na forma de frasco contendo 10ml e Dopalen® (SESPO - Divisão vetbrands saúde animal, Jacareí, São Paulo, Brasil) cujo princípio ativo é a Ketamina (Cloridrato de ketamina), considerado como um anestésico e sedativo, apresentando-se na forma de frasco contendo 10ml (Figura 9). A quantidade utilizada foi de 0,1ml/kg na região intraperitonal (coxa do animal), e a média de solução anestésica utilizada foi de 0,3 a 0,4 ml.

Figura 9 - Anestésicos: Dopalen® (SESPO - Divisão vetbrands saúde animal, Jacareí, São Paulo, Brasil) e Anasedan® (SESPO - Divisão vetbrands saúde animal, Jacareí, São Paulo, Brasil)

Após a anestesia, realizou-se a tricotomia na região da cabeça do animal com o auxílio de uma lâmina de barbear e de bisturi. Para a realização da antisepsia utilizou-se iodopovidona, com o auxílio de uma gaze (Figura 10).

Figura 10 - Tricotomia na região frontal da cabeça do animal e antisepsia

A incisão realizada foi em forma semilunar com uma lâmina de bisturi 15c e, juntamente o periósteo foi incisionado e rebatido (Figura 11).

Figura 11 - Incisão e periósteo rebatido na forma semilunar

A cabeça do animal possui 2 parietais nos quais foram confeccionados defeitos não críticos de 3mm de diâmetro, com o auxílio de uma trefina para tecido ósseo. A trefina foi acoplada a um contra-ângulo e encaixado num motor de implante Kavø (Kavø Konzept Surg, Fábrica KaVo Ind. Com. Ltda., Joinvile – Santa Catarina - Brasil) a qual foi predeterminado a uma rotação de 1500 rpm, sempre com irrigação abundante a fim de não danificar o tecido ósseo receptor do enxerto (Figura 12). Foram realizados 2 (dois) defeitos não críticos, uma em cada parietal (Figura 13).

Figura 12 - Trefina de 3 mm e contra-ângulo. **A)** Trefina acoplada no contra-ângulo de implante. **B)** Realização da perfuração numa das parietais com a trefina

Figura 13 - Vista da região parietal. **A)** Marcações iniciais da perfuração. **B)** Defeitos não críticos realizados nas duas parietais

Após a criação dos defeitos ósseos, foi realizado o preenchimento com os devidos biomateriais, de acordo com os grupos e subgrupos (Figura 14). Os biomateriais foram hidratados antes da sua colocação nos defeitos, com soro fisiológico, dentro de um pote dappen esterilizado (Figura 15).

Figura 14 - Colocação dos biomaterias nos defeitos. **A)** GenOx. **B)** GenMix. **C)** Bio-Oss. **D)** PerioGlas. **E)** Polímero de mamona

Figura 15 - Biomaterial hidratado com soro fisiológico no pote Dappen esterilizado

Após a colocação dos biomateriais nos defeitos, estes foram recobertos com o periósteo, o qual foi suturado juntamente com a derme, utilizando-se um fio de sutura de seda 4.0 (Ethicon, Jonhson & Jonhson), coaptando bem as bordas para evitar a contaminação do enxerto e possíveis soltura dos pontos, passando-se iodopovidona sobre a região operada (Figura 16).

Figura 16 - Vista periférica da sutura com fio de seda 4.0 (Ethicon, Jonhson & Jonhson). **A)** Sutura com ponto simples. **B)** Antissepsia da região

Os animais foram monitorados nas primeiras 24, 48, 72 horas para verificar se haveria alguma soltura dos pontos e observar a recuperação dos animais. Estes animais foram mantidos em caixas individuais por 4 semanas após a cirurgia e reagrupados em 5 animais em cada caixa após o período descrito acima. Esse procedimento foi realizado devido ao fluxo de pesquisas e utilização do biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru.

4.3.2 Grupo 3

Neste grupo os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos descrito no item anterior. A única modificação foi que em vez de inserirmos o biomaterial no defeito, estimulou-se o periósteo da região do crânio do animal para possibilitar uma abundância de sangue, proporcionando a formação de um coágulo que preenchesse o defeito (Figura 17). Logo após, suturou-se a derme do animal como descrito anteriormente.

Figura 17 - Coágulo preenchendo o defeito da calvária do animal

4.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais dos grupos 1, 2 e 3, após 6 meses da cirurgia, foram sacrificados de acordo com o protocolo do biotério central da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, eutanásia por superdosagem de anestésico e relaxante muscular (Figura 9), aplicado diretamente no coração do animal.

As drogas utilizadas para tal procedimento foram:

→ Anasedan[®] (SESPO - Divisão vetbrands saúde animal, Jacareí, São Paulo, Brasil) cujo princípio ativo é a Xilazina (Cloridrato de Xilazina), considerado como um anestésico e sedativo, e se apresenta na forma de frasco contendo 10ml.

→ Dopalen[®] (SESPO - Divisão vetbrands saúde animal, Jacareí, São Paulo, Brasil) seu princípio ativo é a Ketamina (Cloridrato de ketamina), considerado como um anestésico e sedativo, e se apresenta na forma de frasco contendo 10ml.

Para determinar a quantidade de substância a ser utilizada nesse procedimento, realizou-se um projeto piloto com 4 animais, concluindo-se que poder-se-ia utilizar 0,8ml de solução (0,4ml de Dopalen[®] e 0,4ml de Anasedan[®]), quando injetada diretamente no coração do animal.

Após o sacrifício dos animais, realizou-se a tricotomia da região da calota craniana, com o auxílio de uma lâmina de barbear, para melhor visualização da área a ser removida (as duas parietais). Com o auxílio de um disco diamantado dupla face (Figura 18), acoplado a um contra-ângulo de implante, foi removida a calvária

por inteira do animal, cada uma delas colocadas posteriormente em potes individuais etiquetados para melhor identificação de cada espécime (Figura 19).

Figura 18 - Disco diamantado dupla face para a remoção da calota

Figura 19 - Calota craniana com os cortes realizados com o disco diamantado

4.5 PREPARO DAS PEÇAS PARA O TESTE DE MICROTRAÇÃO

Após a coleta das calvárias, as peças foram dissecadas e cortadas com discos de aço em baixa rotação sob constante irrigação, deixando o espécime com as dimensões de 12 mm de comprimento, 4 mm de largura e a área central do espécime com 1 mm de largura por 0,5 mm espessura, determinando uma secção transversal de 0,5 mm² (Figura 20), observando-se sempre a área das parietais. Após esse procedimento, os espécimes foram armazenados em solução de Timol 4% até a realização do teste (protocolo FOB/USP). A alta concentração de colágeno

da fase orgânica permite ao osso resistir a tensões de tração. E a fase inorgânica dá ao osso excelente resistência às tensões de compressão TUREK (1991).

Figura 20 - Esquema para o preparo do espécime. **A)** calota craniana após dissecação, pronto para o preparo do corpo-de-prova. **B)** Corpo-de-prova dividido ao meio para confecção do espécime. **C)** padronizado nas dimensões adequadas para teste mecânico (12 x 4 x 1mm), seta azul demonstrando a região utilizada para mensuração da secção transversal (largura)

4.6 TESTE DE MICROTRAÇÃO

Para a realização do teste de microtração, utilizou-se uma máquina de tração Universal de teste Vitrodyne, modelo V1000 (Liveco Inc., Burlington, VT) (Figura 21) que possibilita a fixação dos espécimes na própria máquina. Os espécimes foram fixados na máquina com o auxílio de um adesivo à base de cianocrilato (SANO; TAKATSU; CIUCCHI, 1995) e submetidos ao ensaio de tração a uma velocidade de 1,0 mm/min.

Figura 21 - Máquina Vitrodyne, V-1000 (Liveco Inc., Burlington,VT), com dispositivo de teste Bencor-Multi-T

Após a realização da tração, a máquina revela o valor de tensão máxima gerada para a fratura/rompimento do espécime, sendo o valor projetado em Quilograma (Kg), dividido pela área de secção transversal (cm^2), que é obtida pela mensuração da largura x a espessura da área central do espécime (Figura 20C, ver seta azul) e multiplicado por uma constante universal (0,0981), chegando ao valor de tensão máxima em Mega Pascal (MPa):

$$\text{Tensão} = \frac{\text{Tração (Kg)} \times 0,0981}{\text{Área (cm}^2\text{)}} = \text{MPa}$$

4.7 ANÁLISE DA ÁREA FRATURADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os espécimes foram submetidos a uma avaliação por microscopia eletrônica de varredura da superfície rompida após a realização do teste de tração.

Para tanto, amostras foram colocadas no porta espécime “stub” e levados ao metalizador “sputtering” (MED 010 da Balzers), onde foi realizada a deposição de uma fina camada de ouro (100-200 Å). As amostras foram analisadas em um microscópio de varredura Zeiss DMS 910A0 (Carl Zeiss – Alemanha) capturadas pelo software DITI0 (Carl Zeiss - Alemanha) em aumentos nominais de 20X, 50X,

100X e 200X e armazenadas no formato TIF para Windows. Foram analisadas as áreas de rupturas de todos os grupos.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a realização dos testes será realizada, em cada grupo, uma correlação linear entre a tensão proporcionada e a área a ser avaliada para verificar se houve influência direta da área com o resultado final.

As médias de tensão serão tabuladas e verificadas as suas médias e desvio padrão, comparando-as entre si pelo teste de ANOVA a 1 critério. Também será realizando o teste T de Tukey para descobrir, se houver, as diferenças estatísticas. A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” GraphPad InStat, versão 2.0, considerando diferenças significativas quando o valor de “p” foi menor que 0,05.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Após a realização do teste de tração, foram obtidos os valores de tensão gerada para romper os espécimes, os quais foram utilizados juntamente com a área para realizar o cálculo da resistência da tração. Como foi descrito anteriormente, a resistência à tração é obtida por uma fórmula de tensão sobre área. Sabendo-se que a área influencia diretamente o resultado de resistência, realizou-se em cada grupo uma correlação linear de Person para verificar se a área teria influenciado positivamente ou negativamente no resultado final.

Os gráficos de correlação linear estão representados nas Figuras 22 a 26. Observou-se que em todos os grupos houve uma correlação negativa entre a tensão gerada e área, porém percebe-se que os valores encontrados mantiveram-se dentro de um padrão regular de correlação, não havendo resultados discrepantes que pudessem influenciar o padrão do resultado final.

Figura 22 - Correlação de Person do grupo 1-A (GenOx). O coeficiente de correlação (r) = - 0,6563

Figura 23 - Correlação linear de Person do grupo 1-B (GenMix). O coeficiente de correlação (r) = - 0,01210

Figura 24 - Correlação linear de Person do grupo 1-C (Bio-Oss). O coeficiente de correlação (r) = - 0,8196

Figura 25 - Correlação linear de Person do grupo 2-a (PerioGlass). O coeficiente de correlação (r) = - 0,4224

Figura 26 - Correlação linear de Person do grupo 2-b (Polímero de Mamona). O coeficiente de correlação (r) = - 0,1766

Após a realização da correlação linear de Person, os resultados foram tabulados e obtidas as médias e desvio padrão de cada grupo. Esses resultados estão ilustrados nas Tabelas 1 a 6. A Tabela 7 demonstra as médias e desvio padrão de todos os grupos e, na Figura 27, observa-se um gráfico comparativo das médias e desvios padrão de cada grupo.

Tabela 1 - Valores individuais para cada espécime do grupo 1-A (GenOx) em relação teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área

Espécimes	Tensão (Mpa)	Área (cm ²)
1	9,177521522	0,0021606
2	9,932517055	0,0018176
3	4,782149835	0,002723
4	5,949028812	0,0026864
5	5,88688698	0,002212
6	12,35746588	0,0019782
7	10,31045903	0,0027384
8	4,332102263	0,0035086
9	7,337444906	0,002886
10	7,4917046	0,002891
Desvio Padrão	2,41642594	0,000519045
Média	7,709076255	0,002666783

Tabela 2 - Valores individuais para cada espécime do grupo 1-B (GenMix) relativamente ao teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área

Espécimes	Tensão (Mpa)	Área (cm ²)
1	6,673469388	0,02499
2	9,661563255	0,022338
3	4,465687948	0,035148
4	8,310378751	0,036594
5	4,319302571	0,034068
6	7,062902615	0,02639
7	8,95890411	0,025185
8	16,17744063	0,03032
9	7,680563711	0,025545
10	12,56047728	0,036708
Desvio Padrão	3,602119472	0,0297286
Média	8,587069026	0,005484971

Tabela 3 - Valores individuais para cada espécime do grupo 1-C (Bio-Oss) relativamente ao teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área

Espécimes	Tensão (Mpa)	Área (cm ²)
1	11,13002042	0,022035
2	5,989010989	0,039312
3	5,289029536	0,04266
4	9,06345733	0,04113
5	8,590519703	0,026265
6	6,192912186	0,045938
7	6,225251295	0,039396
8	18,39109744	0,020803
9	11,12402551	0,02822
10	5,072792363	0,05028
Desvio Padrão	4,087821728	0,010411301
Média	8,706811678	0,0356039

Tabela 4 - Valores individuais para cada espécime do grupo 2a (PerioGlas) relativamente ao teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área

Espécimes	Tensão (Mpa)	Área (cm ²)
1	1,274025974	0,0154
2	13,22484352	0,02077
3	5,801612903	0,0186
4	6,102372701	0,022506
5	1,369920402	0,021483
6	0,935220935	0,020979
7	1,930798299	0,025404
8	13,85960265	0,02265
9	6,031973765	0,014637
10	21,32423268	0,011501
Desvio Padrão	6,837676495	0,004303573
Média	7,185460383	0,019393

Tabela 5 - Valores individuais para cada espécime do grupo 2b (Polímero de mamona) relativamente ao teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área

Espécimes	Tensão (Mpa)	Área (cm ²)
1	5,350047794	0,0040382
2	14,20392958	0,0022295
3	8,899567217	0,003392
4	16,67338635	0,0023075
5	4,034783231	0,004401
6	10,14998556	0,00277
7	8,637431989	0,0038376
8	10,74029582	0,002728
9	13,73606962	0,000948
10	19,50511483	0,0019725
Desvio Padrão	4,529209253	0,000928541
Média	10,93205851	0,002825108

Tabela 6 - Valores individuais para cada espécime do grupo 3 (Coágulo) relativamente ao teste de microtração, ilustrando a área da secção transversal (cm²) e tensão (MPa). Ao final, as médias e desvio padrão da tensão e área

Espécimes	Tensão (Mpa)	Área (cm ²)
1	8,18257646	0,04316
2	9,015037594	0,02394
3	13,25750324	0,017759
4	6,043948521	0,029216
5	11,11513158	0,02736
6	6,18760137	0,022196
7	6,837825279	0,02152
8	5,582711834	0,033387
9	16,67686659	0,014706
10	12,73081201	0,021576
Desvio Padrão	3,740955607	0,008248684
Média	9,563001447	0,025482

Tabela 7 - Valores das médias e desvio padrão de todos os grupos

Grupos	médias	desvio padrão
GenOx	7,709	2,416
GenMix	8,587	3,602
Bio-Oss	8,706	4,087
PerioGlas	7,185	6,837
Polímero de mamona	10,932	4,529
Coágulo	9,563	3,74

Figura 27 - Gráfico ilustrando a resistência à tração do osso, de acordo com o grupo experimental. As colunas representam a média e as barras o desvio padrão da média

Na Tabela 7 e Figura 27 observa-se que o grupo que obteve maior média de resistência à tração foi o grupo de polímero de mamona ($10,932 \pm 4,529$ MPa). Consequentemente, obteve-se uma comparação decrescente na seguinte ordem: Coágulo ($9,563 \pm 3,74$ MPa), Bio-Oss ($8,706 \pm 4,087$ MPa), GenMix ($8,587 \pm 3,602$ MPa), GenOx ($7,709 \pm 2,416$ MPa), PerioGlas ($7,185 \pm 6,837$ MPa).

Ao realizar o teste estatístico ANOVA a 1 critério observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P < 0,5$). Nota-se um grande desvio de padrão no grupo do PerioGlass, sendo os valores da média e desvio padrão muito próximos.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Após o teste de tração na máquina de ensaio universal, os espécimes foram submetidos ao banho de ouro e capturadas as imagens da área de ruptura. As Figuras 28 a 31 representam as superfícies rompidas após o teste.

Figura 28 - Grupo 1 A (GenOx). **A)** Aumento de 20x, observa-se a presença de material enxertado na região fraturada e fibras colágenas. **B)** Aumento de 3000x, observam-se fibras colágenas com pequenas formações ósseas no seu interior

Figura 29 - Grupo 1 C (BioOss). **A)** Aumento de 20x, observa-se a presença de material enxertado compactado e poucas fibras colágenas. **B)** Aumento de 3000x, presença de uma maior uniformidade de tecido ósseo e menor quantidade de fibras colágenas

Figura 30 - Grupo 2a (PerioGlas). **A)** Aumento de 20x, observa-se a presença de material enxertado compactado e poucas fibras colágenas; nota-se que houve um desprendimento total do enxerto com a área receptora. **B)** Aumento de 100x, presença de material enxertado muito compactado

Figura 31 - Grupo 2b (Polímero de mamona). **A)** Aumento de 2000x, área do enxerto após a fratura, presença de uma superfície uniforme de tecido ósseo. **B)** Aumento de 800x, área do leito receptor após fratura, pouco remanescente de tecido ósseo

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A perda do elemento dentário pode desencadear um processo fisiológico de reabsorção óssea alveolar. Essa taxa de reabsorção é bem definida na revisão de literatura para humanos, bem como em animais de laboratório, variando entre a maxila e mandíbula devido a vários fatores sistêmicos (diabetes melitus, osteoporose, doenças sanguíneas) (SCHEER; BOYNE, 1987; HOWELL et al., 1997; JAHANGIRI et al., 1998).

A partir do aparecimento do titânio como matéria utilizada na confecção de implantes osseointegrados, os quais são inseridos no tecido ósseo mandibular ou maxilar, tem-se alavancando o tratamento reabilitador de pacientes total ou parcialmente desdentados. Para a colocação desses implantes há necessidade de certa quantidade de tecido ósseo local, tanto em altura como em espessura, para que o mesmo possa receber uma prótese e absorver cargas durante o processo de mastigação. Uma alternativa para minimizar a perda óssea decorrente da extração dos dentes é o uso de biomateriais nesses alvéolos, visando à manutenção desse tecido ósseo (tanto em altura como em espessura) (HOWELL et al., 1997).

A técnica de colocação de um biomaterial no alvéolo é conhecida na periodontia como uma regeneração guiada óssea (ROG), onde se tem como princípio a indução de uma formação óssea sem a interferência dos tecidos moles adjacentes aos alvéolos, utilizando-se uma membrana para obstruir essa migração tecidual.

Para a avaliação desses biomateriais, principalmente no que concerne à formação óssea (qualidade e quantidade), osteocondução, osteoindução e respostas celulares, um dos modelos experimentais utilizados é a calvária de ratos onde se realizam defeitos críticos ou não nessas áreas, observando-se a resposta do biomaterial quanto ao seu processo biológico restaurador.

Neste estudo foi utilizado esse modelo experimental (calvária de ratos) baseado em literatura estudada para os testes mecânicos, visto o grande embasamento científico no aspecto biológico desse modelo, observando-se uma grande gama de biomateriais avaliados, como as BMPs (AHN et al., 2003; LEE et al., 2003; HAN et al., 2005; HONG et al., 2006; JUNG et al., 2006; FERREIRA et al.,

2004), polímeros (FOWLER et al., 2002; FRANCIS et al., 2003; LEE et al., 2003; TAMIMI et al., 2006; HONG et al., 2006; VERHEGGEN; MERTEN, 2001; RUPPRECHT et al., 2003; FERREIRA et al., 2004), xenoenxertos (MATZENBACHER et al., 2003; TAMIMI et al., 2006), membranas (VERNA et al., 2002; TAMURA et al., 2005; MARDAS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002), aloenxertos (GLOWACKI; ALTOBELLI; MULLIKEN, 1981; MARDAS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002), PRP (PRYOR et al., 2005; HYUN et al., 2005; PRYOR; SUSIN; WIKESJO, 2006). Como método de análise do comportamento da calvária, empregou-se uma metodologia denominada teste de microtração, a qual permite encontrar valores numéricos de resistência à tração e módulo de elasticidade.

Ainda que o método de microtração, quando aplicado ao teste de resistência de união entre materiais odontológicos e a estrutura dental, tenha sido pioneiramente descrito por Sano, Shono, Sonoda (1994), o conceito e o teste em si já foram empregados anteriormente para que fossem testadas as propriedades mecânicas da dentina (SANO et al., 1994; BOWEN; RODRIGUEZ, 1962; AKHTER; FAN; RHO, 2004) e osso (RHO; ASHMAN; TURNER, 1993). Embora pareça complexo em sua configuração, aparentemente inaplicável às condições disponíveis nos laboratórios, o conceito e mecânica do teste é verdadeiramente simples, adotando a mecânica fundamental do teste de tração convencional, adaptando-se as extremidades fixa e móvel da máquina de ensaios para a fixação de um espécime de dimensões reduzidas.

O método de microtração pode ser empregado para que se avaliem propriedades mecânicas de substratos como o esmalte (CARVALHO; YOSHIYAMA; BREWER, 1996), dentina (SANO et al., 1994; CARVALHO; FERNANDES; VILLANUEVA, 2001), materiais odontológicos (MENDONCA; SOUZA; CARVALHO, 2003) e propriedades mecânicas ósseas (RHO; ASHMAN; TURNER, 1993). É fundamental entender que a microtração é um método e não um fim, podendo este ser adaptado às necessidades de investigação das respectivas hipóteses experimentais levantadas no estudo, desde que as adaptações não comprometam os princípios mecânicos fundamentais do teste. A particularidade do método em permitir testes em áreas de dimensões reduzidas, aliada a uma boa dose de criatividade dos pesquisadores, oferece a oportunidade de se planejar experimentos

que trazem informações inovadoras para a área. As possibilidades do método de microtração são inúmeras e incluem vantagens como trabalhar com animais com estrutura óssea reduzidas, sem a necessidade de uma grande quantidade de animais ou da avaliação em humanos, esta muitas vezes inviável devido aos problemas éticos.

Após os espécimes serem submetidos ao teste de resistência à tração, obtiveram-se os seguintes valores em ordem decrescente dos grupos: Polímero de mamona ($10,93 \pm 4,52\text{MPa}$), Coágulo ($9,56 \pm 3,74\text{MPa}$), Bio-Oss ($8,70 \pm 4,08$), GenMix ($8,58 \pm 3,60\text{MPa}$), GenOx ($7,7 \pm 2,41\text{MPa}$) e PerioGlas ($7,18 \pm 6,83\text{MPa}$).

Em um estudo analisando o comportamento do osso cortical de fêmures e vértebra em humanos, Bilezikian, Raisz, Rodan (2002), relataram os valores de resistência encontrados, quanto à direção e tipo de carga utilizada (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores médios do osso humano. Adaptação de Bilezikian, Raisz, Rodan (2002)

Tipo de osso	Direção e tipo de carga	Densidade aparente (g/cm^3)	Resistência/tensão máxima (MPa)	Módulo de elasticidade (10^6MPa)
Cortical (corpo do fêmur)	Tensão longitudinal	1,85	133	17
	Compressão longitudinal	1,85	193	17
	Tensão transversal	1,85	51	11,5
	Compressão transversal	1,85	33	11,5
Trabécula (corpo vertebral)	Compressão	0,31	6	76

Quando se analisam os resultados encontrados neste trabalho, para a resistência à tração dos diversos grupos verifica-se que estes não são similares aos encontrados por Bilezikian, Raisz, Rodan (2002), quando comparado ao osso cortical do fêmur com uma tensão longitudinal, compressão longitudinal, tensão transversal ou compressão transversal. Porém, ao comparar os resultados dos grupos analisados neste trabalho, há uma semelhança com o grupo de trabécula (6MPa – compressão) demonstrando que os enxertos empregados podem se

comportar muito semelhante ao osso trabecular da vértebra, ou seja, as áreas enxertadas com os diversos biomateriais não são capazes de sustentar uma tensão em grande excesso como nos ossos longos, mas em casos em que haja pouco necessidade de demanda funcional esses biomateriais se comportariam bem.

O trabalho de Ratier et al. (2001) demonstraram que cimentos ósseos de fosfato de cálcio contendo tetraciclina obtiveram valores de resistência à tração de 2,0 MPa, valor esse inferior ao apresentado neste trabalho, devido ao fato de que os espécimes utilizados no trabalho de Ratier não foram enxertados, mas somente produzidos pela fábrica e submetidos ao teste de tensão. O resultado deste trabalho mostrou-se superior, pois ao avaliar as áreas de ruptura observa-se que havia grande quantidade de fibras colágenas que proporcionam maior resistência à área enxertada, uma vez que as fibras agem como um arcabouço elástico, com minerais depositados sobre ele.

A presença de colágeno pode ser útil para melhorar a resistência da área enxertada, porém uma grande quantidade de fibras interfere negativamente no processo de reparo dos enxertos, pois as fibras conseguem uma mais rápida proliferação celular impedindo que o tecido ósseo seja formado por completo na região. Esse fato fica nítido ao se analisar as microscopias eletrônicas de varredura, por meio das quais percebe-se uma grande quantidade de remanescentes dos enxertos e presença de fibras colágenas em excesso (DIES et al., 1996; BECKER et al., 1992; SMUKLER; LANDI; SETAYESH, 1999; FICKL et al., 2008; MARDAS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002; PARK; LEE; PARK, 2000; STAVROPOULOS; KARRING; KOSTOPOULOS, 2003; LIOUBAVINA-HACK; CARMAGNOLA; LYNCH, 2005).

O método mais indicado para evitar com que não haja a proliferação celular de fibroblastos, que darão origem às fibras colágenas, seria a utilização de uma membrana que isolasse a região enxertada do tecido de recobrimento, o qual é responsável pela migração celular de fibroblastos, ou seja, utilizar uma técnica de regeneração tecidual guiada (FICKL et al., 2008; STAVROPOULOS et al., 2003; LIOUBAVINA-HACK et al., 2005). Esse fato foi comprovado com a análise no próprio momento da morte dos animais, pois era visível a presença de remanescentes do enxerto entrelaçadas por fibras.

Ao comparar os resultados entre os grupos avaliados, observa-se que o coágulo (grupo controle) obteve resultado muito similar aos demais, até sendo maior do que alguns grupos (Bio-Oss, GenOx, GenMix, PerioGlas) reforçando o que se encontra histologicamente em diversos trabalhos em reparo alveolar utilizando somente coágulo (FICKL et al., 2008; NAGATA et al., 2010) e também, demonstrando que o reparo alveolar procede naturalmente com a presença de coágulo e que a presença de um biomaterial em alvéolo somente possibilita a manutenção da altura alveolar por mais tempo, devido ao atraso de reabsorção dos restos dos biomateriais enxertados.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Segundo os métodos empregados e com base nos resultados obtidos nas condições laboratoriais deste estudo, podemos concluir que:

A) Sobre a resistência à microtração

Confirmou-se a hipótese nula proposta deste trabalho, em que os grupos não tiveram diferença estatisticamente significativa entre eles ($P < 0,5$). O grupo do polímero de mamona ($10,92 \pm 4,53 \text{ MPa}$) obteve melhor resultado, seguido dos grupos controle/coágulo ($9,56 \pm 3,74 \text{ MPa}$), Bio-Oss ($8,70 \pm 4,08 \text{ MPa}$), GenMix ($8,58 \pm 3,60 \text{ MPa}$), GenOx ($7,70 \pm 2,41 \text{ MPa}$) e PerioGlas ($7,18 \pm 6,83 \text{ MPa}$).

B) Sobre a análise de microscopia eletrônica de varredura

As imagens pela microscopia eletrônica de varredura revelaram uma semelhança no padrão da região fratura após o teste de microtração, apresentando grande quantidade de fibras colágenas e remanescentes dos enxertos.

C) Consideração final

Observou-se que a resistência à tração foi influenciada diretamente pela grande quantidade de fibras colágenas na região, necessitando um estudo comparativo com a utilização de barreiras mecânicas (membranas – Regeneração óssea guiada). Porém, ao avaliar os grupos apresentados, nota-se que o material foi indiferente para o resultado final da resistência à tração, demonstrando uma boa qualidade dos materiais utilizados, tanto quando comparamos os produtos quanto a sua origem (xenogênica, polimérica ou coágulo), ou a sua procedência de fabricação (nacional ou importado).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1995 Oct;33(5):312-318.

Ahn SH, Kim CS, Suk HJ, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 with carriers in rat calvarial defects. *J Periodontol*. 2003 Jun;74(6):787-797.

Akhter MP, Fan Z, Rho JY. Bone intrinsic material properties in three inbred mouse strains. *Calcif Tissue Int*. 2004 Nov;75(5):416-420.

Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1969 Mar;27(3):309-318.

Araujo M, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Jan;20(1):1-6.

Araujo MG, Liljenberg B, Lindhe J. beta-Tricalcium phosphate in the early phase of socket healing: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Apr 1;21(4):445-454.

Artzi Z, Nemcovsky CE, Tal H. Efficacy of porous bovine bone mineral in various types of osseous deficiencies: clinical observations and literature review. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2001 Aug;21(4):395-405.

Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol*. 2000 Jun;71(6):1015-1023.

Artzi Z, Weinreb M, Carmeli G, et al. Histomorphometric assessment of bone formation in sinus augmentation utilizing a combination of autogenous and hydroxyapatite/biphasic tricalcium phosphate graft materials: at 6 and 9 months in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Jul;19(7):686-692.

Beck JD, Canfield BL, Haddock SM, et al. Three-dimensional imaging of trabecular bone using the computer numerically controlled milling technique. *Bone*. 1997 Sep;21(3):281-287.

Becker W, Becker BE, Caffesse R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *J Periodontol*. 1994 Dec;65(12):1128-1133.

Becker W, Clokie C, Sennerby L, et al. Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports. *J Periodontol*. 1998 Apr;69(4):414-421.

Becker W, Lynch SE, Lekholm U, et al. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol*. 1992 Nov;63(11):929-940.

Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of bone biology* 2ed. San Diego Academic Press; 2002.

Bonachela WC, Molo JR, Taga EM, et al. Manutenção do rebordo alveolar com hidroxiapatita microgranular. *Rev Gaúcha Odont*. 1992;40:212-214.

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*. 1998 Jul;9(4):310-316.

Bowen RL, Rodriguez MS. Tensile strength and modulus of elasticity of tooth structure and several restorative materials. J Am Dent Assoc. 1962 Mar;64:378-387.

Brandao AC, Brentegani LG, Novaes Junior AB, et al. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. Braz Dent J. 2002;13(3):147-154.

Buck BE, Malinin TI, Brown MD. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Clin Orthop Relat Res. 1989 Mar(240):129-136.

Buck BE, Resnick L, Shah SM, et al. Human immunodeficiency virus cultured from bone. Implications for transplantation. Clin Orthop Relat Res. 1990 Feb(251):249-253.

Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials. 2000 Dec;21(23):2347-2359.

Burstein AH, Wright TM. Fundamentals of orthopaedic biomechanics.: Williams & Wilkins; 1994.

Burstein FD, Cohen SR, Hudgins R, et al. The use of porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction. Plast Reconstr Surg. 1997 Sep;100(4):869-874.

Calixto RF, Teofilo JM, Brentegani LG, et al. [Implantation of flakes of castor oil resin in rat dental alveolus]. Pesqui Odontol Bras. 2001 Jul-Sep;15(3):257-262.

Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, et al. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000 Nov;90(5):581-586.

Carvalho RM, Fernandes CA, Villanueva R, et al. Tensile strength of human dentin as a function of tubule orientation and density. *J Adhes Dent*. 2001 Winter;3(4):309-314.

Carvalho RM, Yoshiyama M, Brewer PD, et al. Dimensional changes of demineralized human dentine during preparation for scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol*. 1996 Apr;41(4):379-386.

Cordioli MAG, Pustiglioni FE, Georgetti MAP. Reparação óssea alveolar pós-exodontia em cães, com e sem uso de membrana de PTFE-e – análise histológica. *Rev Pós Grad*. 2000;7:320-327.

de Groot K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials*. 1980 Jan;1(1):47-50.

Denissen H, Montanari C, Martinetti R, et al. Alveolar bone response to submerged bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants. *J Periodontol*. 2000 Feb;71(2):279-286.

Dies F, Etienne D, Abboud NB, et al. Bone regeneration in extraction sites after immediate placement of an e-PTFE membrane with or without a biomaterial. A report on 12 consecutive cases. *Clin Oral Implants Res*. 1996 Sep;7(3):277-285.

Fan Z, Swadener JG, Rho JY, et al. Anisotropic properties of human tibial cortical bone as measured by nanoindentation. *J Orthop Res*. 2002 Jul;20(4):806-810.

Ferreira GR, Cestari TM, Granjeiro JM, et al. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. *Braz Dent J*. 2004;15(3):175-180.

Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, et al. Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct;35(10):906-913.

Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, et al. Hard tissue alterations after socket preservation: an experimental study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Nov;19(11):1111-1118.

Fisher JP, Lalani Z, Bossano CM, et al. Effect of biomaterial properties on bone healing in a rabbit tooth extraction socket model. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Mar 1;68(3):428-438.

Fowler EB, Cuenin MF, Hokett SD, et al. Evaluation of pluronic polyols as carriers for grafting materials: study in rat calvaria defects. *J Periodontol*. 2002 Feb;73(2):191-197.

Frame JW. Hydroxyapatite as a biomaterial for alveolar ridge augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1987 Dec;16(6):642-655.

Francis PO, McPherson JC 3rd, Cuenin MF, et al. Evaluation of a novel alloplast for osseous regeneration in the rat calvarial model. *J Periodontol*. 2003 Jul;74(7):1023-1031.

Froum S, Cho SC, Rosenberg E, et al. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *J Periodontol*. 2002 Jan;73(1):94-102.

Gamal AY, Mailhot JM, Garnick JJ, et al. Human periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCl conditioned root surfaces. *J Clin Periodontol*. 1998 May;25(5):404-412.

Gauthier O, Boix D, Grimandi G, et al. A new injectable calcium phosphate biomaterial for immediate bone filling of extraction sockets: a preliminary study in dogs. *J Periodontol*. 1999 Apr;70(4):375-383.

Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB. Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calcif Tissue Int*. 1981;33(1):71-76.

Gosain AK. Hydroxyapatite cement paste cranioplasty for the treatment of temporal hollowing after cranial vault remodeling in a growing child. *J Craniofac Surg*. 1997 Nov;8(6):506-511.

Haase HR, Clarkson RW, Waters MJ, et al. Growth factor modulation of mitogenic responses and proteoglycan synthesis by human periodontal fibroblasts. *J Cell Physiol*. 1998 Mar;174(3):353-361.

Han DK, Kim CS, Jung UW, et al. Effect of a fibrin-fibronectin sealing system as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-4 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol*. 2005 Dec;76(12):2216-2222.

Hong SJ, Kim CS, Han DK, et al. The effect of a fibrin-fibronectin/beta-tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein-2 system on bone formation in rat calvarial defects. *Biomaterials*. 2006 Jul;27(20):3810-3816.

Howell TH, Fiorellini J, Jones A, et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997 Apr;17(2):124-139.

Hunt DR, Jovanovic SA. Autogenous bone harvesting: a chin graft technique for particulate and monocortical bone blocks. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1999 Apr;19(2):165-173.

Hyun SJ, Han DK, Choi SH, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol*. 2005 Oct;76(10):1667-1674.

Insaurralde E, Sanada JT, Delben AAST, et al. Resistência à tração e o módulo de elasticidade de calvárias de ratos enxertadas com diferentes biomateriais. *Rev. RGO* 2010 Jul/Set; 58(3):375-380.

Jaasma MJ, Bayraktar HH, Niebur GL, et al. Biomechanical effects of intraspecimen variations in tissue modulus for trabecular bone. *J Biomech*. 2002 Feb;35(2):237-246.

Jahangiri L, Devlin H, Ting K, et al. Current perspectives in residual ridge remodeling and its clinical implications: a review. *J Prosthet Dent*. 1998 Aug;80(2):224-237.

Jung UW, Choi SY, Pang EK, et al. 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. *J Periodontol*. 2006 May;77(5):765-772.

Kasiri S, Taylor D. Acritical distance study of stress concentration in bone. *J. Biomechan*. 2008; 41:603-609.

Koole R, Bosker H, van der Dussen FN. Late secondary autogenous bone grafting in cleft patients comparing mandibular (ectomesenchymal) and iliac crest (mesenchymal) grafts. *J Craniomaxillofac Surg*. 1989 Dec;17 Suppl 1:28-30.

Lane JM. Bone graft substitute. *Western J Med*. 1995 Dec:565-567.

Lee EH, Kim JY, Kweon HY, et al. A combination graft of low-molecular-weight silk fibroin with Choukroun platelet-rich fibrin for rabbit calvarial defect. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 May;109(5):e33-38.

Lee YM, Nam SH, Seol YJ, et al. Enhanced bone augmentation by controlled release of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from bioabsorbable membranes. *J Periodontol*. 2003 Jun;74(6):865-872.

Lekovic V, Camargo PM, Klokkevold PR, et al. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *J Periodontol*. 1998 Sep;69(9):1044-1049.

Lioubavina-Hack N, Carmagnola D, Lynch SE, et al. Effect of Bio-Oss with or without platelet-derived growth factor on bone formation by "guided tissue regeneration": a pilot study in rats. *J Clin Periodontol*. 2005 Dec;32(12):1254-1260.

Majzoub Z, Berengo M, Giardino R, et al. Role of intramarrow penetration in osseous repair: a pilot study in the rabbit calvaria. *J Periodontol*. 1999 Dec;70(12):1501-1510.

Mardas N, Kostopoulos L, Karring T. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. *J Craniofac Surg*. 2002 May;13(3):453-462; discussion 454-462.

Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, et al. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol*. 1992 Jun;63(6):515-525.

Matzenbacher SA, Mailhot JM, McPherson JC 3rd, et al. In vivo effectiveness of a glycerol-compounded demineralized freeze-dried bone xenograft in the rat calvarium. *J Periodontol*. 2003 Nov;74(11):1641-1646.

Mellonig JT, Prewett AB, Moyer MP. HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol*. 1992 Dec;63(12):979-983.

Mendonca JS, Souza MH, Jr., Carvalho RM. Effect of storage time on microtensile strength of polyacid-modified resin composites. *Dent Mater*. 2003 Jun;19(4):308-312.

Miller TA, Ishida K, Kobayashi M, et al. The induction of bone by an osteogenic protein and the conduction of bone by porous hydroxyapatite: a laboratory study in the rabbit. *Plast Reconstr Surg*. 1991 Jan;87(1):87-95.

Misch CE, Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent*. 1993 Fall;2(3):158-167.

Nagata MJ, Messori M, Pola N, et al. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Orthop Res*. 2010 Apr;28(4):468-473.

Norton MR, Odell EW, Thompson ID, et al. Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Dec;14(6):775-783.

Okamoto T, Perri de Carvalho AC, Milanezi LA, et al. Implante de boplant em alvéolo dentais. *Rev Fac Odont Araçatuba*. 1974;3:13-21.

Oreffo RO, Triffitt JT. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone*. 1999 Aug;25(2 Suppl):5S-9S.

Pang EK, Paik JW, Kim SK, et al. Effects of chitosan on human periodontal ligament fibroblasts in vitro and on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol*. 2005 Sep;76(9):1526-1533.

Park YJ, Lee YM, Park SN, et al. Enhanced guided bone regeneration by controlled tetracycline release from poly(L-lactide) barrier membranes. *J Biomed Mater Res*. 2000 Sep 5;51(3):391-397.

Perri de Carvalho AC, Okamoto T, Garcia Jr. IR. Empregos de membrana de teflon para a reparação guiada em exodontia. *Rev Gaúcha Odont.* 1998;3:127-131.

Pinto LP, Brosco HB, Taga R, et al. Regeneração óssea guiada de alvéolos de extração dentária: Porque faze-la? *Rev Bras Implant.* 2000:9-12.

Poehling S, Pippig SD, Hellerbrand K, et al. Superior effect of MD05, beta-tricalcium phosphate coated with recombinant human growth/differentiation factor-5, compared to conventional bone substitutes in the rat calvarial defect model. *J Periodontol.* 2006 Sep;77(9):1582-1590.

Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol.* 2005 Sep;32(9):966-972.

Pryor ME, Susin C, Wikesjo UM. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodontol.* 2006 Jun;33(6):455-460.

Pryor ME, Yang J, Polimeni G, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *J Periodontol.* 2005 Aug;76(8):1287-1292.

Ratier A, Gibson IR, Best SM, et al. Setting characteristics and mechanical behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline. *Biomaterials.* 2001 May;22(9):897-901.

Rho JY, Ashman RB, Turner CH. Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements. *J Biomech.* 1993 Feb;26(2):111-119.

Rho JY, Flaitz D, Swarnakar V, et al. The characterization of broadband ultrasound attenuation and fractal analysis by biomechanical properties. *Bone*. 1997 May;20(5):497-504.

Rho JY, Pharr GM. Effects of drying on the mechanical properties of bovine femur measured by nanoindentation. *J Mater Sci Mater Med*. 1999 Aug;10(8):485-488.

Rupprecht S, Merten HA, Kessler P, et al. Hydroxyapatite cement (BoneSource) for repair of critical sized calvarian defects--an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg*. 2003 Jun;31(3):149-153.

Sano H, Shono T, Sonoda H, et al. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater*. 1994 Jul;10(4):236-240.

Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, et al. Tensile properties of resin-infiltrated demineralized human dentin. *J Dent Res*. 1995 Apr;74(4):1093-1102.

Scheer P, Boyne PJ. Maintenance of alveolar bone through implantation of bone graft substitutes in tooth extraction sockets. *J Am Dent Assoc*. 1987 May;114(5):594-597.

Serino G, Rao W, Iezzi G, et al. Polylactide and polyglycolide sponge used in human extraction sockets: bone formation following 3 months after its application. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Jan;19(1):26-31.

Shimano MM, Shimano AC, Volpon JB. Histerese de fêmures de ratas submetidos a ensaios de flexão, em diferentes faixas etárias. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*. 2002;18(2):89-97.

Simpson HE. The healing of extraction wounds. *Br Dent J*. 1969 Jun 17;126(12):550-557.

Smukler H, Landi L, Setayesh R. Histomorphometric evaluation of extraction sockets and deficient alveolar ridges treated with allograft and barrier membrane: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 May-Jun;14(3):407-416.

Stavropoulos A, Karring ES, Kostopoulos L, et al. Deproteinized bovine bone and gentamicin as an adjunct to GTR in the treatment of intrabony defects: a randomized controlled clinical study. *J Clin Periodontol*. 2003 Jun;30(6):486-495.

Stephan EB, Jiang D, Lynch S, et al. Anorganic bovine bone supports osteoblastic cell attachment and proliferation. *J Periodontol*. 1999 Apr;70(4):364-369.

Tal H. Autogenous masticatory mucosal grafts in extraction socket seal procedures: a comparison between sockets grafted with demineralized freeze-dried bone and deproteinized bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res*. 1999 Aug;10(4):289-296.

Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, et al. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol*. 2006 Dec;33(12):922-928.

Tamura T, Fukase Y, Goke E, et al. Three-dimensional evaluation for augmented bone using guided bone regeneration. *J Periodontal Res*. 2005 Jun;40(3):269-276.

Thompson DM. Extraction sites--foundations for restorative excellence. *Compend Contin Educ Dent*. 1999;20(3 Spec No):10-18; quiz 19.

Torres J, Tamimi FM, Tresguerres IF, et al. Effect of solely applied platelet-rich plasma on osseous regeneration compared to Bio-Oss: a morphometric and densitometric study on rabbit calvaria. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008 May;10(2):106-112.

Turek SL. *Ortopedia: princípios e sua aplicação*. São Paulo: Manole LTDA; 1991.

Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993 Jul-Aug;14(4):595-608.

Turner CH, Rho J, Takano Y, et al. The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques. *J Biomech*. 1999 Apr;32(4):437-441.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965 Nov 12;150(698):893-899.

Van Der Linden JC, Verhaar JA, Weinans H. A three-dimensional simulation of age-related remodeling in trabecular bone. *J Bone Miner Res*. 2001 Apr;16(4):688-696.

van Rietbergen B, Weinans H, Huiskes R, et al. A new method to determine trabecular bone elastic properties and loading using micromechanical finite-element models. *J Biomech*. 1995 Jan;28(1):69-81.

Verheggen R, Merten HA. Correction of skull defects using hydroxyapatite cement (HAC)--evidence derived from animal experiments and clinical experience. *Acta Neurochir (Wien)*. 2001 Sep;143(9):919-926.

Verna C, Dalstra M, Wikesjo UM, et al. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. *J Clin Periodontol*. 2002 Sep;29(9):865-870.

Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*. 2001 Jun;22(12):1599-1606.

Wozney JM. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. *J Periodontol*. 1995 Jun;66(6):506-510.

Yu D, Li Q, Mu X, et al. Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low-temperature rapid-prototyping technology. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Oct;37(10):929-934.

Zhao YF, Mendes M, Symington JM, et al. Experimental study of bone growth around a dental implant after Surgibone grafting. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 Nov-Dec;14(6):889-897.

Zysset PK, Guo XE, Hoffler CE, et al. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *J Biomech*. 1999 Oct;32(10):1005-1012.

ANEXO

ANEXO A – OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 023/2007

Bauru, 10 de dezembro de 2007.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado "Avaliação da resistência e módulo de elasticidade de calvárias de ratos enxertadas com diferentes biomateriais", de autoria de Jefferson Tomio Sanada foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator aprovando o projeto foi aceito "*ad referendum*" desta Comissão.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e
Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Accácio Lins do Valle
Docente do Departamento de Prótese