UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

“Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (*Rattus norvegicus*)”.

Thais Accorsi Mendonça

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Endodontia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

BAURU – 2005

Mendonça, Thais Accorsi

**M 532a Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (*Rattus norvegicus*)/Thais Accorsi Mendonça -- Bauru, 2005.
xix 110 p.: il. ; 30 cm.**

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

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

Assinatura:

Data:

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB/USP:

Nº do Protocolo: 011 / 2003

Data: 07 de maio de 2003

Thais Accorsi Mendonça

03 de julho de 1977 Taquaritinga - SP	Nascimento
1996-999	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade do Estado de São Paulo.
2000-2002	Curso de Pós-Graduação em Endodontia, em nível de Especialização, no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – Universidade de São Paulo.
2003- 2005	Curso de Pós-Graduação em Endodontia, em nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.
Associações e Conselhos	Conselho Regional de Odontologia (CRO) Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas (APCD) Associação Brasileira de Odontologia (ABO)

DEDICATÓRIA

À minha mãe Edna e meu pai Valter,

Aos meus avós Cidinha e José,

À Deus e Santo Antoninho da Rocha Marmo,

onde encontro serenidade e confiança em todos os momentos.

EPÍGRAFE

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.

prefiro ser feliz,.....
que em conformidade viver....."

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

À minha Mãe e meu Pai, exemplos de obstinação e amor às filhas. Sempre me incentivando na busca pela felicidade e realização profissional.

Aos meus Avós, Cidinha e José, agradeço o carinho e amor de tantas tardes preguiçosas regadas a muito bolinho de chuva.

Ao Flávio, meu amor, amigo e incentivador. Foram tantas passagens juntas, desde o começo, na dúvida da escolha por uma vida acadêmica, passando pelo incentivo nos momentos difíceis e presença nas alegrias e sucessos.

“Nosso maior desejo na vida é encontrar alguém,
Que nos faça fazer o melhor que pudermos”.

Ralph Waldo Emerson

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Mauro Granjeiro, não tenho palavras para agradecer os inúmeros ensinamentos, tanto na formação científica como pessoal. Sempre com olhos francos e bondosos, com paixão e paciência na arte de ensinar.

À Daniela, minha irmã, amor fraterno, sempre presente em todos os momentos de minha vida e ao Gustavo, meu cunhado, admiro-o pelo caráter, bom senso e muito bom humor.

À Julieta, Beto, Ênio, Júlio e Luciene, família do Flávio, e que há tempo são para mim como minha família também. À Julieta, com sua fala mansa e sabedoria na vida; ao Beto, cujos sentimentos são transparecidos através do olhar; ao Ênio, com alegria de viver; ao Júlio, com imenso senso de humor e um coração maior ainda e finalmente Luciene, com garra de viver e vencer.

Agradecimentos

Ao Grupo inicial de Imunohistoquímica: Ana Cláudia Demarchi, Willian Zambuzzi e Katiúcia Batista da Silva Paiva. Companheiros de trabalho com um objetivo comum. Pessoas que se tornaram amigos verdadeiros, em um trabalho que se tornou prazer.

Agradecimentos

Aos Professores da Endodontia, Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante, Roberto Brandão, Ivaldo Gomes de Moraes e Norberti Bernardinelli, pelos ensinamentos e carinho.

À Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho, quem primeiro me orientou no caminho científico, meus agradecimentos, respeito e admiração. Sua visão humanística foi meu maior aprendizado.

À Profa. Dra. Teresa Cristina de Barros, da Universidade Paulista - UNIP, pela colaboração e orientação na dissertação. Agradeço sua disponibilidade. Aprendi muito com seu bom humor e franqueza.

Ao “Tio Gastão”, Prof. Dr. José Alberto de Souza Freitas, a quem eu admiro pela obra, pelo carinho e amor para com os outros.

Ao Professores da Especialização em Endodontia do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (Centrinho), Prof. Dr. Celso Kenji Nishiyama e Profa. Renata Pardini Hussne, pelo aprendizado e amizade.

Ao Prof Dr. Rumio Taga, da Disciplina de Histologia, pela grande contribuição em minha formação. Admiro sua simplicidade e sabedoria.

Agradecimentos

Ao meu Tio Edner Accorsi (*in memorian*), agradeço a sua ajuda em muitos momentos, seu bom humor e colaboração.

Ao Dr. Antônio Carlos Dib Jorge, a quem chamo carinhosamente de “Tio Dib”. Foi a sua perspicácia clínica que me ajudou, permitindo que eu chegasse até aqui.

Ao Prof. Dr. Paulo Sakai, que sempre me tratou com carinho e atenção, que fez jus ao título de médico, orientando e confortando a minha família por caminhos desconhecidos. Meu medo era eliminado na confiança de seus olhos.

Agradecimentos

À Tânia Mary Cestari, a pessoa mais dedicada que conheço. Admiro a sua simplicidade e paixão pelo trabalho. São tantos os agradecimentos, que não conseguirei expressar em palavras.

À Danieli Ceolin, agradeço os ensinamentos, paciência, bom humor e grande incentivo. Tive uma imensa alegria neste convívio.

Às amigas Lidiane de Castro Pinto, Valéria Gelani e Renata Pardini pela cumplicidade e carinho.

Ao meu amigo, Fábio Balico, um amigo muito querido. Obrigada pelas muitas risadas e conversas.

Aos colegas do curso de mestrado, Danieli, Amélio, Luciano, Norberto, Jácio, Adriana, Augusto e Eduardo, juntos na luta, no riso e nas dificuldades, por toda a colaboração nos momentos importantes. Alguns dos maiores aprendizados vieram de nossa convivência.

Às amigas Andréa Angotti, Patrícia Olini, Carla Oliveira, Juliana Maia e Silvia Pavarina. Amigas de muito tempo, amigas de coração.

Aos amigos de Faculdade, Roberto Kiyoshi Tsuchiya (Robert D.), Marcelo Donizetti Chaves (Sertão) e Rodrigo de Almeida Garcia, a quem sinto muitas saudades do convívio. Meus grandes parceiros, que sempre me incentivaram na pós-graduação.

Agradecimentos

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica: Juliano Pessani, Irene Ramires, Tatiana Sales, Vanessa Eid da Silva, Esther Takamori, Eduardo Aleixo Figueira, Ariadne Letra, Renato Menezes, Cristina Sicca, Flávia Iano, Flávia Levy, Cleide Martinhon, Danilo Januário, Elide Caroselli, Gustavo Zanelatto, Juliane de Carvalho, Tatiana Furlani, Kellen Gasgue, Kelly Olympio, Rejane Fukushima, Renato Sartori e Rodrigo Oliveira. Adoro esta família bioquímica.

Aos amigos que muito me ajudaram na prática cirúrgica da tese: Tânia Mary Cestari, Rodrigo de Oliveira, Jefferson Sanada, Renato Sartori, Katiúcia Batista da Silva Paiva, Danilo Januário, Daniele Ceolin, Norberto Juarez e Flávio Monteiro Amado.

À amiga, Ana Paula Anequini, que me orientou no início da minha vida profissional, sempre com muito bom humor e simplicidade. Sinto falta das nossas conversas na sala de espera.

Aos colegas de mestrado de outros cursos, a quem dividimos as alegrias e questionamentos. Desejo a todos muita sorte e caminhos recheados de oportunidades.

A minha amiga Clarissa (Kika), D. Mabel, Humberto, Daniela e Sr. Humberto (*in memoriam*). Tive a honra e prazer de ter o convívio e carinho de vocês.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, a quem eu admiro pela persistência e competência.

Ao Prof. Dr. Fábio Tobias Perassi, quem primeiro me incentivou a seguir a carreira acadêmica. Admiro a sua honestidade.

À Profa. Dra. Glória de Almeida Soares (UFRJ) e o doutorando Márcio Baltazar Conz pela ajuda nos testes de caracterização físico-química e à Márcia Soares Sader, pela ajuda na microscopia eletrônica de varredura com EDS.

Aos técnicos do laboratório de bioquímica, Ovídio e Thelma, agradeço a colaboração nestes anos de convívio.

Aos funcionários do biotério, Luís, Erasmo, Wagner e Ricardo, agradeço a atenção e colaboração neste trabalho.

À Sueli, D. Neide, Edmauro e Patrícia, funcionários da Endodontia, por toda a ajuda e momentos de alegria juntos. Sentirei saudades.

À Vera, funcionária da Fisiologia, pelas conversas e pelo exemplo de trabalho digno e honesto.

Ao funcionário Clodoaldo, porteiro da Faculdade, pelos incontáveis “Bom dia”, incentivador para que meu dia realmente fosse bom.

Agradecimentos

À Diretoria da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo.

Aos funcionários da Biblioteca e da Pós-Graduação, por toda a atenção e disponibilidade com que atendem a todos.

À CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de estudos.

À empresa Baumer S. A pela doação dos materiais utilizados nesta pesquisa.

À empresa Johnsons & Johnsons, pela doação de materiais cirúrgicos.

Aos funcionários do CCDM, pela dedicação e profissionalismo com que atendem a todos.

SUMÁRIO

LISTADE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xviii
RESUMO.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	02
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	07
2.1. Tecido ósseo- considerações gerais.....	07
2.2. Materiais osteossubstitutos.....	10
2.3. Regeneração óssea guiada (ROG).....	17
3. PROPOSIÇÃO.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Materiais.....	26
4.2. Caracterização físico-química.....	28
4.3. Avaliação da capacidade osteogênica <i>in vivo</i>	30
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Caracterização físico –química do OBM.....	36
5.2. Análise <i>in vivo</i>	51
6. DISCUSSÃO.....	60
6.1. Caracterização físico-química dos biomateriais.....	60
6.2. Modelo experimental utilizado.....	64
6.3. Análise microscópica da resposta biológica.....	67
7. CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ABSTRACT.....	89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Materiais utilizados no estudo.....	27
FIGURA 2: Esquema do processo de produção do OBM.....	28
FIGURA 3: Esquema demonstrando as estruturas no modelo experimental utilizado.....	32
FIGURA 4: Procedimentos cirúrgicos.....	33
FIGURA 5: Perfil termogravimétrico.....	39
FIGURA 6: Espectros no Infravermelho.....	40
FIGURA 7: Termograma Endotérmico da Calorimetria Exploratória Diferencial.....	42
FIGURA 8: Difratoograma de Rx.....	45
FIGURA 9: Fotomicrografias eletrônicas de varredura do OBM.....	46
FIGURA 10: Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos biomateriais utilizados em diferentes aumentos.....	47
FIGURA 11: Espectros de EDS.....	48
FIGURA 12: Análise da superfície do Gen-Ox Orgânico com sonda EDS associada ao MEV.....	49
FIGURA 13: Análise da superfície de Gen-Derm com sonda EDS associada ao MEV.....	50
FIGURA 14: Imagens radiográficas digitais divididas de acordo com os períodos experimentais.....	52
FIGURA 15: Grupo controle.....	55
FIGURA 16: Grupo tratado com Bio-Oss.....	56
FIGURA 17: Grupo tratado com Gen-Ox.....	57
FIGURA 18: Grupo tratado com OBM.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Distribuição dos grupos experimentais.....	31
TABELA 2: Identificação dos possíveis grupamentos químicos presentes na hidroxiapatita, em função do número de onda.....	38
TABELA 3: Identificação dos possíveis grupamentos químicos presentes no colágeno, em função do número de onda.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

OBM	osso bovino misto
TG	termogravimetria
FTIR	espectroscopia no infravermelho
DSC	calorimetria exploratória diferencial
MEV	microscopia eletrônica de varredura
FTIR	espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar algumas propriedades físico-químicas do osso bovino misto (OBM) e analisar comparativamente o potencial osteocondutor do OBM em relação ao osso bovino inorgânico medular (Bio-Oss[®] e Gen-Ox[®]), tendo o coágulo como controle negativo. O OBM foi analisado por meio de termogravimetria, espectroscopia no infravermelho, calorimetria exploratória diferencial, determinação da porosidade e tamanho de poros, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X e cristalinidade. Para esta análise foram feitos defeitos críticos (9 mm de diâmetro) na calvária de ratos (n=5/período – material), preenchidos de acordo com o grupo experimental e recobertos com membrana de cortical óssea bovina Gen-Derm[®]. Ao final dos períodos de 1, 3, 6 e 9 meses pós-cirúrgicos, as calotas foram coletadas, fixadas em formalina 10% tamponada, radiografadas e processadas para análise histológica. As análises físico-químicas evidenciaram grupamentos característicos de colágeno e de hidroxiapatita no osso bovino misto. Na análise microscópica comparativa observamos que: a) não ocorreu o completo fechamento do defeito em quaisquer dos grupos estudados; b) em todos os grupos a membrana foi reabsorvida antes do período de 1 mês; c) no grupo controle a ossificação ocorreu na borda do defeito, sendo a região central preenchida por tecido conjuntivo fibroso; d) no grupo tratado com Bio-Oss ocorreu ossificação na borda do defeito, com denso fibrosamento ao redor das partículas; e) no grupo tratado com Gen-Ox houve neoformação óssea ao redor das partículas do biomaterial; f) no grupo tratado com OBM o infiltrado inflamatório persistiu no primeiro mês, sendo substituído por tecido conjunto fibroso ao redor das partículas. Concluimos que: a) o OBM apresenta frações orgânica (cerca de 15%) e inorgânica (cerca de 75%); b) nenhum dos materiais testados foi capaz de induzir o fechamento completo da lesão de tamanho crítico; c) o Gen-Ox inorgânico demonstrou a maior capacidade osteocondutora dentre os materiais testados; d) o OBM e o Bio-Oss, no modelo experimental utilizado, não apresentaram propriedades osteocondutoras e, e) nenhum dos materiais foi reabsorvido no período de 9 meses.

Palavras-chave: Biomateriais, Implante ósseo, Reparo ósseo, Regeneração óssea guiada, Osso bovino, Implante xenogênico.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os crescentes avanços na área das cirurgias ortopédicas, plásticas reconstrutivas, bucomaxilofaciais, além das dentárias como na periodontia, implantodontia e endodontia têm instigado um significativo número de pesquisadores a desenvolver e produzir diversos tipos de materiais para enxerto, que tem por propósito, promover uma melhor reparação de áreas ósseas lesadas. A despeito de o osso autógeno apresentar boas propriedades biológicas (como osteogênese, osteoindução e osteopromoção), os vários inconvenientes de se obter osso autógeno, dentre eles, necessidade de um outro procedimento cruento, período de convalescença, susceptibilidade a infecções, risco de reabsorções ósseas progressivas e morbidade (VESCIO ¹²⁰, 1967), estimularam a busca de um material substituto ideal para enxertos em áreas ósseas.

Já é amplamente difundido e pesquisado o uso clínico de biomateriais osteosubstitutos na odontologia (ZITZMANN et al.¹²⁹, 1997; BLANK & LEVY⁹, 1999), como na periodontia e implantodontia. Mas ainda não existem muitos trabalhos comparando o reparo do defeito ósseo entre diferentes tipos de implantes e a terapia mais utilizada (preenchimento da loja óssea apenas com o coágulo).

A evolução dos biomateriais para implante ósseo e o progresso das técnicas de sua utilização têm estimulado pesquisadores a desenvolver inovações, e aprimorar os produtos já existentes. Visto que as características desejadas de um biomaterial são biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação clínica, ausência de riscos trans-operatórios ou seqüelas, além de boa aceitação pelo paciente, conclui-se que ainda não existe um material que contenha todas essas características (OLIVEIRA⁷⁴ et al., 1999).

É sabido que, ainda, defeitos mais extensos, têm as chances de sucesso diminuídas. A tendência atual é desenvolver e utilizar materiais que acelerem ou, ao menos, permitam o reparo normal e completo da loja óssea, diminuindo o risco pós-operatório (SAAD & ABDELLATIEF⁸⁵, 1991; KELLERT et al.⁴⁸, 1994; RANKOW & KRASNER⁷⁸, 1996; PÉCORA et al.⁷⁵, 1997; BLANK & LEVY⁹, 1999; MASTROMIHALIS et al.⁶³, 1999; YOUNG et al.¹²⁷, 1999).

Estudos mais recentes realizados por nossa equipe (OLIVEIRA et al.⁷⁴, 1999; HERCULANI et al.³⁸, 2000) corroboraram análises publicadas na literatura mundial (BLANK & LEVY⁹, 1999; MASTROMIHALIS et al.⁶³, 1999), onde o material orgânico e inorgânico derivado do osso bovino mostrou-se perfeitamente biocompatível. Trata-se de um material obtido de uma fonte abundante, de custo acessível, sendo seguro quanto ao risco de transmissão de doenças, visto que o processo de tratamento a que é submetido (liofilização, desmineralização e desproteínização) elimina qualquer risco de resposta imunogênica, e também de uma possível zoonose, incluindo o mal da “vaca louca” (WENZ et al.¹²³, 2001). Apresenta capacidade osteocondutora, pois permite a aposição de tecido ósseo originado de osso já existente (MASTERS⁶², 1988).

A utilização de osso bovino medular desproteínizado e membrana de cortical óssea bovina desmineralizada isoladamente (TAGA¹¹¹, 2004) promoveram significativo reparo ósseo (80-100%) em defeitos de tamanho crítico (que não se reparariam por si só) em calvária de cobaias, o que reforça não somente a biocompatibilidade dos materiais como sua excelente propriedade osteocondutora em lesões extensas.

Atualmente no mercado existem diversas marcas comerciais para osso bovino desproteínizado, como o Bio-oss[®] (Osteohealth Co.), produto importado indicado como substituto ósseo, mas com elevado custo. Este material é biocompatível (CAMELO et al.²⁰, 2001; YAMADA et al.¹²⁶, 2002), tendo sido testado, em diversos modelos animais, como em defeito crítico em calvária de ratos, que demonstraram sua aplicabilidade (THALLER et al.¹¹⁴, 1994; SU-GWAN et al.¹⁰⁷, 2002). Há ainda diversos relatos demonstrando sua utilização clínica, com sucesso, nas diversas áreas da odontologia (HOUSER et al.⁴⁰, 2001; FUGAZZOTTO & DE PAOLI³⁴, 2002; INDOVINA & BLOCK⁴¹, 2002).

Também de origem xenogênica, há o Gen-Ox[®] (Baumer S.A., São Paulo, Brasil), desenvolvido com tecnologia nacional, apresentando menor custo, mas com propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes aos similares importados. É indicado para o preenchimento de cavidade como substituto de enxerto ósseo e apresenta-se nas formas inorgânica e orgânica (cortical ou medular), em blocos ou grânulos.

Graças à sua biocompatibilidade e estrutura tridimensional biologicamente desenhada que favorece a osteocondução, o osso bovino adequadamente processado potencialmente representa ainda uma opção como material carreador de células ou fatores de crescimento. O desenvolvimento de fatores de crescimento vêm tendo grande importância recentemente devido a evolução dos estudos sobre utilização clínica de fatores de indução, que exigem sistemas de carregamento adequados (LEVINE et al.⁵⁵, 1997; CONCANNON et al.²³, 1997; MORONE & BODEN⁶⁸, 1998). Além de fornecer uma estrutura de suporte e osteocondução, o osso bovino inorgânico poderá prover também um alto conteúdo de cálcio e fósforo, essenciais para a neoformação do tecido ósseo (SCIADINI et al.⁸⁷, 1997). A implantação de matriz óssea mineralizada e desproteínizada (Gen-Ox®), tanto a 100°C como a 1000°C mostrou uma resposta tecidual semelhante à utilização de enxerto autólogo e xenólogo desmineralizado (OLIVEIRA et al.⁷⁴, 1999), permitindo concluir que os materiais eram biocompatíveis.

Entretanto, os implantes xenogênicos apresentam pobre resistência mecânica, não sendo possível sua implantação e imediata função no sítio receptor, ou mesmo sua fixação através de parafusos. É desejável então o desenvolvimento de um material que possibilite a utilização de carga imediata, mantendo as características de biocompatibilidade, osteocondução e osteoindução (STOGARD-JENSEN et al.¹⁰⁴, 1996).

O processamento do osso bovino utilizando peróxidos, solventes orgânicos e agentes caotrópicos proporciona a remoção de células, proteínas e lipídios, resultando em material potencialmente aplicável no tratamento de perdas ósseas como o Tutoplast® (Mentor) e Kiel Bone® (Kiel) (TADIC & EPPLE¹⁰⁹, 2004). Estudos preliminares desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que o osso bovino misto produzido pela Baumer S. A. apresentava biocompatibilidade sem ativação aparente do sistema imunológico (SUBITONI¹⁰⁵, 2002; JANUÁRIO⁴³, 2003).

Com o desenvolvimento do conceito de regeneração tecidual guiada (GTR), por DAHLIN et al.²⁶ (1988), introduziu-se o uso de barreiras físicas (membranas) para impedir que células dos tecidos epiteliais circunjacentes proliferem ocupando a área da lesão e dificultando a reorganização óssea que é sabidamente mais lenta.

SCHENK et al.⁸⁷ (1994) relatam que a membrana sobre defeitos ósseos estimula a regeneração óssea pelo princípio da osteopromoção (na regeneração óssea guiada, ROG), ou seja, impedindo a invasão do espaço do defeito por tecido conjuntivo frouxo. Esse procedimento cria um microambiente celular, tecidual e molecular adequados para a neoformação óssea (YAMADA et al.¹²⁵, 2002). Contudo, o índice de formação óssea depende da revascularização e do recrutamento de células osteoprogenitoras (SCHENK⁸⁸, 1992), e da distância a ser percorrida por estas células, impondo o tempo de permanência durante o qual a membrana deverá ficar funcionalmente intacta no local.

Recentemente foi introduzida no mercado brasileiro uma membrana biológica liofilizada de cortical óssea bovina (Gen-Derm[®]), que se constitui basicamente de fibras colágenas ósseas.

Destarte, neste trabalho objetiva-se a caracterização físico-química do osso misto (OBM) e a análise histológica comparativa do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos (Bio-Oss[®], Gen-Ox[®] e OBM), em relação ao coágulo apenas, no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos. Em todos os defeitos ósseos será utilizada a membrana de cortical óssea desmineralizada (Gen-Derm[®]), de forma a aplicar o conceito de regeneração óssea guiada.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Tecido Ósseo - Considerações gerais*

O tecido ósseo é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, onde a matriz extracelular é mineralizada, conferindo-lhe rigidez, mas mantendo algum grau de elasticidade. Além de sua função de suporte, o osso é a maior reserva primária de cálcio do organismo, sendo o cálcio um íon essencial para a vida, pois participa da manutenção do pH interno do corpo, assim como na transmissão e condução do impulso elétrico em nervos e músculos. Deste modo, o tecido ósseo tem uma grande capacidade de remodelação, renovando-se constantemente para responder às necessidades metabólicas do corpo e a manutenção da estabilidade da calcemia (DEMPSTER²⁹, 1999; MARX & GARG⁶¹, 1998).

Em nível molecular, o osso é constituído, basicamente, de uma matriz orgânica colagênica (colágeno tipo I), contendo proteoglicanas de baixa massa molecular e proteínas não colágenas, que correspondem a 25% de seu peso; uma parte mineral (principalmente hidroxiapatita) correspondente a 65% e água (10%). Sua função geral está relacionada com a constituição do esqueleto, sustentação e fixação dos músculos e depósito para íons cálcio para manutenção da calcemia (JUNQUEIRA & CARNEIRO⁴⁶, 1990).

Macroscopicamente há duas formas de osso: cortical (compacto) e esponjoso (medular). No osso compacto, a matriz de colágeno está organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central, constituindo o sistema de Harvers. Os canais centrais contendo nervos e vasos sanguíneos se comunicam entre si e com a cavidade medular óssea através dos canais de Volkmann. Já o osso esponjoso apresenta uma matriz mais porosa, organizada em trabéculas. As diferenças entre osso cortical e esponjoso não são apenas estruturais, mas também funcionais. Assim, o osso cortical dá resistência e proteção, enquanto que o esponjoso atua nas funções metabólicas. O osso cortical ou compacto é encontrado nas diáfises de ossos longos e na superfície externa de ossos chatos. O osso esponjoso ou medular delimita espaços intertrabeculares que são preenchidos por medula óssea vermelha, onde há a produção ativa de células sanguíneas a partir

de células mesenquimais, ou, com o envelhecimento, por medula óssea amarela, um sítio de reserva de gordura. (MARX & GARG⁶¹, 1998).

Protegendo externamente o osso existe uma fina camada de tecido conjuntivo com grande potencial osteogênico, denominado periósteo, e um tecido equivalente, o endósteo, que recobre as superfícies internas dos ossos.

Histologicamente existem quatro tipos de tecido ósseo: o trabeculado ou entrelaçado, o composto, o lamelar e o fasciculado. O osso trabeculado desempenha importante papel durante o reparo ósseo, sendo o primeiro tecido ósseo a ser formado. Caracteriza-se por uma velocidade de formação muito rápida (30-50µm ao dia ou mais), por ter uma matriz de colágeno desorganizada sem a estrutura lamelar dos sistemas harvesianos e por ser frágil, exibindo pouca resistência biomecânica. É o tecido ósseo predominante durante o desenvolvimento pré-natal, por isso é referido como “osso embrionário”, um termo incorreto, visto que todos os adultos têm habilidade de formar este tipo de osso. Também é o tecido que caracteriza a primeira fase da regeneração óssea, e apesar de formar-se muito rapidamente, é reabsorvido e substituído pelo osso lamelar. Este, por sua vez, é o tecido ósseo maduro, com alta resistência mecânica. Caracteriza-se por formar-se bem devagar, a uma velocidade de 0,6µm por dia e por ter uma estrutura altamente organizada de fibra colágenas e cristais de minerais. O termo “tecido ósseo composto” é usado para descrever o estágio de transição entre o osso trabeculado ao osso lamelar, durante a fase de remodelação. E, finalmente, o tecido ósseo fasciculado é o osso encontrado na zona de inserção de ligamentos das articulações. Este tipo de osso é de importância particular na odontologia porque está presente adjacente ao ligamento periodontal (MELCHER⁶⁶, 1970; ROBERTS et al.⁸¹, 1987).

Quanto às células presentes no tecido ósseo, temos:

1. **Osteoblastos:** células cubóides organizadas em uma camada contínua sobre o osteóide, ou seja, camada não mineralizada de matriz, que recobre a superfície óssea mineralizada. Estas células são responsáveis pela osteogênese, isto é, pela síntese e secreção da matriz orgânica, sua maturação e mineralização. O osteoblasto além de sintetizar e secretar o colágeno tipo I, que corresponde a 90% da matriz orgânica, também produz as outras proteínas não colagênicas encontradas na matriz, como: sialoproteína óssea,

osteopontina, osteonectina, osteocalcina, BMPs, proteoglicanas e outras. É uma célula muito rica em fosfatase alcalina, enzima essencial para o processo de mineralização da matriz (MARX & GARG⁶¹, 1998). Vários fatores sistêmicos e locais regulam o seu número, a sua diferenciação e a sua atividade, incluindo fatores autócrinos. Assim, estas células possuem receptores para hormônios sistêmicos (paratormônio, estrógenos, glicocorticóides, insulina, hormônios tireoideanos), vitamina D3 e fatores locais como prostanoídes (PGE, PGF_{2α}), citocinas (TGF-βs, BMPs, FGFs, IGF-1, PDGF) e interleucinas (RAISZ & RODAN⁷⁷, 1998). Os osteoblastos se diferenciam a partir de células mesenquimais indiferenciadas, e a sua diferenciação em osteoblastos depende de estímulos externos, fatores de crescimento, hormônios e interações celulares.

2. **Osteócitos:** são osteoblastos incorporados à matriz óssea mineralizada, durante a osteogênese. Apresentam longas projeções citoplasmáticas que delimitam canálculos intercomunicantes constituindo uma rede de comunicação entre as células e a superfície óssea.
3. **Osteoclastos:** são células grandes multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleares. Quando ativo é polarizado, com parte da membrana envolvida na reabsorção fortemente aderida à superfície óssea e que delimita a zona reabsorvente da célula, denominada “borda em escova” ou “borda franjada”. Com o início da reabsorção aparece uma depressão na superfície óssea junto à borda em escova que é conhecida como lacuna de Howship (JUNQUEIRA & CARNEIRO⁴⁶, 1990; MARX & GARG⁶¹, 1998).

A interação da atividade de osteoblasto-osteoclasto é responsável pela remodelação óssea, ou seja, a reabsorção e a neoformação óssea contínua que ocorre em todos os ossos (RODAN & MARTIN⁸², 1981). Deste modo, os osteoblastos produzem fatores que vão influenciar a diferenciação e função dos osteoclastos, alguns destes são depositados e armazenados na matriz e outros secretados localmente em resposta a hormônios ou fatores locais. Segundo RODAN & MARTIN⁸², os receptores para a maioria dos fatores osteolíticos são encontrados nos osteoblastos e não nos osteoclastos. Em cultura, os osteoclastos reabsorvem osso em resposta a fatores liberados por osteoblastos estimulados (MCSHEEHY &

CHAMBERS⁶⁴, 1986), e componentes da matriz óssea é que atraem e ativam os osteoclastos (THESINGH & BURGER¹¹⁵, 1983). Por outro lado, a reabsorção óssea libera fatores que recrutam e ativam os osteoblastos.

Um destes fatores que controlam o comportamento osteoclástico, é a osteoprotegerina (OPG), descoberta em 1997 por SIMONET et al⁹⁷. Os autores observaram que a sua superexpressão em camundongos transgênicos resultava em osteopetrose devido ao bloqueio da diferenciação de osteoclastos. A identificação e o estudo funcional da OPG mostrou que, além de esteróides e outros hormônios, novas moléculas secretadas podem atuar sistemicamente no controle da diferenciação de osteoclastos. Obviamente a identificação de um receptor solúvel que controla a osteoclastogênese sugeriu que deveria existir um fator associado a este receptor, o qual foi chamado de RANKL, ou fator de diferenciação de osteoclastos (ODF). RANK está presente na membrana de precursores de osteoclastos, bem como solúvel no microambiente ósseo. A deficiência em RANKL leva a osteopetrose (KARSENTY⁴⁷, 1999).

2. 2. *Materiais osteosubstitutos*

O organismo está sujeito a inúmeras adversidades que podem levar à perda de um órgão (perda dental, por exemplo), de massa corpórea (perdas ósseas), ou podem levar à substituição de um tecido por outro, podendo ser este novo tecido indesejado ou ineficiente. Isto é especialmente verdadeiro no que se refere ao tecido ósseo. Como observado anteriormente, este é um tecido altamente dinâmico e versátil, com funções diversas, como proteção de órgãos, reservatório de cálcio, sustentação do corpo. Em determinadas situações, como em casos de acidentes ou doenças osteodestrutivas, nem sempre toda a dinâmica orgânica pode ser capaz de regenerar o tecido perdido e, assim, devolver forma e função adequadas. Outros distúrbios podem interferir no crescimento craniofacial, como no caso da crânio-sinostose (MARDAS et al.⁵⁹, 2002), e novamente o organismo não consegue oferecer reparo adequado, o que prejudica o crescimento do indivíduo. De acordo com SERVICE⁹⁴ (2000), todo ano são realizados ao redor de 450.000 enxertos ósseos nos Estados Unidos principalmente em fraturas com perda tecidual.

No caso da odontologia, inúmeras são as situações onde as perdas ósseas prejudicam a função dental, como nas periodontites, ou até mesmo impedem a reabilitação bucal, como é o caso de pacientes desdentados que necessitam de reabilitação com implantes osteointegrados, mas não possuem quantidade ou qualidade óssea adequadas. BOYNE¹³, em 1971, foi o primeiro autor a estudar a aplicação dos enxertos ósseos por razões protéticas. Com o tempo, o mesmo tipo de enxerto passou a ser utilizado de forma regular para que fosse possibilitada a instalação de implantes osteointegrados.

É importante que se faça uma distinção entre enxertos e implantes. O enxerto ou transplante é um tecido ou órgão vivo, pois contém células do doador e, portanto, espera-se que sobreviva na região receptora. Já o implante, ao contrário, é um material sem células viáveis (BAUER & MUSCHLER⁵, 2000).

O enxerto autógeno é largamente empregado quando da necessidade de aumento do volume ósseo, visto que possui diversas propriedades desejáveis, como osteogênese, osteocondução e osteoindução. Além disso, por ter origem no mesmo indivíduo que irá receber o enxerto, a aceitação do procedimento pelo organismo torna-se facilitada, sem risco de rejeição. Contudo, inconvenientes desta técnica podem ser descritos, como a necessidade de internação, maior período de convalescença, susceptibilidade a infecções nos sítios doadores e, ainda, reabsorção progressiva e constante (CARVALHO et al.²², 2004). Nem sempre a obtenção de quantidade e qualidade adequadas de osso autógeno é simples, e os inconvenientes citados anteriormente podem desencorajar o paciente à realização do procedimento.

Em vista do que foi citado, é natural a busca de substitutos ósseos, e de produtos que estimulem a formação óssea e que possam ser utilizados em situações onde o restabelecimento do volume e qualidade óssea seja desejável. Tal biomaterial deve ser utilizado em íntimo contato com os tecidos do indivíduo e, para tanto, possuir características como: biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação clínica, ausência de riscos trans-operatórios e seqüelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação pelo paciente (SERVICE⁹⁴, 2000). Apesar de haver uma grande variedade de implantes ósseos, associada a um avanço crescente no seu desenvolvimento e aperfeiçoamento, ainda não existe um biomaterial que preencha todos esses requisitos.

AABOE et al.¹, em 1995, realizaram uma revisão de literatura sobre defeitos ósseos criados experimentalmente e sobre materiais substitutos ósseos. Relataram que um material ideal para implante ósseo, de origem não autógena, deve ser esterilizável, não tóxico, não induzir resposta imunológica e que possa estar disponível em quantidades suficientes. Este deve ainda ser capaz de induzir a diferenciação de células em osteoblastos, sendo ao mesmo tempo gradualmente absorvível, fornecendo um suporte condutivo para formação de um novo osso. Adicionalmente, o material deve funcionar como uma barreira mecânica para o crescimento de tecido fibroso ou invaginação de tecido muscular para dentro do defeito.

De acordo com o Instituto Nacional de Saúde Americano (The National Institute of Health Consensus Development Conference on Dental Implants⁷¹) em 1989, os materiais para implante ósseo podem ser classificados de acordo com sua origem em 3 grandes famílias: autógeno, alógeno e aloplástico. Atualmente outra categoria deve ser salientada, a do implante xenogênico, e que vem sendo empregado de forma crescente (OLIVEIRA et al.⁷⁴, 1999; HERCULANI et al.³⁸, 2000; SICCA et al.⁹⁶, 2000; BUNYARATAVEJ & WANG¹⁵, 2001).

O osso autógeno é obtido de áreas doadoras do próprio indivíduo. O implante alógeno é obtido de indivíduos de espécie semelhante ao receptor; e os implantes aloplásticos podem ser de natureza metálica, cerâmica ou polimérica. Os implantes xenogênicos são obtidos de indivíduos de espécies diferentes do receptor, sendo mais comumente obtidos de bovinos (CARVALHO et al.²², 2004).

Os biomateriais podem, ainda, ser classificados de acordo com algumas de suas propriedades, e divididos em: osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores. Osteogênicos são os materiais orgânicos capazes de estimular diretamente os osteoblastos a formar osso; osteoindutores, por sua vez, são materiais capazes de induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, aumentando o crescimento ósseo ou, até mesmo, formando osso ectópico, e os osteocondutores (geralmente inorgânicos, materiais desproteinizados) favorecem a migração, proliferação e maturação das células progenitoras, além de conduzirem a aposição do novo osso em sua superfície a partir de tecido ósseo preexistente nas bordas da lesão (URIST¹¹⁹, 1965). Mudanças tecnológicas na produção dos

biomateriais e na obtenção dos substitutos ósseos são responsáveis por conferir a estes materiais características de osteoindução, osteocondução ou osteogênese, e estes fatores são o grande foco atual da bioengenharia.

Há, ainda, uma outra classificação que pode ser utilizada em função das características físico-químicas resultantes do processamento dos biomateriais, ou seja, dividem-se em orgânicos e inorgânicos. O osso, geralmente bovino, é desmineralizado em condições controladas de pH e temperatura removendo os componentes inorgânicos e celulares, restando predominantemente colágeno tipo I e, em algumas vezes, resíduos de fatores de crescimento. O material inorgânico é obtido através da desproteinização do osso através de processos termo-químicos que removem sua porção orgânica, restando fundamentalmente hidroxiapatita (HA). Ambos biomateriais podem apresentar-se em blocos ou particulados em diferentes tamanhos de grânulos, macro ou micro partículas (CARVALHO et al.²², 2004).

Dentre os vários biomateriais desenvolvidos, esforços intensos têm sido feitos nas últimas três décadas para o desenvolvimento de derivados inorgânicos, os quais receberam grande atenção como materiais de preenchimento, espaçadores e substitutos para enxertos ósseos, principalmente devido à sua biocompatibilidade, bioatividade e características de osteocondução em relação ao tecido hospedeiro (DE GROOT²⁸, 1980; BONACHELLA et al.¹¹, 1992; GRANJEIRO et al.³⁵, 1992; BURSTEIN et al.¹⁷, 1997). Além de fornecer uma estrutura de suporte e osteocondução, proverão também um alto conteúdo de cálcio e fósforo, essenciais para a neoformação do tecido ósseo (SCIADINI et al.⁸⁷, 1997).

É importante salientar que a estrutura da hidroxiapatita é similar entre as espécies (LE GEROS⁵², 1991). Inúmeros trabalhos na literatura demonstraram a biocompatibilidade da matriz inorgânica bovina como material para enxerto ósseo (MASTERS⁶², 1988; OLIVEIRA et al.⁷⁴, 1999).

Dentre os materiais inorgânicos, atualmente destaca-se o de origem xenogênica, pois se trata de um material obtido de uma fonte abundante, de custo acessível, sendo também seguro quanto ao risco de transmissão de doenças, e o processo de tratamento a qual é submetido elimina qualquer risco de resposta imunogênica (WENZ et al.¹²³, 2002).

Um dos materiais provenientes de osso bovino inorgânico, e com larga utilização no mercado, é o Bio-Oss[®] (Osteohealth Co.). Este material é uma matriz óssea mineral obtida após a remoção de componentes orgânicos do osso bovino medular. Devido à sua estrutura, é física e quimicamente comparável à matriz mineral do osso humano.

Em 1993, HISLOP et al.³⁹ utilizaram o (Bio-Oss) para reconstrução óssea em humanos, e observaram que os melhores resultados foram observados em pacientes submetidos à cirurgia ortognática, e os piores em pacientes que necessitavam de aumento de rebordo alveolar. Pacientes com defeitos hipoplásicos (sindrômicos), e pacientes que necessitavam de correção após trauma, obtiveram resultados medianos. De acordo com os autores, as propriedades do material poderiam ser melhoradas acrescentando-se alguns fragmentos de osso autógeno. Se observarmos que o objetivo em se desenvolver um biomaterial é eliminar a utilização de osso autógeno, devido aos inconvenientes já citados, concluímos que o material não cumpriu plenamente seu objetivo.

Em 1998, BECKER et al.⁷ testaram diferentes biomateriais para o preenchimento de alvéolos humanos após extração: osso autógeno, osso liofilizado desmineralizado (DFDBA), osso bovino desproteinizado (Bio-Oss) e proteína morfogenética óssea (BMP) humana em carreador de proteínas não colagênicas, e observaram que os melhores resultados ocorreram com a utilização de BMPs, com regeneração óssea acelerada, e osso autógeno, que demonstrou melhor qualidade óssea.

Entretanto, diversos outros trabalhos demonstraram as várias possíveis utilizações para o osso inorgânico bovino (Bio-Oss), e que tais procedimentos podem ser bem sucedidos quando bem indicados. YOUNG et al.¹²⁷, em 1999, avaliaram o uso de osso inorgânico bovino (Bio-Oss) em defeitos na maxila e mandíbula de coelhos, e compararam com defeitos preenchidos com osso autógeno, osso autógeno + Bio-Oss e defeitos não tratados. Após 12 semanas, os autores puderam observar que no grupo não tratado o defeito estava preenchido com tecido fibroso com formação óssea somente nas bordas do defeito; no grupo tratado com osso autógeno houve formação de novo osso ao redor das partículas, embora em algumas regiões tenha-se observado células multinucleares compatíveis com osteoclastos

reabsorvendo as partículas; com o uso do Bio-Oss, o osso neoformado também era detectado ao redor das partículas. Não houve sinal de reabsorção do material, embora a superfície da partícula fosse irregular, levando os autores a questionar se o Bio-Oss poderia ser classificado como um material reabsorvível, visto que suas partículas não apresentavam sinais de reabsorção.

A observação de que o Bio-Oss pode não ser reabsorvível vai ao encontro das observações de ARTZI ³, que em 2000 avaliaram alvéolos que foram preenchidos com Bio-Oss. A altura da crista óssea foi medida logo após a extração e após 9 meses, quando o campo foi novamente aberto e um cilindro ósseo da área enxertada foi coletado. Observou-se que houve completo preenchimento do alvéolo com osso neoformado em 82,3% dos casos, e verificou-se ainda a presença das partículas do material em todos os espécimes, presença de osso imaturo na porção coronal e osso lamelar na porção mais apical. Os autores concluíram que o mineral ósseo bovino é um material biocompatível e apropriado para evitar a perda óssea que ocorre após a extração, no entanto, mesmo após nove meses, as partículas ainda estavam presentes, não sendo totalmente reabsorvidas.

Outros trabalhos demonstraram sucesso na utilização do Bio-Oss em diferentes situações, como AABOE et al.², em 2000, na osteointegração de implantes subperiostais na tíbia de coelhos, e observaram que o Bio-Oss é biocompatível e osteocondutor. Em 2002, CAMARGO et al.¹⁹, avaliaram o uso combinado de plasma rico em plaqueta, mineral ósseo bovino (Bio-Oss) e regeneração tecidual guiada (membrana Atrisorb®) em defeitos ósseos periodontais, e observaram que houve significativa redução na profundidade da bolsa e ganho de inserção, principalmente quando o uso do Bio-Oss foi associado ao plasma rico em plaquetas, quando comparados aos valores prévios.

O mineral ósseo bovino (Bio-Oss), relatado até o momento, é um produto importado, com custo elevado. Após esforços para a obtenção de um produto similar nacional, chegou-se ao que hoje é comercializado sob a marca Gen-Ox® (Baumer S.A., São Paulo, Brasil), com menor custo e propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes aos similares importados. Uma diferença em relação ao Bio-Oss® é que o Gen-Ox® apresenta-se nas formas inorgânica e orgânica (oriundas da cortical ou medular), em blocos ou grânulos. Este material vem sendo, de forma

crescente, alvo de pesquisas, com o intuito de observar sua biocompatibilidade, suas características físico-químicas, e seu potencial osteocondutor e osteoindutor.

OLIVEIRA et al.⁷⁴, em 1999, implantaram no subcutâneo de ratos, matriz óssea desproteinizada (Gen-Ox® inorgânico), nas temperaturas de 100°C e 1000°C, e observaram que os materiais de origem bovina podem ser adequadamente utilizados como material de preenchimento. Entretanto, os autores relataram a formação de granuloma do tipo corpo estranho ao redor do material implantado.

Em 2000, HERCULANI et al.³⁸ avaliaram o reparo ósseo com a utilização de membrana de cortical óssea bovina (Gen-Derm®, Baumer S. A.) associada ou não a implante ósseo bovino desmineralizado (Gen-Ox® orgânico), em defeitos cirúrgicos de 12 mm de diâmetro na calvária de cobaias, e observaram os melhores resultados em longo prazo no grupo com osso liofilizado. Apesar de a formação óssea, a partir da borda, ter sido menor, ao final de 6 meses 62% do espaço do defeito estava preenchido por tecido ósseo, cuja formação iniciava-se em ilhotas no interior da cavidade.

KINA⁴⁹, em 2002, avaliou comparativamente a resposta celular em subcutâneo de ratos ao implante de osso cortical bovino desproteinizado a 100°C (Gen-Ox® inorgânico), na forma microgranular (250-1000 µm) e macrogranular (1000-2000 µm), bem como a temperatura de desproteinização (a 100 ou 1000°C) do osso cortical bovino inorgânico macrogranular. O autor concluiu que o osso cortical bovino desproteinizado a 100°C ou 1000°C, quer macro ou microgranular promoveu resposta tecidual semelhante à descrita para implantação subcutânea de osso autógeno ou alógeno mineralizado, sugerindo que possa ser usado como material de preenchimento osteosubstituto e como potencial carreador das proteínas morfogenéticas do osso.

2. 3. Regeneração óssea guiada (ROG)

A regeneração óssea guiada demonstrou sucesso em uma variedade de experimentos em modelos animais. No entanto, pouco se encontra na literatura sobre os mecanismos fundamentais básicos deste conceito. Tem-se reportado que a neoformação óssea se desenvolve por meio de células derivadas da medula óssea, as

quais apresentam um potencial osteogênico (BUSER et al.¹⁸, 1994) e por meio do periósteo, visto que sua simples manipulação pode promover o aumento de espessura óssea na calvária de ratos (MARDAS et al.⁵⁹, 2002).

O princípio da Regeneração Tecidual Guiada foi desenvolvido, nas duas últimas décadas, para a regeneração de tecidos periodontais perdidos resultantes da doença periodontal inflamatória. O tratamento de defeitos ou perdas ósseas pelo mesmo princípio foi conceituado como Regeneração Óssea Guiada (ROG), ou Osteopromoção. O trabalho de MURRAY et al.⁷⁰, em 1957, foi pioneiro. Os autores protegeram o coágulo sangüíneo com um envoltório plástico fenestrado, e houve o preenchimento ósseo no fêmur, ílio e coluna espinhal, sem a utilização de enxerto, concluindo que para o crescimento do tecido ósseo são necessários três fatores: a) presença de coágulo sangüíneo; b) osteoblastos preservados; e c) contato com tecido vivo.

Entretanto, o conceito de ROG destacou-se em 1988 com o trabalho de DAHLIN et al.²⁶, com o uso de membrana não absorvível de teflon para a regeneração de defeitos ósseos não periodontais, de cortical a cortical, bilateralmente, nos ângulos da mandíbula de ratos. Os autores observaram que defeitos recobertos por duas membranas, de maneira que o defeito ficasse entre as membranas mostraram melhores resultados quanto à regeneração óssea foram obtidos quando utilizadas as membranas, enquanto que defeitos sem membrana, mesmo após 22 semanas, estavam preenchidos por tecido conjuntivo fibroso.

Os mesmos autores (DAHLIN et al.²⁷, em 1990) utilizaram o modelo de defeito ósseo em macacos, utilizando membranas não-absorvíveis de teflon expandido (e-PTFE) em defeitos com tamanho similar à de um cisto. Em um grupo controle, ou seja, sem o uso da membrana, estes defeitos apicais não apresentaram sinais de regeneração completa em virtude da invaginação de tecido conjuntivo para dentro do defeito. Após 3 meses de tratamento em ambos os tipos de defeitos, críticos e apicais, o material teste proporcionou a regeneração óssea completa; enquanto que no grupo controle, houve formação óssea descontinuada envolta por uma grande massa de tecido conjuntivo. BECKER et al.⁷, em 1990, confirmaram histologicamente estes resultados em estudo piloto em cachorros.

Um estudo comparando diversas membranas absorvíveis em relação à barreira não absorvível de e-PTFE, em defeitos trans-ósseos na mandíbula de ratos, foi realizado por SANDBERG et al.⁸⁶, em 1993. As membranas absorvíveis eram de ácido poliglicólico e ácido polilático, e possuíam diferentes velocidades de absorção, e os autores concluíram após 12 semanas que estas membranas eram biocompatíveis e causaram uma reação inflamatória superficial de média intensidade, enquanto não foram totalmente absorvidas. Em relação a ROG, não houve diferença significativa entre as membranas absorvíveis e não absorvível.

Os modelos de defeitos ósseos em calvárias de ratos, cobaias e coelhos vêm sendo amplamente utilizados, e firmaram-se como modelos adequados para a avaliação da resposta orgânica a implantes osteosubstitutos e de seus potenciais de osteocondução e osteoindução. Nas calvárias, é possível a obtenção de defeitos críticos, isto é, que não reparam sem o auxílio de técnicas regenerativas, permitindo avaliar biomateriais e compará-los entre si. Há, entretanto, dificuldades na padronização dos estudos que se utilizam deste modelo animal. Uma delas é que, como dito anteriormente, diferentes animais são utilizados e, assim, não há como comparar os resultados. Além disso, alguns autores (KOSTOPOULOS & KARRING⁵⁰, 2000; MARDAS et al.⁵⁹, 2002) envolvem a sutura interparietal no defeito ósseo, o que pode afetar o resultado da terapia realizada, visto que a região da sutura é uma fonte de células osteoprogenitoras.

DUPOIRIEUX et al.³¹, 2001, afirmam que defeitos em calvária são os modelos experimentais mais seletivos de regeneração óssea, devido ao pobre aporte sanguíneo da região, e pelo fato de que a estrutura membranosa impede o reparo espontâneo.

Em 1991, em estudo clássico de DAHLIN et al.²⁵, avaliaram a ROG em defeitos críticos bilaterais de 8 mm na calvária de ratos, com cuidado para não danificar a dura-máter e o cérebro do animal. Os autores puderam observar que o uso de membranas favoreceu a formação óssea, mas que a manutenção do espaço para a formação óssea é imprescindível, visto que em casos onde houve colapso da membrana a formação óssea foi menor.

LINDE et al.⁵⁶, em 1993, utilizaram a técnica da ROG com sucesso para o aumento da quantidade de tecido ósseo na calvária de ratos, e utilizaram uma

membrana rígida em forma de cúpula, com 5 a 8 mm de diâmetro na calvária de ratos, criando um espaço para a migração de células osteogênicas oriundas da calvária através do coágulo mantido em posição. A análise histológica no período de 9 a 16 semanas indicou a presença de tecido ósseo neoformado abaixo da cúpula, que chegou a 80% de seu volume. A quantidade de osso neoformado foi dependente da qualidade da membrana, tipo, porosidade, rigidez e o tempo de reparo. Nos casos onde a membrana não manteve o espaço eficientemente, houve cicatrização por tecido conjuntivo. Este importante trabalho demonstrou que a ROG pode ser um fator de grande valia para a cirurgia reconstrutiva, sendo confirmado posteriormente num estudo em coelhos por ITO et al.⁴², em 1998.

HAMMERLE et al.³⁶, em 1995, estudaram os estágios iniciais da reparação de defeitos trans-ósseos de 15 mm de diâmetro na calvária de coelhos, com a utilização de barreira de PTFE. Além de observarem ossificação nas bordas do defeito, os autores notaram o aumento desta ossificação com o tempo. Após uma semana, o trabeculado de tecido ósseo cresceu dentro do tecido conjuntivo frouxo altamente vascularizado que ocupava o defeito em direção ao centro. Após 2 semanas, ilhotas isoladas de novo osso foram detectadas neste tecido conjuntivo que se uniram em formações maiores. No estágio final, o trabeculado primário do tecido ósseo foi reforçado por depósitos de camadas regulares de osso lamelar, sendo o reparo ósseo caracterizado, segundo os autores, como osso intramembranoso.

KOSTOPOULOS & KARRING⁵⁰, no ano de 2000, observaram em defeitos críticos (5 mm de diâmetro) na calvária de ratos, com envolvimento da sutura interparietal, recobertos com membrana de e-PTFE protegendo o defeito no aspecto cerebral e galeano, a ocorrência da regeneração óssea completa com mais de 80% dos espécimes com regeneração da sutura sagital.

Em 2001, DUPOIRIEUX et al.³¹, realizaram um estudo comparativo de 3 membranas: não absorvível (PTFE) e absorvível (poliglactina e de colágeno oriunda da casca de ovo de aves), em defeitos críticos (6 mm de diâmetro) trans-ósseos de cada lado da calvária de ratos, sem o envolvimento da sutura. O defeito teste foi recoberto por uma membrana na parte cerebral do defeito e outra na parte da gálea. Os autores relataram que, para os defeitos recobertos com a membrana de colágeno, houve pouca ou nenhuma osteopromoção e regeneração parcial em apenas um

animal dentre 10 casos. As conclusões deste estudo foram de que apenas a barreira de PTFE proporcionou resultados favoráveis e sugeriram que a estrutura e composição da membrana são importantes.

Ainda em 2001, STAL et al.¹⁰² fizeram um estudo na calvária de coelhos com uma membrana absorvível de compósitos (LACTSORB). Relataram que não houve qualquer reação inflamatória com células gigantes tipo corpo estranho e que o defeito recoberto, tanto interna como externamente, apresentou resultados mais expressivos que o defeito coberto com apenas uma membrana. Nos dois grupos formou-se uma camada de osso cortical interna e externa e, entre elas, osso medular com tecido adiposo típico. Os autores concluíram que a osteopromoção com membranas absorvíveis é uma terapia alternativa para diminuir defeitos ósseos, após a realização de cirurgias craniofaciais e neurocirurgias.

MARDAS et al.⁵⁹, em 2002, estudaram o impacto da barreira de PTFE e da matriz óssea desmineralizada alogênica na regeneração óssea e da sutura craniana em ratos. Nos defeitos sem tratamento, com 4 meses, houve formação de tecido conjuntivo fibroso na parte medial do defeito, e pequenas porções de novo osso na periferia do defeito. Nos defeitos tratados com osso desmineralizado, alguns casos regeneraram completamente com tecido ósseo ou parcialmente com osso e tecido conjuntivo. Nos casos de regeneração completa com tecido ósseo, foram observadas partículas de osso desmineralizado dando um aspecto compacto ao novo osso gerado. A combinação de membrana e osso desmineralizado promoveu a regeneração completa apenas nos defeitos tratados com duas membranas, uma na parte interna e outra na parte externa, regeneraram todo o defeito tratado e a formação de uma estrutura similar à sutura sagital. O contorno da área regenerada nem sempre seguiu o contorno original devido ao colapso da membrana para dentro do defeito. A área regenerada consistia de osso lamelar contendo lacunas com osteócitos e vasos sanguíneos. Na região da sutura, os autores encontraram uma zona de osteoblastos adjacentes ao novo osso formado seguido por uma zona de tecido conjuntivo exibindo alta vascularização. Havia na parte medial da sutura tecido conjuntivo com muitos fibroblastos e fibras orientadas horizontalmente interdigitando entre si, lembrando uma sutura sagital normal.

Atualmente, o princípio da regeneração óssea guiada baseia-se na utilização de duas classes de barreiras: as absorvíveis e as não absorvíveis. A indicação de que classe de membrana deve ser utilizada está diretamente ligada ao tipo de defeito escolhido, à relação custo-benefício e a disponibilidade ou interesse do paciente em fazer a cirurgia de reentrada para a remoção da membrana não-absorvível.

As barreiras, quando empregadas na ROG, devem seguir os seguintes critérios (WANG & MACNEIL¹²², 1998): a) biocompatibilidade; b) possuir permeabilidade permitindo a difusão de plasma e nutrientes, mas impedir a passagem de células; c) atuar como um suporte físico ao tecido mole circunjacente, prevenindo o colapso deste no espaço com o coágulo sanguíneo, onde as células do tecido original da ferida possam migrar; d) proteção da singela rede vascular enquanto o coágulo sofre processo de organização; e) exclusão de células competidoras; f) prevenir a formação de uma cicatriz tecidual; e g) ser de fácil manuseio.

As investigações sobre materiais absorvíveis para a confecção de membranas têm como principal objetivo eliminar a cirurgia de reentrada, a qual é um procedimento necessário com barreiras a base de materiais não absorvíveis. Para membranas absorvíveis, temos membrana de ácido polilático e ácido poliglicólico e membranas de colágeno.

A manutenção da integridade estrutural da membrana, durante o período inicial do reparo da ferida, é um pré-requisito importante na ROG para a manutenção do espaço, e conseqüente repovoamento da área por células originárias do(s) tecido(s) do defeito. A integridade estrutural depende diretamente da taxa de degradação do colágeno, que é influenciada pela origem do colágeno empregado.

BRUNEL et al.¹⁴, em 1996, relataram que uma barreira que apresente longo período de reabsorção, nem sempre proporciona maior regeneração periodontal ou óssea, após estudarem o reparo ósseo de defeitos em calvárias de ratos (6 mm de diâmetro), e observaram que não houve diferença estatística na regeneração óssea nos sítios tratados com as membranas com diferentes taxas de ligação cruzada. Os autores observaram, ainda, que em 30 dias não havia mais sinais da membrana em um dos grupos, havia franca reabsorção da mesma em outro grupo, e a reabsorção estava apenas iniciada em um terceiro grupo, e que esta variação era devida à quantidade de ligações cruzadas que a membrana possuía.

Com resultados diferentes, TAGA et al.¹¹², 1997, avaliaram o destino de membrana liofilizada de cortical de osso bovino desmineralizado (marca Dentoflex®) colocada em posição subperióstica na calvária de cobaia (12 animais), e constataram que a membrana é lentamente reabsorvida da superfície óssea por atividade de células mononucleadas, e raramente observou células multinucleadas em sua superfície. Salienta-se que nos resultados histológicos obtidos após 6 meses da colocação da membrana, somente em dois casos a membrana havia sido reabsorvida.

É importante salientar, portanto, que as membranas reabsorvíveis não possuem o mesmo tempo de reabsorção, e que isto pode variar de acordo com sua composição, espessura (LINDE et al.⁵⁶, 1993) e tratamento (BRUNEL et al.¹⁴, 1996).

TAGA¹¹¹, em 2004, utilizou a membrana absorvível à base de colágeno, GenDerm®, em defeitos críticos na calvária de cobaias (10 mm de diâmetro). A membrana foi colocada no lado epidural, o defeito foi preenchido com coágulo e recoberto com outra membrana do lado ectodural. Para a manutenção do espaço foi utilizado na região central um suporte de osso alogênico desmineralizado inativado (3 mm de diâmetro). O defeito, no grupo controle, foi preenchido com coágulo sanguíneo e o mantenedor de espaço na região central. Os animais foram mortos em tempos experimentais de 1, 3 e 6 meses após a cirurgia para as análises morfométrica e histológica. Os resultados obtidos no estudo indicaram que o uso da dupla membrana de cortical óssea bovina desmineralizada e o mantenedor de espaço promoveram um ótimo reparo de defeito de tamanho crítico em calvária de cobaias.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Caracterizar as propriedades físico-químicas do osso bovino misto (OBM) e analisar microscopicamente a resposta tecidual ao OBM em comparação ao Gen-Ox medular inorgânico e ao Bio-Oss.

Especificamente, pretendemos:

- 1) Determinar o perfil termogravimétrico, espectro de infravermelho, termograma diferencial exploratório, porosidade, análise de superfície utilizando microscopia eletrônica de varredura, difração de Raios-X e cristalinidade do OBM, comparativamente a materiais orgânicos ou inorgânicos;
- 2) Realizar a análise histológica descritiva do reparo ósseo na presença do OBM, Gen-Ox Inorgânico e Bio-Oss, sendo o coágulo o grupo controle.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. *Bio-Oss®*

O Bio-Oss é osso bovino medular inorgânico, produzido por Geistlich Pharma Ag (Switzerland). A sua desproteinização, de acordo com o fabricante, ocorre à cerca de 300°C (Figura 1- A e B). O Bio-Oss utilizado neste trabalho foi adquirido com Brazil Implant Systems Com. Imp. Exp. Ltda - São Paulo.

4.1.2. *Gen-Ox®*

O Gen-Ox é produzido pela Baumer S. A. (Registro no Ministério da Saúde n.10345500001) e apresenta-se em diferentes formas, particulados e blocos, e composições, orgânico ou inorgânico. Neste estudo, utilizamos micropartículas (250-1000 µm) osso bovino medular orgânico (Figura 1- C e D) e micropartículas de osso bovino medular inorgânico (Figura 1- E e F) a 1000°C, ambos doados pelo fabricante.

4.1.3. *Gen-Derm®*

A Gen-Derm é uma membrana absorvível composta de colágeno ósseo obtido da matriz orgânica de osso cortical bovino. É produzida pela Baumer S. A. (ANVISA n. 10345500007). (Figura 1- G e H).

4.1.4. *Osso Bovino Misto (OBM)*

O OBM é um material que contém ambas as frações orgânica (predominantemente colágeno tipo I) e inorgânica (hidroxiapatita) do osso bovino. Utilizando álcalis, solventes orgânicos e peróxidos (Figura 2) capazes de remover restos de células, sangue, coágulo, gordura e proteínas não aderidas ao osso é possível obter-se um material com melhores propriedades mecânicas que o Gen-Ox orgânico ou inorgânico, uma vez que se evita a desmineralização, que torna o material gelatinoso quando umedecido, ou sinterização, que torna o material friável (Figura 1- I e J). Neste estudo foram utilizados grânulos com cerca de 200-400 µm, processado e fornecido pela empresa Baumer S. A.

Figura 1: Materiais utilizados no estudo.

Fotos ilustrativas da apresentação e microscopia eletrônica de varredura dos seguintes materiais: A-B) Bio-Oss; C-D) Gen-Ox orgânico medular; E-F) Gen-Ox inorgânico medular; G-H) Gen-Derm e, I-J) OBM. Todos os materiais de enxerto foram esterilizados previamente por radiação gama (25 Kgy).

Figura 2: Esquema do processo de produção do OBM

4.2. Caracterização Físico-Química

O perfil termogravimétrico, espectroscopia de infravermelho, calorimetria exploratória diferencial, determinação da porosidade e tamanho de poros e microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais – CCDM, na Universidade Federal de São Carlos. A análise por microscopia eletrônica de varredura foi complementada com o Sistema de Energia Dispersiva (EDS) que permite a determinação da composição qualitativa e semi-quantitativa das amostras a partir da emissão de raios-X característicos. O limite de detecção é da ordem de 1% e o sistema permite a construção de mapas químicos da superfície da amostra (mapa elemental). Estas análises foram realizadas no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.2.1. Termogravimetria (TG)

A termogravimetria é definida como uma técnica termoanalítica na qual a massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Uma pequena quantidade da amostra é colocada em um suporte de alumina, onde sua massa é constantemente monitorada por uma termobalança. Utilizamos o programa de temperatura com equilíbrio a 50°C, razão de aquecimento de 10°C/minuto, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min⁻¹), e temperatura final de 950°C (TA Instruments, modelo TGA 2950) acoplado a um analisador térmico (TA Instruments, modelo TA2000). O perfil termogravimétrico do OBM foi comparado ao Gen-Ox inorgânico e ao do orgânico. A massa inicial de partida de cada material foi de 19,95 mg (OBM), 17,88 mg (Gen-Ox inorgânico) e, para o Gen-Ox orgânico 8,9010 e 11,4570 (duplicata).

4.2.2. Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica consiste em incidir radiação eletromagnética correspondente a faixa do infravermelho ($4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$) na amostra. A energia associada a estes comprimentos de onda uma vez absorvida pela molécula converte-se em energia de rotação – vibração molecular. Este fenômeno de absorção é mensurável e altamente dependente dos grupamentos químicos que estão presentes na amostra. Portanto, análise e interpretação de um espectro no infravermelho obtido para um polímero mostra os grupamentos químicos presentes na estrutura tanto da fase inorgânica como da orgânica e, conseqüentemente, sua estrutura. Amostras de OBM, Gen-Ox inorgânico e orgânico foram colocadas sobre uma pastilha de brometo de potássio (KBr). As pastilhas foram preparadas na concentração de 0,1%, isto é, 1,8 mg de amostra para 180 mg de KBr. Foram realizadas 24 leituras para a obtenção do espectro. Utilizou-se um espectrofotômetro da Perkin-Elmer, modelo 1000 IR.

4.2.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Nesta técnica mede-se a diferença de energia fornecida a uma substância e a um material de referência (tubo de PVC vazio) em função da temperatura ou tempo, quando ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. O equipamento utilizado foi da marca Netzsch, modelo DSC 200. A rampa de aquecimento foi de -20°C até 250°C , com razão de aquecimento de $5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, em atmosfera de forno de nitrogênio gasoso (fluxo de gás de $30\text{ mL}/\text{minuto}$) em um cadinho de alumínio fechado. Foram analisados o OBM (massa inicial de 14,6 mg) e o Gen-Ox orgânico medular (massa inicial de 10,30 mg), pois esta técnica permite avaliar exclusivamente polímeros, analisando o conteúdo de proteína (colágeno tipo I).

4.2.4. Determinação da porosidade e tamanho de poros

O método utilizado para a determinação da porosidade e tamanho de poros do OBM foi a intrusão de mercúrio em material poroso sob pressão utilizando o

Porosizer 9320 da Micromeritics, com pressão máxima de 30.000 psi, com faixa de tamanho de poros de 0,006 a 360 micrômetro.

4.2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi MEV-Leica, modelo MEV-Stereoscan 440 acoplado à sonda de EDS. A metalização das amostras foi realizada com ouro, em um equipamento tipo sputter SCD50, da Balzers. A voltagem utilizada nas análises encontra-se na tarja das micrografias. Também foi realizada a microscopia eletrônica de varredura com contraste de número atômico (retroespalhamento). O contraste de elétrons retroespalhados é usado na identificação de fases com composições químicas diferentes, sendo dependente do número atômico dos espécimes envolvidos.

4.2.6. Difração de raio-X e cristalinidade

O uso de várias técnicas de difração de Rx está relacionado à emissão de um feixe de raio-x paralelo ao espécime e a reflexão do feixe que incidiu o espécime (SOUTHWORTH⁹⁹, 1975). A difração de raio-x pode indicar a presença de diferentes fases na amostra, a pureza do material e o percentual de cristalinidade (LE GEROS et al.⁵³, 1995). Os materiais OBM, Gen-Ox inorgânico e o Bio-Oss foram analisados no difratômetro de raio -X (DRX- Miniflex, Rigaku, Tóquio, Jactam), operado em 30kV, 15mA e radiação de CuK α e os dados foram obtidos de 5-100°2 θ . Para a análise da cristalinidade utilizou-se a técnica de LANDI et al.⁵⁰, 2000. Inicialmente, a identificação da(s) fase(s) foi realizada com o auxílio de fichas ICDD (*International Center for Diffraction Data*). Estes testes foram realizados no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, UFRJ, dirigido pela Profa. Dra. Glória de Almeida Soares.

4.3. Avaliação da capacidade osteogênica *in vivo*

4.3.1. Grupos experimentais

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais desta Faculdade, protocolo n. 011/2003. Um total de 80 ratos (*Rattus norvegicus*), Wistar machos adultos (5 meses de idade e peso médio de 350g),

fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, foram usados no experimento. Esses animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 20, conforme o esquema abaixo:

TABELA 1: Distribuição dos grupos experimentais

<i>GRUPOS EXPERIMENTAIS</i>	<i>MATERIAIS DE PREENCHIMENTO</i>
Controle	Coágulo + membrana Gen –Derm®
I	Bio-Oss + membrana Gen –Derm®
II	Gen-Ox + membrana Gen –Derm®
III	OBM + membrana Gen –Derm®

Os ratos foram mantidos durante todo o período experimental em boas condições de alimentação, ciclo claro-escuro e higiene.

4.3.2. Preparo dos animais e procedimentos cirúrgicos de implantação

Sob anestesia geral intramuscular, com Anasedan (cloridrato de xilazina, Vetbrands) e Dopalen injetável (cloridrato de Quetamina, Vetbrands), foi realizada a tricotomia da região frontoparietal da cabeça de cada rato com auxílio de lâmina de barbear e a assepsia com álcool iodado. Uma incisão em formato de meia-lua (Figura 4 a), no tegumento que reveste a calota craniana foi feita com bisturi nº15 e os retalhos foram lateralmente levantados com descolador de *Molt* e cinzel de *Oshsenbein* nº1, expondo amplamente a cortical óssea da região. A seguir, com uma trefina cirúrgica de 9 mm de diâmetro externo (Dentoflex®) e irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, realizou-se uma perfuração na região frontoparietal transpassando toda espessura da díploe (Figura 4 d –e). Em seguida, o defeito foi preenchido com coágulo e recoberto com Gen-Derm (grupo controle) ou, nos grupos experimentais (Tabela 1), com um dos materiais e também recoberto com membrana (Figura 3 e Figura 4 i). Os retalhos, a seguir, foram recolocados em sua posição e suturados com linha de seda preta nº 3-0 (Ethicon, Johnson & Johnson). Todos os materiais de enxerto foram esterilizados previamente por radiação gama (25 Kgy).

Figura 3: Esquema demonstrando as estruturas no modelo experimental utilizado.

- A) Grupo controle, defeito preenchido com coágulo e recoberto com membrana e; B) Grupo experimental, defeito preenchido com biomaterial (grupos I, II e III) e recoberto com membrana.

4.3.3. Coleta das peças

Em cada grupo, sub-grupos de 5 ratos foram sacrificados ao término de 1, 3, 6 e 9 meses após as cirurgias por dose excessiva de anestésico. Em seguida, com auxílio de uma serra elétrica, foram coletadas as calotas cranianas com a pele sobreposta e imediatamente submersas em formol 10% tamponado¹, onde permaneceram durante uma semana.

4.3.4. Acompanhamento radiográfico

Após a fixação das peças, as calotas cranianas foram radiografadas utilizando placas ópticas e os seguintes parâmetros: 70 kVp, 10 mAs, distância foco-filme de 40 cm e tempo de exposição de 0,26s. As imagens digitalizadas foram avaliadas no sistema Digora (Soredex Orion Corporation) para acompanhamento dos animais, e verificar o posicionamento do material no defeito e a evolução do reparo.

¹ **Formol 10% Tamponado**

Formaldeído 40%	10 ml
Tampão Fosfato de Sódio*, pH 7,0	90 ml

Figura 4: Procedimentos cirúrgicos

a) incisão do tegumento de revestimento; b) descolamento e levantamento do periósteo e do retalho; c) defeito realizado com a trefina; d-f) retirada da tábua óssea com exposição da dura-máter; g-h) implantação da matriz óssea bovina inorgânica e, i) recobrimento com a membrana de cortical óssea bovina.

4.3.5. Procedimento histotécnico

As peças foram desmineralizadas em solução de EDTA pH 7,2 (solução contendo 4,13% de Titriplex III *Merck*® e 0,44% de hidróxido de sódio), por um período aproximado de dois meses com trocas semanais da solução. Em seguida, as peças foram submetidas ao procedimento histotécnico padrão do laboratório de Histologia da FOB/USP: desidratação em etanol, diafanização em xilol, inclusão em Histosec (parafina + resina sintética fundida), cortes semi-seriados de 5µm de espessura, no sentido laterolateral obtidos em micrótomo Jung-Leica RM2045 e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (LUNA⁵⁷, 1968).

4.3.6. Análise microscópica

Os cortes histológicos foram examinados em um microscópio binocular Axioskop 2 (Carl Zeiss), avaliando-se descritivamente a neoformação óssea, as células presentes no infiltrado inflamatório, a angiogênese, a presença de fibrose e a capacidade osteocondutora do material. As fotomicrografias foram obtidas em um fotomicroscópio Axioskop (Zeiss) contendo câmera fotográfica e software MC200 chip.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1. Caracterização físico-química do OBM

5.1.1. Termogravimetria

Nesta análise comparou-se o perfil termogravimétrico do Gen-Ox Inorgânico, Orgânico e OBM (Figura 5 A, B e C, respectivamente), no qual podemos observar a perda de massa dos materiais em função do aumento da temperatura. O osso bovino medular inorgânico apresentou (Figura 5 A) perda de massa da ordem de 0,6776 % (0,1212mg) entre a temperatura inicial e 384°C, sugestiva de perda de composto(s) orgânico(s). Entretanto, em 665 °C inicia-se outra perda de massa que prossegue até o final do experimento (950 °C). Analisando exclusivamente a curva TG é difícil determinar o fator associado a esta perda de massa. O perfil termogravimétrico do Gen-Ox orgânico (Figura 5 B) revela perda de massa da ordem de 8,96% até 155 °C, que se intensifica fortemente (63,59%) entre 186 – 695 °C. Nova perda se inicia a 760 °C e se estende até a temperatura final de 950 °C, apresentando um resíduo final de 20,66%, provavelmente material inorgânico estável até 950 °C. A análise termogravimétrica do OBM (Figura 5 C) permite verificar a primeira perda de massa entre temperatura inicial e 161 °C (4,92%) possivelmente devido à saída de água. Entre 195 e 501 °C 14,70% da massa, possivelmente compostos orgânicos de massa molar mais elevada, é perdida. A terceira perda ocorre entre 510 e 909 °C (6,64%). Ao final restam 73,74% de material (provavelmente inorgânico) estável até 950 °C.

5.1.2. Espectroscopia de Infravermelho

A Figura 6 (A-C) exibe os espectros de infravermelho por refletância difusa do Gen-Ox inorgânico, orgânico e OBM, respectivamente. Nas tabelas 2 e 3 estão resumidos os grupamentos químicos, em função do número de onda, característicos de hidroxiapatita e colágeno, respectivamente.

O espectro de infravermelho para o Gen-Ox inorgânico (Figura 6 A) apresenta os grupamentos químicos característicos da HA bem resolvidos (número de onda de 600 a 1100 cm⁻¹), ou seja, os picos estão bem definidos. Por outro lado, o espectro do Gen-Ox orgânico (Figura 6 B) apresenta perfil pouco resolvido, com as

bandas bastante alargadas nas posições correspondentes ao colágeno (número de onda de 1658 cm^{-1} , 1552 cm^{-1} , 1235 cm^{-1} , 1450 cm^{-1}). A espectroscopia do OBM (Figura 6 C) evidenciou picos de grupamentos químicos característicos da hidroxiapatita como os íons fosfatos (número de onda de 600 a 1100 cm^{-1}) e de colágeno como a deformação axial da ligação C=O (número de onda de 1658 cm^{-1}) e deformação angular da ligação N-H (número de onda de 1552 cm^{-1}). Quanto às moléculas de água estruturais ou adsorvidas (número de onda de 3400 cm^{-1}), observou-se nesta análise, em ordem decrescente, maior quantidade no material orgânico, misto e inorgânico.

No espectro de infravermelho do Gen-Ox inorgânico bandas em torno de: 3571 cm^{-1} indicam a presença do estiramento da ligação O-H estrutural; bandas em 1172 , 1088 , 1025 e 963 cm^{-1} indicam a presença dos grupos PO_4^{3-} .

A presença de uma banda larga em torno de 3360 cm^{-1} e outra banda de média intensidade em 1653 cm^{-1} apontam a presença de água adsorvida no Gen-Ox orgânico e OBM, mas não no material inorgânico onde essas bandas são muito discretas. A existência de uma banda em 873 cm^{-1} e de duas bandas em 1425 e 1452 cm^{-1} deve-se à presença do grupo $(\text{CO}_3)^{2-}$ substituindo o sítio dos grupos $(\text{PO}_4)^{3-}$, característicos da hidroxiapatita carbonatada do tipo B, as quais estão presentes no OBM, mas não detectáveis no Gen-Ox orgânico ou inorgânico (ELLIOT³², 1994). De acordo com TADIC et al.¹¹⁰ (2002), informações sobre cristalinidade do material podem ser obtidas pelo espectro de infravermelho, esta pode ser vista especialmente pelas bandas que se localizam nas regiões $590\text{-}610\text{ cm}^{-1}$ e 1000 cm^{-1} . Ao contrário do Gen-Ox inorgânico, o OBM possui bandas largas e mal definidas nestas regiões indicando baixa cristalinidade do material.

Os espectros para o Gen-Ox orgânico e o OBM apresentam bandas características de uma proteína: em torno de $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ indicando o estiramento de uma carbonila; em 1560 cm^{-1} é associada a vibrações da amida II no plano da ligação N-H; em 1450 cm^{-1} indicando a presença dos anéis pirrolidínicos da prolina e hidroxiprolina, e a banda próxima a 3400 cm^{-1} devido ao estiramento O-H (BET et al.⁸, 2001; TONHI & PLEPIS¹¹⁶, 2002).

TABELA 2: Identificação dos possíveis grupamentos químicos presentes em hidroxiapatita, em função do número de onda (Ogawa & Plepis⁷³, 2001).

Banda	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupamento químico característico
1	3400	Moléculas de água estruturais ou adsorvidas
2	3560	Íons OH ⁻ estruturais
3	600 e 1100	Íons fostatos
4	870	Íons OH ⁻ da ligação P-OH

TABELA 3: Identificação dos possíveis grupamentos químicos presentes em colágeno, em função do número de onda (Ogawa & Plepis⁷³, 2001).

Banda	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupamento químico característico
1	1658 e 1552	<ul style="list-style-type: none">• 1658- deformação axial da ligação C=O• 1552- deformação angular da ligação N-H Ambas referentes às bandas de amidas I e II
2	1235 e 1450	<ul style="list-style-type: none">• 12535- amida III• 1450- ligação C-H do anel pirrolidínico

Figura 5: Perfil Termogravimétrico

A) Gen-Ox Inorgânico, massa inicial de 17,88 mg; B) Gen-Ox Orgânico, massa inicial média de 10,2 mg (duplicata) e, C) OBM, massa inicial de 19,95 mg.

Figura 6: Espectros no Infravermelho.

A) Gen-Ox Inorgânico; B) Gen-Ox Orgânico, C) OBM. Massas iniciais de 1,8 mg para 180 mg de KBr (0,1%).

5.1.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica que permite determinar a transição térmica de polímeros, ou seja, permite avaliar as alterações que ocorrem no polímero quando aquecido. Como exemplos temos a fusão de um polímero cristalino e a transição vítrea. A DSC permite calcular a capacidade térmica do polímero, sua temperatura de cristalinização (T_c) e de fusão (T_m), as quais são específicas para polímeros puros. Compostos inorgânicos não apresentam variação no fluxo de calor em função da temperatura. A DSC pode nos informar o grau de cristalinidade e quanto há de material amorfo na amostra de polímero. No caso específico de proteínas a DSC pode nos informar, através do pico endotérmico do termograma, a temperatura de desnaturação (T_d) da proteína.

O termograma para o Gen-Ox orgânico (Figura 7 A), constituído principalmente de colágeno, apresenta três temperaturas de transição, 43,4; 128,8 e 180,3 °C, enquanto para o OBM (Figura 7 B) apenas duas, 45,6 e 152,9 °C, foram observadas.

Figura 7: Termograma Endotérmico da Calorimetria Exploratória Diferencial.

A) Gen-Ox Orgânico (10,3 de massa inicial) e, B) OBM (14,6 de massa inicial). As amostras foram submetidas a uma rampa de aquecimento de -20 a 250 °C com uma taxa de 5°C/minuto.

5.1.4. Difração de Rx e Cristalinidade

A Figura 8 apresenta os difratogramas de Rx das amostras de Gen-Ox inorgânico, Bio-Oss e OBM. Os espectros obtidos apresentaram os picos principais referentes à HA sintética (JCPDS-ICDD² cartão 9-432, 1992), podendo destacar a presença dos picos nas intensidades de 100 % correspondente ao $2\theta = 32$, 60% ao $2\theta = 33$ e 40% ao $2\theta = 26$.

Os padrões de difração de Rx das diferentes amostras foram refinados para a determinação do índice de cristalinidade (LANDI et al.⁵¹, 2000) que resultaram nos valores de cristalinidade de 96%, 40% e 11% para o Gen-Ox Inorgânico, Bio-Oss e OBM, respectivamente Figura 8 A, B e C.

5.1.5. Determinação da porosidade e tamanho de poros

O diâmetro médio de poros do OBM foi de 78,21 μ m com uma porosidade da ordem de 52,57%.

5.1.6. Microscopia eletrônica de varredura

Pela análise por Microscopia eletrônica de varredura do OBM, observou-se uma distribuição bimodal de tamanhos de poros nas partículas de osso. Os poros maiores têm um tamanho que gira ao redor de 10-20 μ m, enquanto que os menores situam-se ao redor de 0,1 a 1 μ m (Figura 9). A análise das micrografias permite identificar partículas da ordem de 50 a 100 μ m sem a existência de concavidades, indicando que o processo de fabricação do material, a partir do osso medular, as destruiu.

As características superficiais dos materiais podem ser observadas na Figura 10. O Bio-Oss apresenta partículas regulares recobertas por nanopartículas (Figura 10 A 4) e, ainda, canalículos e sulcos possivelmente relacionados ao osteócitos e seus prolongamentos (Figura 10 A 2 e A 3), aparentemente seguindo a direção de linhas

² JCPDS-ICDD: Joint Committee on Powder Diffraction-International Center for Diffraction Data (JCPDS-ICDD, também conhecido como ICDD).

de força. Os poros observados eram da ordem de 150-200 micrômetros (Figura 10 A-destaque).

No Gen-Ox orgânico (Figura 10 B), observamos partículas irregulares, porém com uma superfície mais uniforme. Os poros deste biomaterial são da ordem de 90 micrômetros (Figura 10 B1-destaque). Da mesma forma, o Gen-Ox inorgânico (Figura 10 C) mostra-se poroso (Figura 10 C 1 e 2), mas com a superfície recoberta com nanopartículas que, em maior aumento, indicam fusão dos cristais de hidroxiapatita (Figura 10 C 3 e 4). As partículas do OBM eram de tamanho bastante variado (Figura 10 D 1) com aspecto irregular contendo concavidades (Figura 10 D 2) e área de fraturas (Figura 10 D 3), possivelmente decorrentes da moagem do material. A superfície em maior aumento (Figura 10 D 4), em oposição ao Bio-Oss, não apresenta sulcos ou canais em sua superfície.

A análise com EDS, acoplada ao MEV, permitiu identificar os elementos químicos presentes nas amostras Bio-Oss, Gen-Ox Inorgânico e OBM (Figura 11 A, B e C, respectivamente). Em todos os materiais o ouro (Au) foi identificado, pois foi utilizado na metalização das amostras. Sódio (Na) e magnésio (Mg), utilizados na preparação de tampões foram identificados, bem como cálcio (Ca), fósforo (P), carbono (C) e oxigênio (O).

O espectro de EDS do Gen-ox orgânico (Figura 12 A) revelou a presença de carbono, hidrogênio, oxigênio, sódio, alumínio, ouro, fósforo e cálcio. A técnica de retro-espalhamento indicou a presença de elementos de maior número atômico (área mais brilhante, Figura 12 B), os quais foram identificados como alumínio (Al), fósforo (P) e cálcio (Ca), utilizando a técnica de mapeamento elemental (Figura 12 C, D e E, respectivamente).

A superfície da Gen-Derm observada por meio da MEV evidenciou uma superfície regular com poros de diferentes tamanhos sugestivos de canais de Harvers e Volkman (Figura 13 A). Utilizando o retro-espalhamento evidenciamos partículas de átomos de elevado peso atômico (Figura 13 B e C – setas vermelhas) que pelo mapeamento elemental revelou tratar-se de estruturas contendo cálcio (Figura 13 D – seta preta). Esta observação foi confirmada no MEV (Figura 13 E) pelo EDS que comparou o conteúdo na região da membrana (E1) e da partícula (E2), sendo que o cálcio foi detectado exclusivamente na região E2 (Figura 13 F e G).

Figura 8: Difrátogramas de Rx.

A) Gen-Ox Inorgânico; B) Bio-Oss e; C) OBM. O difratômetro de Raios -X operou em 30kV, 15mA e radiação de $\text{CuK}\alpha$. Os dados foram obtidos de 5-100° 2θ .

Figura 9: Fotomicrografias eletrônicas de varredura do OBM.

A) aumento de 800x; B) aumento de 1500x; C) aumento de 5.000x e D) aumento de 10.000x.

Figura 10: Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos biomateriais utilizados em diferentes aumentos.

A) Bio-Oss; B) Gen-Ox Orgânico; C) Gen-Ox Inorgânico e, D) OBM.

Figura 11: Espectros de EDS

A) Bio-Oss; B) Gen-Ox Inorgânico e, C) OBM. À saber: (C) carbono; (O) oxigênio; (Mg) magnésio; (Au) ouro; (P) fósforo; (Ca) cálcio e (Na) sódio.

Figura 12: Análise da superfície do Gen-Ox Orgânico com sonda EDS associada ao MEV.

A) Espectro de EDS; B) MEV com retro espalhamento; C-E) mapeamento elemental para alumínio, fósforo e cálcio, respectivamente.

Figura 13: Análise da superfície de Gen-Derm com sonda EDS associada ao MEV.

A) Fotomicrografia eletrônica de varredura; B-C) MEV com retro espalhamento; D) mapeamento elemental do cálcio; E) fotomicrografia eletrônica de varredura; F) espectro de EDS para a região E1 e, G) espectro de EDS para a região E2. Voltagem: 15.00; Magnification: 6000.

5.2. Análise *in vivo*

A descrição dos resultados será dividida em função dos grupos controle e experimentais, detalhando os resultados radiográficos e histológicos em função dos períodos analisados.

5.2.1. Acompanhamento Radiográfico

O acompanhamento radiográfico do processo de reparo dos defeitos nos animais ao longo dos períodos experimentais mostrou que não houve a oclusão do defeito por neoformação de tecido ósseo em nenhum dos grupos estudados. No grupo controle, há imagens sugestivas de formação de tecido mineralizado a partir da borda do defeito nos períodos de 6 e 9 meses (Figura 14 A- setas vermelhas). No grupo Bio-Oss (Figura 14 B) observa-se com nitidez as granulações radiodensas referentes aos grânulos do biomaterial. Os grânulos radiodensos referentes ao Gen-Ox inorgânico (Figura 14 C) também são observados até os 3 meses, e nos períodos subsequentes as granulações tornam-se pouco definidas, maiores e formando aglomerados (Figura 14 C - setas vermelhas). No grupo OBM, observamos que os grânulos tornam menos definidos aos 9 meses (Figura 14 D).

Figura 14: Imagens radiográficas digitais divididas de acordo com os períodos experimentais.

A) Coágulo - as setas vermelhas mostram imagens sugestivas de tecido mineralizado na borda do defeito; B) Bio-Oss; C) Gen-Ox Inorgânico - as setas vermelhas mostram as granulações do biomaterial pouco definidas, maiores, formando aglomerados e, D) OBM.

5.2.2. Análise Histológica

A análise histológica das peças nos vários grupos experimentais mostrou que os defeitos não foram preenchidos completamente por tecido ósseo em nenhum dos tratamentos nos diferentes períodos.

Assim, o grupo controle apresentou a área do defeito preenchida por um tecido conjuntivo fibroso com diferentes graus de celularidade e fibrosamento em função dos períodos experimentais (Figura 15). O tecido fibroso não continha células inflamatórias e o fibrosamento foi mais evidente na região central e nos períodos mais tardios (Figura 15 F). Para o grupo Bio-Oss, o defeito estava preenchido por um tecido conjuntivo fibroso rico em células e sem reação inflamatória evidente, preenchendo os espaços entre as partículas (Figura 16 B). No decorrer dos períodos experimentais, o grau de fibrosamento aumentou principalmente ao redor das partículas, estabelecendo uma interface com o osso neoformado (Figura 16 C, D e F). Para o grupo com defeito ósseo preenchido por Gen-Ox inorgânico, entre as partículas havia um tecido conjuntivo denso ricamente celularizado e vascularizado, com ausência de reação inflamatória (Figura 17: B). Ao longo dos períodos, próximo a borda do defeito, ocorreu o envolvimento das partículas por células conjuntivas e a invaginação de tecido por entre os poros do biomaterial (Figura 17 D e F). Células ósseas se diferenciaram nas superfícies das partículas de Gen-Ox promovendo a neoformação óssea e a incorporação das partículas no seu interior. O tecido ósseo foi depositado em íntimo contato com a superfície do material (Figura 17 C e F). No grupo OBM observamos na região do defeito as partículas envoltas por tecido conjuntivo fibroso com diferentes graus de celularidade em função do período experimental (Figura 18 A). No período de 1 mês, ocorreu reação inflamatória entre as partículas (Figura 18 A), mas ao longo dos períodos experimentais, transformou-se em tecido conjuntivo fibroso (Figura 18 D). As partículas perto da borda do defeito, na sua maioria, foram englobadas pelo tecido ósseo neoformado (Figura 18 B). Entretanto, na região central, as partículas encontravam-se isoladas uma das outras por tecido conjuntivo fibroso (Figura 18 F).

Um fato comum em todos os grupos e para todos os períodos, foi a ausência da membrana em nenhum dos espécimes, indicando a sua reabsorção completa antes de 1 mês pós cirurgia (Figuras 15, 16, 17 e 18).

Em relação à osteogênese, todos os grupos apresentaram uma neoformação óssea a partir da borda do defeito (Figura 15, 16, 17 e 18). No grupo coágulo, a osteogênese apresentou-se discreta (Figura 15 A, B e C) e mesmo nos períodos mais tardios não se observou a presença de tecido mineralizado no centro da lesão, mas somente de tecido conjuntivo fibroso (Figura 15 E e F). Para o grupo Bio-Oss, além dessa neoformação óssea na borda (Figura 16 A), observamos a formação de pequenas ilhotas ósseas na região central do defeito no período de 9 meses (Figura 16 E). O mesmo ocorreu para o grupo preenchido com Gen-Ox, entretanto, a quantidade de tecido ósseo neoformado na borda em íntimo contato com as partículas e de ilhotas ósseas na região central, a partir dos 6 meses era subjetivamente maior (Figura 17 A, E e F). Para o OBM, havia poucas ilhotas ósseas na região central (Figura 18 E)

Quanto a angiogênese, observamos um comportamento similar para todos os grupos, ou seja, houve uma angiogênese mais exuberante no período inicial, porém ao longo do tempo, os vasos se concentraram próximos à região do osso neoformado (Figura 15 D, 16 F e 17 F)

Figura 15: Grupo controle.

A) 1 mês: borda da lesão (4x, linha pontilhada) exibindo discreta formação óssea (o) e tecido conjuntivo fibroso no espaço do defeito com intensa angiogênese (destaque 40x, seta vermelha), notar a ausência da membrana (*); B) 3 meses: borda da lesão (linha pontilhada), 10x; C - E) 6 meses: neoformação óssea (o) discreta na borda do defeito C): 4x), recoberta por tecido conjuntivo denso (TC) rico em células e vasos D): seta vermelha, 40x), mas pouco celularizado e densamente fibroso (seta) quando distante da borda óssea (E): 100x); F) 9 meses: intensa fibrose (seta) na região central, 40x. Hematoxilina/Eosina.

Figura 16: Grupo tratado com Bio-Oss.

- A) 1 mês: borda da lesão (linha pontilhada) exibindo discreta formação óssea (o) e as partículas do biomaterial (espaços assinalados com um ponto), 4x; B) 1 mês: borda da lesão e ausência de membrana (*), 10x; C) 3 meses: fibrosamento (seta dupla) ao redor das partículas, 40x; D) 6 meses: interface de fibrosamento entre a partícula e osso neoformado (ON) borda do defeito (seta dupla); E) 9 meses: ilhotas de osso neoformado na região central, 10x; F) 9 meses: detalhe do tecido fibroso (seta dupla) envolvendo as partículas (ponto), 100x. Hematoxilina/Eosina.

Figura 17: Grupo tratado com Gen-Ox.

- A) 1 mês: borda da lesão (linha pontilhada) exibindo formação óssea (o), as partículas do biomaterial (ponto) e ausência da membrana (*), 4x; B) 1 mês: osteogênese (o) na superfície e no interior de uma partícula, 10x; C) 1 mês: osso neoformado (ON) na superfície de uma partícula (ponto) exibindo osteócitos (Oc) e osteoblastos (Ob), 100x; D) 3 meses: osso neoformado (ON) na superfície de partículas (pontos) e invaginação (seta) do tecido para o interior de uma partícula, 40x; E) 6 meses: intensa neoformação óssea (ON) cortical na região epidural próxima da borda do defeito e ao redor de várias partículas (ponto) e íntimo contato com a superfície do material, 10x e; F) 9 meses: partículas do biomaterial incorporadas ao osso neoformado em íntimo contato com o tecido ósseo, 40x. Hematoxilina/Eosina

Figura 18: Grupo tratado com OBM.

A) 1 mês: borda da lesão (linha pontilhada) exibindo formação óssea (o) a partir da borda do defeito, as partículas do biomaterial (ponto) e ausência da membrana (*), 4x; B) 3 meses: partícula do biomaterial (ponto) perto da borda circundada de osso neoformado (ON), 40x; C) 6 meses: partículas na região central envoltas por tecido conjuntivo fibroso (setas), 10x; D) 9 meses: discreta osteogênese (o) na borda do defeito, 4x; E) 9 meses: uma ilha de osso neoformado (ON) na região central, 10x e; F) 9 meses: partícula circundada por tecido conjuntivo fibroso (TF), 100x. Hematoxilina/Eosina.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A reparação de extensos defeitos ósseos é, ainda, um dos maiores desafios para a área de cirurgia bucomaxilofacial. Deste modo, é de grande importância o aprimoramento de meios que auxiliem o organismo na regeneração óssea no local. A terapia cirúrgica utilizando biomateriais de preenchimento e membranas é um dos procedimentos que têm proporcionado resultados satisfatórios na regeneração óssea em alguns tipos de defeitos (CAMELO et al.²⁰, 2001). Apesar do grande número de biomateriais osteossubstitutos disponíveis no mercado, o biomaterial ideal, aliando simultaneamente propriedades mecânicas e biológicas que favoreça o reparo, ainda não foi produzido. Em particular, o material OBM aqui testado, é produzido a partir de tecido ósseo esponjoso de ossos longos, por tratamento com solventes, agentes caotrópicos e peróxidos, porém sem a remoção da matriz mineral e da estrutura colagênica. Visando aumentar a resistência mecânica do biomaterial sem alterar a biocompatibilidade.

O objetivo do presente estudo foi avaliar as características físico-químicas do OBM e analisar comparativamente as suas presumíveis propriedades osteocondutoras em relação a outros implantes xenogênicos inorgânicos. A hipótese positiva testada é que o OBM é biocompatível, absorvível e osteocondutor.

6.1. Características físico-químicas dos biomateriais

A caracterização físico-química objetivou determinar os constituintes do OBM comparativamente aos materiais com elevado conteúdo de HA (Gen-Ox inorgânico e Bio-Oss) e de colágeno (Gen-Ox orgânico).

A termogravimetria permite avaliar a perda de massa da amostra em função de seu aquecimento. É notória a presença de fase orgânica significativa no Gen-Ox orgânico (80%) contra 20% no OBM e 0,7% no Gen-Ox inorgânico. Estes dados sugerem que, possivelmente, ainda existam resíduos minerais no Gen-Ox orgânico em oposição ao inorgânico, este último processado a 950-1000 °C, e praticamente livre de material orgânico. O conteúdo protéico no OBM é similar ao do osso natural (20-25%) (TADIC & EPPLÉ¹⁰⁹, 2004; SENA⁹², 2004), sendo inclusive deficiente em cálcio (HA carbonatada tipo B). Chama-se hidroxiapatita carbonatada do tipo A

(CHA-tipo A) a apatita cujo íon carbonato substitui o íon hidroxila (OH^- , sítio monovalente) e hidroxiapatita carbonatada do tipo B (CHA-tipo B) a apatita cujo íon carbonato substitui o íon fostato (PO_4) $_3^-$, sítio trivalente. Os espectros de infravermelho e os difratogramas indicam a presença de cristais de baixa cristalinidade (ELLIOT³¹, 1994; LE GEROS et al.⁵², 1995). Além disso, a razão de intensidade relativa das bandas 1240 e 1450 cm^{-1} próxima a 1, em ambos materiais é, segundo SYLVESTER et al.¹⁰⁷ (1989), indicativo da preservação da estrutura secundária em tripla hélice da molécula de tropocolágeno.

A curva termogravimétrica clássica para o osso natural (p. ex., Tutoplast[®] humano), um material obtido de forma semelhante ao OBM, apresenta 3 estágios de perda de massa que podem ser associados a estágios específicos (TADIC & EPPL¹⁰⁹, 2004; LE GEROS⁵¹, 1991). Da temperatura ambiente a cerca de 200 °C a água incorporada é perdida. Acima de 300 °C a matéria orgânica, como colágeno, gordura, proteínas, iniciam a queima. Ao redor de 400 °C, somente a fase mineral (fosfato de cálcio) está presente. Existindo hidroxiapatita carbonatada, ocorre perda de massa entre 400 e 950 °C (PETERS et al.⁷⁵, 2000; SUCHANEK et al.¹⁰⁵, 2002; SENA⁹², 2004). É importante ressaltar que todas as apatitas biológicas são apatitas carbonatadas (DOROZHUKIN & EPPL²⁹, 2002), como é o caso do OBM. Estudo recente demonstrou que o Bio-Oss contém uma pequena porção de água, mas o material combustível não foi detectável. Os materiais que ainda contém toda ou a maioria da matriz óssea orgânica (Kiel Bone, osso natural e Tutoplast[®]) tem uma composição similar contendo uma porção de água (6-10 %), material orgânico (20-50%) e hidroxiapatita carbonatada como fase mineral (TADIC & EPPL¹⁰⁹, 2004). Faixas semelhantes foram observadas para o OBM (Figura 5C) exceto pelo menor conteúdo de água (5%) e matéria orgânica (15%), mas maior conteúdo de carbonato (6,6%).

Como esperado para apatitas calcinadas (temperatura de tratamento superior a 900 °C), o Gen-Ox inorgânico não apresentou perda de massa acima de 200 °C, exceto pela perda acima de 700 °C, a qual pode estar associada à saída de carbonato residual, não perdida durante o processo industrial, por exemplo a interrupção da calcinação antes que todo o carbonato tenha sido queimado. É importante destacar,

observando a Figura 5A que esta perda é praticamente desprezível, da ordem de 0,3% da amostra.

A termogravimetria nos permite concluir que o OBM é um material semelhante ao osso natural, enquanto o Gen-Ox inorgânico é uma hidroxiapatita calcinada com baixíssimo conteúdo de carbonato e o Gen-Ox orgânico contém, ainda, um resíduo mineral estável a 950 °C.

A análise espectral no infravermelho nos informou que o Gen-Ox inorgânico possui as bandas típicas da HA (ELLIOT³¹, 1994; LE GEROS et al.⁵², 1995; CONZ²³, 2003), enquanto o Gen-Ox orgânico apresentou as bandas compatíveis com o colágeno (BET et al.⁷, 2001; TONHI & PLEPIS¹¹⁵, 2002; SENA⁹², 2004). Em relação ao Bio-Oss (TADIC & EPPL¹⁰⁹, 2004), notamos que o Gen-Ox inorgânico não possui resíduo de água ou carbonato, obviamente devido ao processo de calcinação. Contudo, o Gen-Ox orgânico e o OBM apresentam as múltiplas bandas relacionadas ao conteúdo orgânico (colágeno) e água, porém o OBM apresenta, ainda, bandas referentes ao fosfato de cálcio e carbonato, concordando com os resultados de OGAWA & PLEPIS⁷³ (2001) e TADIC & EPPL¹⁰⁹ (2004).

De acordo com TADIC et al.¹⁰⁸ (2002) e CONZ²³ (2003), informações sobre cristalinidade do material podem ser obtidas pelo espectro de infravermelho, esta pode ser vista especialmente pelas bandas que se localizam nas regiões 590-610 cm⁻¹ e 1000 cm⁻¹. Ao contrário do Gen-Ox inorgânico, o OBM e o Bio-Oss (TADIC & EPPL¹⁰⁹, 2004) possuem bandas largas e mal definidas nestas regiões indicando baixa cristalinidade do material formado.

A análise dos resultados apresentados nos difratogramas do Gen-Ox inorgânico, Bio-Oss e OBM em relação ao padrão disponível no banco de dados ICDD (Ficha 9-432) permite concluir pela presença dos picos característicos da hidroxiapatita. Os difratogramas do OBM e Bio-Oss apresentam um perfil composto de bandas largas que pode estar associado a diferentes características do material: presença de cristais com dimensões nanométricas, presença de defeitos na estrutura e baixa cristalinidade do pó formado (ELLIOT³¹, 1994; LE GEROS et al.⁵², 1995; TADIC & EPPL¹⁰⁹, 2004). Não foram detectadas reflexões referentes a outras fases de fosfatos de cálcio. Através da técnica de LANDI et al.⁵⁰ (2000) mostrou-se que, realmente, a cristalinidade das diferentes hidroxiapatitas naturais é maior para o Gen-

Ox inorgânico, o que é coerente com a calcinação a que foi submetido (Figura. 8A) Não foi determinado o difratograma para o Gen-Ox orgânico, pois o colágeno não é uma matriz cristalina e, portanto, não apresenta um difratograma característico (OGAWA & PLEPIS⁷³, 2001). O difratograma do OBM é particularmente similar ao apresentado para outros biomateriais derivados de osso não submetido à desmineralização ou tratamento térmico (TADIC & EPPLÉ¹⁰⁹, 2004).

Uma vez que a cristalinidade é diretamente proporcional a temperatura de processamento do biomaterial, temos que a baixa cristalinidade do Bio-Oss é resultado da relativa menor temperatura de processamento (300°C) em comparação ao Gen-Ox, o qual é processado a 1000°C. O efeito da temperatura de processamento está associado à eliminação do conteúdo de carbonato presente no osso, o que só ocorre a temperaturas superiores a 400 °C (LE GEROS⁵¹, 1991; TADIC & EPPLÉ¹⁰⁹, 2004). O OBM apresenta cristalinidade ainda menor pelo fato de não ter sido submetido a qualquer tratamento térmico que pudesse remover parte de seu conteúdo orgânico e de carbonato.

É possível concluir que o conteúdo de matéria orgânica e carbonato, identificados pelas análises termogravimétrica, infravermelho e difração de Rx, proporcionam um biomaterial com menor cristalinidade e, por consequência, mais susceptível à degradação. De acordo com nossos resultados os biomateriais testados neste estudo poderiam ser agrupados na seguinte ordem crescente de cristalinidade: OBM, Bio-Oss e Gen-Ox inorgânico.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada para o OBM e Gen-Ox orgânico, posto que variações de energia não são observáveis, na faixa de temperatura estudada, para o Gen-Ox inorgânico. Como descrito anteriormente, notamos apenas a variação térmica pertinente à desnaturação do colágeno, ao redor de 40 °C (OGAWA & PLEPIS⁷³, 2001). A transição de fase observada a 128 e 159 °C para o Gen-Ox orgânico e OBM, respectivamente, pode estar associada à água presente nos materiais. Essa transição foi reportada por OGAWA & PLEPIS⁷³ (2001) a 100 °C para o colágeno nativo. A temperatura mais elevada observado em nosso estudo pode ser decorrente da presença de diferentes conteúdos minerais, cerca de 20% para o Gen-Ox orgânico e 70% para o OBM (Figura 5 C). A arquitetura de fosfato de cálcio retardaria essa transição. Estes resultados do DSC, em conjunto

com a espectroscopia no infravermelho, confirmam a presença de colágeno nas amostras de OBM e Gen-Ox orgânico.

A indução da osteogênese *in vivo* é diretamente dependente da capacidade osteocondutora dos materiais. O grau de microporosidade depende do método de compactação e da temperatura de sinterização de materiais sintéticos ou da utilização de materiais naturais cujos poros foram biologicamente desenhado. A presença de poros na superfície da hidroxiapatita aumenta a área de superfície do material de enxerto, favorecendo a osteocondução, permitindo um crescimento ósseo também no interior dos poros (WERNER et al.¹²³, 2002; ASHOK et al.⁴, 2002). Para ocorrer o crescimento ósseo no interior dos materiais de enxerto, os poros devem apresentar um diâmetro mínimo de 100µm (CAROTENUTO et al.²⁰, 1999; MISCH⁶⁶, 1999; TAMPIERI et al.¹¹⁰, 2001).

No presente trabalho avaliamos a porosidade do OBM utilizando a extrusão de mercúrio, onde observamos que o diâmetro médio dos poros é de 78,21 µm, enquanto que a porosidade do material é da ordem de 52,6%. É fundamental ressaltar que esta análise possui uma limitação importante a ser considerada, qual seja, somente é capaz de detectar poros menores que 250 µm. Assim, os poros maiores oriundos das trabéculas do osso esponjoso bovino não foram contabilizados.

A análise por MEV demonstrou que todos os outros materiais avaliados apresentaram poros, inclusive a Gen-Derm. É importante destacar que a utilização da sonda EDS confirmou a presença de cálcio residual nos materiais desmineralizados e a presença de alumínio na superfície do Gen-Ox orgânico que pode ser devido ao processamento do material.

6.2. Modelo experimental utilizado

Deve-se evidenciar que modelos animais têm sido utilizados, por várias décadas, em experimentos para testes de medicamentos, materiais cirúrgicos e técnicas de tratamentos. Usamos um modelo animal criado em condições laboratoriais totalmente padronizadas, seguindo condições éticas pré-estabelecidas. Entretanto, os resultados obtidos em modelo animais devem ser analisados com cautela, visto que não podem ser extrapolados diretamente para os humanos e deve-

se salientar que animais de laboratório de pequeno porte apresentam maior capacidade regenerativa óssea do que humanos.

Muitos fatores devem ser levados em consideração na avaliação de estudos *in vivo*, como a quantidade e qualidade de osso formado num defeito ósseo, pois são influenciadas pela espécie e o tipo de animal utilizado no experimento, sua idade, a estabilidade do defeito, localização anatômica do defeito, tipo de osso, presença ou ausência de periósteo e da dura-máter (TAGA¹¹², 2004). A espécie *Rattus norvegicus*, avaliada neste estudo, é muito utilizada em pesquisas e aceita na comunidade científica (BOHNING et al.⁹, 1999).

A região anatômica escolhida para a confecção do defeito foi à calvária. A utilização da calvária para a realização de defeito de tamanho crítico deveu-se a sua pobre vascularização e relativa deficiência de medula óssea com relação a outros ossos. Na díploe da calvária do rato a presença do osso esponjoso entre as corticais é muito discreta. Além disso, embriológica e morfologicamente, a calvária desenvolve-se por ossificação intramembranosa, à semelhança dos ossos membranosos da face. Anatomicamente a calvária consiste de duas tábuas corticais que delimitam a região medular central, semelhante ao osso alveolar. Segundo SCHMITZ & HOLLINGER⁹⁰ (1986) e DUPOIRIEUX et al.³⁰ (2001), devido às características acima citadas, a calvária é o local de eleição para testes de biomateriais e de estudo de regeneração óssea guiada.

Com relação ao defeito ósseo de tamanho crítico, SCHMITZ & HOLLINGER⁹⁰ (1986), definiram-no como um defeito cujas dimensões não permitem a regeneração espontânea do tecido ósseo durante o tempo de vida do animal, a não ser que algum tipo de material osteogênico, osteoindutor ou osteocondutor seja colocado dentro ou sobre este defeito. Tais defeitos, quando não tratados, são reparados por tecido conjuntivo fibroso, embora ocorra alguma neoformação óssea nas margens do defeito.

O defeito de tamanho crítico em calvária aqui usado, atendeu aos requisitos descritos por BOSCH et al.¹¹ (1998) para testes de regeneração óssea, ou seja: a) o tamanho mínimo do defeito ósseo experimental não deve ser menor do que o defeito crítico ósseo, individualizado para a espécie; b) o sítio de implantação deve incluir preferencialmente osso cortical e medular; c) o defeito deve ser estável; d) o risco de

fratura deve ser mínimo; e) o modelo animal deve permitir fácil acesso às análises radiográfica e histológica.

Contudo, na literatura há discordância quanto ao tamanho crítico dos defeitos em calvária de ratos. SANDBERG et al.⁸⁵ (1993); BOSCH et al.¹¹ (1998) e MARDAS et al.⁵⁸ (2002) consideraram crítico defeitos de 5 mm de diâmetro. Já para DUPOIRIEUX et al.³⁰ (2001) são defeitos de 6 mm e para DAHLIN et al.²⁶ (1991) defeitos de 8 mm.

A definição do tamanho de uma lesão crítica é fundamental, pois pode comprometer a avaliação pretendida. DUPOIRIEUX et al.³⁰ (2001) relataram que três diferentes tipos de membranas não apresentaram diferenças significativas quanto ao reparo ósseo. Salientamos que em virtude do tamanho do defeito não crítico usado nessa pesquisa, os resultados tornam-se questionáveis devido à similaridade dos materiais ou à capacidade de reparação espontânea do tecido.

Devido às estas considerações, na presente pesquisa usamos trefinas com 8mm de diâmetro interno, permitindo a confecção de um defeito final com 9mm de diâmetro.

Outro fator discutido na literatura é a localização de defeito na calvária. Optamos por realizar o defeito no centro da calvária por vários fatores, como: a não interferência da musculatura da orelha; a disponibilidade de grande área óssea e a grande facilidade para o manejo, realização do defeito e tomada radiográfica.

Apesar do acima exposto, convém salientar que existem pesquisadores que contra-indicam esta localização, devido ao risco de lesar durante a cirurgia a estrutura anatômica vascular existente abaixo da sutura sagital, e de introduzir o tecido conjuntivo proveniente da sutura na avaliação da regeneração óssea (BOSCH et al.¹¹,1998). Estes pesquisadores preconizam a realização de defeitos bilaterais em cada animal, o que permitiria uma análise pareada entre o defeito controle e o teste. De acordo com vários pesquisadores (DAHLIN et al.²⁶ (1991); KOSTOPOULOS & KARRING⁴⁹ (2000); MARDAS et al.⁵⁸ (2002)), contra-indicamos também esse procedimento porque defeitos bilaterais ficam muito próximos um do outro, podendo a reparação de um defeito interferir no defeito contralateral e até mesmo haver a intercomunicação entre os defeitos por reabsorção da fina parede divisória e,

conseqüentemente, a transformação em um único grande defeito, afetando os resultados do experimento.

O tipo de incisão usada na calvária é também um aspecto de discussão, já que deve: facilitar a visão do leito cirúrgico, gerar um retalho de fácil manejo, manter o periósteo íntegro, conter o material em experimentação no local e facilitar a sutura. Nos trabalhos de BOSCH et al.¹¹, (1998); BOHNING et al.⁹, (1999); DUPOIRIEUX et al.³⁰ (2001) foi utilizada a incisão sobre a sutura sagital. Contudo, acreditamos que esse tipo de incisão seja contra-indicado, uma vez que a coaptação do retalho e do periósteo, dividido no meio pela incisão, fica no meio do defeito fazendo com que os dois processos de cicatrização, o do tegumento e o do osso, fiquem sobrepostos, possibilitando a interferência entre ambos e o desvirtuamento do processo de regeneração óssea. Também pode ocorrer, neste tipo de incisão, que a sutura se realizada de forma inadequada, promova a deslocamento do material ou pode ocorrer ainda a deiscência, o que provocaria a exposição do material, com instalação de um processo infeccioso e, conseqüentemente, alteração no resultado final do reparo. (JOVANOVIĆ et al.⁴⁴ (1992); MURPHY⁶⁸ (1995); NOWZARI & SLOTS⁷¹ (1995); LEKOVIC et al.⁵³ (1998); WANG & CAROLL¹²¹ (2001)). Devido a estas considerações, optamos por realizar uma incisão em meia-lua (SCHLIEPHAKE et al.⁸⁹, 2004), deixando o retalho e o periósteo íntegro sobre o defeito, fazendo com que a sutura fique a uma distância segura, sem a possibilidade de deslocamento do material em experimentação.

As membranas foram utilizadas com formato igual à da incisão, sem ângulos nas bordas. As margens das membranas ficaram a uma distância de 2 a 3 mm além da borda do defeito, como preconizado na utilização de membranas para a osteopromoção (WANG & CAROLL¹²¹, 2001). Seu uso foi determinado em função dos princípios da regeneração óssea guiada, visando eliminar o risco de proliferação fibroblástica na área do defeito ósseo.

6.3. Análise microscópica da resposta biológica

É sabido que, para que haja crescimento de tecido ósseo, existe a necessidade de preenchimento do defeito com coágulo sanguíneo, permitindo o seu íntimo contato com tecido vivo das paredes do defeito e, conseqüentemente, com células

osteoprogenitoras e osteoblastos preservados (MURRAY et al.⁶⁹, 1957; MARKS & ODGREN⁵⁹, 2002). Este dado foi corroborado por observações de MELCHER & DREYER⁶⁴ (1964) em lesões penetrantes no fêmur de ratos protegidos por uma membrana não absorvível. Através destas informações, escolhemos o grupo coágulo recoberto com membrana como controle e, em todos os outros grupos experimentais, os biomateriais foram misturados ao sangue do próprio animal.

A análise dos resultados obtidos para o grupo controle, tanto radiográficos como histológicos, mostrou que não houve a completa reparação do defeito por tecido ósseo ao longo dos períodos experimentais. A formação óssea observada no grupo controle restringiu-se à borda da lesão. Microscopicamente, a quantidade de tecido ósseo foi pequena, restrita a borda do defeito, enquanto que o restante do defeito estava ocupado por tecido conjuntivo fibroso. Estes dados confirmam que o defeito ósseo criado era efetivamente de tamanho crítico, ideal para se avaliar a eficiência prática de biomateriais (BOSCH et al.¹¹, 1998).

Atualmente o enxerto ósseo mais utilizado na prática cirúrgica odontológica e médica é o osso autógeno que preenche o defeito proporcionando estabilidade, além de agir como um arcabouço para a neoformação óssea, sendo absorvido de maneira gradual e vascularizado à medida que novo osso é sintetizado (YOUNG et al.¹²⁶, 1999). Contudo, a dificuldade em se conseguir o osso suficiente e a morbidade causada por este procedimento estimulou a busca de novas alternativas (BAUER & MUSCHLER⁵, 2000; SERVICE⁹³, 2000; CARVALHO²¹, 2004).

O reparo ósseo envolve a quimiotaxia e adesão de células tronco à matriz óssea desmineralizada, seguida de proliferação de células osteoprogenitoras, diferenciação de condroblastos e osteoblastos e a formação de cartilagem, osso e medula óssea hematopoiética. É cada vez mais evidente que uma ampla variedade de proteínas regulatórias governa a biologia celular e molecular da osteogênese (SPORN & ROBERTS⁹⁹, 1989; HAUSCHKA et al.³⁶, 1986; REDDI⁷⁸, 1981; REDDI⁷⁹, 1984). Dentre essas proteínas destaque especial deve ser dado às proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), encontradas nos tecidos mineralizados e que são liberadas durante a reabsorção (URIST¹¹⁶, 1965; URIST et al.¹¹⁸, 1984; WOZNEY et al.¹²⁴, 1988), induzindo a formação de novo osso, tornando os fenômenos de reabsorção e aposição acoplados (RODAN⁸², 1991; RODAN⁸³, 1992).

O desenvolvimento de substitutos ósseos decorre da limitação em qualidade e quantidade de osso autógeno, impossibilidade de prever o grau de reabsorção do enxerto e à grande morbidade. Dentre os diversos materiais existentes e em estudo, xenoenxertos inorgânicos derivados do osso bovino, como o Bio-Oss e o Gen-Ox inorgânico, têm sido avaliados. Especificamente o Bio-Oss, mais extensivamente estudado, é tido como reabsorvível, pois não é sinterizado, e osteocondutor. Entretanto, diversos estudos refutam estas características (SKOGLUND et al.⁹⁷, 1997; STASSEN et al.¹⁰², 1994; MANDELKOW et al.⁵⁷, 1990). O Gen-Ox é uma hidroxiapatita natural sinterizada disponível em diversas formas, blocos ou grânulos, densos ou porosos, com propriedades osteocondutoras (BONACHELLA et al.¹⁰, 1992; HERCULANI et al.³⁷, 2000; KINA⁴⁸, 2002).

Os processos de desproteinização térmica do osso quase sempre resultam em materiais friáveis com baixa resistência mecânica, enquanto a desmineralização do osso resulta na estrutura de colágeno a qual é gelatinosa quando hidratada. Buscando melhorar as propriedades mecânicas, sem perder características como a biocompatibilidade e osteocondução, o osso natural livre de células, gordura e proteínas tem sido avaliado (TADIC & EPPLÉ¹⁰⁹, 2004).

A proposta deste estudo foi também comparar o efeito do OBM ao Bio-Oss e Gen-Ox inorgânico utilizando um modelo experimental que efetivamente demonstrasse a capacidade osteocondutora dos materiais (defeito crítico em crânio de ratos) sob condições comparáveis de reparo. Além disso, foram estudados os sinais de reabsorção e o destino dos implantes.

A análise radiográfica e microscópica da implantação do OBM, Bio-Oss e Gen-Ox inorgânico não evidenciou sinais de reabsorção das partículas, mesmo após 9 meses da implantação. Algumas células gigantes foram notadas, porém bordas pregueadas e lacunas de Howship não foram identificadas. A formação de novo osso em contato direto com a superfície da partícula ocorreu somente ao redor das partículas de Gen-Ox inorgânico próximos da borda dos defeitos. Frequentemente foi observada a presença de osteoblastos de recobrimento em contato com o tecido ósseo neoformado e o tecido conjuntivo reacional era livre de células inflamatórias. Em oposição a esse quadro, a avaliação histológica do OBM e Bio-Oss demonstrou intenso fibrosamento ao redor das partículas, cujo tecido conjuntivo fibroso era

vascularizado e rico em células, sem sinais de inflamação para o Bio-Oss. Ao redor das partículas de OBM o tecido conjuntivo fibroso continha diversas células inflamatórias mononucleares, bem como eosinófilos, ainda no período de 1 mês. Este quadro não foi observado nos períodos subsequentes. A formação óssea ao redor das partículas de Bio-Oss ocorreu apenas na interface da cápsula fibrosa e na região próxima à borda da lesão, o que não ocorreu nas fibras ao redor dos grânulos de OBM.

Os resultados observados para o Bio-Oss corroboram os relatos de YOUNG et al.¹²⁶ (1999) e INDOVINA & BLOCK⁴⁰ (2002), e este último identificou em alvéolos de cães, defeito muito favorável ao reparo, a presença de fibrosamento ao redor das partículas sem resposta inflamatória após 8 semanas, porém a formação óssea ocorreu entre as partículas envoltas por cápsula fibrosa.

SU-GWAN et al.¹⁰⁶ (2001) avaliaram o Bio-Oss, dentina e gesso Paris em defeitos críticos em crânio de ratos e observou formação óssea em contato com o Bio-Oss apenas na região próxima à borda. Embora não seja mencionado pelos autores, a observação das fotomicrografias disponíveis no artigo, indicou intenso fibrosamento na região mais afastada das bordas.

Em confronto direto com essas observações temos o relato de JENSEN et al.⁴³ (1996) que demonstraram uma intensa osseointegração do Bio-Oss. O modelo ósseo escolhido foi o defeito em tibia de coelhos, sendo implantados cilindros do material. Salientamos que neste tipo de defeito o aporte sanguíneo e a oferta de células osteoprogenitoras são maiores em relação ao crânio, o que poderia explicar a maior intensidade da osteogênese.

Nossos resultados mostraram de maneira bastante evidente que após 9 meses os materiais permanecem praticamente intactos no sítio de implantação, conflitando diretamente com o relato de SPECTOR¹⁰⁰ (1994).

O fechamento completo do defeito não ocorreu, provavelmente, pela proliferação fibroblástica e fibrosamento de parte da lesão. Isto pode ter ocorrido pela ineficácia da membrana utilizada em atuar como barreira. Essa incapacidade pode ter sido devido à espessura da membrana e à presença de partículas minerais em sua superfície como detectado no espectro de energia dispersiva (EDS) durante a análise por MEV. A presença do mineral pode ter estimulado a reabsorção da

membrana abreviando sua presença na interface do defeito e permitindo a proliferação de fibroblastos para o interior do defeito (URIST & STRATES¹¹⁷, 1970).

A análise por MEV indicou, ainda, significativa diferença na topografia dos materiais e, em particular, na presença de nanopartículas do material na superfície dos mesmos. Destacamos que na superfície do Bio-Oss e OBM essas nanopartículas apresentavam formato irregular e agregados de diferentes dimensões, enquanto que no Gen-Ox, devido à sinterização, estas nanopartículas assumiam aspecto vítreo e mais regular. É sabido que o tamanho da partícula, sua forma e a aspereza da superfície podem afetar a adesão e a proliferação celular sobre o material (BURG et al.¹⁵, 2000). O tamanho de partículas dos diferentes tipos de material para implante é fator importante para o sucesso do reparo ósseo. SHAPOFF et al.⁹⁴, 1980 e ZANER & YUKNA¹²⁷, 1984 preconizaram o uso de partículas menores que 0,5 mm para o tratamento de defeitos periodontais. Não há uma definição clara de qual tamanho de partícula é adequado para cada tecido ou condição clínica, uma vez que as características físico-químicas de cada material e do defeito ósseo também afetam a resposta tecidual ao implante. FUCINI et al.³², em 1993, não encontraram diferença estatisticamente significativa no tratamento de defeitos ósseos periodontais de pacientes utilizando DFDBA de diferentes tamanhos (250-500 e 850 -1000µm). Certamente, estudos padronizados serão ainda necessários para se estabelecer a correta relação entre o tamanho e características do material com o tipo e local do defeito ósseo.

Em nosso estudo foi possível identificar partículas de dimensões inferiores a 100 µm e ainda menores, podendo atuar com importante fator pró-inflamatório (SCHLIEPHAKE et al.⁸⁸, 1991). Estudos complementares serão necessários para se entender o real efeito destas características nas propriedades biológicas destes materiais.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A partir deste estudo, podemos concluir que:

- 1) O OBM é um material poroso e regular e apresenta frações orgânica (cerca de 15%, possivelmente colágeno) e inorgânica (cerca de 75%, possivelmente HA carbonatada de baixa cristalinidade);
- 2) Nenhum dos materiais testados foi capaz de induzir o fechamento completo da lesão de tamanho crítico.
- 3) O Gen-Ox inorgânico demonstrou a maior capacidade osteocondutora dentre os materiais testados.
- 4) O OBM e o Bio-Oss, no modelo experimental utilizado, não apresentaram propriedades osteocondutoras.
- 5) Nenhum dos materiais foi reabsorvido no período de 9 meses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas¹

- 1- AABOE, M. et al. **Healing of experimentally created defects; a review.** *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.*, v.33, n.5, p.312-8, oct., 1995
- 2- AABOE, M. et al. **Osseointegration of subperiosteal implants using bovine bone substitute and various membranes.** *Clin. Oral. Implants Res.*, v.11, n.1, p.51-8, feb, 2000.
- 3- ARTZI, Z. **Coronal ridge augmentation in the absence of bilateral bony plates around a pathologically denuded implant surface.** *Int. J. Periodon. Res. Dent.*, v.20, n.2, p.191-7, apr., 2000.
- 4- ASHOK, M. et al. **Crystallization of hydroxyapatite at physiological temperature.** *Materials letters*, v.77, p.2066-2070, 2002.
- 5- BAUER, T. W. & MUSCHLER, G. F. **Bone graft materials: an overview of the basic science.** *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.371, p.10-27, 2000.
- 6- BECKER, W. et al. **Bone formation at dehiscenced dental implant sites treated with implant augmentation material: a pilot study in dogs.** *Int. J. Period. Rest. Dent.*, v.10, n.2, p.92-101, 1990.
- 7 BECKER, W. et al. **Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports.** *J. Periodontol*, v.69, n.4, p.414-21, apr., 1998.
- 8- BET, M. R. et al. **Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagines and glutamine carboxyamine side chains.** *Biomacromolecules*, v.2, p.1074-9, 2001.
- 9- BLANK, B. S. & LEVY, A. R. **Combinated treatment of a large periodontal defect using GTR and DFDBA.** *Int. J. Period. Res. Dent.* v.19, n.5, p.481-7, oct., 1999.
- 10- BOHNING, B. P. et al. **The effect of guided tissue regeneration on the healing of osseous defects in rat calvaria.** *J. Endod.*, v.25, n.2, p.81-4, feb, 1999.

¹ Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento "Referências Bibliográficas: exemplos", emanados do Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

- 11- BONACHELLA, W. C. et al. **Manutenção do rebordo alveolar com hidroxiapatita microgranular.** *RGO*, v.40, n.3, p.212-4, 1992.
- 12- BOSCH, C. et al. **Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials.** *J. Craniofac. Surg.*, v.9, n.4, p. 310-6, July. 1998.
- 13- BOYNE, P. J. **Transplantation, implantation and grafts.** *Dent Clin North Am.*, v.15, n.2, p. 433-53, apr., 1971.
- 14- BRUNEL, G. et al. **Regeneration of rat calvarial defects using a biosorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking.** *J. Periodontol*, v. 67, n. 12, p.1342-8, dec., 1996.
- 15- BUNYARATAVEJ, P. & WANG, H.L. **Collagen membrane; a review.** *J. Periodontol.*, v.72, n.2, p.215-29, feb., 2001.
- 16- BURG, K. J. L. et al. **Biomaterials development for boen tissue engineering.** *Biomaterials*, v.21, p.2347-2359, 2000.
- 17- BURSTEIN, F. D. et al. **The use of porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction.** *Plast. Reconstr. Surg.*, v.100, n.4, p.869-74, 1997.
- 18- BUSER, D. et al. **Guided bone regeneration in implant dentistry.** Chicago, Quintessence Books, 1994.
- 19- CAMARGO, P. M. et al. **Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans.** *J. Periodontal. Res.*, v.37, n.4, p.300-6, aug, 2002.
- 20- CAMELO, M. et al. **Periodontal regeneration with an autogenous bone Bio-Oss composite graft and a Bio-Gide membrane.** *Int. J. Period. Rest. Dent.*, v.21, n.2, p.109-19, apr., 2001
- 21- CAROTENUTO, G. et al. **Macroporous hydroxyapatite as alloplastic material for dental applications.** *Journal of Materials Science: materials in medicine*, v.10, p.671-676, 1999.
- 22- CARVALHO, P. S. P et al. **Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais.** *Implant News*, v.1, n.3, maio/jun., 2004

- 23- CONCANNON, M. J. et al. **Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: a long-term study.** *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 99, n.7, p. 1983-8, 1997.
- 24- CONZ, M. B. **Caracterização in vitro de grânulos de hidroxiapatitas comerciais utilizadas em enxertos ósseos.** Rio de Janeiro, 2003. 94 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 25- DAHLIN, C. et al. **Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique.** *J. Neurosurg.*, v.74, n.3, p.487-91, Mar. 1991.
- 26- DAHLIN, C. et al. **Healing of bone defects by guided tissue regeneration.** *Plast. Reconstr. Surg.*, n.81, p.672-6, 1988.
- 27- DAHLIN, C. et al. **Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys.** *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg.*, v.24, n.1, p.13-19, 1990.
- 28- DE GROOT, K. **Bioceramics consisting of calcium phosphate salts.** *Biomaterials*, v.1, n.1, p.47-50, 1980
- 29- DEMPSTER, D. W. **New concepts in bone remodeling.** In: Seibel, M. J.; Robins, S. P.; Bilezikian, j. P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**, San Diego, Academic Press, cap.18, p.261-73, 1999.
- 30- DOROZHKIN, S. V. & EPPLE, M. **Biological and medical significance of calcium phosphates.** *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, v.41, p.3130-46, 2002.
- 31- DUPOIRIEUX, L. et al. **Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects.** *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.30, p.58-62, Feb. 2001.
- 32- ELLIOT, J. C. **Structure and chemistry of the apatite and other calcium orthophosphates.** 1st Edition, Amsterdam, Elsevier, 1994.
- 33- FUCINI, S. E. et al. **Small versus large particles of demineralized freeze-dried bone allografts in human intrabony periodontal defects.** *J. Periodontol.*, v.64, n.9, p.844-7, sept., 1993.

- 34- FUGAZZOTTO, P. A. & DE PAOLI, S. **Sinus floor augmentation at the time of maxillary molar extraction: success and failure rates of 137 implants in function for up to 3 years.** *J. Periodontol.*, v.73, n.1, p.39-44. jan., 2002.
- 35- GRANJEIRO, J. M. et al. **Hidroxiapatita para uso clínico.** *Rev. Gaúcha Odontol.*, v.40, n.2, p.130-4, mar./abr., 1992.
- 36- HAMMERLE, C. H. et al. **Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration.** *J. Oral. Maxill. Surg.*, v.53, n.2, p.167-74, fev, 1995.
- 37- HAUSCHKA, P. V. et al. **Growth factors in bone matrix** *J. Biol. Chem.*, v.261, p.12665-74, 1986.
- 38- HERCULANI, P. P. et al. **Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado.** *Rev. Bras. Implant.*, v.7, n.2, p.7-14, 2000.
- 39- HISLOP, W. S. et al. **A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery.** *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.31, p.149-53, 1993.
- 40- HOUSER, B. E. et al. **Clinical evaluation of anorganic bovine xenograft with a bioabsorbable collagen barrier in the treatment of molar furcation defects.** *Int. J. Period. Rest. Dent.*, v.21, n.2, p.161-9, 2001.
- 41- INDOVINA, A. Jr. & BLOCK, M. S. **Comparison of 3 bone substitutes in canine extraction sites.** *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.60, n.1, p.53-8, 2002.
- 42- ITO, K. et al. **Effects of bioabsorbable and non-resorbable barrier membranes on bone augmentation in rabbit calvaria.** *J. Periodontol.*, v.69, n.11, p.1229-37, nov., 1998.
- 43- JANUÁRIO, D. **Análise microscópica e radiográfica do implante intramuscular de osso medular misto processado pelo método P. U.** Projeto PIBIC/USP em desenvolvimento, 2003.
- 44- JENSEN, S. S. et al. **Tissue reactions and material characteristics of four bone substitutes.** *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.11, p.55-66,

- 1996.
- 45- JOVANOVIĆ, S. A. et al. **Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscence defect sites: a clinical study.** *Int. J. oral Maxillofac. Implants*, v.7, n.2, p.233-45, summer, 1992.
- 46- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 7ª Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1990.
- 47- KARSENTY, G. **The genetic transformation of bone biology.** *Genes Dev.*, v.13, n.23, p.3037-51, dec-1, 1999.
- 48- KELLERT, M. et al. **Guided tissue regeneration: an adjunct to endodontic surgery.** *J. Am. Dent. Assoc.* v.125, p.1229-33, sept., 1994.
- 49- KINA, J. R. **Estudo da biocompatibilidade de implante de osso cortical bovino inorgânico. Análise histológica e enzimática em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos do efeito do tamanho da partícula e da temperatura de desproteinização.** Araçatuba, 2002. 105p. Tese (Livre-Docência). Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista.
- 50- KOSTOPOULOS, L. & KARRING, T., **Regenerations of the sagittal suture by GTR and its impact on growth of the cranial vault.** *J. Craniofac. Surg.*, v.11, n.6, p.553-61, nov., 2000. Comentários em: *J. Craniofac. Surg.*, v.12, n.2, p.197-9, mar., 2001.
- 51- LANDI, E. et al. **Densification behavior and mechanisms of synthetic hydroxyapatite.** *Journal of the European Ceramic Society*, v.20, p.2377-87, 2000.
- 52- LE GEROS, R. Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine. Monographs in oral science.** v.15, Karger, 1991. 201p.
- 53- LE GEROS, R. Z. et al. **Calcium phosphate biomaterials: preparation, properties and biodegradations.** In: *Encyclopedic Handbook Of Biomaterials Anal*, vol 1, part A, Ed. Marcel, Dekka, N.Y., pp.1429-1463, 1995.
- 54- LEKOVIC, V. et al. **Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes.** *J. Periodontol.*, v.69, n.9, p.1044-9, sept, 1998.

- 55- LEVINE, J.P. et al. **Bone morphogenetic protein promotes vascularization and osteoinduction in preformed hydroxyapatite in the rabbit.** *Ann. Plast. Surg.*, v. 39, p. 158-68, 1997.
- 56- LINDE, A. et al. **Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique. An experimental study in rats.** *J. Oral. Maxil. Surg.*, v.51, n.8, p.892-7, aug., 1993.
- 57- LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of pathology.** 38 ed. New York, McGraw-Hill Book Company, p.36-8, 1968.
- 58- MANDELKOW, H. K. et al. **New bone formation following implantation of various hydroxyapatite ceramics. Animal experiment with bore holes in sheep tibia.** *Unfall Chirurg*, v.93, p.376-81, 1990.
- 59- MARDAS, N. et al. **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.*, v.13, n.3, p.453-62, may 2002.
- 60- MARKS Jr, S. C. & ODGREN, P. R. **Structure and development of the skeleton.** In: Bilezikian, J. P.; Raisz, I. G.; Rodan, G. A. **Principles of bone biology.** 2ª Ed., San Diego, Academic Press, cap.1, p.3-15, 2002.
- 61- MARX, R. E. & GARG, A. K. **Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology.** *Implant. Dent.*, v.7, n.4, p.267-76, 1998.
- 62- MASTERS, D.H. **Bone and bone substitutes** *Calif. Dent. Ass. J.*, v. 16, p.56-65, jan., 1988.
- 63- MASTROMIHALIS, N. et al. **Applications for guided bone regeneration in endodontic surgery.** *N. Y. State Dent. J.*, may, 1999.
- 64- MCSHEEHYc,P. M. & CHAMBERS, T. J. **Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factors that simulates osteoclastic bone resorption.** *Endocrinology*, v.119, p.1654-9, 1986. apud Marks Jr, C. C., & Odgren, P. R.⁵⁹, p.8.

- 65- MELCHER, A. H. & DREYER, C. J. **Protection of the blood clot in healing circumscribed bone defects.** *J. Bone Joint. Surg.*, v.43, p.827, 1964.
- 66- MELCHER, A.H. **Repair of wound in the periodontium of the rat. Influence of the periodontal ligament on osteogenesis.** *Arch Oral Biol.*, 15, 1183-204, 1970.
- 67- MISCH, C. E. **Contemporary implant dentistry.** Ed. Mosby, 1999.
- 68- MORONE, M. A. & BODEN, S. D. **Experimental posterolateral lumbar spinal fusion with a demineralized bone matrix gel.** *Spine*, v. 23, p.159-67, 1998.
- 69- MURPHY, K. G. **Incidence of characterization and effect of postoperative surgical complications using Gore-Tex periodontal material. Part I. Incidence and character of complications.** *Int. J. Periodon. Res. Dent.*, v.15, p.363-75, 1995.
- 70- MURRAY C. et al. **Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity.** *Am J. Surg.*, v.95, p.385-7, 1957.
- 71- **National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on Dental Implants, june 13-15.** *Journal of Dental Education*, v.52, n.12, p.824-7, 1988.
- 72- NOWZARI, H. & SLOTS, J. **Microbiologic and clinical study of expanded polytetrafluorethylene membranes for guided bone regeneration around implants.** *Int. J. Periodont. Res. Dent.*, v.10, p.67-73, 1995.
- 73- OGAWA, C.A. & PLEPIS, A. M. G. **Estudos preliminares de liberação de ciprofloxacina em compósito hidroxiapatita: colágeno.** *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v.17, n.3, p.123-130, set/dez, 2001.
- 74- OLIVEIRA, R.C. et al. **Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos.** *Rev. FOB*, v.7, n.3/4, p.85-93, jul-dez., 1999.

- 75- PÉCORA, G. et al. **Barrier membrane techniques in endodontic microsurgery.** *Dent. Clin. of North Am.* v.41, n.3, p.585-602, july, 1997.
- 76- PETERS, F. et al. **The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction, X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis.** *Thermochim. Acta*, v.361, p.131-8, 2000.
- 77- RAISZ, L. G. & RODAN, G. A. **Embryology and cellular biology of bone.** In: Avioli, L. V.; Krane, S. M. **Metabolic bone disease.** 3^a Ed., San Diego, Academic Press, cap1, p.1-22, 1998.
- 78- RANKOW, H.J. & KRASNER, P. R. **Endodontic aplication of guided bone regeneration in endodontic surgery.** *J. Endod.* , v.22, n.1, p.34-43, jan., 1996.
- 79- REDDI, A. H. **Cell biology and biochemistry of endochondral bone development.** *Coll. Relat. Res.*, v.1, p.209-26, 1981
- 80- REDDI, A. H. **Extracellular matrix and development.** In: Piez, K. A.; redid, A. H. (eds). **Extracellular Matrix Biochemistry.** New York; Elsevier, p.375-412, 1984.
- 81- ROBERTS, W. E. et al. **Bone physiology and metabolism.** *CDA J.*, v.15, n.10, p.54-61, oct., 1987.
- 82- RODAN, G. A. & MARTIN, T. J. **Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption: a hypotesis.** *Calcif. Tiss. Int.*, v.33, n.4, p.349-51, 1981.
- 83- RODAN, G. A. **Introduction to bone biology.** *Bone*, v.13 (suppl1), p. S3-S6, 1992.
- 84- RODAN, G. A. **Mechanical loading, estrogen deficiency, and the coupling of bone formation to bone resorption: Comment.** *J. Bone Miner Res.*, v.6, p.527-30, 1991.
- 85- SAAD, A. Y. & ABDELLATIEF, E. M. **Healing assessment of osseous defects of periapical lesions associated with failed endodontically treated teeth with use of freeze-dried bone allograft.** *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* v.71, n.5, p.612-7, 1991.

- 86- SANDBERG, E. et al. **Bone regeneration by the osteopromotion technique using biosorbable membranes: an experimental study in rats.** *J. Oral. Maxill. Surg.*, v.51, n.10, p.1106-14, oct., 1993.
- 87- SCIADINI, M.F. et al. **Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model.** *J. Orthop. Res.*, v. 15, p. 844-57, 1997.
- 88- SCHENK, R. K. **Biology of fracture repair** .In: Brower B. D.; Jupiter, J. B.; Levine, A. M. & Trafton P. G.(eds), **Skeletal Trauma**. Philadelphia:Saunders, 1992.
- 89- SCHENK, R. K. et al. **Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects. A histologic study in the canine mandible.** *Int. J. of Oral Maxillofac. Impl.*, v.9, n.1, p.13-29, 1994.
- 90- SCHLIEPHAKE, H. et al. **Influence of pore dimension on bone ingrowth into porous hydroxyapatite blocks used as bone graft substitutes. A histometric study.** *Int. Journal of Oral and Maxillofacial Surg.*, v. 20, p.53-58, 1991.
- 91- SCHLIEPHAKE, H. et al. **Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats.** *Clin. Oral Implants Res.*, v.5, n., p.112-8, feb., 2004.
- 92- SCHMITZ, J. P. & HOLLINGER, J. O. **The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions.** *Clin Orthop*, v. 205, p.299-308, Apr. 1986
- 93- SENA, L. A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações médicas.** Rio de Janeiro, 2004. 95p. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 94- SERVICE, R.F. **Tissue engineers build new bone.** *Science*, v.289, n.5484, p.1498-500, 2000.
- 95- SHAPOFF, C. A. et al. **The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogeneic freeze-dried bone and autogenous marrow.** *J. Periodontol.*, v.5, n.11, p.625-30, nov. 1980.

- 96- SICCA, C. M. et al. **Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos: efeito do tamanho da partícula.** *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, v.8, n.1/2, p.1-10, jan.-jun.,2000.
- 97- SIMONET, W.S. et al. **Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.** *Cell* , v.89, p 89-309, 1997.
- 98- SKOGLUND, A. et al. **A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral.** *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.*, v.12, p.194-200, 1997.
- 99- SOUTHWORTH, H. N. **Introduction to modern microscopy.** Wykeham publications (London) LTD., 1975.
- 100- SPECTOR, M. **Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral as implants to facilitate bone regeneration.** *Clin. Plast. Surg.*, v.21, p.437-44, 1994.
- 101- SPORN, M. B. & ROBERTS, A. B. **Transforming growth factors. Multiple actins and potencial clinical applications.** *J. Am. Med. Assoc.*, v.262, p.938-41, 1989.
- 102- STAL, S. et al. **Compartmentalized bone regeneration of cranial defects with biodegradable barriers: an animal model.** *J. Craniofac. Surg.*, v.12, n.1, p.41-7, jan., 2001.
- 103- STASSEN, L. F. et al. **Use of anorganic bone in periapical defects following apical surgery: a prospective trial.** *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.*, v.32, p.83-5, 1994.
- 104- STORGARD-JENSEN, S. et al. **Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes.** *Inter J. Oral Maxillof. Impl.* , v.11, n.1, p.55-66, 1996.
- 105- SUBITONI, B. L. **Análise microscópica da resposta tecidual ao implante intraósseo de pino de osso cortical bovino em fêmur de rato.** Projeto PIBIC/USP em desenvolvimento, 2002.
- 106- SUCHANEK, W. et al. **Mechanochemical-hydrothermal synthesis of carbonated apatite powders at room temperature.** *Biomaterials*, v.23, p.699-710, 2002.

- 107- SU-GWAN, K. et al. **Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats.** *J. Craniomaxillofac. Surg.*, v.29, n.5, p.282-8, 2001
- 108- SYLVESTER, M. F. et al. **Collagen banded fibril structure and the collagen-platelet reaction.** *Thrombosis Research*, v.55, p.135-48, 1989.
- 109- TADIC, D. & EPPLE, M. **A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone.** *Biomaterials*, v.25, p.987-994, 2004.
- 110- TADIC, D. et al. **Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites.** *Biomaterials*, v.23, p.2553-2559, 2002.
- 111- TAGA, M. L. L. **Análise histológica e radiográfica do potencial osteopromotor da membrana de cortical óssea bovina no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de cobaia (Cavia Porcellus).** Tese apresentada para obtenção do título de Mestre, Universidade de São Paulo, Bauru, 2004. 149p.
- 112- TAGA, R. et al. **Destino de membrana de cortical óssea bovina colocada em posição subperióstica na calvária de cobaia.** *Rev. Brasil. Implant.*, v.3, n.6, p. 24-9, nov./dez., 1997.
- 113- TAMPIERI, A. et al. **Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone.** *Biomaterials*, v.22, issue12, p.1365-1370, 2001.
- 114- THALLER, S. R. et al. **Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model.** *J. Craniofac. Surg.*, v.5, n.4, p.242-6, 1994.
- 115- THESINGH, C. W. & BURGER, E. H. **The role of mesenchyme in embryonic long bones as early deposition site for osteoclast progenitor cells.** *Dev. Biol.*, v.95, p.429-38, 1983 apud Marks Jr, S. C.; Odgren P. R. ⁵⁹, p.8.
- 116- TONHI, E. & PLEPIS, A. M. G. **Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana.** *Química Nova*, v.25, n.6, p.943-8, 2002.

- 117- URIST, M. R. & STRATES, B. S. **Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. Including observations on acetone-fixed intra and extracellular proteins.** *Clin Orthop.*, v.71, p.271-8, 1970.
- 118- URIST, M. R. et al. **Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.81, p.371-5, 1984.
- 119- URIST, M.R. **Bone: formation by autoinduction.** *Science*, v.150, n.698, p.893-9, nov., 1965.
- 120- VESCIO, R. S. **Preliminary observation on use of processed heterogenous bone in surgical endodontic procedures.** *N. Y. State D. J.*, v.33, p.396-9, aug./sept., 1967.
- 121- WANG, H. L. & CAROLL, W. J. **Guided bone regeneration using bone grafts and collagen membranes.** *Quint. Int.*, v.3, n.7, p.504-15, 2001.
- 122- WANG, H.L. & MACNEIL,R.L. **Guided tissue regeneration. absorbable barriers.** *Dent. Clin. North. Am.*, v.42, n.3, p.505-22, july, 1998.
- 123- WENZ, B. et al. **Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone.** *Biomaterials*, v.22, p.1599-606, 2001.
- 124- WERNER, J. et al. **Mechanical properties and in vivo cell compatibility of hydroxyapatite ceramics with graded pore structure.** *Biomaterials*, v.23, p.4285-4294, 2002.
- 125- WOZNEY, J. M. et al. **Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.** *Science*, v.242, p.1528-34, 1988.
- 126- YAMADA, S. et al. **Effect of porous xenographic bone graft with collagen barrier membrane on periodontal regeneration.** *Int. J. Period. Rest. Dent.*, v.22, n.4, p.389-97, aug., 2002.
- 127- YOUNG, C. et al. **A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits.** *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, v.14, n.1, p.72-6, 1999.

- 128- ZANER, D. J. & YUKNA, R. A. **Particle size of periodontal bone grafting materials.** *J. Periodontol.*, v.55, n.7, p.406-9, jul., 1984.
- 129- ZITZMANN, N. U. et al. **Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration.** *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.12, n.6, p.844-52, 1997.

ABSTRACT

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the physicochemical properties of mixed bovine bone (MBB) and analyze the osteoconductive potential of MBB compared to woven inorganic bovine bone (Bio-Oss[®] e Gen-Ox[®]), having as a control the blood clot, in rat calvariae. MBB was analyzed by means of thermogravimetry, infrared spectroscopy, differential exploratory calorimetry, pore size and porosity determination, scanning electron microscopy, X-ray diffraction and cristallinity. Critical size defects (9-mm diameter) were made in rat calvariae (n=5/period – material), filled according to the experimental group and covered with bovine cortical bone membrane (Gen-Derm[®]). At the end of the study periods (1, 3, 6 and 9 months postoperatively), the skulls were collected, fixed in 10% formalin, radiographed and processed for histological analysis. Physicochemical analysis showed characteristic collagen and hydroxyapatite groups in the MBB. The comparative microscopic evaluation showed that: a) there was no complete closure of the defects in any study group; b) in all groups, the membrane was resorbed before 1 month; c) in the control group, ossification took place on the periphery of the defect, and the central region of the defect was filled with connective fibrous tissue; d) in the group treated with Bio-Oss there was ossification on the periphery of the defect and dense fibrous tissue surrounding the graft particles; e) in the group treated with Gen-Ox there was bone formation surrounding the biomaterial particles; f) in the group treated with MBB the inflammatory infiltrate persisted in the first month and was then substituted by fibrous connective tissue surrounding the particles. In conclusion: a) MBB is composed by organic (15%) and inorganic (75%) fractions; b) none of the tested materials was able to induce the complete cleasure of the critical size defects; c) Gen-Ox was the most osteoconductive material among those tested; d) neither MBB nor Bio-Oss, in this experimental model, showed osteoconductive properties and e) none of the materials was resorbed in 9 months.

Keywords: biomaterials, osseous implant, bone repair, guided bone regeneration, bovine bone, xenogenic implant.