A histological section of bone tissue, likely from a rabbit tibia, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows a complex network of bone trabeculae and marrow spaces. The trabeculae are stained pink (eosinophilic) and contain various cells, including osteocytes and osteoblasts. The marrow spaces are stained purple (basophilic) and contain hematopoietic cells. The overall structure is highly organized and typical of cancellous bone.

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

BRUNO CAVALINI CAVENAGO

**Estudo do processo de reparo ósseo em função de
quatro biomateriais. Avaliação microscópica em tíbias
de coelhos**

**BAURU
2011**

BRUNO CAVALINI CAVENAGO

Estudo do processo de reparo ósseo em função de quatro biomateriais. Avaliação microscópica em tíbias de coelhos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia

Versão corrigida

BAURU
2011

C315e Cavenago, Bruno Cavalini
Estudo do processo de reparo ósseo em função
de quatro biomateriais. Avaliação microscópica em
tíbias de coelhos / Bruno Cavalini Cavenago.--
Bauru, 2011.
170p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

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

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 027/2009
Data: 25 de setembro de 2009

DADOS CURRICULARES

BRUNO CAVALINI CAVENAGO

Nascimento	27 de dezembro de 1984 Campo Mourão – PR
Filiação	Valdir Varea Cavenago Roseli Cavalini Cavenago
2002 – 2005	Graduação em Odontologia – Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá, PR.
2006	Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.
2007 – 2008	Curso de Especialização em Saúde Coletiva – Faculdade São Leopoldo Mandic, Campinas, SP.
2007 – 2008	Curso de Especialização em Endodontia - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
2009 – 2011	Curso de Pós-Graduação, Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração em Endodontia, pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
Associações	CRO-PR – Conselho Regional de Odontologia do Estado do Paraná. IADR – International Association for Dental Research. SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Aos meus pais *Valdir Varea Cavenago* e *Roseli Cavalini Cavenago*, que são os grandes pilares de minha vida. Sei que se orgulham por eu alcançar esse objetivo em minha vida, mas saibam que esta conquista é de fato responsabilidade de vocês, pois a união de nossa família, todo amor e carinho com que fui criado, contribuíram para minha formação. Além do mais, sempre investiram, incondicionalmente, em minha educação, mesmo que em momentos da vida tiveram que se privar de alguns desejos para me oferecer educação de qualidade. Saibam que procuro trilhar minha vida, tomando os dois como referências, praticando os princípios que me foram ensinados ao longo da vida, princípios estes de dignidade, honestidade, humildade e perseverança. Vocês me ajudaram a superar inúmeras dificuldades e me supriram em todas as minhas necessidades. A verdade é que me orgulho muito dos pais que tenho. Amo vocês e obrigado por tudo que fizeram e representam para mim.

A minha irmã *Amanda Cavalini Cavenago* por seu amor incondicional e por procurar estar sempre presente em minha vida. Obrigado pelo carinho, incentivo e preocupação. Por sempre vibrar com minhas conquistas. Saiba que com grande ternura a tenho no meu coração, te amo maninha.

A minha namorada *Leuci Freitas*, mesmo sacrificando momentos que poderíamos estar desfrutando juntos, sempre me apoiou através do seu amor e cumplicidade. A distância que nos separa sempre foi presente, assim como a constante saudade, mas com o relacionamento sólido conseguimos superar todas as dificuldades e em breve selaremos de fato nossa união. Este passo que dou é mais uma conquista dessa etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos. Você transformou minha vida, te amo.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* pela vida maravilhosa que tenho, repleta de felicidade e saúde, além de todas as oportunidades que surgiram em minha vida. O Senhor está sempre presente iluminando meus caminhos.

As minhas avós *Aparecida Varea Cavenago* e *Luzia da Costa Cavalini* pelo carinho e por estarem sempre presentes, também por torcerem para que meus objetivos fossem alcançados. Em especial ao meu avô *Clóvis Cavalini (in memorian)* que deixou saudades partindo cedo demais, mas estou certo que de onde estiver certamente estará feliz por essa minha conquista.

Aos meus tios *Clóvis, Décio, Genivaldo, Osvaldo* e tias *Cida, Inês, Lúcia e Luiza*, além de todos meus primos pelo carinho e incentivo.

Aos meus amigos *Julio, Raphael e Fábio*, que sempre incentivaram e vibraram com as minhas conquistas. E a todos meus amigos de Campo Mourão e Maringá, pela amizade de longa data, por todo apoio e consideração.

Aos professores da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru:

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. *Roberto Brandão Garcia*, pela amizade, confiança, paciência e o constante apoio, além das correções criteriosas para que esse trabalho fosse realizado da melhor maneira possível. Para mim fica o exemplo de professor, na essência da palavra, pois transparece o entusiasmo e o prazer em ensinar, repassando sem restrições seu conhecimento, sendo nítida sua vocação como educador. Também o admiro como pessoa, sempre sereno, gentil e extremamente educado. Solícito e dedicado não mediu esforços para que eu pudesse desempenhar o melhor. Sou muito grato ao senhor.

Prof. Dr. *Marco Antonio Hungaro Duarte*, que passou a ser mais que um professor, tornando-se um grande amigo. Admiro sua determinação, competência e principalmente sua humildade. Sempre solícito e empenhado no trabalho, sua disposição e foco para buscar sempre mais, o torna um professor diferenciado. Obrigado pelas constantes orientações e auxílios nos atendimentos clínicos, saiba que contribuiu muito para meu desenvolvimento clínico e científico.

Prof. Dr. *Clovis Monteiro Bramante*, é um exemplo a ser seguido, mesmo por tudo o que já fez e representa para a Endodontia, está sempre, incansavelmente, em busca do avanço científico.

Profa. Dra. *Flaviana Bombarda de Andrade*, muito competente e carismática. Ingressou recentemente a equipe de professores e logo conquistou a amizade de todos, desejo muito sucesso nessa nova fase de sua vida.

Prof. Dr. *Ivaldo Gomes de Moraes*, com um coração enorme é muito querido por todos a sua volta. Obrigado por sua amizade e confiança. Admiro sua simplicidade e disposição tanto para ensinar quanto para ouvir.

Prof. Dr. *Norberti Bernardineli* sempre bem humorado, seus ensinamentos e conselhos faz a Endodontia parecer mais simples. Agradeço pela amizade e por sua constante disponibilidade e atenção.

Agradeço aos meus professores da disciplina de Endodontia do Cesumar, durante minha graduação, por despertarem meu interesse por essa especialidade, além de formarem minha base na área, especialmente ao Prof. Dr. *Carlos Alberto Herrero de Moraes* por despertar em mim o desejo de seguir a carreira acadêmica, particularmente nesta instituição.

A todos professores da disciplina de Histologia, pela atenção e disponibilização das instalações de seu departamento para que parte deste trabalho fosse realizado. Agradeço ao Prof. Dr. *Gerson Francisco de Assis* pela orientação dada quanto à avaliação microscópica, sempre solícito e gentil.

A todos professores do curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos transmitidos pelas disciplinas ministradas durante o mestrado.

Aos funcionários do departamento de Endodontia *Edimauro, Neide e Suely* pelo companheirismo e convivência harmoniosa durante esses anos, além do auxílio em todos os momentos que necessitei, sempre dispostos me atenderam prontamente.

As biólogas do departamento de Histologia, *Daniele, Patrícia e Tânia* pela dedicação e competência quanto ao preparo histotécnico de minhas amostras, prestaram um auxílio valioso na inclusão das peças, corte e coloração. Além de sempre, pacientemente, esclarecem minhas dúvidas pertinentes.

Aos funcionários do Biotério *Luiz Carlos, Erasmo, Elias e Richard*, pelas orientações quanto ao manejo e pelo desvelo que tiveram com os animais utilizados nessa pesquisa.

Aos funcionários da Pós-Graduação e Biblioteca pela cordialidade, sempre prestativos ao dar informações.

Aos amigos pós-graduandos da Endodontia: *Aldo Enrique Del Carpio Perochena, Clarissa Teles Rodrigues, Elaine Cristina Consolmagno, Járcio Baldi, Marcelo Haas Villas Bôas, Marina Angélica Marciano da Silva, Paloma Gagliardi Minotti, Raquel Zanin Midená, Ronald Ordinola Zapata e Thais Vieira Rizzo Nunes da Cunha.*

Aldo obrigado pelo apoio e parceria. Conhecemos muitas pessoas ao longo da vida, mas a amizade perdura pela vida toda. Pela convivência diária e por todos os momentos, bons ou ruins, passo a tê-lo como irmão.

Ronald pela amizade e consideração. Aprendi muito convivendo com você, sua capacidade de raciocínio científico é impressionante, tanto quanto sua disponibilidade em compartilhar seu conhecimento. Obrigado por tanto me ajudar.

Thais pela amizade desde a especialização, sua alegria e determinação, servem de exemplo para alcançar nossos objetivos, obrigado pelo incentivo e apoio.

Marina, Paloma e Raquel pelo companheirismo e amizade, mas especialmente pela imensa disponibilidade e o auxílio fundamental durante as cirurgias dos animais, trabalhando juntos aprendi muito com vocês.

Clarissa, Elaine e Marcelo pela ótima convivência, amizade e companheirismo. Pelos bons momentos que passamos e por juntos aprendermos muito com os seminários, laboratórios e clínicas.

Aos pós-graduandos *Camila Lopes Cardoso e Járcio Baldi*, pela amizade e por me permitirem participar de suas respectivas pesquisas, onde aprendi muito.

Aos demais colegas de pós-graduação de todas as áreas e aos alunos da graduação pelo convívio, aprendizado e também pelo futebol.

E a todas pessoas que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do Diretor, **Prof. Dr. José Carlos Pereira**.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do Presidente, **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação, na área de concentração em Endodontia, **Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia**.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pela concessão de bolsa de estudo, que possibilitou a realização desta pesquisa.

Ao Programa de Apoio a Pós-graduação (PROAP) – Capes, pelo auxílio quanto à disponibilização dos materiais utilizados nesta pesquisa.

*“A ciência é o grande
antídoto contra o veneno
do entusiasmo e da
superstição.”*

Adam Smith

Resumo

RESUMO

Este estudo avaliou o processo de reparo ósseo em cavidades cirúrgicas de tamanho não crítico, quando preenchidas por diferentes biomateriais. Um defeito ósseo de 5mm de diâmetro por 8mm profundidade foi criado em cada metáfise tibial de 27 coelhos machos. Foram estabelecidos 4 grupos com 12 cavidades por material. As cavidades foram preenchidas com matriz óssea bovina inorgânica, GenOx Inorg[®] (grupo 1), matriz óssea bovina orgânica, GenOx Org[®] (grupo 2), matriz óssea bovina composta, GenMix[®] (grupo 3) e sulfato de cálcio di-hidratado (Grupo 4). Adicionalmente, seis cavidades preenchidas com coágulo sanguíneo foram utilizadas como controle (grupo 5). Os animais foram mortos após 30, 60 e 90 dias e as amostras coletadas foram submetidas ao processamento histotécnico para obter cortes de 5 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina. Foram realizadas análises histomorfológica descritiva e histomorfométrica, que consistiu na mensuração da área de tecido ósseo neoformado. Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis e Dunn. Aos 30 e 60 dias a área de tecido ósseo neoformado ocorreu de forma semelhante entre todos os grupos ($P > 0,05$). No período de 90 dias houve diferença significativa entre os grupos 2 e 4, bem como entre os grupos 4 e 5. Ao realizar a análise estatística de cada grupo em função dos 3 períodos experimentais, constatou-se que nos grupos 1, 2 e 3 a área de tecido ósseo neoformado aos 30 dias foi menor ($P < 0,05$) em relação a 60 e 90 dias. No grupo 4, ocorreu diferença significativa entre os períodos de 30 e 90 dias, já no grupo 5 houve diferença significativa ao comparar 30 e 60 dias. Com base na microscopia observamos que os biomateriais estudados não inibiram o processo de reparo; o GenOx Inorg e a matriz inorgânica presente no GenMix exibiram características morfológicas de propriedade osteocondutora, mais intensa no primeiro grupo. O GenOx Org e o sulfato de cálcio di-hidratado apresentaram-se completamente reabsorvidos aos 30 dias. Foi possível concluir que os valores neoformativos proporcionados pelo GenMix não foram significativamente superiores, àqueles obtidos pelo GenOx Inorg, GenOx Org e sulfato de cálcio di-hidratado. Os diferentes biomateriais utilizados não apresentaram resultados superiores ao coágulo sanguíneo, exceto o sulfato de cálcio di-hidratado aos 90 dias.

Palavras-chave: Materiais Biocompatíveis. Regeneração óssea. Teste de Materiais.

Abstract

ABSTRACT

Study of bone repair process in function of four biomaterials. Microscopy evaluation in rabbit tibias

This study evaluated the bone healing process in non-critical surgical cavity size, when grafted with different biomaterials. A 5mm wide and 8mm long defect were created in each tibial metaphysis of 27 male rabbits. Four groups of 12 cavities per material were established. The cavities were filled with deproteinized bovine bone, GenOx Inorg[®] (group 1), demineralized bovine bone, GenOx Org[®] (group 2), composite bovine bone, GenMix[®] (group 3) and di-hydrate calcium sulfate (group 4). Additionally 6 cavities were filled with blood clot for control purposes (group 5). At 30, 60 and 90 days after surgery the animals were killed and the grafted areas were submitted to histologically process to obtain a 5 µm thickness sections and stained with hematoxylin and eosin. The specimens were proceeded to descriptive and quantitative microscopic analysis, by measuring the area of new formed bone. The results were statistically analyzed by the Kruskal-Wallis and Dunn tests. At 30 and 60 days the area of new bone formation was similar among all groups ($P > 0,05$). In 90 days period there was a significant difference between groups 2 and 4, as well as groups 4 and 5. Performing the statistical analysis of each group in relation to the 3 experimental periods, it was found that in groups 1, 2 and 3 the area of new bone formed at 30 days was lower ($P < 0,05$) than 60 and 90 days. There was a significant difference in group 4 comparing the periods 30 and 90 days and in group 5 between 30 and 60 days. Based on microscopy findings we observed that the biomaterials studied did not inhibit the repair process; the GenOx Inorg and inorganic matrix present in GenMix exhibited morphological characteristics of osteoconductive property, more intense in the first one. The GenOx Org and di-hydrate calcium sulfate were completely reabsorbed within 30 days. It was concluded that the values of new bone formed area provided by GenMix were not significantly higher than obtained by GenOx Inorg, GenOx Org and di-hydrate calcium sulfate. The different biomaterials used did not show better results than blood clot, except di-hydrate calcium sulfate at 90 days.

Key words: Biocompatible Materials. Bone Regeneration. Materials Testing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS:

Figura 1 - Osso bovino inorgânico esponjoso, GenOx Inorg – Baumer S.A.....	85
Figura 2 - Osso bovino orgânico cortical, GenOx Org – Baumer S.A.....	85
Figura 3 - Osso bovino composto, GenMix – Baumer S.A.	85
Figura 4 - Sulfato de Cálcio di-hidratado, Merck.	86
Figura 5- Anasedan (relaxante muscular) e Dopalen (anestésico), Vetbrands.....	86
Figura 6 - Tíbia e maior aumento do local da confecção dos defeitos.	86
Figura 7 - A) anti-sepsia com solução degermante; B) infiltração de solução anestésica; C) incisão; D) divulsão.	87
Figura 8 - A) perfuração com a trefina nº 3; B) cavidade óssea.	89
Figura 9 - A) matriz óssea bovina inorgânica; B) matriz óssea bovina orgânica; C) GenMix manipulado com soro fisiológico; D) sulfato de cálcio di-hidratado manipulado com soro fisiológico	89
Figura 10 - Inserção do material na cavidade	89
Figura 11 - A) curetagem da cavidade; B) cavidade preenchida com sangue	90
Figura 12 - A) sutura interna com fio absorvível; B) sutura externa com fio de seda.....	90
Figura 13 - A) antibiótico Flotril 2,5%; B) anti-inflamatório Ketoflex 1,0%.....	92
Figura 14 - Epífise da tíbia, logo após sua remoção	92

Figura 15 – Interface do programa Leica Application Suite 3.7.0 e delimitação do tecido ósseo	96
Figura 16 – Interface do programa Photoshop 7.0 e criação das máscaras.....	96
Figura 17 – Interface do programa bioImageL 2.0 e contagem da área em μm^2	96
Figura 18 – a) Grupo 1 – Tecido periosteal (O) e cortical neoformada na área do defeito (●). b) Grupo 1 (maior aumento) - Osso neoformado trabeculado (↑), envolvendo partículas da matriz inorgânica (↑). c) Grupo 2 – Tecido periosteal (O), cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido tipo endocondral (★). d) Grupo 2 – Tecido tipo endocondral (★) e parte do tecido ósseo cortical neoformado (●). e) Grupo 3 – Cortical neoformada na área do defeito (●). f) Grupo 3 (maior aumento) – partícula de osso inorgânico (↑) envolvida por osso neoformado (↑). g) Grupo 4 – cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido periosteal (O). h) Grupo 5 – cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido periosteal (O)	105
Figura 19 – a) Grupo 1 – Cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido periosteal (O). b) Grupo 1 (maior aumento) - Partícula de osso inorgânico (↑) e trabécula de osso neoformado (↑). c) Grupo 2 – Fechamento incompleto do defeito (□), cortical neoformada (●) e tecido periosteal (O). d) Grupo 2 – Detalhe da cortical óssea neoformada (●) abaixo da borda do defeito. e) Grupo 3 – Cortical neoformada incompleta na área do defeito (●) e tecido periosteal (O). f) Grupo 3 (maior aumento) – partículas do GenMix (↑) envolvidas por tecido conjuntivo denso (▲). g) Grupo 4 – cortical neoformada (●) e tecido periosteal (O). h) Grupo 5 – cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido periosteal (O). i) e j) Grupo 5 (maior aumento) – Tecido periosteal (O), cortical neoformada (●) e clastos (△).....	109/111

Figura 20 – a) Grupo 1 – Osso cortical neoformado (●) e tecido periostal (○). b) Grupo 1 (maior aumento) - Partículas de osso inorgânico (↑) e trabéculas de osso neoformado (↑). c) Grupo 3 – Cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido periostal (○). d) Grupo 3 (maior aumento) – partículas da matriz inorgânica (↑) envolvidas por tecido conjuntivo denso (▲). e) Grupo 2 – cortical neoformada (●) e tecido periostal (○). f) Grupo 4 – cortical neoformada (●) e tecido periostal (○). g) Grupo 5 – cortical neoformada (●) e tecido periostal (○) 115

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Representação da área, em mm ² , do tecido ósseo neoformado em cada grupo no período de 30 dias contendo mediana, máximo, mínimo, primeiro e quarto quartil.....	118
Gráfico 2 – Representação da área, em mm ² , do tecido ósseo neoformado em cada grupo no período de 60 dias contendo mediana, máximo, mínimo, primeiro e quarto quartil.....	118
Gráfico 3 - Representação da área, em mm ² , do tecido ósseo neoformado em cada grupo no período de 90 dias, contendo mediana, máximo, mínimo, primeiro e quarto quartil.....	119
Gráfico 4 - Representação da área de osso neoformado (mediana) em cada período no Grupo 1 (GenOx Inorg).....	120
Gráfico 5 - Representação da área de osso neoformado (mediana) em cada período no Grupo 2 (GenOx Org)	120
Gráfico 6 - Representação da área de osso neoformado (mediana) em cada período no Grupo 3 (GenMix)	121
Gráfico 7 - Representação da área de osso neoformado (mediana) em cada período no Grupo 4 (Sulfato de Cálcio di-hidratado)	121
Gráfico 8 - Representação da área de osso neoformado (mediana) em cada período no Grupo 5 (controle).....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos materiais nas cavidades cirúrgicas dos animais.....	88
Tabela 2 -	Representação por meio da mediana (primeiro e quarto quartil), da área em mm ² , do osso neoformado nos grupos experimentais e controle, nos três períodos.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μm	Micrometros
μm ²	Micrometros quadrados
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros quadrados
ml	Mililitros
mg	Miligramas
Kg	Quilogramas
®	Marca registrada
%	Porcentagem
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
BMP	Bone morphogenetic protein (proteína morfogenética óssea)
PRP	Plasma rico em plaquetas
HE	Hematoxilina e Eosina
pH	Potencial Hidrogênico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	ESTUDO EM COLEHOS	33
2.2	ENXERTOS ÓSSEOS	34
2.2.1	MATRIZ ÓSSEA INORGÂNICA	40
2.2.2	MATRIZ ÓSSEA ORGÂNICA	53
2.2.3	MATRIZ ÓSSEA COMPOSTA	59
2.2.4	SULFATO DE CÁLCIO	65
3	PROPOSIÇÃO	77
4	MATERIAL E MÉTODOS	81
4.1	ANIMAIS	83
4.2	MATERIAIS UTILIZADOS	83
4.2.1	Matriz óssea bovina inorgânica	83
4.2.2	Matriz óssea bovina orgânica	83
4.2.3	Matriz óssea bovina composta	84
4.2.4	Sulfato de Cálcio	84
4.3	INTERVENÇÕES CIRÚRGICAS	84
4.3.1	Anestesia	84
4.3.2	Incisão e sindesmotomia	84
4.3.3	Confecção dos defeitos e seu preenchimento	87
4.3.4	Sutura	90
4.3.5	Medicação pós-operatória	91
4.4	PERÍODOS DE PROSERVAÇÃO	91
4.5	PREPARO DAS PEÇAS	91
4.6	PROCEDIMENTO HISTOTÉCNICO	92
4.6.1	Desmineralização	92
4.6.2	Obtenção das lâminas	93
4.6.3	Coloração	93
4.7	ANÁLISE MICROSCÓPICA	94
4.7.1	Descritiva	94
4.7.2	Morfométrica	94

4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	97
5	RESULTADOS	99
5.1	ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA	101
5.1.1	Grupo 1 – GenOx Inorg – 30 dias	101
5.1.2	Grupo 2 – GenOx Org – 30 dias	101
5.1.3	Grupo 3 – GenMix – 30 dias	102
5.1.4	Grupo 4 – Sulfato de Cálcio di-hidratado – 30 dias	102
5.1.5	Grupo 5 – Controle – 30 dias	103
5.1.6	Grupo 1 – GenOx Inorg – 60 dias	107
5.1.7	Grupo 2 – GenOx Org – 60 dias	107
5.1.8	Grupo 3 – GenMix – 60 dias	107
5.1.9	Grupo 4 – Sulfato de Cálcio di-hidratado – 60 dias	108
5.1.10	Grupo 5 – Controle – 60 dias	108
5.1.11	Grupo 1 – GenOx Inorg – 90 dias	113
5.1.12	Grupo 2 – GenOx Org – 90 dias	113
5.1.13	Grupo 3 – GenMix – 90 dias	113
5.1.14	Grupo 4 – Sulfato de Cálcio di-hidratado – 90 dias	114
5.1.15	Grupo 5 – Controle – 90 dias	114
5.2	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	117
6	DISCUSSÃO	123
6.1	Da Metodologia	125
6.2	Dos Resultados	134
7	CONCLUSÕES	147
	REFERÊNCIAS	151
	ANEXOS	167

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Quando nos deparamos com lesões periapicais, cujo tratamento endodôntico convencional não é capaz de solucionar, podemos lançar mão da cirurgia parendodôntica como terapia. A ostectomia realizada para acessar o periápice e a remoção da lesão instalada, resulta em um defeito ósseo com dimensões variáveis de acordo com o tamanho da lesão. Quanto maior for esse defeito, mais dificultoso e prolongado será o processo de reparo. O coágulo sanguíneo é importante no preenchimento da loja cirúrgica, pois o mesmo será o precursor do processo de reparo ósseo, porém de acordo com as proporções da cavidade, pode ocorrer uma degeneração do coágulo, antes de sua organização, gerando um atraso ou incompleto reparo, devido à invaginação de tecido conjuntivo, que formará um tecido fibroso (BRAMANTE; BERBERT, 2000).

Assim, para evitar tal intercorrência, pode-se fazer o uso de enxertos ósseos. Estes geram um fenômeno dinâmico, quando empregados corretamente, promovendo um reparo satisfatório. Para tanto incorporam-se ao organismo e como consequência são revascularizados e remodelados, assumindo os contornos anatômicos desejados.

Porém para almejar o reparo ósseo, é fundamental compreender o mecanismo biológico do mesmo. O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo, formado por células e matriz extracelular mineralizada, contendo sais de cálcio e fosfato. Sendo uma estrutura rígida, o osso tem função de suporte para as partes moles e proteção para os órgãos, além de ser um reservatório de íons cálcio e fosfato para o organismo. Na morfologia macroscópica o tecido ósseo pode ser diferenciado em osso compacto, que aparece como uma massa sólida e osso esponjoso, que consiste de uma trama de espículas ósseas ou trabéculas que delimitam espaços ocupados pela medula óssea. Na morfologia microscópica tanto o osso compacto quanto o esponjoso apresentam a mesma estrutura básica, que também pode ser dividida em dois tipos de tecido ósseo: primário (imaturo) e secundário (maduro ou lamelar). Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz, diferenciando, no entanto, quanto sua organização.

O osso primário ocorre durante o desenvolvimento embrionário e no reparo de fraturas, porém é temporário e gradualmente vai sendo substituído por osso secundário (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). No tecido ósseo secundário (maduro ou lamelar), a matriz está disposta em camadas ou lamelas concentricamente ao redor de um canal vascular longitudinal, constituindo o sistema de Havers. Os canais de Havers estão conectados entre si por meio de canais transversais ou oblíquos denominados de canais de Volkmann, que contém vasos sanguíneos oriundos da medula e do periósteo. Esse tipo de estrutura é evidenciado no osso compacto, já o osso esponjoso, apesar de também ser lamelar, geralmente não apresenta sistema haversiano, a não ser que as trabéculas apresentem espessura suficiente (ROSS; ROWRELL, 1993; KIERSZENBAUM, 2004). Em suma, enquanto o osso cortical oferece resistência e proteção, o esponjoso atua nas funções metabólicas. As superfícies dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem na superfície externa o periósteo e na interna o endósteo (JUNQUEIRA; CANEIRO, 2004).

Nos ossos longos, como o fêmur ou tíbia, sua estrutura está dividida em epífise, metáfise e diáfise. Na extremidade desses ossos está a epífise, que consiste de osso esponjoso coberto por uma fina camada de osso compacto. A diáfise ou corpo é formada por osso compacto formando um cilindro oco, denominado de cavidade medular. Já a metáfise é uma área de transição que conecta as duas estruturas anteriores (ROSS; ROWRELL, 1993).

A matriz óssea é composta por uma parte orgânica (35%) e outra inorgânica (65%). A matriz orgânica contém essencialmente fibras colágenas tipo I (90%), além de proteoglicanos (ricos em condroitinsulfato, queratansulfato e ácido hialurônico) e proteínas não colagenosas (osteocalcina, osteopontina e osteonectina). O componente inorgânico do osso é representado predominantemente por depósitos de fosfato de cálcio com características cristalinas da hidroxiapatita com a composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (KIERSZENBAUM, 2004). Das células constituintes do tecido ósseo destacam-se os osteoblastos, osteócitos, células de revestimento ósseo e os osteoclastos.

Para ocorrer o processo de reparo ósseo, quer seja nas fraturas ou nos defeitos ósseo cirúrgicos, a presença do coágulo sanguíneo é fundamental, pois ele

gera uma malha de fibrina, que além de vedar, atua como um arcabouço para o influxo de células inflamatórias, crescimento de fibroblastos e novos capilares sanguíneos. Este é gradativamente substituído por tecido de granulação, pois o periósteo e endósteo, próximos ao local da injúria, respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido rico em células osteoprogenitoras, originando uma camada ao entorno da área lesada. Tanto nessa camada quanto no conjuntivo localizado nas bordas da injúria, ocorre a formação de tecido ósseo, pois as células imaturas do tecido de granulação se diferenciam em osteoblastos e passam a sintetizar tecido osteóide, que consiste de fibras colágenas e proteoglicanas, de constituição química adequada a receber sais de cálcio. As fibras colágenas se dispõem em feixes orientados em várias direções, e com a mineralização, passam a formar o osso imaturo. Dessa forma, ocorre a ossificação intramembranosa, porém também pode ocorrer por ossificação endocondral, por meio de pequenos fragmentos de cartilagem que aí se forma servindo como um molde que gradativamente será substituído por tecido ósseo. Com a evolução do processo ocorre a formação de um calo ósseo, constituído por tecido ósseo imaturo que une provisoriamente às extremidades do osso fraturado. Com o transcorrer do tempo esse calo é remodelado, o osso imaturo será aparado por osteoclastos, e novas etapas de ossificação vão seguir através de osteoblastos dispostos em uma camada na superfície da nova trabécula óssea, até que se tenha completa substituição por tecido ósseo lamelar (JUNQUEIRA; CANEIRO, 2004; KIERSZENBAUM, 2004).

Apesar do grande potencial de reparo do tecido ósseo, em algumas situações, de acordo com as proporções do defeito, a regeneração pode não ser completa, pois o defeito pode ser invadido pelo tecido conjuntivo circundante, que apresenta uma velocidade de proliferação e migração celular maior do que o tecido ósseo. Dessa forma o uso de enxertos ósseos pode colaborar com o processo de reparo. Na presença de enxertos ósseos, o mecanismo reparador descrito se desenvolve normalmente, desde que o material utilizado não seja citotóxico (PECORA, *et al.*, 1997; AABOE, *et al.*, 2000; APAYDIN; TORABINEJAD, 2004; BETTI, 2004; MAEDA, *et al.*, 2007).

Há muito tempo que os enxertos ósseos, para o uso em cirurgias bucais, são alvo de estudo, datando de 1923, onde Hedeus (GARCIA, 2007) propôs o uso de

osso do processo alveolar e da tíbia para reconstruir defeitos provocados pela doença periodontal. Inicialmente os enxertos ósseos foram considerados meras barreiras e seus resultados foram medidos principalmente pela habilidade de suportar as tensões mecânicas (HABAL; REDDI, 1992).

Para que possa proporcionar melhores resultados, o enxerto deve ser preferencialmente osteogênico, osteoindutor e osteocondutor (DELIBERADOR, *et al.*, 2006; FURLANETO, *et al.*, 2007). A osteogênese ocorre quando osteoblastos viáveis fazem parte do enxerto, e com suprimento sanguíneo adequado no local enxertado, formam centros de ossificação. A osteoindução envolve a neoformação óssea por meio do estímulo de células osteoprogenitoras para que se diferenciem em osteoblastos. Já a osteocondução é proporcionada por materiais biocompatíveis, que servem como arcabouço para o crescimento ósseo em contato com sua superfície (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001).

Os materiais empregados para enxerto ósseo podem ser classificados quanto sua origem, sendo autólogos (autógenos), homólogos (alógenos), heterólogos (xenógenos) e aloplásticos. Os autógenos são enxertos obtidos do próprio indivíduo. Os alógenos são enxertos obtidos de indivíduos diferentes, porém da mesma espécie, um exemplo são os enxertos obtidos dos bancos de ossos humanos. Já os xenógenos são obtidos de uma espécie diferente do receptor. E os aloplásticos, que são materiais de origem inorgânica ou sintéticos (PECORA, *et al.*, 1997; HOSOKAWA, *et al.*, 1999; HOEXTER, 2002; BETTI, 2004; DA CRUZ, *et al.*, 2007; MAEDA, *et al.*, 2007; CALASANS-MAIA, *et al.*, 2009).

De modo geral esses materiais ou biomateriais apresentam características próprias quanto à sua composição, apresentação física e capacidade de serem reabsorvidos ou não, sendo ideal utilizar materiais reabsorvíveis, pois estes não competirão com o tecido ósseo, enquanto esse é formado.

Diversos estudos apontam que o enxerto ósseo autógeno é o mais eficiente, pois não possui ação antigênica, transporta proteínas, minerais e células ósseas vitais (osteoblastos e células-tronco osteoprogenitoras), sendo assim capaz de promover osteogênese, osteoindução e osteocondução (RODAN; MARTIN, 2000; EID, *et al.*, 2001; FINKEMEIER, 2002; HOEXTER, 2002; STROCCHI, *et al.*, 2002;

THORWARTH, *et al.*, 2006; TUDOR, *et al.*, 2008). Porém o uso do enxerto autógeno trás alguns inconvenientes, como a necessidade de outro procedimento cirúrgico e morbidade pós-operatória, devido à debilidade da região doadora, e dependendo dessa, pode oferecer uma quantidade insatisfatória de material (FINKEMEIER, 2002; STROCCHI, *et al.*, 2002; THORWARTH, *et al.*, 2006; TUDOR, *et al.*, 2008; PARK, *et al.*, 2009).

Frente às adversidades para se obter o osso autógeno, os biomateriais são empregados, destes, a matriz óssea xenogênica, de origem bovina, tem sido amplamente utilizada, com resultados satisfatórios (RICHARDSON, *et al.*, 1999; GARCIA, 2007; ARAÚJO; LINDHE, 2009; ROCHA, *et al.*, 2010). O processamento do osso bovino pode gerar dois materiais distintos, a matriz óssea inorgânica e a orgânica. O osso bovino desproteínizado é composto pela matriz inorgânica, ou seja não tem proteínas, consiste apenas dos componentes minerais. Apresenta como principal característica a propriedade osteocondutora. As proteínas são removidas por tratamento térmico em temperaturas superiores a 300°C (CALASANS-MAIA, *et al.*, 2009). O osso bovino inorgânico pode ser de origem cortical ou esponjoso (HABAL; REDDI, 1992).

O osso bovino desmineralizado, é composto somente pela matriz orgânica e alguns autores sugerem que possa apresentar um potencial osteoindutor devido à presença de fatores de crescimento solúveis em sua composição (FINKEMEIER, 2002; SICCA, *et al.*, 2008). O tratamento do osso bovino com solventes orgânicos, álcalis e ácidos em concentração e temperatura controladas, permite a remoção de células, resíduos celulares e várias proteínas não-colanogênicas, assim como a porção mineral, deixando uma estrutura protéica constituída basicamente de colágeno tipo I e uma pequena quantidade de fatores de crescimento, como proteínas morfogenéticas ósseas (CALASANS-MAIA, *et al.*, 2009).

O tratamento acima de 300°C ou com álcalis, seguido por neutralização elimina o risco de transmissão de doenças, por meio dos enxertos xenogênicos, tornando-os materiais seguros (WENZ; OESCH; HORST, 2001).

Recentemente foi lançado no mercado brasileiro uma matriz óssea bovina composta, GenMix[®], que apresenta tanto matriz orgânica cortical quanto matriz

inorgânica medular, na forma granular, associados a um aglutinante de colágeno. O objetivo da utilização de um material composto com porções orgânica e inorgânica é diminuir o tempo total de reabsorção das partículas, já que as porções orgânicas são mais rapidamente reabsorvidas. É um material biocompatível, e por apresentar as duas matrizes associadas, pode atuar como osteocondutor e osteoindutor, somando as vantagens dos dois componentes, por outro lado o GenMix pode ter sua capacidade de osteocondução e/ou osteoindução afetadas por essa associação (STEIN; SILVA; DA SILVA, 2009).

Dentre os materiais aloplásticos, destaca-se o sulfato de cálcio, um material amplamente usado, discutido e bem aceito na literatura, sendo o primeiro relato de seu uso para preenchimento de defeitos ósseos feito por Dreesman em 1892 (MAEDA, *et al.*, 2007). Esse material é biocompatível, reabsorvível e hemostático, além de atuar como osteopreenchedor, evitando a invaginação de tecido conjuntivo e epitelial para o interior da cavidade (PECORA, *et al.*, 2001; WALSH, *et al.*, 2003; AICHELMANN-REIDY; HEATH; REYNOLDS, 2004; MELO, *et al.*, 2005; MAEDA, *et al.*, 2007). Também há relato, que o sulfato de cálcio pode promover um aumento da angiogênese local (STROCCHI, *et al.*, 2002).

Com a disponibilidade no mercado da matriz óssea bovina composta (GenMix®), julgamos oportuno avaliar, comparativamente, as matrizes ósseas bovinas inorgânica, orgânica e composta, bem como um material aloplástico, o sulfato de cálcio, em defeitos ósseos produzidos em tíbias de coelhos.

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

A literatura revista está apresentada de forma cronológica, onde foram levantados estudos relevantes a respeito do tema abordado, proporcionando um embasamento técnico-científico para a realização deste experimento. Está dividida nos seguintes tópicos: estudo em coelhos; enxertos ósseos; matriz óssea inorgânica, matriz óssea orgânica, matriz óssea composta e sulfato de cálcio.

2.1 Estudo em coelhos

O coelho de laboratório (*Oryctolagus cuniculus*) pertence à classe *Mammalia*, ordem *lagomorpha*, família *leporidae* (coelhos, lebres) e gênero *Oryctolagus*. Dentre as espécies de coelhos, os da raça Nova Zelândia, são provavelmente os mais utilizados em pesquisas científicas, devido ao seu porte médio podendo atingir um peso máximo de 6 quilos. O esqueleto do coelho é relativamente frágil, este pesa cerca da metade de um gato do mesmo peso corporal. A tíbia é um osso longo do membro posterior, que em uma extremidade se articula com o fêmur e na outra com o tálus. Lateral e paralelamente a tíbia encontra-se a fíbula, que é um osso em forma de lâmina fina. A fíbula se funde com a tíbia distalmente em um pouco mais de metade do seu comprimento. As extremidades das tíbias, chamadas de epífises consistem de osso esponjoso coberto por uma fina camada de osso compacto, já o corpo do referido osso, é denominado diáfise, que consiste de osso compacto formando um cilindro oco com um espaço medular central, também chamado de cavidade medular. A metáfise é uma região delgada de transição que conecta a epífise com a diáfise (BREWER, 2006).

MARINI, *et al.*, (1992), avaliaram a combinação anestésica comumente utilizada para sedar coelhos, a ketamina (35 mg/kg) com xilazina (5 mg/kg) comparando com a adição de butorfanol (0,1 mg/kg) à essa mesma associação. Os coelhos foram anestesiados em semanas consecutivas, com uma das duas associações. Os parâmetros fisiológicos, incluindo frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão arterial e gasometria arterial (pH, pO₂, pCO₂) foram

mensurados durante a anestesia. Os reflexos foram testados e gravados, para posteriormente serem avaliados. A adição do butorfanol prolongou a perda de reflexo em 140%, e sua adição à ketamina e xilazina resultou em discretas alterações fisiológicas, tradicionalmente associadas com esta combinação.

Uma revisão da literatura a respeito das técnicas anestésicas para experimentação em coelhos foi realizada por FONSECA, *et al.*, (1996). Os autores enfatizaram sobre as vias de administração dos agentes anestésicos, medicação pré-anestésica, monitoração, técnicas para agentes de anestésicos injetáveis e cuidados pós-operatórios necessários. A medicação pré-anestésica é importante para reduzir a dor e o desconforto do animal, além de diminuir a quantidade de agentes anestésicos. A xilazina é um potente hipnótico não narcótico, um tranquilizante agonista-adrenérgico, de ação central com propriedades analgésicas de relaxamento muscular, por inibir os impulsos de transmissão intraneural. Proporciona boa sedação com moderada analgesia, porém não é indicada para ser usada isoladamente como agente anestésico no coelho, por promover hipotensão arterial importante e graves arritmias cardíacas. Além disso, potencializa a ação de muitas drogas anestésicas. Das drogas anestésicas destaca-se a ketamina que induz estado de sedação profunda, imobilidade e analgesia acentuada com efeito de anestesia dissociativa. Tende a estimular a função cardiovascular com aumento do débito cardíaco. Pode ser usada isoladamente como agente anestésico apresentando grande margem de segurança, porém é de uso limitado devido a alta incidência de apnéia e por não apresentar adequado relaxamento muscular. Uma técnica anestésica adequada para o coelho e bastante utilizada é a associação da ketamina com a xilazina, por manter um plano anestésico cirúrgico efetivo por cerca de 30 a 75 minutos. Tanto a ketamina quanto a xilazina são solúveis em água e podem ser misturados em uma mesma seringa. Após a aplicação intramuscular dessas drogas anestésicas é importante realizar o monitoramentos dos sinais vitais do animal.

2.2 Enxertos ósseos

O processo de reparo dos defeitos ósseos muitas vezes constitui um desafio aos profissionais que trabalham com cirurgia oral. Para contornar tal desafio, os

cirurgiões podem utilizar os enxertos autógenos e alógenos, contudo, estes apresentam restrições em relação à sua obtenção (Bone-grafting materials. Their uses, advantages and disadvantages, 2002; THORWARTH, *et al.*, 2006; TUDOR, *et al.*, 2008). Os enxertos xenogênicos de origem bovina e os aloplásticos têm sido utilizados com frequência e as pesquisas têm demonstrado em geral que esses biomateriais apresentam resultados promissores (STROCCHI, *et al.*, 2002; XU, *et al.*, 2004; PARK, *et al.*, 2009).

DUPOIRIEUX, *et al.*, (1994), avaliaram o efeito da esterilização da matriz óssea desmineralizada com óxido de etileno ou com calor (autoclave), sobre sua capacidade de formação óssea. Foram utilizados 30 ratos onde foram realizados defeitos ósseos no osso nasal e frontal, que foram preenchidos com os materiais em estudo. Após dois meses os animais foram sacrificados e a formação óssea avaliada através de análise macroscópica, radiográfica e histológica. O osso desmineralizado esterilizado com óxido de etileno promoveu formação óssea em 90% dos casos, enquanto que o esterilizado com calor não promoveu formação óssea em nenhum caso. Dessa forma a esterilização com óxido de etileno não interfere nas propriedades biológicas do enxerto ósseo.

A influência do tamanho das partículas dos biomateriais nas reações celulares, utilizando cultura de fibroblastos como modelo, foi verificada por HIGASHI; OKAMOTO, (1996). Nas culturas foram empregadas cerâmicas de hidroxiapatita porosa e densa, na forma de partículas com tamanhos de 300 e 40 μm . Essas foram mantidas na cultura de fibroblastos, derivados da polpa dental, por 7 dias. A reação celular foi observada pela microscopia de contraste de fase e pela microscopia eletrônica de varredura. Passados 7 dias, foi realizada uma contagem celular para avaliar a proliferação celular. De acordo com os resultados as partículas de hidroxiapatita de 300 μm estavam completamente cobertas pelos fibroblastos, ao contrário das partículas de 40 μm , onde um pequeno número de fibroblastos estava presentes. Nas partículas maiores (300 μm), as células proliferaram apenas ao redor das mesmas. Assim os autores apontaram que as partículas de hidroxiapatita densa de 300 μm podem ser consideradas um biomaterial mais apropriado, sendo que as partículas menores podem ser consideradas, pelo tecido, como um corpo estranho.

Ao realizar cirurgias parendodônticas em gatos, MAGUIRE, *et al.*, (1998), utilizaram 24 dentes de 12 animais, nos quais realizaram apicectomia e obturação retrógrada com MTA e antes do reposicionamento do retalho, oito cavidades foram cobertas com membrana reabsorvível, oito foram preenchidas com hOP-1 (proteína osteogênica humana) em um carreador de colágeno e as oito restantes não receberam nenhum tratamento, servindo como controles. Após 12 semanas os animais foram mortos e os espécimes devidamente preparados para análise histológica. Os resultados mostraram que os espécimes com membranas, apresentavam um grau significativamente maior de inflamação, adjacente às raízes seccionadas e que não houve um aumento significativo na formação óssea e de cimento com o uso das mesmas. Já com o outro material experimental, houve uma menor formação de cimento. Assim, baseados nesses resultados, os autores sugerem que o uso de membranas reabsorvíveis e o hOP não promovem um efeito positivo no reparo dos tecidos periapicais após cirurgia parendodôntica.

O risco de transmissão de encefalopatia espongiforme bovina através de enxertos derivados de ossos bovinos, utilizados para aplicações odontológicas, foi estudado por SOGAL; TOFE, (1999). O uso de xenoenxertos é uma opção muito prática, porém tem-se o receio da possibilidade de transmissão de doenças do gado para os humanos. Incidentes de encefalopatia espongiforme bovina (EEB) em seres humanos ressaltaram essa probabilidade. Os autores realizaram uma revisão da literatura sobre como avaliar o risco de transmissão da EEB, e dois modelos foram eleitos como aplicáveis para esse estudo. Um foi desenvolvido pelo Ministério Federal Alemão de Saúde e outro pela Associação Americana de Pesquisa Farmacêutica e Fabricantes. Os resultados das análises realizadas utilizando os dois modelos, mostraram que o risco de transmissão de doenças pelo enxerto ósseo bovino foi considerado insignificante, podendo ser atribuído aos protocolos rigorosos seguidos no fornecimento e processamento do osso de origem bovina. Com base na análise, é evidente que o risco de contrair a EEB a partir do enxerto de osso bovino é muito menor que o risco de morte por raios, tornados ou outros fenômenos do gênero. No entanto, este baixo risco só pode ser mantido enquanto um programa de gerenciamento efetivo e ativo continuar sendo aplicado ao processamento de tecidos xenogênicos de origem bovina.

BUCHAIM, *et al.*, (2002), avaliaram a reação tecidual frente ao implante do biomaterial Gen-phos[®], que consiste em hidroxiapatita sintética microgrânular (10-15 mm) e reabsorvível. Esse material foi implantado em cavidades de tíbias de ratos, que foram submetidos a uma dieta alcoólica. Um total de 60 animais foram utilizados, divididos em grupo controle, onde receberam uma dieta com água, e subdivididos em grupo C1 (cavidade cirúrgica com coágulo) e C2 (cavidade preenchida com Gen-phos) e grupo experimental com uma dieta com álcool etílico diluído na água, também subdivididos, em grupo E1 (cavidade cirúrgica com coágulo) e E2 (cavidade preenchida com Gen-phos). Após 10, 20 e 40 dias os animais foram mortos e as áreas dos implantes foram analisadas microscopicamente. Os resultados obtidos mostraram que com a dieta alcoólica, houve neoformação de tecido ósseo mais discreto em todos os espécimes e em todos os períodos. Aos 40 dias, tanto no grupo C2 (Gen-phos) e C1 (coágulo), as cavidades cirúrgicas estavam, completamente, preenchidas com tecido ósseo neoformado bem desenvolvido. A neoformação óssea foi mais favorável em alguns espécimes com a implantação da Gen-phos, aos 20 dias.

Em um estudo clínico prospectivo, GARRETT, *et al.*, (2002), avaliaram o reparo de defeitos ósseos periapicais após cirurgia parendodôntica, utilizando ou não membranas reabsorvíveis, para regeneração tecidual guiada. Neste estudo foram incluídos 25 pacientes que foram submetidos à cirurgia parendodôntica, sendo que o defeito ósseo estava limitado à região apical, e ao final do procedimento foi utilizado ou não uma membrana reabsorvível cobrindo o defeito. Os pacientes foram controlados radiograficamente durante 3, 6 e 12 meses, essas radiografias foram comparadas com a radiografia tomada imediatamente após a cirurgia, levadas a um “software” e realizada a análise da densidade óssea. Não houve diferença estatística do reparo entre os dois grupos. Os resultados sugerem que a colocação de uma membrana sobre a abertura óssea, após uma cirurgia parendodôntica, não trouxe nenhum efeito adicional sobre o reparo ósseo.

Um estudo comparativo microscópico sobre a capacidade osteocondutora do osso desproteínizado, com tamanhos diferentes de partículas (300-500 e 850-1000 µm) implantadas em coelhos submetidos ao procedimento de levantamento do seio maxilar, foi feito por XU, *et al.*, (2003). Ficou demonstrado que as partículas do referido osso, em ambos os tamanhos induziram, a osteocondução em uma semana

após o implante. Osso formou-se inicialmente na periferia com proliferação para o centro da cavidade. No grupo de partículas pequenas, o osso neoformado mostrou muitas interconexões e apareceu na maioria das amostras em 8 semanas após o implante. A análise histomorfométrica revelou, de modo significativo, maior neoformação de tecido ósseo, bem como maior densidade no grupo de partículas pequenas do que no grupo de partículas grandes, tanto em 4 e 8 semanas após o implante.

Ao realizar o levantamento do seio maxilar, utilizando osso desproteínizado, XU, *et al.*, (2004), avaliaram a reabsorção das partículas do material empregado. Para isso utilizaram uma matriz inorgânica alógena, a qual foi obtida a partir de ossos de dois coelhos machos adultos, realizando o preparo como descrito por Matsuda *et al.*(1995). Um total de 20 coelhos foram submetidos a enxertos para levantamento de seio maxilar bilateralmente, utilizando-se o coágulo de sangue (grupo controle) e partículas de osso desproteínizado (grupo experimental). Os animais foram mortos após 2, 4, 6, 8 e 10 semanas. Ao realizar a análise microscópica, os autores encontraram que após duas semanas o espaço obtido no levantamento de seio foi ocupado, por osso neoformado ou por tecido conjuntivo fibroso no grupo controle. A análise histomorfométrica mostrou que a altura conseguida no levantamento de seio foi significativamente maior no grupo experimental em todos os períodos. As partículas de osso desproteínizado foram reabsorvidas lentamente contribuindo para o aumento estável do assoalho do seio maxilar.

De acordo com PINTO, *et al.*, (2007), o osso autógeno é considerado o enxerto ideal, pois compõe-se de tecidos do próprio indivíduo e é o único entre os tipos de enxerto ósseo a fornecer células ósseas vivas imunocompatíveis, essenciais à fase I da osteogênese, que é responsável pela proliferação das células ósseas, em especial do osteóide; assim, quanto mais células vivas forem transplantadas, mais tecido ósseo será formado. Entretanto devido aos transtornos em obtê-lo, utilizam-se outros tipos de enxertos, tais como os xenógenos, que proporcionam diferenças antigênicas mais pronunciadas do que o osso alogênico, exigindo um tratamento mais vigoroso para prevenir sua rejeição. Os materiais chamados aloplásticos são alternativas para reconstruções faciais, os quais são subdivididos em reabsorvíveis ou não absorvíveis. Esse tipo de material vem

ganhando cada vez mais aceitação no mercado em razão do fácil uso e manipulação. Outros benefícios dos materiais aloplásticos são diminuição do tempo cirúrgico, além de múltiplos tamanhos e formatos disponíveis.

JARDIM, *et al.*, (2009), apresentaram um caso clínico de enxerto autólogo realizado na maxila de uma paciente na área do dente 14 perdido. Os exames clínico e complementar revelaram reabsorção óssea na região. A área da linha oblíqua externa foi escolhida como área doadora. Após determinado período foi instalado um implante osteointegrado, e com o controle radiográfico, ficou constatado o sucesso da terapia.

Um novo processo de esterilização de tecidos, denominado BioCleanse[®], foi desenvolvido para limpar e esterilizar tecidos de origem músculo-esquelética para a implantação. É um sistema de esterilização à baixa temperatura, que usa uma combinação de processos mecânicos e químicos. Avaliando os efeitos do processo BioCleanse sobre o osso cortical bovino sob diferentes modos de processamento e comparando com o osso cortical humano tratado de forma similar, KEMPER, *et al.*, (2010) observaram que o osso bovino tratado com o referido processo de esterilização, mantém propriedades biomecânicas favoráveis, quando comparado com o osso humano tratado de forma semelhante. Os resultados sugeriram que o osso bovino processado pode preservar as propriedades mecânicas necessárias para seu uso como enxerto.

PAPPALARDO, *et al.*, (2010), realizaram análise em microscópio eletrônico de varredura e microanálise de raios-x, buscando avaliar o efeito do tamanho do diâmetro das partículas do material na interação bio-molecular entre osteoblastos MG63 e quatro biomateriais (ácido polilático-glicólico, osso bovino desproteínizado, osso equino e matriz óssea humana desmineralizada) com diferentes tamanhos de partículas. De acordo com as observações feitas com o MEV e microanálise de raios-X, foi possível inferir sobre a influência das células MG63 sobre a morfologia, a capacidade proliferativa, a modalidade de adesão e diferenciação das referidas células influenciadas pelas diferentes estruturas dos biomateriais usados. Dos materiais estudados, a matriz óssea humana desmineralizada foi o melhor substrato para o crescimento ósseo, pois proporcionou uma adesão mais intensa e precoce das células MG63, que parece estar relacionada à presença do componente

orgânico, enquanto que o efeito osteoindutor seria atribuído, principalmente, à presença de BMP's.

2.2.1 Matriz óssea inorgânica

O osso bovino inorgânico (Bio-Oss[®]) foi utilizado para reconstruções ósseas em cirurgias faciais por HISLOP; FINLAY; MOOS, (1993). Foram empregados no estudo pacientes sindrômicos que apresentavam defeitos faciais hipoplásicos (grupo A), pacientes com necessidades de correções de deformidades pós-traumáticas (grupo B), pacientes submetidos a cirurgia ortognática (grupo C) e pacientes com necessidade de aumento de rebordo alveolar (grupo D). Após a utilização desse material, os pacientes foram controlados radiograficamente, e os resultados foram classificados como bom, satisfatório e insatisfatório. Os autores concluíram que a utilização do osso inorgânico se mostrou eficiente em cirurgias ortognáticas, embora o resultado para o aumento de rebordo alveolar tenha sido insatisfatória.

Utilizando o osso bovino inorgânico (Bio-Oss[®]) em defeitos periapicais, STASSEN, *et al.*, (1994) selecionaram 89 pacientes que necessitavam de cirurgia parendodôntica, que foram aleatoriamente divididos em dois grupos, no primeiro foi utilizado o osso inorgânico e no segundo foi mantido com coágulo sanguíneo. Foram avaliados entre 3 e 27 meses após as cirurgias, sendo classificados como sucesso ou insucesso. Os resultados indicaram um maior número de insucessos com a utilização de osso inorgânico e que estes ocorriam em um tempo menor, após as cirurgias, do que os controles. Dessa forma, os autores contra indicaram o seu uso em cirurgias na região apical.

CLERGEAU, *et al.*, (1996), avaliaram o potencial de reparo quando utilizado o osso inorgânico com colágeno em defeitos ósseos experimentais. Utilizaram oito cães, nos quais extraíram os terceiros pré-molares inferiores, e criaram defeitos ósseos no lado mesial do quarto pré-molar e no distal do segundo pré-molar e induziram inflamação e formação de placa com bandas de aço, que foram removidas após oito semanas. Essas lesões foram tratadas estabelecendo o grupo 1 (controle) com curetagem cirúrgica e o grupo 2 (experimental) com o uso de osso inorgânico com colágeno para preenchimento. Após 6, 18 e 36 semanas da cirurgia foram

obtidos espécimes de ambos os grupos, que foram examinados por microrradiografia. No grupo 1, não houve significativa regeneração nos três períodos experimentais; já, no grupo 2, observou-se significativa regeneração óssea nos períodos de 18 e 36 semanas. Foi verificada presença de anquilose em apenas dois espécimes. Este estudo evidenciou que a regeneração óssea em defeitos experimentais é favorecida pelo uso do osso inorgânico com colágeno.

Dos vários biomateriais que são empregados na clínica médico-odontológica, encontra-se a hidroxiapatita que é muito utilizada para o tratamento de lesões ósseas. Ela consiste em um sal de fosfato de cálcio com uma organização cristalina bastante complexa. A hidroxiapatita pode ser ou não reabsorvível. A hidroxiapatita reabsorvível é indicada para os casos onde necessita-se a sua substituição pelo tecido ósseo, sendo nestes casos, associada frequentemente à uma matriz orgânica de osso e membranas biológicas. Uma das características desse biomaterial, é que, é reabsorvido muito lentamente, mesmo quando possui partículas microgranulares, levando cerca de 4 a 6 meses para sua completa reabsorção, além disso é biocompatível e não tem ação antigênica devido ao fato de ser um material inorgânico. Já a hidroxiapatita não reabsorvível é indicada nos casos onde há grande perda de tecido ósseo e necessita-se o preenchimento do defeito ósseo (TAGA, 1996).

Os fatores de crescimento ósseo precisam ser carregados através de um sistema biocompatível, biodegradável e osteocondutor, de modo que os mantenha pelo tempo necessário no local. Este papel de carreador, pode ser desempenhado pelo osso bovino inorgânico. Assim YUKNA, *et al.*, (1998) avaliaram um peptídeo sintético (P-15) como célula de ligação, combinado com osso bovino inorgânico ou com o enxerto ósseo descalcificado, congelado e seco (DFDBA) em pacientes com defeitos ósseos periodontais. Os resultados sugeriram que o uso do peptídeo P-15 combinado com o osso bovino inorgânico produz melhores resultados clínicos. Além de manter as BMP's no local e fornecer uma estrutura de suporte e de osteocondução, a matriz inorgânica pode também prover um alto conteúdo de cálcio e fósforo, essenciais para a neoformação óssea.

Em 1999, BATISTA, *et al.*, testaram o osso bovino inorgânico em defeitos ósseos periodontais de 11 pacientes totalizando 26 defeitos pareados apresentando

profundidade de bolsa maior ou igual a 6 mm. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em dois grupos, o primeiro (controle) recebeu somente membrana e o segundo (teste) foi preenchido com osso bovino inorgânico e recoberto com membrana. Após seis meses houve uma melhora clínica significativa com diminuição da profundidade da bolsa e ganho de suporte periodontal, mas sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No entanto, verificou-se que o grupo controle apresentou recessão gengival significativamente mais pronunciada do que o outro grupo. Os autores concluíram que o osso bovino inorgânico pode ser utilizado associado à membrana para o tratamento de defeitos intra-ósseos, mas que seu uso não apresenta resultados significativamente melhores que o do uso isolado de membranas.

Um teste a respeito da biocompatibilidade do osso bovino desproteínizado preparados de duas formas, um aquecido a 100°C disponibilizado comercialmente (GenOx[®]) e outro a 1000°C (preparado no laboratório de Bioquímica da FOB-USP), foi realizado por OLIVEIRA, *et al.*, (1999). Esses materiais foram implantados em subcutâneos de ratos e, após 10, 20, 30 e 60 dias, os animais foram mortos e as peças removidas para processamento histológico. As análises microscópicas mostraram uma reação granulomatosa tipo corpo estranho de baixa renovação, contendo macrófagos e células gigantes multinucleadas em contato com o material, semelhante à implantação subcutânea de osso autógeno ou alógeno mineralizado. Ao final do período experimental não houve diferença significativa entre os materiais testados.

Comparando o xenoenxerto bovino desproteínizado, Bio-Oss[®], com o aloenxerto ósseo desmineralizado congelado (DFDBA) em defeitos infra-ósseos de humanos, RICHARDSON, *et al.*, (1999), utilizaram 17 pacientes saudáveis, sem doença sistêmica, mas com periodontite moderada a grave (7 homens e 10 mulheres, com idades entre 34-67). Cirurgicamente, somente foram incluídos defeitos infra-ósseos quando havia profundidade maior do que 3,0 mm. Os defeitos foram divididos aleatoriamente, sendo preenchidos com osso bovino inorgânico ou com DFDBA. A resolução do defeito foi de 59,4% para o grupo de DFDBA e 77,6% para o grupo do Bio-Oss.

Em 1999, YOUNG; SANDSTEDT; SKOGLUND, avaliaram o uso de osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) em defeitos na maxila e mandíbula de coelhos. Estes foram preenchidos com osso autógeno (grupo I), Bio-Oss (grupo II), osso autógeno + Bio-Oss (grupo III) e com coágulo sanguíneo (grupo IV). Após 12 semanas, os animais foram sacrificados e as áreas do defeito foram preparadas para análise histológica. Pode se observar que não houve diferença na resposta tecidual entre maxila e mandíbula. No grupo IV, o defeito estava preenchido com tecido fibroso com formação óssea somente nas bordas do defeito. O grupo I apresentou formação de novo osso ao redor das partículas, sendo que estas estavam sendo reabsorvidas por células multinucleares. Já com o grupo II, o osso neoformado foi detectado em contato com as partículas, mas estas não apresentavam sinais de reabsorção. Desta forma, os autores questionaram se o Bio-Oss pode ser classificado como um material reabsorvível.

No ano seguinte, AABOE, *et al.*, (2000), mostraram em seu estudo, implantes que foram fixados em tíbias de 9 coelhos, com o enxerto ósseo Bio-Oss® cobrindo toda a superfície do implante. Adicionalmente foram utilizados três diferentes membranas para cobrir o enxerto e o implante. As membranas utilizadas foram Poliglactina 910®, uma membrana dupla de colágeno (reabsorvível) e a membrana ePTFE (não-reabsorvível). Após 12 semanas, todos os implantes subperiosteais foram completamente osseointegrados. O Bio-Oss mostrou ser biocompatível e osteocondutor. As membranas ePTFE não apresentaram degradação, nem infiltração adjacente de células inflamatórias. A poliglactina 910 e as membranas duplas de colágeno reabsorveram ligeiramente. Não havia sinais de reabsorção da superfície do osso recém-formado sob a membrana de colágeno.

Observando histomorfometricamente a resposta de alvéolos humanos, de 15 pacientes, que foram preenchidos com osso bovino desproteínizado, após exodontia, ARTZI; TAL; DAYAN, (2000), mensuraram as dimensões ósseas no pós-operatório e após nove meses. Após o período final, os pacientes foram submetidos a uma nova cirurgia para a instalação de implante, e o fragmento ósseo retirado foi analisado histomorfometricamente. Observaram que houve neoformação óssea no alvéolo em 82,3% dos casos, as partículas do material foram observadas em todos os espécimes, houve maior deposição óssea na região apical, e quanto ao tecido conjuntivo se constatou o contrário, com maior concentração na região cervical. Os

autores concluíram que o osso bovino inorgânico é um material biocompatível e que o seu uso está indicado em alvéolos após extrações, para se manter o nível ósseo, porém mesmo após 9 meses pode-se encontrar partículas desse material indicando seu longo tempo de reabsorção.

ARTZI; TAL; DAYAN, (2001), avaliaram histoquimicamente alvéolos humanos preenchidos com osso bovino desproteinizado. Foram incluídos no estudo 15 pacientes, os quais tiveram os alvéolos preenchidos com Bio-Oss, imediatamente após exodontia. Após nove meses, por meio de uma trefina foi removido uma parte do enxerto, que foi processado para análise histoquímica. A análise revelou as características do osso neoformado, a relação do tecido lamelar nos diferentes níveis do alvéolo e a disposição do osso neoformado ao redor das partículas de osso bovino. De acordo com os resultados os autores verificaram que esse é um material biocompatível e que sua propriedade osteocondutora foi determinada pela integração do osso neoformado com as partículas do osso bovino, encontradas, ainda nove meses após a cirurgia.

Com o objetivo de investigar o reparo de defeitos ósseos em rebordo alveolar, preenchidos com osso bovino inorgânico, ZITZMANN, *et al.*, (2001), utilizaram seis pacientes parcialmente desdentados, com necessidade de aumento ósseo do rebordo alveolar, para a colocação de implante. Os defeitos, todos localizados na maxila, foram preenchidos com Bio-Oss® e cobertos com a membrana de colágeno reabsorvível Bio-Gide®. Foram realizadas biópsias dos locais, 6 e 7 meses após a enxertia. As partículas de Bio-Oss ocuparam 31% da área total. Um contato íntimo entre tecido ósseo e Bio-Oss foi detectada ao longo de 37% das superfícies de partículas. Os sinais de reabsorção do material foram observados, indicando que o material faz parte do processo de remodelação.

CAMARGO, *et al.*, (2002) estudaram o potencial de reparo ósseo quando utilizado o enxerto ósseo bovino inorgânico (Bio-Oss®) isoladamente ou associado ao plasma rico em plaquetas. Para o estudo foram incluídos 18 pacientes que apresentavam periodontite apical crônica. Os defeitos ósseos foram tratados com um dos protocolos, como citados anteriormente. Observaram que os dois tratamentos resultaram em significativa redução na profundidade da bolsa e ganho de inserção quando comparados aos valores prévios, porém ao compará-los, houve

diferença significativa, mostrando melhores resultados quando se utilizou uma associação.

Em 2002, INDOVINA; BLOCK, utilizaram o Bio-Oss® e dois tipos de sulfato de cálcio (BoneSource® e Embarc®) em alvéolos dentários de cães. Os animais foram mortos após 8 semanas, e as amostras foram encaminhadas para análise histológica. Com os resultados encontraram que no grupo controle (coágulo sanguíneo) e no Bio-Oss houve formação óssea significativamente maior do que nos grupos em que se utilizou o sulfato de cálcio. Também se observou que após dois meses houve resultados semelhantes entre o coágulo e o Bio-Oss, não havendo sua reabsorção.

Também em alvéolos, porém de humanos, preenchidos com enxerto ósseo bovino desproteínizado (Bio-Oss®) e membrana de colágeno (Bio-Gide®), foi observado o reparo. Foram utilizados 21 paciente nos quais foram empregados três tratamentos, utilizando somente membrana (grupo A), preenchimento com Bio-Oss (grupo B) e com coágulo sanguíneo (grupo C). Foram realizadas biópsias da área em estudo para avaliação microscópica. De acordo com os resultados, nos grupos A e C havia osso mineralizado e medular. No grupo B, após 7 meses havia a presença de partículas, que eram circundadas por pequenas quantidades de osso cortical e tecido conjuntivo. Havia aproximadamente 26% de osso lamelar, 8,4% de osso cortical, 26,2% de medular e 18,1% de partículas de Bio-Oss®, sendo que 40% dessas partículas estavam em contato com tecido ósseo neoformado (CARMAGNOLA; ADRIAENS; BERGLUNDH, 2003).

STAVROPOULOS, *et al.*, (2003), examinaram a influência, a longo prazo, do osso bovino inorgânico bovino (Bio-Oss®) e do vidro bioativo (Biogran®) na formação óssea. Foram usados 18 ratos, nestes foram feitas incisões ao longo da borda inferior da mandíbula, de modo a expor o ramo mandibular. Hemi-esferas de Teflon, com diâmetro interno de 6mm, estas foram preenchidas com osso bovino desproteínizado (grupo 1) ou com vidro bioativo (grupo 2) ou foram mantidas vazias, como controle (grupo 3), depois foram colocadas com sua parte aberta voltada para a superfície lateral do ramo. Os animais foram mantidos por um ano. Os espécimes foram submetidos à microscopia, buscando observar o volume de osso neoformado, partículas do enxerto e tecido conjuntivo frouxo no espaço originalmente criado pela

hemi-esfera. O volume médio de osso neoformado ocupou apenas 23% do espaço total em animais enxertados com Bio-Oss e 12,6% nos enxertados com Biogran. Nos animais controle, porém, 88,2% ($p < 0.01$) do espaço, foi preenchido com osso neoformado.

Para estudar detalhadamente o desempenho do osso bovino desproteínizado esponjoso em grânulos (Bio-Oss[®]), como material de enxerto ósseo, TADJOEDIN, *et al.*, (2003), realizaram análise histomorfométrica em amostra obtida de cinco pacientes tratados com esse material para a reconstrução da maxila severamente atrofica. Associado ao osso bovino, foram empregadas partículas de osso autógeno, em concentrações que progrediram de 20% a 100%, com o tempo de preservação de 5 a 8 meses. Os resultados mostraram que em todos os casos, os grânulos de osso bovino estavam interligados por pontes de osso neoformado. O volume de osso na área do enxerto se correlacionou inversamente com a concentração de osso bovino enxertado, variando entre 37% e 23%. No entanto, o volume total de material mineralizado ocorreu no mesmo intervalo em todos os cinco pacientes (entre 53% e 59%). Os autores constataram que a remodelação óssea foi muito ativa em todos os enxertos.

WORTH, *et al.*, (2005) utilizaram xenoenxerto de osso esponjoso bovino, para avaliar seu potencial osteocondutor, quando empregado em defeitos ósseos criados em ovinos. Para obter o enxerto xenogênico, cubos de osso esponjoso com 25mm, foram retirados a partir do côndilo femoral distal de ossos bovinos. Foram utilizadas 20 ovelhas, que foram submetidas ao procedimento cirúrgico para remoção, com trefina, de um cilindro de osso da tíbia. Nessas lojas cirúrgicas foram implantados cilindros de osso bovino com o mesmo diâmetro. Foi utilizado, também enxerto autógeno. Após a implantação cirúrgica do osso esponjoso, foi administrado fluorocromo a 12 ovelhas em 2 ½, 4 ½ e 8 semanas. A incorporação dos xenoimplantes foi avaliada radiograficamente durante 10 semanas. Radiograficamente, o grau de osteointegração foi comparável. Os dados histomorfométricos, confirmaram as propriedades osteocondutora de ambos materiais implantados. A remodelação foi maior nos xenoimplantes com 2 ½ semanas. Em 4 ½ semanas, houve uma maior atividade no enxerto autógeno, mas em 8 semanas ambos se comportaram de forma semelhante.

Uma análise microscópica acerca da resposta tecidual frente ao osso inorgânico bovino medular em microgrânulos, implantados em subcutâneo de rato, foi realizada por ZAMBUZZI, *et al.*, (2005). Para esse estudo foram utilizados 40 ratos que foram divididos em 2 grupos, um controle, nos quais foram implantados cápsulas de colágeno vazia, e outro teste com cápsulas de colágeno contendo 0,1g do biomaterial (GenOx®). Os animais foram mortos após 10, 20, 30 e 60 dias. Os espécimes foram preparados para serem avaliados microscopicamente. Aos 10 dias, observou-se infiltrado inflamatório crônico composto por macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias (CGMI). Outras células inflamatórias como neutrófilos, plasmócitos e linfócitos estavam presentes de maneira discreta, desaparecendo no transcorrer dos períodos mais longos. A porosidade do material foi preenchida pelo tecido conjuntivo reacional mostrando as CGMI. A fibrose foi mais intensa aos 60 dias e evidentemente superior ao grupo controle. Entretanto, o material não causou reações adversas severas, não estimulando a resposta imunológica.

JENSEN, *et al.*, (2006) avaliaram o reparo ósseo e a reabsorção de enxertos autógenos, osso bovino inorgânico e fosfato beta-tricálcio, quando utilizados em defeitos ósseos em mandíbula de minipigs. Foram utilizados 12 animais, e com uma trefina foi realizado um defeito com 9mm de diâmetro e 5 de profundidade no ramo da mandíbula, bilateralmente. Os animais foram sacrificados com 1, 2 4 e 8 semanas, e as amostras foram submetidas à análise microscópica. De acordo com os resultados, todos os grupos apresentaram neoformação óssea. Em 4 semanas o grupo com enxerto autógeno apresentou maior neoformação. Os dois materiais testados apresentaram resultados satisfatórios, mas retardaram o processo de reparo nos períodos iniciais. Foram biocompatíveis mantendo-se integrados com o osso neoformado.

STEIGMANN, (2006) em um estudo clínico, avaliou a viabilidade de usar uma barreira reabsorvível de colágeno feita de pericárdio bovino, juntamente com enxerto xenogênicos para aumentar rebordo alveolar para a subsequente colocação de implantes dentários. Foram selecionados 8 pacientes, apresentando ao todo, necessidade de colocação de 19 implantes, com espaço alveolar inadequado para a colocação dos mesmos. Cirurgicamente, os rebordos onde seriam instalados os implantes, foram aumentados colocando uma matriz óssea bovina inorgânica (Bio-

Oss[®] ou Navigraft[®]) e uma membrana de colágeno. Mensurações do tecido mineralizado (quanto largura e altura) par meio das imagens radiográficas foram realizadas durante a cirurgia inicial e após 6 meses, quando foi realizado uma nova cirurgia para a colocação dos implantes. Os resultados sugeriram que a membrana de colágeno do pericárdio pode ser muito útil para elevar o reparo de defeitos localizados no rebordo alveolar, juntamente com o uso de diferentes xenoenxertos.

THORWARTH, *et al.*, (2006) em um estudo prospectivo in vivo, analisaram a neoformação óssea após o uso de osso bovino desproteínizado com ou sem osso autógeno em defeitos ósseos. Foram utilizados 18 porcos adultos, onde foram criados 8 defeitos 10x10mm na calota craniana de cada animal. Esses defeitos foram preenchidos de forma alternada, com osso bovino inorgânico (Bio-Oss[®]), caracterizando o grupo A, e com uma mistura de Bio-Oss e 25% de osso autógeno (grupo B). Os animais foram mortos em ½, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 26 semanas, e as áreas em estudo foram analisadas por meio de microscopia ótica e da microradiografia. A análise histológica indicou osseointegração suficiente da matriz óssea bovina desproteínizada em ambos os grupos. A microradiografia demonstrou um aumento significativo na formação óssea no grupo B após 6 (P = .0159) e 8 semanas (P = .0317). Com isso os autores concluíram que a adição de 25% de osso autógeno resultou em uma formação óssea mais acelerada. Este efeito é provavelmente causado por propriedades osteoindutoras dos elementos celulares transplantado com o osso autógeno.

ZAMBUZZI, *et al.*, (2006) realizaram um estudo com o intuito de observar a resposta tecidual promovida pelo osso bovino inorgânico macrogranular, quando implantados em tecido subcutâneo de ratos. Para isso foram utilizados 40 animais que foram divididos em dois grupos, 20 receberam cápsulas de colágeno vazias e em 20 foram implantados cápsulas de colágeno com 0,1g de osso bovino inorgânico (GenOx[®]). Os animais foram mortos após 10, 20, 30 e 60 dias. Os tecidos subcutâneos ao redor das cápsulas foram removidos e processados para análise microscópica. Após 10 dias, no grupo controle ocorreu um infiltrado inflamatório granulomatoso rico em células gigantes multinucleadas e livre de linfócitos e células plasmáticas, também observado nos implantes de osso bovino desmineralizado. Em períodos posteriores, houve uma diminuição significativa do infiltrado inflamatório e aumento de fibrose ao redor das partículas implantadas. Os autores concluíram que

o material em estudo induziu um granuloma tipo corpo estranho e fibrose ao redor de suas partículas, quando implantado no subcutâneo de ratos, mas não desencadeou nenhuma resposta imune, sendo portanto biocompatíveis.

CARVALHO, *et al.*, (2007), avaliaram duas hidroxiapatitas de origem bovina (HAB) com granulometria de 150 a 200µm e de 300-329µm, e duas hidroxiapatitas sintéticas (HAS), com granulometria de 150 e 300µm, em relação ao reparo proporcionado em defeitos ósseos circulares em cães. Foram utilizados 8 cães, que em cada úmero receberam, bilateralmente, três defeitos ósseos criados com uma trefina. Cada defeito foi preenchido alternadamente com um dos materiais em estudo e o coágulo sanguíneo que serviu como controle. Quatro animais foram mortos após 6 semanas e os outros 4 após 12 semanas. As áreas em estudo foram submetidas à análise histológica e histomorfométrica (percentual de área ocupada por osso, medula óssea e os biomateriais). Pôde-se observar que os grânulos de HA apresentaram contato direto com o osso, independentemente da origem e do tamanho dos grânulos. Nos defeitos controles havia uma maior quantidade de infiltração de tecido conjuntivo. A difração de raios X revelou que as amostras de HA sintéticas testadas são altamente cristalinas, enquanto a HAB se mostrou com superfície mais rugosa, visualizada em MEV. A rugosidade da superfície da HAB parece favorecer o processo de osteocondução.

GARCIA, (2007) avaliou comparativamente, os fenômenos evolutivos do processo de reparo em alvéolos de ratos preenchidos, com osso medular bovino inorgânico (GenOx[®]) e a hidroxiapatita β TCP (GenPhos[®]) na proporção de 70% de HA e 30% de β -tricálcio fosfato. Foram utilizados 48 ratos divididos em 3 grupos, 16 ratos receberam o implante de osso bovino inorgânico e 16 ratos receberam o implante de hidroxiapatita (grupo III). Após 7, 15 e 30 dias pós-cirúrgico, os animais foram mortos. Os resultados mostraram que a HA- β TCP e o osso medular bovino inorgânico desempenharam, igualmente, as funções osteopreenhedora e osteocondutora no processo de reparo alveolar, em todos os períodos experimentais.

TUDOR, *et al.*, (2008) estudaram a neoformação óssea em defeitos reparados com matriz óssea humana (Puros) ou com uma matriz óssea de origem bovina (Navigraft), ambos comparados com o enxerto autógeno. Este estudo foi

conduzido em 9 porcos adultos, que foram mantidos por 1, 8 e 12 semanas. As amostras foram submetidas a análise microradiográfica e histológica. De acordo com o resultados, todos os três materiais testados promoveram um reparo completo dos defeitos até o final do período experimental. Após 12 semanas, a taxa de mineralização verificada microradiograficamente foi de 5% a 10%, inferior à mineralização do enxerto ósseo autógeno. De modo geral ambos materiais testados cumpriram as exigências clínicas para substitutos ósseos, promovendo uma regeneração previsível dos defeitos ósseos.

CALASANS-MAIA, *et al.*, (2009) avaliaram a biocompatibilidade e a osteocondução da matriz óssea medular de origem bovina. Para realizar o estudo utilizaram quinze coelhos, nos quais foram confeccionadas 3 perfurações de 2cm cada em ambas as tíbias. Cada tíbia recebeu dois materiais de enxerto (hidroxiapatita bovina) e um controle, assim uma cavidade foi preenchida com Osseous®, outra com Bio-Oss® e a terceira com coágulo sanguíneo. Os animais foram mortos depois de 7, 14 e 28 dias. Os fragmentos ósseos foram removidos e processados para análise histológica. De acordo com os resultados microscópicos, a interface do osso e biomaterial mostrou ligeira resposta inflamatória depois de 7 dias, mas que esteve ausente nos períodos subsequentes. Os dois materiais foram parcialmente substituídos por tecido ósseo diretamente em contato com a superfície dos materiais, sem ocorrência de fibrose.

Produtos derivados de tecidos bovinos geram a preocupação quanto a rastreabilidade da matéria-prima, o controle dos processos de fabricação e a garantia da biossegurança do material. Assim CARBONARI, *et al.*, (2009) caracterizaram com ensaios laboratoriais o BoneFill®, material produzido a partir de osso cortical bovino, consistindo em uma matriz inorgânica. Teste de hipersensibilidade, avaliação do potencial de citotoxicidade, ensaio de toxicidade aguda sistêmica, teste de irritação cutânea, ensaio de implante, teste de mutação gênica reversa e avaliação histológica de defeitos ósseos foram realizados para caracterização do material atendendo a exigência da ISO 10993. Esse material demonstrou ser eficaz, para ser utilizado como material de preenchimento de defeitos ósseos em animais.

HANDSCHEL, *et al.*, (2009) realizaram uma revisão da literatura, buscando mostrar qual seria o material mais adequado para o enxerto ósseo em casos de elevação do seio maxilar. A pesquisa da literatura foi realizada através da Biblioteca Nacional de Medicina, e abrangeu toda a literatura a respeito do tema em Inglês e Alemão desde 1995 até 2006, focando no tópico de volume de osso neoformado. Encontraram que em uma fase relativamente precoce após o implante o osso autógeno apresenta os maiores valores de neoformação óssea. Depois de nove meses nenhuma diferença estatisticamente significativa pode ser detectada entre os diversos materiais de enxerto. Do ponto de vista clínico, a utilização de osso autógeno é vantajoso se a reabilitação protética é esperada dentro de nove meses. Em outros casos, a utilização de osso bovino inorgânico em combinação com osso autógeno parece ser preferível.

Utilizando vários materiais de enxerto para o levantamento de seio maxilar em humanos, KIM, *et al.*, (2009) avaliaram a resposta tecidual promovida por uma mistura de osso autógeno e Bio-Oss® (grupo I), uma mistura de Bio-Oss e Orthoblast II® (grupo II), apenas Bio-Oss (grupo III) e no grupo IV apenas com uma matriz sintética, Osteon®. Para avaliar o reparo, amostras da área operada foram coletadas utilizando um trépano de 2,0 mm após 4 e 6 meses do procedimento cirúrgico. Foi observado um bom reparo quando o enxerto xenogênico ou sintético foram utilizados isoladamente. A mistura de osso alógeno com xenógeno não mostrou melhora no reparo. De acordo com os resultados, os enxertos xenogênicos ou sintéticos podem ser considerados eficazes para enxerto ósseo no levantamento do seio maxilar.

PARK, *et al.*, (2009) observaram a capacidade de reparo empregando um novo material para enxerto ósseo, o N-HA (material a base de hidroxiapatita derivada da casca de ovos de galinha). Para o estudo, realizaram defeitos ósseos de 8mm de diâmetro em calvária de ratos, essas cavidades foram preenchidas com N-HA, Bio-Oss (matriz óssea bovina inorgânica) e N-HA associado com sulfato de cálcio. Após 6 e 12 os espécimes foram avaliados microscopicamente quanto a porcentagem de neoformação óssea. De acordo com os resultados, os autores encontraram que o grupo com N-HA apresentou maior reparo ósseo nos dois períodos (11,2% em 6 semanas e 19,2% em 12 semanas), o grupo controle (coágulo) apresentou 3,9% e 6,4%, o grupo com Bio-Oss teve 6,4% e 8,2% e o

grupo N-HA com sulfato de cálcio apresentou 6,3% e 12,6% de neoformação óssea em 6 e 12 semanas respectivamente. O sulfato de cálcio não melhorou o reparo quando comparado com o N-HA sozinho.

BERNABÉ, *et al.*, (2010) realizaram uma avaliação microscópica, quanto ao processo de reparo proporcionado pelo uso de membrana, material de enxerto ósseo e MTA em cirurgia paraendodôntica em cães. Para isso, foram utilizados 48 dentes de cães, nos quais foram induzidos a lesões periapicais, para que posteriormente, em uma única sessão fosse realizado o tratamento endodôntico convencional, concomitantemente com a cirurgia paraendodôntica. No último procedimento referido, foi realizado apicectomia do dente tratado endodonticamente e confeccionando o retropreparo com pontas ultra-sônicas, preenchendo-o com MTA. As lojas cirúrgicas foram mantidas apenas com coágulo sanguíneo (grupo I), com coágulo porém recoberta com membrana de cortical bovina (grupo II). Nos demais espécimes, as cavidades foram preenchidas somente com matriz óssea bovina (grupo III) ou recoberta com membrana (grupo IV). Após 180 dias os animais foram mortos e a região de estudo foi submetida à análise microscópica. Os resultados mostraram que o infiltrado inflamatório, o reparo periapical e o comportamento do MTA, foram o mesmo em todos os grupos, incluindo o estímulo de mineralização. Com isso os autores concluíram que o uso da membrana, enxerto ósseo ou sua associação, não influenciou o processo de reparo, após o retropreparo preenchido com MTA.

ROCHA, *et al.*, (2010), buscaram estudar a resposta do osso bovino inorgânico isolado ou associado ao plasma rico em plaquetas, quando enxertados em calotas ósseas de coelhos. Para isso utilizaram 12 animais nos quais os defeitos confeccionados foram preenchidos com osso bovino inorgânico (GenOx[®]), com a mesma matriz óssea porém associada ao PRP ou mantidos apenas com coágulo sanguíneo (controle). Após 4 semanas os animais foram mortos e as áreas em estudo foram processadas e analisadas microscopicamente. Assim puderam observar que no grupo controle o defeito foi preenchido com tecido fibroso que acompanhava o periosteio e pequena neoformação óssea na periferia do defeito. Já nos dois grupos experimentais houve formação óssea na periferia e em alguns casos no centro do defeito, com presença moderada de células gigantes e osso

formado em contato com as partículas do enxerto, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

2.2.2 Matriz óssea orgânica

URIST, (1965) realizou alguns experimentos com osso desmineralizado por meio de diferentes ácidos. Essa matriz orgânica foi implantada em músculo de camundongos, ratos, coelhos. Além disso, ainda utilizou em defeitos ósseos de coelhos, cães e humanos. O uso de 0.6N de ácido clorídrico para a desmineralização proveu matrizes com resultados satisfatórios, essas foram revascularizadas e reabsorvidas rapidamente, enquanto que a neoformação óssea ocorria às custas da proliferação de células osteoprogenitoras. De acordo com os resultados o autor concluiu que essa matriz óssea apresentou a propriedade de induzir a diferenciação de células indiferenciadas em células osteoprogenitoras com a neoformação óssea.

REDDI; HUGGINS, (1972) avaliaram a matriz óssea desmineralizada, utilizando como protocolo de desmineralização o emprego de ácido hidrocloreídrico, e como solvente orgânico o álcool absoluto e o éter dietil anidro. Testes físico-químicos foram realizados e essa matriz foi implantada em tecido muscular de ratos. Os animais foram avaliados microscopicamente por um período de até 21 dias. Após 24 horas o material implantado já havia sido envolvido por fibroblastos. Sob as condições do estudo os autores observaram que alteração do fenótipo fibroblástico para condroblastos, foi uma transformação instável, ao passo que a mudança do fenótipo, fibroblastos para osteoblastos, manteve-se estável. Essa transformação ocorreu por meio de uma série de eventos sequenciais. As medições de atividade de fosfatase alcalina e da incorporação de sulfato radioativo, fósforo e cálcio foram sensivelmente e quantitativamente determinantes para o surgimento de cartilagem e osso.

KÜBLER, *et al.*, (1993) avaliaram as propriedades da matriz óssea desmineralizada ao comparar com osso somente liofilizado. Por meio da microscopia eletrônica de varredura ficou evidenciada a remoção do fosfato de cálcio inorgânico e a manutenção das fibras colágenas. Testes mecânicos mostraram que a liofilização aumentou o módulo de elasticidade, bem como a resistência à

compressão. Quanto mais desmineralizado e reidratado mais macio, flexível e menor resistência à compressão apresentava. Os espécimes obtidos longitudinalmente ou perpendicularmente ao longo eixo da diáfise apresentaram diferenças nos testes mecânicos. Esses materiais foram implantados em músculos de ratos e mantidos por seis semanas. O osso desmineralizado mostrou condrogênese e osteogênese em 50% dos espécimes, enquanto que o osso apenas liofilizado não induziu formação de cartilagem e tampouco de osso. Entretanto o osso desmineralizado induziu uma maior resposta inflamatória. Quando o osso desmineralizado foi implantado em ratos imunosuprimidos não houve reação inflamatória e a condrogênese foi observada em 94% dos espécimes. A formação de cartilagem também foi testada em culturas de células neonatais de músculo de rato. Neste experimento, 68% dos espécimes que receberam osso desmineralizado apresentaram formação de cartilagem, enquanto que não houve condrogênese nos espécimes que receberam osso sem tratamento e osso liofilizado. Assim, estes resultados indicam que o osso desmineralizado apresenta a propriedade de osteoindução.

CONCANNON; BOSCHERT; PUCKETT, (1997) avaliaram a capacidade de reparo ósseo em defeitos confeccionados em fêmures de coelhos, utilizando como material de enxerto o osso desmineralizado, produzido em laboratório com matéria prima obtida de outros coelhos. Foram utilizados 55 animais, nos quais foram criados defeitos segmentares de 1cm no fêmur, que foi estabilizado com placas de titânio, o espaço entre os remanescentes ósseos foram preenchidos seguido o seguinte protocolo: grupo 1- preenchimento com osso desmineralizado alógeno e permanência da estabilização por 12 meses, grupo 2- preenchimento com osso desmineralizado alógeno e remoção da estabilização após oito semanas, grupo 3- controle, nada foi colocado no espaço removido e grupo 4- preenchimento com osso autógeno. Todos os animais foram controlados radiograficamente e após 12 meses foram mortos para se realizar a análise microscópica. Em todos os animais que receberam o osso desmineralizado o espaço foi totalmente preenchido com osso neoformado após 6 a 8 semanas. Porém o osso desmineralizado não foi tão eficiente quanto o osso autógeno.

RABIE; WONG; HÄGG, (2000), observaram o processo de reparo ósseo proporcionado pelo enxerto autógeno associado com matriz óssea desmineralizada

de origem intramembranosa (MOD-IM) ou endocondral (MOD-EC). Para a pesquisa, utilizaram 20 coelhos, realizando 35 defeitos no osso parietal, que foram preenchidos com osso endocondral autógeno (EC) em 5 defeitos, com osso endocondral autógeno misturado com MOD-IM em 5 espécimes (EC/ MOD-IM), 5 defeitos foram preenchidos com osso intramembranoso autógeno (osso parietal) misturado com MOD-IM (IM/MOD-IM), seis foram preenchidos com osso endocondral autógeno misturado com MOD-EC (EC/MOD-EC). Além disso 10 defeitos foram mantidos apenas com coágulo sanguíneo e 4 foram preenchidos com colágeno. Após 14 dias os animais foram mortos e as peças foram submetidas à análise microscópica. Houve maior quantidade de osso neoformado no grupo IM/MOD-IM seguido do grupo EC/MOD-IM, EC/MOD-EC e somente osso endocondral, havendo diferença estatisticamente significativa quando comparados os três primeiros com o último. Nos grupos controle, não houve neoformação óssea.

Buscando verificar se a idade apresenta alguma influência sobre o reparo de defeitos ósseos, quando tratados com osso desmineralizado de origem xenogênica, TORRICELLI, *et al.*, (2002), utilizaram em sua pesquisa 18 ratos com duas idades distintas, 3 meses (jovens) e com 18 meses (idosos). Em todos os animais foram confeccionados defeitos ósseos com 2mm de diâmetro, que foram preenchidos com matriz óssea orgânica em grânulos ou foram mantidos apenas com coágulo sanguíneo. O uso da matriz óssea mostrou um aumento significativo na formação óssea nos animais com as duas idades. A análise de microdureza mostrou que o osso formado, apresentou dureza trabecular semelhante ao tecido ósseo adjacente. Essa matriz óssea xenogênica foi efetiva na neoformação. Já o fator idade parece ter interferido no volume de osso neoformado, mas não apresentou influência na maturação óssea.

CARNEIRO, (2003), avaliou microscopicamente, o efeito do tamanho das partículas de matriz de osso medular bovino desmineralizado, nas formas micro e macrogranular, no processo de reparo ósseo em defeitos criados em fêmures de coelhos. Após, 1, 3 e 6 meses da implantação dos materiais, os animais foram mortos e a análise microscópica apontou reação granulomatosa do tipo corpo estranho envolvendo as partículas do material implantado, sugerindo que houve falhas na manufatura do material. O autor concluiu que o tamanho das partículas

não influenciou no processo de reparo dos defeitos, além disso atuaram apenas como substâncias osteopreenchedoras .

SANADA, *et al.*, (2003) testaram a biocompatibilidade de blocos cilíndricos de matriz de osso bovino esponjoso desmineralizado (Gen-Ox[®]), quando implantados em músculo de 30 ratos. Os animais foram sacrificados após 3, 7, 14, 21 e 28 dias, o local do enxerto foi radiografado e as peças removidas foram submetidas ao processamento histotécnico. A análise microscópica mostrou que nos períodos de 3 e 7 dias havia um processo inflamatório agudo, caracterizado pela presença de neutrófilos, reabsorção do coágulo sanguíneo e angiogênese. Entre 14 e 21 dias, verificou-se a reabsorção da matriz implantada por células mononucleadas, poucas células gigantes e sua substituição por tecido conjuntivo fibroso rico em vasos e células. Aos 28 dias, na maioria dos casos, observou-se apenas pequenos fragmentos de matriz implantada envolto por tecido conjuntivo. Radiograficamente, não se notou evidências de mineralização. Com base nos resultados obtidos o enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco mostrou-se biocompatível e reabsorvível quando implantado em tecido conjuntivo, sem qualquer indício de ocorrência de osteogênese ectópica, ou seja, não tem capacidade osteoindutora.

SUMMITT; REISINGER, (2003), analisaram as propriedades mecânicas do osso desmineralizado em função do tempo de saturação ácida e métodos de processamento e esterilização, utilizando amostras de diferentes regiões anatômicas. Foram realizados testes para verificar o efeito da saturação ácida, as propriedades viscoelásticas, deformação, fadiga e para os efeitos do processo de esterilização. Os resultados deste estudo mostraram que o osso desmineralizado tem força suficiente, mesmo após a esterilização, para suportar carga e tem propriedades viscoelásticas. Suas propriedades mecânicas permitem que ele tenha várias aplicações médicas.

BETTI, (2004), avaliou o reparo ósseo em defeitos de tamanho não crítico preenchidos com osso bovino orgânico em bloco ou em microgrânulos. Foram confeccionados defeitos ósseos em fêmures de coelhos. Desses, 15 defeitos foram preenchidos com matriz óssea em bloco (grupo I), 15 com matriz óssea em microgrânulos (grupo II) e 15 com coágulo sanguíneo (controle). Os animais foram

mortos 30, 90 e 180 dias após a cirurgia. Na análise microscópica, após 30 dias, o grupo experimental II apresentou algumas partículas de material em reabsorção e também uma ligeira maior quantidade de osso trabeculado que os outros grupos. Neste período, enquanto os grupos experimentais apresentaram o defeito preenchido completa ou parcialmente com osso trabeculado, o grupo controle apresentou invaginação do tecido conjuntivo para o interior de defeito. Após 90 dias todos os grupos mostraram intensa remodelação do osso trabeculado neoformado, que foi substituído por osso lamelar. Após 180 dias as amostras apresentaram um reparo semelhante. Por meio da análise radiográfica não houve diferenças estatisticamente significante entre o osso em bloco e granulado.

Em 2004, MARINS, *et al.*, pesquisaram a capacidade da matriz óssea bovina orgânica em bloco (GenOx[®]) em promover o reparo. O estudo foi realizado em calvária de 25 ratos, confeccionando um defeito com 8mm de diâmetro, que foi preenchido com o referido material em estudo ou mantido apenas com coágulo sanguíneo. Na maioria dos animais tratados, o material foi reabsorvido lentamente e serviu como um arcabouço, favorecendo a angiogênese, migração e adesão celular. A neoformação óssea ocorreu a partir das bordas da lesão. No entanto, uma reação tipo corpo estranho ocorreu, com a presença de inúmeras células gigantes, que inibiu a neoformação óssea local, dois animais do subgrupo de 1 mês e em um animal do subgrupo de 3 meses. Esses casos foram interpretados como resultantes da ausência de desmineralização e da falta de retirada de potenciais fatores antigênicos durante a produção do biomaterial.

DA CRUZ, *et al.*, (2007), analisaram por meio da microscopia eletrônico de varredura (MEV) a morfologia, o tamanho e a composição química de materiais do osso bovino orgânico cortical e esponjoso em micropartículas e macropartículas, osso cortical inorgânico bovino, hidroxiapatita e osso humano desmineralizado, congelado e seco. Para a análise da composição química, as partículas não foram metalizadas e foram analisadas por espectroscopia por dispersão de energia (EDS). De acordo a análise em MEV, observou que o tamanho de muitas partículas não condiziam com o mencionado pelo fabricante e a análise por EDS revelou elementos que são comuns à composição do tecido ósseo, porém revelaram a presença de elementos minerais nas partículas de osso bovino orgânico. Os autores sugeriram que o osso bovino orgânico não pode ser considerado um material orgânico puro.

Em 2008, BIGHAM, *et al.*, realizaram uma avaliação radiológica, histopatológica e biomecânica da matriz óssea desmineralizada de origem xenogênica e da matriz óssea autógena, quando implantadas em osso de coelho. Foram realizadas radiografias da área após 1 dia, 2, 4, 6 e 8 semanas. Os autores encontraram que os testes estatísticos não revelaram diferenças significativas entre os dois grupos no quesito de formação óssea pela avaliação radiológica. Tanto a avaliação histopatológica quanto a biomecânica não revelaram diferenças significativas entre os dois grupos.

MURUGAN; RAMAKRISHNA; RAO, (2008), realizaram um estudo laboratorial de modo a processar e caracterizar, bioquímica e fisicamente, a constituição da matriz óssea bovina desmineralizada. Essa matriz foi obtida a partir de tíbia de bovinos adultos, realizando um protocolo de desmineralização, com a utilização de ácidos e álcoois. Foram realizados testes físicos e bioquímicos, utilizando como ferramentas de análise a microscopia eletrônica de varredura e um espectrofotômetro, além de uma análise térmica por meio de varredura diferencial de calorimetria. De acordo com os resultados, observaram que as análises espectroscópicas e térmicas indicaram o processo de desmineralização, portanto não havia partículas minerais associadas com o tecido conjuntivo em ambos os testes. O tamanho das partículas e sua distribuição favorecem uma melhor osteoindução.

BIGHAM, A.S., *et al.*, (2009) avaliaram a matriz óssea desmineralizada de origem bovina (MOBD) e uma nova matriz, extraída de ossos fetais bovinos, sobre o processo de reparo ósseo. Foram utilizados 20 coelhos, nos quais foram criados defeitos no osso radio, que foram preenchidos com MOBD (n=10) e com a matriz óssea bovina fetal (n=10). Os animais foram mortos após 8 semanas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Radiograficamente, bem como na avaliação histopatológica e biomecânica. Os resultados deste estudo indicaram que houve um reparo satisfatório dos defeitos ósseos com ambos materiais estudados.

O efeito do osso bovino e humano orgânicos e de uma resina de poliuretano derivada do óleo da mamona, sobre o processo de reparo ósseo quando implantados em calvária de coelhos, foi avaliado por LAUREANO FILHO, *et al.*,

(2009). Para isso utilizaram 18 animais, nos quais 6 receberam osso bovino desmineralizado (Osseobond[®]), 6 animais receberam um enxerto com osso humano desmineralizado (Dembone[®]) e em 6 animais foi utilizado o polímero da mamona (Aug-Ex[®]). Os animais foram mortos após 7 e 15 semanas. De acordo com a análise microscópica, em todos os grupos, houve um aumento na neoformação óssea com o decorrer do tempo. Os autores concluíram que todos os materiais experimentais se mostraram biocompatíveis, mas o poliuretano foi reabsorvido mais lentamente, apresentando melhores resultados que os enxertos ósseos orgânicos.

ZHUKAUSKAS, *et al.*, (2010) avaliaram o reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico criados em tíbias de coelhos, utilizando como materiais de enxerto o BioSet RT, um aloenxerto composto por matriz óssea desmineralizada e o ProOsteon 500R, uma hidroxiapatita extraída de corais e para o grupo controle, os defeitos foram mantidos com coágulo sanguíneo. Foram utilizados 32 animais, que foram mortos após 1 dia, 6, 12 e 24 semanas ao procedimento cirúrgico, e as amostras foram analisadas microscópica e radiograficamente. Os autores constataram que ambos materiais foram biocompatíveis e os defeitos apresentaram significativa neoformação óssea. Após 12 semanas o BioSet RT demonstrou radiograficamente um fechamento do defeito em 10 de 14 defeitos; já o ProOsteon 500RT apresentou 1 em 14. Após 24 semanas ambos materiais apresentaram um completo fechamento do defeito, constatado microscopicamente também não houve diferença estatística significativa na análise radiográfica. Dessa forma, ambos materiais foram biocompatíveis e propiciaram a neoformação óssea, utilizando esse modelo experimental, ressaltando que o BioSet RT proporcionou um reparo ósseo em um menor tempo que o ProOsteon 500R.

2.2.3 Matriz óssea composta

DA COSTA FILHO; TAGA; TAGA, (2001), avaliaram os efeitos de uma matriz óssea bovina composta sobre a osteogênese na medula óssea de tíbia de coelhos. Foram empregados cilindros de titânio que foram preenchidos com os materiais e implantados cirurgicamente na tíbia de coelhos, de modo que, os biomateriais entrassem em contato somente com a medula óssea. Os materiais utilizados foram uma matriz composta por hidroxiapatita (HA) contendo um pool de BMP's associado

com osso bovino desproteínizado (grupo 1), HA com osso bovino desproteínizado (grupo 2) e somente coágulo sanguíneo (grupo 3). Após 67 dias, os animais foram mortos, e as peças foram processadas para análise microscópica. O grupo 2 formou significativamente maior quantidade de tecido ósseo dentro do cilindro, seguido pelo grupo 1 e pelo controle negativo, não havendo diferença estatisticamente significativa entre estes dois últimos grupos. Desta maneira, concluíram que o pool de BMP's e as proteínas não colágenas do osso teve um efeito inibitório sobre a osteogênese e que os biomateriais sem as BMP's, particularmente o osso bovino desproteínizado, proporcionaram um substrato favorável à formação óssea.

RAFTER, *et al.*, (2002), avaliaram o reparo em perfurações de furca, com o uso ou não de uma matriz interna. Foram utilizadas duas matrizes, Hapset® (65% de hidroxiapatita não-absorvível e 35% de gesso Paris) e a hidroxiapatita. No estudo foram empregados 4 babuínos (*Papioanubis*) como modelos experimentais, sendo realizadas perfurações de furca nos dentes molares e pré-molares, estas perfurações foram preenchidas com Hapset, que serviu como um arcabouço, para um preenchimento do trajeto da perfuração com amálgama (grupo 1). No grupo 2 foi realizado da mesma forma porém com a hidroxiapatita como matriz. No grupo 3 não foi colocada matriz, somente amálgama. Como controle positivo a perfuração não foi selada (grupo 4), e como controle negativo, não foi feita perfuração (grupo 5). Os animais foram mortos após 1 semana, 1, 3 e 7 meses. Ficou constatado que quando o amálgama foi utilizado sozinho, sem matriz, houve acentuada extrusão do material para o osso subjacente associado com uma resposta inflamatória grave, que continuou durante todo o período de observação. Quando uma matriz foi utilizada, houve uma resposta aguda inflamatória inicial que diminuiu com o tempo, sendo que, após 7 meses, 75% dessas amostras estavam com ausência de inflamação. Não houve diferença significativa na resposta tecidual frente aos diferentes materiais utilizados como matriz. Tanto o Hapset quanto a hidroxiapatita foram encapsuladas por tecido conjuntivo nas fases iniciais seguido por deposição óssea em contato direto com os materiais.

O reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico (8mm) em calvária de ratos, foi estudado por FERREIRA, *et al.*, (2004) utilizando um enxerto ósseo bovino composto Gen Pro®, que é composto por um "pool" de proteínas morfogenéticas bovinas, ligado a hidroxiapatita sintética absorvível microgranulada. Defeitos

mantidos apenas com coágulo sanguíneo foram estabelecidos como controle. Após 1, 3 e 6 meses as áreas em estudos foram analisadas microscopicamente. No grupo experimental, após 1 e 3 meses, os defeitos estavam preenchidos por tecido conjuntivo fibroso e inúmeros focos de reação granulomatosa, tipo corpo estranho, ao redor de aglomerados de hidroxiapatita. Aos 6 meses os focos de reação granulomatosa tipo corpo estranho diminuíram em número e tamanho. A utilização desse material neste modelo de estudo, promoveu a formação de reação granulomatosa tipo corpo estranho e inibiu profundamente a neoformação óssea. Assim os autores sugeriram, que a hidroxiapatita sintética microgranular não é um bom carreador para as BMP's expressarem o seu potencial indutor.

MUNHOZ, (2005) avaliou uma associação de matriz óssea bovina inorgânica, orgânica, colágeno e BMP (Gen-tech®) como material de enxerto em alvéolos de terceiros molares inferiores de humanos. Foram incluídos no estudo 39 pacientes entre 15 e 25 anos de idade que possuíam terceiros molares inferiores não-irrompidos bilateralmente, com indicação para extração. Após as extrações, um dos lados foi mantido apenas com coágulo (grupo controle) e o outro lado (grupo experimental) recebeu o enxerto do material proposto associado à utilização de membrana (Gen-derm®). A análise radiográfica constituiu de medidas da distância da crista óssea alveolar à junção amelo-cementária, além da densidade radiográfica. As tomadas radiográficas periapicais digitais foram realizadas no transoperatório, pós-operatório imediato, e depois de 60 e 180. Os resultados demonstraram que houve uma diminuição na medida da distância da crista óssea alveolar à junção amelo-cementária significativa ao longo dos períodos analisados, porém não houve diferença entre os grupos. Com relação à medida de densidade, houve um aumento significativo ao longo do tempo nos dois grupos e significativamente maior no grupo experimental, porém não significativo, comparando os grupos nos períodos de tempo separadamente. Entretanto, não se pode afirmar que esse aumento se deve a neoformação óssea ou a radiopacidade do material ainda presente.

TEIXEIRA, *et al.*, (2007) estudaram os aspectos clínicos, radiográficos e histológicos do reparo ósseo em defeitos segmentares criados em tíbias de ovino. Foram utilizados doze carneiros jovens, onde criaram um defeito de 3,5 centímetros na diáfise da tíbia direita, mantendo o perióstio. Esses defeitos ósseos foram estabilizados com uma placa óssea combinada com uma gaiola de titânio. No G1 a

gaiola foi preenchida com enxerto ósseo cortical autógeno particulado. No G2, as gaiolas foram preenchidas com um enxerto ósseo bovino composto que consiste de osso bovino inorgânico, osso bovino orgânico, proteínas morfogenéticas e aglutinante de colágeno. Os animais foram avaliados radiograficamente no dia da cirurgia e após 15, 30, 60 e 90 dias, sendo que após os 90 dias os animais foram mortos e as peças foram processadas para análise microscópica. O exame radiográfico mostrou a formação inicial de calo periosteal em ambos os grupos no local da ostectomia após 15. Aos 60 e 90 dias ocorreu uma remodelação do calo. Análise microscópica mostrou que a quantidade de materiais implantados no G1 e G2 foram semelhantes e a quantidade de neoformação óssea foi menor e mais imaturo no G1 do que no G2.

A neoformação óssea proporcionada por um xenoenxerto bovino composto comparado com o enxerto autógeno, quando aplicados em cirurgia de levantamento de seio maxilar em coelhos, foi avaliada por SICCA, *et al.*, (2008). Foram utilizados 18 coelhos, nos quais foi realizado o levantamento do seio maxilar bilateralmente. No esquerdo foi colocado cerca de 200mg de enxerto autógeno cortico-medular triturado, e no seio direito foi utilizado o Gen-Tech[®]. Os animais foram sacrificados após 2, 4 e 8 semanas, foram realizadas tomografias das peças para analisar a densidade óptica entre os grupos. Posteriormente foi realizada uma análise microscópica. De acordo com os resultados da tomografia, houve uma densidade máxima no período de duas semanas em ambos os grupos. A análise microscópica mostrou que houve infiltrado inflamatório apenas no período de duas semanas no grupo teste, exclusivamente em torno do componente orgânico do biomaterial. Em relação à neoformação óssea, não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos em todos os períodos.

ARAÚJO; LINDHE, (2009) realizaram um estudo avaliando o efeito, a longo prazo, sobre a formação e o volume de tecido ósseo, promovido por um enxerto xenogênico implantado em alvéolos de cães. Nos animais, os terceiros pré-molares foram seccionados ao meio e suas raízes distais foram removidas, enquanto que os canais mesiais foram obturados convencionalmente. Um enxerto composto de 90% de osso bovino desproteínizado e 10% de colágeno, Bio-Oss[®] collagen, foi colocado preenchendo os alvéolos do quadrante esquerdo, enquanto que do lado oposto permaneceram apenas com coágulo sanguíneo. Após 6 meses, os cães foram

mortos e as áreas do estudo foram analisadas microscopicamente. De acordo com os resultados encontrados, a colocação do Bio-Oss colagen no alvéolo logo após a extração serviu como uma barreira impedindo a invaginação de tecido conjuntivo, mas não aumentou a neoformação óssea, comparando com o grupo controle. Porém as dimensões do alvéolo foram mais bem preservadas no grupo experimental.

GONÇALVES, *et al.*, (2009) avaliaram quatro casos clínicos onde um xenoenxerto bovino composto foi empregado para regeneração da perda óssea. Três casos de alvéolos dentais pós-extração atraumática e um caso de procedimento de elevação de seio maxilar usando técnica de reposição lateral, objetivando a colocação de implante, foram tratados com xenoenxerto composto. Quatro a oito meses, previamente à colocação de implante, as áreas enxertadas foram re-operadas e biópsias ósseas removidas por broca trefina. Após seis meses da colocação dos implantes, os elementos protéticos estiveram em função e mostrando sucesso clínico. A análise histológica das biópsias mostrou ausência de infiltrado inflamatório e presença de tecido ósseo neoformado fora e dentro de poros e fendas do biomaterial. O xenoenxerto foi biocompatível e permitiu a aposição de novo osso, indicando seu uso antes da colocação de implantes osteointegrados.

STEIN; SILVA; DA SILVA, (2009) avaliaram o reparo ósseo promovido por três matrizes e o enxerto ósseo autógeno, em fêmures de ratos. Para o estudo foram utilizados 14 ratos, nos quais foram realizados 2 defeitos em cada fêmur, assim no mesmo animal, esses defeitos foram preenchidos com osso autógeno particulado, hidroxiapatita (HA), Genphos[®] (HA + β -TCP) e GenMix[®] (osso bovino composto). Os animais foram mortos após seis e doze semanas, e as amostras submetidas a análise microscópica. Os autores encontraram que o enxerto autógeno proporcionou um reparo ósseo muito superior nos dois períodos experimentais, seguido pelo GenMix, Genphos e hidroxiapatita.

PRATA, (2010) realizou uma avaliação histomorfométrica sobre o reparo ósseo após o enxerto com uma associação de osso autógeno e/ou osso bovino composto (Gen-Mix) associados a células-tronco mesenquimais em defeitos ósseos produzidos pela extração dental de ratos. 108 ratos foram divididos em 6 grupos sendo os alvéolos preenchidos apenas com sangue, sendo controle (c); osso autógeno (oa); Gen-Mix (G-mix); célula-tronco (ctr) – o defeito ósseo foi preenchido

por sangue e células- tronco obtidas da medula óssea; osso autógeno + células-tronco (oa+ctr); Gen-Mix + células-tronco (Gmix+ctr). Os animais foram sacrificados após 7, 21 e 42 dias (n=6) e as amostras teciduais foram processadas para a obtenção de secções de 5µm e coradas com HE. Por meio de um sistema de análise de imagens se estimou a fração de volume do osso trabecular (%) ao redor do enxerto no interior do alvéolo. Os resultados histológicos mostraram que os materiais enxertados apresentaram uma osteointegração progressiva e sem reação de corpo estranho. O grupo enxertado com GenMix isoladamente ou associado às célula- tronco produziu menor formação de osso, ao passo que, o osso autógeno sozinho ou associado às células-tronco foi superior em volume de tecido ósseo em relação aos demais grupos. Concluíram que o osso autógeno e o GenMix isoladamente ou associados às célula- tronco foram biologicamente compatíveis desenvolvendo osteointegração progressiva e que o osso autógeno foi superior no processo de reparo. Estes resultados ainda sugerem que a associação das células-tronco aos enxertos ósseos acelerou a neoformação óssea, principalmente quando associadas ao osso autógeno.

STAVROPOULOS; WIKESJÖ, (2010) estudaram a influência das dimensões do defeito periodontal no reparo e regeneração, quando os defeitos intraósseos foram preenchidos com osso bovino desproteínizado associado com matriz de colágeno para promover regeneração tecidual guiada. Para o experimento foram utilizados 3 cães nos quais tiveram o segundo, terceiro e quarto pré-molares inferiores bilateralmente extraídos. Após 4 meses, defeitos intra-ósseos em forma de caixa foram criados na face mesial. A raiz mesial cirurgicamente exposta foi raspada com curetas para remover o ligamento periodontal e o cimento. Nos defeitos foram implantados osso bovino inorgânico com matriz de colágeno (Bio-Oss Collagen®) e coberto com uma membrana de colágeno (Biogide®). Após 18 dias de preservação os animais foram mortos, sendo realizado uma análise microscópica da área. De acordo com os resultados, um novo cimento abrangeu todo o dente em ambos defeitos intraósseos. Um ligamento periodontal com largura e composição semelhante à do ligamento periodontal normal envolvendo o defeito foi observada. Os autores constataram por meio da metodologia empregada que a reabsorção radicular ou anquilose foi rara.

2.3.4 Sulfato de cálcio

SOTTOSANTI, (1992), avaliou o uso do sulfato de cálcio como barreira para regeneração tecidual guiada, por meio de quatro casos clínicos. Nestes foram utilizados uma associação de osso alógeno congelado desmineralizado e sulfato de cálcio hemi-hidratado, numa proporção de 80% e 20%, respectivamente, e sobre esse material foi aplicada uma barreira de sulfato de cálcio, devido ao fato deste material ser biocompatível e por atuar como uma barreira física, impedindo a invasão de tecido conjuntivo e epitelial. De acordo com os resultados, o sulfato de cálcio quando utilizado como barreira em regeneração tecidual guiada, e associado ao enxerto ósseo alógeno congelado desmineralizado, retarda a invasão dos tecidos epitelial e conjuntivo, permitindo um prognóstico favorável para o reparo ósseo.

A regeneração óssea em função do sulfato de cálcio foi avaliada por PECORA, *et al.*, (1997). Para realizar o estudo foram utilizados 40 ratos, nos quais foram criados defeitos ósseos do tipo túnel com 5mm de diâmetro bilateralmente, no ângulo da mandíbula, sendo divididos em dois grupos, no lado direito, discos de sulfato de cálcio com 2 mm de espessura foram implantados na periferia dos defeitos, tanto por vestibular quanto por lingual, já no lado esquerdo, foi mantido apenas com coágulo. Os animais foram sacrificados em 3, 9, 18 e 22 semanas. Por meio de análise microscópica os autores encontraram que no grupo teste em 3 semanas, 6 amostras apresentavam reparo ósseo parcial e 3 já apresentavam total. Com 9 semanas, 6 amostra possuíam formação óssea completa e 3 parcial, sendo este resultado similar com 18 e 22 semanas. Apenas dois espécimes do grupo controle mostraram completo reparo do defeito ósseo, e isso em 22 semanas. No grupo teste se observou uma contínua ponte formada entre as duas margens do defeito ósseo, enquanto que no grupo controle mostrou invasão do defeito por tecido conjuntivo. Os autores concluíram que a barreira de sulfato de cálcio pode conter a invaginação de tecido conectivo, permitindo que haja reparo ósseo satisfatório.

A hidroxiapatita e o sulfato de cálcio foram empregados em perfurações de furca, por ALHADAINY, *et al.*, (1998). Para o estudo foram realizadas perfurações na região de furca na câmara pulpar de 72 dentes de 9 cães. Foram divididos em 3 grupos com 24 perfurações cada, sendo que no grupo 1 as perfurações foram

seladas com ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond), no grupo 2 foram preenchidas com hidroxiapatita e no grupo 3 com sulfato de cálcio. Adicionalmente 36 dentes foram utilizados como controle. Os animais foram sacrificados após 1, 3 e 6 meses. A resposta tecidual dos materiais testados foi avaliada clínica, radiográfica e microscopicamente. Os autores observaram que os casos reparados com hidroxiapatita mostraram o maior sucesso radiográfico, sendo seguido pelo sulfato de cálcio e ionômero de vidro. Na avaliação microscópica, a taxa média de reparo foi de 67% para o sulfato de cálcio, 62% para a hidroxiapatita e 59% para o ionômero de vidro. Não houve diferença significativa entre a hidroxiapatita e o sulfato de cálcio quando utilizados como materiais seladores de perfurações. O uso de um material como plug para forração pode não ser necessária quando cimentos de ionômero de vidro modificado por resina são usados.

O efeito do sulfato de cálcio, sobre o reparo de defeitos intra-ósseos, foi investigado por KIM, *et al.*, (1998). Os autores realizaram a extração dos primeiros e segundos incisivos superiores de cães, e após 2 meses realizaram defeitos ósseos na região mesial aos terceiros incisivos superiores, bilateralmente. Em um lado os autores preencheram o defeito com sulfato de cálcio e no outro foi mantido apenas o coágulo sanguíneo. De acordo com os resultados os autores observaram que no grupo experimental o sulfato de cálcio proporcionou um efetivo reparo, pois agiu especialmente como uma barreira evitando a invaginação do epitélio juncional para a região apical, favorecendo ao local o processo de reparo.

DE LEONARDIS; PECORA, (2000), realizaram a elevação do seio maxilar utilizando o sulfato de cálcio. Para a pesquisa foram incluídos 57 pacientes no quais foram divididos em dois grupos, sendo o primeiro o grupo controle com 12 pacientes (15 seios) nos quais após o levantamento de seio a cavidade foi preenchida com sulfato de cálcio, que foi levado em passo único, no outro grupo o experimental com 45 pacientes (50 seios) o sulfato de cálcio foi colocado em camadas. Amostras do tecido ósseo neoformado na elevação do seio maxilar foram retiradas para a instalação de implantes, após 9 meses. Essas amostras foram submetidas a análise microscópica. No grupo teste houve neoformação de tecido ósseo conforme a reabsorção progressiva do sulfato de cálcio. Somente algumas partículas de sulfato de cálcio foram observadas após 6 meses, e praticamente não foi detectada após 9 meses. De acordo com a análise histomorfométrica, no grupo teste houve uma maior

densidade de tecido ósseo. Os autores concluíram que o sulfato de cálcio é um material efetivo para a técnica de elevação do seio maxilar e que a técnica aplicada no grupo teste proporcionou melhores resultados.

GOLDMAN, *et al.*, (2000), avaliaram clínica e radiograficamente o reparo de cavidades patológicas da mandíbula e maxila, utilizando o sulfato de cálcio isoladamente ou associado ao osso bovino liofilizado. Foram incluídos no estudo 14 pacientes com lesões periapicais localizadas na maxila ou mandíbula, destes, em 10 lesões com aproximadamente 1,5cm de diâmetro foi utilizado sulfato de cálcio, e nas lesões com aproximadamente 2cm foram preenchidas com sulfato de cálcio associado ao osso bovino liofilizado. Os pacientes foram acompanhados durante 6 meses, sendo que em 30 dias após a cirurgia, a epiteliação ocorreu normalmente em todas as amostras, com ausência de edema e dor. Radiograficamente pode observar que a deposição óssea ocorreu da periferia para o centro da lesão, sendo que os demais aspectos radiográficos apresentavam-se normais.

PECORA, *et al.*, (2000), utilizaram o sulfato de cálcio como material osteopreenchedor em cirurgia parendodôntica. No estudo foram incluídos 20 pacientes que necessitavam de intervenção cirúrgica para o tratamento de lesões presentes que se estendiam sobre a raiz, classificadas como lesões do tipo II. Após apicectomia, foi realizado o retropreparo com ultrassom e a obturação retrógrada foi feita com Super EBA. O sulfato de cálcio foi colocado de modo a preencher toda loja cirúrgica. O controle radiográfico foi realizado com 3, 6, 9 e 12 meses após a cirurgia, e estas radiografias foram avaliadas por três endodontistas. De acordo com os resultados após 6 meses, houve reparo completo em 70% dos casos, em 20% incompleta, 5% incerta e 5% insatisfatória.

O sulfato de cálcio utilizado como material osteopreenchedor no tratamento cirúrgico de lesões ósseas do tipo túnel, estendidas da cortical vestibular a lingual, foi avaliado por PECORA, *et al.*, (2001). Vinte pacientes foram incluídos no estudo, pois apresentavam algum dente mostrando evidência radiográfica de lesão periapical em torno de 10mm, que atingiam da cortical vestibular a lingual. Foram divididos em 2 grupos de 10 dentes cada. No grupo experimental os dentes foram tratados com apicectomia, retrobturação com Super EBA e a lesão óssea foi preenchida com sulfato de cálcio. No grupo controle se procedeu da mesma forma,

porém a lesão óssea foi preenchida apenas com coágulo sanguíneo. Para a avaliação foram realizados exames radiográficos antes da cirurgia, logo após e depois de seis e doze meses. Os resultados mostraram que no grupo experimental sete dentes tiveram uma recuperação completa e dois incompleta. Já no grupo controle três dentes tiveram recuperação completa, cinco incompleta e uma insatisfatória, sendo que um elemento de cada grupo foi excluído e extraído por fratura vertical. De acordo com autores, o uso do sulfato de cálcio na terapia cirúrgica convencional de lesões que se estendam da lamina óssea vestibular até a lingual pode contribuir para a melhora dos resultados clínicos.

MURASHIMA, *et al.*, (2002), avaliaram o efeito do sulfato de cálcio como material osteopreenchedor em cirurgia parendodôntica. Para o estudo foram utilizados terceiros e quartos pré-molares de 11 cães, os quais foram tratados endodonticamente e realizada cirurgia de apicectomia, onde o preparo foi feito com ultrassom e a obturação retrógrada feita com Super EBA. Para este experimento foram preparados três tipos de defeitos ósseos. Os defeitos classificados como tipo 1, comunicavam-se com a sulco gengival na raiz mesial do terceiro pré-molar, os do tipo 2 envolviam a raiz distal do terceiro pré-molar e a raiz mesial do quarto pré-molar, já os do tipo 3 eram realizados na raiz distal do quarto pré-molar, estendendo-se da cortical óssea vestibular até a lingual (defeitos do tipo túnel). Os defeitos ósseos do lado experimental foram preenchidos com sulfato de cálcio e os do lado opostos, ficaram apenas com o coágulo sanguíneo, servindo como controle. Os animais foram sacrificados após oito e dezesseis semanas, sendo submetidos à análise microscópica. Nos defeitos do tipo 1, não observaram a formação óssea em nenhum dos grupos, já nos defeitos do tipo 2 e 3 o sulfato de cálcio apresentou resultados significativamente maiores que no grupo controle. O sulfato de cálcio foi efetivo para a regeneração óssea de defeitos extensos incluindo os do tipo túnel, porém foi menos efetivo em defeitos que comunicavam com o sulco gengival.

STROCCHI, *et al.*, (2002) realizaram um estudo em coelhos avaliando a densidade de microvasos em locais tratados com sulfato de cálcio e osso autógeno, usando ou não membranas e-PTFE. Para a realização do mesmo, foram utilizados 9 coelhos e nestes foram criadas três cavidades de 6mm de largura em cada metáfise das tíbias totalizando 54 defeitos. Os defeitos foram divididos em três grupos, sendo que no grupo 1 foram preenchidos com sulfato de cálcio e recobertos com a

membrana e-PTFE, no grupo 2 foram preenchidos apenas com sulfato de cálcio e o grupo 3 recebeu osso autógeno. Os animais foram sacrificados 4 semanas após o experimento, e as amostras foram avaliadas em relação a presença e a quantidade de vasos sanguíneos através do método DVM (densidade de microvasos). Os autores encontraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo que foi encontrado uma maior quantidade de vasos no grupo 1, seguido pelo grupo 2 e 3. Assim, a presença de mais vasos sanguíneos nos locais tratados com SC pode explicar os bons resultados apresentados na literatura.

YOSHIKAWA, *et al.*, (2002), se propuseram estudar os efeitos de membranas reabsorvíveis, não-reabsorvíveis e do sulfato de cálcio no processo de reparo ósseo. Para o estudo foram utilizados terceiros e quartos pré-molares inferiores de cães, bilateralmente, que foram tratados endodonticamente, para depois serem apicectomizados. As cavidades retrógradas foram preparadas e seladas com Super EBA. Para selar a cavidade óssea foram estabelecidos cinco grupos. Nos grupos A, B e C as cavidades foram cobertas respectivamente com membranas e-PTFE, PLGA e membranas colágenas. No grupo D foram preenchidas com sulfato de cálcio e o grupo E manteve-se apenas com coágulo sanguíneo, que serviu como controle. Os animais foram mortos após 4, 8 e 16 semanas, e as amostras foram analisadas microscopicamente. No grupo em que se usou a membrana e-PTFE apresentou um volume ósseo significativamente maior, mas a concavidade da cortical neoformada foi menor que no grupo controle. O sulfato de cálcio foi reabsorvido em 4 semanas, o reparo ósseo foi similar a do grupo com membrana e-PTFE e superior ao controle.

CHOGLE; MICKEL, (2003), realizaram uma avaliação *in vitro* das propriedades antibacterianas das barreiras utilizadas na regeneração tecidual guiada. Para realizar o estudo os autores utilizaram três barreiras usadas na regeneração tecidual guiada, sendo elas o ácido polilático (Atrisorb), osso laminar e o sulfato de cálcio, comparando-os por meio de um teste de difusão no ágar, para verificar a inibição do crescimento da *Prevotella nigrescens* e *Enterococcus faecalis*. Foram utilizadas placas de ágar sangue sendo divididas em dois grupos, no primeiro grupo, 20 placas foram inoculadas com *P. nigrescens* num ambiente anaeróbio estéril, enquanto no segundo grupo, 20 placas foram inoculadas com *E. faecalis*. Em cada placa, seções de 5,0 mm cada, foram colocadas de tal forma que cada placa ficasse com os três materiais em testes. As placas do grupo do *P. nigrescens* foram

incubadas em uma câmara anaeróbica, durante 7 dias. As placas do grupo *E. faecalis* foram incubadas a 37 ° C durante 2 dias. De acordo com os resultados, nenhuma zona de inibição foi observada com osso laminar ou sulfato de cálcio. Porém zonas de inibição foram observadas com o Atrisorb, em ambos os grupos. A zona de inibição para o *P. nigrescens* foi significativamente maior do que a zona de inibição para o *E. faecalis*. Assim a hidrofobicidade do Atrisorb e seus componentes N-metil-2-pirolidina foram sugeridas como as fontes de sua atividade antibacteriana.

AICHELMANN-REIDY; HEATH; REYNOLDS, (2004), realizaram um estudo sobre o sulfato de cálcio di-hidratado quando empregado em defeitos periodontais. O estudo contou com 19 pacientes que apresentavam periodontite crônica, nos quais dois defeitos infra-ósseos foram comparados, sendo assim divididos em dois grupos. Os do grupo 1 foram preenchidos com material alógeno desidratado congelado desmineralizado (DFDBA) e recobertos com a membrana e-PTFE, já os do grupo 2 foram preenchidos com uma mistura de DFDBA e sulfato de cálcio numa proporção de 4:1 e coberto com uma barreira de sulfato de cálcio. Os resultados mostraram que o sulfato de cálcio, quando usado combinado com DFDBA e utilizado como barreira, clinicamente melhorou muito o reparo dos defeitos infra-ósseos, tanto na redução da profundidade de sondagem, nos ganhos de nível de inserção clínica, quanto no preenchimento dos defeitos. Os autores indicam que para esse tipo de tratamentos o sulfato de cálcio, quando combinado com o osso alógeno, é uma boa alternativa para a membrana e-PTFE.

APAYDIN; TORABINEJAD, (2004) buscaram avaliar o efeito do sulfato de cálcio em relação à deposição do cimento e tecido ósseo após cirurgia periodontal em cães. Para o estudo utilizaram 25 dentes sendo segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores, os quais receberam tratamento endodôntico e após duas semanas, foram realizadas apicectomias, sendo o preparo apical realizado com ultrassom e as cavidades preenchidas com MTA. Para preencher os defeitos ósseos, em um lado foi utilizado o sulfato de cálcio hemi-hidratado (Capset, LifecoreBiomedical) e no outro foi mantido apenas o coágulo sanguíneo, permanecendo como controle. Após 4 meses os animais foram mortos e o local em estudo foi analisado microscopicamente. Os resultados mostraram que o sulfato de cálcio não apresentou efeitos negativos, porém não intensificou o reparo

alveolar ou dentoalveolar, outro ponto observado foi que ele não altera significativamente as propriedades do MTA.

Os efeitos do uso do sulfato de cálcio no processo de reparo ósseo em alvéolos humanos, foi avaliado por GUARNIERI, *et al.*, (2004), durante 3 meses. Com o intuito de reduzir a perda de volume ósseo após a extração dentária, favorecendo uma futura instalação de implante, os autores avaliaram 10 pacientes que foram submetidos a extração de 10 dentes unirradiculados, destes respectivos alvéolos 5 foram preenchidos com sulfato de cálcio e 5 mantidos com coágulo sanguíneo. Após 3 meses de preservação, amostras do osso alveolar neoformado foram retiradas por meio de uma broca trefina. Estas amostras foram encaminhadas para análise microscópica, onde os autores encontraram a ausência do sulfato de cálcio, bem como a formação de tecido ósseo sem diferença estatística significativa entre as áreas apical, média e coronal.

A eficácia clínica de um composto para enxerto ósseo, recoberto por uma barreira de sulfato de cálcio, foi avaliada por HARRIS, (2004). Para realizar o estudo o autor selecionou 100 pacientes que apresentavam defeitos periodontais infra-ósseos. Estes passaram pela terapêutica periodontal básica, para que fossem realizadas as cirurgias para o cobrimento das falhas ósseas. Os defeitos foram preenchidos com um composto contendo um volume aproximado de 75% de DFDBA (matriz óssea alógena), 15% de sulfato de cálcio, 5% de hidroxiapatita e 5% de tetraciclina. Para cobrir esse material foi colocada uma barreira de sulfato de cálcio com aproximadamente 2mm. Os casos foram preservados em média por 5,2 meses onde ao decorrer desse tempo foram avaliadas, a profundidade de sondagem, o nível de inserção e a recessão do tecido marginal. De acordo com os resultados o autor concluiu que este composto utilizado juntamente com a barreira de sulfato de cálcio, melhorou significativamente os parâmetros clínicos observados durante o período pós-operatório.

ORSINI, *et al.*, (2004), por meio de um estudo experimental em coelhos avaliaram o reparo de defeitos ósseos utilizando partículas e pasta de sulfato de cálcio. Para realizar o estudo foram utilizados 8 coelhos, onde em cada animal foram realizados 2 defeitos ósseos de 6 mm, na metáfise tibial, bilateralmente. Os defeitos na tíbia direita foram preenchidos com pasta de sulfato cálcio, enquanto os defeitos

na esquerda foram preenchidos com partículas de sulfato de cálcio. Os animais foram sacrificados após 2 e 4 semanas. No primeiro período foi possível observar uma intensa atividade osteoblástica. Após duas semanas, o sulfato cálcio ainda estava presentes no dois grupos. Já após quatro semanas, o sulfato de cálcio foi praticamente reabsorvido por completo e substituído por osso neoformado, e em nenhum dos espécimes foram verificadas células inflamatórias presentes. De acordo com os resultados os autores não identificaram diferença na resposta tecidual, com as duas formas de sulfato de cálcio utilizadas.

STUBBS, *et al.*, (2004) utilizaram tíbia de coelhos como modelo experimental para analisar a resposta do sulfato de cálcio utilizado individualmente ou associado a uma hidroxiapatita de coral. Foram utilizados 54 coelhos, onde realizaram um defeito em cada tíbia, estes foram preenchidos somente com hidroxiapatita (Pro Osteon 200 R[®]), hidroxiapatita associada a uma pasta de sulfato de cálcio (Osteoplast[®]), pasta de sulfato de cálcio isoladamente, e dois grupos preenchidos com sulfato de cálcio peletizados (Osteoplast[®] e Osteoset[®]). Os animais foram avaliados após 3, 6, 12, 24, 36 e 52 semanas. A amostras foram analisadas radiograficamente e por meio de microscopia óptica e eletrônica. Os autores encontraram que o sulfato de cálcio tanto em pasta como em pelets, atua como um arcabouço para a neoformação óssea, porém o reparo ósseo completo não foi observado, devido sua rápida reabsorção. Os autores sugerem que o sulfato de cálcio na forma de pasta pode melhorar a manipulação das partículas dos substitutos ósseos, como o Pro osteon 200 R, que permaneceu como um andaime osteocondutor por até 52 semanas e podem ter desempenhado um papel importante no fechamento da janela cortical.

MELO, *et al.*, (2005), por meio de análise microscópica, avaliaram a influência do vidro bioativo, sulfato de cálcio ou a combinação destes, quando utilizados em defeitos ósseos criados em tíbias de ratos. Para a pesquisa foram utilizados 64 ratos divididos em 4 grupos, de acordo com o material utilizado para preencher a cavidade, sendo estabelecido, grupo C (controle, coágulo), grupo SC (sulfato de cálcio), grupo VB (vidro bioativo) e grupo VB/SC (vidro bioativo com barreira de sulfato de cálcio). Os animais foram mortos após 10 e 30 dias. Nos animais com 10 dias observou que no grupo C houve maior formação óssea que nos demais grupos, porém sem diferença estatística significativa entre os grupos experimentais. Já com 30 dias o grupo C também demonstrou maior formação óssea, já os grupos com

sulfato de cálcio apresentaram uma formação óssea significativamente maior que o vidro bioativo. Os autores acreditam que estes resultados foram encontrados devido ao sulfato de cálcio ser reabsorvido mais rapidamente que o vidro bioativo, proporcionando assim um ingresso mais rápido de células osteoprogenitoras.

O enxerto ósseo autógeno com ou sem barreira de sulfato de cálcio, empregado no tratamento de lesões de furca classe II em cães, foi microscopicamente avaliado por DELIBERADOR, *et al.*, (2006). No estudo foram utilizados segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores de cães, onde lesões de furca classe II foram criadas cirurgicamente e imediatamente tratadas. Os dentes tratados foram divididos em três grupos, sendo que no grupo controle as lesões foram mantidas somente com o coágulo sanguíneo, em outro grupo as lesões foram preenchidas com osso autógeno e no terceiro grupo as lesões foram preenchidas com osso autógeno e recoberto com uma camada de sulfato de cálcio. Os animais foram mortos após 90 dias, e mensurações do tecido periodontal formado foram realizadas, para se obter a porcentagem de tecido formado em relação ao defeito original e depois as amostras foram submetidas à análise microscópica. De acordo com os resultados os autores observaram que a regeneração periodontal nos três grupos foi similar, e que o reparo ósseo e a formação de tecido conectivo nas lesões de furca foi incompleta na maioria dos espécimes, sem diferença estatística significativa entre os grupos. Os autores concluíram que a recuperação periodontal foi similar no enxerto de osso autógeno com ou sem barreira de sulfato de cálcio em tratamento de lesões de furca classe II.

PETERS, *et al.*, (2006) avaliaram os efeitos biológicos do sulfato de cálcio como material osteopreenchedor em defeitos. Para isso os autores criaram defeitos de tamanho crítico na metáfise da tíbia e do fêmur de 5 ovelhas, sendo dois defeitos em cada osso. Esses defeitos foram divididos em 4 grupos, sendo 3 experimentais e 1 controle, distribuídos aleatoriamente. Dessa forma, um grupo recebeu sulfato de cálcio em pastilhas (Osteoset®), outro o osso autógeno, outro o osso alógeno e por fim um grupo que foi preenchido apenas com coágulo sanguíneo, permanecendo como controle. Após 12 semanas os animais foram mortos e a área em estudo analisada microscopicamente. Com os resultados os autores observaram que estatisticamente não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, mas que estes apresentaram maior quantidade de osso neoformado do que no

grupo controle, e concluíram que em defeitos metafisários o sulfato de cálcio pode ser um substituto ao enxerto ósseo.

CONEGLIAN, (2007) avaliou o processo evolutivo de reparo ósseo frente ao sulfato de cálcio e à hidroxiapatita. O estudo foi realizado em 48 ratos, os quais foram extraídos o incisivo central superior direito, e os alvéolos foram preenchidos com os materiais em estudo. Dessa forma, o grupo I foi o controle, onde os alvéolos foram mantidos somente com o coágulo sanguíneo, já no grupo II os alvéolos foram preenchidos com sulfato de cálcio di-hidratado e no grupo III implantou-se a hidroxiapatita CTCP GenPhos. Os animais foram mortos após 7, 15 e 30 dias, as hemimaxilas removidas foram processadas para serem submetidas à análise microscópica. De acordo com os resultados, o processo de reparo alveolar aos 7, 15 e 30 dias, ocorreu de forma semelhante entre os grupos, destacando-se diferença significativa quanto a neoformação óssea, aos 15 dias, entre os grupos controle e hidroxiapatita BTP GenPhos. No período de 30 dias, a evolução da neoformação óssea foi semelhante para todos os grupos.

MAEDA, *et al.*, (2007) avaliaram, microscopicamente, o reparo tecidual de cavidades cirúrgicas em fêmures de coelho, preenchidas com sulfato de cálcio. Para o estudo foram avaliadas três formulações do sulfato de cálcio disponíveis no mercado, sendo elas o sulfato de cálcio di-hidratado da Merck (grupo 1), Capset da Lifecore-EUA (grupo 2) e Surgiplaster da Classimport-Itália (grupo 3). Para testá-los foram confeccionadas 2 cavidades de 5mm de diâmetro por 8mm de profundidade em cada epífise femoral de cada animal utilizado no experimento, essas cavidades foram preenchidas de acordo com os grupos citados e como controle algumas cavidades foram mantidas apenas com coágulo sanguíneo. Os tempos experimentais foram 30, 60, 90 e 180. Assim as epífises coletas foram preparadas para análise microscópica, onde os autores observaram que, de modo geral houve neoformação óssea em todos os grupos estudados, independente da marca comercial do sulfato de cálcio, destacando os grupos 1 e 2 que em 30 dias apresentou a formação de tecido conjuntivo fibroso, que ocupou parcialmente a área central do defeito, não apresentando calo ósseo. Já o grupo 3 apresentou duas pequenas faixas de tecido ósseo primário, onde no interior havia tecido conjuntivo sendo substituído por tecido mielóide. Nos demais períodos os grupos experimentais apresentaram um reparo semelhante, porém no grupo controle a ocorrência de

neoformação óssea foi mais intensa do que nos grupos experimentais, em todos os períodos de avaliação. De acordo com a metodologia empregada e com os resultados obtidos, os autores concluíram que todos os defeitos ósseos tratados com sulfato de cálcio mostraram ocorrência de neoformação óssea em todos os grupos estudados, independentemente da marca comercial do sulfato de cálcio utilizado.

SCARANO, *et al.*, (2007), relataram um caso clínico sobre o reparo ósseo peri-implante no qual utilizou-se o sulfato de cálcio. Um paciente de 47 anos foi submetido à instalação de um implante na região lateral da maxila. Ao redor do implante havia um defeito com dimensões de 3x4 mm, que foi preenchido com sulfato cálcio (Surgiplaster). Após 1 mês, o sulfato de cálcio foi detectado por meio da análise da radiografia periapical. Após 4 meses de preservação, foi removido uma amostra óssea da interface com o implante, este fragmento foi dividido ao meio, uma porção foi processada para microscopia óptica, enquanto outra foi processada para microscopia eletrônica de transmissão. De acordo as avaliações os autores puderam confirmar que o sulfato de cálcio foi de fato biocompatível apresentando rápida reabsorção, propiciando neoformação óssea no local.

FAVIERI, *et al.*, (2008), relataram um caso clínico de cirurgia parendodôntica onde foi utilizado o MTA, osso humano liofilizado e sulfato de cálcio. Neste caso, uma paciente de 21 anos apresentava episódios recorrentes de agudização de um processo crônico do dente 12. A paciente apresentava destruição óssea da tábua vestibular na região apical deste dente, deixando esta parte da raiz exposta à cavidade oral. A radiografia periapical inicial mostrou uma grande área radiolúcida circundante ao ápice. Foi realizado o tratamento endodôntico convencional, realizado sob condições especiais, já que o ápice estava exposto à cavidade oral, assim o isolamento convencional teve de ser modificado e adaptado para o caso. O canal foi instrumentado e obturado de acordo com a técnica de Schilder. A cirurgia foi realizada imediatamente após a conclusão da terapia endodôntica, que foi realizada em 2 fases. A primeira, consistiu na apicectomia com remoção de 4 mm da raiz na região apical e no preparo da retrocavidade com ultrassom. Em seguida, foi inserido o material o MTA selando o retropreparo. Para preencher a cavidade óssea destruída, foi utilizado osso humano liofilizado associado ao sulfato de cálcio. E visando a reconstrução da arquitetura óssea original dessa região, foi aplicado uma

camada de sulfato de cálcio. Após dois anos não havia sinais clínicos ou radiográficos sugestivos de fracasso do tratamento.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Analisar comparativamente, por intermédio da histomorfologia descritiva e morfométrica, a resposta tecidual provocada pelas matrizes ósseas xenogênicas: GenOx Inorg[®] (matriz óssea bovina desproteinizada ou inorgânica), GenOx Org[®] (matriz óssea bovina desmineralizada ou orgânica) e GenMix[®] (matriz óssea bovina composta), além de um material aloplástico representado pelo sulfato de cálcio di-hidratado, quando implantados em tíbias de coelhos.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada, após avaliação e a aprovação pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, resultando no protocolo nº 027/2009 (anexo A).

4.1 ANIMAIS

Para realizar o estudo foram utilizados 27 coelhos machos, adultos e brancos, do grupo genético Botucatu (*Oryctolagus Cuniculus*), com peso médio de 3,5 kg, com idade de aproximadamente 150 dias, procedentes do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu-UNESP. Os animais utilizados apresentavam funções vitais normais e foram mantidos, durante todo o período experimental, isolados em gaiolas de aço individuais no biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, sob boas condições ambientais de alimentação, temperatura, higiene e iluminação. A alimentação foi à base de ração sólida para coelhos (Nutricoeelho[®], Purina do Brasil, Paulínia, SP, Brasil) e água, fornecidos a vontade.

4.2 MATERIAIS UTILIZADOS:

4.2.1 Matriz óssea bovina inorgânica

GenOx Inorg (Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil) (figura 1) é um osso bovino esponjoso desproteinizado liofilizado de origem bovina. Produto microgranulado de 0,5 a 1,0mm e esterilizado com radiação gama.

4.2.2 Matriz óssea bovina orgânica

GenOx Org (Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil) (figura 2) é um osso bovino cortical desmineralizado liofilizado, apresentado em microgrânulos de 0,5 a 1,0mm, esterilizado com radiação gama.

4.2.3 Matriz óssea bovina composta

GenMix (Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil) (figura 3) é um xenoenxerto ósseo bovino composto, contendo matriz óssea inorgânica, orgânica e aglutinante de colágeno, produto microgranular com partículas de 0,25 a 1,0 mm. Esterilizado da mesma forma que os materiais anteriores.

4.2.4 Sulfato de Cálcio

Utilizado como um enxerto aloplástico o sulfato de cálcio di-hidratado (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (figura 4) é apresentado sob a forma de um pó branco, fino e inodoro.

4.3 INTERVENÇÕES CIRÚRGICAS:

4.3.1 Anestesia:

Para se realizar a intervenção cirúrgica os animais foram submetidos à anestesia geral. Para isso foram inicialmente submetidos a uma medicação pré-anestésica com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (Anasedan[®], Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) na dose de 5 mg/Kg de peso corporal, em seguida, anestesiados também por via intramuscular, com uma associação de cloridrato de ketamina (Dopalen[®], Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) a uma dose de 50 mg/Kg com 5 mg/Kg de cloridrato de xilazina (figura 5). Doses de manutenção anestésica foram ministradas no transcorrer do ato cirúrgico, conforme necessário (metade da dose inicial).

4.3.2 Incisão e sindesmotomia:

Após o procedimento de anestesia, foi realizada a tricotomia na face interna das patas traseiras na região da epífise da tíbia. Em seguida foi realizada a antisepsia da área com solução degermante à base de polivinilpirrolidona iodo (PVP-I) a 1% (Riodeine[®], Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA, São José do Rio

Preto, SP, Brasil). Antes de realizar a incisão, foi infiltrado na área cerca de 1 ml de solução anestésica local, cloridrato de articaína 4% com epinefrina 1:100.000 (Articaine100[®], DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), com o intuito de diminuir o sangramento durante o procedimento cirúrgico. Em seguida o animal foi coberto com um campo cirúrgico fenestrado estéril, deixando exposto somente à área a ser operada. Uma incisão linear de aproximadamente 5 cm foi realizada na metáfise de ambas tíbias, na parte interna, com lâmina para bisturi nº 15, seguida por uma divulsão total do retalho. O periósteo foi descolado com um descolador de Molt, de modo a visualizar o local determinado para confeccionar o defeito ósseo (figura 7).

Figura 1 - Osso bovino inorgânico esponjoso, GenOx Inorg – Baumer S.A.

Figura 2 - Osso bovino orgânico cortical, GenOx Org – Baumer S.A.

Figura 3 - Osso bovino composto, GenMix – Baumer S.A.

Figura 4 - Sulfato de Cálcio di-hidratado, Merck.

Figura 5 - Anasedan (relaxante muscular) e Dopalen (anestésico), Vetbrands.

Figura 6 - Tíbia e maior aumento do local da confecção dos defeitos.

Figura 7 - A) anti-sepsia com solução degermante; B) infiltração de solução anestésica; C) incisão; D) divulsão.

4.3.3 Confeção dos defeitos e seu preenchimento:

Os defeitos ou cavidades criadas, apresentavam um diâmetro aproximado de 5mm e 8mm de profundidade que foram confeccionados com uma broca trefina nº 3 (Dentoflex, São Paulo, SP, Brasil) acoplada em um contra-ângulo, com auxílio do motor elétrico TC-Motor 3.000(Nouvag AG/AS, Goldach, Suíça) na velocidade de 3.000 rpm, sob constante irrigação com solução salina estéril (figura 8).

Em cada animal foram realizadas duas cavidades cirúrgicas, uma em cada tíbia. Essas cavidades foram preenchidas com os biomateriais em estudo e com coágulo sanguíneo, configurando os seguintes grupos:

Grupo 1: GenOx Inorg

Grupo 2: GenOx Org

Grupo 3: GenMix

Grupo 4: Sulfato de cálcio di-hidratado

Grupo 5: Coágulo sanguíneo (controle)

Foi realizada uma alternância entre as cavidades para inserção dos materiais, de modo que cada animal recebesse dois grupos distintos. Cada grupo experimental teve um total de 12 amostras, sendo 4 para cada período de preservação, já o controle teve um total de 6 amostras, com 2 em cada período.

Tabela 1. Distribuição dos materiais nas cavidades cirúrgicas dos animais.

Grupo	Materiais	Períodos		
		30 dias	60 dias	90 dias
		Cavidades ósseas	Cavidades ósseas	Cavidades ósseas
1	GenOx Inorg	4	4	4
2	GenOx Org	4	4	4
3	GenMix	4	4	4
4	Sulfato de cálcio	4	4	4
5	Controle	2	2	2

Todos os biomateriais foram manipulados com solução salina estéril (figura 9). Para preencher as cavidades com os respectivos materiais, esses foram levados com uma seringa de 1mL estéril, com a ponta removida, ficando com um calibre próximo ao defeito confeccionado. Os materiais foram colocados na seringa, completando 0,3mL, foram levados próximo a borda da cavidade e pressionando o êmbolo o material foi inserido no interior da cavidade (figura 10). Com um instrumento rombo foi feito somente uma acomodação do material sem compactá-lo. Já no grupo controle, preenchido com coágulo sanguíneo, após a confecção do defeito, este foi apenas curetado e aguardado o seu preenchimento com sangue (figura 11). Para auxiliar na posterior identificação dos materiais utilizados, foi realizada a pigmentação dos pelos da pata, sendo amarelo representando o grupo I (GenOx Inorg), azul grupo II (GenOx Org), preto grupo III (GenMix), vermelho grupo IV (Sulfato de cálcio) e sem pigmentação para o grupo V (controle).

Figura 8 - A) perfuração com a trefina nº 3; B) cavidade óssea.

Figura 9 - A) matriz óssea bovina inorgânica; B) matriz óssea bovina orgânica; C) GenMix manipulado com soro fisiológico; D) sulfato de cálcio di-hidratado manipulado com soro fisiológico.

Figura 10 - Inserção do material na cavidade.

Figura 11 - A) curetagem da cavidade; B) cavidade preenchida com sangue.

4.3.4 Sutura:

Os tecidos foram reposicionados e o tecido muscular foi suturado com pontos simples utilizando fio absorvível Vicryl 4.0 (figura 12A) com agulha atraumática (Vicryl®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). A sutura do tecido cutâneo foi realizada por meio de pontos simples com fio de seda preta 4.0 (figura 12B) com agulha atraumática (Ethicon®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). Terminada a sutura, foi realizada uma nova anti-sepsia da área com solução iodada e o animal levado de volta à sua gaiola, monitorado quanto a sua volta da anestesia e pós-operatório. A sutura foi removida após 7 dias da cirurgia.

Figura 12 - A) sutura interna com fio absorvível; B) sutura externa com fio de seda.

4.3.5 Medicação pós-operatória:

Logo após a cirurgia, foi aplicado, por via intra-muscular, 2mL de antibiótico enrofloxacino (Flotril 2,5%[®], Mantecorp/Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (figura 13A) durante 5 dias consecutivos e 0,2 mL por Kg de peso corporal de anti-inflamatório cetoprofeno (Ketoflex 1%[®], Mundo Animal, São Paulo, SP, Brasil) (figura 13B) por 3 dias, após a cirurgia.

4.4 PERÍODOS DE PROSERVAÇÃO:

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais e de alimentação, que antes da cirurgia.

Os animais foram mortos aos 30, 60 e 90 dias após a cirurgia. Para isso foram previamente submetidos à anestesia, como referido anteriormente, para que assim, sob anestesia profunda, receberam uma injeção intra-cardíaca de cloreto de potássio 19,1% (Samtec, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

4.5 PREPARO DAS PEÇAS:

Após a eutanásia, ambas as tíbias de cada animal foram removidas e dissecadas (figura 14), separando a parte óssea onde foram confeccionados os defeitos (as epífises das tíbias). As regiões expostas foram examinadas atentamente para registrar eventuais sinais macroscópicos de inflamação ou infecção. Logo após, as peças foram imersas em formol tamponado a 10%, pH 7,2, mantendo-as por um período de uma semana.

Figura 13 - A) antibiótico Flotril 2,5%; B) anti-inflamatório Ketoflex 1,0%.

Figura 14 - Epífise da tíbia, logo após sua remoção.

4.6 PROCEDIMENTO HISTOTÉCNICO:

4.6.1 Desmineralização:

As peças foram lavadas em água corrente durante vinte e quatro horas para a remoção do excesso de fixador, prosseguindo-se então com a desmineralização em solução de EDTA 4,13% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) renovada semanalmente.

Para avaliar o grau de desmineralização das peças, foram realizadas tomadas radiográficas convencionais, para verificar se a imagem apresentava alguma radiopacidade indicativa de mineralização. As peças foram radiografadas com o aparelho de raios-X Gnatus XR6010 (Gnatus Equipamentos Odontológicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil), no sentido longitudinal dos defeitos ósseos, a uma distância de 30 cm, com exposição de 0,3 segundos, com filmes radiográficos periapicais Insight Kodak (Eastman Kodak Company, Rochester, Estados Unidos) e processados conforme o tempo e temperatura recomendados. Também foi realizado um teste de dureza da peça, introduzindo uma pequena agulha. Constatou-se a desmineralização completa em aproximadamente 160 dias.

Após a desmineralização das peças, estas foram submetidas aos procedimentos histotécnicos de desidratação, clarificação, banhadas e incluídas em Histosec (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (parafina + resina plástica) para a obtenção dos blocos.

4.6.2 Obtenção das lâminas:

Os espécimes foram incluídos de modo que as cavidades cirúrgicas fossem cortadas longitudinalmente, envolvendo o osso cortical externo, medular, enxerto e osso cortical interno. As peças foram cortadas em micrótomo rotativo automático Leica RM2265 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), obtendo cortes semi-seriados, com 5 micrometros de espessura, estendidos em banho Maria (40 a 50°C) e fixados em lâminas. De cada peça foram obtidas três lâminas, com três cortes cada uma.

4.6.3 Coloração:

Os cortes dos espécimes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina.

4.7 ANÁLISE MICROSCÓPICA:

As amostras foram submetidos à análise microscópica descritiva e morfométrica, utilizando o microscópio óptico binocular (LeitzAristoplan, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemanha).

4.7.1 Descritiva:

Descrição dos fenômenos teciduais presentes nos espécimes representativos de cada grupo, observando os seguintes aspectos:

- neorformação da cortical óssea;
- reposição do periósteo;
- tecido de granulação;
- presença do material implantado;
- fechamento do defeito ósseo.

4.7.2 Morfométrica:

A quantificação da neorformação óssea foi realizada por meio um *software* que forneceu o valor da área do tecido ósseo neoformado. Para digitalizar as imagens microscópicas, foi utilizado o microscópio óptico LeitzAristoplan com objetiva de 1,6x. Uma câmera de captação de imagem (Leica DFC295, Leica Microsystems, Heerbrugg, Alemanha) acoplada ao microscópio e conectada a um microcomputador com o *software* Leica Application Suite 3.7.0 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemanha), capturou as imagens. Todas as lâminas foram fotografadas, digitalizando um corte, o mais representativo, em cada. Este programa também foi utilizado para processar as imagens, de modo que pudessem ser analisadas posteriormente, para isso foi utilizado a ferramenta de análise, criando uma “máscara” binária de cor verde sobre o tecido ósseo (figura 15). As imagens binarizadas foram gravadas em arquivos com extensão TIFF e antes de serem analisadas no *software* de quantificação, foram aplicadas no *software* Photoshop 7.0

(Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, Estados Unidos), onde foram analisadas cuidadosamente e quando necessário foram criadas máscaras adicionais de cor branca, sobre tecidos que não o tecido ósseo, que eventualmente foram marcados com a cor verde (figura 16). O osso cortical, pré-existente nas bordas dos defeitos, foi coberto com uma outra “máscara” de cor negra, para que não entrasse na contagem da área. Isso foi realizado, buscando manter somente o tecido ósseo neoformado marcado com a cor verde. Após esses procedimentos, as imagens foram levadas ao *software* *bioImage_L* 2.0 (Malmö, Suécia, disponível em www.bioimage.l.com). Este programa faz a contagem da área por meio da identificação de duas cores, o vermelho e verde, por isso o cuidado prévio em manter somente o tecido ósseo marcado em verde. Calibrado de acordo com a escala da imagem, esse programa forneceu os valores da área de tecido ósseo em micrometros quadrados (figura 17). Os dados obtidos foram transformados em milímetros quadrados e submetidos à análise estatística.

Figura 15 – Interface do programa Leica Application Suite 3.7.0 e delimitação do tecido ósseo.

Figura 16 – Interface do programa Photoshop 7.0 e criação das máscaras.

Figura 17 – Interface do programa bioImageJ 2.0 e contagem da área em μm^2 .

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

De posse dos resultados morfométricos, empregou-se o teste de D'Agostino e Pearson, e ao constatar a ausência de normalidade utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, realizando assim a comparação entre os 5 grupos, dentro de cada período avaliado, bem como a comparação entre os períodos dentro de cada grupo, adotando um nível de significância de 5%. Desse modo, quando os referidos testes demonstraram a ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$), foi aplicado o teste de Dunn, para comparar individualmente os valores em questão. Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software* GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, Estados Unidos).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

5.1.1 Grupo 1 – GenOx Inorg – 30 dias

Os espécimes representativos deste grupo exibiram a área enxertada bem definida. Na região da cortical o processo de reparo apresentou-se em plena atividade determinando o fechamento do defeito por tecido ósseo neoformado de aspecto trabeculado, que estava em continuidade com as trabéculas que se estendiam as porções mais profundas do defeito, na região medular (figura 18a). Esse osso neoformado de aspecto trabecular, contornado por células compatíveis com osteoblastos envolveu, durante sua neoformação, as partículas de osso desproteinizado implantados, incorporando-se a sua estrutura (figura 18b). Essas partículas apresentaram-se de tamanhos variados como imagens amorfas de aspecto basofílico e homogêneo. De permeio a essa estrutura trabecular óssea havia a presença de tecido conjuntivo frouxo, bem celularizado e vascularizado, com algumas células gigantes multinucleadas sugerindo a presença de clastos. Na porção superficial do defeito, sobre a cortical em reparo, verificou-se a presença de tecido conjuntivo denso rico em fibras colágenas e bem celularizado, compatível com tecido periostal.

5.1.2 Grupo 2 – GenOx Org – 30 dias

A microscopia desses espécimes exibiu na região cortical do defeito, um trabeculado ósseo neoformado envolvido por células osteoblásticas. Esse trabeculado estava presente na periferia do defeito, avançando para região central, fechando-o quase que totalmente. A partir da borda do defeito observou-se também a presença de tecido cartilaginoso, que avançava sobre a superfície do trabeculado ósseo neoformado. Na borda oposta do referido defeito observou-se ainda, discreta neoformação óssea do tipo endocondral (figura 18d). Na porção superficial do defeito formou-se um tecido conjuntivo denso bem celularizado e rico em fibras colágenas,

posicionando-se como um tecido periostal (figura 18c). Nos outros espécimes a formação do trabeculado ósseo, reparando a cortical externa, apresentou-se em pequena quantidade, ficando restrita a uma das extremidades do defeito. O restante do mesmo, estava fechado por tecido conjuntivo denso celularizado e bem vascularizado. Os espaço medular dos espécimes examinados, demonstrou apenas tecido medular e não se observou em nenhuma amostra, vestígios de partículas de matriz orgânica implantada.

5.1.3 Grupo 3 – GenMix – 30 dias

Na área correspondente ao defeito ósseo, de modo específico na região da cortical, havia neoformação óssea de aspecto trabecular, selando a superfície do defeito. Esse tecido ósseo trabeculado jovem aprofundava-se em direção ao espaço medular (figura 18e). Toda essa estrutura trabecular descrita envolvia parcialmente, de modo esparso, às partículas inorgânicas do material implantado (figura 18f). Tais partículas estavam representadas por imagens negativas vazias ou preenchidas por material de aspecto homogêneo e levemente basofílico. De permeio ao trabeculado ósseo jovem e às partículas, havia tecido conjuntivo bem celularizado e vascularizado, sugerindo a formação de tecido medular. Observou-se ainda a presença discreta de células gigantes multinucleadas esparsas. Na porção superficial do defeito ósseo em reparo havia a presença de uma faixa de tecido conjuntivo denso bem celularizado e rico em fibras colágenas, à guisa de tecido periostal.

5.1.4 Grupo 4 – Sulfato de Cálcio di-hidratado – 30 dias

Neste grupo a microscopia revelou na região cortical do defeito ósseo a formação de uma delgada faixa de tecido ósseo neoformado de aspecto trabeculado, promovendo o fechamento do referido defeito, acima de suas bordas. Nas porções subjacentes havia estrutura tecidual compatível com tecido medular. Não se observou, em toda a extensão do defeito, resquícios do material implantado. Na porção mais superficial do defeito ósseo, sobre a cortical em reparo, a presença de tecido conjuntivo com características de tecido periostal (figura 18g).

5.1.5 Grupo 5 – Controle – 30 dias

Os espécimes desse grupo demonstraram a cortical óssea em franco processo de reparo, exibindo em alguns espécimes um aspecto compacto, em outros o osso cortical externo em reparo exibiu um aspecto de calo ósseo, tendo em seu interior uma estrutura trabeculada. Na porção superficial dos defeitos ósseos, em reparo, havia tecido conjuntivo com características de tecido periostal. No espaço medular havia característica de normalidade (figura 18h).

30 dias

Figura 18– a) Grupo 1 – Tecido periosteal (O) e cortical neoformada na área do defeito (●). b) Grupo 1 (maior aumento) - Osso neoformado trabeculado (↑), envolvendo partículas da matriz inorgânica (●). c) Grupo 2 – Tecido periosteal (O), cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido tipo endocondral (★). d) Grupo 2 – Tecido tipo endocondral (★) e parte do tecido ósseo cortical neoformado (●). e) Grupo 3 – Cortical neoformada na área do defeito (●). f) Grupo 3 (maior aumento) – partícula de osso inorgânico (●) envolvida por osso neoformado (↑). g) Grupo 4 – cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido periosteal (O). h) Grupo 5 – cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido periosteal (O).

5.1.6 Grupo 1 – GenOx Inorg – 60 dias

Os espécimes deste grupo demonstraram neoformação óssea bem definida, caracterizando nova cortical e promovendo o selamento do defeito ósseo. Sobre essa cortical havia a presença de um tecido conjuntivo espesso, denso à custa de grande quantidade de fibras colágenas, formando o tecido periostal (figura 19a). Abaixo dessa cortical neoformada, no espaço medular, observou-se ainda neoformação de tecido conjuntivo ricamente celularizado, cujos componentes celulares formavam a população medular. Esses elementos celulares estavam distribuídos de permeio a vasos sanguíneos, células gigantes multinucleadas esparsas, possivelmente clastos e trabéculas de tecido ósseo neoformado envolvendo parcialmente as imagens das partículas do material implantado (figura 19b). Essas trabéculas ósseas estavam segmentadas e em menor número em relação ao período de 30 dias.

5.1.7 Grupo 2 – GenOx Org – 60 dias

Os espécimes representativos desse grupo demonstraram incompleto fechamento do defeito ósseo, mas havia atividade neoformativa óssea de aspecto trabeculado, abaixo de uma das bordas (figura 19d). Todavia a abertura permaneceu preenchida por tecido conjuntivo denso, bem celularizado e vascularizado. Na região superficial havia a presença de tecido conjuntivo denso e fibroso, assumindo características de membrana periostal. Na região abaixo da cortical óssea observou-se tecido medular (figura 19c).

5.1.8 Grupo 3 – GenMix – 60 dias

Neste grupo houve o fechamento do defeito ósseo pela neoformação de uma cortical contínua e bem definida. Todavia em alguns espécimes observou-se uma pequena falha na continuidade formativa da cortical externa (figura 19e). Nessa pequena solução de continuidade constatou-se a presença de um conglomerado de partículas enxertadas envolvidas por tecido conjuntivo denso bem celularizado com

algumas células gigantes multinucleadas. Algumas dessas partículas já estavam sendo envolvidas pelo osso cortical neoformado (figura 19f). Na porção superficial dessa estrutura óssea cortical neoformada, havia tecido conjuntivo fibroso e celularizado constituindo o tecido periostal. Na área subjacente, correspondente ao espaço medular, notou-se um predomínio das partículas implantadas e de permeio às mesmas havia tecido conjuntivo denso celularizado e uma ou outra célula gigante multinucleada. A maioria das células presentes no referido tecido conjuntivo eram células com características da população medular.

5.1.9 Grupo 4 – Sulfato de Cálcio di-hidratado – 60 dias

Os espécimes deste grupo apresentaram cortical óssea neoformada, menos espessa que a cortical periférica ao defeito, mas sua estrutura era bem definida, selando totalmente a abertura do defeito. Na porção superficial observou-se tecido conjuntivo denso fibroso bem celularizado, formando a estrutura periostal. Subjacente ao defeito selado notou-se a presença de tecido medular (figura 19g).

5.1.10 Grupo 5 – Controle – 60 dias

Observou-se tecido ósseo cortical neoformado selando o defeito produzido (figura 19h). Na porção superficial, além de tecido conjuntivo fibrocelular do tipo periostal, notou-se em todos os espécimes com maior ou menor intensidade a presença de lacunas de reabsorção, sugerindo atividade osteoremodeladora (figuras 19i e 19j). Na porção subjacente havia tecido medular com características de normalidade.

60 dias

Figura 19– a) Grupo 1 – Cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido periostal (○). b) Grupo 1 (maior aumento) - Partícula de osso inorgânico (↑) e trabécula de osso neoformado (↑). c) Grupo 2 – Fechamento incompleto do defeito (□), cortical neoformada (●) e tecido periostal (○). d) Grupo 2 – Detalhe da cortical óssea neoformada (●) abaixo da borda do defeito. e) Grupo 3 – Cortical neoformada incompleta na área do defeito (●) e tecido periostal (○). f) Grupo 3 (maior aumento) – partículas do GenMix (↑) envolvidas por tecido conjuntivo denso (▲). g) Grupo 4 – cortical neoformada (●) e tecido periostal (○). h) Grupo 5 – cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido periostal (○). i) e j) Grupo 5 (maior aumento) – Tecido periostal (○), cortical neoformada (●) e clastos (△).

5.1.11 Grupo 1 – GenOx Inorg – 90 dias

Nos espécimes representativos deste grupo houve neoformação de osso cortical de espessura variável, selando o defeito e nas porções subjacentes, havia neoformação de trabéculas ósseas por todo espaço medular (figura 20a). Essas trabéculas envolviam as partículas do osso inorgânico enxertado, caracterizando o desenvolvimento formativo de tecido ósseo sobre a superfície das mesmas (figura 20b). Essas partículas apresentavam-se como espaços de tamanhos variados, preenchidos por uma estrutura de aspecto homogêneo e basofílico. De permeio às estruturas descritas havia um tecido medular. Na porção superficial da cortical neoformada, ocorreu a formação de tecido conjuntivo fibrocelular espesso, à guisa de tecido periosteal, envolvendo resquícios de partículas ósseas implantadas, em cuja periferia notou-se a presença de células gigantes multinucleadas esparsas, sugerindo atividade clástica.

5.1.12 Grupo 2 – GenOx Org – 90 dias

A microscopia dos espécimes deste grupo revelou uma atividade neoformativa da cortical óssea, selando o defeito. Na porção subjacente estava o espaço medular com aspecto de normalidade. Na superfície da cortical óssea havia tecido conjuntivo do tipo fibrocelular espesso, compatível com periosteio (figura 20e).

5.1.13 Grupo 3 – GenMix – 90 dias

Os espécimes representativos deste grupo demonstraram cortical óssea neoformada, selando o defeito (figura 20c). No espaço medular, logo abaixo da cortical, havia um conglomerado de imagens negativas de tamanhos variados, representando as partículas do material implantado. As referidas imagens estavam em geral, envolvidas por faixas de tecido conjuntivo com característica fibro-angioblástica (figura 20d). De permeio às estruturas descritas, havia a presença de tecido medular. Na superfície do tecido ósseo cortical neoformado havia a formação de tecido fibrocelular compatível com tecido periosteal.

5.1.14 Grupo 4 – Sulfato de Cálcio di-hidratado – 90 dias

A microscopia dos espécimes deste grupo demonstrou a neoformação de cortical óssea vedando o defeito produzido. Essa cortical apresentou-se em todos os espécimes examinados com uma espessura similar. Na porção superficial da mesma ocorreu a formação de um tecido fibrocelular compatível com o periósteo. No espaço medular subjacente notou-se a presença de tecido medular e ausência total de vestígios do material implantado (figura 20f).

5.1.15 Grupo 5 – Controle – 90 dias

Os espécimes deste grupo exibiram de modo geral a cortical externa neoformada com aspecto compacto, selando o defeito produzido (figura 20g). Na porção superficial do segmento neoformado da cortical externa, observou-se a presença discreta de atividade osteoremodeladora e tecido fibrocelular compatível com periósteo. O tecido medular apresentava-se com características de normalidade.

90 dias

Figura 20– a) Grupo 1 – Osso cortical neoformado (●) e tecido periosteal (○). b) Grupo 1 (maior aumento) - Partículas de osso inorgânico (↑) e trabéculas de osso neoformado (↑). c) Grupo 3 – Cortical neoformada na área do defeito (●) e tecido periosteal (○). d) Grupo 3 (maior aumento) – partículas da matriz inorgânica (↑) envolvidas por tecido conjuntivo denso (▲). e) Grupo 2 – cortical neoformada (●) e tecido periosteal (○). f) Grupo 4 – cortical neoformada (●) e tecido periosteal (○). g) Grupo 5 – cortical neoformada (●) e tecido periosteal (○).

5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Na mensuração da área de tecido ósseo neoformado, obtivemos os respectivos valores em mm^2 , que encontram-se resumidos na tabela 2, pelos valores das medianas.

Tabela 2 – Representação por meio da mediana (primeiro e quarto quartil), da área em mm^2 , do osso neoformado nos grupos experimentais e controle, nos três períodos experimentais.

	30 Dias	60 Dias	90 Dias
Grupo 1 GenOx Inorg	1,58 (1,21 - 2,02)	2,88 (2,47 - 3,13)	3,21 (2,87 - 3,69)
Grupo 2 GenOx Org	0,52 (0,35 - 1,75)	2,26 (1,77 - 2,77)	2,59 (1,16 - 3,06)
Grupo 3 GenMix	1,63 (1,03 - 1,98)	2,56 (2,37 - 2,82)	2,81 (2,66 - 3,23)
Grupo 4 Sulfato de Cálcio	1,37 (1,20 - 1,66)	2,16 (1,67 - 2,70)	3,29 (3,07 - 3,74)
Grupo 5 Controle	1,63 (1,16 - 2,19)	3,01 (2,43 - 3,67)	2,59 (2,26 - 2,97)

De acordo com os dados obtidos pode-se observar que de modo geral, os biomateriais empregados proporcionaram uma área de osso neoformado similar ao grupo 5 (controle). Também se pode constatar que houve a progressão da neoformação óssea com o decorrer do tempo, salvo pelo grupo 5 (controle) que no período de 90 dias apresentou menor área de tecido ósseo neoformado em relação ao período anterior. Outro ponto de destaque é a intensidade da neoformação óssea em função do tempo, bem evidente no grupo 2, ao comparar o período de 30 dias com os seguintes.

Os valores obtidos por meio da variável analisada foram analisados estatisticamente e a ausência de normalidade foi constatada pelo teste D'Agostino e Pearson. Assim os dados foram submetidos a um modelo estatístico não paramétrico, aplicando os testes de Kuskal-Wallis e de Dunn, devido ao número e variabilidade das amostras. Ao realizar a análise estatística, em um primeiro momento, efetuaram-se comparações entres os cinco grupos dentro de cada

período experimental. Assim ao se avaliar o período de 30 dias, empregando o teste de Kruskal-Wallis, constatou-se que não houve diferença significativa na comparação entre todos os grupos ($P = 0,2471$). Os resultados deste período estão ilustrados no gráfico 1.

Gráfico 1 - Representação da área, em mm^2 , do tecido ósseo neoformado em cada grupo no período de 30 dias, contendo mediana, máximo, mínimo, primeiro e quarto quartil.

Do mesmo modo que o período anterior, aos 60 dias, não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0573$) na comparação entre os grupos (gráfico 2).

Gráfico 2 - Representação da área, em mm^2 , do tecido ósseo neoformado em cada grupo no período de 60 dias, contendo mediana, máximo, mínimo, primeiro e quarto quartil.

No período de 90 dias (gráfico 3) o teste de Kruskal-Wallis apontou diferença estatística significativa ($P = 0,0041$), assim ao aplicarmos o teste de Dunn para comparações individuais entre os 5 grupos, ficou demonstrado que na comparação entre os grupos 2 e 4 houve diferença estatisticamente significativa, assim como na comparação entre os grupos 4 e 5 ($P < 0,05$).

Gráfico 3 - Representação da área, em mm^2 , do tecido ósseo neoformado em cada grupo no período de 90 dias, contendo mediana, máximo, mínimo, primeiro e quarto quartil.

Realizou-se também a análise estatística individualizada de cada grupo em função dos três períodos estudados. Nos grupos 1, 2 e 3 houve diferença significativa ($P < 0,0001$) quando comparado o período de 30 dias com os períodos de 60 e 90 dias. Já ao se comparar os períodos de 60 e 90 dias, não foi constatada diferença significativa (gráficos 4, 5 e 6).

Gráfico 4 - Representação da área de osso neoformado (mediana) em cada período no Grupo 1 (GenOx Inorg).

Gráfico 5 - Representação da área de osso neoformado (mediana) em cada período no Grupo 2 (GenOx Org).

Gráfico 6 - Representação da área de osso neoformado (mediana) em cada período no Grupo 3 (GenMix).

Frente aos resultados obtidos, ao aplicar o teste de Dunn, verificou-se no grupo 4 (gráfico 7), que as comparações entre os períodos de 30 e 60 dias, assim como entre 60 e 90 dias não resultaram em diferença significativa ($P > 0,05$), já na comparação entre 30 e 90 dias houve significância estatística ($P < 0,0001$).

Gráfico 7 Representação da área de osso neoformado (mediana) em cada período no Grupo 4 (Sulfato de Cálcio di-hidratado).

No grupo 5 (gráfico 8) não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 30 e 90 dias, assim como entre 60 e 90 dias, diferença somente observada na comparação entre 30 e 60 dias.

Gráfico 8 - Representação da área de osso neoformado (mediana) em cada período no Grupo 5 (controle).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 Da Metodologia

O reparo ósseo de cavidades cirúrgicas ou patológicas vem de longa data sendo motivo de estudo, com o intuito de encontrar biomateriais que promovam resultados satisfatórios. Para se avaliar o processo de reparo ósseo, é importante inserir na pesquisa um modelo biológico de estudo, para que se possa observar a resposta tecidual frente ao material implantado, por esse motivo a pesquisa em animais é indicada para realizar esse tipo de estudo.

A literatura está repleta de relatos onde se utilizaram diversos animais como modelo experimental, podendo ser ratos (DUPOIRIEUX, *et al.*, 1994; PECORA, *et al.*, 1997; TORRICELLI, *et al.*, 2002; STAVROPOULOS, *et al.*, 2003; MARINS, *et al.*, 2004; ZAMBUZZI, *et al.*, 2005; PARK, *et al.*, 2009), minipigs (JENSEN, *et al.*, 2006), coelhos (CONCANNON; BOSCHERT; PUCKETT, 1997; YOUNG; SANDSTEDT; SKOGLUND, 1999; AABOE, *et al.*, 2000; STROCCHI, *et al.*, 2002; BETTI, 2004; ORSINI, *et al.*, 2004; MAEDA, *et al.*, 2007; BIGHAM, *et al.*, 2008; CALASANS-MAIA, *et al.*, 2009), gatos (MAGUIRE, *et al.*, 1998), cães (CLERGEAU, *et al.*, 1996; ALHADAINY, *et al.*, 1998; INDOVINA; BLOCK, 2002; YOSHIKAWA, *et al.*, 2002; APAYDIN; TORABINEJAD, 2004; ARAÚJO; LINDHE, 2009; STAVROPOULOS; WIKESJÖ, 2010), ovelhas (WORTH, *et al.*, 2005; PETERS, *et al.*, 2006; TEIXEIRA, *et al.*, 2007), porcos (THORWARTH, *et al.*, 2006; TUDOR, *et al.*, 2008) e macacos (RAFTER, *et al.*, 2002).

Apesar de o tecido ósseo apresentar estrutural e funcionalmente as mesmas características básicas nos animais, cada modelo experimental citado anteriormente, apresenta suas particularidades, desse modo, o estudo em humanos também se faz necessário, sendo empregados para aumento de rebordo para a instalação de implantes (ZITZMANN, *et al.*, 2001; STEIGMANN, 2006; SCARANO, *et al.*, 2007; JARDIM, *et al.*, 2009), em tratamento de defeitos periodontais (SOTTOSANTI, 1992; YUKNA, *et al.*, 1998; BATISTA, *et al.*, 1999; RICHARDSON, *et al.*, 1999; CAMARGO, *et al.*, 2002; AICHELMANN-REIDY; HEATH; REYNOLDS, 2004;

HARRIS, 2004), na manutenção do rebordo após exodontia (ARTZI; TAL; DAYAN, 2000,2001; CARMAGNOLA; ADRIAENS; BERGLUNDH, 2003; GUARNIERI, *et al.*, 2004; MUNHOZ, 2005), no levantamento de seio maxilar (DE LEONARDIS; PECORA, 2000; KIM, *et al.*, 2009), em cirurgias de reconstrução buco-maxilo-facial (HISLOP; FINLAY; MOOS, 1993; TADJOEDIN, *et al.*, 2003) e em cirurgias parendodônticas (STASSEN, *et al.*, 1994; PECORA, *et al.*, 1997; GOLDMAN, *et al.*, 2000; PECORA, *et al.*, 2000; PECORA, *et al.*, 2001; GARRETT, *et al.*, 2002; FAVIERI, *et al.*, 2008).

Para realizar o presente estudo, optamos em utilizar o coelho como modelo experimental, por ser um animal de médio porte, sendo possível confeccionar defeitos ósseos maiores do que em outros roedores de laboratório. Outra vantagem em relação a animais menores, como os ratos, muito utilizados para esse tipo de estudo, é que estes devido ao seu metabolismo, apresentam um alto potencial de osteogênese, assim seus resultados podem ser contestados ao se extrapolar para os humanos. O coelho é um animal dócil que permite um fácil manejo e acomodação, podendo ser utilizado em um número suficiente para realizar uma análise representativa, ainda com a possibilidade de padronizar quanto à raça, sexo, idade e peso, reduzindo significativamente o número de variáveis (BREWER, 2006). Buscando estabelecer uma padronização, seguimos a maior vertente da literatura e empregamos no estudo somente animais machos e adultos, procedentes de uma mesma linhagem com uma faixa de peso em torno dos 3,5Kg (BETTI, 2004; STUBBS, *et al.*, 2004; XU, *et al.*, 2004; MAEDA, *et al.*, 2007; SICCA, *et al.*, 2008; ROCHA, *et al.*, 2010). Machos, haja vista que possíveis alterações hormonais das fêmeas podem interferir no processo de reparo, buscando estabelecer um padrão na amostra, porém há registros na literatura de autores que não fazem esse tipo de distinção (YOUNG; SANDSTEDT; SKOGLUND, 1999; AABOE, *et al.*, 2000). A faixa de peso utilizada reflete a idade do animal, em torno de 5 meses já considerado um animal em fase adulta (RABIE; WONG; HÄGG, 2000) apresentando assim maturidade óssea, evitando também que o metabolismo acelerado da fase de crescimento possa interferir nos resultados, pois já foi demonstrado que a idade do animal pode interferir no volume do tecido ósseo neoformado (TORRICELLI, *et al.*, 2002).

No coelho pode-se utilizar diversos sítios para confeccionar defeitos ósseos, como a calvária (LAUREANO FILHO, *et al.*, 2009; ROCHA, *et al.*, 2010), maxila (XU, *et al.*, 2003, 2004; SICCA, *et al.*, 2008), mandíbula (YOUNG; SANDSTEDT; SKOGLUND, 1999) e ossos longos das patas como radio (BIGHAM, *et al.*, 2008; BIGHAM, *et al.*, 2009), fêmur (CONCANNON; BOSCHERT; PUCKETT, 1997; BETTI, 2004; MAEDA, *et al.*, 2007) e tíbia (AABOE, *et al.*, 2000; RABIE; WONG; HÄGG, 2000; DA COSTA FILHO; TAGA; TAGA, 2001; STROCCHI, *et al.*, 2002; ORSINI, *et al.*, 2004; STUBBS, *et al.*, 2004; CALASANS-MAIA, *et al.*, 2009). Vale ressaltar que a princípio, no estudo piloto desta pesquisa, optamos pela confecção de dois defeitos ósseos em cada fêmur seguindo o protocolo proposto por MAEDA, *et al.*, (2007), no entanto verificamos houve uma maior debilidade do animal bem como um caso de fratura. Com isso mudamos o local e o número de defeitos, realizando um defeito em cada metáfise tibial, região mais fácil de acesar, com menos tecidos para incisar. Esse protocolo foi satisfatório haja vista que não houve nenhum caso de fratura pós-operatória e menor morbidade durante o período pós-operatório. Optamos em utilizar a metáfise da tíbia, pois assim como a epífise, apresenta externamente um osso cortical compacto circundando um osso esponjoso trabeculado (BREWER, 2006) essa região também foi utilizada com sucesso por outros autores (STROCCHI, *et al.*, 2002; ORSINI, *et al.*, 2004; STUBBS, *et al.*, 2004), há autores que realizaram na diáfise (DA COSTA FILHO; TAGA; TAGA, 2001; CALASANS-MAIA, *et al.*, 2009), onde o osso esponjoso diminui dando lugar a uma cavidade medular. Porém um defeito criado na metáfise oferece menor risco de fratura do que na diáfise, além disso, quando inserido um material no defeito, este fica confinado, o que pode não ocorrer quando inserido na cavidade medular.

Ao realizarmos o procedimento cirúrgico, os animais encontravam-se profundamente anestesiados, para isso receberam uma dose inicial de relaxante muscular (xilazina) por meio de uma injeção intramuscular e depois foram anestesiados pela mesma via com uma associação de cloridrato de xilazina com cloridrato de ketamina, associação amplamente utilizada (MARINI, *et al.*, 1992; CONCANNON; BOSCHERT; PUCKETT, 1997; BETTI, 2004; MAEDA, *et al.*, 2007; SICCA, *et al.*, 2008; CALASANS-MAIA, *et al.*, 2009). A medicação pré-anestésica é importante para reduzir a dor e o desconforto do animal, além de diminuir a quantidade de agentes anestésicos (FONSECA, *et al.*, 1996). Essas drogas

proporcionam uma anestesia profunda dando um tempo de trabalho satisfatório, podendo chegar até 75 minutos (FONSECA, *et al.*, 1996).

Quanto ao tamanho do defeito ósseo criado, optamos em realizar um defeito de tamanho não crítico, removendo apenas uma cortical, ou seja, um defeito com proporções na qual o organismo seria capaz de reparar sem ser necessário nenhuma intervenção, podendo assim manter um controle efetivo, para verificar se o uso de algum biomaterial é capaz de promover benefícios no processo de reparo ósseo. Além do mais, já é constatada a importância do uso de materiais de enxerto em defeitos de tamanho médio a grande porte (BETTI, 2004; XU, *et al.*, 2004; TEIXEIRA, *et al.*, 2007; PARK, *et al.*, 2009). Para realizarmos os defeitos utilizamos uma trefina, criando um defeito circular, removendo apenas uma cortical, ou seja, criamos defeitos cilíndricos padronizados com aproximadamente 5mm de diâmetro por 8mm de profundidade em todos os espécimes. É um defeito que nos permitiu inserir uma quantidade de biomaterial suficiente para uma análise microscópica.

Os defeitos criados foram preenchidos com quatro biomateriais com características distintas além do grupo controle que foi mantido apenas com coágulo sanguíneo. Apesar de ser um consenso que o enxerto com osso autógeno é o padrão ouro para o enxerto em defeitos ósseos (HOEXTER, 2002; PINTO, *et al.*, 2007; HANDSCHEL, *et al.*, 2009) por ser composto de tecidos do próprio indivíduo, sendo os únicos entre os tipos de enxerto ósseo a fornecer células ósseas vivas imunocompatíveis, essenciais à fase I da osteogênese, responsáveis pela proliferação das células ósseas (RODAN; MARTIN, 2000; EID, *et al.*, 2001), sabemos das inconveniências em utilizá-lo, especialmente pela morbidade da área doadora e dependendo desta, oferecendo uma quantidade limitada de material para enxerto.

Assim, pela facilidade de se obter e por já ter um respaldo na literatura, optamos em utilizar três biomateriais de origem xenogênica e um aloplástico. Os materiais xenogênicos utilizados são de origem bovina já o aloplástico foi o sulfato de cálcio di-hidratado. Em relação aos materiais xenogênicos, há a desconfiança que esses materiais possam portar e transmitir doenças dos animais para o homem, sendo que risco de transmissão da encefalopatia espongiforme bovina através de enxertos derivados de ossos bovinos é o que mais preocupe. Porém o risco de

transmissão desta ou qualquer outra doença é insignificante devido aos rigorosos protocolos seguidos no fornecimento e processamento desses materiais disponibilizados comercialmente (SOGAL; TOFE, 1999), especialmente pelo processamento químico e/ou térmico para obtê-las (CALASANS-MAIA, *et al.*, 2009). Além disso, antes de serem disponibilizadas comercialmente essas materiais são esterilizados.

Um dos biomateriais xenogênicos empregados no estudo foi o GenMix, um material composto por osso orgânico cortical e osso inorgânico medular, ambos na forma granular, associados a aglutinante de colágeno. O objetivo dessa formulação é associar a capacidade osteocondutora da matriz óssea inorgânica com o possível potencial osteoindutor da matriz óssea orgânica. Por apresentar as duas matrizes, pode atuar como osteocondutor e osteoindutor (STEIN; SILVA; DA SILVA, 2009). Mas por ser um material disponível a pouco tempo no mercado, justifica-se a sua utilização neste estudo buscando observar seu comportamento biológico para observar se corresponde as características propostas.

Optamos por colocar um grupo composto por matriz óssea bovina inorgânica comercialmente apresentada como GenOx Inorg pois é um composto isolado do GenMix, inclusive produzido pelo mesmo fabricante. É um material biocompatível (CARBONARI, *et al.*, 2009) comprovadamente quando testado em tecido subcutâneo de ratos (OLIVEIRA, *et al.*, 1999; ZAMBUZZI, *et al.*, 2005). Sua composição consiste basicamente em hidroxiapatita (GARCIA, 2007), assim possui lenta reabsorção, que em humanos pode levar de 4 a 6 meses (TAGA, 1996), mas ARTZI; TAL; DAYAN, (2000) demonstrou que havia partículas do material após 9 meses. De acordo com alguns autores esse material além de fornecer uma estrutura de suporte, também pode prover uma alta liberação de cálcio (HOEXTER, 2002) e fósforo, essenciais para a neoformação óssea (YUKNA, *et al.*, 1998). Porém é amplamente aceito que esse material é apenas osteocondutor (AABOE, *et al.*, 2000), devido ao fato de ser biocompatível e reabsorvível, permite o ingresso e integração do osso neoformado com suas partículas (ARTZI; TAL; DAYAN, 2001; CARMAGNOLA; ADRIAENS; BERGLUNDH, 2003; CALASANS-MAIA, *et al.*, 2009). Ainda a respeito de suas propriedades, ficou claro no estudo de THORWARTH, *et al.*, (2006), que esse material somente apresentou propriedade osteoindutora quando associado ao osso autógeno. Essa matriz apresenta um amplo respaldo na

literatura sendo alvo em diversas pesquisas realizadas inclusive em humanos (HISLOP; FINLAY; MOOS, 1993; BATISTA, *et al.*, 1999; RICHARDSON, *et al.*, 1999) com resultados muito satisfatórios. STASSEN, *et al.*, (1994) obtiveram resultados negativos quando empregado em cirurgias parendodônticas, chegando até contraindicar o seu uso para essa finalidade, mas vale ressaltar que em seu estudo utilizou apenas o controle radiográfico como indicador de sucesso. É um material granulado com partículas de 0,5 a 1mm, considerado um tamanho adequado sendo que as partículas menores de 0,3mm podem ser consideradas pelo tecido, um corpo estranho (HIGASHI; OKAMOTO, 1996). Porém XU, *et al.*, (2003) constataram que partículas entre 0,3 a 0,5 mm promoveram uma maior neoformação no seu entorno, quando comparado com partículas de 0,85 a 1mm.

Já a matriz óssea orgânica (GenOx Org) foi empregada no estudo, também por ser um composto isolado do GenMix, além disso, essa matriz apresenta propriedades físicas satisfatórias (SUMMITT; REISINGER, 2003) mas devido a sua composição é rapidamente reabsorvida pelo organismo receptor (LAUREANO FILHO, *et al.*, 2009). É um material biocompatível (BETTI, 2004), desde que apresente boa qualidade de produção (CARNEIRO, 2003), pois é importante ao processo de reparo que não ocorra reação antigênica (HOEXTER, 2002). Outro ponto de suma importância que nos levou a testar esse material foi verificar se apresenta de fato propriedade osteocondutora (BETTI, 2004; MURUGAN; RAMAKRISHNA; RAO, 2008) e/ou osteoindutora (URIST, 1965; KÜBLER, *et al.*, 1993), devido a fatores de crescimento presentes em sua matriz, podendo oferecer resultados tão satisfatórios a ponto de serem considerados similares ao autógeno (BIGHAM, *et al.*, 2008).

O Sulfato de Cálcio foi empregado por já ser utilizado para essa finalidade desde a década de 60 (SOTTOSANTI, 1992), tendo suas propriedades bem descritas na literatura, sendo basicamente um material osteopreenchedor (KIM, *et al.*, 1998; DE LEONARDIS; PECORA, 2000; GOLDMAN, *et al.*, 2000; MELO, *et al.*, 2005). Este material existe na forma hemi-hidratada e di-hidratada, optamos pela forma di-hidratada por ter relatos de sua eficiência, dentro de sua aplicabilidade (AICHELMANN-REIDY; HEATH; REYNOLDS, 2004), além disso de acordo com MAEDA, *et al.*, (2007) ambos apresentam resultados similares, quando utilizados em defeitos ósseos, similares ao nosso modelo experimental. Este é um material de

rápida reabsorção assim buscamos comparar com a matriz óssea orgânica, já que apresenta um custo mais baixo.

Um grupo foi mantido apenas com coágulo sanguíneo atuando como controle, visto que em uma cavidade de tamanho não crítico, a evolução do processo natural de reparo já é bem conhecida.

Todos os biomateriais foram manipulados com a adição de soro fisiológico assim como indicado pelo fabricante e realizado por outros autores (MUNHOZ, 2005; CONEGLIAN, 2007; GARCIA, 2007) para facilitar sua inserção. Além do mais ROCHA, *et al.*, (2010) observaram que a associação de PRP ao osso bovino inorgânico não promoveu resultados superiores, sendo insignificante a diferença quando utilizado o osso bovino inorgânico isoladamente da mesma forma que CAMARGO, *et al.*, (2002).

Foram utilizados materiais particulados, pois proporcionam uma revascularização mais intensa, maior superfície de osteocondução e remodelação biológica mais fácil quando comparados ao enxerto em bloco (BETTI, 2004).

Quanto à possibilidade do uso de membranas, acreditamos que não seria necessário para nosso estudo, haja vista que GARRETT, *et al.*, (2002) sugerem que a colocação de uma membrana sobre a abertura óssea após uma cirurgia parendodôntica não trouxe nenhum efeito adicional sobre o reparo ósseo, assim como BERNABÉ, *et al.*, (2010).

A sutura foi feita em dois planos, de modo à coaptar melhor os tecidos, e consequentemente promover uma cicatrização mais rápida e eficaz, primeiramente suturando o tecido muscular com fio reabsorvível e o tecido cutâneo com fio de seda.

Logo após o procedimento cirúrgico, cada animal recebeu medicação sistêmica, sendo administrado, via intramuscular, uma dose de anti-inflamatório (Ketoflex 1,0%) estendido por 3 dias consecutivos, com o objetivo de modular o processo inflamatório e minimizar a dor, e uma dose antibiótico (Flotril 2,5%) por 5 dias consecutivos para prevenir quanto a possíveis infecções pós-cirúrgicas. Esse protocolo medicamentoso foi prescrito por um Médico Veterinário.

Os períodos experimentais foram estipulados, tomando como referência que em função do organismo do coelho, este animal leva aproximadamente 6 semanas para promover o processo de reparo ósseo (GARETTO, *et al.*, 1995; MACNEILL, *et al.*, 1999). A partir disto, propusemos trabalhar com três períodos, buscando observar o processo de reparo a curto, médio e longo prazo. Porém buscando a literatura encontra-se uma grande variabilidade de períodos nesse modelo de estudo, assim os períodos adotados por nós seguiram alguns estudos previamente realizados como BETTI, (2004) e MAEDA, *et al.*, (2007) para que pudéssemos estabelecer uma comparação dos resultados obtidos.

Para se realizar a análise microscópica, as epífises tibiais nas quais foram criados os defeitos, foram dissecadas mantendo somente o periósteo sobre o defeito. Essas após a fixação em formol, foram desmineralizadas em EDTA 4,13%, buscando assim, com um processo de desmineralização mais lento, uma melhor preservação das estruturas (BETTI, 2004; CONEGLIAN, 2007; GARCIA, 2007), vale ressaltar que em média as amostras levaram cerca de 6 a 7 meses para completar o processo de desmineralização.

Foram realizados cortes semi-seriados com 5 micrometros de espessura, obtendo 3 lâminas com 3 cortes para cada amostra. As lâminas foram coradas de acordo com a mesma técnica empregada por diversos autores (BETTI, 2004; MAEDA, *et al.*, 2007; SICCA, *et al.*, 2008) e como proposto pelo laboratório de Histologia da FOB-USP. Utilizamos a coloração com Hematoxilina e Eosina, pois esta técnica permite evidenciar com clareza o tecido ósseo e conjuntivo, bem como as células presentes, pois há a diferenciação do núcleo e citoplasma.

A análise microscópica foi realizada em duas etapas, uma descritiva, onde buscamos apresentar de forma detalhada todos os fenômenos histomorfológicos observados nos espécimes mais representativos de cada grupo, a outra etapa foi morfométrica, onde buscamos mensurar a área de tecido ósseo neoformado.

A quantificação do tecido ósseo neoformado pode ser realizada pela atribuição de escores (CONEGLIAN, 2007; GARCIA, 2007; ZHUKAUSKAS, *et al.*, 2010), mas por ser um modo subjetivo, pode não ser tão preciso quanto à contagem ponto a ponto, com o uso de retículo (JENSEN, *et al.*, 2006; SANTAMARIA JÚNIOR,

et al., 2010). Diversos autores utilizam softwares de análise de imagens para realizar a mensuração do tecido ósseo formado, por ser uma maneira rápida e confiável de realizar essa função (XU, *et al.*, 2003; ORSINI, *et al.*, 2004; MELO, *et al.*, 2005; KIM, Y., *et al.*, 2009; LAUREANO FILHO, *et al.*, 2009; STEIN; SILVA; DA SILVA, 2009; KIM, W., *et al.*, 2010; RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, *et al.*, 2010).

O *software* *bioImage_L* foi desenvolvido recentemente para realizar a mensuração de biofilme em imagens obtidas por meio da microscopia confocal de varredura laser. Este *software* oferece uma ferramenta para realizar mensurações automatizadas por meio da segmentação de cores (verde e vermelho), essa ferramenta é calibrada de acordo com a escala das imagens (CHÁVEZ DE PAZ, 2009). Assim, com a realização de um teste piloto para análise histomorfométrica das imagens, constatamos que ao se realizar o tratamento das imagens obtidas do microscópio ótico, alterando a cor das imagens basófilas (como o tecido ósseo) para o verde, por meio da binarização com o *software* Leica Application Suite 3.7.0, conseguimos realizar com sucesso a mensuração da área em μm^2 com o *software* *bioImage_L*. Para reduzir ao máximo possíveis resultados falso-positivos, como a contagem de áreas que não as de tecido ósseo neoformado, utilizamos um *software* específico para o trabalho em imagens (Photoshop 7.0) para criar máscaras sobre fibras ou células sanguíneas que também foram binarizadas, bem como o tecido ósseo pré-existente, nas bordas dos defeitos. As imagens preparadas foram armazenadas em pastas, nas quais automaticamente foram medidas pelo *software*, que forneceu a área segmentada de cada imagem em μm^2 que posteriormente foram transformados em mm^2 para facilitar a interpretação dos dados.

Ao realizar a análise estatística, a ausência de normalidade foi constatada pelo teste D'Agostino e Pearson. Com isso foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar quantitativamente os cinco grupos independentemente dentro de cada período e também para avaliar cada grupo em função dos três períodos. De posse dos resultados, ao se observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos ou períodos, realizou-se o teste de Dunn, por ser um teste específico para comparações múltiplas.

6.2 Dos Resultados

O processo de reparo ósseo ocorre em função de uma cadeia de eventos celulares, que diante de uma injúria, causada pela confecção de um defeito ósseo, o tecido responde com a formação de coágulo, inflamação, angiogênese, fibroplastia, síntese de matriz, epiteliação e remodelação (ROSS; ROWRELL, 1993; KIERSZENBAUM, 2004).

De acordo com as dimensões dos defeitos ósseos criados neste estudo, sabe-se que o próprio organismo pode proporcionar um reparo adequado (BETTI, 2004), por isso utilizamos o coágulo sanguíneo como controle para os demais grupos experimentais. Ao manter uma cavidade preenchida com sangue, logo ocorre a coagulação do mesmo, que passa a atuar como um corpo estranho, gerando uma resposta inflamatória que desencadeia um processo de reabsorção e estimula, concomitantemente a proliferação fibroangioblástica, criando um meio adequado para o depósito de matriz e a neoformação óssea (GARCIA, 2007).

Para a análise descritiva dos resultados foram estabelecidos como parâmetros a morfologia neoformativa da cortical óssea externa, a reposição do periósteo, a presença de tecido de granulação, reabsorção ou persistência do material implantado e o fechamento completo ou incompleto do defeito ósseo. Já com a análise histomorfométrica buscamos quantificar o tecido ósseo neoformado no defeito.

De modo geral o grupo 5 (controle), apresentou uma evolução satisfatória no processo de reparo no defeito produzido, apresentando maior área de neoformação óssea aos 60 dias quando comparado ao período anterior ($P < 0,05$), maior inclusive que o período de 90 dias, porém não significativamente. Vale ressaltar que em 60 dias, notou-se em todos os espécimes com maior ou menor intensidade a presença de lacunas de reabsorção, sugerindo atividade osteoremodeladora e aos 90 dias os espécimes desse grupo apresentaram uma cortical neoformada com aspecto compacto, selando o defeito produzido, apesar da ocorrência em um dos espécimes de ausência de selamento. O reparo do defeito ósseo às expensas do coágulo sanguíneo foi condizente com os estudos de MELO, *et al.*, (2005); CONEGLIAN, (2007); GARCIA, (2007); MAEDA, *et al.*, (2007); CALASANS-MAIA, *et al.*, (2009).

Ao incluir a matriz óssea bovina inorgânica (grupo 1) em nosso estudo, verificamos que a referida matriz sugeriu, pela análise morfológica, capacidade osteocondutora nos três períodos experimentais. A neoformação óssea ocorreu em contato direto com as partículas do material implantado. Para uma melhor osteocondução, as partículas devem ter em sua estrutura tridimensional um grande número de poros interconectados, para permitir a proliferação celular e vascular, além da formação de tecido de granulação em seu interior. Outro ponto importante que parece favorecer a osteocondução é a superfície do material que apresenta-se rugosa (CARVALHO, *et al.*, 2007). Nossos achados estão de acordo com os de diversos autores (YOUNG; SANDSTEDT; SKOGLUND, 1999; ARTZI; TAL; DAYAN, 2001; ZITZMANN, *et al.*, 2001; CARMAGNOLA; ADRIAENS; BERGLUNDH, 2003; WORTH, *et al.*, 2005; JENSEN, *et al.*, 2006) que constataram, que de fato, essa matriz exerce plenamente a função osteocondutora, consequentemente sendo biocompatível.

Em nenhuma das amostras desse grupo, observamos que alguma partícula do material tenha promovido uma reação antigênica, o que, atualmente, está descartado em função do preparo da matriz (SOGAL; TOFE, 1999; CALASANS-MAIA, *et al.*, 2009). Com referência ao tamanho das partículas empregadas, 0,5 a 1mm, não provocou nenhuma reação do tipo corpo estranho, pois de acordo com HIGASHI; OKAMOTO, (1996) partículas menores que 0,3mm podem ser consideradas como um corpo estranho. De modo geral independentemente do tamanho dos grânulos, observamos que havia aposição de osso neoformado envolvendo as partículas enxertadas. Com referência à ausência de reação inflamatória, de permeio as trabéculas ósseas neoformadas, pode estar vinculado ao fato de não termos avaliado um período inicial mais curto, pois GARCIA, (2007) ao implantar osso bovino inorgânico em alvéolos de ratos observou que em 7 dias houve uma reação inflamatória, predominantemente, moderada. Todavia, tal reação teve esse desempenho somente aos 7 dias, caindo significativamente para discreta aos 15 e 30 dias. CALASANS-MAIA, *et al.*, (2009) utilizaram um modelo experimental semelhante ao nosso, porém adotaram períodos experimentais mais curtos 7, 14 e 28 dias. De acordo com seus resultados, o grupo controle teve preenchimento completo com osso neoformado e não se observou inflamação adversa. Todavia com a matriz inorgânica, infiltrados inflamatórios leves estavam

presentes aos 7 dias e ausentes aos 14 dias. O processo de regeneração predominava depois de 14 dias. A osteogênese começou aos 7 dias, nas margens da lesão e expandiu-se em direção ao centro, durante todo o período experimental, preenchendo o defeito ósseo.

Ao implantar matriz óssea bovina inorgânica em subcutâneo de ratos, OLIVEIRA, *et al.*, (1999) verificou a formação de um granuloma do tipo corpo estranho, com o recrutamento de macrófagos e células gigantes multinucleadas, do mesmo modo quando implantou osso autógeno. Assim como ZAMBUZZI, *et al.*, (2006) constataram em subcutâneo de ratos que o GenOx Inorg não causou reações adversas severas, sendo bem tolerado pelo tecido conjuntivo de rato.

Manipulamos esse material com soro fisiológico, pois de acordo com o estudo de ROCHA, *et al.*, (2010), que compararam o osso bovino inorgânico isolado ou associado ao plasma rico em plaquetas, constataram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. THORWARTH, *et al.*, (2006) concluíram que somente com a adição de 25% de osso autógeno, houve formação óssea mais acelerada. Este efeito é provavelmente causado pelas propriedades osteoindutoras dos elementos celulares transplantado com o osso autógeno.

Nossos resultados evidenciaram de maneira clara que as partículas inorgânicas do material implantado permaneceram praticamente inalteradas mesmo após 90 dias, assim realizando uma projeção a períodos mais estendidos podemos concordar com TAGA, (1996), que afirmou que esse material quando microgranulado, leva cerca de 4 a seis meses para sua completa reabsorção. Porém ARTZI; TAL; DAYAN, (2000) mesmo após 9 meses ainda observou partículas do osso inorgânico, implantados em alvéolos humanos.

Nos três períodos foi possível observar a presença de células gigantes multinucleadas esparsas, sugerindo atividade clástica. Nos períodos iniciais essas células foram observadas em menor número, mas possivelmente poderiam estar associadas a reabsorção das trabéculas ósseas que se formaram na região medular. Ficou evidente aos 90 dias, que essas células encontravam-se na periferia das partículas do material implantado, apontando, possivelmente para o início de um processo de reabsorção do material. ZITZMANN, *et al.*, (2001) constataram sinais de

reabsorção do material enxertado em humanos após seis meses, indicando que este mecanismo faz parte do processo de remodelação. Por outro lado YOUNG; SANDSTEDT; SKOGLUND, (1999) relataram que as partículas de matriz óssea bovina inorgânica, no caso o Bio-Oss, não apresentaram sinais de reabsorção, permitindo questionar se esse material pode ser classificado como reabsorvível.

O GenOx Inorg (grupo 1) proporcionou o selamento do defeito criado, por meio de neoformação de osso cortical, em todos os períodos, corroborando com os resultados de TUDOR, *et al.*, (2008) e de INDOVINA; BLOCK, (2002), mas não houve diferença significativa em nenhum dos períodos, quando comparado ao grupo controle. INDOVINA; BLOCK, (2002) observaram, ainda que a matriz óssea bovina inorgânica promoveu neoformação óssea significativamente maior do que nos grupos em que se utilizou sulfato de cálcio, resultado esse não verificado em nosso estudo. O osso bovino inorgânico proporciona bons resultados, mas de acordo com JENSEN, *et al.*, (2006) seu uso retarda o processo de reparo nos períodos iniciais, o que não pode ser verificado em nosso estudo.

URIST, (1965) foi o primeiro a relatar o potencial osteoindutor da matriz óssea desmineralizada ou orgânica de origem animal e humana, quando implantada em tecido muscular de animais. Ele observou que houve formação óssea heterotópica, incluindo formação medular central em 50 a 98% dos animais, após um período de 4 e 16 semanas de implantação. Esse potencial osteoindutor foi corroborado por KÜBLER, *et al.*, (1993) que também implantaram matriz óssea orgânica em tecido muscular de ratos, e após 6 semanas encontraram que em 50% dos casos houve condrogênese e osteogênese, todavia quando o implante foi enxertado em animais imunossuprimidos ocorreu em 94% dos implantes ossificação endocondral. Já no teste in vitro 68% das amostras induziram condrogênese. Apesar da matriz óssea orgânica ter sido há muito tempo alvo de estudo, ainda tem suas propriedades muito contestadas, considerando que a osteoindução, se faz às custas de proteínas presentes como as BMP's e outros fatores.

A matriz óssea bovina orgânica é um material biocompatível e reabsorvível (ZHUKAUSKAS, *et al.*, 2010). SANADA, *et al.*, (2003) implantaram em músculo de ratos a matriz óssea esponjosa bovina orgânica (GenOx Org) em blocos, constataram uma resposta inflamatória aguda, principalmente nos períodos iniciais,

provavelmente devido a uma reação decorrente da desorganização tecidual causada pelo procedimento cirúrgico. Nos períodos tardios ficou claro para os autores que esse material não tem capacidade osteoindutora, pois não houve qualquer indício de ocorrência de osteogênese ectópica, dado confirmado por CARNEIRO, (2003).

Em nosso estudo, os períodos experimentais demonstraram, na maioria dos espécimes, neoformação óssea incompleta da cortical, exceto para o período de 90 dias.

Uma possibilidade para a ausência da propriedade de osteoindução seria a presença de traços minerais em sua estrutura, haja vista que REDDI; HUGGINS, (1972) propuseram que a presença de matriz mineralizada isolada ou associada à matriz orgânica, causaria a inibição da osteogênese. Essa afirmação foi baseada na presença de células gigantes multinucleadas (inibidoras da osteogênese), no local da implantação da matriz mineralizada, caracterizando possivelmente, reação do tipo corpo estranho.

Por esse motivo o controle de qualidade no processamento dessa matriz é de suma importância, para se obter uma matriz puramente orgânica, pois estudos constataram que ocorre reação tipo corpo estranho com a presença de células gigantes, devido a presença de elementos minerais associados às partículas de osso bovino orgânico, por deficiência na desmineralização e remanescentes potencialmente antigênicos durante a produção desse biomaterial (CARNEIRO, 2003; DA CRUZ, *et al.*, 2007). MURUGAN; RAMAKRISHNA; RAO, (2008), ao realizarem um controlado protocolo de desmineralização com a utilização de ácidos e álcoois, demonstraram como obter uma matriz óssea bovina puramente orgânica sem partículas minerais associadas.

Com referência ao nosso estudo, podemos inferir que o biomaterial usado apresentou um padrão de qualidade aceitável, lembrando que em nenhum dos espécimes preenchidos com o mesmo ocorreu reação inflamatória crônica.

É importante ressaltar que não encontramos resquícios do material implantado, mesmo no período de 30 dias, ao contrário de BETTI, (2004) e CARNEIRO, (2003), que neste mesmo período em modelos experimentais similar ao nosso, observaram ainda, a presença de restos de partículas da matriz implantada.

Em relação a ocorrência da formação de cartilagem que origina o processo de ossificação endocondral, discute-se muito que depende da origem, endocondral ou intramembranosa da matriz óssea desmineralizada. A respeito disso, ISAKSSON, *et al.*, (1992) trabalhando com matriz óssea desmineralizada de origem endocondral e intramembranosa, em defeitos ósseos criados em calvárias de coelhos, constataram que ambos materiais apresentaram baixo potencial osteoindutor, e que a neoformação óssea ocorreu basicamente pela osteocondução. BETTI, (2004), constatou em alguns casos, no período de 30 dias, tecido ósseo neoformado em contato com fragmentos da matriz, levando-a a concluir, que esse material é osteocondutor. Por outro lado, RABIE; WONG; HÄGG, (2000) afirmaram que a matriz óssea orgânica, especialmente a de origem intramembranosa apresenta um grande potencial osteoindutor.

Em nosso estudo utilizamos matriz óssea orgânica de origem endocondral, e nos espécimes do período de 30 e 60 dias observamos que o defeito não estava totalmente fechado pelo osso neoformado. No período de 30 dias na borda do defeito havia tecido cartilaginoso, avançando sobre a superfície do trabeculado ósseo neoformado, onde havia discreta neoformação óssea do tipo endocondral. Nos outros espécimes, o osso neoformado pode até ter sido precedido por cartilagem. Esse quadro também foi observado por BIGHAM, *et al.*, (2008), em defeitos segmentares, realizados em rádio de coelhos e preenchidos com osso bovino orgânico, onde após 60 dias constaram a presença de cartilagem em ossificação endocondral.

Aos 90 dias o tecido ósseo neoformado fechou totalmente o defeito produzido, mas não havia nenhum vestígio do material implantado, a exemplo dos períodos de 30 e 60 dias. Esse aspecto morfológico pode estar contradizendo a capacidade osteocondutora do material, dado também observado por CARNEIRO, (2003) e DA CRUZ, *et al.*, (2007). Desse modo esse material atuou como uma barreira física, contendo a invaginação de tecido conjuntivo para dentro da cavidade, caracterizando a propriedade osteopreenhedora já comprovada por vários autores (TORRICELLI, *et al.*, 2002; CARNEIRO, 2003; BETTI, 2004; DA CRUZ, *et al.*, 2007).

A área de tecido ósseo neoformado nos defeitos implantados com osso orgânico foi significativamente menor no período de 30 dias quando comparada com

os períodos de 60 e 90 dias. Comparando com o grupo controle não houve diferença significativa em nenhum período. TORRICELLI, *et al.*, (2002) no entanto, encontraram que o emprego de matriz óssea orgânica causou um aumento significativo na formação óssea comparado ao grupo controle, mas é oportuno salientar que os autores trabalharam com defeitos menores, que aqueles produzidos neste trabalho.

Empregando a matriz orgânica em defeitos de tamanho crítico, em calvária de ratos, DA CRUZ, *et al.*, (2007), observaram que o material foi reabsorvido lentamente e serviu como um arcabouço, favorecendo a angiogênese, migração e adesão celular. Ao empregar essa matriz em defeitos segmentares em fêmures de coelhos, CONCANNON; BOSCHERT; PUCKETT, (1997), verificaram que em todos os animais que receberam a matriz orgânica, o espaço foi totalmente preenchido com osso neoformado após 6 a 8 semanas, porém, a referida matriz não foi tão eficiente quando comparada com o osso autógeno. Por outro lado BIGHAM, *et al.*, (2008), observaram, em um modelo experimental similar ao anteriormente citado, que o reparo do defeito quando empregado essa matriz foi tão rápido quanto com o osso autógeno.

O GenMix é um biomaterial composto por uma associação de matriz inorgânica e orgânica do osso bovino, acrescido de aglutinante de colágeno, que facilita a manipulação do material quando misturado ao soro ou sangue. A proposta deste material é que se tenha um tempo total de reabsorção menor, além de agregar propriedade osteocondutora da matriz inorgânica e a possível propriedade osteoindutora da matriz orgânica.

Em nenhum espécime do nosso trabalho, em que utilizamos esse biomaterial, foi detectado reação antigênica, atestando de fato sua biocompatibilidade. Outro fator observado foi a capacidade osteocondutora do material, observado em menor proporção quando comparado com a matriz puramente inorgânica, justamente pelo fato de apresentar uma menor quantidade da mesma. STEIN; SILVA; DA SILVA, (2009), utilizaram o GenMix em fêmures de ratos, e constataram em seus resultados trabéculas ósseas formadas em íntimo contato com as partículas inorgânicas e quanto ao composto orgânico, este parece não ter apresentado nenhuma ação osteoindutora. PRATA, (2010), implantou o GenMix em alvéolos de ratos, e verificou

que a referida matriz não apresentou a propriedade osteoindutora sugerida por alguns relatos da literatura, portanto deve ter atuado apenas como osteocondutora. Ainda nesse estudo, o autor observou menor formação de osso nos animais em que utilizou o GenMix, isoladamente ou associado às células-tronco, quando comparados com o grupo que recebeu osso autógeno. STEIN; SILVA; DA SILVA, (2009) verificaram também que o enxerto autógeno proporcionou um reparo ósseo muito superior quando comparado com o GenMix. SICCA, *et al.*, (2008) ao utilizar um biomaterial composto (matriz óssea bovina inorgânica, orgânica, um pool de BMP's e colágeno) para realizar levantamento de seio maxilar em coelhos, observaram que houve infiltrado inflamatório apenas no período de duas semanas iniciais, exclusivamente em torno do componente orgânico do biomaterial e coincidentemente houve um retardo no processo de reparo ósseo, sugerindo que a resposta inflamatória levou à rápida reabsorção do material, eliminando a potencial capacidade osteoindutora das BMP's presentes na matriz óssea desmineralizada. Ao utilizar o mesmo biomaterial em defeitos segmentares de tíbias de ovinos, TEIXEIRA, *et al.*, (2007) verificaram após 90 dias, que a quantidade de neoformação óssea foi menor e mais imatura quando comparado com enxerto autógeno.

Em nosso experimento constatamos que a área de neoformação óssea foi significativamente maior nos períodos de 60 e 90 dias quando comparados ao período de 30 dias. Ao compará-lo com o grupo controle não apresentou diferença estatisticamente significante em nenhum período. De acordo com PRATA, (2010), a utilização dessa matriz composta nos alvéolos de ratos causou retardo significativo na reparação alveolar.

A associação de matrizes ósseas a outros componentes para desenvolver novos biomateriais ainda precisa de estudos aprofundados, visto que ainda é um tema controverso na literatura. Em seu estudo DA COSTA FILHO; TAGA; TAGA, (2001) observaram que o “pool” de BMP's e as proteínas não colágenas do osso provocaram um efeito inibitório sobre a osteogênese. Desse modo afirmaram que os biomateriais sem as BMP's, particularmente o osso bovino desproteinizado, proporcionaram um substrato favorável à formação óssea. Já FERREIRA, *et al.*, (2004) ao utilizar um enxerto ósseo bovino composto Gen Pro[®], composto por um “pool” de proteínas morfogenéticas bovinas, ligado a hidroxiapatita sintética absorvível microgranulada, em defeitos de tamanho crítico em calvaria de ratos,

observaram que esse biomaterial promoveu a formação de reação granulomatosa tipo corpo estranho e inibiu profundamente a neoformação óssea. Assim os autores sugeriram, que a hidroxiapatita sintética microgranular não é um bom carreador para as BMP's expressarem o seu potencial indutor.

Em relação ao emprego do sulfato de cálcio, já é bem esclarecido que esse material atua apenas como osteopreenchedor, bloqueando a invaginação do tecido conjuntivo e permitindo que haja reparo ósseo adequado (SOTTOSANTI, 1992; PECORA, *et al.*, 1997; STROCCHI, *et al.*, 2002; STUBBS, *et al.*, 2004; PETERS, *et al.*, 2006), fato confirmado por nosso estudo, haja visto que, de acordo com o nossos resultados o sulfato de cálcio atuou como uma barreira eficiente, pois nos três períodos observados não se constatou a proliferação de tecido conjuntivo para o interior da cavidade óssea. Esse resultado está em desacordo com aqueles obtidos por MAEDA, *et al.*, (2007), que em um modelo experimental similar ao nosso, verificaram que houve a formação de tecido conjuntivo fibroso avançando para o interior do defeito nos casos preenchidos com o mesmo sulfato de cálcio utilizado por nós, no período de 30 dias. O autor atribuiu esse fato à rápida reabsorção do material, pois após 30 dias não foi mais possível detectar a presença de sulfato de cálcio na área do defeito. Não podemos evidenciar se esse material apresentou ação osteocondutora, como sugerida por KIM, *et al.*, (1998), pois em nenhum período constatamos a presença do material na área enxertada.

É conhecido que o sulfato de cálcio leva cerca de 4 semanas para ser reabsorvido, da mesma forma não detectamos após 30 dias e tampouco nos demais períodos, resquícios do material implantado, assim como STROCCHI, *et al.*, (2002); YOSHIKAWA, *et al.*, (2002); ORSINI, *et al.*, (2004). Aliás ORSINI, *et al.*, (2004), ao avaliar o reparo de defeitos ósseos, utilizando partículas e pasta de sulfato de cálcio, constataram que após duas semanas, o sulfato de cálcio ainda estava presente no dois grupos. Porém após quatro semanas, foi praticamente reabsorvido por completo e substituído por osso neoformado, e em nenhum dos espécimes foram verificadas células inflamatórias presentes. Os autores não identificaram diferença na resposta tecidual, com as duas formas de sulfato de cálcio utilizadas, assim como STUBBS, *et al.*, (2004). Já CONEGLIAN, (2007) ao implantar sulfato de cálcio em alvéolos de ratos por 7, 15 e 30 dias, observou que em todos os períodos experimentais, apareceram resíduos do sulfato de cálcio di-hidratado na forma de

conglomerados basofílicos com aspecto granulado, porém houve uma redução na sua quantidade conforme aumentava o período de observação. Além disso, é importante ressaltar que o referido autor detectou ao redor ou no interior desses conglomerados, a presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas, células essas responsáveis pela fagocitose do material, mostrando assim a tentativa do organismo de reabsorver o mesmo. Por outro lado STUBBS, *et al.*, (2004) ao implantarem sulfato de cálcio em defeitos criados em tíbia de coelhos, encontraram o material no defeito após 3 e 6 semanas da cirurgia, sendo que a reabsorção completa foi vista somente após 12 semanas. DE LEONARDIS; PECORA, (2000) constataram que algumas partículas de sulfato de cálcio foram observadas após 6 meses e praticamente não foi detectada após 9 meses.

Neste trabalho o período de 60 dias, apresentou neoformação óssea que não foi significativamente maior que o período de 30 dias, porém apresentou cortical óssea neoformada, menos espessa que a cortical periférica ao defeito. Já no período de 90 dias a área de formação óssea foi maior ($P < 0,05$) que os dois períodos anteriores, apresentando uma cortical óssea mais bem definida. Esses resultados mais uma vez não estão de acordo com MAEDA, *et al.*, (2007), no qual o grupo controle, preenchido somente com o coágulo sanguíneo, a ocorrência de neoformação óssea foi mais intensa do que nos grupos com sulfato de cálcio, em todos períodos de avaliação, porém é importante ressaltar que esse autor realizou apenas análise descritiva dos fenômenos neoformativos.

Na comparação com os demais grupos o sulfato de cálcio (grupo 4) não apresentou diferença significativa nos períodos de 30 e 60 dias, somente apresentou neoformação óssea superior ($P < 0,05$), quando comparado com o grupo 2 e grupo 5 no período de 90 dias. PETERS, *et al.*, (2006) observaram que em defeitos metafisários de ovinos de tamanho não crítico, o sulfato apresentou maior quantidade de osso neoformado do que no grupo controle após 12 semanas. MELO, *et al.*, (2005) ao implantar esse biomaterial em tíbias de ratos, verificaram aos 30 dias menor formação óssea do que o grupo controle.

Uma possível explicação para os bons resultados apresentados pelo sulfato de cálcio, seria a presença de mais vasos sanguíneos nos locais tratados com esse material, como demonstrado por STROCCHI, *et al.*, (2002) que realizaram um

estudo em coelhos avaliando a densidade angioblástica em locais tratados com sulfato de cálcio e osso autógeno, e verificaram uma maior quantidade de vasos sanguíneos quando utilizado o sulfato de cálcio. Assim esses autores sugeriram que esse material é capaz de promover um aumento na angiogênese local, favorecendo o processo de reparo.

É importante relatar o estudo de APAYDIN; TORABINEJAD, (2004) que avaliaram o efeito do sulfato de cálcio em relação à deposição do cimento e tecido ósseo após cirurgia parendodôntica em cães. Demonstraram que o sulfato de cálcio não apresentou efeitos negativos, porém não intensificou o reparo ósseo ou dento-alveolar, outro ponto observado foi que ele não alterou as propriedades do MTA. YOSHIKAWA, *et al.*, (2002), também utilizaram o sulfato de cálcio em cirurgia parendodôntica em cães, e observaram que o reparo ósseo foi similar a do grupo com membrana e-PTFE e superior ao controle. MURASHIMA, *et al.*, (2002), utilizaram o mesmo modelo experimental e o sulfato de cálcio foi efetivo para a regeneração óssea de defeitos extensos incluindo os do tipo túnel, porém foi menos efetivo em defeitos que comunicavam com o sulco gengival.

Com base em nossos resultados, podemos inferir que os biomateriais empregados neste estudo, de acordo com suas características, constituem opções como osteopreenchedores e/ou osteocondutores, variado quanto ao tempo de reabsorção. Todavia, são biocompatíveis e não interferem no processo de reparo ósseo. Porém estudos complementares com mais variáveis serão necessários para esclarecer de forma abrangente as reais propriedades biológicas e a aplicabilidade destes biomateriais.

Certamente que os resultados obtidos neste estudo, não devem ser diretamente extrapolados aos humanos, no entanto, no que se refere à cirurgia parendodôntica, podemos pressupor que assim como nos defeitos em tíbias de coelhos, os biomateriais empregados apresentaram um comportamento aceitável, atuando principalmente de modo a conter a proliferação de tecidos circunjacentes ao defeito, e mesmo em alguns casos conduzindo a neoformação óssea. Mas, há que se considerar, que qualquer material introduzido no interior de um defeito pode atrasar o reparo, assim deve-se ponderar quanto a real necessidade de se aplicar

esses biomateriais, visto que em defeitos de menores proporções, o próprio organismo, através do coágulo sanguíneo, é capaz de promover o reparo.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a metodologia desenvolvida permitiram concluir que:

- Os biomateriais utilizados não demonstraram resultados superiores ao coágulo sanguíneo, exceto o sulfato de cálcio di-hidratado aos 90 dias.
- O GenMix não apresentou diferença estatisticamente significativa ao GenOx Inorg, GenOx Org e o sulfato de cálcio, quanto ao processo de neoformação óssea.
- O GenOx Inorg e o composto inorgânico do GenMix demonstraram morfologia compatível com a função de osteocondução.
- Tanto o GenOx Org quanto o sulfato de cálcio di-hidratado foram completamente reabsorvidos antes de 30 dias.

Referências

REFERÊNCIAS

Bone-grafting materials. Their uses, advantages and disadvantages. J Am Dent Assoc. 2002;133(8):1125-6.

Aaboe M, Schou S, Hjørting-Hansen E, Helbo M, Vikjaer D. Osseointegration of subperiosteal implants using bovine bone substitute and various membranes. Clin Oral Implants Res. 2000;11(1):51-8.

Aichelmann-Reidy M, Heath C, Reynolds M. Clinical evaluation of calcium sulfate in combination with demineralized freeze-dried bone allograft for the treatment of human intraosseous defects. J Periodontol. 2004;75(3):340-7.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. Eur Spine J. 2001;10 Suppl 2:S96-101.

Alhadainy H, Himel V, Lee W, Elbaghdady Y. Use of a hydroxylapatite-based material and calcium sulfate as artificial floors to repair furcal perforations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;86(6):723-9.

Apaydin E, Torabinejad M. The effect of calcium sulfate on hard-tissue healing after periradicular surgery. J Endod. 2004;30(1):17-20.

Araújo M, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. Clin Oral Implants Res. 2009;20(5):433-40.

Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. J Periodontol. 2000;71(6):1015-23.

Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets: 2. Histochemical observations at 9 months. J Periodontol. 2001;72(2):152-9.

Batista EL, Novaes AB, Simonpietri JJ, Batista FC. Use of bovine-derived anorganic bone associated with guided tissue regeneration in intrabony defects. Six-month evaluation at re-entry. J Periodontol. 1999;70(9):1000-7.

Bernabé P, Gomes-Filho J, Cintra L, Moretto M, Lodi C, Nery M, et al. Histologic evaluation of the use of membrane, bone graft, and MTA in apical surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(2):309-14.

Betti LV. **Análises microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos.** 2004. 152 p. (Tese de Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo - USP, Bauru.

Bigham A, Dehghani S, Shafiei Z, Torabi Nezhad S. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *J Orthop Traumatol*. 2008;9(2):73-80.

Bigham AS, Dehghani SN, Shafiei Z, Nezhad ST. Experimental bone defect healing with xenogenic demineralized bone matrix and bovine fetal growth plate as a new xenograft: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *Cell Tissue Bank*. 2009;10(1):33-41.

Bramante CM, Berbert A. *Cirurgia Paraendodôntica*. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2000.

Brewer N. Biology of the rabbit. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2006;45(1):8-24.

Buchaim RL, Roque DD, Roque JS, Toledo Filho JL, Andreo JC, Okamoto T. Genphos implant in surgical cavities performed in the tibia of rats submitted to experimental chronic alcoholism. A microscopic study. *Rev Fac Odontol Bauru*. 2002;10(1):17-22.

Calasans-Maia MD, Ascoli FO, Novellino ATNA, Rossi AM, Granjeiro JM. Avaliação histológica comparativa de reparo ósseo em tíbia de coelho tratada com xenoenxertos. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2009;17(6):340-3.

Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res*. 2002;37(4):300-6.

Carbonari M, Ludtke J, Santos PCV, Carvalho NTA, Gehrke SA. Caracterização físico-química e biológica de enxerto ósseo bovino, Bonefill, em bioensaios – Parte 1. Revista ImplanteNews. 2009;6(6):679-83.

Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. Clin Oral Implants Res. 2003;14(2):137-43.

Carneiro E. **Análise microscópica descritiva do efeito do tamanho das partículas de matriz de osso medular bovino desmineralizado na reparação de defeito ósseo em fêmures de coelhos.** 2003. 72 p. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo, Bauru.

Carvalho A, Faria P, Grisi M, Souza S, Taba M, Palioto D, et al. Effects of granule size on the osteoconductivity of bovine and synthetic hydroxyapatite: a histologic and histometric study in dogs. J Oral Implantol. 2007;33(5):267-76.

Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. Appl Environ Microbiol. 2009;75(6):1734-9.

Chogle S, Mickel A. An in vitro evaluation of the antibacterial properties of barriers used in guided tissue regeneration. J Endod. 2003;29(1):1-3.

Clergeau LP, Danan M, Clergeau-Guérithault S, Brion M. Healing response to anorganic bone implantation in periodontal intrabony defects in dogs. Part I. Bone regeneration. A microradiographic study. J Periodontol. 1996;67(2):140-9.

Concannon M, Boschert M, Puckett C. Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: a long-term study. Plast Reconstr Surg. 1997;99(7):1983-8.

Coneglian PZA. **Avaliação do processo evolutivo de reparo ósseo frente ao sulfato de cálcio e à hidroxiapatita. Estudo microscópico em alvéolos dentários de ratos.** 2007. 254 p. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo - USP, Bauru.

da Costa Filho LC, Taga R, Taga EM. Rabbit bone marrow response to bovine osteoinductive proteins and anorganic bovine bone. Int J Oral Maxillofac Implants. 2001;16(6):799-808.

da Cruz G, de Toledo S, Sallum E, de Lima A. Morphological and chemical analysis of bone substitutes by scanning electron microscopy and microanalysis by spectroscopy of dispersion energy. *Braz Dent J*. 2007;18(2):129-33.

De Leonardis D, Pecora G. Prospective study on the augmentation of the maxillary sinus with calcium sulfate: histological results. *J Periodontol*. 2000;71(6):940-7.

Deliberador T, Nagata M, Furlaneto F, Melo L, Okamoto T, Sundfeld M, et al. Autogenous bone graft with or without a calcium sulfate barrier in the treatment of Class II furcation defects: a histologic and histometric study in dogs. *J Periodontol*. 2006;77(5):780-9.

Dupoirieux L, Costes V, Jammet P, Souyris F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1994;23(6):395-8.

Eid K, Zelicof S, Perona B, Sledge C, Glowacki J. Tissue reactions to particles of bone-substitute materials in intraosseous and heterotopic sites in rats: discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation. *J Orthop Res*. 2001;19(5):962-9.

Favieri A, Campos L, Burity V, Santa Cecília M, Abad EC. Use of biomaterials in periradicular surgery: a case report. *J Endod*. 2008;34(4):490-4.

Ferreira GR, Cestari TM, Granjeiro JM, Taga R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. *Braz Dent J*. 2004;15(3):175-80.

Finkemeier C. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84(3):454-64.

Fonseca NM, Goldenberg S, Gomes PO, Lima CAP. Anestesia em Coelhos. *Acta Cir Bras*. 1996;11(2):82-104.

Furlaneto F, Nagata M, Fucini S, Deliberador T, Okamoto T, Messori M. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(3):311-8.

Garcia RD. **Estudo do processo evolutivo do reparo ósseo frente ao implante de osso bovino inorgânico e de hidroxiapatita BTCP. Análise microscópica em**

alvéolos dentários de ratos. 2007. 186 p. (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo, Bauru.

Garetto LP, Chen J, Parr JA, Roberts WE. Remodeling dynamics of bone supporting rigidly fixed titanium implants: a histomorphometric comparison in four species including humans. *Implant Dent.* 1995;4(4):235-43.

Garrett K, Kerr M, Hartwell G, O'Sullivan S, Mayer P. The effect of a bioresorbable matrix barrier in endodontic surgery on the rate of periapical healing: an in vivo study. *J Endod.* 2002;28(7):503-6.

Goldman RS, Hansen NS, Marcone C, Silva OC, Alonso C, Antonio AMMP. Tratamento cirúrgico das lesões do periápice com implantes de sulfato de cálcio. *Rev Bras Cir Implant.* 2000;25(7):55-8.

Gonçalves F, Hohn A, Granjeiro JM, da Silva IIC, Taga R, Cestari TM, et al. Regeneração óssea em Odontologia com a utilização do substituto ósseo composto xenogênico Gen Mix. *Revista Implant News.* 2009;6(4):373-9.

Guarnieri R, Pecora G, Fini M, Aldini N, Giardino R, Orsini G, et al. Medical grade calcium sulfate hemihydrate in healing of human extraction sockets: clinical and histological observations at 3 months. *J Periodontol.* 2004;75(6):902-8.

Habal MB, Reddi AH. *Bone Grafts & Bone Substitutes.* Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1992.

Handschel J, Simonowska M, Naujoks C, Depprich RA, Ommerborn MA, Meyer U, et al. A histomorphometric meta-analysis of sinus elevation with various grafting materials. *Head Face Med.* 2009;5:12.

Harris R. Clinical evaluation of a composite bone graft with a calcium sulfate barrier. *J Periodontol.* 2004;75(5):685-92.

Higashi T, Okamoto H. Influence of particle size of hydroxyapatite as a capping agent on cell proliferation of cultured fibroblasts. *J Endod.* 1996;22(5):236-9.

Hislop WS, Finlay PM, Moos KF. A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1993;31(3):149-53.

Hoexter D. Bone regeneration graft materials. J Oral Implantol. 2002;28(6):290-4.

Hosokawa R, Kubo T, Wadamoto M, Sato Y, Kimoto T. Direct bone induction in the subperiosteal space of rat calvaria with demineralized bone allografts. J Oral Implantol. 1999;25(1):30-4.

Indovina A, Block MS. Comparison of 3 bone substitutes in canine extraction sites. J Oral Maxillofac Surg. 2002;60(1):53-8.

Jardim ECG, Santos PL, Santiago Junior JF, Jardim Júnior EG, Aranega AM, Garcia Júnior IR. Enxerto ósseo em Odontologia. Rev Odontol de Araçatuba. 2009;30(2):24-8.

Jensen S, Broggini N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. Clin Oral Implants Res. 2006;17(3):237-43.

Junqueira LC, Caneiro J. Histologia Básica. 10 ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan; 2004.

Kemper N, Davison N, Fitzpatrick D, Marshall R, Lin A, Mundy K, et al. Characterization of the mechanical properties of bovine cortical bone treated with a novel tissue sterilization process. Cell Tissue Bank. 2010.

Kierszenbaum AL. Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à Patologia. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora; 2004.

Kim CK, Chai JK, Cho KS, Moon IS, Choi SH, Sottosanti JS, et al. Periodontal repair in intrabony defects treated with a calcium sulfate implant and calcium sulfate barrier. J Periodontol. 1998;69(12):1317-24.

Kim Y, Yun P, Kim S, Lim S. Analysis of the healing process in sinus bone grafting using various grafting materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107(2):204-11.

Kübler N, Reuther J, Kirchner T, Priessnitz B, Sebald W. Osteoinductive, morphologic, and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extracted, allogeneic human bone. J Oral Maxillofac Surg. 1993;51(12):1346-57.

Laureano Filho JR, Andrade ES, Albergaria-Barbosa JR, Camargo IB, Garcia RR. Effects of demineralized bone matrix and a 'Ricinus communis' polymer on bone regeneration: a histological study in rabbit calvaria. J Oral Sci. 2009;51(3):451-6.

Maeda S, Bramante C, Taga R, Garcia R, de Moraes I, Bernadineli N. Evaluation of surgical cavities filled with three types of calcium sulfate. J Appl Oral Sci. 2007;15(5):416-9.

Maguire H, Torabinejad M, McKendry D, McMillan P, Simon JH. Effects of resorbable membrane placement and human osteogenic protein-1 on hard tissue healing after periradicular surgery in cats. J Endod. 1998;24(11):720-5.

Marini RP, Avison DL, Corning BF, Lipman NS. Ketamine/xylazine/butorphanol: a new anesthetic combination for rabbits. Lab Anim Sci. 1992;42(1):57-62.

Marins LV, Cestari TM, Sottovia AD, Granjeiro JM, Taga R. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. J Appl Oral Sci. 2004;12(1):62-9.

Melo L, Nagata M, Bosco A, Ribeiro L, Leite C. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. Clin Oral Implants Res. 2005;16(6):683-91.

Munhoz EA. **Avaliação radiográfica de enxerto ósseo xenogênico em alvéolos de terceiros molares inferiores não irrompidos.** 2005. 121 p. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo, Bauru.

Murashima Y, Yoshikawa G, Wadachi R, Sawada N, Suda H. Calcium sulphate as a bone substitute for various osseous defects in conjunction with apicectomy. Int Endod J. 2002;35(9):768-74.

Murugan R, Ramakrishna S, Rao KP. Analysis of bovine-derived demineralized bone extracts. J Mater Sci Mater Med. 2008;19(6):2423-6.

Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR. Effect of deproteinization temperature on the preparation of microgranular bovine cortical bone: microscopic biochemical analysis in rat subcutaneous tissue. Rev Fac Odontol Bauru. 1999;7(3/4):85-93.

Orsini G, Ricci J, Scarano A, Pecora G, Petrone G, Iezzi G, et al. Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement: an experimental study in rabbit. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;68(2):199-208.

Pappalardo S, Carlino V, Brutto D, Sinatra F. How do biomaterials affect the biological activities and responses of cells? An in vitro study. *Minerva Stomatol*. 2010;59(9):445-64.

Park J, Jang J, Bae S, An C, Suh J. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(4):372-8.

Pecora G, Andreana S, Margarone Jr, Covani U, Sottosanti J. Bone regeneration with a calcium sulfate barrier. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;84(4):424-9.

Pecora G, De Leonardis D, Ibrahim N, Bovi M, Cornellini R. The use of calcium sulphate in the surgical treatment of a 'through and through' periradicular lesion. *Int Endod J*. 2001;34(3):189-97.

Pecora G, Leonardis DD, Ricci J, Massi OM. O uso de sulfato de cálcio em endodontia. *Rev Bras Odontol*. 2000;57(2):98-100.

Peters C, Hines J, Bachus K, Craig M, Bloebaum R. Biological effects of calcium sulfate as a bone graft substitute in ovine metaphyseal defects. *J Biomed Mater Res A*. 2006;76(3):456-62.

Pinto JGS, Ciprandi MTO, Aguiar RC, Lima PVP, Hernandez PAG, Silva Júnior AN. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais – uma revisão de conceitos atuais. *Rev Facul Odontologia UPF*. 2007;12(3):79-84.

Prata CA. **Avaliação da osteogênese em defeitos ósseos com utilização da engenharia tecidual óssea: uma comparação entre osso autógeno, substituto ósseo e células-tronco mesenquimais.** 2010. 118 p. (Tese de doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Rabie AB, Wong RW, Hägg U. Composite autogenous bone and demineralized bone matrices used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000;38(5):565-70.

Rafter M, Baker M, Alves M, Daniel J, Remeikis N. Evaluation of healing with use of an internal matrix to repair furcation perforations. *Int Endod J.* 2002;35(9):775-83.

Ramírez-Fernández MP, Calvo-Guirado JL, Arcesio-Delgado Ruiz R, Maté-Sánchez de Val JE, Gómez-Moreno G, Guardia J. Experimental model of bone response to xenografts of bovine origin (Endobon®): a radiological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2010.

Reddi AH, Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(6):1601-5.

Richardson C, Mellonig J, Brunsvold M, McDonnell H, Cochran D. Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Clin Periodontol.* 1999;26(7):421-8.

Rocha F, Ramos L, Batista J, Ferro E, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P. Bovine anorganic bone graft associated to PRP: Histological analysis in rabbit calvaria. *J Oral Implantol.* 2010.

Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 2000;289(5484):1508-14.

Ross MH, Rowrell LJ. *Histologia, texto e atlas.* 2 ed. São Paulo: Editorial Médica Panamericana; 1993.

Sanada JT, Rodrigues JGR, Canova GC, Cestari TM, Taga EM, Taga R. Histologic, radiographic and imunoglobuline profile analysis after implantation blocks of demineralized bovine cancellous bone graft in muscle of rats. *J Appl Oral Sci.* 2003;11(3):209-15.

Santamaria Júnior M, Fracalossi ACC, Ortiz MFM, Consolaro AC. Influence of bisphosphonates on alveolar bone density: a histomorphometric analysis. *Brazilian Oral Research.* 2010;24(3):309-15.

Scarano A, Orsini G, Pecora G, Iezzi G, Perrotti V, Piattelli A. Peri-implant bone regeneration with calcium sulfate: a light and transmission electron microscopy case report. *Implant Dent*. 2007;16(2):195-203.

Sicca C, Corotti M, Sgarbosa S, Cestari T, Cavalcanti M, Ferreira P, et al. Comparative histomorphometric and tomographic analysis of maxillary sinus floor augmentation in rabbits using autografts and xenografts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;86(1):188-96.

Sogal A, Tofe A. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol*. 1999;70(9):1053-63.

Sottosanti J. Calcium sulfate: a biodegradable and biocompatible barrier for guided tissue regeneration. *Compendium*. 1992;13(3):226-8.

Stassen LF, Hislop WS, Still DM, Moos KF. Use of anorganic bone in periapical defects following apical surgery- a prospective trial. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1994;32(2):83-5.

Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard J, Karring T. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in the rat. *J Clin Periodontol*. 2003;30(7):636-43.

Stavropoulos A, Wikesjö U. Influence of defect dimensions on periodontal wound healing/regeneration in intrabony defects following implantation of a bovine bone biomaterial and provisions for guided tissue regeneration: an experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2010;37(6):534-43.

Steigmann M. Pericardium membrane and xenograft particulate grafting materials for horizontal alveolar ridge defects. *Implant Dent*. 2006;15(2):186-91.

Stein RSS, Silva JB, da Silva VD. Estudo comparativo da neoformação óssea utilizando-se o enxerto autógeno e três substitutos: Defeitos ósseos em ratos. *Rev Bras Ortop*. 2009;44(4):330-5.

Strocchi R, Orsini G, Iezzi G, Scarano A, Rubini C, Pecora G, et al. Bone regeneration with calcium sulfate: evidence for increased angiogenesis in rabbits. *J Oral Implantol*. 2002;28(6):273-8.

Stubbs D, Deakin M, Chapman-Sheath P, Bruce W, Debes J, Gillies RM, et al. In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model. *Biomaterials*. 2004;25(20):5037-44.

Summitt M, Reisinger K. Characterization of the mechanical properties of demineralized bone. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(3):742-50.

Tadjoedin E, de Lange G, Bronckers A, Lyaruu D, Burger E. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol*. 2003;30(3):261-70.

Taga EM. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. *Rev Bras Cirug Implant*. 1996;3(1):59-69.

Teixeira CR, Rahal SC, Volpi RS, Taga R, Cestari TM, Granjeiro JM, et al. Tibial segmental bone defect treated with bone plate and cage filled with either xenogeneic composite or autologous cortical bone graft. An experimental study in sheep. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2007;20(4):269-76.

Thorwarth M, Schlegel K, Wehrhan F, Srouf S, Schultze-Mosgau S. Acceleration of de novo bone formation following application of autogenous bone to particulated anorganic bovine material in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):309-16.

Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Giardino R. Characterization of bone defect repair in young and aged rat femur induced by xenogenic demineralized bone matrix. *J Periodontol*. 2002;73(9):1003-9.

Tudor C, Srouf S, Thorwarth M, Stockmann P, Neukam F, Nkenke E, et al. Bone regeneration in osseous defects-application of particulated human and bovine materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(4):430-6.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(698):893-9.

Walsh W, Morberg P, Yu Y, Yang J, Haggard W, Sheath P, et al. Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;(406):228-36.

Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*. 2001;22(12):1599-606.

Worth A, Mucalo M, Horne G, Bruce W, Burbidge H. The evaluation of processed cancellous bovine bone as a bone graft substitute. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(3):379-86.

Xu H, Shimizu Y, Asai S, Ooya K. Experimental sinus grafting with the use of deproteinized bone particles of different sizes. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(5):548-55.

Xu H, Shimizu Y, Asai S, Ooya K. Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(1):126-33.

Yoshikawa G, Murashima Y, Wadachi R, Sawada N, Suda H. Guided bone regeneration (GBR) using membranes and calcium sulphate after apicectomy: a comparative histomorphometrical study. *Int Endod J*. 2002;35(3):255-63.

Young C, Sandstedt P, Skoglund A. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(1):72-6.

Yukna RA, Callan DP, Krauser JT, Evans GH, Aichelmann-Reidy ME, Moore K, et al. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol*. 1998;69(6):655-63.

Zambuzzi WF, Oliveira RC, Alanis D, Menezes R, Letra A, Cestari TM, et al. Microscopic analysis of porous microgranular bovine anorganic bone implanted in rat subcutaneous tissue. *J Appl Oral Sci*. 2005;13(4):382-6.

Zambuzzi WF, Oliveira RC, Pereira FL, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM. Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. *Braz Dent J*. 2006;17(4):274-8.

Zhukauskas R, Dodds RA, Hartill C, Arola T, Cobb RR, Fox C. Histological and radiographic evaluations of demineralized bone matrix and coralline hydroxyapatite in the rabbit tibia. *J Biomater Appl*. 2010;24(7):639-56.

Zitzmann NU, Schärer P, Marinello CP, Schüpbach P, Berglundh T. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2001;21(3):288-95.

Anexos

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
 Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
 PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
 Fone: (14)3235-8356
 e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 027/2009.

Bauru, 25 de setembro de 2009.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado "*Estudo do processo de reparo ósseo em função do sulfato de cálcio, vidro bioativo e enxerto ósseo bovino composto. Avaliação morfológica em fêmures de coelhos*", de autoria de Bruno Cavalini Cavenago, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator aprovando o projeto foi aceito "*ad referendum*" desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários

ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 027/2009

Bauru, 31 de janeiro de 2011.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de alteração no título do projeto de pesquisa "*Estudo do processo de reparo ósseo em função do sulfato de cálcio, vidro bioativo e enxerto ósseo bovino composto. Avaliação morfológica em fêmures de coelhos*" de autoria de Bruno Cavalini Cavenago, CD. Marina Angélica Marciano da Silva, CD. Raquel Zanin Midena e CD. Paloma Gagliardi Minotti, sob sua orientação, para ESTUDO DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO EM FUNÇÃO DE QUATRO BIOMATERIAIS. AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA EM TÍBIAS DE COELHOS, informamos que esta Comissão aprovou *ad referendum*, considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários