UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

TAMIRIS VALLIM ZAMBALDI DE OLIVEIRA

**Avaliação histomorfométrica da biocompatibilidade do enxerto
bovino misto (OrthoGen[®]) em tecido subcutâneo e o potencial
osteogênico em defeito ósseo craniano**

BAURU

2014

TAMIRIS VALLIM ZAMBALDI DE OLIVEIRA

**Avaliação histomorfométrica da biocompatibilidade do enxerto
bovino misto (OrthoGen[®]) em tecido subcutâneo e o potencial
osteogênico em defeito ósseo craniano**

Dissertação Corrigida apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral (opção Biologia Oral).

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Versão Corrigida

BAURU

2014

Ol4a Oliveira, Tamiris

Avaliação histomorfométrica da biocompatibilidade do enxerto bovino misto (OrthoGen®) em tecido subcutâneo e o potencial osteogênico em defeito ósseo craniano / Tamiris Vallim Zambaldi de Oliveira. – Bauru, 2014.

136p. : il. ; 31cm.

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

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

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

Assinatura:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 025/2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Carlos e Nadir**, pelo apoio, carinho e dedicação e o mais importante pelo incentivo e compreensão em todas as minhas escolhas.*

*Ao meu irmão **Thiago**, por sempre estar ao meu lado por me encorajar a seguir meus sonhos.*

*Aos meus avós, **Oliveira e Hélia**, que são responsáveis por grande parte de minhas conquistas.*

*Aos meus tios, **Ester e Cláudio**, por me apoiarem e incentivarem.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Gerson Francisco de Assis**, meu orientador pelo ensinamento, competência e paciência prestados a mim durante a realização deste trabalho.

À **Tania Mary Cestari** pela amizade, paciência, e ensinamentos, sem ela não teria conseguido realizar essa pesquisa.

Aos professores do laboratório de Histologia, **Prof. Dr. Rumio Taga, Prof. Dra. Camila de Oliveira Rodini Pegoraro, Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet**, por contribuírem em meu aprendizado.

Á todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru e em especial a **Danielle, Patrícia e Teresa**, pelo apoio e auxílio prestados no desenvolvimento da pesquisa, e pela amizade em todos os momentos.

Aos meus amigos de laboratório em especial **Ricardo, Cadu e Bruna** com quem sempre pude contar, pois sempre estiveram presentes quando precisei; e me ajudaram a cada dia tornar-me uma pessoa melhor.

À minha família que sempre me deu apoio e principalmente á minha mãe **Nadir** e meu irmão **Thiago** que sempre estiveram ao meu lado.

A **CAPES**, pela minha bolsa de mestrado e apoio à pesquisa.

Aos **animais** que deram suas vidas para que outras vidas sejam salvas.

A **Faculdade de Odontologia de Bauru** e aos **professores** que transmitiram seus ensinamentos e contribuíram para meu aprendizado.

A empresa **Baumer®** por fornecer o biomaterial utilizado nesta pesquisa.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Resumo

RESUMO

O desenvolvimento atual de materiais ósseo-substitutos com potencialidade de promover o fechamento completo de um defeito ósseo crítico tem levantado questões quanto à sua atuação biológica. Uma opção de material ósseo utilizado são os enxertos ósseos de origem animal, pois possuem propriedades físico-químicas similares ao osso humano. O osso bovino misto que preserva a estrutura colagênica e o mineral ósseo tem sido proposto e utilizado como material ósseo-substituto. O objetivo desse estudo foi avaliar a biocompatibilidade e o potencial osteogênico de um enxerto bovino ósseo substituto, OrthoGen[®] (Baumer S.A.), na forma de partículas (OGp) e blocos (OGb). Para a avaliação da biocompatibilidade, 100 mg de OrthoGen[®] nas formas de partícula e bloco, foram implantados no subcutâneo de ratos (n=25) e o tecido reacional foi avaliado aos 7, 14, 21, 30 e 60 dias (n=5 animais/período) após a implantação. Para a análise do potencial osteogênico foram implantados 100 mg de Orthogen[®] nas formas de partícula e bloco em defeito crítico na calvária de ratos (n=30), e a formação óssea foi mensurada aos 1, 3 e 6 meses (n=10/período) após a implantação. A análise radiográfica e histomorfométrica revelaram que no tecido subcutâneo o OGb foi melhor aceito pelo organismo quando comparado ao OGp com uma frequência menor de células gigante multinucleadas entre os períodos avaliados (OGb 0,23% vs OGp 2,19%) e consequentemente uma média de reabsorção também menor (OGb 13% vs OGp 38%). Em ambos os implantes não foi encontrado focos de infiltrado inflamatório composto por leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e plasmócitos. Na calvária o OGb mostrou níveis de reabsorção inferiores e uma maior taxa de formação óssea quando comparado ao OGp após 6 meses (OGb 70 mm³ vs OGp 17 mm³). Baseado no modelo experimental utilizado neste estudo, concluímos que ambas as formas do Orthogen[®] são biocompatíveis em tecido subcutâneo, no entanto, sua forma em bloco promove uma maior formação óssea, possuindo uma capacidade osteogênica superior à forma em partícula, no modelo experimental avaliado.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis. Regeneração óssea. Teste de materiais. Ratos

Abstract

ABSTRACT

Histomorphometric evaluation of biocompatibility of integral bovine graft (Orthogen ®) implanted in subcutaneous tissue and osteogenic potential in cranial bone defect

The current development of bone graft materials with the potential to promote the complete closure of a critical size bone defect has raised questions as to its biological activity. An option of bone material used, are animal bone grafts since the human bone have similar physicochemical properties. Among the materials is the integral bone substitute of bovine origin, which preserves the organic and inorganic compound of the bone tissue, has been proposed and used as bone graft. The aim of this study was to evaluate the biocompatibility and osteogenic potential of a new integral bone substitute OrthogenTM (Baumer S.A.) in the form of particles (OGp) and block (OGb). For biocompatibility evaluation, 100mg OrthogenTM was implanted into dorsal subcutaneous pocket of rat (n= 25) and the reactional tissue was analyzed at 7, 14, 21, 30 and 60 days (n=5animals/period) after implantation. For osteogenic potential evaluation, 100mg OrthogenTM was implanted into critical-size defect in parietal bones of rat (n=30) and the bone formation, biomaterial reabsorption, connective tissue formation and osteoclast activity was evaluated at 1, 3 and 6 months (n=10/period) after implantation. Radiographic and histomorphometrical analysis showed that, in the subcutaneous tissue the OGb was more accepted by the host compared to OGp, with lower density of the multinucleated giant cells (OGb 0.23% vs. OGp 2.19%) and consequently a lower rate of matrix resorption (OGb 13%, vs. OGp 38%). In both implants was not found focus of inflammatory infiltrated composed by polymorphonuclear leucocytes, lymphocytes and plasmocytes. In rat calvaria the OGb showed lower rate of reabsorption and more volume of bone formation compared to OGp after 6 months (OGb 70 mm³ vs OGp 17 mm³). Based on experimental models used in this study we concluded that both forms of the OrthogenTM was biocompatible in subcutaneous tissue, however, its form of porous block promoted greater bone formation and has a higher osteogenic capacity than the particle shape, in the evaluated experimental model.

Key words: Biocompatible materials. Bone regeneration. Materials testing. Rats

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	- Osso bovino misto OrthoGen® na forma de partículas e bloco.....	29
Figura 2	- Distribuição dos animais que receberam implantação dos biomateriais em tecido subcutâneo	30
Figura 3	- Procedimentos cirúrgicos implantação OrthoGen® no tecido subcutâneo	33
Figura 4	- Distribuição dos animais que receberam implantação dos biomateriais em defeitos crítico na calvária	37
Figura 5	- Procedimentos cirúrgicos implantação OrthoGen® no defeito crítico craniano	39
Figura 6	- Imagens radiográficas da região enxertada (subcutâneo) obtidas logo após o término da fixação das peças nos diversos períodos experimentais.....	47
Figura 7	- OrthoGen® em partícula período de 7 dias implantado no subcutâneo.....	49
Figura 8	- OrthoGen® em bloco período de 7 dias implantado no subcutâneo.....	51
Figura 9	- OrthoGen® em partícula período de 14 dias implantado no subcutâneo.....	55
Figura 10	- OrthoGen® em bloco período de 14 dias implantado no subcutâneo.....	57
Figura 11	- OrthoGen® em partícula período de 30 dias implantado no sfubcutâneo	61

Figura 12 - OrthoGen® em bloco período de 30 dias implantado no subcutâneo.....	63
Figura 13 - OrthoGen® em partícula período de 60 dias implantado no subcutâneo.....	67
Figura 14 - OrthoGen® em bloco período de 60 dias implantado no subcutâneo.....	69
Figura 15 - Imagens radiográficas da região enxertada com partículas de OrthoGen® no defeito crítico	77
Figura 16 - Imagens radiográficas da região enxertada com blocos de OrthoGen® no defeito crítico	79
Figura 17 - Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em partícula (OGp) no período de 1 mês.....	83
Figura 18 - Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em bloco (OGb) no período de 1 mês.....	85
Figura 19 - Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em partícula (OGp) no período de 3 meses.....	89
Figura 20 - Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em bloco (OGb) no período de 3 meses.....	91
Figura 21 - Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em partículas (OGp) no período de 6 meses	95
Figura 22 - Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em bloco (OGp) no período de 6 meses	97

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráficos da densidade de volume (%) do biomaterial, tecido conjuntivo, área de reabsorção e células gigantes multinucleadas (CGM) nos diferentes grupos de tratamento durante todo o período experimental	73
Gráfico 2 - Gráficos do Volume Total, Volume do biomaterial, volume do osso neoformado e volume de tecido conjuntivo nos diferentes grupos de tratamento durante todo o período experimental.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Média e Desvio Padrão da densidade de volume (%) do OrthoGen [®] em partícula (OGp) e bloco (OGb)	71
Tabela 2	- Média e Desvio Padrão da densidade de volume (%) do Tecido Conjuntivo	71
Tabela 3	- Média e Desvio Padrão da densidade de volume (%) da Área de Reabsorção	72
Tabela 4	- Média e Desvio Padrão da densidade de volume (%) da Célula Gigante Multinucleada na Área de Reabsorção.....	72
Tabela 5	- Média e Desvio Padrão Volume total da região enxertada (mm ³).....	99
Tabela 6	- Média e Desvio Padrão Volume (mm ³) do OrthoGen [®] em partícula e bloco	99
Tabela 7	- Média e Desvio Padrão Volume Osso Neoformado (mm ³).....	100
Tabela 8	- Média e Desvio Padrão Volume Tecido Conjuntivo (mm ³).....	100

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BMP	Proteína morfogenética osséa
ISO	International Organization for Standardization
CEEPa	Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
OGp	Orthogen® partícula
OGb	Orthogen® bloco
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HE	Hematoxilina eosina
TC	Tecido conjuntivo
V	Vaso sanguíneo
CO	Coágulo sanguíneo
CGM	Célula gigante multinucleada
TA	Tecido adiposo
M	Músculo
ADA	American Dental Association
FDA	Federation Dentaire Association
LGC	Célula gigante langhans
IFN γ	Interferon gamma
MCSF	Fator de estimulação da colônia do macrófago
IL	Interleucina
TNF	Fator de necrose tumoral
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
mm ³	Milímetros cúbicos
μ m	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	PROPOSIÇÃO	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Biomaterial	29
3.2	Teste <i>in vivo</i>.....	29
3.3	Biocompatibilidade do Orthogen® em subcutâneo de ratos.....	30
3.3.1	Animais.....	30
3.3.2	Procedimento cirúrgico	31
3.3.3	Coleta das amostras e obtenção das imagens radiográficas.....	35
3.3.4	Procedimentos histotécnicos.....	35
3.3.5	Avaliação dos cortes histológicos corados por HE	35
3.3.6	Determinação da densidade de volume (%) das estruturas presentes na área enxertada.....	36
3.3.7	Tratamento estatístico dos dados.....	37
3.4	Avaliação da capacidade osteogênica do Orthogen® em defeito ósseo craniano	37
3.4.1	Animais.....	37
3.4.2	Procedimentos cirúrgicos	38
3.4.3	Coleta das amostras e procedimentos histotécnicos.....	41
3.4.4	Avaliação cortes histológicos corados pela HE	41
3.4.5	Obtenção Fotomicrografias	43
3.4.6	Tratamento estatístico dos dados.....	43

4	RESULTADOS.....	45
4.1	Biocompatibilidade do Orthogen® em tecido subcutâneo de rato	47
4.1.1	Radiográfico	47
4.1.2	Morfológico	48
4.1.3	Morfométrico.....	71
4.2	Capacidade osteogênica do Orthogen® em defeito ósseo craniano	75
4.2.1	Radiográfico	75
4.2.2	Morfológico.....	81
4.2.3	Morfométrico.....	99
5	DISCUSSÃO	103
6	CONCLUSÕES	115
	REFERÊNCIAS.....	119
	ANEXOS	133

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O enxerto ósseo representa um amplo campo para estudos e um grande avanço da cirurgia, uma vez que o tecido ósseo não é capaz de reparar defeitos ósseos extensos, provocados por traumas, tumores, infecções entre outras complicações, fazendo do osso o segundo material mais comumente implantado no corpo humano, com uma estimativa de 600.000 enxertos realizados anualmente só nos Estados Unidos (Marino e Ziran, 2010; Zorzi e Miranda, 2012)

O melhor enxerto ósseo considerado “Gold Standard” é o enxerto autógeno em razão de não ser imunogênico, ter propriedades de osteocondução, osteoindução e a presença de fatores de crescimento importantes para o reparo ósseo (Gosain, 1997; Coquelin *et al.*, 2012; Kinoshita e Maeda, 2013). A utilização de enxerto autógeno não oferece risco de transmissão de doenças e não apresenta problemas imunológicos graves (Marx, Ehler e Peleg, 1996; Misch, 2000). No entanto, esta técnica apresenta diversos inconvenientes, como necessidade de internação hospitalar, maior período de convalescença, chances de complicações durante a cirurgia, tamanho da área doadora insuficiente, susceptibilidade a infecções na área doadora, anatomia e estrutura do enxerto inadequada e, às vezes, intensa reabsorção e incorporação do material enxertado durante o processo reparacional (Damien e Parsons, 1991; Bauer e Muschler, 2000; Taga *et al.*, 2000; Mcallister e Haghighat, 2007).

Devido a esses inconvenientes, nas últimas décadas pesquisadores de vários laboratórios tem buscado o desenvolvimento de materiais ósseo-substitutos alternativos ao enxerto autógeno, que tenham potencialidade de promover o fechamento completo de um defeito ósseo crítico, com novo tecido ósseo exibindo características morfofuncionais mais próximas possíveis do tecido normal (Misch e Dietsh, 1993; Seebach *et al.*, 2010), estes materiais podem ser de origem humana, animal ou sintéticos (The National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Program: Dental Implants, 1988; Mokbel *et al.*, 2008).

As aplicações de aloenxertos de origem humana, de xenoenxertos e materiais sintéticos, são ótimas alternativas ao uso do enxerto autógeno (Yamada *et al.*,

1997), pois possuem maior disponibilidade e eliminam uma segunda área cirúrgica, quando comparado ao osso autógeno, reduzindo os custos do tratamento e a morbidade dos pacientes (Yildirim *et al.*, 2000).

Entre os substitutos ósseos xenógenos, os mais utilizados atualmente são os de origem bovina, pois em humanos estes materiais possuem uma grande propriedade de osteocondução (Oliveira *et al.*, 1999), apresentam uma resistência biomecânica muito similar à do osso humano e com tratamentos adequados durante sua obtenção evitam respostas imunológicas ou inflamatórias adversas (Sicca *et al.*, 2000; Wataha, 2001; Wenz, Oesch e Horst, 2001; Meyer, Floerkemeier e Windhgen, 2008). Estudos *in vivo* têm demonstrado a viabilidade do osso xenogênico em defeitos ósseos, sejam eles desproteínizado ou matriz óssea orgânica (Pinheiro *et al.*, 2008; Betti *et al.*, 2011; Bernabe *et al.*, 2012), desmineralizados ou matriz óssea inorgânica (Banjar e Mealey, 2013; Bigham-Sadegh *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2014) e desvitalizados ou mistos (Silva *et al.*, 2008).

Porém, sabe-se atualmente que até mesmo materiais altamente biocompatíveis provocam certo grau de resposta do hospedeiro (Anderson, 1988; Remes e Williams, 1992).

Imediatamente após a implantação do biomaterial o corpo inicia uma série de eventos biológicos em resposta ao biomaterial implantado como, formação do coágulo, reação inflamatória, formação do tecido de granulação, reação de corpo estranho e por fim formação de uma capsula de tecido fibroso (Anderson, 1984). Esses eventos envolvem atração e ativação de componentes celulares como mastócitos, neutrófilos, monócitos/macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfócitos e células residentes como fibroblastos que interagem ou comunicam – se por meio das quimiocinas, fatores de crescimento e citocinas (Gretzer *et al.*, 2006). Dentre os tipos celulares, os macrófagos se destacam pelo seu envolvimento direto na interação do hospedeiro com o biomaterial (Anderson, Rodriguez e Chang, 2008). Características químicas e físicas do biomaterial podem interferir na adsorção de proteínas e induzir à adesão e fusão de macrófagos podendo dar origem as células gigantes multinucleadas, cujas citocinas produzidas por estas células podem direcionar ao processo de reparo/fibrose ou, ainda, desencadear a um processo inflamatório/imune crônico pela produção contínua e excessiva de citocinas pró-

inflamatórias (Brodbeck *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2007; Saino *et al.*, 2011). Assim, produção e liberação de citocinas pró inflamatórias produzida localmente pelos macrófagos podem influenciar na biocompatibilidade do biomaterial (Benahmed *et al.*, 1997).

Entre os xenoenxertos bovinos, temos os desproteinizados ou mistos e que são quimicamente tratados, para manter apenas os componentes orgânicos (colágeno) e inorgânicos, dando resiliência e resistência mecânica, similares ao do tecido ósseo humano (Orthogen, 2011). O osso desproteinizado seja de origem bovina como o Unilab Surgibone™, ou humana com o Tutoplast™, já vem sendo utilizado como biomaterial ósseo substituto a cerca de 30 anos. Durante esse período duas empresas, uma canadense (Unilab Surgibone™) e a outra europeia (Tutoplast™) anunciaram mais de 1,5 milhão de enxertos sem documentação de transmissão de doenças relacionadas ao biomaterial (Yoshikawa, 2000; Kneser *et al.*, 2006). Entretanto, Actis, Obwegeser e Ruperez, (2004), observaram que as propriedades mecânicas podem reduzir se os biomateriais forem expostos a longos períodos de autoclavagem com alta pressão. Além disso, os diferentes protocolos de tratamento químico do osso bovino podem alterar sua resposta biológica no leito receptor aumentando a taxa de reabsorção do biomaterial, levando a perda da integridade funcional e resistência mecânica na fase crítica do reparo ósseo (Quereshy *et al.*, 2000).

Nessa categoria, recentemente no Brasil encontra-se o Orthogen®, um enxerto ósseo desproteinizado, de origem bovina, que mantém as características físico-químicas do osso *in natura*. É produzido pela Genius®, divisão de biomateriais da Baumer®, empresa com mais de 50 anos de atuação no mercado médico-cirúrgico (Orthogen, 2011).

O Orthogen® foi submetido a ensaios *in vivo* e *in vitro* para avaliar sua citotoxicidade e biocompatibilidade (Oliveira, 2002; Galia *et al.*, 2008; Orsi *et al.*, 2008). Os resultados revelaram que o biomaterial possui ausência de citotoxicidade em 100% das amostras e a avaliação não apresentou alterações macroscópicas nem mortes nos animais estudados, sendo considerado pelos autores como um material ósseo biocompatível (Galia *et al.*, 2008).

Apesar destes estudos sobre as propriedades do biomaterial os testes *in vivo* da biocompatibilidade se baseiam apenas em resultados radiográficos e macroscópicos, não satisfazendo o conjunto de normas embasadas cientificamente e subdividas em 20 tópicos (ISO 10.993), para avaliação de dispositivos e materiais de uso médico (Tomida *et al.*, 2011). Pois além das características químicas e físicas adequadas, o biomaterial não deve apresentar efeitos tóxicos e nem desencadear eventos imunológicos ao organismo receptor, ou seja, deve ser biocompatível (Meyer, Floerkemeier e Windhgen, 2008), os quais só podem ser avaliados microscopicamente.

Recentes estudos têm revelado que biomateriais derivados de osso bovino são biocompatíveis (Oliveira *et al.*, 1999; Takamori *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2013; Jardelino *et al.*, 2014). Utilizando como modelo experimental o tecido subcutâneo de rato, Cestari *et al.*, (2010) observaram histomorfometricamente que o osso bovino cortical desvitalizado no formato de um pino após 7, 14, 28 e 60 dias implantação é biocompatível tendo boa aceitação do enxerto pelo organismo com mínima reação inflamatória, que reduziu após 14 dias, sem causar danos aos tecidos subjacentes. Utilizando o mesmo modelo experimental Oliveira *et al.*, (1999) avaliou a biocompatibilidade do osso bovino desproteinizado (Gen-OX®) e verificaram que a implantação do biomaterial, induziu a formação de um granuloma tipo corpo estranho com recrutamento de macrófagos e CGM, semelhante ao observado nos implantes subcutâneos dos enxertos autógenos e alogênos, inferindo que o biomaterial de origem bovina são biocompatíveis e podem ser usado como material de preenchimento ósseo-substitutos.

Porém, no caso dos biomateriais ósseo-substitutos a biocompatibilidade não é o único fator a ser avaliado. Um biomaterial ósseo-substituto deve apresentar uma boa biocompatibilidade, ser osteocondutivo e gradualmente reabsorvido à medida que novo osso viável vai sendo formado e remodelado. Bernabe *et al.*, (2012) por meio de análise histológica avaliou a influência do enxerto bovino GenOx®, associado ou não à membrana GenDerm®, na reparação de defeitos ósseos críticos na tíbia de ratos. Observaram que todos os grupos experimentais foram capazes de reparar o defeito com mais eficácia do que o grupo controle sem material, nos períodos de 30 e 90 dias, e também que o GenOx® associado ao GenDerm® promove resultados melhores para o tratamento de defeitos ósseos críticos. De

acordo com os autores os resultados revelaram que o uso de materiais classificados como ósseos substitutos são uma boa opção na prática clínica, pois permitem a reparação óssea de defeitos críticos extensos devido ao potencial osteocondutor e as características físicas e químicas do material ósseo bovino.

O potencial osteogênico/osteocondutor tem sido amplamente estudado utilizando o modelo de defeito crítico na calvária de ratos (Norton *et al.*, 2003; Mokbel *et al.*, 2008; Develioglu, Unver Saraydin e Kartal, 2009; Develioglu *et al.*, 2010), pois é possível simular grandes perdas ósseas craniofaciais. A calvária é composta por tecido ósseo de origem intramembranosa e seu suprimento sanguíneo é relativamente limitado. Essas propriedades biológicas lhe conferem pouca capacidade para se regenerar espontaneamente (Schmitz e Hollinger, 1986), requerendo a utilização de um enxerto ósseo ou de biomateriais ósseos substitutos capazes de induzir ou promover maior formação de tecido ósseo. Outro fator positivo para a utilização da calvária, é que ela apresenta uma área anatomicamente livre de estresse mecânico, com estabilidade relativa das estruturas que circundam os defeitos críticos (Mankani *et al.*, 2006).

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

A proposição desse trabalho foi fazer uma comparação entre os biomateriais Orthogen® na forma de bloco poroso e em partículas, atendendo os seguintes objetivos:

- A) verificar a biocompatibilidade, pela determinação histomorfométrica dos eventos teciduais envolvidos no processo de cicatrização, após 7, 14, 21, 30 e 60 dias de implantação dos biomateriais em tecido subcutâneo de rato.
 - B) avaliar a reabsorção/degradação dos biomateriais e a neoformação óssea pela análise radiográfica e histomorfométrica dos defeitos cranianos tratados com os biomateriais após 1,3 e 6 meses de implantação.
-

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Biomaterial

Foram utilizados os biomateriais (Fig. 1) de nome comercial enxerto bovino misto OrthoGen®, produzidos pela empresa BAUMER / Mogi Mirim - SP na forma de micropartículas (0,5 – 0,75 mm de diâmetro), constituídos por: partícula (Lote: 4051666) e bloco (Lote: 025678)

Figura 1. Osso bovino misto OrthoGen® na forma de partículas e bloco.

3.2 Testes *in vivo*

O material utilizado na atual pesquisa foi oriundo das peças (crânios e tecido subcutâneo de rato) incluídas em Histosec® (Merck) do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (Protocolo N° 020/2008, aprovado em 13/11/2008). O número de protocolo do CEEPA para utilização das peças é Protocolo N° 025/2013 sendo aprovado em 20/08/2013.

A execução do projeto realizou-se nos laboratórios de Cirurgia Experimental e de Histotécnica da disciplina de Histologia, no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

3.3 Biocompatibilidade do Orthogen® em tecido subcutâneo de ratos

3.3.1 Animais

Foram utilizados 25 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente 300 g provenientes do Biotério: ANILAB (rua Servidão quatro, 292 – Bairro São Domingos, Paulínia – SP), divididos em 5 períodos experimentais (n=5) de 7,14,21,30 e 60 dias e implantados OrthoGen® bloco (OGb) e OrthoGen® partículas (OGp).

Figura 2. Distribuição dos animais que receberam implantação dos biomateriais em tecido subcutâneo

3.3.2 Procedimentos cirúrgicos

A anestesia geral dos animais foi obtida com aplicação intramuscular de Cloridrato de Ketamina (Dopalen® da AgribRANDS Ltda.) associado ao Cloridrato de Xilazina (Anasedan® da AgribRANDS Ltda.), relaxante muscular e sedativo de uso animal (Fig. 3A). Após a anestesia, realizou-se a tricotomia do dorso do animal e a assepsia vigorosa com iodo alcoólico (Fig. 3B). Com bisturi nº 15, foram realizadas três incisões contra laterais de 1 cm no tegumento que reveste o dorso do animal (Fig. 3C). Em seguida, realizamos a divulsão do tecido conjuntivo (Fig. 3D) que separa o epitélio do músculo formando três lojas. Na primeira loja foi implantado aproximadamente 100 mg OrthoGen® em forma de partículas (Fig. 3D e F) e na segunda loja o OrthoGen® em bloco (Fig. 3D e G) e a terceira loja serviu como controle do reparo da ferida. Em seguida realizamos a sutura do tegumento com linha de seda preta nº 4-0 (Ethicon - Johnson & Johnson®). (Fig. 3H)

Figura 3. Procedimentos cirúrgicos: a) medicamentos utilizados como anestésicos; b) isolamento da área cirúrgica; c) incisão do tegumento; d) divulsão do tecido conjuntivo; e) 100 mg do OrthoGen® na forma de partículas e bloco; f) implantação do OrthoGen® na forma de partículas; g) implantação do OrthoGen® na forma de bloco; e h) sutura realizada no tegumento.

3.3.3 Coleta das amostras e obtenção das imagens radiográficas

Os animais foram mortos ao término dos períodos experimentais por dose excessiva de anestésico. Os enxertos juntamente com os tecidos adjacentes que o revestem foram coletados e em seguida submetidos ao processo de fixação em formol a 10% em tampão fosfato durante uma semana e radiografadas no Departamento de Estomatologia, disciplina de Radiologia, da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, utilizando filme oclusal para radiografia dental Kodak Insight I O-41 (Eastman Kodak Company – EUA), sendo a distância foco-filme de 40 cm e o tempo de exposição 0,4s. A revelação foi realizada em conjunto e com critérios rigorosos de tempo e temperatura.

3.3.4 Processamento histotécnico

Procedida a análise radiográfica subjetiva, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA (solução contendo 4,13% de Tritriplex III Merck® e 0,44% de hidróxido de sódio) a temperatura de 2 a 8°C, por um período aproximado de quarenta dias. Após a desmineralização as peças passaram pelos seguintes procedimentos histológicos: desidratação em concentrações crescente de etanol, diafanização em xilol, infiltração e inclusão em Histosec® (parafina + resina sintética - Laboratório Merck®). Cortes semi-seriados de 5µm de espessura, foram obtidos em um micrótomo Jung-Leica® RM2045 e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE).

3.3.5 Avaliação dos cortes histológicos corados por HE

Pela análise morfológica avaliamos temporalmente o tipo de tecido e de células do tecido reacional associado ao biomaterial implantado, e o tempo de permanência e o processo de absorção do biomaterial.

Os cortes teciduais corados em HE mais representativos foram fotografados com uma câmera CCD-IRIS RGB – Sony® acoplada a um microscópio Axioskop 2 com objetivas variadas (10x, 20x e objetiva de imersão de 40x) de forma a evidenciar os resultados obtidos assim como detalhes microscópicos do processo de reparo estudado.

3.3.6 Determinação da densidade de volume (%) das estruturas presentes na área enxertada

a) Casualização dos campos microscópicos

Todos os métodos estereológicos são baseados em princípios geométricos – estatísticos derivados da probabilidade em que imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidam com um sistema-teste apropriado. Deste modo, o ponto central nestes métodos está na casualização das amostras, ou seja, a escolha das amostras do tecido a serem confrontadas com o sistema-teste, deve ser realizada por um método que elimine a ocorrência de vício na amostragem. Isto é conseguida pela aplicação de procedimento de casualização em todos os estágios do experimento, desde a escolha dos animais, a seleção dos blocos histológicos em cada lâmina e, principalmente, a seleção dos campos microscópicos a serem utilizados nas quantificações.

De cada peça histológica foram obtidas 15 lâminas contendo 4 cortes semi-seriados cada uma. Através de sorteio foram escolhidas 5 lâminas para serem utilizadas e de cada lâmina selecionado um (1) corte histológico. Para a escolha dos 15 campos microscópicos por corte, utilizamos um esquema de casualização sistemática segundo as indicações de (Weibel, 1969). Salienta-se que nesse esquema os campos microscópicos são escolhidos em intervalos regulares, de maneira que todas as regiões do corte histológico sejam representadas.

b) Avaliação morfométrica da densidade de volume (V_{vi})

As densidades de volume (V_{vi}) do tecido conjuntivo, biomaterial, áreas de reabsorção e células gigantes no tecido foram avaliados com uma objetiva de 40X e um graticulo de integração II Zeiss colocado em uma ocular Kpl 8X, composta de 10 linhas paralelas e 100 pontos numa área quadrangular. A imagem do graticulo foi superposta sucessivamente a 15 campos histológicos escolhidos por amostragem sistemática (Weibel, 1969), e os seguintes dados foram anotados: a) número de pontos (P_i) que caíram sobre as estruturas (i) e sobre o total de pontos que caíram no enxerto (P). A densidade de volume de cada tipo de estrutura foi calculada pela relação $V_{vi} = P_i / P = V_{vi}$.

3.3.7 Tratamento estatístico dos dados

Todos os resultados morfométricos de densidade de volume das análises histológicas, foram submetidos ao teste de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov*) e subsequentemente submetidas ao teste “t” Student para comparação entre grupos por período e pela análise de variância (ANOVA) para a comparação entre os períodos por grupo, sendo as médias contrastadas pelo teste de Tukey, usando software Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA) para Windows, com um nível de significância de 5%.

3.4 Avaliação da capacidade osteogênica do Orthogen® em defeito ósseo craniano

3.4.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente 300 g provenientes do Biotério: ANILAB (Rua Servidão quatro, 292 – Bairro São Domingos, Paulínia – SP), divididos em 2 grupos experimentais preenchidos com Orthogen® bloco (OGb) e Orthogen® Partículas (OGp) (Figura 4).

Figura 4. Distribuição dos animais que receberam implantação dos biomateriais em defeitos críticos na calvária.

3.4.2 Procedimentos cirúrgicos

A anestesia geral dos animais foi obtida com aplicação intramuscular de Cloridrato de Ketamina (Dopalen[®] da AgribRANDS Ltda) associado ao Cloridrato de Xilazina (Anasedan[®] da AgribRANDS Ltda), relaxante muscular e sedativo de uso animal (Fig. 5A).

Após anestesia, foi realizada a tricotomia da região fronto-parietal da cabeça do animal com auxílio de lâmina de barbear e a assepsia vigorosa com iodo alcoólico. Após o isolamento da área cirúrgica (Fig. 5B), com auxílio de um bisturi número dez, foi realizada uma incisão em formato de meia-lua no tegumento de revestimento do crânio. Em seguida, com a espátula “Molt”, levantou-se os retalhos lateralmente, expondo amplamente a cortical óssea da região (Fig. 5C). Posteriormente, com a trefina cirúrgica de 8 mm de diâmetro e com uma irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, foi realizada uma perfuração nos ossos parietais transpassando toda espessura da díploe, expondo a dura-máter no fundo das lesões (Fig. 5D-E).

Imediatamente após a abertura, os defeitos ósseos foram preenchidos com aproximadamente 100 mg de OrthoGen[®] na forma de partículas (Fig. 5F) e Bloco (Fig. 5G) homogeneizados com sangue, conforme o grupo de tratamento. Os retalhos de tegumento foram em seguida recolocados em suas posições e suturados com linha de seda preta para odontologia número quatro (Ethicon-Johnson & Johnson[®]) (Fig. 5H).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais até o momento da eutanásia.

Figura 5. Procedimentos cirúrgicos: a) medicamentos utilizados como anestésicos; b) isolamento da área cirúrgica; c) exposição da cortical óssea; d) perfuração transóssea com utilização da trefina; e) defeito realizado expondo a dura-mater; f) implantação do OrthoGen[®] na forma de partículas; g) implantação do OrthoGen[®] na forma de bloco; e h) sutura realizada no tegumento.

3.4.3 Coleta das amostras e processamento histotécnico

Todos os animais foram mortos com dose excessiva de anestésico, conforme o período de tratamento de 1,3 e 6 meses.

As calotas cranianas com as peles sobrepostas foram retiradas com auxílio de uma serra elétrica e fixadas por uma semana em formol tamponado a 10%, quando então, foram radiografadas.

Procedida a análise radiográfica, as peças histológicas foram desmineralizadas em solução de EDTA (solução contendo 4,13% de Tritriplex III Merck® e 0,44 % de hidróxido de sódio) à temperatura de 2 a 8°C, por um período aproximado de quarenta dias.

As peças desmineralizadas foram submetidas a procedimentos histotécnicos padronizados, com desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em Histosec® - Merck (parafina + resina sintética). Finalmente, cortes semi-seriados de 5µm de espessura, no sentido latero-lateral, foram obtidos em um micrótomo Jung-Leica® RM2045 e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE).

3.4.4 Avaliação dos cortes histológicos corados pela HE

a) Determinação da espessura vertical (T) e do volume total da região enxertada (V_{tre})

Tanto a espessura quanto o volume total da área enxertada somente foram possíveis de calcular devido à restrição da área enxertada que, foi delimitada pelas suas bordas ósseas dando-lhe um formato cilíndrico. Estes dados são muito importantes, pois, permitem verificar se durante o período analisado ocorre redução do volume enxertado e se existe, em qual tipo é mais proeminente.

A espessura vertical (T) dos defeitos ósseos preenchidos com OrthoGen® foram determinadas no sistema de análise KS300 (Kontron Elektronik GmbH, Eching, Munique, Alemanha), usando uma objetiva de 4X. Para tanto, imagens de 2 cortes frontais semi-seriados mais centrais da região do enxerto foram obtidos de cada animal. A espessura de cada corte foi medida a 0,5 mm de intervalo e a média da espessura vertical (T) foi calculada para cada defeito.

A partir da medida do diâmetro (d) inicial do defeito obtido com um micrometro digital durante os procedimentos cirúrgicos e da espessura vertical (T) da região enxertada, o volume total da região enxertada (V_{tre}) foi calculado usando a fórmula para o volume do cilindro: $V_{tre} = A_{enxerto} \times T_{enxerto}$; onde: $A_{enxerto} = \pi \cdot (d/2)^2$.

b) Determinação da densidade de volume (V_{vi}) de cada estrutura na região do enxerto

A densidade de volume (V_{vi}) ou o percentual do volume do enxerto ocupado pelo biomaterial, tecido conjuntivo e tecido ósseo neoformado foram baseados na relação fundamental de estereologia, denominada de princípio de Delesse, no qual a fração de volume (V_{vi}) de um dado componente no material é, em média, igual a fração de área (A_{Ai}) de transecções do componente nos cortes do material, portanto $V_{vi} = A_{Ai}$ (Weibel, 1969). Esse parâmetro histológico foi avaliado com auxílio de uma objetiva de imersão de 40X e um graticulo de integração II Zeiss® colocado em uma ocular Kpl 8X, composta de 10 linhas paralelas e de 100 pontos numa área quadrangular. A imagem do graticulo foi superposta, sucessivamente, a 100 campos histológicos escolhidos por amostragem sistemática, e os seguintes dados foram anotados: a) número de pontos (P_i) que caíram sobre cada estrutura (i) e sobre a área total enxertada com OrthoGen® (P). A densidade de volume (V_{vi}) foi calculada a partir da relação: $V_{vi} (\%) = (P_i/P) \cdot 100$.

c) Determinação do volume absoluto de cada estrutura na região do enxerto

O objetivo desta pesquisa foi obter dados morfométricos absolutos de volume de tecido ósseo neoformado, de tecido conjuntivo e ósseo. Para tanto, determinamos o volume total da região do enxerto (V_{tre}), ou seja, o volume do enxerto mais o tecido reacional, conforme o descrito no item (1.2.2.4 a) para cada defeito. A conversão dos dados relativos (densidades de volume em percentual) em dimensões morfométricas absolutas (mm^3) para cada estrutura analisada (V_{ti}) foi obtida pela seguinte fórmula: ($V_{ti} = V_{vi} \times V_{tre}$)

3.4.5 Obtenção das fotomicrografias

Os cortes histológicos corados em HE foram fotografados com uma câmera Olympus DP71 acoplada a um microscópio Olympus BX50 com objetivas 2x, 4x, 10x, 20x e 40x, enquanto as imagens capturadas foram enviadas para o programa DP Controller, procurando-se evidenciar os resultados obtidos, assim como detalhes microscópicos do processo de reparo ósseo.

3.4.6 Tratamento estatístico dos dados

Todos os resultados morfométricos de densidade de volume das análises histológicas, foram submetidos ao teste de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov*) e subsequentemente submetidas ao teste “t” Student para comparação entre grupos por período e pela análise de variância (ANOVA) para a comparação entre os períodos por grupo, sendo as médias contrastadas pelo teste de Tukey, usando software Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA) para Windows, com um nível de significância de 5%.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Bicompatibilidade do Orthogen® em tecido subcutâneo de rato

4.1.1 Radiográfico

As imagens radiográficas obtidas logo após o término da fixação das peças de cada animal, em cada período experimental, estão apresentadas na Figura 6. As imagens apontam que, aos 7 dias iniciais há uma similaridade na área enxertada mostrando a radiopacidade do bloco e partículas. No decorrer dos dias, principalmente após o período de 21 dias, podemos notar que o Orthogen® na forma de partículas foi gradualmente reabsorvido, pois a densidade diminuiu acentuadamente em relação ao Orthogen® bloco, que praticamente não alterou a sua estrutura durante todos os períodos analisados, exceto aos 21 dias em que dois blocos apresentaram uma diminuição na radiodensidade.

Figura 6: Imagens radiográficas da região enxertada com OrthoGen® partícula e bloco, obtidas logo após o término da fixação das peças nos diversos períodos experimentais.

4.1.2 Morfológicos

As fotomicrografias representativas do Orthogen[®] na forma de bloco e partículas implantados em tecido subcutâneo para cada período experimental estão apresentadas nas figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 mostrando que:

Aos 7 dias: Os espaços entre as partículas do OGp implantadas estavam preenchidas por tecido conjuntivo ricamente celularizada e vascularizada com alguns restos de coágulo (Figura 7A). Além disso, células inflamatórias mononucleares, principalmente macrófagos estavam presentes na superfície do OGp, oriundas dos vasos sanguíneos próximos a sua superfície (Figura 7B). Enquanto que, no OGb ocorreu a formação de uma cápsula de tecido conjuntivo ricamente celularizado e vascularizado (Figura 8A), o qual passou a migrar lentamente para o interior dos poros mais superficiais em direção ao centro do bloco, ocupando os espaços preenchidos por coágulo sanguíneo (Figura 8B).

Figura 7: OrthoGen® em partículas período de 7 dias. **A)** Observar as partículas de OGp envoltas por tecido conjuntivo (TC) ricamente celularizado e vascularizado. **B)** Detalhe do OGp envoltas por tecido conjuntivo (TC) com algumas células inflamatórias mononucleadas migrando (seta) dos vasos sanguíneos (V) para a superfície do biomaterial. 10x e 40x. HE

Figura 8: OrthoGen® em bloco período de 7 dias. **A)** Observar a presença de tecido conjuntivo (TC) ricamente celularizado e vascularizado que envolve toda a superfície externa do OGb e mais internamente poros preenchidos por coágulo sanguíneo (CO) **B)** Detalhe da figura anterior mostrando as trabéculas do biomaterial OGb cujos poros mais externos mostram se preenchidos por tecido conjuntivo (TC) com células que parecem migrar (seta) para os poros mais internos ainda ocupados pelo coágulo sanguíneo (CO). 10x e 40x. HE

Aos 14 dias: No grupo OGp os espaços entre as partículas estavam preenchidas por tecido conjuntivo mais fibroso, em relação ao período anterior, organizado paralelamente a superfície do material, porém ricamente vascularizado e celularizado (Figura 9A-B). Na superfície do OGp ocorreu a formação de extensas áreas de reabsorção com a presença de células gigantes multinucleadas responsáveis pela rápida reabsorção/degradação das partículas OGp (Figura 9B), além de macrófagos. Enquanto o poros do OGb estavam preenchidos por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado e celularizado, contendo em seu interior restos do coágulo sanguíneo localizados principalmente nos poros mais centrais do bloco que lentamente estavam sendo substituídos pelo tecido conjuntivo (Figura 10A). As áreas de reabsorção presentes na superfície do OGb eram menores em relação ao OGp e apresentavam inúmeros macrófagos, como também, raramente células gigantes multinucleada (Figura 10B).

Figura 9: OrthoGen[®] em partículas período de 14 dias. **A)** Observar as partículas do (OGp) envoltas por tecido conjuntivo fibroso ricamente vascularizado (TC). **B)** Detalhe das partículas (OGp) envoltas por tecido conjuntivo fibroso organizado paralelamente ao biomaterial e áreas de reabsorção (área tracejada) com a presença de CGM (seta preta). 10x e 40x. HE

Figura 10: OrthoGen® em bloco período de 14 dias. **A)** Observar o espaço preenchido pelo biomaterial (OGb) e com a presença do tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado (TC) entre as trabéculas do bloco. **B)** Detalhe das trabéculas do biomaterial (OGb) envolvidas por tecido conjuntivo frouxo e em algumas áreas com a presença de células macrofágicas responsáveis pela degradação do biomaterial (área tracejada). 10x e 40x. H

Entre 21 e 30 dias: No grupo OGp as partículas estão totalmente envoltas por tecido conjuntivo fibroso (Figura 11A), com a presença de células gigantes multinucleadas na superfície do biomaterial (Figura 11B). Enquanto os poros do OGb foram intensamente preenchidos por tecido conjuntivo mais fibroso, em relação aos períodos anteriores, e ricamente vascularizado e celularizado (Figura 12A). As células gigantes multinucleadas são formadas na superfície do biomaterial em áreas de reabsorção com presença de biomaterial degradado (Figura 12B). A migração de células inflamatórias mononucleadas, principalmente macrófagos, para a superfície do material em partícula ocorreu mais acentuadamente nos primeiros 30 dias de implantação, quando comparado ao biomaterial em bloco, ocasionando a uma maior reabsorção da sua superfície do biomaterial em partícula por macrófagos e raras células gigantes multinucleadas, sendo essa reabsorção menor e mais lenta no biomaterial em bloco.

Figura 11: OrthoGen® em partículas período de **30 dias.** **A)** Observar o espaço preenchido com biomaterial em partículas (OGp) envolvido pelo tecido conjuntivo fibroso (TC). **B)** Detalhe das partículas do biomaterial (OGp) totalmente envolta por tecido conjuntivo fibroso (TC) com a presença de células gigantes multinucleadas na superfície do biomaterial em áreas de reabsorção (área tracejada). 10x e 40x. HE

Figura 12: OrthoGen® em bloco período de 30 dias. **A)** Espaço preenchido com biomaterial em bloco (OGb) intensamente preenchido por tecido conjuntivo (TC) ricamente celularizado e vascularizado. **B)** Detalhe das trabéculas do biomaterial (OGb) cujos poros mostram se totalmente preenchidos por tecido conjuntivo (TC) mais fibroso em relação aos períodos anteriores e ricamente vascularizado (V), com a presença de células gigantes multinucleadas na superfície do biomaterial em áreas de reabsorção (área tracejada) com presença de biomaterial degradado. 10x e 40x. HE

Aos 60 dias: No grupo OGp ocorreu um aumento da área preenchida por tecido conjuntivo fibroso vascularizado e celularizado e uma diminuição na área preenchida pelo biomaterial (Figura 13A). As áreas de reabsorção aumentaram, em relação aos períodos anteriores, e a frequência de células gigantes multinucleadas aumentou, notando, dessa maneira, a presença de biomaterial degradado (Figura 13B). Já no bloco, a maior parte dos coágulos sanguíneos foram substituídos por tecido adiposo e tecido conjuntivo característico da região, mostrando uma boa biocompatibilidade do biomaterial (Figura 14A). Havia algumas raras células gigantes multinucleadas e poucas áreas de reabsorção, mantendo o volume do enxerto até o término do período experimental. A ausência de células do sistema imune, como linfócitos e plasmócitos, reforça a boa biocompatibilidade do biomaterial (Figura 14B).

Figura 13: OrthoGen® em partículas período de **60 dias**. **A)** Observar o espaço preenchido com biomaterial em partícula (OGp) envolto por tecido conjuntivo (TC) ricamente vascularizado e celularizado com a presença de músculo (M) e tecido adiposo (TA) **B)** Detalhe das partículas do biomaterial (OGp) totalmente envoltas por tecido conjuntivo e com um aumento na frequência das células gigantes multinucleadas (seta preta), aumentando as áreas de reabsorção do biomaterial (área tracejada) com presença do biomaterial degradado (seta verde). 10x e 40x. HE

Figura 14: OrthoGen® em bloco período de 60 dias. **A)** Observar o espaço preenchido por biomaterial em bloco (OGb) envolto por tecido conjuntivo (TC) e tecido adiposo (TA d). **B)** Detalhe das trabéculas do biomaterial (OGb) e o preenchimento dos poros por tecido adiposo (TA) e tecido conjuntivo fibroso (TC) característico da região, mostrando a boa biocompatibilidade do biomaterial, notamos ainda a presença de células gigantes multinucleadas (seta vermelha) responsável pela degradação do biomaterial. 10x e 40x. HE

4.1.3 Morfométrico

Os dados obtidos para densidade de volume (%) de cada estrutura avaliada para os grupos OGp e OGb implantados em tecido subcutâneo com $p < 0,05$ estão apresentados nas Tabelas 1,2,3 e 4, Figura 17.

Tabela 1: Média e Desvio Padrão da densidade de volume (%) do OrthoGen® em partícula (OGp) e bloco (OGb).

Biomaterial	OGp	OGb	Teste "t" Probabilidade "p"
7 dias	40,1 ± 5,3 ^a	49,4 ± 9,8	0,062639
14 dias	38,5 ± 3,8 ^a	46,9 ± 3,4	0,002917
21 dias	37,5 ± 4,8 ^a	46,8 ± 4,8	0,024404
30 dias	35,1 ± 5,1 ^a	44,7 ± 5,7	0,012275
60 dias	24,9 ± 1,6 ^b	42,6 ± 1,6	0,000009
Anova "p"	0,000022	0,413027	

Letras diferentes $p < 0,05$ entre períodos por grupo

Tabela 2: Média e Desvio Padrão da densidade de volume (%) do Tecido Conjuntivo

Tecido Conjuntivo	OGp	OGb	Teste "t" Probabilidade "p"
7 dias	40,3 ± 9,2	23,8 ± 7,0	0,006436
14 dias	35,7 ± 2,7	29,9 ± 12,0	0,263236
21 dias	40,6 ± 3,9	31,7 ± 11,2	0,088984
30 dias	38,4 ± 3,0	27,9 ± 11,4	0,050312
60 dias	39,7 ± 8,4	26,6 ± 3,0	0,005299
Anova "p"	0,596172	0,6684	

Letras diferentes $p < 0,05$ entre períodos por grupo

Tabela 3: Média e Desvio Padrão da densidade de volume (%) da Área de Reabsorção

Área de Reabsorção	OGp	OGb	Teste "t" Probabilidade "p"
7 dias	7,2 ± 1,0	4,4 ± 1,0 ^{A, B}	0,001039
14 dias	7,7 ± 1,3	3,4 ± 0,2 ^A	0,000036
21 dias	9,3 ± 0,9	4,5 ± 1,2 ^{A, B}	0,000037
30 dias	10,7 ± 1,6	5,5 ± 1,9 ^B	0,000614
60 dias	9,3 ± 4,3	6,0 ± 1,2 ^B	0,087058
Anova "p"	0,061112	0,010288	

Letras diferentes p<0,05 entre períodos por grupo

Tabela 4: Média e Desvio Padrão da densidade de volume (%) da Célula Gigante Multinucleada na Área de Reabsorção

Célula Gigante Multinucleada	OGp	OGb	Teste "t" Probabilidade "p"
7 dias	0,075 ± 0,15 ^a	0,025 ± 0,05	0,437852
14 dias	0,900 ± 0,17 ^{a, b}	0,167 ± 0,20	0,000091
21 dias	1,033 ± 0,55 ^{a, b}	0,350 ± 0,33	0,025616
30 dias	2,192 ± 0,75 ^c	0,292 ± 0,20	0,000227
60 dias	1,667 ± 1,01 ^{b, c}	0,308 ± 0,27	0,010160
Anova "p"	0,000068	0,103428	

Letras diferentes p<0,05 entre períodos por grupo

Gráfico 1: Gráficos da densidade de volume (%) do biomaterial (A), tecido conjuntivo (B), área de reabsorção (C) e células gigante multinucleadas (CGM) (D) nos diferentes grupos de tratamento durante todo o período experimental. Letras minúsculas diferentes p < 0,05 entre períodos do OGp, letras maiúsculas diferentes p<0,05 entre períodos do OGb, e asterisco p<0,05 entre grupos por período.

A análise das tabelas 1, 2, 3, 4 e do gráfico 1, bem como a análise estatística dos dados mostraram que:

- 1) A densidade de volume do **Biomaterial** OGb mantém-se constante durante todo o período experimental, ocupando em média 46% da região implantada. Já a densidade de volume do OGp, manteve-se constante entre 7 e 30 dias, ocupando em média 37,8%, reduzindo 0,29 vezes entre 30 e 60 dias. Ao comparar os grupos, nota-se que a densidade de volume do OGb e OGp não apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) no período de 7 dias. Todavia, entre 14 e 60 dias, o volume do OGp foi em média 0,25 vezes menor em relação ao OGb.
 - 2) A densidade de volume do **Tecido Conjuntivo** nos grupos OGp e OGb manteve-se constante durante todos os períodos experimentais, ocupando em média, respectivamente, 38,9% e 28% da região implantada. As diferenças estatísticas ocorreram quando comparados OGp com OGb apenas nos períodos de 7 e 60 dias em que o OGp foi em média, respectivamente, 0,41 e 0,33 vezes maior, que o OGb.
 - 3) A densidade de volume da **Área de Reabsorção** não apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) no grupo OGp entre os períodos de 7 a 60 dias. Já no OGb, a densidade de volume da área de reabsorção não apresentou diferença entre 7 e 14 dias ($p < 0,05$), e entre 14 e 30 dias ocorreu um aumento de 0,24 vezes, mantendo-se constante aos 60 dias ($p < 0,05$). Quando comparado os grupos entre 7 e 30 dias, a densidade de volume da área de reabsorção no grupo OGp foi em média 0,49 vezes maior em relação ao OGb, não apresentando diferença ($p < 0,05$) no período de 60 dias.
 - 4) A densidade de volume das **Células Gigantes Multinucleadas** no grupo OGp entre 7 e 30 dias aumentou gradualmente em média 28,23 vezes, além de se manter constante aos 60 dias ($p < 0,05$). Já no grupo OGb não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os períodos. Ao comparar os grupos, não houve diferenças na densidade de volume de células gigantes aos 7 dias, entretanto, entre 14 e 60 dias a média foi 0,81 vezes maior no OGp em relação ao OGb.
-

4.2 Capacidade osteogênica do Orthogen® em defeito ósseo craniano

4.2.1 Radiográfico

As imagens radiográficas obtidas logo após o término da fixação das peças de cada animal, em cada período experimental, estão apresentadas nas figuras 18 e 19. As análises das imagens radiográficas mostraram que:

No período inicial de 1 mês, os defeitos ósseos do grupo OGp (Figura 15 A1-A5) estavam preenchidos por pequenas partículas do biomaterial com radiodensidade semelhante ao do tecido ósseo adjacente ao defeito, enquanto, no grupo OGb (Figura 16 A1-A5) estavam preenchidos pelo bloco, o qual apresentava trabéculas mais radiodensas do que o tecido ósseo adjacente.

Após 3 meses de implantação, no grupo OGp (Figura 15 B1-B5), em dois casos (Figura 15 B2 e B4), os enxertos encontravam-se menos radiodensos, em relação ao observado no período anterior, com várias áreas radiopacas, provavelmente ocupadas por tecido mole. Nos demais defeitos (Figura 15 B1, B3 e B5), é possível notar o aumento da radiodensidade na borda do defeito e o enxerto com radiodensidade semelhante ao do período anterior. Por sua vez, em relação ao grupo OGb (Figura 16 B1-B5), em dois casos ocorreram uma redução do enxerto e formação de áreas mais radiopacas, provavelmente devido ao processo de reabsorção tanto do material quanto do tecido ósseo (Figura 16 B2 e B3), nos demais três casos (Figura 16 B1, B4 e B5) ocorreram um aumento da radiodensidade, tanto na borda do defeito quanto no interior dos espaços entre as trabéculas.

Aos 6 meses, no defeito ósseo do grupo OGp (Figura 15 C1-C5) em três defeitos (Figura 15 C2, C3 e C5) as imagens radiográficas mostravam-se similares aos do período anterior (comparar com Figura 15 B1, B3 e B5), e em dois defeitos (Figura 15 C1 e C4) ocorreram um aumento da radiodensidade entre as partículas, provavelmente decorrente da formação óssea. No grupo OGb (Figura 16 C1-C5), em todos os defeitos ocorreram um aumento da radiodensidade no interior dos espaços entre as trabéculas, devido à formação óssea. Em três casos (Figura 16 C1, C2 e C4), o enxerto estava bem coaptado ao osso neoformado na borda do defeito e em dois casos (Figura 16 C3 e C5) apresentavam algumas áreas radiopacas referentes, provavelmente, aos espaços preenchidos por tecido mole.

Figura 15: Imagens radiográficas da região enxertada com partículas de OrthoGen® obtidas logo após o término da fixação das peças **A:** 1 mês; **B:** 3 meses; **C:** 6 meses, áreas radiolúcidas referente a interposição por tecido mole (seta amarela), áreas de maior radiodensidade possível interposição de tecido ósseo (seta vermelha).

Figura 16: Imagens radiográficas da região enxertada com blocos de OrthoGen® obtidas logo após o término da fixação das peças **A:** 1 mês; **B:** 3 meses; **C:** 6 meses, áreas de processo de reabsorção (seta azul), áreas do enxerto bem coaptado ao osso neoformado (seta verde).

4.2.2 Morfológico

As fotomicrografias representativas do Orthogen® na forma de bloco e partículas implantados em defeito ósseo craniano para cada período experimental estão apresentadas nas figuras 17, 18, 19, 20, 21 e 22 mostrando que:

No período de 1 mês, os defeitos ósseos do grupo OGp (Figura 17) apresentaram pequena formação óssea na borda do defeito e na superfície da dura-máter (Figura 17 C-E). O restante dos defeitos mostrava-se preenchido por grande quantidade de partículas de OGp, com áreas de reabsorção por macrófagos e células gigantes multinucleadas (Figura 17D). Entre as partículas ocorreu a formação de um tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado com inúmeras células macrofágicas, migrando em direção a superfície do material (Figura 17B). Quanto ao grupo OGb (Figura 18), as trabéculas do biomaterial mostravam-se íntegras com pequenas áreas de reabsorção/degradação e concomitante deposição de tecido ósseo (Figura 18C-E). Os espaços entre as trabéculas próximas a superfície da dura-máter apresentavam-se preenchidas por tecido ósseo e pequenas áreas por tecido conjuntivo frouxo. Já na região próxima ao tegumento (Figura 18 B-D) os espaços entre as trabéculas de OGb mostraram-se preenchidos por tecido conjuntivo mais frouxo ricamente celularizado, principalmente fibroblasto, e vascularizado.

Figura 17: Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em partículas (OGp) no período de 1 mês. **A)** Aspecto panorâmico do defeito preenchido por OGp envolto por tecido conjuntivo (TC) e com a presença de tecido ósseo neoformado (asteriscos) nas margens do defeito e na superfície da dura-máter. **B-D)** Detalhes da região próxima ao tegumento mostrando o OGp envolto por tecido conjuntivo (TC), com a presença de algumas áreas de reabsorção (seta vermelha) e a reabsorção de OGp por célula gigante multinucleada (seta preta). **C-E)** Detalhe próximo a dura-máter exibindo o OGp próximo ao tecido ósseo neoformado (asteriscos) e envolto por tecido conjuntivo (TC) ricamente celularizado. HE

Figura 18: Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em bloco (OGb) no período de 1 mês. **A)** Aspecto panorâmico do defeito preenchido por OGb envolto por tecido conjuntivo (TC) e com a presença de tecido ósseo neoformado (asteriscos) nas margens do defeito e na superfície da dura-máter. **B-D)** Detalhes da região próxima ao tegumento mostrando os espaços entre as trabéculas ou poros de OGb invadidos por tecido conjuntivo (TC) e ainda algumas áreas de reabsorção (seta vermelha). **C-E)** Detalhe próximo a dura-máter exibindo o OGb envolto por tecido ósseo neoformado (asteriscos) e por tecido conjuntivo (TC), com áreas de deposição (área tracejada) de tecido ósseo neoformado rico em vasos sanguíneo (V) na superfície do OGb. HE

No período de 3 meses, no grupo OGp (Figura 19), a formação óssea mostrava-se similar ao do período anterior, ou seja, pequena formação óssea na borda do defeito e próxima a dura-máter, porém com arranjo lamelar. Neste período ocorreu intensa redução, tanto em número quanto em tamanho, das partículas do OGp que apresentava em sua superfície áreas de reabsorção/degradação por macrófagos e células gigantes multinucleadas (Figura 19E). Na superfície de algumas partículas ocorreu deposição de tecido ósseo adjacente a áreas de reabsorção (Figura 19D), e em outras ocorreram a interposição por tecido conjuntivo mais fibroso do que o período anterior (comparar Figura 19C com 17B), principalmente próximo ao tegumento. Enquanto no grupo OGb (Figura 20), havia uma quantidade nitidamente maior de tecido ósseo em relação ao período de 30 dias (comparar 20A com 18A), localizada não só na borda do defeito mas em toda a região próxima a dura-máter, caminhando/invadindo o interior das trabéculas mais superficiais em direção ao tegumento (Figura 19A-B-D). Os espaços entre as trabéculas, localizadas próximas ao tegumento, mostravam-se preenchidas por tecido conjuntivo mais fibroso em relação ao período anterior, porém, ricamente vascularizado (comparar Figura 20E com 18D).

Figura 19: Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em partículas (OGp) no período de 3 meses. **A)** Aspecto panorâmico do defeito preenchido por OGp envolto por tecido conjuntivo (TC) e com a presença de tecido ósseo neoformado (asteriscos). 10X; **B-D)** Detalhe próximo à região do tegumento mostrando o OGp envolto por tecido ósseo neoformado (asteriscos) e uma pequena parte de tecido conjuntivo (TC), e áreas de reabsorção do OGp (área tracejada) envolto por tecido ósseo neoformado. **C-E)** Detalhe próximo à região da dura-máter exibindo o tecido conjuntivo (TC) mais fibroso em relação ao período anterior invadindo os espaços entre as partículas de OGp e a formação de tecido ósseo (asterisco) envolvendo uma partícula do OGp (área tracejada), com presença de células gigantes multinucleadas (seta preta). HE

Figura 20: Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em bloco (OGb) no período de **3 meses**. **A)** Aspecto panorâmico do defeito preenchido por OGb envolto por tecido conjuntivo (TC) e com a presença de tecido ósseo neoformado (asteriscos). **B-D)** Detalhes próximos à dura-máter mostrando o tecido ósseo neoformado (asteriscos) invadindo a estrutura do OGb e uma pequena parte de tecido conjuntivo (TC) fibroso. **C-E)** Detalhe próximo à região do tegumento exibindo o tecido conjuntivo (TC) fibroso ricamente celularizado e vascularizado invadindo os espaços entre as trabéculas de OGb e a presença de tecido ósseo (asterisco) e a presença de vasos sanguíneos (V). HE.

No período de 6 meses, no grupo OGp (Figura 21) as partículas de biomaterial diminuíram acentuadamente em relação aos períodos anteriores, e ocorreu um pequeno aumento na formação de tecido ósseo, envolvendo pequenos fragmentos da OGp reabsorvido. O restante das partículas apresentava intensa reabsorção (Figura 21B-D), com presença de extensas células gigantes multinucleadas (Figura 21E) em sua superfície. O espaço entre as partículas de OGp estava preenchido por tecido conjuntivo fibroso. Quanto ao grupo OGb (Figura 22), as trabéculas do biomaterial apresentavam-se íntegras com pequenas áreas de reabsorção/degradação e aposição de tecido ósseo. Assim, grande parte dos espaços entre as trabéculas do biomaterial estavam preenchidos por tecido ósseo compacto com pequenas áreas de tecido conjuntivo fibroso próximo a superfície do biomaterial (Figura 22B-D). E, algumas áreas de deposição de tecido ósseo neoformado entre as trabéculas (Figura 22E).

Figura 21: Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em partículas (OGp) no período de **6 meses**. **A)** Aspecto panorâmico do defeito preenchido por OGp envolto por tecido conjuntivo (TC) e com a presença de tecido ósseo neoformado (asterisco) entre as partículas de OGp. **B-D)** Detalhes próximo à dura-máter mostrando o OGp envolto por tecido conjuntivo (TC) fibroso e a presença de tecido ósseo neoformado (asterisco) envolvendo as partículas de OGp, com áreas de reabsorção (seta vermelha) do OGp e um pequena partícula envolto por tecido ósseo neoformado (área tracejada). **C-E)** Detalhe próximo ao tegumento exibindo o OGp envolto por e por tecido conjuntivo (TC) celularizado e vascularizado e uma pequena parte de tecido ósseo neoformado (asterisco), com a presença de células gigantes multinucleadas (seta preta). HE.

Figura 22: Fotomicrografia do defeito craniano preenchido por OrthoGen® em bloco (OGp) no período de **6 meses**. **A)** Aspecto panorâmico do defeito preenchido por OGb envolto tecido ósseo neoformado (asterisco) e a presença de tecido conjuntivo (TC) em pequenas partes da área do defeito. **B-D)** Detalhe mostrando o OGb envolto tecido ósseo neoformado (asterisco) e tecido conjuntivo (TC) com a presença de vasos sanguíneos (V); **C-E)** Detalhe exibindo o tecido ósseo neoformado (asterisco) depositado entre as trabéculas reabsorvidas do OGb e uma presença menor de tecido conjuntivo (TC), e a deposição (área tracejada) de tecido ósseo neoformado (asterisco) entre as trabéculas do OGb. HE

4.2.3 Morfométrico

Os dados obtidos para volume total da região enxertada e de cada estrutura (mm³) avaliada para o Orthogen® em bloco e partículas implantados em defeito ósseo craniano com $p < 0,05$ estão apresentados nas Tabelas 5, 6, 7 e 8 e Gráfico 2.

Tabela 5: Média e Desvio Padrão Volume total da região enxertada (mm³)

Volume Total	OGp	OGb	Teste “t” Probabilidade “p”
1 mês	71,6 ± 12,1	119,5 ± 6,8 ^A	0,000121
3 meses	60,3 ± 6,3	151,4 ± 18,0 ^{A, B}	0,000147
6 meses	58,7 ± 22,6	156,9 ± 12,7 ^B	0,000020
Anova “p”	0,213228	0,014210	

Letras diferentes $p < 0,05$ entre períodos por grupo

Tabela 6: Média e Desvio Padrão Volume (mm³) do OrthoGen® em partícula e bloco

Volume Biomaterial	OGp	OGb	Teste “t” Probabilidade “p”
1 mês	21,6 ± 6,0 ^a	27,9 ± 7,7	0,171861
3 meses	9,7 ± 2,6 ^b	26,9 ± 11,7	0,010839
6 meses	10,4 ± 7,4 ^b	33,2 ± 1,5	0,000126
Anova “p”	0,006317	0,359336	

Letras diferentes $p < 0,05$ entre períodos por grupo

Tabela 7: Média e Desvio Padrão Volume Osso Neoformado (mm³)

Volume Osso Neoformado	OGp	OGb	Teste “t” Probabilidade “p”
1 mês	5,6 ± 3,0 ^a	22,7 ± 10,6 ^A	0,007592
3 meses	11,8 ± 3,9 ^{a, b}	45,0 ± 11,9 ^{A, B}	0,000411
6 meses	17,0 ± 9,9 ^b	70,9 ± 27,2 ^B	0,001708
Anova “p”	0,022667	0,001837	

Letras diferentes p<0,05 entre períodos por grupo

Tabela 8: Média e Desvio Padrão Volume Tecido Conjuntivo (mm³)

Volume Conjuntivo	OGp	OGb	Teste “t” Probabilidade “p”
1 mês	44,4 ± 6,5 ^a	69,9 ± 8,0	0,000695
3 meses	38,8 ± 2,6 ^{a, b}	79,5 ± 16,4	0,004434
6 meses	31,3 ± 8,8 ^b	52,7 ± 16,3	0,013669
Anova “p”	0,013347	0,111265	

Letras diferentes p<0,05 entre períodos por grupo

Gráfico 2: Gráficos do (A) Volume Total (B) Volume do biomaterial (C) volume do osso neoformado (D) volume de tecido conjuntivo nos diferentes grupos de tratamento durante todo o período experimental. Letras minúsculas diferentes $p < 0,05$ entre períodos do OGp, letras maiúsculas diferentes $p < 0,05$ entre períodos do OGb, e asterisco $p < 0,05$ entre grupos por período.

A análise das tabelas 5, 6, 7 e 8 e do gráfico 2, bem como a análise estatística dos dados mostraram que:

- 1) O **volume total da região enxertada** no grupo OGp não apresentou diferença ($p < 0,05$) entre os períodos de 1 a 6 meses. Já o grupo OGb, o volume total da região enxertada no período de 1 mês foi de 0,24 vezes menor em relação ao de 6 meses. Quando comparado os grupos, OGp apresentou um volume total da região enxertada em média de 0,55 vezes menor em relação ao grupo OGb.
 - 2) O **volume de biomaterial** no grupo OGp diminuiu 0,55 vezes entre 1 e 3 meses e manteve-se constante durante os 6 meses. Já no grupo OGb não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os períodos. Ao comparar os grupos, observa-se que o volume de biomaterial não apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) no período de 1 mês, todavia, aos 3 e 6 meses, no grupo OGp foi em média 0,67 vezes menor em relação ao OGb.
 - 3) O **volume de osso neoformado** entre 1 e 6 meses, nos grupos OGp e OGb aumentaram, respectivamente, 2,04 e 2,12 vezes. Ao comparar os grupos, nota-se que o volume de osso no grupo OGp foi em média 0,75 vezes menor que o grupo OGb durante todo período experimental.
 - 4) O **volume de Tecido conjuntivo** no grupo OGp de 1 mês foi de 0,29 vezes maior que no período de 6 meses. Já no grupo OGb o volume de Tecido Conjuntivo não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) significativa. Ao comparar os grupos, aponta-se que o volume de tecido conjuntivo em OGb foi de 0,43 vezes maior em relação ao grupo OGp.
-

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Nos últimos dois séculos xenoenxertos ósseos de várias espécies têm sido transplantados no homem, dentre eles o mais comumente empregado é o de origem bovina, pois são facilmente obtidos e não há grandes considerações éticas quanto à sua utilização, considerando que possuem uma disponibilidade praticamente ilimitada de material. Com o avanço do desenvolvimento de materiais da área médica e em particular na correção e reabilitação bucal, há uma preocupação geral na maioria dos países avançados quanto aos possíveis efeitos adversos provenientes dos materiais que entram no mercado odontológico, sem serem submetidos a um programa rigoroso e extenso de testes laboratoriais (Marx, Ehler e Peleg, 1996; Oliveira *et al.*, 1999; Seebach *et al.*, 2010; Boaventura *et al.*, 2012; Zorzi e Miranda, 2012).

Uma avaliação biológica completa dos materiais da área médica e, notadamente, odontológica deve incluir três níveis de pesquisa, que são: os testes pré-clínicos em animais e *in vitro*; testes em animais *in situ*; e largos ensaios em humanos (Oliveira *et al.*, 2010).

A partir dessas avaliações biológicas, diversos autores (Ibanez *et al.*, 1998; Stavropoulos, 2008; Cabbar *et al.*, 2011) estudaram a biocompatibilidade de xenoenxertos ósseos que podem ser utilizados parcialmente desproteinizado (Surgibone®, Unilab Surgibone Inc®, Tutogen Medical GmbH®), diminuindo a antigenicidade e produzindo uma ligeira resposta imune, que apresentam resultados bem sucedidos (Ibanez *et al.*, 1998; Stavropoulos, 2008). Cabbar *et al.*, (2011) investigaram o efeito do plasma rico em plaquetas, que pode ter melhorado a resposta, combinado ao xenoenxerto ósseo particulado Unilab Surgibone® no aumento do seio maxilar em 10 pacientes. Os autores comprovaram que o material é biocompatível, e que sozinho é capaz de fornecer a estabilidade necessária para implantes. Enquanto que Stavropoulos *et al.*, (2011) avaliaram histologicamente a cicatrização de defeitos intraósseos após a exodontia de 5 dentes alveolares, tratados com xenoenxerto ósseo (Tutogen) e membrana colágena bovina. Constataram que 6 meses após a implantação do biomaterial houve a formação de novas células, cemento e ligamento periodontal em 4 dos 5 dentes avaliados e, que

as partículas do Tutogen apresentaram-se envoltas por tecido conjuntivo sem nenhuma evidência de formação óssea e sem sinais de reação de corpo estranho ou reabsorção contínua das partículas. Enquanto que, (Tudor *et al.*, 2008) implantaram Tutogen e enxerto ósseo autógeno na calvária de porcos (avaliado em microradiografia) e constaram que não havia diferenças estatísticas entre os biomateriais quanto ao preenchimento ósseo dos defeitos. Outro estudo relatou uma boa regeneração óssea e remodelação completa do enxerto Tutogen, 6 meses após sua implantação em defeitos no osso femoral de coelhos (Gunther *et al.*, 1996). Esses exemplos evidenciam a importância de estudos relacionados à ação dos biomateriais no organismo. Apesar de existirem materiais similares (Surgibone®, Unilab Surgibone Inc®, Tutogen Medical GmbH®) ao Orthogen®, existem poucos trabalhos na literatura com relação à caracterização estrutural e da resposta biológica desse biomaterial que é um xenoenxerto ósseo liofilizado misto (Orthogen, 2011).

Alguns dos poucos estudos utilizando o Orthogen® relatam resultados positivos, como (Galia *et al.*, 2008), que avaliou a biocompatibilidade do enxerto ósseo liofilizado *in vitro* e macroscopicamente *in vivo*. No teste *in vitro* foi utilizado uma linhagem de fibroblastos de ratos e não constatou potencial citotóxico em 100% das amostras e no teste *in vivo* com 20 ratos albinos o material foi inoculado via injeção intraperitoneal, e não apresentou toxicidade aguda sistêmica na visualização macroscópica, mostrando que o Orthogen® é um produto com excelente biocompatibilidade. Em outro estudo (Galia *et al.*, 2011), realizou a caracterização físico-química do enxerto ósseo bovino liofilizado e verificou na microscopia eletrônica de varredura que o enxerto ósseo bovino apresenta estrutura típica de osso medular com poros interconectados, extremamente importantes para a adesão celular. Alguns autores (M. Ashok, 2003; Mendonça e Granjeiro, 2005; Junqueira e Carneiro, 2008) relataram as mesmas observações quanto à estrutura microscópica, como o BioOss ou GenOx Inorg (MENDONÇA, 2005; JUNQUEIRA, 2008) ou submetidos a processamentos físico-químicos TutoPlast *bovine*, Tutobone ou TutoPlast *human* (M. Ashok, 2003), bem como para produtos não comerciais submetidos a processos físico-químicos de limpeza e purificação *Kiel bone*.

Com resultados *in vitro* e macroscópico *in vivo* os autores confirmaram a qualidade do Orthogen®, que é um produto com características que seguem as

normas sugeridas na literatura, além de demonstrar similaridade com outros enxertos ósseos (Surgibone e Tutogen) processados e amplamente utilizados.

Para que um biomaterial possa ser utilizado para as finalidades a que se destinam, a ISO (International Standardization Organization) padronizou normas para a avaliação de dispositivos médicos. Por exemplo, a ISO 10993-6 preconiza a utilização de animais de laboratório, devido ao tamanho reduzido, e do alto metabolismo, corroborando com as recomendações da American Dental Association (ADA) e Federation Dentaire Association (FDA) (Borelli, 2010). Essas avaliações percorrem os campos da fabricação, processos de esterilização e a resposta biológica dos tecidos nos quais os materiais vão entrar em contato (Calixto e Carvalho, 2001). Qualquer material implantado pode desencadear uma resposta inflamatória por parte do tecido hospedeiro, conhecida como reação de corpo estranho (França *et al.*, 2005), sendo a biocompatibilidade determinada de acordo com a intensidade e duração desta resposta.

Portanto, a biocompatibilidade é descrita como a capacidade de um biomaterial, prótese ou dispositivo médico funcionar normalmente, provocando uma resposta apropriada por parte do organismo em que é implantado (Anderson, 2003). Os testes de biocompatibilidade são realizados em tecido conjuntivo subcutâneo, ósseo e de cultura de células, ou seja, testes que permitem seguro e razoável controle e, por vezes, precisa determinação da toxicidade de vários materiais (Oliveira, 2000). Nesse caso, a avaliação parte de uma simples análise microscópica dos eventos e tipos celulares que permeiam o biomaterial, até uma avaliação molecular.

Assim, na primeira etapa do presente estudo avaliou-se a cinética dos eventos celulares e teciduais desencadeado após a implantação do OrthoGen® na forma de bloco (OGb) e partículas (OGp) em tecido subcutâneo de rato, os quais mostraram diferença quanto a biocompatibilidade dependendo da sua estrutura física.

No modelo experimental utilizado, a forma em bloco mostrou-se menos reabsorvível que sua forma em partícula, o que pode ser facilmente observado macroscópica e radiograficamente. Todavia, não tenham sido observados níveis anormais de células do sistema imunológico como linfócitos e plasmócitos tanto na

forma em bloco como partículas, a presença de células gigantes multinucleadas (CGM) foi significativamente maior nos grupos OGp. Salientamos que, o formato e tamanho do biomaterial, bem como o local de implantação são um dos principais fatores que influenciam na reação de corpo estranho (Anderson, Rodriguez e Chang, 2008). Contudo ainda não há uma definição clara de qual tamanho de partícula é adequado para cada tecido ou condição clínica, uma vez que as características físico-químicas de cada material também influenciam na resposta tecidual ao enxerto (Sicca *et al.*, 2000). Dados da literatura têm mostrado que materiais osteocondutores com intuito de manter a capacidade estrutural do defeito ósseo (Judas, Figueiredo e Dias, 2009), vem possuir um arcabouço tridimensional e uma grande quantidade de poros, cerca de 90%. Esses poros interconectados permitem a proliferação celular e vascular bem como a formação de tecido de granulação no seu interior (Oliveira *et al.*, 2010).

Outro fator importante é a superfície química do material, pois esta deve favorecer a adesão e proliferação celular, já que a adsorção de proteínas e adesão de macrófagos derivados de monócitos são tópicos significantes na formação de corpo estranho (Anderson, Rodriguez e Chang, 2008). A interação de células inflamatórias com a superfície química do biomaterial tem um impacto significativo na biocompatibilidade e no funcionamento de dispositivos médicos (Brodbeck e Anderson, 2009).

O tipo, os níveis e a superfície das proteínas adsorvidas são determinantes críticos na reação do tecido aos implantes, uma vez que a interação dessas proteínas com os receptores das células inflamatórias, especialmente os macrófagos e as células gigantes multinucleadas que constituem o maior sistema de reconhecimento para biomateriais (Wilson *et al.*, 2005; Anderson, Rodriguez e Chang, 2008).

Células gigantes multinucleadas (CGM) são observadas no tecido ósseo, em granulomas decorrentes de resíduos bacterianos, e na reação de corpo estranho contra materiais implantados/introduzidos no organismo. As CGMs são formadas por fusões repetidas de macrófagos. Três tipos importantes de CGMs existem: os osteoclastos, as células gigantes de Langhans '(LGC) e as células gigantes de corpo estranho (CGMCe) (Anderson, 2000). Os osteoclastos pertencem a uma classe

distinta de CGM que reabsorve o tecido ósseo envolvido no processo biológico da remodelação óssea. A LGC normalmente contém menos de 20 núcleos que ficam dispostos em forma de ferradura e estão presentes em torno de partículas indigeríveis de microorganismos. Estas células ficam cercadas por linfócitos que produzem IFNg (Interferon-g), estimulando a formação de LGC. As CGMce estão presentes na reação inflamatória contra corpos estranhos, e geralmente contém mais de 20 núcleos que ficam espalhados por toda a célula. As CGMce são estimuladas *in vitro* pelo fator estimulatório de colônia de macrófagos M-CSF e citocinas como a IL-4 e IL-13 (Lemaire *et al.*, 1996; Defife *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 1998). Em materiais degradáveis, estas CGMs continuam presentes até que o material seja totalmente degradado, diminuindo em número e tamanho conforme o tempo e morrem por processo apoptótico. Este perfil da CGMce foi observado no atual trabalho principalmente nos implantes de OGp.

Vale salientar que o papel das CGMs na inflamação ainda não está completamente compreendido. No passado, as CMGs eram consideradas como resultado da fusão de macrófago frustrados, incapazes de fagocitarem fragmentos de grandes dimensões, resultando em células inúteis que não possuíam função alguma no processo inflamatório (Mariano e Spector, 1974). Todavia, estudos recentes mostraram que as CGM podem estar envolvidas na fagocitose de colágeno e na eliminação de materiais estranhos ao organismo, além de elas desempenharem um papel na expressão de citocinas capazes de controlar a resposta inflamatória (Enelow *et al.*, 1992; De Graaf *et al.*, 1996; Hernandez-Pando *et al.*, 1997).

Geralmente, as células inflamatórias, como macrófagos, adotam seu fenótipo de acordo com o ambiente que encontram. Luttikhuizen *et al.*, (2007) utilizaram um modelo de implante subcutâneo de biomateriais não degradáveis (Politereftalato de etileno), degradáveis (colágeno de ovelha *crosslinked*) e bioativo (PCLdiUPy), e verificaram que a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL1b, IL-6 e TNF-alfa, quimiocinas como CXCL1/KC, CXCL2/MIP2 e CCL2/MCP1, além de fatores de crescimento tipo FGF e VEGF foram mais elevadas em CGMs presentes no biomaterial bioativo. Segundo os autores os biomateriais com diferentes composições e degradabilidade provocam diferentes respostas dos macrófagos e das CGM, ou seja, estas células alteram seu perfil de expressão ativando e modulando a resposta local ou o microambiente ao redor do implante.

A introdução de um corpo estranho em um tecido vivo desencadeia uma série de eventos caracterizados, pela adsorção de proteínas do sangue, que ocorre imediatamente no momento da implantação, a chegada de células inflamatórias no local do implante, principalmente macrófagos, formação de células gigantes multinucleadas e a formação do tecido de granulação que marca o início da cicatrização, caracterizada pela chegada de fibroblastos e células endoteliais (Anderson, Rodriguez e Chang, 2008).

Salientamos que essas características foram observadas no material testado durante o decorrer dos períodos experimentais. Nas duas formas do Orthogen® observou-se a presença de macrófagos e de CGM que surgem a partir da fusão dos macrófagos na superfície do biomaterial, indicando que no Orthogen® esses tipos celulares foram os principais responsáveis pela reabsorção do biomaterial pelo organismo. A área de reabsorção no grupo OGp manteve-se constante durante os períodos experimentais ocupando em média 8,84% da região enxertada, enquanto que, o percentual de CGM na área de reabsorção aumentou 28,23 vezes entre 7 e 60 dias, com pico aos 30 dias (2,19%). Já no grupo OGb a área de reabsorção e a CGM ocupou em média 4,76% da região enxertada enquanto a de CGM manteve-se constante sendo em média de apenas 0,23% da área de reabsorção. A presença de CGM foi de 0,81 vezes maior no grupo OGp, sugerindo que o tamanho e disposição das partículas contribuíram para a migração, fusão, adesão e ativação de células macrofágicas acelerando o processo de absorção e diminuindo a área preenchida pelo biomaterial em até 0,29 vezes no último período. O tecido conjuntivo manteve-se constante nos dois grupos, ocupando em média 38,9% e 28,0%, respectivamente, no grupo OGp e OGb. Porém no grupo OGp, o tecido conjuntivo apresentou-se mais fibroso e com inúmeros macrófagos, enquanto, no OGb a superfície mostrava-se envolta por uma fina cápsula de tecido conjuntivo organizado, centralmente por tecido conjuntivo frouxo ricamente celularizado e vascularizado e tecido adiposo característico da região.

A quase ausência de plasmócitos e linfócitos nos períodos estudados é outro fator que indica a boa aceitação biológica do enxerto ósseo liofilizado pelo tecido. Assim, os resultados mostram que o Orthogen® na forma de Bloco é mais biocompatível do que a partícula quando implantado em subcutâneo de ratos.

Na segunda etapa do estudo avaliamos a capacidade osteocondutora do biomaterial Orthogen® na forma de partícula e blocos implantados em defeitos críticos na calvária de ratos. Porém, no atual trabalho não acrescentamos o grupo controle do defeito de tamanho crítico, pois vários trabalhos nossos publicados e em andamento mostram que os defeitos de 8-mm de diâmetro na calvária de rato, com 120 dias de idade, com até 6 meses de experimento formam tecido ósseo apenas na borda do defeito, sendo preenchido por tecido conjuntivo denso rico em fibroblastos e vasos sanguíneos (Ferreira *et al.*, 2004; Marins *et al.*, 2004; Luttikhuisen *et al.*, 2007). Confirmando que defeitos críticos de 8 mm não são capazes de restabelecer o tecido perdido. Assim, eticamente conforme o protocolo liberado pelo CEEPA, consideramos o defeito como de tamanho crítico, baseado nos dados já publicados.

Nos grupos OGb e OGp foram implantados 100 mg do biomaterial nos defeitos, sendo que, no grupo OGb o volume do bloco manteve-se constante durante todo o período experimental, mantendo o espaço para a formação óssea. A sua espessura maior que a tábua óssea e a sua porosidade favoreceram a migração de vasos para as áreas centrais do bloco e a invasão de células que participaram da deposição de tecido ósseo neoformado. Assim, após 6 meses da enxertia no grupo OGb o bloco se mostrava íntegro com a maioria dos poros preenchida por tecido ósseo, cujo o volume era de 70,9 mm³, corroborando com alguns estudos clínicos que indicam que o OrthoGen® bloco é biocompatível com características osteocondutoras permitindo a remodelação óssea com mínima perda de volume (Galia, 2004; Gonçalves, 2011).

Já, no grupo OGp, as partículas do biomaterial foram rapidamente reabsorvidas e não foram capazes de manter o espaço para a formação óssea, sendo que a região do defeito foi invadida por tecido conjuntivo fibroso. A presença de tecido conjuntivo no defeito pode ter inibido a formação de tecido ósseo, pois compromete alguns efeitos quimiotactantes, prejudicando o recrutamento de células osteoprogenitoras, e diminuindo assim a taxa de formação óssea (Zambuzzi *et al.*, 2012). A intensa reabsorção por células gigantes multinucleadas foi observada principalmente após o 3º mês de enxertia, ocasionando uma drástica redução de 55% no volume da OGp na região do defeito (21,6 mm³ no 1º mês para 9,7 mm³ aos 3 meses). Apesar da pouca reabsorção das partículas de OGp no 1º mês, os espaços entre eles estavam preenchidos por grande quantidade de tecido conjuntivo

(44mm³) e pequena formação óssea (5,6mm³), porém, ao final de 6 meses ocorreu uma redução de 29% no volume de tecido conjuntivo, enquanto, a formação óssea aumentou 67%. Todavia, no grupo OGp o volume de osso neoformado foi 0,75 vezes menor que o do grupo OGb. Comparativamente, Develioglu, Unver Saraydin e Kartal,(2009) utilizando o enxerto ósseo particulado Unilab Surgibone em defeitos de 5 mm de diâmetro, encontraram resultados similares aos observados neste trabalho, ou seja, após 1 mês as partículas do biomaterial estavam envoltas por tecido conjuntivo fibroso, mínima formação óssea e presença de CGM na superfície do biomaterial. Entretanto em estudo subsequente Develioglu *et al.*, (2010) avaliaram o mesmo biomaterial em defeitos cranianos bilaterais de 6 mm de diâmetro e verificaram que após 12 meses de enxertia as partículas praticamente não foram reabsorvidas e a formação óssea foi mínima e similar ao grupo controle sem tratamento. Para os autores, o tamanho da partícula e a composição química podem ter influenciado na reabsorção e formação óssea.

Em um dos primeiros estudos realizados em fêmur de macacos Shapoff *et al.*, (1980) implantaram enxerto alogênico congelado com diferentes tamanho de partícula, sendo que, os de menor tamanho (100-300 µm) promoveram maior reabsorção e formação óssea em relação aos de maior tamanho (1000-2000 µm) salientando a importância do tamanho das partículas no processo de formação óssea. Por outro lado, recentes estudos em humanos Testori *et al.*, (2013) avaliaram a influência do tamanho da partícula no aumento do seio maxilar, utilizando um osso inorgânico bovino e concluíram que partículas maiores (1.0mm – 2.0mm) têm maior capacidade para formação óssea do que partículas menores (0.25mm – 1.0mm) e essas formaram áreas com células adiposas, canais vasculares e algumas células inflamatórias, que não estiveram presentes nas partículas maiores. Em defeito crítico 8mm em coelhos Kluppel *et al.*, (2013) implantaram três tamanhos diferentes de matriz óssea inorgânica bovina, grande (750 – 1000 µm), médio (450 – 749 µm) e pequeno (<450 µm) e verificaram que, todos os três tamanhos resultaram em infiltrado inflamatório e apenas a partícula menor foi intensamente reabsorvida apresentando maior neoformação óssea quando comparado às partículas grandes e médias que apresentaram maior formação de tecido conjuntivo fibroso. Embora todos os autores tenham verificado diferenças quanto ao tamanho da partícula versus formação óssea, as diferenças obtidas quanto aos resultados podem ser

decorrentes das variações quanto a composição química e quanto a forma e o local de implantação.

Outro fator relevante é a presença e intensidade das células gigantes multinucleadas na superfície do biomaterial que pode ter interferido na formação óssea visto que, tanto os macrófagos como as CGM aderentes ao biomaterial liberam várias citocinas que podem influenciar na resolução da resposta inflamatória, a progressão da cicatrização do defeito e ainda contribuir para a degradação prematura do biomaterial pelas CGM (Tavares, 2012). A intensa taxa de reabsorção do biomaterial observada nos grupos OGp pode ser explicada por meio da ação das citocinas pró-reabsorção, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1) que em geral controlam o sistema imune essencialmente pela estimulação de M-CSF (fator estimulante de colônias de macrófagos) consequentemente aumentando o número de células pré-osteoclásticas (Brodbeck *et al.*, 2002).

Os resultados mostraram que a forma em Bloco do biomaterial Orthogen® possui uma capacidade osteogênica superior à forma em partículas, no modelo experimental avaliado.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, com a utilização de diferentes técnicas, pode se inferir que ambas as formas do enxerto ósseo Orthogen® são biocompatíveis em tecido subcutâneo, no entanto, no formato em bloco revelou se mais osteogênico do que a forma em partícula, provocando uma reação inflamatória menos intensa e com menor frequência de CGM quando implantada em tecido subcutâneo, e promovendo maior formação de tecido ósseo em defeito ósseo de tamanho crítico em ratos.

Referências

REFERÊNCIAS

ACTIS, A. B.; OBWEGESER, J. A.; RUPEREZ, C. Influence of different sterilization procedures and partial demineralization of screws made of bone on their mechanical properties. **J Biomater Appl**, v. 18, n. 3, p. 193-207, Jan 2004. ISSN 0885-3282 (Print) 0885-3282.

ANDERSON, J. M. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. v. 5, n. 1, p. 5–10, January 1984 1984. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0142-9612\(84\)90060-7](http://dx.doi.org/10.1016/0142-9612(84)90060-7) >.

_____. Inflammatory response to implants. **ASAIO Trans**, v. 34, n. 2, p. 101-7, Apr-Jun 1988. ISSN 0889-7190 (Print)

0889-7190.

_____. Multinucleated giant cells. **Curr Opin Hematol**, v. 7, n. 1, p. 40-7, Jan 2000. ISSN 1065-6251 (Print) 1065-6251. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. BIOLOGICAL RESPONSES TO MATERIALS. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.matsci.31.1.81>, 2003-11-28 2003. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.matsci.31.1.81> >.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. FOREIGN BODY REACTION TO BIOMATERIALS. **Semin Immunol**, v. 20, n. 2, p. 86-100, Apr 2008. ISSN 1044-5323 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004> >.

BANJAR, A. A.; MEALEY, B. L. A clinical investigation of demineralized bone matrix putty for treatment of periodontal bony defects in humans. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 33, n. 5, p. 567-73, Sep-Oct 2013. ISSN 0198-7569.

BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials. An overview of the basic science. **Clin Orthop Relat Res**, n. 371, p. 10-27, Feb 2000. ISSN 0009-921X (Print) 0009-921x.

BENAHMED, M. et al. LPS increases biomaterial degradation by human monocytes in vitro. **J Biomed Mater Res**, v. 34, n. 1, p. 115-9, Jan 1997. ISSN 0021-9304 (Print)

0021-9304.

BERNABE, P. F. et al. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 3, p. 384-8, Mar 2012. ISSN 0905-7161.

BETTI, L. V. et al. Repair of rabbit femur defects with organic bovine bone cancellous block or cortical granules. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 26, n. 6, p. 1167-75, Nov-Dec 2011. ISSN 0882-2786.

BIGHAM-SADEGH, A. et al. Evaluation of bone healing in canine tibial defects filled with cortical autograft, commercial-DBM, calf fetal DBM, omentum and omentum-calf fetal DBM. **J Vet Sci**, v. 14, n. 3, p. 337-43, 2013. ISSN 1229-845x.

BOAVENTURA, J. M. C. et al. The importance of biocompatibility of new materials: Review for the glass ionomer cement. **Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo**, v. 24, n. 1, p. 42-50, 2012. ISSN 1983-5183. Disponível em: < http://arquivos.cruzeirodosuleducacional.edu.br/principal/old/revista_odontologia/pdf/janeiro_abril_2012/Unicid_24_01_42-50.pdf >.

BORELLI, V. **BIOCOMPATIBILIDADE DE BIOMATERIAIS: ESTUDO EXPLORATÓRIO SOBRE A APLICAÇÃO DA NORMA ISO 10.993.** COLAOB The 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials. MEDEIROS, F.; MAIA, M., et al. Gramado-RS: Instituto de pesquisas energéticas e nucleares 2010.

BRODBECK, W. G.; ANDERSON, J. M. Giant cell formation and function. **Curr Opin Hematol**, v. 16, n. 1, p. 53-7, Jan 2009. ISSN 1065-6251. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/MOH.0b013e32831ac52e> >.

BRODBECK, W. G. et al. Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro. **Cytokine**, v. 18, n. 6, p. 311-9, Jun 21 2002. ISSN 1043-4666 (Print)1043-4666. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. **J Biomed Mater Res A**, v. 64, n. 2, p. 320-9, Feb 1 2003. ISSN 1549-3296 (Print)1549-3296. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.10425> >.

CABBAR, F. et al. The effect of bovine bone graft with or without platelet-rich plasma on maxillary sinus floor augmentation. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 69, n. 10, p. 2537-47, Oct 2011. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2011.03.040> >.

CALIXTO, R. F. E.; CARVALHO, T. L. L. **Implantation of flakes of castor oil resin (*Ricinus communis*) in rat alveolus immediately after dental extraction. Histologic and histometric evaluation of biocompatibility and chronology of bone healing.** 2001. text Universidade de São Paulo

CARVALHO, P. et al. **Avaliação microscópica da propriedade biológica e da biocompatibilidade do osso composto e do osso integral de origem bovina.** *ImplantNews*. 10: 169-177 p. 2013.

CESTARI, T. M. et al. Biocompatibility evaluation of a new bioresorbable pin for membrane fixation. **Braz Dent J**, v. 21, n. 6, p. 482-90, 2010. ISSN 0103-6440. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

COQUELIN, L. et al. In vivo and in vitro comparison of three different allografts vitalized with human mesenchymal stromal cells. **Tissue Eng Part A**, v. 18, n. 17-18, p. 1921-31, Sep 2012. ISSN 1937-3341. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0645> >.

DAMIEN, C. J.; PARSONS, J. R. **Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications.** *J Appl Biomater*. 2: 187-208 p. 1991.

DE GRAAF, J. H. et al. The presence of cytokines in Langerhans' cell histiocytosis. **J Pathol**, v. 180, n. 4, p. 400-6, Dec 1996. ISSN 0022-3417 (Print)0022-3417. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9896\(199612\)180:4<400::aid-path701>3.0.co](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199612)180:4<400::aid-path701>3.0.co) >.

DEFIFE, K. M. et al. Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. **J Immunol**, v. 158, n. 7, p. 3385-90, Apr 1 1997. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DEVELIOGLU, H. et al. Evaluation of the long-term results of rat cranial bone repair using a particular xenograft. **J Oral Implantol**, v. 36, n. 3, p. 167-73, 2010. ISSN 0160-6972 (Print)0160-6972. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1563/aaid-joi-d-09-00064> >.

DEVELIOGLU, H.; UNVER SARAYDIN, S.; KARTAL, U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. **Dent Mater J**, v. 28, n. 4, p. 396-400, Jul 2009. ISSN 0287-4547 (Print)0287-4547. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ENELOW, R. I. et al. Cytokine-induced human multinucleated giant cells have enhanced candidacidal activity and oxidative capacity compared with macrophages. **J Infect Dis**, v. 166, n. 3, p. 664-8, Sep 1992. ISSN 0022-1899 (Print)0022-1899. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FERREIRA, G. R. et al. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. **Braz Dent J**, v. 15, n. 3, p. 175-80, 2004. ISSN 0103-6440. Disponível em: < <http://dx.doi.org/S0103-64402004000300002> >.

FRANÇA, V. P. et al. Experimental comparative study of bioactive composite with polymeric matrix for applications to oculoplastic surgery for tissue replacement. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 68, n. 4, p. 425-431, 08/2005 2005. ISSN 0004-2749. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0004-27492005000400003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.

GALIA, C. R. **Enxertos ósseos liofilizados e impactados humano e bovino em revisão de artroplastia total de quadril**. 2004. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul

GALIA, C. R. et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of Lyophilized Bovine Bone Biocompatibility. **Clinics**, v. 63, n. 6, p. 801-6, Dec 2008. ISSN 1807-5932 (Print)1980-5322 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/s1807-59322008000600016> >.

_____. Physicochemical characterization of lyophilized bovine bone grafts. **Rev. bras. ortop.**, v. 46, n. 4, p. 444-451, 00/2011 2011. ISSN 0102-3616. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-36162011000400017&lng=en&nrm=iso&tlng=en >.

GONÇALVES, F. O uso do substituto ósseo xenogênico em bloco OrthoGen em procedimento de enxertia intraoral. Avaliação clínica e histológica., <http://www.odontomedicalrs.com.br/OrthoGen-casos-clinicos-bx.pdf>, 2011. Disponível em: < <http://www.odontomedicalrs.com.br/OrthoGen-casos-clinicos-bx.pdf> >.

GOSAIN, A. K. Hydroxyapatite cement paste cranioplasty for the treatment of temporal hollowing after cranial vault remodeling in a growing child. **J Craniofac Surg**, v. 8, n. 6, p. 506-11, Nov 1997. ISSN 1049-2275 (Print)1049-2275. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GRETZER, C. et al. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 17, n. 6, p. 669-87, 2006. ISSN 0920-5063 (Print)0920-5063. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GUNTHER, K. P. et al. Osteointegration of solvent-preserved bone transplants in an animal model. **Osteologie**, v. 5, n. 1, p. 4-12, 1996. Disponível em: < http://www.novomedics.ch/cms/daten/file/TBA4_Guenther_1996_English.pdf >.

HERNANDEZ-PANDO, R. et al. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 α , tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β , during the course of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, v. 90, n. 4, p. 607-617, 1997. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2567.1997.00193.x/abstract> >.

IBANEZ, J. et al. Results of the biocompatible osteoconductive polymer (BOP) as an intersomatic graft in anterior cervical surgery. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 140, n. 2, p. 126-33, 1998. ISSN 0001-6268 (Print)0001-6268. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

IKEDA, T. et al. IL-13 as well as IL-4 induces monocytes/macrophages and a monoblastic cell line (UG3) to differentiate into multinucleated giant cells in the presence of M-CSF. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 253, n. 2, p. 265-72, Dec 18 1998. ISSN 0006-291X (Print)0006-291x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.9702> >.

JARDELINO, C. L. et al. Biocompatibility of Bovine Anorganic Xenograft. **Key Engineering Materials**, v. 396-398, p. 3-6, 2014. ISSN 978-0-87849-353-1. Disponível em: < <http://www.scientific.net/KEM.396-398.3.pdf> >.

JONES, J. A. et al. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. **J Biomed Mater Res A**, v. 83, n. 3, p. 585-96, Dec 1 2007. ISSN 1549-3296 (Print)1549-3296. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.31221> >.

JUDAS, F.; FIGUEIREDO, H.; DIAS, R. **Biomateriais em cirurgia ortopédica reconstrutiva**: Clínica Universitária de Ortopedia, HUC 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008.

KINOSHITA, Y.; MAEDA, H. Recent Developments of Functional Scaffolds for Craniomaxillofacial Bone Tissue Engineering Applications. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 1-24, 2013. ISSN 1537-744X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2013/863157> >.

KLUPPEL, L. E. et al. Bone repair is influenced by different particle sizes of anorganic bovine bone matrix: a histologic and radiographic study in vivo. **J Craniofac Surg**, v. 24, n. 4, p. 1074-7, Jul 2013. ISSN 1049-2275. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/SCS.0b013e318286a0a3> >.

KNESER, U. et al. Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model. **J Cell Mol Med**, v. 10, n. 3, p. 695-707, Jul-Sep 2006. ISSN 1582-1838 (Print)1582-1838. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LEMAIRE, I. et al. M-CSF and GM-CSF promote alveolar macrophage differentiation into multinucleated giant cells with distinct phenotypes. **J Leukoc Biol**, v. 60, n. 4, p. 509-18, Oct 1996. ISSN 0741-5400 (Print)0741-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIANG, L. et al. Adipose-derived stem cells combined with inorganic bovine bone in calvarial bone healing in rats with type 2 diabetes. **J Periodontol**, v. 85, n. 4, p. 601-9, Apr 2014. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2013.120652> >.

LUTTIKHUIZEN, D. T. et al. Material dependent differences in inflammatory gene expression by giant cells during the foreign body reaction. **J Biomed Mater Res A**, v. 83, n. 3, p. 879-86, Dec 1 2007. ISSN 1549-3296 (Print)1549-3296. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.31420> >.

M. ASHOK, N. M. S., S. NARAYANA KALKURA. Crystallization of hydroxyapatite at physiological temperature. v. 57, n. Issues 13–14, p. 2066–2070, April 2003 2003. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-577X\(02\)01140-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-577X(02)01140-0) >.

MANKANI, M. H. et al. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. **Stem Cells**, v. 24, n. 9, p. 2140-9, Sep 2006. ISSN 1066-5099 (Print)1066-5099. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2005-0567> >.

MARIANO, M.; SPECTOR, W. G. The formation and properties of macrophage polykaryons (inflammatory giant cells). **The Journal of Pathology**, v. 113, n. 1, p. 1-19, 1974. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1711130102/abstract> >. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1711130102/pdf> >.

MARINO, J. T.; ZIRAN, B. H. Use of solid and cancellous autologous bone graft for fractures and nonunions. **Orthop Clin North Am**, v. 41, n. 1, p. 15-26; table of contents, Jan 2010. ISSN 0030-5898. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ocl.2009.08.003> >.

MARINS, L. V. et al. 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**, v. 12, n. 1, p. 62-9, Mar 2004. ISSN 1678-7757 (Print)1678-7757. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MARX, R. E.; EHLER, W. J.; PELEG, M. "Mandibular and facial reconstruction" rehabilitation of the head and neck cancer patient. **Bone**, v. 19, n. 1 Suppl, p. 59s-82s, Jul 1996. ISSN 8756-3282 (Print)1873-2763. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MCALLISTER, B. S.; HAGHIGHAT, K. Bone augmentation techniques. **J Periodontol**, v. 78, n. 3, p. 377-96, Mar 2007. ISSN 0022-3492 (Print)0022-3492. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2007.060048> >.

MENDONÇA, T. A.; GRANJEIRO, J. M. **Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (Rattus norvegicus)**. 2005. text (Mestrado). Universidade de São Paulo

MEYER, S.; FLOERKEMEIER, T.; WINDHGEN, H. Histological osseointegration of Tutobone®: first results in human - Springer. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 128, n. 6, p. 539-544, 2008. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00402-007-0402-z> >.

MISCH, C. E. Biomateriais utilizados em implantes dentários. In: (Ed.). **Implantes dentários contemporâneos**. São Paulo: Editora Santos, v.2, 2000. p.271-302.

MISCH, C. E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dent**, v. 2, n. 3, p. 158-67, Fall 1993. ISSN 1056-6163 (Print)1056-6163. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MOKBEL, N. et al. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. **Oral Maxillofac Surg**, v. 12, n. 2, p. 73-8, Jul 2008. ISSN 1865-1550 (Print)1865-1550. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10006-008-0107-7> >.

NORTON, M. R. et al. Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. **Clin Oral Implants Res**, v. 14, n. 6, p. 775-83, Dec 2003. ISSN 0905-7161 (Print)0905-7161. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OLIVEIRA, A. C. P. **Comparação entre enxerto ósseo autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em modelo de cranioplastia em ratos**. 2002. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul

OLIVEIRA, L. S. A. F. et al. Biomaterials for bone regeneration - Methods of analyses and future perspectives. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. Supl. 1, p. 37-44, 2010. ISSN 1677-5090.

OLIVEIRA, M. R. B. D. **Compatibilidade biológica de materiais odontológicos em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos**. 2000. (Livre-docência). Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia de Araraquara Araraquara.

OLIVEIRA, R. C. D. et al. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular: avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, v. 7, n. 3/4, p. 85-93, 12/1999 1999. Disponível em: < [http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS\(=p&nexAction=Ink&exprSearch=298412&indexSearch=ID](http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS(=p&nexAction=Ink&exprSearch=298412&indexSearch=ID) >.

ORSI, V. V. et al. Bovine non-demineralized lyophilized bone with mesenchymal stem cells for tissue engineering: experimental study in heterotopic site. **Rev. Soc. Bras. Cir. Craniomaxilofac**, v. 10, n. 4, p. 133-139, 12/2008 2008. Disponível em: < [http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS\(=p&nexAction=Ink&exprSearch=505188&indexSearch=ID](http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS(=p&nexAction=Ink&exprSearch=505188&indexSearch=ID) >.

Orthogen. Porto Alegre, RS, 2011. Disponível em: < http://www.odontomedicalrs.com.br/folder_orthogen.pdf >.

PINHEIRO, A. L. et al. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: an in vivo study in a rodent model. **Photomed Laser Surg**, v. 26, n. 2, p. 167-74, Apr 2008. ISSN 1549-5418 (Print)1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2007.7027> >.

QUERESHY, F. A. et al. The efficacy of bioresorbable fixation in the repair of mandibular fractures: An animal study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 58, n. 11, p. 1263-1269, November 2000 2000. ISSN 0278-2391. Disponível em: < [http://www.joms.org/article/S0278-2391\(00\)60940-0/fulltext](http://www.joms.org/article/S0278-2391(00)60940-0/fulltext) >.

REMES, A.; WILLIAMS, D. F. Immune response in biocompatibility. **Biomaterials**, v. 13, n. 11, p. 731-43, 1992. ISSN 0142-9612 (Print)0142-9612. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SAINO, E. et al. Effect of electrospun fiber diameter and alignment on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1900-11, May 9 2011. ISSN 1525-7797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/bm200248h> >.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res**, n. 205, p. 299-308, Apr 1986. ISSN 0009-921X (Print)0009-921x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SEEBACH, C. et al. Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behaviour of human mesenchymal stem cells (MSC) in vitro. **Injury**, v. 41, n. 7, p. 731-8, Jul 2010. ISSN 0020-1383. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2010.02.017> >.

SHAPOFF, C. A. et al. The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogeneic freeze-dried bone and autogenous marrow. **J Periodontol**, v. 51, n. 11, p. 625-30, Nov 1980. ISSN 0022-3492 (Print)0022-3492. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1902/jop.1980.51.11.625> >.

SICCA, C. M. et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos: efeito do tamanho da partícula. **Rev. Fac. odontol. Bauru**, v. 8, n. 1/2, p. 1-10, 06/2000 2000. Disponível em: < [http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=BBO\(=p&nextAction=Ink&exprSearch=19068&indexSearch=ID](http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=BBO(=p&nextAction=Ink&exprSearch=19068&indexSearch=ID) >.

SILVA, R. A. et al. Effect of anti-inflammatory agents on the integration of autogenous bone graft and bovine bone devitalized matrix in rats. **Acta Cir Bras**, v. 23, n. 2, p. 140-8, Mar-Apr 2008. ISSN 0102-8650 (Print)0102-8650. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STAVROPOULOS, A. Deproteinized Bovine Bone Xenograft. In: PIETRZAK, S. (Ed.). **Musculoskeletal tissue regeneration: Biological materials and methods**. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. p.119-151. ISBN 978-1-59745-239-7.

STAVROPOULOS, A. et al. Clinical and histologic evaluation of a granular bovine bone biomaterial used as an adjunct to GTR with a bioresorbable bovine pericardium collagen membrane in the treatment of intrabony defects. **J Periodontol**, v. 82, n. 3, p. 462-70, Mar 2011. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2010.100331> >.

TAGA, R. et al. Evolução de enxertos ósseos autógenos e alógenos colocados em defeitos ósseos de tamanho crítico em calvária de cobaias. **BCI**, v. 7, n. 26, p. 37-44, 06/2000 2000. Disponível em: < [http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS\(=p&nextAction=Ink&exprSearch=302441&indexSearch=ID](http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS(=p&nextAction=Ink&exprSearch=302441&indexSearch=ID) >.

TAKAMORI, E. R. et al. **Biocompatibility evaluation of different granular porous anorganic bovine bone grafts**. [International Association for Dental Research](#). Toronto 2008.

TAVARES, D. D. S. **Avaliação *in vitro* do comportamento de células osteoprogenitoras e macrófagos humanos em pastilhas de fosfato tricálcio com e sem magnésio.** 2012. 119 (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

TESTORI, T. et al. Effect of xenograft (ABBM) particle size on vital bone formation following maxillary sinus augmentation: a multicenter, randomized, controlled, clinical histomorphometric trial. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 33, n. 4, p. 467-75, Jul-Aug 2013. ISSN 0198-7569. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.11607/prd.1423> >.

The National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Program: Dental Implants. 1988. Disponível em: < <http://consensus.nih.gov/1988/1988DentalImplants069html.htm> >.

TOMIDA, M. et al. Comparative examination of subcutaneous tissue reaction to high molecular materials in medical use. **Eur J Med Res**, v. 16, n. 6, p. 249-52, Jun 21 2011. ISSN 0949-2321 (Print)0949-2321. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TUDOR, C. et al. Bone regeneration in osseous defects-application of particulated human and bovine materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 105, n. 4, p. 430-6, Apr 2008. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.07.037> >.

WATAHA, J. C. Principles of biocompatibility for dental practitioners. **J Prosthet Dent**, v. 86, n. 2, p. 203-9, Aug 2001. ISSN 0022-3913 (Print)0022-3913. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1067/mpr.2001.117056> >.

WEIBEL, E. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. **Int Rev Cytol**, v. 26, p. 235-302, 1969. ISSN 0074-7696 (Print)0074-7696. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WENZ, B.; OESCH, B.; HORST, M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. **Biomaterials**, v. 22, n. 12, p. 1599-606, Jun 2001. ISSN 0142-9612 (Print)0142-9612. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WILSON, C. J. et al. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. **Tissue Eng**, v. 11, n. 1-2, p. 1-18, Jan-Feb 2005. ISSN 1076-3279 (Print)1076-3279. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/ten.2005.11.1> >.

YAMADA, S. et al. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. **Biomaterials**, v. 18, n. 15, p. 1037-41, Aug 1997. ISSN 0142-9612 (Print)0142-9612. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YILDIRIM, M. et al. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. **Clin Oral Implants Res**, v. 11, n. 3, p. 217-29, Jun 2000. ISSN 0905-7161 (Print)0905-7161. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YOSHIKAWA, T. Bone reconstruction by cultured bone graft. v. 13, n. Issues 1–2, p. 29–37, 1 September 2000 2000. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931\(00\)00173-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931(00)00173-9) >.

ZAMBUZZI, W. F. et al. Biological monitoring of a promissory xenogenic pin for biomedical applications: a preliminary intraosseous study in rats. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 3, p. 367-72, Mar 2012. ISSN 0905-7161. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.02143.x> >.

ZORZI, A. R.; MIRANDA, J. B. D. Introduction, Bone Grafting. In: ZORZI, D. A. (Ed.). **Bone Grafting**: InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0321-0.

Anexos

Anexo A - Aprovação do Projeto Pelo Comitê de Ética

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 025/2013

Bauru, 20 de agosto de 2013.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Avaliação histomorfométrica da biocompatibilidade do enxerto bovino misto (OrthoGen®) em tecido subcutâneo e do potencial osteogênico em defeito ósseo craniano**, de autoria de Tamiris Vallim Zambaldi de Oliveira, sob sua orientação, foi enviado a um relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão, realizada no dia **19 de agosto de 2013**.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que, ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>

Anexo B - Aprovação do Projeto de Pesquisa 2008

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

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

CEEPA-Proc. Nº 020/2008

Bauru, 13 de novembro de 2008.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado "Biocompatibilidade e potencial osteogênico do enxerto ósseo bovino Orto-gen® particulado e em bloco avaliados em tecido subcutâneo e defeitos ósseos perenes em calvária de ratos", de sua autoria 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,

Profª Drª Marlília Afonso Rabelo Buzalaf

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis
Docente do Departamento de Ciências Biológicas